

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Barbora Bulanová

Molekulárně-genetická analýza karcinomů štítné žlázy u dětských a
dospívajících pacientů

Molecular genetic analysis of thyroid carcinomas in pediatric and adolescent
patients

Dizertační práce

Vedoucí práce: RNDr. Vlasta Kuklíková, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení školitele:

Prohlašuji, že Mgr. Barbora Bulanová se zásadním způsobem podílela na vzniku všech čtyř publikací, které tvoří nedílnou součást této dizertační práce.

V Praze dne 24.11.2023

.....

RNDr. Vlasta Kuklíková, Ph.D.

Prohlášení autora práce:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24.11.2023

.....

Mgr. Barbora Bulanová

Poděkování:

Děkuji RNDr. Vlastě Kuklíkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a věnovaný čas při zpracovávání této dizertační práce. Dále bych ráda poděkovala vedoucímu laboratoře Oddělení molekulární endokrinologie Mgr. Josefu Včelákovi, ředitelce Endokrinologického ústavu doc. RNDr. Běle Bendlové, CSc. za pomoc v průběhu doktorského projektu a ochotu zabývat se vzniklými problémy. Mé poděkování patří i Ing. Karolíně Mastníkové a všem ostatním kolegům z našeho oddělení za podněty a vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji mému manželovi a rodičům za trpělivost, lásku a podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

U dětských a dospívajících pacientů se uzly ve štítné žláze objevují vzácně, ale je u nich větší riziko malignity než u dospělých pacientů. Karcinomy štítné žlázy představují nejčastější endokrinní malignitu, jejíž incidence stále narůstá. I když existuje několik typů karcinomů štítné žlázy, z 90 % případů se u dětských a dospívajících pacientů jedná o papilární karcinom štítné žlázy (PTC). Cílem práce bylo zanalyzovat rozsáhlý soubor PTC od dětských a dospívajících pacientů, zjistit jejich genetickou příčinu a nálezy korelovat s klinicko-patologickými daty. Dalším cílem bylo charakterizovat nejčastější nálezy a porovnat je se souborem dospělých pacientů pozitivních na tutéž mutaci. Posledním cílem bylo zoptimalizovat vhodnou metodiku pro detekci nejčastějších nálezů u dětských a dospívajících pacientů pro rutinní využití.

Vzorky nádorové tkáně štítné žlázy byly vyšetřeny pomocí molekulárně genetických metod, převážně za využití masivně paralelního sekvenování a analýzy real-time PCR. Zjistili jsme, že nejčastější příčinou PTC dětských a dospívajících pacientů jsou fúzní geny, které jsme detekovali v 56 % pacientů. Celkem bylo identifikováno 20 různých typů fúzních genů, z nichž některé nebyly dosud v literatuře popsány. Fúzní geny zahrnovaly onkogeny *RET*, *NTRK*, *BRAF*, *ALK*, *MET*. Dalšími genetickými změnami byly bodové mutace genů *BRAF* a *RAS*. Celkově se nám podařilo zjistit genetickou příčinu u 77 % pacientů. Při porovnání PTC pozitivních a negativních na fúzní gen jsme zjistili, že PTC pozitivní na fúzní gen byly agresivnější povahy a pacienti podstoupili intenzivnější léčbu. Nejčastějším nálezem byly *RET* a *NTRK* fúzní geny, které jsme zanalyzovali i u dospělého souboru. Pozitivní nálezy jsme charakterizovali na základě společných znaků. Provedli jsme i porovnání mezi kohortami dětských a dospělých pacientů se stejným typem mutace (*RET* nebo *NTRK* fúzní gen). Na základě dosažených výsledků jsme zavedli metodiku detekce fúzních genů, jak u předoperačních, tak i pooperačních vzorků štítné žlázy, která se osvědčila v rutinní praxi.

Tato dizertační práce je významným příspěvkem k pochopení patogeneze PTC u dětských a dospívajících pacientů a výsledky práce jsou navíc využitelné v rutinní praxi.

Klíčová slova:

papilární karcinom štítné žlázy, děti a dospívající, gen, mutace, fúzní gen, *RET*, *NTRK*

Abstract

Thyroid nodules are rare in pediatric and adolescent patients, but they are at greater risk of malignancy than adult patients. Thyroid carcinomas are the most common endocrine malignancy and their incidence is increasing. Although there are several types of thyroid carcinoma, 90% of cases in pediatric and adolescent patients are papillary thyroid carcinomas (PTCs). The aim of this study was to analyze a large cohort of PTCs from pediatric and adolescent patients, determine their genetic cause, and correlate the findings with clinical pathological data. Another aim was to characterize the most frequent findings and compare them with a cohort of adult patients with thyroid carcinoma positive for the same mutation. The final objective was to optimize a suitable methodology for detecting the most common findings in pediatric and adolescent patients for routine use.

Thyroid tumor tissue samples were examined using molecular genetic methods, mostly using next-generation sequencing and real-time PCR analysis. We found that fusion genes were the most common cause of PTC in pediatric and adolescent patients, detected in 56% of patients. In total, 20 different types of fusion genes were identified, some of which have not been previously described in the literature. The fusion genes included the oncogenes *RET*, *NTRK*, *BRAF*, *ALK*, *MET*. Other genetic alterations were point mutations in the *BRAF* and *RAS* genes. Overall, we were able to identify the genetic cause in 77% of patients. When comparing PTCs positive and negative for the fusion gene, we found that PTCs positive for the fusion gene were more aggressive and patients underwent more intensive treatment. The most common findings were *RET* and *NTRK* fusion genes, which we also analyzed in the adult cohort. We characterized the positive findings based on common features. We also performed comparisons between cohorts of pediatric and adult patients with the same type of mutation (*RET* or *NTRK* fusion gene). Based on our results, we established a method for detecting fusion genes in both preoperative and postoperative thyroid specimens, which has proven successful in routine practice.

This dissertation is a significant contribution to the understanding of the pathogenesis of PTC in pediatric and adolescent patients and, in addition, the results of this work are applicable in routine practice.

Key words: papillary thyroid carcinoma, children and adolescents, gene, mutation, fusion gene, *RET*, *NTRK*

Obsah

Seznam zkratk	8
Předmluva	10
1 Teoretický úvod	11
1.1 Nádory štítné žlázy a jejich typy	11
1.2 Epidemiologie a etiologie karcinomů štítné žlázy	13
1.3 Klinické a histopatologické znaky karcinomů štítné žlázy	15
1.4 Léčba	19
1.4.1 Chirurgická léčba	19
1.4.2 TSH suprese	20
1.4.3 Léčba radioaktivním jódem (RAI)	20
1.4.4 Léčba pomocí kinázových inhibitorů	21
1.4.5 Radioterapie a chemoterapie	21
1.5 Molekulárně-genetická podstata nádorů štítné žlázy	22
1.5.1 MAPK dráha	22
1.5.1.1 Tyrozinkinázové receptory	23
1.5.1.2 RAS	26
1.5.1.3 RAF	26
1.5.2 PI3K/AKT dráha	27
1.5.2.1 PI3K (fosfatidyl inositol 3-kináza)	28
1.5.3 Mutace dalších genů spojených se vznikem nádorů štítné žlázy	29
1.5.3.1 <i>TERT</i>	29
1.5.3.2 <i>TP53</i>	29
1.5.3.3 <i>EIF1AX</i>	30
1.5.3.4 <i>EZH1</i>	30
1.5.3.5 <i>CHEK2</i>	30
1.5.3.6 <i>PPM1D</i>	31
2 Cíle práce	32
3 Experimentální část	33
3.1 Publikace č. 1: Somatic genetic alterations in a large cohort of pediatric thyroid nodules	

3.2	Publikace č. 2: <i>RET</i> , <i>NTRK</i> , <i>ALK</i> , <i>BRAF</i> , and <i>MET</i> Fusions in a Large Cohort of Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas	46
3.3	Publikace č. 3: <i>NTRK</i> Fusion Genes in Thyroid Carcinomas: Clinicopathological Characteristics and Their Impact on Prognosis	61
3.4	Publikace č. 4: <i>RET</i> fusion genes in pediatric and adult thyroid carcinomas: cohort characteristics and prognosis	79
3.5	Propojující text mezi publikacemi	96
4	Diskuze	101
5	Závěr	108
6	Seznam literatury	110

Seznam zkratek

AK	amino acid	aminokyselina
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase	
ATC	anaplastic thyroid carcinoma	anaplastický karcinom štítné žlázy
ATP	adenosin triphosphate	adenosintrifosfát
CR1-3	conserved region 1-3	konzervovaný region 1-3
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	
FTC	follicular thyroid carcinoma	folikulární karcinom štítné žlázy
GAP	GTPase Activating Protein	
GDP	guanosin diphosphate	guanosindifosfát
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor	
GTP	guanosin triphosphate	guanosintrifosfát
HRAS	Harvey Rat Sarcoma	
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma	
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogenem aktivovaná protein kináza
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase	
MEN	multiple endocrine neoplasia	mnohočetná endokrinní neoplázie
MET	Mesenchymal Epithelial Transition	
MTC	medullary thyroid carcinoma	medulární karcinom štítné žlázy
NRAS	Neuroblastoma Rat Sarcoma	
<i>NTRK</i>	Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase	
OCA	oncocyctic carcinoma	onkocytární karcinom
PDTC	poorly differentiated thyroid carcinoma	nízce diferencovaný karcinom štítné žlázy
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	fosfatidylinositol 3-kináza
PIP2	phosphatidylinositol 4,5 biphosphate	fosfatidylinostol 4,5 disfosfát
PIP3	phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate	fosfatidylinostol 3,4,5 trisfosfát

PTC	papillary thyroid carcinoma	papilární karcinom štítné žlázy
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma	
RAI	radioactive iodine	radioaktivní jód
RAS	Rat Sarcoma	
RET	Rearranged during Transfection	
TCGA	The Cancer Genome Atlas	
TGL	thyroglobulin	tyreoglobulin
TKI	tyrosine kinase inhibitor	tyrozin kinázový inhibitor
TNM	tumor-node-metastasis	
TRK	Tropomyosin Receptor Kinase	
TSH	thyroid stimulating hormone	tyreoidální stimulační hormon
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace

Předmluva

Karcinomy štítné žlázy jsou nejčastější endokrinní malignitou, jejíž incidence se v posledních desetiletích stále zvyšuje. Nárůst v incidenci je bohužel zřejmý i u dětských a dospívajících pacientů, u nichž karcinomy štítné žlázy představují osmou nejčastější malignitu. Do jisté míry má na zvýšenou incidenci vliv technický pokrok zobrazovacích metod schopných odhalit karcinomy i o velmi malých rozměrech a celkově dostupnost vyšetření štítné žlázy. I tak se ale hovoří o nárůstu pokročilejších karcinomů. Etiologie u většiny případů karcinomů štítné žlázy není známa a je stále předmětem diskuzí. Mezi rizikové faktory patří ionizující záření, autoimunní zánětlivá onemocnění, obezita a genetické predispoziční syndromy.

Karcinomy štítné žlázy dětských a dospívajících pacientů se liší od karcinomů u dospělých pacientů. Z klinického hlediska jsou karcinomy dětských a dospívajících pacientů větší velikosti s vyšší mírou invazivity a častějšími lokálními a distálními metastázami. Na druhou stranu mají nižší riziko dediferenciace, velice příznivou prognózu a nízkou mortalitu. Tyto odlišnosti by mohla vysvětlit molekulárně genetická analýza karcinomů.

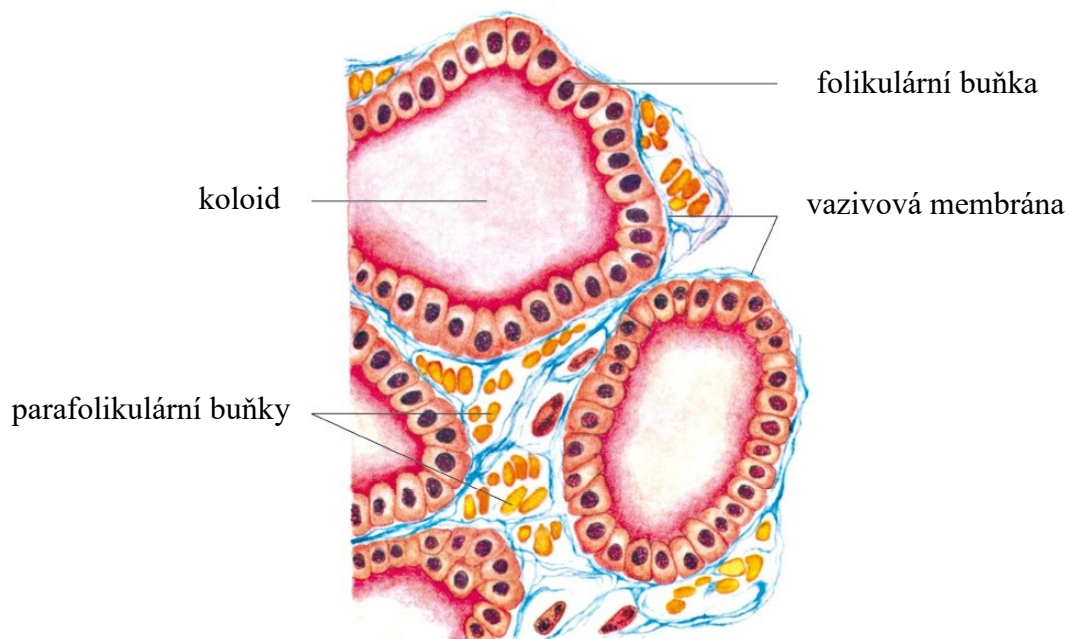
U karcinomů štítné žlázy se vyskytují mutace genů kódující proteiny hrající roli v signálních kaskádách, hlavně mitogen aktivované protein kinázové a fosfotidylinositol 3-kinázové dráze. Jedná se o bodové mutace genů *BRAF*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *RET*, *PIK3CA*, *PTEN*. Dále byly popsány fúzní geny, z nichž většina obsahuje region kódující intaktní kinázovou doménu tyrozin kinázového receptoru, např. *RET*, *NTRK*, *ALK* fúzní geny. V neposlední řadě byly publikovány mutace genů, jejichž produkty hrají jinou roli než v signalizačních kaskádách, např. v regulaci buněčného cyklu, opravách DNA, prodlužování délky telomér, translaci, modifikaci histonů.

Genetická příčina karcinomů štítné žlázy u dětských a dospívajících pacientů byla studována již dříve, avšak kvůli vzácnosti onemocnění probíhaly analýzy na malých souborech a za použití zastaralých technik. V současné době máme k dispozici nové přístroje a metodické postupy, díky nimž dokážeme odhalit i dosud nepopsané mutace. Znalost genetické podstaty vzniku karcinomů štítné žlázy u dětí by mohla přispět ke zpřesnění diagnózy, prognózy a personalizované léčbě.

1 Teoretický úvod

1.1 Nádory štítné žlázy a jejich typy

Štítná žláza je endokrinní orgán lokalizovaný na přední straně krku sahající od 5. krčního po 1. hrudní obratel. Morfologicky sestává z pravého a levého laloku, které jsou navzájem propojeny isthmem. V centrální části štítné žlázy může u některých jedinců vybíhat třetí tzv. pyramidální lalok. Štítná žláza hraje zásadní roli v regulaci bazálního metabolismu a má klíčovou roli v metabolismu vápníku. Při ontogenezi se štítná žláza vychlipuje ze střední části primitivního hltanu, který se skládá z buněk endodermu. Tyto progenitorové buňky štítné žlázy dávají vzniknout folikulárním buňkám štítné žlázy (Obr. 1), které vylučují hormony tyroxin a trijodthyronin. Tyto hormony působí na vývoj, růst a funkci většiny tkání a orgánů, ovlivňují rychlost látkové výměny a spotřebu kyslíku. Dalším typem buněk štítné žlázy jsou parafolikulární neboli C buňky (Obr. 1), které jsou také jako folikulární buňky odvozeny z endodermu a ne z buněk neurální lišty, jak bylo dříve předpokládáno (Johansson et al., 2015). Parafolikulární buňky vylučují polypeptidový hormon kalcitonin, jehož funkcí je ukládání vápníku a fosfátu v kosterních a dalších tkání (Das et al., 2017; Nilsson & Fagman, 2017).



Obrázek 1. Mikroskopická stavba štítné žlázy. Upraveno a přejato z https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_II/pages/zlazy.html

Na základě 5. edice WHO (World Health Organization) klasifikace endokrinních a neuroendokrinních tumorů se nádory štítné žlázy dělí na základě jejich buněčného původu, z jakých buněk je nádor odvozen. Od folikulárních buněk je odvozena většina nádorů štítné žlázy a dělí se na benigní, nízkorizikové a maligní neoplázie. Mezi benigní nádory patří folikulární nodózní onemocnění štítné žlázy a adenomy, které mohou být folikulární, onkocytární nebo folikulární s papilární architekturou. Mezi nízkorizikové neoplázie patří neinvazivní folikulární tumor s papilárními jadernými znaky, tumory nejistého maligního potenciálu a hyalinizující trabekulární tumor. Mezi maligní nádory štítné žlázy patří papilární karcinom (PTC), invazivní opouzdřená folikulární varianta papilárního karcinomu, folikulární karcinom (FTC), onkocytární karcinom (OCA), high-grade neanaplastický karcinom štítné žlázy z folikulárních buněk a anaplastický karcinom štítné žlázy (ATC) (Baloch et al., 2022).

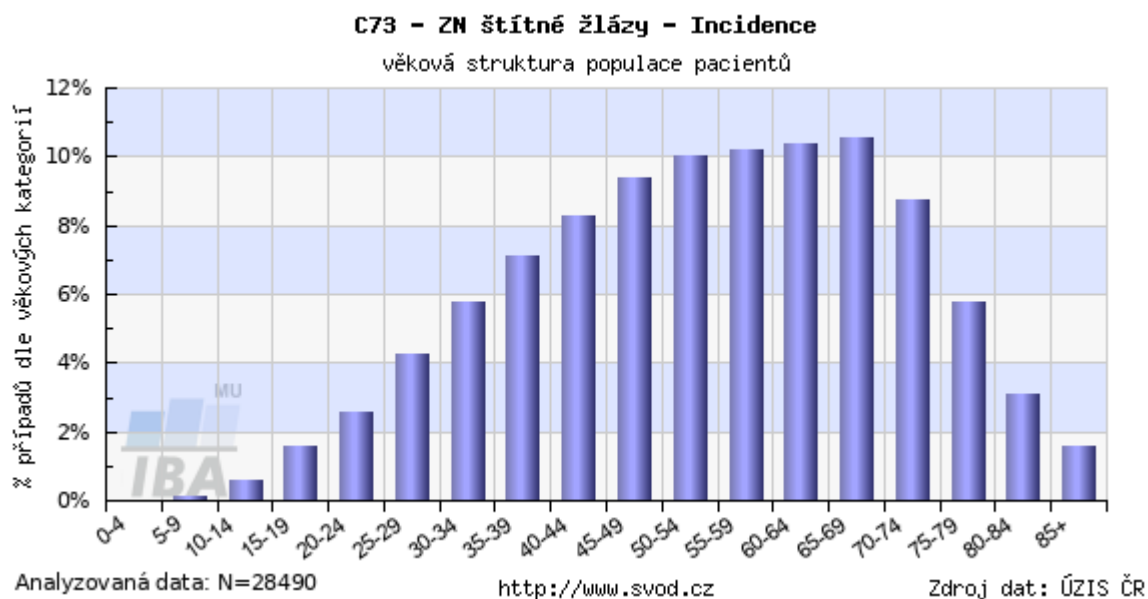
PTC se vyskytuje přibližně v 80-85 % případů maligního onemocnění štítné žlázy (LiVolsi, 2011). Obecně jsou PTC asociované s dobrou prognózou a nízkou mortalitou. Míra přežití je uváděna 96% po 5 letech, 93% po 10 letech a > 90 % po 20 letech od stanovení diagnózy (Milano, 2018). FTC a OCA jsou méně častými (kolem 5 %) typy karcinomů štítné žlázy, u kterých má rozsah invaze nádoru významný dopad na míru přežití. U FTC je uváděno 40měsíční přežití 97 % u minimálně invazivního karcinomu, 81 % u opouzdřeného karcinomu s angioinvazí a 45 % u široce invazivního karcinomu (O'Neill et al., 2011). U OCA bylo publikováno přežití 100 % pacientů s karcinomem bez angioinvaze a 20 % pacientů s karcinomem s přítomnou angioinvazí po 5 letech od diagnózy (Ghossein et al., 2006). High-grade neanaplastický karcinom štítné žlázy z folikulárních buněk se dělí na dva subtypy: diferencovaný high-grade karcinom a nízce diferencovaný karcinom štítné žlázy (PDTC). Jedná se o vzácné nádory, jejichž prevalence se pohybuje kolem 1 % (Akaishi et al., 2019; Asioli et al., 2010). Diferencovaný high-grade karcinom a velká část PDTC vznikají po synchronní nebo metachronní progresi dobře diferencovaných forem karcinomu z folikulárních buněk. Diferencovaný high-grade karcinom si stále zachovává vlastnosti dobře diferencovaných karcinomů. Na druhou stranu PDTC ztratil buněčnou diferenciaci (původní vlastnosti a funkci buněk). Jejich společným znakem je zvýšený počet mitóz a přítomnost nádorových nekróz (Baloch et al., 2022). ATC představuje přibližně 1 % všech tyreoidálních malignit, ale způsobuje většinu úmrtí na karcinom štítné žlázy. Medián přežití je 6 měsíců (Haigh, 2000). Více než jednoho roku se dožije kolem 20 % pacientů (Sherman et al., 2011; Smallridge & Copland, 2010).

Od parafolikulárních buněk je odvozen medulární karcinom štítné žlázy (MTC), který představuje cca 2 % tyreoidálních malignit a 8 % úmrtí spojených s karcinomem štítné žlázy (Lim et al., 2017). U MTC se rozlišuje familiární a sporadická forma. Familiární forma se vyskytuje až u 25 % případů (Mathiesen et al., 2018). Míra přežití je uváděna 5letá 75–96 % a 10letá 64–91 % a to v závislosti na stádiu onemocnění v době diagnózy (Mathiesen et al., 2019; Rendl et al., 2008). MTC produkuje kalcitonin, který je používán jako jeho biomarker.

U dětských a dospívajících pacientů v zachytu karcinomů štítné žlázy výrazně převládá PTC, vyskytující se přibližně v 90 % případů. FTC a MTC se vyskytují v jednotkách procent (Guleria et al., 2022; Hogan et al., 2009). V případě FTC se většinou jedná o minimálně invazivní karcinomy spojené s příznivou prognózou. V případě nálezu MTC se z více než 95 % jedná o familiární formu onemocnění (Waguespack et al., 2011). OCA, PDTC a ATC byl u dětských a dospívajících pacientů popsán pouze v ojedinělých případech (Mon & Newlon, 2015; Wu et al., 2011; Zirilli et al., 2020).

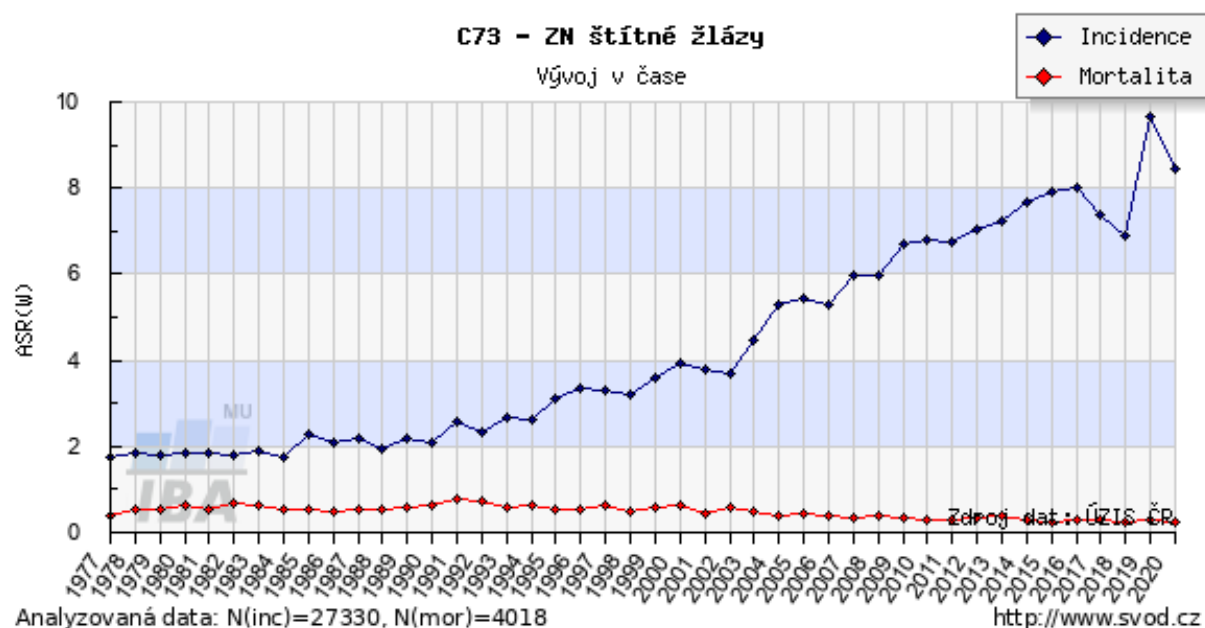
1.2 Epidemiologie a etiologie karcinomů štítné žlázy

Karcinomy štítné žlázy představují nejčastější endokrinní malignitu a tvoří 1.5-3 % všech maligních onemocnění jak u dospělých, tak i dětských pacientů (Ferlay et al., 2013; Greenlee et al., 2001). Ženy toto onemocnění postihuje přibližně třikrát častěji než muže. Karcinomy štítné žlázy u žen představují 5. nejčastější malignitu po karcinomech prsu, plic, kolorekta a dělohy. U mužů jim patří až 16. příčka (Cronin et al., 2022). U adolescentních pacientů jsou karcinomy štítné žlázy 8. nejčastější malignitou a u dívek jsou dokonce 2. nejčastějším nádorovým onemocněním (Hogan et al., 2009). Medián věku pacientů v době stanovení diagnózy je 49 let u žen a 54 let u mužů (Howlader N, 2019). V České republice pacienti do 20 let představují pouze 2,33 % pacientů s diagnózou karcinomu štítné žlázy (Obr. 2).



Obrázek 2. Věková struktura populace pacientů s karcinomy štítné žlázy v České republice. Převzato z <https://svod.cz>, ZN zhoubný nádor

Incidence karcinomů štítné žlázy se za poslední čtyři dekády stále zvyšuje (Obr. 3). Mezi lety 1975-1995 byl zaznamenán nárůst 0,8 % ročně a mezi lety 1996-2016 dokonce 4,6 % ročně (Howlader N, 2019). I když se mezi hlavní příčiny vzrůstající incidence uvádí zvýšená citlivost zobrazovacích metod a častější sledování většího počtu pacientů, je zaznamenán i vyšší počet karcinomů větších rozměrů a celkově pokročilejšího onemocnění (Lim et al., 2017).



Obrázek 3. Nárůst incidence karcinomů štítné žlázy v České republice. Sledované období mezi lety 1977-2021. Převzato z <https://svod.cz>, ZN zhoubný nádor

Jedním z rizikových faktorů je ionizující záření, a to zejména pokud jsou mu vystaveni jedinci dětského věku. Byla zdokumentována zvýšená incidence karcinomů štítné žlázy u přeživších výbuchu atomových bomb v Hirošimě a Nagasaki během 2. světové války, obzvláště u jedinců, kterým bylo v době ozáření méně než 20 let (Furukawa et al., 2013). V souvislosti s haváriemi jaderných elektráren Černobylu a Fukušimy byl zaznamenán nárůst incidence karcinomů štítné žlázy u dětských a dospívajících jedinců (Ohtsuru et al., 2019; Pacini et al., 1997). Dalším rizikovým faktorem, hlavně u pediatrických pacientů, je terapeutické ozařování pro jinou primární malignitu, nejčastěji leukémii či lymfom (Hess et al., 2021). Karcinomy štítné žlázy jsou u dětí nejčastější sekundární malignitou (Rose et al., 2012; Turcotte et al., 2017). Vyšší riziko vzniku karcinomu koreluje s vyšší dávkou ozáření, nižším věkem pacienta a riziko přetrvává i desítky let po ozáření (Lene et al., 2012).

Mezi další rizikové faktory se uvádí autoimunitní zánětlivá onemocnění štítné žlázy, jódová deficience v potravě a obecně vystavení se škodlivým vlivům vnějšího prostředí. Přítomnost Hashimotovy tyreoiditidy koreluje s výrazně vyšším rizikem vzniku karcinomu. Možnou příčinou vzniku karcinomu ve spojitosti se zánětlivým onemocněním štítné žlázy je zvýšená buněčná proliferace, angiogeneze, redukováná apoptóza a nadprodukce tyreoidálního stimulačního hormonu (TSH) (Penta et al.).

Dalším rizikovým faktorem je obezita. Paralelně s nárůstem případů karcinomů štítné žlázy, vzrůstala i prevalence obezity, jak u dospělých, tak i u dětí. Mezi lety 1980 až 2013 prevalence obezity vzrostla o 27,5 % u dospělých a o 47,1 % u dětí (Ng et al., 2014; Schmid et al., 2015).

Za vznikem karcinomu štítné žlázy může stát také genetický predispoziční syndrom. PTC je z 95 % případů sporadický a pouze z 5 % familiární povahy. Mezi nejznámější syndromy spjaté s nádory štítné žlázy patří: DICER1 syndrom, PTEN hamartoma syndrom a familiární adenomatózní polypóza. S diagnózou familiárního MTC jsou spjaty syndromy mnohočetná endokrinní neoplázie (MEN) typu 2A a MEN typu 2B (Peiling Yang & Ngeow, 2016).

1.3 Klinické a histopatologické znaky karcinomů štítné žlázy

U karcinomů štítné žlázy jsou sledovány následující klinické a histopatologické znaky, na základě kterých se odvíjí léčba pacientů a je stanovena prognóza onemocnění: věk a pohlaví pacienta, typ a případný subtyp karcinomu, velikost nádoru, fokalita, invaze přes pouzdro nádoru, extratyreoidální extenze, angioinvaze, nekróza, mitotická aktivita, lokální metastázy, distální metastázy.

Věk pacienta je u karcinomů štítné žlázy klíčovým prognostickým indikátorem. Udává se, že pacienti mladší 55 let mají lepší prognózu než pacienti věku 55 let a výše (Nixon et al., 2016). Dalším prognostickým indikátorem je pohlaví pacienta. Muži s diagnózou MTC byly asociovány s horší prognózou než ženy (Costa et al., 2022). V případě diagnózy PTC, se udává, že u pacientů do věku 55 let mají ženy významně lepší prognózu než muži. Pokud je pacientům s PTC nad 55 let, mají muži a ženy prognózu srovnatelnou (Zhang et al., 2018).

Jednotlivé typy karcinomů jsou uvedeny v kapitole 1.1 Nádory štítné žlázy. U PTC je na základě rozdílných morfologických znaků rozlišováno několik následujících subtypů: klasický, klasický opouzdřený, infiltrativní folikulární, difúzně sklerotizující, solidní/trabekulární, warthin-like, onkocytární, jasnobuněčný, vřetenobuněčný, s fibromatózním stromatem, vysokobuněčný, hobnail a kolumnární. S vyšší agresivitou onemocnění je spojován infiltrativní folikulární, difúzně sklerotizující, solidní, vysokobuněčný a hobnail subtyp PTC. U FTC a OCA jsou rozlišovány následující subtypy: minimálně invazivní, opouzdřený angioinvazivní a široce invazivní (Baloch et al., 2022).

Velikost karcinomu může být od zlomku milimetru až po cca 15 cm (Harahap et al., 2022; Harjit & Hisham, 2005). O karcinomech, které jsou ≤ 10 mm, se hovoří jako o tzv. mikrokarcinomech. Obecně jsou mikrokarcinomy spjaty s excelentní prognózou. Existuje však několik výjimek, kdy je nutná větší obezřetnost, 1) pokud je pacient mladší 19 let, 2) nádor je multifokální a při součtu průměrů všech ložisek je výsledná hodnota větší než 1 cm, 3) jsou přítomny agresivní morfologické znaky jako je extratyreoidální extenze, angioinvaze a určité subtypy karcinomů (Aliyev et al., 2020). Dříve byl mikrokarcinom považován za samostatný subtyp, v nové edici WHO klasifikace se to již z výše uvedených důvodů nedoporučuje.

Karcinom štítné žlázy se může projevovat jedním (unifokální) nebo dvěma či více anatomicky oddělenými ložisky (multifokální). Multifokalita může být výsledkem více nezávislých nádorů nebo důsledkem intratyreoidálního šíření jedné nádorové masy. Dále je v případě multifokality rozlišováno, zda jsou ložiska umístěna v rámci jednoho laloku (unilaterálně) nebo v obou lalocích štítné žlázy (bilaterálně.) Multifokalita se u PTC objevuje přibližně ve 30 % případů a je spojena s vyšším rizikem metastáz do lymfatických uzlin a horší prognózou (Genpeng et al., 2018; Kuhn et al., 2012; Polat et al., 2019).

Extratyreoidální extenze je definována jako invaze nádorových buněk přes pouzdro štítné žlázy do přiléhajících struktur. Je rozlišováno, zda se jedná o mikroskopickou extenzi zasahující do těsně přiléhajících struktur a měkkých tkání či makroskopickou extenzi zasahující do svaloviny,

podkožních měkkých tkání, hrtanu, jícnu, průdušnice, zvrtného nervu, prevertebrální fascie, mediastinálních cév nebo krční tepny. Extratyreoidální extenze, ať už mikroskopická nebo makroskopická, je spojena s horší prognózou (Liu et al., 2019).

Angioinvaze popisuje rozšíření nádorových buněk do krevních cév. Častěji se vyskytuje u FTC a pokročilejších typů karcinomů štítné žlázy než u PTC, kde bývá přítomna v 6-12 % případů (Furlan et al., 2004; Mai et al., 2002). Angioinvaze koreluje s vyšším rizikem distálních metastáz (Mai et al., 2002). Nádorová nekróza a zvýšená mitotická aktivita (≥ 5 mitóz/10 zorných polí při velkém zvětšení) bývá přítomna u pokročilejších karcinomů jako je PDTC nebo ATC, vzácněji u diferencovaných karcinomů štítné žlázy (Wong et al., 2020). Angioinvaze, přítomnost nekrotických čí zvýšená mitotická aktivita je znakem agresivnějšího onemocnění a horší prognózy.

Lokální metastázy karcinomu štítné žlázy postihují lymfatické uzliny v oblasti krku a vyskytují se průměrně u 37 % případů (Mao et al., 2020). Je rozlišováno, zda se metastázy nacházejí v centrálním či laterálním krčním kompartmentu, přičemž jejich přítomnost v laterálním kompartmentu je spojena s častější recidivou onemocnění (Heng et al., 2022). Dalším ukazatelem z hlediska léčby a prognózy je velikost metastáz, přítomnost extranodálního šíření a počet metastaticky postižených lymfatických uzlin z celkového počtu vyšetřených uzlin. Na toto téma vzniklo mnoho studií, avšak nedošlo k jednoznačné shodě, od jaké velikosti a počtu metastáz je onemocnění spojeno s horší prognózou (Wang & Ganly, 2016).

Vzdálené neboli distální metastázy karcinomu štítné žlázy se vyskytují u 1-4 % případů a výrazně zvyšují mortalitu. Je udáváno, že 5leté přežití v případě vzdálených metastáz do jednoho orgánu je 78% a v případě multiorgánových metastáz pouze 15% (Wang et al., 2014). Ve většině případů distální metastázy karcinomu štítné žlázy postihují plíce, v necelé třetině případů kosti, vzácně játra a mozek. U přibližně čtvrtiny pacientů se vzdálenými metastázami je přítomno multiorgánové postižení (Toraih et al., 2021).

Karcinomy štítné žlázy jsou podobně jako jiné solidní nádory klasifikovány na základě TNM (tumor-node-metastasis) systému, který se neustále vyvíjí a momentálně je u karcinomů štítné žlázy platná jeho osmá edice (Tab. 1). TNM systém klasifikuje karcinomy na základě jejich velikosti, invazivity a přítomnosti lokální a vzdálených metastáz. Na základě TNM kategorií se na počátku léčby stanovují prognostická TNM stadia I-IV. Vzhledem k obecně příznivější prognóze u mladších pacientů se u pediatrických a dospělých pacientů do 55 let určují pouze stadia I a II, a to na základě absence či přítomnosti distálních metastáz (Tuttle et al., 2017).

Tabulka 1. TNM klasifikace karcinomů štítné žlázy. Převzato a upraveno z (Tuttle et al., 2017).

TNM klasifikace karcinomů štítné žlázy (8. edice)		
TX		Primární nádor nemůže být hodnocen
T0		Primární nádor nenalezen
T1		Nádor je ≤ 2 cm v největším rozměru a je omezený na štítnou žlázu
	T1a	Nádor je ≤ 1 cm v největším rozměru a je omezený na štítnou žlázu
	T1b	Nádor je > 1 cm ale ≤ 2 cm v největším rozměru a je omezený na štítnou žlázu
T2		Nádor je > 2 cm ale ≤ 4 cm v největším rozměru a je omezený na štítnou žlázu
T3		Nádor je > 4 cm, omezený na štítnou žlázu nebo je přítomna makroskopická extratyreoidální extenze zasahující do příčně pruhované svaloviny
	T3a	Nádor je > 4 cm a je omezený na štítnou žlázu
	T3b	Makroskopická extratyreoidální extenze zasahující do příčně pruhované svaloviny, nádor je jakékoliv velikosti
T4		Makroskopická extratyreoidální extenze do hlavních struktur krku, nádor je jakékoliv velikosti
	T4a	Makroskopická extratyreoidální extenze do podkožních měkkých tkání, hrtanu, jícnu, průdušnice nebo zvratného nervu
	T4b	Makroskopická extratyreoidální extenze do prevertebrální fascie, do krční tepny nebo mediastinálních cév
NX		Metastázy v regionálních lymfatických uzlinách nemohou být hodnoceny
N0		Bez známek metastáz v regionálních lymfatických uzlinách
N1		Metastázy v regionálních lymfatických uzlinách
	N1a	Metastázy do lymfatických uzlin v centrálním kompartmentu
	N1b	Metastázy do lymfatických uzlin v laterálním kompartmentu
M0		Bez vzdálených metastáz
M1		Vzdálené metastázy

U pediatrických pacientů jsou pozorovány karcinomy štítné žlázy agresivnější povahy než u dospělých pacientů. Pediatři mají větší nádory než dospělí pacienti, přestože jejich štítná žláza je menších rozměrů. U pediatrických pacientů je také častěji popisována extratyreoidální extenze, lokální a distální metastázy a multifokalita nádoru (Dinauer et al., 2008). Na druhou stranu mají pediatři s karcinomem štítné žlázy nižší riziko dediferenciace nádoru a mortality (Hay et al., 2018). Vzhledem ke klinickým odlišnostem mezi dětskou a dospělou populací vydaly odborné společnosti doporučení týkající se managementu nádorů štítné žlázy určená přímo pro dětské pacienty. Doporučení byla vydána v roce 2015 Americkou a v roce 2022 Evropskou tyreoidální asociací (Francis et al., 2015; Lebbink et al., 2022).

1.4 Léčba

V případě nálezu suspektního uzlu štítné žlázy, je zvaženo provedení aspirační biopsie uzlu tenkou jehlou pod ultrasonografickou kontrolou. Odebraný vzorek tkáně je cytologicky zhodnocen, případně je provedeno i molekulárně genetické vyšetření. Patologové pro zhodnocení nálezu používají Bethesda Systém pro reportování tyreoidálních cytopatologií (Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology) klasifikující vzorky do 6 kategorií. Bethesda I označuje nediagnosticský vzorek, Bethesda II benigní vzorek, Bethesda III atypii nejistého významu, Bethesda IV folikulární neoplázií, Bethesda V podezření z malignity a Bethesda VI malignitu. Bethesda System pro cytopatologii štítné žlázy byl poprvé zaveden v roce 2010, dnes se používá již 3. edice, která vyšla v letošním roce (Ali et al., 2023). Na základě anamnézy, sonografického nálezu, cytologického, příp. molekulárně genetického výsledku je stanoven způsob léčby. Jednou z možností je chirurgická léčba, která může být elektivní, diagnostická nebo i v případě predispozičního syndromu profylaktická.

1.4.1 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba nádorů štítné žlázy je základní léčebnou metodou, v některých případech i jedinou, kterou pacient podstoupí. Chirurgický výkon je členěn na základě rozsahu na hemityreoidektomii (odstranění jednoho laloku štítné žlázy) a totální tyreoidektomii (odstranění celé štítné žlázy) s případnou disekcí lymfatických uzlin. Určení vhodného rozsahu operace je stále předmětem diskuzí. Panují značné odlišnosti v závislosti na tom, v jakém státě se pracoviště, kde se tyreoidektomie provádí, nachází. Rozsah výkonu ovlivňují klinická data (věk pacienta, anamnéza), data ze zobrazovacích metod, nejčastěji z ultrasonografie, a výsledek cytologického a případně i genetického vyšetření. Z hlediska zobrazovacích metod jsou obecně posuzovány znaky, jako je velikost, ohraničení a umístění nádoru, přítomnost metastáz apod. Mezi hlavní komplikace hrozící při chirurgických výkonech patří dočasná či trvalá paréza zvratného nervu, odstranění příštítných tělísek, projevující se následnou hypoparatyreózou s tetanickými křečemi a parestéziemi, a zvýšené krvácení. U geneticky prokázané familiární formy MTC je pacientových příbuzných s patogenní mutací genu *RET* (Rearranged during transfection) prováděna profylaktická totální tyreoidektomie (Nixon et al., 2013).

U pediatrických pacientů s podezřením na karcinom štítné žlázy se ve většině případů provádí totální tyreoidektomie z důvodu vyššího rizika malignity tyreoidálních uzlů oproti dospělým a časté bilaterality onemocnění. Dalším důvodem je zvýšené riziko recidivy onemocnění u pacientů chirurgicky léčených pomocí hemityreoidektomie (Hay et al., 2010). U pacientů

s přítomností nebo zvýšeným rizikem metastáz v lymfatických uzlinách se provádí disekce lymfatických uzlin v centrálním nebo laterálních kompartmentech (Lebbink et al., 2022).

1.4.2 TSH suprese

Cirkulující TSH stimuluje folikulární buňky k proliferaci, čímž vzrůstá riziku vzniku nádorového ložiska. Po tyreoidektomii je proto u pacientů TSH udržováno v rozmezí 0,1-0,5 mU/l (případně i jinak po zhodnocení rizikovosti pacienta) podáváním syntetických hormonů štítné žlázy. TSH suprese může mít nežádoucí vedlejší účinky jako je osteoporóza u postmenopauzálních žen nebo negativní vliv na srdce (Brancatella & Marcocci, 2020).

Pacient je po chirurgické léčbě pravidelně sonograficky sledován a je mu kontrolována nejen hladina TSH, ale také tyreoglobulinu (TGL), který slouží jako nádorový marker pro hodnocení účinnosti léčby a ukazatel, zda nedochází k recidivě onemocnění.

1.4.3 Léčba radioaktivním jódem (RAI)

Pacient, který podstoupil totální tyreoidektomii a histologicky mu byl diagnostikován diferencovaný karcinom štítné žlázy je posouzen pro léčbu RAI (^{131}I). RAI je smíšeným β a γ zářičem s fyzikálním poločasem rozpadu 8 dní. RAI je vysoce selektivní pro folikulární buňky štítné žlázy, vstupuje přes jejich natrium-jodidový symportér a vysílá krátkovlnné β záření, které způsobuje akutní buněčnou smrt. Léčba je podávána pro eliminaci zbytků tkáně štítné žlázy, čímž se snižuje riziko recidivy a zvyšuje se senzitivita diagnostických testů jako je scintigrafie a hladina TGL, pro zjištění metastatického či reziduálního onemocnění a pro ablaci reziduálních nádorových ložisek či metastáz, ať už lokálních, tak i distálních. Na základě hladiny stimulovaného TGL a dalších parametrů je pacientovi, který je v hypotyreóze, podána optimální dávka RAI, která může být v rozsahu 50-200 mCi. Na postterapeutické celotělové scintigrafii se zobrazí ložiska akumulující radiofarmakum (Nguyen et al., 2015).

V 5-15 % případů jsou ložiska diferencovaného karcinomu štítné žlázy refrakterní k léčbě RAI (Worden, 2014). Zda je karcinom RAI refrakterní, může pomoci určit několik následujících klinických scénářů. 1) Na diagnostické scintigrafii ^{131}I není přítomen žádný záchyt radiofarmaka, 2) Na scintigrafii ^{131}I provedeném několik dní po terapii ^{131}I není přítomen žádný záchyt radiofarmaka, 3) Akumulace ^{131}I je přítomna pouze v některých, ale ne ve všech nádorových ložiskách, 4) Metastázy karcinomu progredují navzdory akumulaci ^{131}I , 5) Metastázy karcinomu progredují navzdory kumulativní aktivitě $^{131}\text{I} > 600$ mCi. Pokud je karcinom RAI refrakterní, není další léčba pomocí RAI efektivní a je nutné zvolit jiné možnosti léčby (Tuttle et al., 2019).

1.4.4 Léčba pomocí kinázových inhibitorů

V případě progredujícího RAI refrakterního nebo pokročilého metastatického karcinomu štítné žlázy může být pacient indikován k léčbě pomocí kinázových inhibitorů, které mohou být nespecifické (necílené) nebo specifické (cílené). Nespecifické kinázové inhibitory účinkují na vícero kináz, proto se nazývají multikinázové inhibitory. Nespecifické inhibitory byly objeveny a používány dříve než inhibitory specifické. Mezi nejznámější multikinázové inhibitory patří: vandetanib, cabozantinib, sorafenib, lenvatinib. K použití specifických kinázových inhibitorů je nejprve nutné provést molekulárně genetické vyšetření, a na základě pozitivního výsledku se zvolí farmakum účinné pro konkrétní detekovanou mutaci (Tab. 2). Výhodou cílených kinázových inhibitorů je obecně jejich vyšší efektivita, nižší toxicita léčby a možnost jejich použití i u pediatrických pacientů (Mascarenhas et al., 2022; Merino et al., 2022; Morgenstern et al., 2021; Romero, 2023). V poslední době počet typů cílených kinázových inhibitorů používaných v rámci klinických studií významně narůstá (Lubitz et al., 2021; Markham, 2020).

Tabulka 2. Možnost cílené léčby na základě prokázané genetické změny.

Genetická změna	Cílený kinázový inhibitor
<i>NTRK</i> fúzní gen	larotrectinib, entrectinib
<i>RET</i> bodová mutace nebo <i>RET</i> fúzní gen	selpercatinib, pralsetinib
<i>ALK</i> fúzní gen	crizotinib, alectinib
<i>BRAF</i> V600X	dabrafenib + trametinib
<i>BRAF</i> fúzní gen	trametinib

1.4.5 Radioterapie a chemoterapie

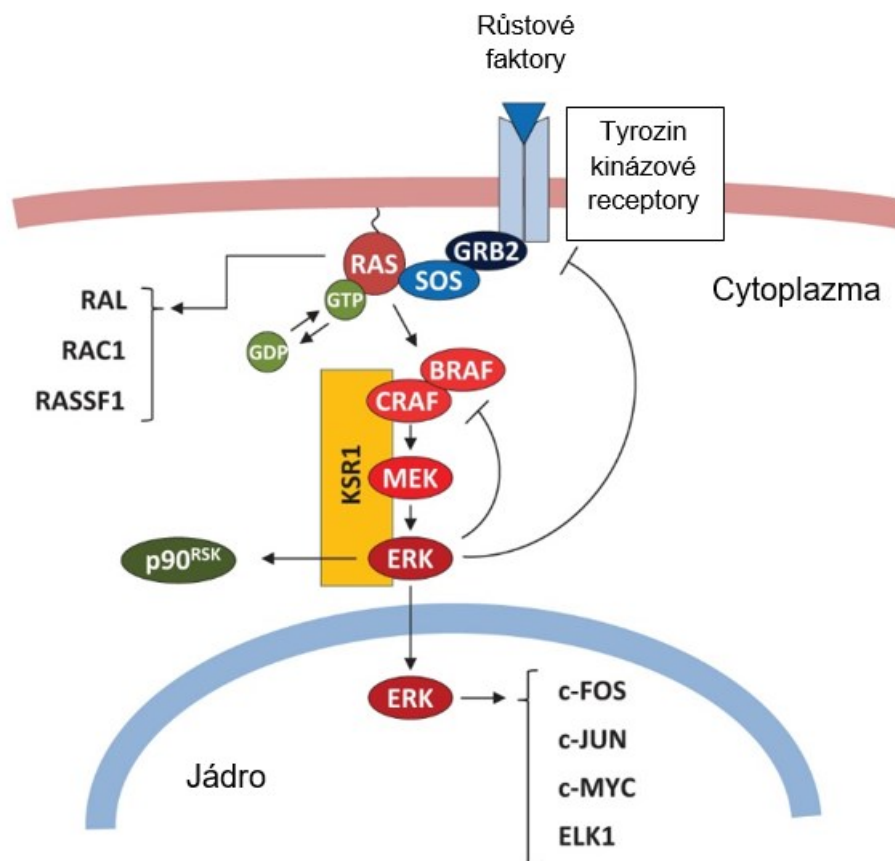
Léčba pomocí radioterapie využívá vysokoenergetického ionizujícího záření nebo částic pro eliminaci nádorových buněk nebo zpomalení jejich růstu. Momentálně je nejčastěji používaný lineární urychlovač, u něhož je možnost volby různé energie záření podle umístění karcinomu. Zevní ozáření může být použito pro zmenšení nádorové masy před samotnou operací či u inoperabilních nádorů štítné žlázy. Nevýhodou této léčby je postižení okolní zdravé tkáně. Chemoterapie je pro léčbu karcinomů štítné žlázy aplikována vzácně (např. u ATC). Výhodou je možnost její kombinovatelnosti s radioterapií. Radioterapie a chemoterapie je ve většině případů používána po vyčerpání jiných možností léčby (Kiess et al., 2016).

1.5 Molekulárně-genetická podstata nádorů štítné žlázy

Za vznik nádorů štítné žlázy jsou ve většině případů zodpovědné patogenní mutace v genech kódující proteiny mitogen aktivované protein kinázové (MAPK) a fosfotidylinositol 3-kinázové (PI3K) signalizační dráhy, které jsou v důsledku konstitutivně aktivní. Patogenní genetickou změnou mohou být bodové mutace, rozsáhlejší delece či inserce, změna počtu kopií genů nebo vznik fúzních genů. V minoritních případech jsou pozorovány u nádorů štítné žlázy mutace genů kódující proteiny účastnících se jiných signalizačních drah či mutace genů kódující proteiny hrající roli v regulaci buněčného cyklu a oprav DNA. Existují i další mechanismy, které dokáží spustit buněčnou transformaci a proliferaci. V této kapitole budou představeny hlavní mechanismy vzniku nádorů štítné žlázy (Zaballos & Santisteban, 2017).

1.5.1 MAPK dráha

MAPK dráha reguluje pro buňku zásadní procesy jako je diferenciace, proliferace, migrace, apoptóza a autofágie (Lavoie et al., 2020). Tato dráha se skládá z kaskády proteinů zprostředkovávající signál z membránového receptoru do jádra buňky (Obr. 4). Signál začíná vazbou extracelulární signální molekuly (mitogenu) na tyrozin kinázový receptor. Receptor po navázání mitogenu dimerizuje a dojde k fosforylaci tyrozinových zbytků v cytoplazmatické doméně receptoru. Adaptorový protein (např. GRB2, SHC1) se váže svojí SH2 nebo PTB doménou na fosforylované tyrozinové zbytky receptoru. Na adaptorový protein se naváže přes dvě SH3 domény SOS protein, který se vazbou aktivuje, čímž dojde k výměně guanosindifosfátu (GDP) na RAS proteinu za guanosintrifosfát (GTP) a RAS (Rat Sarcoma) protein se stává aktivní. RAS aktivuje kinázu RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma), ta aktivuje kinázu MEK (Mitogen-activated Protein Kinase Kinase) a MEK kináza aktivuje ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase). Aktivaci napomáhá scaffold protein jako je např. KSR1. ERK kináza může fosforylovat až 200 různých substrátů (např. transkripční faktory, cyklin D, s mikrotubuly asociované proteiny). V průběhu let byly identifikovány aktivační mutace genů kódující proteiny této signalizační dráhy, čímž je způsobena konstitutivní aktivace MAPK dráhy hrající klíčovou roli při vzniku nejen karcinomů štítné žlázy, ale i mnoha jiných typů maligního onemocnění (Zaballos & Santisteban, 2017; Zhang & Liu, 2002).



Obrázek 4. MAPK signální kaskáda. Převzato a upraveno (Zaballos & Santisteban, 2017).

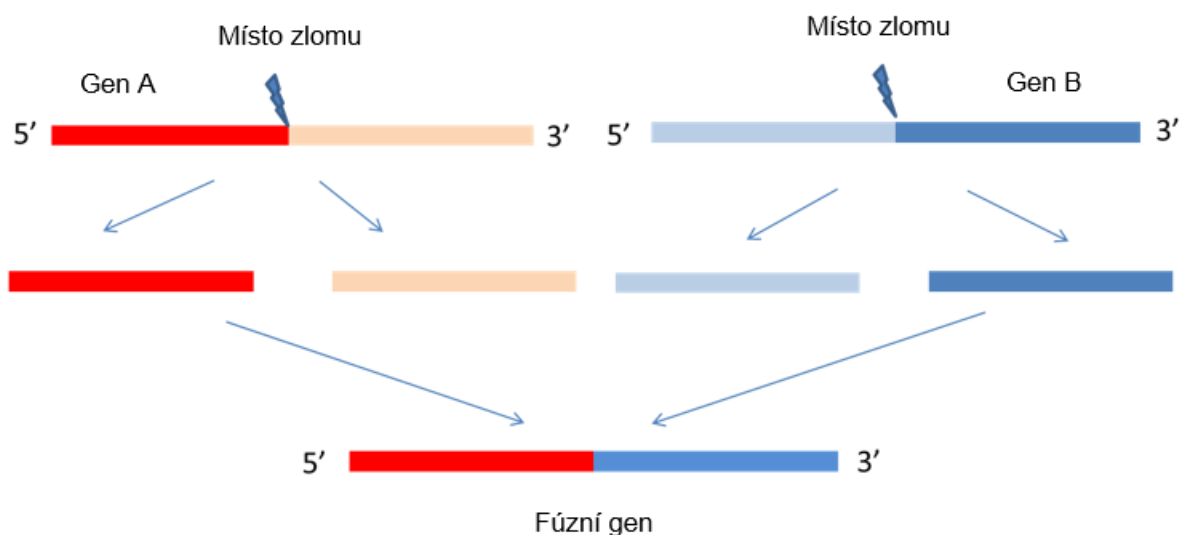
1.5.1.1 Tyrozinkinázové receptory

Tyrozinkinázové membránové receptory mají vysokou afinitu pro různé růstové faktory, cytokiny a hormony. Je známo přibližně 90 tyrozinkináz, z nichž 58 je receptorových. Většina receptorů je jednopodjednotková, ale mohou být i multimerní, např. inzulínový receptor, který tvoří dimery spojené disulfidickými můstky v přítomnosti hormonu inzulínu. Tyrozinkinázové membránové receptory se skládají ze tří domén: extracelulární doména (N-konec), transmembránová domény a intracelulární doména (C-konec). Extracelulární doména obsahuje různé konzervované elementy, např. Ig-like domény, opakování fibrotinového typu či na cystein bohatý region. Transmembránová doména obsahuje 25-38 hydrofóbních aminokyselin. Intracelulární část obsahuje katalytickou doménu, kde dochází k autofosforylaci tyrozinových zbytků (Robinson et al., 2000).

Patogenní mutace genů kódujících tyrozinkinázové receptory vedou ke konstitutivní aktivaci signální kaskády a následnému vzniku nádoru. U karcinomů štítné žlázy jsou nejčastěji mutované geny pro RET, TRK (Tropomyosin Receptor Kinase) A, TRK C receptorové kinázy

a vzácněji jsou mutované geny pro ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) a MET (Mesenchymal Epithelial Transition) (Zaballos & Santisteban, 2017).

RET receptor obsahuje v extracelulární části čtyři kadherin-like domény a jeden na cystein bohatý region. Intracelulárně je uložena kinázová doména. RET receptor je kódován stejnojmenným *RET* genem, který může obsahovat různé genetické změny, u karcinomů štítné žlázy se jedná nejčastěji o aktivační bodové mutace a fúzní geny. Patogenní bodové mutace *RET* genu mohou vzniknout v extracelulární doméně na cystein bohatém regionu, čímž dojde k vytvoření kovalentního diméru nezávisle na vazbě ligandu a následné aktivaci. Dále mohou patogenní bodové mutace vzniknout v intracelulární tyrozinkinázové doméně, čímž dojde k aktivaci monomerní formy RET receptoru. Bodové mutace *RET* genu, aktivačního charakteru, způsobují MTC. Pokud jsou mutace *RET* genu zárodečné, jedná se o familiární formu MTC, pokud jsou somatické, jedná se o sporadickou formu MTC (Starenki & Park, 2015). Dalším onkogenním mechanismem zahrnujícím *RET* gen je vznik fúzního genu. Fúzní geny vznikají spojením dvou dříve separátních genů z důvodu chromozomální přestavby: inverzí, inzercí, translokací, delecí, tandemovou duplikací nebo chromotripsí (Obr. 5). Vzácně může dojít i k chromozomální přestavbě jednoho genu. Ve většině případů dochází ke vzniku fúzního proteinu, který může mít novou funkci i buněčnou lokalizaci (Taniue & Akimitsu, 2021).



Obrázek 5. Vznik fúzního genu z genu A a genu B. Fúzní gen B je pod regulací promotoru genu A. Převzato a upraveno z <https://cleanpng.com/png-fusion-gene-gene-expression-chimeric-gene-cancer-f-6228759/download-png.html>

RET fúzní geny vznikají spojením části partnerského genu s částí *RET* genu kódující kinázovou doménu (většinou se jedná o oblast exonů 12–21). Partnerský gen je ve štítné žláze běžně exprimovaný a zahrnuje intaktní dimerizační doménu důležitou pro dimerizaci a aktivaci kinázové domény *RET* genu. U štítné žlázy jsou *RET* fúzní geny ve většině případů asociovány s PTC, ve vzácných případech mohou být asociovány i s jiným typem karcinomu (Grubbs et al., 2015; Landa et al., 2016). Mezi nejčastější partnerské geny patří *CCDC6* a *NCOA4*. *CCDC6/RET* fúzní gen, také známý pod názvem *RET/PTC1*, byl objeven v roce 1987 a byl popsán o tři roky později (Fusco et al., 1987; Grieco et al., 1990). Jednalo se o jednu z prvních odhalených příčin karcinomu štítné žlázy. O další tři roky později byl popsán *PRKARIA/RET*, také známý jako *RET/PTC2* a roku 1994 byl objeven *NCOA4/RET* neboli *RET/PTC3* fúzní gen (Bongarzone et al., 1993; Santoro et al., 1994).

TRK receptory obsahují v extracelulární doméně dva na cystein bohaté regiony, mezi nimiž je na leucin bohatý region. Nejbližší transmembránové doméně jsou ještě dvě imunoglobulin-like domény. Součástí intracelulární kinázové domény je pět klíčových tyrozinových zbytků, z nichž tři tvoří aktivační smyčku a na zbylé dva se vážou adaptorové proteiny. TRK receptory jsou za normálních podmínek aktivovány navázáním ligandu – neurotrofinu, poté dochází k jejich dimerizaci a autofosforylaci tyrozinových zbytků kinázové domény (Cunningham & Greene, 1998). Receptory TRK A, TRK B a TRK C jsou kódovány příslušnými geny *NTRK1* (Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase1), *NTRK2* a *NTRK3*. U karcinomů štítné žlázy dochází k onkogenní aktivaci vznikem *NTRK* fúzních genů. *NTRK* fúzní geny byly pozorovány hlavně u PTC, ale i u PDTC a ATC. Mezi nejčastější partnerský gen patří *ETV6* (ETS Variant Transcription Factor 6) (Amatu et al., 2019; Landa et al., 2016).

ALK receptor má unikátní strukturu, kdy extracelulární doména obsahuje dva MAM regiony, mezi nimiž je LDL region a v blízkosti transmembránové domény se nachází na glycin bohatý region. Po navázání ligandu na extracelulární část receptoru, dochází k homo- nebo heterodimerizaci receptoru, autofosforylaci tyrozinových zbytků na intracelulární kinázové doméně a tím k aktivaci. U karcinomů štítné žlázy byly objeveny různé typy *ALK* fúzních genů, a to jak u PTC, tak i u PDTC, MTC a ATC. Nejčastějším partnerským genem je *STRN* (Hillier et al., 2019; Huang, 2018; Landa et al., 2016).

Extracelulární doména MET receptoru zahrnuje SEMA doménu, PSI doménu a čtyři imunoglobulin-like domény. *MET* fúzní geny se u karcinomů štítné žlázy vyskytují velice vzácně (Agrawal et al., 2014; Chu et al., 2020; Uchikawa et al., 2021).

1.5.1.2 RAS proteiny

Do RAS rodiny guanosin nukleotid vazebných proteinů patří několik jejich izoform, z nichž nejčastěji zmiňované v souvislosti s onkogenní aktivací jsou proteiny HRAS (Harvey Rat Sarcoma), KRAS (Kirsten Rat Sarcoma), NRAS (Neuroblastoma Rat Sarcoma). RAS proteiny jsou součástí jak MAPK, tak i PI3K/AKT dráhy a mají GTPázovou aktivitu.

Jedná se o malé proteiny (20-29 kDa) skládající se z 188/189 aminokyselin (AK). Obsahují 2 domény: G doménu a C doménu. C doména je hypervariabilní a obsahuje CAAT box, který je posttranslačně modifikovaný - prenylací nebo palmitoylací. Tyto modifikace C domény umožňují zakotvení RAS proteinů do membrány. G doména funguje jako molekulární spínač regulující MAPK nebo PI3K/AKT dráhu. GAP (GTPase Activating Protein, např. NF1) stimuluje hydrolýzu GTP na GDP, díky svým „argininovým prstům“ katalyzuje nukleofilní atak γ fosfátu za účasti hořčnatých iontů a molekuly vody, čímž se z GTP uvolní anorganický fosfát a dojde k „vypnutí“ signální kaskády. GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) je aktivátor (např. SOS) a katalyzuje vytáhnutí GDP z nukleotid vazebné kapsy, do které se naváže GTP, které je v cytoplazmě ve výrazně vyšším zastoupení než GDP. RAS s navázaným GTP má vysokou afinitu k RAF kináze nebo PI3K. G doména RAS proteinu má 5 G motivů vážících GDP/GTP. G1 motiv neboli P-smyčka interaguje s α a β fosfátem GDP/GTP. Součástí G2 motivu je threonin 35, který váže γ fosfát GTP a hořčnaté ionty ve vazebném místě. G2 motiv je důležitý pro hydrolýzu GTP tím, že váže GAP. G3 motiv je také zahrnut do interakcí s γ fosfátem GTP a napomáhá jak nukleotidové záměně za pomoci GEF, tak i při GTP hydrolýze za účasti GAP. Motivy G4 a G5 pomáhají v rozpoznání guaninu, se kterým specificky interagují (Vetter, 2014). Patogenní mutace *RAS* genu, které se obvykle nacházejí v kodónech 12, 13 a 61, způsobují permanentně navázaný GTP. Pokud dojde k mutaci v kodónu 12 nebo 13, které jsou součástí P-loopu, dochází k nesenzitivitě, a tím pádem nedochází k inaktivaci pomocí GAP. Mutace v kodónu 61 stabilizuje tranzitní stav pro hydrolýzu GTP. U nádorů štítné žlázy se mohou *RAS* mutace vyskytovat u benigních i maligních lézí a to u všech typů maligních nádorů štítné žlázy (Xing, 2016).

1.5.1.3 RAF kinázy

RAF kinázy jsou serin/threoninové kinázy, které jsou součástí MAPK dráhy. Přenášejí signál od proteinů RAS na tyrozin/serin-threonin duální kinázu MEK. V onkologii nejznámější RAF kináza je kináza BRAF.

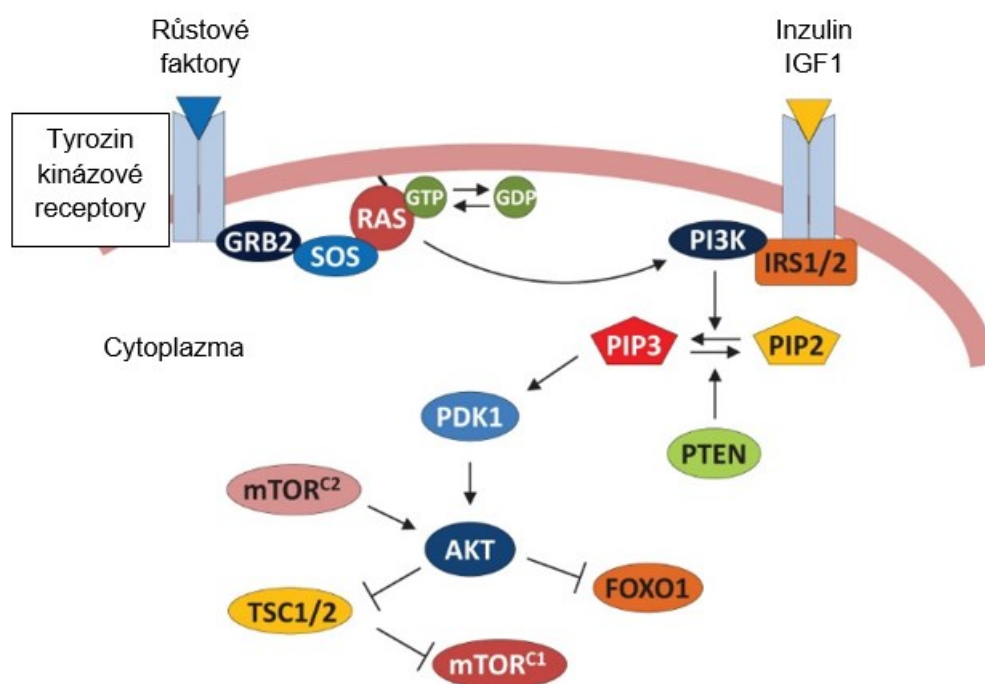
BRAF kináza se skládá ze 766 AK, které tvoří 3 konzervované domény/regiony (CR1-3). První konzervovaný region (CR1) obsahuje RAS-GTP vazebnou doménu (AK 155-227). Pokud není RAS-GTP na doménu navázán, dochází k autoinhibici kinázové domény (součástí CR3) regionem CR1 za účasti diméru proteinu 14-3-3. CR2 je bohatý na serin, čímž tvoří flexibilní spojku mezi CR1 a CR3. U BRAF kinázy jsou seriny konstitutivně fosforylovány. CR3 (AK 457-717) je dvoulalokové struktury, laloky jsou mezi sebou spojeny pantovým (hinge) regionem. Menší N-lalok (AK 457-530) je primárně zodpovědný za vazbu adenosin trifosfát (ATP) a jeho součástí je tzv. P-smyčka. Větší C-lalok (AK 535-717) váže substrátové proteiny a jeho součástí je aktivační smyčka (AK 596-600), která tvoří silné hydrofobní interakce s P-smyčkou, čímž udržuje kinázu v inaktivním stavu. Konkrétně AK L597 a V600 interagují s G466, F468 a V471, které udržují kinázu inaktivovanou, dokud nedojde k fosforylaci. Mechanismus aktivace BRAF kinázy tkví v defosforylaci S259, čímž se uvolní navázaný dimér proteinu 14-3-3, uvolní se vazba mezi CR1 a CR3 a odhalí se v CR1 RAS-GTP vazebná doména, na kterou se naváže RAS-GTP, dále v CR3 dojde k fosforylaci aktivační smyčky pomocí ATP a záporným nábojem se interakce s P-smyčkou destabilizují. V aktivní konformaci BRAF tvoří diméry přes vodíkové můstky a elektrostatické interakce kinázové domény. Kinázová doména fosforyluje serin a threonin konsenzuální sekvenci na cílových proteinech (kináza MEK). Jedná se o nukleofilní atak hydroxylové skupiny na γ fosfát na ATP (Tran et al., 2005).

U karcinomů štítné žlázy je mutace genu *BRAF* V600E nejčastější genetickou změnou. Tato aktivační mutace v kinázové doméně způsobuje konstitutivní aktivaci BRAF kinázy. Mutace *BRAF* V600E se vyskytuje u přibližně 40-60 % PTC, dále bývá detekována i u PDTC a ATC. Jsou známy i *BRAF* fúzní geny, které zahrnují intaktní kinázovou doménu v CR3 a naopak pozbývají CR1, díky čemuž nedochází k autoinhibici (Agrawal et al., 2014; Landa et al., 2016).

1.5.2 PI3K/AKT dráha

Další významnou signalizační kaskádou je PI3K/AKT dráha (Obr. 6), která v odpovědi na extracelulární signál podporuje růst, přežití, proliferaci, migraci buněk a angiogenezi. Signál, kterým může být růstový faktor, hormon nebo složka extracelulární matrix (např. EGF, shh, IGF I, inzulin, CaM) nasedne na tyrozinkinázový receptor, ten dimerizuje a autofosforyluje se na tyrozinových zbytcích, na které se naváže regulační podjednotka p85 PI3K přes svojí SH2 doménu. Rekrutuje se katalytická podjednotka p110 a PI3K se stává plně aktivní. Existuje i několik alternativních drah aktivace PI3K dráhy. Jednou z nich je nepřímá aktivace pomocí adaptérového proteinu IRS nebo aktivace pomocí RAS-GTP proteinu. Aktivovaná PI3K

katalyzuje fosforylaci fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PIP2) na fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfát (PIP3). PIP3 je zakotven v membráně, kde může vázat intracelulární proteiny mající PH doménu nebo FYVE doménu. PH doménu má AKT, což je serin/threoninová kináza. PI3K aktivita je esenciální pro translokaci AKT k membráně. AKT po navázání na PIP3 změní konformaci a je aktivován bifosforylací. Po aktivaci se AKT translokuje z plazmatické membrány do cytoplazmy a jádra, kde fosforyluje mnoho efektorů (Hemmings & Restuccia, 2012). Hlavním antagonistou PI3K/AKT dráhy je PTEN, který defosforyluje PIP3 na 5' pozici na PIP2. Jednou z možností onkogenní aktivace jsou mutace genu *PTEN*, které se vyskytují jak u benigních, tak i maligních nádorů štítné žlázy (Quaytman et al., 2022).



Obrázek 6. PI3K/AKT signální dráha. Převzato a upraveno (Zaballos & Santisteban, 2017).

1.5.2.1 PI3K

PI3K je skupina kináz fosforylující lipidy. Fosforylace probíhá pomocí ATP na fosfatidyl inositech na 3'-hydroxylové skupině. PI3K se dělí do tří tříd, z nichž I. třída má dvě podtřídy, které se odlišují katalytickou a regulační podjednotkou tvořící heterodimer. Třída IA se skládá z katalytické podjednotky p110 (p110 α , p110 β , p110 δ – kódovanými geny *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CD*) a regulační podjednotky p85. Třída IB se skládá z katalytické podjednotky p100 γ (kódovaná genem *PIK3CG*) a regulační podjednotky p87. Aktivace receptoru způsobuje přesun katalytické podjednotky k membráně a její uvolnění z interakce s regulační podjednotkou.

K onkogenní aktivaci dochází při patogenní mutaci genu *PIK3CA* kódující katalytickou podjednotku p110 α , což má za následek její sníženou vazbu na regulační podjednotku. Mutace genu *PIK3CA* se vyskytují spíše u pokročilejších karcinomů štítné žlázy a obvykle společně s dalšími mutacemi (např. *BRAF*, *RAS*) (García-Rostán et al., 2005).

1.5.3 Mutace dalších genů spojených se vznikem nádorů štítné žlázy

1.5.3.1 *TERT*

TERT gen kóduje katalytickou podjednotku enzymu telomeráza, která společně s telomerázovou RNA komponentou tvoří telomerázový komplex. Telomeráza je RNA-dependentní DNA ribonukleoprotein polymeráza s reverzně transkriptázovou aktivitou. Funkcí telomerázy je prodlužování telomér, nekódujících repetitivních DNA sekvencí (u lidí TTAGGG) na koncích lineárních chromozomů. Jsou dlouhé několik kbp. Telomeráza umožňuje senescentním buňkám, které by se jinak staly postmitotickými a podstoupily by apoptózu, překročit Hayflickův limit a stát se potenciálně nesmrtelnými. Za běžných okolností buňky dosahují Hayflickova limitu po přibližně 70 mitotických dělení, poté dochází k senescenci. Embryonální a dospělé kmenové buňky, pluripotentní a multipotentní buňky mají aktivní telomerázu. Telomeráza je reaktivována při onkogenezi expresí *TERT* genu. *TERT* gen může být exprimován několika způsoby: hotspot mutacemi, genovou amplifikací, epigenetickými změnami nebo alternativním sestřihem. U nádorů štítné žlázy se nejčastěji vyskytují somatické mutace -124 bp (C228T) a -146 bp (C250T) lokalizované v promotoru genu. Tyto mutace dávají vzniknout 11bp dlouhému vazebnému místu pro EST transkripční faktory a tím dochází k expresi *TERT* genu. *TERT* mutace se vyskytují u všech typů karcinomů štítné žlázy a jsou spojeny s horší prognózou a vyšší mortalitou (Dratwa et al., 2020; Kim et al., 2016; Landa et al., 2016).

1.5.3.2 *TP53*

Gen *TP53* kóduje protein p53, který je regulátorem buněčného cyklu, apoptózy a chromozomální stability. Mezi jeho hlavní funkce patří: 1) aktivace či represe genů vedoucí k zástavě buněčného cyklu, apoptózy, potlačení nádorové proliferace, 2) aktivace oprav DNA, 3) navození diferenciaci přes aktivaci p21, 4) inhibice angiogeneze. Protein p53 se skládá z několika domén: transaktivační domény, prolin bohatého region, DNA vazebné domény, jaderný lokalizační signál, oligomerizační domény a C-terminální domény. Transaktivační doména aktivuje transkripční faktory. Prolin bohatý region je důležitý v pro-apoptické dráze a při translokaci z buněčného jádra. DNA vazebná doména je důležitá pro aktivaci transkripce a

více než 90 % patogenních mutací se nachází v tomto regionu a inaktivují vazbu na DNA. Oligomerizační doména se podílí na tetramerizaci a mutace v této doméně mají dominantně negativní efekt, což znamená, že aberantní protein tvoří s neaberantním proteinem nefunkční nebo pouze částečně funkční heterotetramery, a tím částečně vyřazuje neaberantní protein z funkce (Soussi, 2000). Mutace genu *TP53* se často vyskytují společně s dalšími mutacemi genů, např. *BRAF*, *RAS* u méně diferencovaných karcinomů štítné žlázy (Landa et al., 2016).

1.5.3.3 *EIF1AX*

Gen *EIF1AX* je lokalizovaný na X chromozómu a kóduje eukaryotický iniciační translační faktor 1A, který je součástí 43S preiniciačního komplexu, váže se k tzv. A místu na ribozómu. V případě patogenní mutace *EIF1AX* dochází k narušení sestavy preiniciačního komplexu. Mutace genu *EIF1AX* byly nalezeny u různých typů karcinomů štítné žlázy, u PTC, FTC, OCA, PDTC, ATC, ale i u benigních uzlů. Nejčastěji bývá zachycena A113_sestřihová mutace, ke které dochází na pomezí intronu 5 a exonu 6 (Karunamurthy et al., 2016).

1.5.3.4 *EZH1*

Gen *EZH1* kóduje enzym histon-lyzin N-metyltransferázu, který transferuje metylovou skupinu z S-adenosylmethioninu na lyzin 27 na histonu 3, což vede k transkripční represi. *EZH1* je spolu s dalšími proteiny součástí polycomb represivního komplexu. Jsou známy dvě mutace genu *EZH1* Q571R a Y642F, které způsobují aberantní genovou expresi. Mutace genu *EZH1* se vyskytují v 13,5 % benigních a 0,7 % maligních nádorů štítné žlázy (Agrawal et al., 2014; Jung et al., 2018).

1.5.3.5 *CHEK2*

Gen *CHEK2* kóduje serin/threoninovou kinázu CHK2, která se účastní oprav DNA, zástavy cyklu či apoptózy v reakci na poškození DNA. Skládá se ze tří domén: 1) SQ/TQ cluster doména je fosforylována po přijetí signálu, že je DNA poškozena. 2) Fork-head asociovaná (FHA) doména, jejíž funkcí je dimerizace. 3) C-terminální kinázová doména. Při poškození DNA je aktivováno ATM nebo ATR, které aktivuje CHK2. Nejprve je u CHK2 fosforylována SQ/TQ cluster doména, dojde k dimerizaci FHA domény a následné aktivaci kinázové domény autofosforylací. Po aktivaci diméry disociují. CHK2 fosforyluje CDC25 fosfatázu, která nemůže aktivovat cyklin dependentní kinázu. CHK2 také stabilizuje p53, čímž buňka setrvává v G1 fázi. V případě patogenní mutace *CHEK2* genu vzniká nefunkční kináza, dochází k hromadění poškozené DNA a je tak zvýšené riziko nádorů. Somatické mutace genu *CHEK2* se u nádorů štítné žlázy vyskytují vzácně (Agrawal et al., 2014; Cai et al., 2009).

1.5.3.6 *PPM1D*

Gen *PPM1D* kóduje protein fosfatázu 1D, která je členem PP2C rodiny serin/threoninových fosfatáz. Exprese tohoto genu je indukovaná v reakci na poškození DNA a buněčný stres, např. v důsledku ionizujícího záření. PPM1D potlačuje p53 indukovanou transkripci a apoptózu a je důležitá pro zachování integrity genomu. Pokud je PPM1D v důsledku mutace nadměrně exprimován, může dojít k trvalé inhibici p53. Somatické mutace genu *PPM1D* se u nádorů štítné žlázy vyskytují vzácně (Agrawal et al., 2014; Deng et al., 2020).

2 Cíle práce

Karcinomy štítné žlázy dětských a dospívajících pacientů se liší od karcinomů dospělých pacientů. Bývají agresivnější povahy a vyžadují upravený způsob léčby, kdy je brána v potaz větší invazivita karcinomů, ale i dopad intenzity léčby dětského nebo dospívajícího pacienta, který má před sebou mnoho desítek let života. Alarmující je i skutečnost nárůstu incidence karcinomu štítné žlázy jak u dětských, tak i dospělých pacientů. Z těchto důvodů je nutné se karcinomům štítné žlázy a jejich molekulárně genetickým změnám věnovat. Očekávám, že by výsledky mé práce mohly být přínosem v diagnostice, prognostice a na míru postavené léčbě.

Cíle práce:

- 1) Analyzovat rozsáhlý soubor vzorků pediatrických PTC a odhalit jejich genetický profil.
- 2) Porovnat agresivitu PTC dětských a dospívajících pacientů na základě jejich genetického pozadí.
- 3) Charakterizovat karcinomy dětských i dospělých pacientů pozitivních na *RET* a *NTRK* fúzní geny. Porovnat klinické a histopatologické znaky mezi kohortami dětských a dospělých pacientů.
- 4) Optimalizovat metodiku pro detekci širokého spektra fúzních genů a zavést analýzu vybraných fúzních genů do rutinní praxe.

3 Experimentální část

Metodika a výsledky dizertační práce jsou prezentovány ve čtyřech článcích publikovaných v mezinárodních recenzovaných impaktovaných časopisech. U každého článku je uvedeno shrnutí s dosaženými výsledky a podíl autorky dizertační práce na publikacích.

Seznam publikací:

Publikace č. 1:

Pekova B, Dvorakova S, Sykorova V, Vacinova G, Vaclavikova E, Moravcova J, Katra R, Vlcek P, Sykorova P, Kodetova D, Vcelak J, Bendlova B. Somatic genetic alterations in a large cohort of pediatric thyroid nodules. *Endocr Connect*. 2019 Jun;8(6):796-805. doi: 10.1530/EC-19-0069. IF 2,9

Publikace č. 2:

Pekova B, Sykorova V, Dvorakova S, Vaclavikova E, Moravcova J, Katra R, Astl J, Vlcek P, Kodetova D, Vcelak J, Bendlova B. RET, NTRK, ALK, BRAF, and MET Fusions in a Large Cohort of Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid*. 2020 Dec;30(12):1771-1780. doi: 10.1089/thy.2019.0802. IF 6,6

Publikace č. 3:

Pekova B, Sykorova V, Mastnikova K, Vaclavikova E, Moravcova J, Vlcek P, Lastuvka P, Taudy M, Katra R, Bavor P, Kodetova D, Chovanec M, Drozenova J, Astl J, Hrabal P, Vcelak J, Bendlova B. NTRK Fusion Genes in Thyroid Carcinomas: Clinicopathological Characteristics and Their Impacts on Prognosis. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 16;13(8):1932. doi: 10.3390/cancers13081932. IF 5,2

Publikace č. 4:

Bulanova Pekova B, Sykorova V, Mastnikova K, Vaclavikova E, Moravcova J, Vlcek P, Lancova L, Lastuvka P, Katra R, Bavor P, Kodetova D, Chovanec M, Drozenova J, Matej R, Astl J, Hlozek J, Hrabal P, Vcelak J, Bendlova B. RET fusion genes in pediatric and adult thyroid carcinomas: cohort characteristics and prognosis. *Endocr Relat Cancer*. 2023 Oct 26;30(12):e230117. doi: 10.1530/ERC-23-0117. IF 3,9

3.1 Publikace č. 1: Somatic genetic alterations in a large cohort of pediatric thyroid nodules

Souhrn:

U pediatrických pacientů jsou benigní i maligní uzly ve štítné žláze vzácné. Molekulárně genetické vyšetření těchto uzlů je stěžejní pro pochopení příčiny jejich vzniku. V souvislosti se vznikem lézí štítné žlázy byly popsány patogenní změny různých genů. Cílem této studie bylo analyzovat geny *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *IDH1*, *TERT*, *CHEK2*, *PPM1D*, *EIF1AX*, *EZH1* a přítomnost fúzních genů *RET/PTC1* a *RET/PTC3* u rozsáhlého souboru 113 vzorků štítné žlázy (od pediatrických a adolescentních pacientů do 20 let): 30 benigních a 83 maligních (PTC). Jednalo se o jeden z největších publikovaných souborů vzorků štítné žlázy dětských pacientů.

Známostou kauzální patogenní mutaci jsme detekovali u 5/30 benigních vzorků, ve všech případech se jednalo o mutaci genu z rodiny *RAS*. U vzorků PTC jsme našli kauzální mutaci u 35/83 vzorků. Nejčastěji jsme identifikovali *RET* fúzní gen ($n = 18$), následně se jednalo o mutaci *BRAF* V600E ($n = 15$) a jen ve dvou případech jsme našli *RAS* mutaci. Porovnali jsme pacienty s karcinomem pozitivním na *RET* fúzní gen s karcinomem pozitivním na *BRAF* V600E. Významná odlišnost byla zaznamenána u přítomnosti lokálních a distálních metastáz, která byla vyšší u pacientů s *RET* fúzním genem. *TERT* mutaci jsme nedetekovali u žádného pacienta. Dále jsme analyzovali geny vzácněji asociovanými s nádory štítné žlázy (*IDH1*, *CHEK2*, *PPM1D*, *EIF1AX*, *EZH1*). Missense mutaci či delecii jsme našli pouze u genů *IDH1*, *CHEK2*, *PPM1D*. Vzhledem k tomu, že jsme od všech těchto pacientů měli k dispozici DNA z periferní krve, zjistili jsme, že se ve všech případech jedná o zárodečnou variantu. Ovšem dle dostupných databází byly pouze dvě varianty v *CHEK2* genu označeny jako pravděpodobně patogenní/patogenní.

Význam publikace:

Výsledky této studie přispěly svým rozsáhlým, podrobně klinicky a patologicky charakterizovaným souborem a rozsáhlou genetickou analýzou k lepšímu pochopení genetického pozadí nádorů štítné žlázy u dětských pacientů.

Podíl na publikaci:

Můj podíl na práci zahrnoval: 1) izolaci nukleových kyselin ze zmražených tkání štítné žlázy (nově shromážděné vzorky), 2) sekvenaci genů: *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *TERT*, *CHEK2*, *PPM1D*,

EIF1AX, *EZH1* a vyhodnocení sekvenčních dat, 3) příprava cDNA reverzní transkripcí, 4) analýzu fúzních genů pomocí real-time PCR, 5) zpracování a vyhodnocení klinických a patologických dat, 6) statistické zhodnocení, 7) vytvoření tabulek a obrázků, 8) sepsání celého rukopisu

RESEARCH

Somatic genetic alterations in a large cohort of pediatric thyroid nodules

Barbora Pekova¹, Sarka Dvorakova¹, Vlasta Sykorova¹, Gabriela Vacinova¹, Eliska Vaclavikova¹, Jitka Moravcova¹, Rami Katra², Petr Vlcek³, Pavla Sykorova³, Daniela Kodetova⁴, Josef Vcelak¹ and Bela Bendlova¹

¹Department of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, Prague 1, Czech Republic

²Department of Ear, Nose and Throat, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague 5, Czech Republic

³Department of Nuclear Medicine and Endocrinology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague 5, Czech Republic

⁴Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague 5, Czech Republic

Correspondence should be addressed to B Pekova: bpekova@endo.cz

Abstract

There is a rise in the incidence of thyroid nodules in pediatric patients. Most of them are benign tissues, but part of them can cause papillary thyroid cancer (PTC). The aim of this study was to detect the mutations in commonly investigated genes as well as in novel PTC-causing genes in thyroid nodules and to correlate the found mutations with clinical and pathological data. The cohort of 113 pediatric samples consisted of 30 benign lesions and 83 PTCs. DNA from samples was used for next-generation sequencing to identify mutations in the following genes: *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *IDH1*, *CHEK2*, *PPM1D*, *EIF1AX*, *EZH1* and for capillary sequencing in case of the *TERT* promoter. RNA was used for real-time PCR to detect *RET/PTC1* and *RET/PTC3* rearrangements. Total detection rate of mutations was 5/30 in benign tissues and 35/83 in PTCs. Mutations in *RAS* genes (*HRAS* G13R, *KRAS* G12D, *KRAS* Q61R, *NRAS* Q61R) were detected in benign lesions and *HRAS* Q61R and *NRAS* Q61K mutations in PTCs. The *RET/PTC* rearrangement was identified in 18/83 of PTCs and was significantly associated with higher frequency of local and distant metastases. The *BRAF* V600E mutation was identified in 15/83 of PTCs and significantly correlated with higher age of patients and classical variant of PTC. Germline variants in the genes *IDH1*, *CHEK2* and *PPM1D* were found. In conclusion, *RET/PTC* rearrangements and *BRAF* mutations were associated with different clinical and histopathological features of pediatric PTC. *RAS* mutations were detected with high frequency in patients with benign nodules; thus, our results suggest that these patients should be followed up intensively.

Key Words

- ▶ papillary thyroid cancer
- ▶ pediatric
- ▶ mutations
- ▶ benign
- ▶ next-generation sequencing

Endocrine Connections
(2019) 8, 796–805

Introduction

Thyroid nodules affect around 1% of the pediatric population. The incidence has been steadily increasing over the last decades, by approximately 1.1% per year worldwide (1, 2). Possible reasons for this increase are improvements in medical care including ultrasonography and fine-needle aspiration biopsy, environmental carcinogens, endocrine disruptors, inadequate iodine intake and exposure to radiation (3). Thyroid nodules have benign or malignant character. The risk of malignancy is

higher in pediatric nodules compared with adults, 26 vs 7–15% (2, 4).

Pediatric thyroid cancer is a rare disease occurring mostly in females than in males (1). The most common type is papillary thyroid cancer (PTC), which represents 90% or more of pediatric thyroid cancer (4). Medullary (MTC) and follicular thyroid cancer (FTC) are relatively rare. MTC is mostly familial than sporadic in children and adolescents. Poorly differentiated cancer and anaplastic

<https://ec.bioscientifica.com>
<https://doi.org/10.1530/EC-19-0069>

© 2019 The authors
Published by Bioscientifica Ltd



This work is licensed under a Creative Commons
Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 09/19/2019 02:55:58PM
via Knihovna Endokrinologicky Ustav

thyroid cancer (ATC) have only been identified in several pediatric patients (5, 6).

PTCs in children and adolescents are more aggressive than adult PTCs according to many studies (7, 8, 9). On the other hand, they have better outcomes, a lower rate of dedifferentiation and a disease-specific mortality lower than 2% (10). Due to many differences between pediatric and adult PTCs, ATA guidelines specifically for children and adolescents were developed (4).

Differences between pediatric and adult PTCs are not only in clinical-pathological features, but also in genetic alterations. Main PTC-activating somatic mutations in the *RAS*, *BRAF* and *TERT* genes and *RET/PTC* rearrangements cause uncontrolled activation of MAPK and PI3K signaling pathways. It was reported that pediatric PTCs harbor more frequently rearrangements and less frequently point mutations than adult PTCs (11, 12). However, published studies have been performed only in a limited number of pediatric patients or on a low number of investigated genes.

In the Thyroid Cancer Genome Atlas (TCGA) project, genetic alterations of 496 PTCs were detected and mutations in the *CHEK2*, *PPM1D* and *EIF1AX* genes were identified as the novel PTC-causing genes. If these genes play a role in pediatric carcinogenesis is still unknown, because only nine pediatric patients were included in the TCGA project (13).

To the other genes that are associated with thyroid nodules, *IDH1* and *EZH1* genes belong. Mutations in the *IDH1* gene are present in many different types of cancer, including PTC. Several variants have been revealed in the conserved part of the *IDH1* gene with an association with follicular variant of PTC (14). In the *EZH1* gene a hotspot Q571R mutation was detected that causes increased proliferation of thyroid cells (15). This mutation was found predominantly in benign thyroid nodules with follicular pattern and without *RAS* mutation (16).

The purpose of this study was to identify main genetic alterations in one of the largest pediatric cohorts of thyroid nodules. This study investigated not only commonly screened genes *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *TERT*, but also newly identified genes *IDH1*, *CHEK2*, *PPM1D*, *EIF1AX* and *EZH1*. From fusion genes the most common *RET/PTC1* and *RET/PTC3* rearrangements were tested.

Material and methods

Patients and data collection

The cohort consisted of 113 samples from 83 PTCs and 30 benign lesions. Samples were collected from pediatric

patients who underwent surgery from 2003 to 2017 at the Department of Ear, Nose and Throat, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital in Prague. The thyroid tumor samples were histologically evaluated. All the specimens were snap-frozen and stored at -80°C until used for DNA and RNA isolation. Clinical and histopathological data were obtained from clinical and pathological records. Patients or their legal representatives signed an informed consent for genetic studies approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology.

DNA and RNA extraction

DNA and RNA isolations were performed using the AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of DNA and RNA was measured using a spectrophotometer (NanoPhotometer P330; Implen GmbH, München, Germany) and a fluorometer (Qubit 2.0; Invitrogen). The RNA integrity was evaluated using a Bioanalyzer 2100 and Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies).

Next-generation sequencing

The analyzed genes were *HRAS* (exons 2, 3), *KRAS* (exons 2, 3), *NRAS* (exons 2, 3), *BRAF* (exon 15), *TERT* (promoter), *IDH1* gene (exons 4, 6), *CHEK2* (exons 3, 4, 7, 11, 13), *PPM1D* (exons 1, 4, 5, 6), *EIF1AX* (exons 1, 2, 5, 6), *EZH1* (exons 16, 17). Exons of *RAS*, *BRAF*, *CHEK2*, *PPM1D*, *EIF1AX* genes and the *TERT* promoter were selected for analysis because they were the most mutated regions in the TCGA study (13). Exons of *IDH1* and *EZH1* genes were chosen according to previous publications (14, 16). Exons were amplified using PCR with sequence-specific primers. The primer sequences and PCR conditions are available on request. The PCR products were purified using Agencourt AMPure (Beckman Coulter) and used for preparation of next-generation sequencing (NGS) libraries using Nextera XT Sequencing Kit (Illumina) according to the manufacturer's sample preparation protocol and modifications as described in our previous article (17). The NGS libraries were paired-end sequenced for 500 cycles by MiSeq Reagent kit v2 (Illumina) using MiSeq sequencer platform (Illumina).

All variants of the novel PTC-causing genes from TCGA study were also analyzed in DNA samples extracted from peripheral blood of the same patient to distinguish somatic and germline detected genetic changes.

The reference sequences of genes *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *IDH1*, *CHEK2* and *PPM1D* were NM_005343.3, NM_033360.3, NM_002524.4, NM_004333.4, NM_005896.3, NM_007194.3 and NM_003620.3, respectively.

Capillary sequencing

The PCR products of *TERT* promoter were purified using Agencourt AMPure (Beckman Coulter), and then sequencing reaction using Quick Start Master Mix Kit with Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter) was performed. Products of the sequencing reaction were purified using Agencourt Clean SEQ Dye-Terminator Removal (Beckman Coulter). Capillary sequencing was performed by CEQ 8000 instrument (Beckman Coulter). Analyses were evaluated by CEQ 8000 software. The primer sequences and PCR conditions are available on request.

Real-time PCR

RNA was reverse transcribed into cDNA using random primers and AMV Reverse Transcriptase (Promega). Subsequently, cDNA was mixed with iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and sequence-specific primers and *RET/PTC1* and *RET/PTC3* detection was performed by Real-Time PCR (Light Cycler 480, Roche). Reaction conditions and primers were set according to our previous article (18). For cDNA quality control, the expression of housekeeping gene (β -actin, *ACTB*) was tested in every sample. Analyses were evaluated by Light Cycler® 480 SW 1.5.1.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with *t*-test and Fisher's exact test. *P* value <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Patient characteristics

The study consisted of 113 specimens of pediatric patients with predominance of females (73.5%). The age ranged 6–20 years at the time of diagnosis.

As detailed in Fig. 1 and Table 1, 30 samples of benign lesions were collected (nine solitary thyroid nodules, eight follicular adenomas, five multinodular goiters,

five chronic lymphocytic thyroiditis, two thyroid cysts, one oncocytic adenoma). The cohort of benign patients had a mean age at diagnosis 14.7 ± 2.6 years and most of the group consisted of females (24/30). The half of the patients underwent hemithyroidectomy and the other half total thyroidectomy, and in two of them the lymph node dissection was performed. Multifocal nodules in six cases were noted.

Medical records of 83 patients with PTCs were studied for family history, another serious disease and radiation exposure before PTC diagnosis. Thyroid disease in family history had 25 patients. Except two, no other patient had thyroid cancer in family. Two patients had known previous history of radiation exposure. The first one was diagnosed with acute lymphoblastic leukemia and the therapeutic whole-body radio-exposition was prior to thyroid cancer diagnosis. The second patient was diagnosed with Hodgkin's lymphoma and was treated with chemotherapy and radiotherapy. One patient was diagnosed with Cowden syndrome, which is associated with a higher risk of thyroid cancer due to mutation in the *PTEN* gene.

Detailed patient's characteristics of the PTC cohort are summarized in Fig. 1 and Table 2. PTC patients were predominantly females (59/83). Total thyroidectomy was performed in 72 PTC cases and hemithyroidectomy in 11 PTC cases. Hemithyroidectomy was completed to total thyroidectomy in ten cases due to diagnosis of PTC. Mean size of tumor was 22.2 ± 13.6 mm. Microcarcinomas defined as tumors with diameter 10mm or smaller were detected in 16/83 cases. The most common variant of PTC was follicular variant followed by the classical variant. Many rare variants such as columnar, clear cell, tall cell and diffuse sclerosing variant were identified. More than half PTCs were multifocal (46/83) and nearly half had extrathyroidal extension (37/83) and were classified as T3/T4 (38/83). Lymph node metastases were detected in 52/83 and distant metastases in 10/83 cases. All distant metastases were affecting lungs. Most of the PTC patients (72/82) underwent radioactive iodine (RAI) treatment. One 7-year-old patient died from the disease after surgery and before RAI treatment. Maximum number of RAI ablations was 6, which was used in two cases. The RAI treatment was applied in the first case during 9 years and in the second case during 11 years. In the first case, it was PTC with mix of classical, follicular and solid variant and in the second case, it was solid variant of PTC. Reoperations of lymph node metastases were performed in five patients; two of them underwent reoperations three times.

Median follow-up was 72 months (range 1–170 months). Thyreoglobulin (Tg) blood serum level

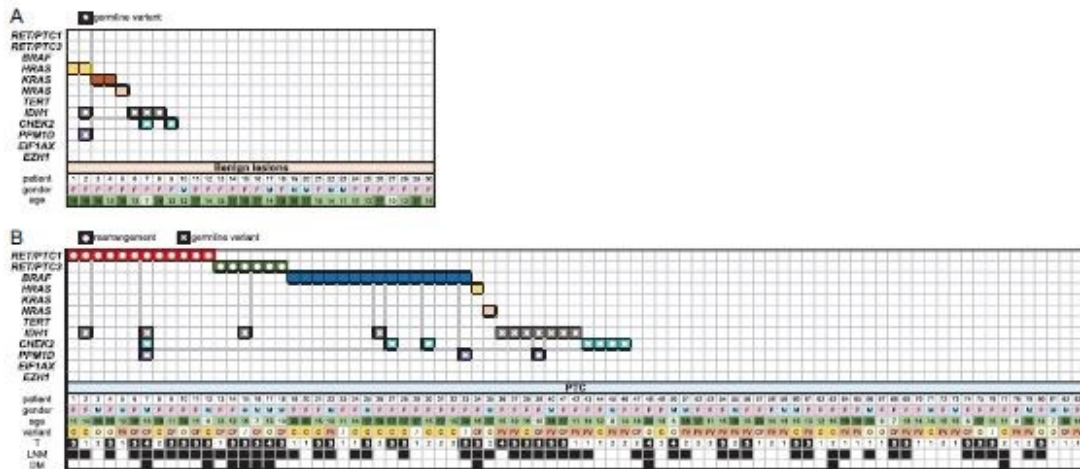


Figure 1 Tile plot of genetic alterations detected in patients with benign lesions (A) and with PTC (B). Clinical and pathological data as gender, age at diagnosis, histological variant, tumor stage, lymph node metastases and distant metastases are shown. C, classical variant; CF, classical and follicular variant; DM distant metastases; F, female; FV, follicular variant; LNM, lymph node metastases; M, male; O, other variant; PTC, papillary thyroid cancer; T, tumor size and extension.

and thyroglobulin antibodies (a-Tg) were monitored for whole postoperative care. Remission was defined as a condition of the patient with any suspect object on ultrasound or whole-body scintigraphy, the Tg levels were lower than 1 µg/L and the a-Tg levels were not detectable. Recurrence and persistence were defined as a condition of a patient with malignant object or objects on ultrasound

or whole-body scintigraphy at least 1 year after surgery or patient who entered remission and then malignant object was appeared. Biochemical persistence was defined as a condition of the patient with the level of Tg higher than 1 µg/L or detectable level of a-Tg with no evident tumor recurrence or persistence. Eight patients could not be classified due to short-term follow-up (range 0–12 months after surgery).

Table 1 Characteristics of pediatric benign cohort.

	Pediatric benign cohort (n = 30)
Patients	
Females	24
Males	6
Age at diagnosis (years, mean ± s.d.)	14.7 ± 2.6
Type of disease	
Solitary thyroid nodule	9
Follicular adenoma	8
Multinodular goiter	5
Chronic lymphocytic thyroiditis	5
Thyroid cyst	2
Oncocytic adenoma	1
Surgery	
Hemithyroidectomy – left lobe	8
Hemithyroidectomy – right lobe	7
Total thyroidectomy without LND	13
Total thyroidectomy with LND	2
Tissue characteristics	
Mean ± s.d. (mm)	22.2 ± 12.1
Multifocality	6

LND, lymph node dissection.

Mutational analysis

The detection rate of mutations in benign and malignant cohorts is noted in Table 3. The total detection rate of mutations in the cohort of benign tissues was 5/30 and in the cohort of PTCs was 35/83, of which *RET/PTC* rearrangement (18/83), *BRAF* V600E mutation (15/83) and *RAS* mutations (2/83) were identified (Fig. 1). All mutations in benign cohort were in *RAS* genes (Fig. 1). Mutations of *RAS* genes in benign lesions included *HRAS* G13R mutation found in one follicular adenoma with uncertain behavior and in one solitary thyroid nodule with oncocytic changes, *KRAS* G12D mutation in the multinodular goiter, *KRAS* Q61R mutation in the follicular adenoma and *NRAS* Q61R mutation in the multinodular goiter with oncocytic changes. Only two mutations in *RAS* genes were identified in PTCs: *HRAS* Q61R and *NRAS* Q61K. *NRAS* Q61K mutation was found in tall cell variant of PTC and *HRAS* Q61R mutation in the mix of

<https://ec.bioscientifica.com>
<https://doi.org/10.1530/EC-19-0069>

© 2019 The authors
Published by Bioscientifica Ltd



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 09/19/2019 02:55:58PM via Kihovna Endokrinologicky Ustav

Table 2 Characteristics of pediatric PTC cohort.

	Pediatric PTC (n = 83)
Patients	
Females	59
Males	24
Age at diagnosis (years, mean ± s.d.)	14.2 ± 3.4
History of radioexposure	2
Tumor size	
Mean ± s.d. (mm)	22.2 ± 13.6
Microcarcinoma (≤10 mm)	16
Histological variant^a	
Classical	23
Classical and follicular	16
Follicular	27
Solid	3
Classical, follicular and solid	3
Diffuse sclerosing	2
Columnar	2
Tall cell	1
Clear cell	1
Pathological characteristics	
Multifocality	46
Extrathyroidal extension	37
Intravascular invasion	22
T1/T2 classification	45
T3/T4 classification	38
Lymph node metastases (N)	52
Distant metastases (M)	10
Chronic lymphocytic thyroiditis	42
Radioiodine therapy^b	
Without radioiodine therapy	9
One dose	41
Two or more doses	31
Follow-up^c	
Reoperation of recurrent metastases	5
Remission	49
Recurrence or persistence	9
Biochemical persistence	16
Disease-specific mortality	1

^aIn five cases histological variant was not available; ^bIn two cases radioiodine therapy records were not available; ^ceight cases were not classified due to short-term follow-up. PTC, papillary thyroid cancer.

classical and follicular variant of PTC. Both patients with *RAS* mutation had lymph node metastases and multifocal carcinoma. The patient with *HRAS* mutation was diagnosed with Hodgkin's lymphoma three years prior to diagnosis of PTC. The tumor had very invasive character; intravascular invasion and lung metastases were detected.

Clinical-pathological features of *RET/PTC* and *BRAF*-positive patients are summarized and compared in Table 4. The most common mutation was the *RET/PTC* rearrangement detected in 18/83 PTCs, including *RET/PTC1* in 11 and *RET/PTC3* in 6 samples. In single case, novel *RET/PTC* rearrangement named *RET/PTC1ex9*, which included part of exon 9 of the *RET* gene, was also

Table 3 Comparison of detection rate of mutations in benign and malignant nodules.

Mutation	Benign (n = 30)	Malignant (n = 83)	P value
<i>HRAS</i> G13R	2	0	
<i>HRAS</i> Q61R	0	1	
<i>KRAS</i> G12D	1	0	
<i>KRAS</i> Q61R	1	0	
<i>NRAS</i> Q61K	0	1	
<i>NRAS</i> Q61R	1	0	
<i>RAS</i> total	5	2	0.014
<i>BRAF</i> V600E	0	15	0.010
<i>TERT</i>	NA	0	
<i>RET/PTC1</i>	0	11	
<i>RET/RET1ex9</i>	0	1	
<i>RET/PTC3</i>	0	6	
<i>RET/PTC</i> total	0	18	0.003
Total	5	35	0.014

NA, not analyzed. Bold indicates statistical significance.

identified (18). The ratio between females and males in *RET/PTC*-positive patients was lower compared to *BRAF* positive patients, but not statistically significant ($P=0.070$). Samples with *RET/PTC* rearrangement were significantly associated with mix of classical and follicular variant of PTC ($P=0.009$) and higher frequency of lymph node metastases ($P=0.020$) and distant metastases ($P=0.005$). All six *RET/PTC3*-positive patients had lymph node metastases, four of these six patients had lung metastases and one patient died from disease. The *BRAF* V600E mutation was detected in 15/83 PTC samples. In *BRAF* positive patients the mean age at the time of diagnosis was significantly higher than in *RET/PTC* positive patients ($P=0.012$). The *BRAF* mutation also correlates with the classical variant of PTC ($P<0.001$). The number of patients, who underwent reoperation of recurrent lymph node metastases, was higher, but not significantly ($P=0.073$). Five patients did not respond to RAI treatment because they did not accumulate RAI. Mutations in the *BRAF* gene and *RET/PTC* rearrangements were exclusively found in malignant samples.

The *TERT* promoter was analyzed only in malignant samples and no mutation was found.

Detected variants in the *IDH1*, *CHEK2* and *PPM1D* genes are summarized in Fig. 1 and Table 5. Variants G105G and V178I in the *IDH1* gene always co-occurred and were detected with comparable frequency 9/83 in malignant and 3/30 in benign samples. The third genetic variant in the *IDH1* gene was Y183C. In the *CHEK2* gene R117G substitution and T367Mfs*15 deletion was identified only in PTC samples. I157T variant was the most common variant in the *CHEK2* gene and was found predominantly in malignant samples. L467F variant was

Table 4 The comparison of clinical and pathological features between *RET/PTC*- and *BRAF*-positive patients.

	<i>RET/PTC</i> (n = 18)	<i>BRAF</i> (n = 15)	P value
Patients			
Females/males	10/8 (1.25:1)	13/2 (6.5:1)	0.070
Age at diagnosis (mean ± s.d.)	13.4 ± 3.6	16.3 ± 2.4	0.012
Tumor size			
Mean ± s.d. (mm)	29.6 ± 18	20 ± 10.6	0.079
Microcarcinoma (<10 mm)	3	4	0.674
Histological variant^a			
Classical	4	11	< 0.001
Classical and follicular	8	0	0.009
Follicular	1	1	1.000
Other	4	0	0.121
Pathological characteristics			
Multifocality	11	8	0.733
Extrathyroidal extension	12	6	0.170
Intravascular invasion	7	3	0.283
T1/T2 classification	5	9	0.085
T3/T4 classification	13	6	
Lymph node metastases (N)	16	7	0.020
Distant metastases (M)	6	0	0.005
Chronic lymphocytic thyroiditis	9	4	0.284
Radioiodine therapy^b			
Without radioiodine therapy	2	2	1.000
One dose	8	5	0.725
Two or more doses	8	7	1.000
Follow-up^c			
Reoperation of recurrent metastases	0	3	0.073
Remission	10	6	0.285
Recurrence or persistence	1	3	0.295
Biochemical persistence	6	5	1.000
Disease-specific mortality	1	0	1.000

^aIn three *BRAF*-positive cases and in one *RET/PTC* positive case histological variant was not available; ^bIn one *BRAF*-positive case radioiodine therapy record was not available; ^cone *BRAF*-positive case was not classified due to short-term follow-up.

Bold indicates statistical significance.

detected only in one patient with follicular adenoma. In the *PPM1D* gene A152A variant was identified only in PTCs and I496V variant was detected in the benign solitary node together with variants of *HRAS* G13R and three variants G105G, V178I and Y183C in the *IDH1* gene. The differences between malignant and benign cohorts were not statistically significant (Table 5). All variants identified in *IDH1*, *CHEK2* and *PPM1D* genes were also tested in DNA from peripheral blood of the same patients

that we had tissue and we revealed all variants as germline. No variants in genes *EIF1AX* and *EZH1* were identified in malignant or in benign samples.

Discussion

Thanks to the development of NGS and using this technique in molecular genetics laboratories, it is possible to study the precise and comprehensive genetic landscape of pediatric thyroid nodules. It helps not only to increase detection rate, but also to identify new molecular markers or cancer gene predispositions. Several years ago, only small cohorts of pediatric patients and few selected numbers of genetic alterations were investigated. Recently, studies with larger cohorts of pediatric patients have appeared with enlarging the spectrum of investigated genetic mutations using NGS panels to find mutations or gene fusions (12, 19, 20). Our study with the size of 113 samples of thyroid nodules is according to our best knowledge the largest pediatric cohort that was analyzed by NGS and provides very important genetic, clinical and pathological data. Unlike our study, in previous studies where NGS panels were also used, presented a limited number of pediatric PTC specimens that ranged from 13 to 25 (12, 19, 20). On the other hand, NGS panels included more genes (14–250) in these studies (12, 19, 20). Moreover, mutations in genes *TET*, *TSHR* (12) and *CDKN2A* (19) and rearrangements of *ALK*, *NTRK1*, *NTRK3*, *PPARγ* genes were revealed (12, 20), besides point mutations in the genes identified also in our study.

Mutations in *RAS* genes occur in malignant and benign pediatric thyroid nodules overall with very low frequency (20, 21, 22, 23). In our cohort, *NRAS* and *HRAS* mutations were detected with no other co-mutation in PTCs with aggressive character, and surprisingly, five *RAS*-positive samples were identified in benign lesions. Clinical impact and prognostic importance of *RAS* mutations is not clearly established, because they appear in follicular adenoma and also in ATC. The risk of malignancy varies among *RAS* genes (*HRAS* 92%, *NRAS* 74%, *KRAS* 61%) in adult population (24). When we consider that pediatric patients have overall higher risk of malignancy than adults, the numbers could be even higher. In our benign cohort, oncocytic changes or uncertain behaviour were identified in *HRAS* and *NRAS*-positive samples, but not in *KRAS*-positive samples. *RAS* mutations could play a role in early cancerogenesis (25). It implies that the pediatric patients with benign lesions harboring *RAS* mutations should be more intensively followed.

Table 5 Identified variants in *IDH1*, *CHEK2* and *PPM1D* genes.

Gene	Exon	Amino acid	Nucleotide	SNP ID	Clinical significance (ClinVar)	SIFT	PolyPhen	Patients with benign issues (n = 30)	Patients with PTCs (n = 83)	P value	Frequency of altered allele in population (GnomAD, %)
<i>IDH1</i>	4	G105G	c.315C>T	rs11554137	Benign	Tolerated	-	3	9	1	5.050
	6	V178I	c.532G>A	rs34218846	Benign	Deleterious	Benign	3	9	1	4.861
	6	Y183C	c.548A>G	rs34599179	Untested	-	Probably damaging	2	2	0.287	0.986
<i>CHEK2</i>	3	R117G	c.349A>G	rs28909982	Likely pathogenic	Deleterious	Probably damaging	0	1	1	0.012
	4	I157T	c.470T>C	rs17879961	Risk factor*	Tolerated	Benign	1	5	1	0.426
<i>PPM1D</i>	11	T367Mfs*15	c.1100delC	rs555607708	Pathogenic	-	Probably damaging	0	1	1	0.208
	13	L467F	c.1401G>C	rs876658908	Uncertain significance	Deleterious	Probably damaging	1	0	0.265	NA
	6	A152A	c.456C>T	rs149400522	Benign	Tolerated	Benign	0	3	0.564	0.444
	6	M96V	c.1486A>G	rs35491690	Likely benign	-	-	1	0	0.265	0.081

*Conflicting interpretations of pathogenicity (uncertain significance/likely pathogenic/pathogenic). GnomAD, Genome Aggregation Database; NA, not available; PTC, papillary thyroid cancer; SIFT, Scale Invariant Feature Transform; SNP, single nucleotide polymorphism.

The *RET/PTC* rearrangement was the most frequent mutation in our cohort of pediatric PTCs, detected in 18/83 malignant samples exclusively. The prevalence of *RET/PTC* in pediatric PTCs is worldwide in the range of 15–67% (7, 8, 26, 27). However, these fusion genes were also found in benign pediatric samples (28). *RET/PTC* is commonly associated with radiation-induced PTC, in which the prevalence is higher (7). In our study, all *RET/PTC*-positive patients were without radiation history. In literature, *RET/PTC* rearrangements do not harbor in general other driver co-mutation in the *BRAF* or *RAS* genes, which was also confirmed in our study. This co-occurrence was found only in few cases and it was associated with more aggressive disease (8, 29). *RET/PTC*-positive samples were associated (not statistically significant) with a higher rate of tumor growth (mostly T3/T4 classification), more frequent extrathyroidal extension, intravascular invasion and multifocality compared to *BRAF*-positive samples. They were significantly associated with more frequent local and distant metastases, especially in cases of *RET/PTC3* rearrangement. No patient underwent reoperation due to recurrent metastases.

The *BRAF* V600E mutation was completely associated with PTC. In our cohort of pediatric PTCs, the prevalence of the *BRAF* V600E was 15/83, which falls within the range of 0–63% of the prevalence *BRAF* mutation in pediatric cases published earlier (7, 9, 30, 31). Possible reasons for wide dispersal of prevalence are different used methods, geographical and environmental factors, size of cohort and age border of pediatric patients. Our study also confirmed that the *BRAF* mutation correlates with the classical variant of PTC and the higher age of patients (32). The association of the *BRAF* V600E mutation with more frequent T1/T2 classification than T3/T4 classification and with higher rate of recurrence was seen, but was not statistically significant (Table 4). *BRAF* V600E-positive patients had more lymph node metastases reoperations due to radiorefractery than *RET/PTC*-positive patients, but the difference was not statistically significant.

In the *IDH1* gene, the germline variants G105G and V178I in similar frequencies in patients with benign and malignant nodules were found. Clinical significance of these variants seems according to ClinVar database and SIFT/PolyPhen *in silico* analysis benign on thyroid tumorigenesis. The Y183C variant was detected with higher frequency in benign nodules. However, this variant was assumed as deleterious/probably damaging by SIFT and PolyPhen analysis. Clinical effect of Y183C variant is still unknown. None of the previously described variants

around codon R132 was found, where the active site of the enzyme occurs (14).

In the TCGA study PTC-causing somatic mutations in *CHEK2*, *PPM1D* and *EIF1AX* genes were identified. Our study revealed several variants in *CHEK2* and *PPM1D* genes that were detected in benign as well as in malignant nodules. These variants did not correspond to those found in the TCGA study (13). All our detected variants in the *CHEK2* and *PPM1D* genes were germline. I157T variant in the *CHEK2* gene was detected in one benign tissue and in five PTCs, which falls in the worldwide range 4.5–15.6% of PTC (33, 34, 35). It was reported that this variant increases the risk of PTC almost twice (OR=1.81) (35). In PTCs, also other variants R117G and T367Mfs*15 in the *CHEK2* gene with probably deleterious effect on protein function were detected (36). It was published that truncating variants are associated with higher risk of thyroid cancer (OR=5.7) than I157T missense variants (OR=2.8) (34). In the *PPM1D* gene two variants were detected in our cohorts with probably benign significance on thyroid tumorigenesis. In our study, any variant in the *EIF1AX* gene was revealed. Frequency of mutations in this gene is generally very low and we assume according to our results, that there is probably no correlation between pediatric thyroid nodules and *EIF1AX* mutations. In one recent study, these novel genes were investigated in pediatric and adult cohorts with PTCs. In pediatric patients, they detected five variants in the *CHEK2* gene, which were presented in all samples, two variants in the *PPM1D* gene and none in the *EIF1AX* gene. Found variants in the *PPM1D* gene did not match ours (37).

Any mutation in the *TERT* promoter in pediatric PTCs was detected. Mutations in this gene are strongly associated with the higher age of adult patients (38). In many studies of pediatric PTC, mutation in the *TERT* promoter has not yet been detected all over the world (9, 19), except one study. They found C228T mutation in 10-year-old patient without extrathyroidal invasion and metastases (39).

In the *EZH1* gene, no mutation was found in benign and malignant specimens in our cohorts. The reason was probably a small cohort of benign samples, because mutations in the *EZH1* gene were detected almost 20 times more frequently (13.5 vs 0.7%) in benign than in malignant thyroid nodules (16). Mutations in the *EZH1* gene were identified only in two PTC cases in the TCGA study (13).

In summary, we revealed genetic cause in 5/30 of benign nodules and in 35/83 of pediatric PTCs; mutations in the *BRAF* gene, *RAS* genes and *RET/PTC* rearrangements

were included. There were significant differences in clinical courses in *RET/PTC* and *BRAF*-positive PTC patients. Patients with *RET/PTC* had more aggressive disease (more frequent local and distant metastases) than patients with *BRAF* mutation. On the basis of the known genetic change in tumor, it could be possible to stratify and individualize the treatment. The role of *RAS* mutations, especially in benign lesions, is not yet fully understood, so it should be kept in mind that they may predispose to cancer and the intensive follow-up of these patients is recommended. Some of the identified variants in the *CHEK2* gene are pathogenic or likely pathogenic and the influence of found variants in the *IDH1* and *PPM1D* gene on thyroid nodules is still uncertain and probably benign.

The genetic landscape of more than half of our PTC cases is still unknown; therefore, further investigation is required, for example in *PTEN* or *PIK3CA* genes, in which somatic mutations in pediatric PTCs were detected (22). Furthermore, other fusion genes need to be identified by RNA sequencing, and copy number variants should also be detected, which could be another trigger of thyroid cancer. The genetic molecular testing seems to be the benefit for pediatric patients for their diagnosis and prognosis. Hopefully, it will improve the quality of life of pediatric patients with thyroid nodules.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic AZV(16-32665A) grants.

References

- Hogan AR, Zhuge Y, Perez EA, Koniaris LG, Lew JI & Sola JE. Pediatric thyroid carcinoma: incidence and outcomes in 1753 patients. *Journal of Surgical Research* 2009 **156** 167–172. (<https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.03.098>)
- Niedziela M. Pathogenesis, diagnosis and management of thyroid nodules in children. *Endocrine-Related Cancer* 2006 **13** 427–453. (<https://doi.org/10.1677/erc.1.00882>)
- Vigneri R, Malandrino P & Vigneri P. The changing epidemiology of thyroid cancer: why is incidence increasing? *Current Opinion in Oncology* 2015 **27** 1–7. (<https://doi.org/10.1097/CCO.000000000000148>)
- Francis GL, Waguespack SG, Bauer AJ, Angelos P, Benavente S, Cerutti JM, Dinan CA, Hamilton J, Hay ID, Luster M, et al. Management guidelines for children with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2015 **25** 716–759. (<https://doi.org/10.1089/thy.2014.0460>)
- Mitsutake N, Fukushima T, Matsuse M, Rogounovitch T, Saenko V, Uchino S, Ito M, Suzuki K, Suzuki S & Yamashita S. BRAFV600E

- mutation is highly prevalent in thyroid carcinomas in the young population in Fukushima: a different oncogenic profile from Chernobyl. *Scientific Reports* 2015 **5** 16976. (<https://doi.org/10.1038/srep16976>)
- 6 Mon R & Newlon J. Anaplastic carcinoma of the thyroid in a 12-year old girl. *Journal of Pediatric Surgery Case Reports* 2015 **3** 404–406. (<https://doi.org/10.1016/j.epsc.2015.08.004>)
 - 7 Cordioli MICV, Moraes L, Cury AN & Cerutti JM. Are we really at the dawn of understanding sporadic pediatric thyroid carcinoma? *Endocrine-Related Cancer* 2015 **22** R311–R324. (<https://doi.org/10.1530/ERC-15-0381>)
 - 8 Gertz RJ, Nikiforov Y, Rehrauer W, McDaniel L & Lloyd RV. Mutation in BRAF and other members of the MAPK pathway in papillary thyroid carcinoma in the pediatric population. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2016 **140** 134–139. (<https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0612-OA>)
 - 9 Oishi N, Kondo T, Nakazawa T, Mochizuki K, Inoue T, Kasai K, Tahara I, Yabuta T, Hirokawa M, Miyauchi A, et al. Frequent BRAF V600E and absence of tert promoter mutations characterize sporadic pediatric papillary thyroid carcinomas in Japan. *Endocrine Pathology* 2017 **28** 103–111. (<https://doi.org/10.1007/s12022-017-9470-y>)
 - 10 Hay ID, Gonzalez-Losada T, Reinalda MS, Honetschlager JA, Richards ML & Thompson GB. Long-term outcome in 215 children and adolescents with papillary thyroid cancer treated during 1940 through 2008. *World Journal of Surgery* 2010 **34** 1192–1202. (<https://doi.org/10.1007/s00268-009-0364-0>)
 - 11 Penko K, Livezey J, Fenton C, Patel A, Nicholson D, Flora M, Oakley K, Tuttle RM & Francis G. BRAF mutations are uncommon in papillary thyroid cancer of young patients. *Thyroid* 2005 **15** 320–325. (<https://doi.org/10.1089/thy.2005.15.320>)
 - 12 Borre PV, Schrock AB, Anderson PM, Morris JC, Heilmann AM, Holmes O, Wang K, Johnson A, Waguespack SG, Ou SI, et al. Pediatric, adolescent, and young adult thyroid carcinoma harbors frequent and diverse targetable genomic alterations, including kinase fusions. *Oncologist* 2017 **22** 255–263. (<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0279>)
 - 13 Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014 **159** 676–690. (<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>)
 - 14 Hemeryk JP, Bastos AU & Cerutti JM. Identification of several novel non-p. R132 IDH1 variants in thyroid carcinomas. *European Journal of Endocrinology* 2010 **163** 747–755. (<https://doi.org/10.1530/EJE-10-0473>)
 - 15 Calebiro D, Grassi ES, Eszlinger M, Ronchi CL, Godbole A, Bathon K, Guizzardi F, De Filippis T, Krohn K, Jaeschke H, et al. Recurrent EZH1 mutations are a second hit in autonomous thyroid adenomas. *Journal of Clinical Investigation* 2016 **126** 3383–3388. (<https://doi.org/10.1172/JCI84894>)
 - 16 Jung CK, Kim Y, Jeon S, Jo K, Lee S & Bae JS. Clinical utility of EZH1 mutations in the diagnosis of follicular-patterned thyroid tumors. *Human Pathology* 2018 **81** 9–17. (<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.04.018>)
 - 17 Dvorakova S, Sykorova V, Vlachikova E, Sykorova P, Vlcek P, Kodetova D, Lastuvka P, Betka J, Mokrejs M, Vcelak J, et al. A 3-bp deletion VK600-1E in the BRAF gene detected in a young woman with papillary thyroid carcinoma. *Endocrine Pathology* 2015 **26** 309–314. (<https://doi.org/10.1007/s12022-015-9387-2>)
 - 18 Halkova T, Dvorakova S, Vlachikova E, Sykorova V, Vcelak J, Sykorova P, Vlcek P, Reboun M, Katra R, Kodetova D, et al. A novel RET/PTC variant detected in a pediatric patient with papillary thyroid cancer without ionization history. *Human Pathology* 2015 **46** 1962–1969. (<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.08.013>)
 - 19 Ballester LY, Sarabia SF, Sayeed H, Patel N, Baalwa J, Athanassaki I, Hernandez JA, Fang E, Quintanilla NM, Roy A, et al. Integrating molecular testing in the diagnosis and management of children with thyroid lesions. *Pediatric and Developmental Pathology* 2016 **19** 94–100. (<https://doi.org/10.2350/15-05-1638-OA.1>)
 - 20 Ficarsic JL, Buryk MA, Ozolek J, Ranganathan S, Monaco SE, Simons JP, Witchel SF, Gurtunca N, Joyce J, Zhong S, et al. Molecular characterization of sporadic pediatric thyroid carcinoma with the DNA/RNA ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Pediatric and Developmental Pathology* 2016 **19** 115–122. (<https://doi.org/10.2350/15-07-1667-OA.1>)
 - 21 Eszlinger M, Niedziela M, Typlt E, Jaeschke H, Huth S, Schaarschmidt J, Aigner T, Trejster E, Krohn K, Bösenberg E, et al. Somatic mutations in 33 benign and malignant hot thyroid nodules in children and adolescents. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014 **393** 39–45. (<https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.05.023>)
 - 22 Alzahrani AS, Murugan AK, Qasem E, Alswailim M, Al-Hindi H & Shi Y. Single point mutations in pediatric differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2017 **27** 189–196. (<https://doi.org/10.1089/thy.2016.0339>)
 - 23 Mostoufi-Moab S, Labourier E, Sullivan L, LiVolsi V, Li Y, Xiao R, Beaudenon-Huibregtse S, Kazahaya K, Adzick NS, Baloch Z, et al. Molecular testing for oncogenic gene alterations in pediatric thyroid lesions. *Thyroid* 2018 **28** 60–67. (<https://doi.org/10.1089/thy.2017.0059>)
 - 24 Patel SG, Carty SE, McCoy KL, Ohori NP, LeBeau SO, Seethala RR, Nikiforova MN, Nikiforov YE & Yip L. Preoperative detection of RAS mutation may guide extent of thyroidectomy. *Surgery* 2017 **161** 168–175. (<https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.04.054>)
 - 25 Kato S, Lippman SM, Flaherty KT & Kurzrock R. The conundrum of genetic ‘drivers’ in benign conditions. *Journal of the National Cancer Institute* 2016 **108** djw036. (<https://doi.org/10.1093/jnci/djw036>)
 - 26 Bongarzoni I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, Basolo F, Pinchera A, Pilotti S & Pierotti MA. Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996 **81** 2006–2009. (<https://doi.org/10.1210/jcem.81.5.8626874>)
 - 27 Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL & Tuttle RM. The ret/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000 **85** 1170–1175. (<https://doi.org/10.1210/jcem.85.3.6472>)
 - 28 Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, Basolo F, Demidchik EP, Miccoli P, Pinchera A, et al. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 **86** 3211–3216. (<https://doi.org/10.1210/jcem.86.7.7678>)
 - 29 Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, BinHumaid FS, Alkhafaji D, Al-Rijjal RA, Meyer BF & Shi Y. Concomitant RAS, RET/PTC, or BRAF mutations in advanced stage of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2014 **24** 1256–1266. (<https://doi.org/10.1089/thy.2013.0610>)
 - 30 Henke LE, Perkins SM, Pfeifer JD, Ma C, Chen Y, DeWees T & Grigsby PW. BRAF V600E mutational status in pediatric thyroid cancer. *Pediatric Blood and Cancer* 2014 **61** 1168–1172. (<https://doi.org/10.1002/pbc.24935>)
 - 31 Kumagai A, Namba H, Saenko VA, Ashizawa K, Ohtsuru A, Ito M, Ishikawa N, Sugino K, Ito K, Jeremiah S, et al. Low frequency of BRAF T1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 **89** 4280–4284. (<https://doi.org/10.1210/jc.2004-0172>)
 - 32 Nikita ME, Jiang W, Cheng SM, Hantash FM, McPhaul MJ, Newbury RO, Phillips SA, Reitz RE, Waldman FM & Newfield RS. Mutational analysis in pediatric thyroid cancer and correlations with age, ethnicity, and clinical presentation. *Thyroid* 2016 **26** 227–234. (<https://doi.org/10.1089/thy.2015.0401>)

- 33 Cybulski C, Gorski B, Huzarski T, Masojć B, Mierzejewski M, Dębniak T, Teodorczyk U, Byrski T, Gronwald J, Matyjasik J, *et al.* CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *American Journal of Human Genetics* 2004 **75** 1131–1135. (<https://doi.org/10.1086/426403>)
- 34 Siolek M, Cybulski C, Gašior-Perćzak D, Kowalik A, Kozak-Klonowska B, Kowalska A, Chłopek M, Kluźniak W, Wokolorczyk D, Pałyga I, *et al.* CHEK 2 mutations and the risk of papillary thyroid cancer. *International Journal of Cancer* 2015 **137** 548–552. (<https://doi.org/10.1002/ijc.29426>)
- 35 Kaczmarek-Rys M, Ziemnicka K, Hryhorowicz ST, Górczak K, Hoppe-Golebiewska J, Skrzypczak-Zielńska M, Tomys M, Gołąb M, Szkudlarek M, Budny B, *et al.* The c.470T>C CHEK2 missense variant increases the risk of differentiated thyroid carcinoma in the Great Poland population. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2015 **13** 8. (<https://doi.org/10.1186/s13053-015-0030-5>)
- 36 Desrichard A, Bidet Y, Uhrhammer N & Bignon YJ. CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families. *Breast Cancer Research* 2011 **13** R119. (<https://doi.org/10.1186/bcr3062>)
- 37 Alzahrani AS, Murugan AK, Qasem E, Alswailem MM, AlGhamdi B, Moria Y & Al-Hindi H. Absence of EIF1AX, PPM1D, and CHEK2 mutations reported in thyroid Cancer Genome Atlas (TCGA) in a large series of thyroid cancer. *Endocrine* 2018 **63** 94–100. (<https://doi.org/10.1007/s12020-018-1762-6>)
- 38 Xing M, Liu R, Liu X, Murugan AK, Zhu G, Zeiger MA, Pai S & Bishop J. BRAF V600E and tert promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence. *Journal of Clinical Oncology* 2014 **32** 2718–2726. (<https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.5094>)
- 39 Alzahrani AS, Qasem E, Murugan AK, Al-Hindi HN, AlKhafaji D, Almohanna M, Xing M, Alhomaidah D & AlSwaleem M. Uncommon tert promoter mutations in pediatric thyroid cancer. *Thyroid* 2016 **26** 235–241. (<https://doi.org/10.1089/thy.2015.0510>)

Received in final form 2 May 2019

Accepted 14 May 2019

Accepted Preprint published online 14 May 2019

3.2 Publikace č. 2: *RET, NTRK, ALK, BRAF, and MET* Fusions in a Large Cohort of Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas

Souhrn:

Somatickým bodovým mutacím u dětských PTC bylo věnováno několik studií, avšak komplexní studie týkající se detekce fúzních genů pomocí RNA sekvenování v literatuře chyběla. Cílem této studie bylo detekovat pomocí RNA sekvenování různé typy fúzních genů u nádorů štítné žlázy u pediatrických pacientů a výsledky korelovat s klinickými a patologickými daty. Soubor čítal 93 vzorků od dětských a dospívajících pacientů s PTC, v době publikace se jednalo o největší soubor, u kterého byly analyzovány fúzní geny pomocí RNA sekvenace.

U 72/93 pacientů jsme našli kauzální patogenní mutaci, přičemž u 52/93 případů jsme detekovali fúzní gen. Celkově bylo zaznamenáno 20 různých typů fúzních genů asociovaných s onkogeny: *RET, NTRK1, NTRK3, ALK, BRAF, MET*. Pět typů fúzních genů nebylo v době publikace v literatuře popsáno (*TPR/RET, IKBKG/RET, BBIP1/RET, OPTN/BRAF, EML4/MET*) a jeden typ nebyl do té doby odhalen u karcinomů štítné žlázy (*CUL1/BRAF*). Klinická a patologická data byla porovnána mezi kohortami pozitivními a negativními na fúzní gen. U pacientů s PTC pozitivních na fúzní gen byla častěji zaznamenána extratyreoidální extenze, vyšší kategorie T v TNM klasifikaci, častější lokální a distální metastázy, chronická lymfocytární tyreoiditida a četná psamomatózní tělíska. Vyšší četnost lokálních a distálních metastáz byla zaznamenána u pacientů s karcinomem pozitivním na *RET* fúzní gen oproti pacientům pozitivních na *NTRK3* fúzní gen. Pacientům s karcinomem pozitivním na fúzní gen bylo podáno více dávek RAI. U pediatrických pacientů s PTC byla prokázána vysoká četnost fúzních genů a jejich vysoká variabilita. Pacienti s karcinomem pozitivním na fúzní geny měli vyšší agresivitu onemocnění než pacienti, u kterých fúzní gen nebyl zachycen.

Význam publikace:

Poznatky této studie přispěly k lepší diagnostice, prognostice a léčbě karcinomů štítné žlázy u dětských pacientů.

Podíl na publikaci:

Můj podíl na práci zahrnoval: 1) izolaci nukleových kyselin ze zmražených tkání štítné žlázy (nově shromážděné vzorky), 2) sekvenaci genů: *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *TERT* a vyhodnocení sekvenačních dat 3) přípravu všech knihoven na RNA sekvenaci, 4) RNA sekvenaci vybraných vzorků, 5) bioinformatické vyhodnocení, 6) navržení a optimalizaci primerů pro detekci fúzních genů pomocí real-time PCR, 7) zpracování a vyhodnocení klinických dat, 8) provedení klinicko-genetické korelace, 9) statistické zhodnocení, 10) vytvoření tabulek a obrázků, 11) sepsání celého rukopisu

RET, NTRK, ALK, BRAF, and MET Fusions in a Large Cohort of Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas

Barbora Pekova,¹ Vlasta Sykorova,¹ Sarka Dvorakova,¹ Eliska Vaclavikova,¹
Jitka Moravcova,¹ Rami Katra,² Jaromir Astl,³ Petr Vlcek,⁴
Daniela Kodetova,⁵ Josef Vcelak,¹ and Bela Bendlova¹

Background: Pediatric papillary thyroid carcinoma (PTC) is a rare malignancy, but with increasing incidence. Pediatric PTCs have distinct clinical and pathological features and even the molecular profile differs from adult PTCs. Somatic point mutations in pediatric PTCs have been previously described and studied, but complex information about fusion genes is lacking. The aim of this study was to identify different fusion genes in a large cohort of pediatric PTCs and to correlate them with clinical and pathological data of patients.

Methods: The cohort consisted of 93 pediatric PTC patients (6–20 years old). DNA and RNA were extracted from fresh frozen tissue samples, followed by DNA and RNA-targeted next-generation sequencing analyses. Fusion gene-positive samples were verified by real-time polymerase chain reaction.

Results: A genetic alteration was found in 72/93 (77.4%) pediatric PTC cases. In 52/93 (55.9%) pediatric PTC patients, a fusion gene was detected. Twenty different types of *RET*, *NTRK3*, *ALK*, *NTRK1*, *BRAF*, and *MET* fusions were found, of which five novel, *TPR/RET*, *IKBKG/RET*, *BBIP1/RET*, *OPTN/BRAF*, and *EML4/MET*, rearrangements were identified and a *CUL1/BRAF* rearrangement that has not been previously described in thyroid cancer. Fusion gene-positive PTCs were significantly associated with the mixture of classical and follicular variants of PTC, extrathyroidal extension, higher T classification, lymph node and distant metastases, chronic lymphocytic thyroiditis, and frequent occurrence of psammoma bodies compared with fusion gene-negative PTCs. Fusion-positive patients also received more doses of radioiodine therapy. The most common fusion genes were the *RET* fusions, followed by *NTRK3* fusions. *RET* fusions were associated with more frequent lymph node and distant metastases and psammoma bodies, and *NTRK3* fusions were associated with the follicular variant of PTC.

Conclusions: Fusion genes were the most common genetic alterations in pediatric PTCs. Fusion gene-positive PTCs were associated with more aggressive disease than fusion gene-negative PTCs.

Keywords: papillary thyroid carcinoma, pediatric, fusion genes, rearrangements, RNA targeted sequencing

Introduction

THYROID CANCER IS THE most common endocrine malignancy in pediatric patients and its incidence is increasing worldwide (1,2). Moreover, thyroid cancer is the second most common cancer among adolescents aged 15–19 years in the United States (1,3). Papillary thyroid carcinomas (PTCs) account for ~90% of pediatric thyroid carcinomas (4) that differ clinically, pathologically, and genetically from adult PTCs. Pediatric PTCs are usually more advanced at the time of diagnosis with a larger tumor size and higher rate of lymph node metastases and distant

metastases occurring mostly in the lungs (5–7). However, the prognosis of pediatric PTC is excellent (8).

Pediatric PTCs have driver mutations with a different detection rate than in adults. The *BRAF*^{V600E} mutation is not as common in pediatric PTCs as in adults, and mutations in *RAS* genes are rare (7,9). *RET/PTC* rearrangements, the most common being the *CCDC6/RET* fusion gene (also known as *RET/PTC1*) in sporadic cohorts and the *NCOA4/RET* fusion gene (also known as *RET/PTC3*) in cohorts of radiation-induced PTCs, occur more frequently in pediatric than in adult PTCs (10,11). These two fusion genes have been investigated for more than 20 years in different

¹Department of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic.
²Departments of ²Ear, Nose and Throat, ³Nuclear Medicine and Endocrinology, and ⁴Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic.
⁵Department of Otorhinolaryngology and Maxillofacial Surgery, 3rd Faculty of Medicine, Military University Hospital, Prague, Czech Republic.

pediatric cohorts worldwide (10,12–15) and the association between chromosomal rearrangements and exposure of pediatric patients to ionizing radiation has been reported (10,12). Recently, other types of fusion genes have been found in addition to the *RET/PTC* rearrangements, but have not been comprehensively studied in a large pediatric cohort. Reported fusions included *ETV6/NTRK3* (11), *STRN/ALK* (16), *AKAP9/BRAF* (11), *AGK/BRAF* (17), *PAX8/PPARG* (18), and others.

In our recent study, we have performed an analysis of genetic alterations in 83 PTCs and 30 benign tumors of pediatric patients. The analysis included *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *IDH1*, *CHEK2*, *PPM1D*, *EIF1AX*, and *EZH1* genes and *CCDC6/RET* and *NCOA4/RET* fusion genes (19). Driver mutations were found in 42.2% of PTCs (19). In most PTC samples, a genetic alteration was not detected, thus we decided to extend the analysis to include additional fusion genes.

The aim of the current study was to identify known as well as novel fusion genes in a cohort of 93 pediatric PTC samples. A further goal of the study was to determine any association of the presence of mutations with clinical and pathological features in pediatric patients with PTC.

Materials and Methods

Patients

The cohort consisted of 93 pediatric patients who underwent thyroid surgery from 2003 to 2019 at the Department of Ear, Nose and Throat, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital in Prague. Informed consent was obtained from all patients or their legal representatives. The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology in Prague. Samples were evaluated by an experienced pathologist and classified according to the 7th edition of the AJCC TNM system. Clinical and pathological data were collected from each patient.

DNA and RNA extraction

DNA and RNA were extracted from homogenized, fresh frozen tissues using the AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. DNA and RNA concentrations were measured using a fluorometer (Qubit 2.0; Invitrogen, Carlsbad, CA), purity was evaluated using a spectrophotometer (NanoPhotometer P330; Impln GmbH, München, Germany), and RNA integrity was tested using the Bioanalyzer 2100 and the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). All RNA samples used for analyses had an RNA integrity number ≥ 8 .

RNA-targeted sequencing

Detection of known and novel fusion genes was performed by paired-end RNA sequencing using the QIAseq Targeted RNAscan panel (Qiagen, Venlo, The Netherlands) in the first analysis and the FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung panel (ArcherDx, Boulder, CO) in the second analysis.

First, 84 PTC samples were sequenced using the QIAseq Targeted RNAscan panel according to the manufacturer's protocol. Briefly, RNA was reverse transcribed using random primers into double-stranded cDNA whose ends were modified and adenylated, and adapters containing unique molecular tags (UMTs) and sample indexes were ligated. Then, single

primer extension was performed, followed by universal polymerase chain reaction (PCR), during which the second sample indexes were added. Purified libraries were quantified using a fluorometer and paired-end sequencing was performed on the HiSeq 2500 sequencer (Illumina, San Diego, CA). Cycles for Read 1 and Read 2 were 231 and 71, respectively. Bioinformatic analysis was performed using the GeneGlobe Data Analysis Center software, version 2.0.2. (Qiagen).

The remaining nine samples that were not sequenced in the first RNA sequencing analysis, five samples with novel or rare fusion gene detected by the first RNA sequencing analysis, and samples that had low complexity, meaning less than 300,000 reads with different UMTs per sample after the first RNA sequencing analysis, were used for the second RNA sequencing analysis using the FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung panel. The libraries were prepared following the manufacturer's instructions similar to the first sequencing run, and paired-end sequencing was performed on the MiSeq sequencer (Illumina). Cycles for Read 1 and Read 2 were 151 and 151, respectively. Bioinformatic analysis was performed using the Archer Analysis software, version 6.0.4 (ArcherDx).

In both analyses, for a gene fusion to be considered as valid, at least five high-quality unique reads had to span the breakpoint and a minimum of three reads had to have a unique start site.

Verification of fusion genes

The presence of fusion genes from RNA sequencing analyses was verified by real-time PCR. RNA (2 μ g) was reverse transcribed into cDNA in a final volume of 25 μ L using random primers (Promega, Madison, WI) with an annealing temperature of 70°C for 5 minutes, then the AMV reverse transcriptase, RNase inhibitor, and dNTP reagents (Promega) were added and incubated at 25°C for 10 minutes, 37°C for 60 minutes, and 80°C for 5 minutes.

Subsequently, cDNA was diluted five times and amplified with the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) and gene-specific primers, which were designed using the NCBI Primer BLAST tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). The Kaviar software was used to avoid primer design in the gene region with variants occurring with a frequency higher than 0.08% in the population. Primer sequences are summarized in Supplementary Table S1. Amplification of the *ACTB* gene was used as a cDNA quality control and cDNAs of all samples were required to have an amplification curve of the *ACTB* gene that crossed the threshold before cycle 30.

Real-time PCR was performed as follows using the Light Cycler[®] 480 system (Roche, Penzberg, Germany): 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 10 seconds and 60°C for 30 seconds. The melting curve was recorded by holding at 95°C for 10 seconds, cooling to 70°C for 1 minute, and then slowly heating to 95°C (ramp rate of 0.11°C/s) with continuous acquisition of the fluorescence signal. PCRs were performed in duplicate and each experiment included a negative control where RNase-free water was used instead of template cDNA. The evaluation was performed using the Light Cycler[®] 480 SW 1.5.1. (Roche). Samples positive for *CCDC6/RET* and *NCOA4/RET* fusion genes were known from a previous analysis (19).

DNA-targeted sequencing

Detection of point mutations in *BRAF* (exon 15), *HRAS* (exons 2 and 3), *KRAS* (exons 2 and 3), *NRAS* (exons 2 and 3), and *TERT* (promoter) genes was performed in all samples as described previously (19). DNA was amplified using gene-specific primers that are available with PCR conditions on request. PCR products were purified using the Agencourt AMPure (Beckman Coulter, Brea, CA), libraries were prepared using the Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) according to the manufacturer's protocol and sequenced for 500 cycles by the MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina) using the MiSeq sequencer (Illumina). The Integrative Genomics Viewer was used for sequence data visualization.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Fisher's exact test to compare categorical data and *t*-test to compare continuous variables. *p* Value <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Study cohort

The cohort consisted of 93 pediatric PTC patients (6–20 years old). The mean age of diagnosis was 14.5 ± 3.4 years and the female-to-male ratio was 2.6:1. A family history of thyroid disorder was present in 30 patients. One patient was diagnosed with Cowden syndrome with germline *PTEN* mutation. Two patients underwent radiation treatment before the diagnosis of PTC, the first patient was diagnosed with acute lymphoblastic leukemia and the second patient was diagnosed with Hodgkin's lymphoma.

Initial symptoms or signs for detection of PTCs were evaluated in individual patients. In 34 (41.0%) patients, a thyroid nodule was palpated by a family member or by the patient himself. Nineteen (22.9%) patients were followed for endocrine diseases such as goiter, hypothyroidism, or chronic lymphocytic thyroiditis and a thyroid nodule was detected by sonography. In 15 (18.1%) patients, a thyroid nodule was palpated during a pediatrician's examination. In 14 (16.9%) patients, a thyroid nodule was found during examination for another disease, and in only one (1.2%) patient, a thyroid nodule was identified during active screening of a pediatric patient whose father had PTC. In 10 patients, the initial symptoms of PTC were unknown.

Total thyroidectomy (TT) was performed in 82 patients and subtotal thyroidectomy in 11 patients, which was completed to TT in 10 cases. The mean tumor size was 22.1 ± 13.7 mm and 17 patients had microcarcinoma. Among histological variants of PTC, there were 26 (29.9%) cases of the classical variant, 20 (23.0%) cases of a mixture of classical and follicular variants, 29 (33.3%) cases of the follicular variant, 3 (3.4%) cases of the solid variant, 3 (3.4%) cases of a mixture of classical, follicular, and solid variants, 2 (2.3%) cases of the diffuse sclerosing variant, 2 (2.3%) cases of the columnar variant, 1 (1.1%) case of the tall cell variant, and 1 (1.1%) case of the clear cell variant. In six cases, a histological variant was not specified.

Multifocality was observed in 50 (53.8%) cases, extra-thyroidal invasion in 38 (40.9%) cases, angioinvasion in 24 (25.8%) cases, lymph node metastases in 58 (62.4%) cases, and distant metastases in 10 (10.8%) cases. Chronic lym-

phocytic thyroiditis was present in 49 (52.7%) samples, and the frequent occurrence of psammoma bodies was observed in 13 (14%) samples. The specimens with few psammoma bodies (up to 5 bodies per tissue section) were not included.

The median follow-up of the patients was 72 months (range of 2–198 months). Eleven (13.3%) patients had persistent or recurrent disease based on ultrasound or whole-body scintigraphy. Sixteen (19.3%) patients had only biochemical evidence of persistent disease with the basal thyroglobulin blood serum level higher than $1 \mu\text{g/L}$ or detectable levels of thyroglobulin antibodies. Fifty-six (67.5%) patients had no evidence of disease. One (1.2%) patient, a 7-year-old boy, died due to advanced disease with extensive metastases spread in the lungs before radioiodine (RAI) treatment. Ten patients were not classified due to short-term follow-up (less than one year after surgery). Eighty-four patients received RAI treatment. Eight patients did not receive RAI therapy due to having microcarcinoma (low-risk disease).

Detection of fusion genes

Fusion genes were found in 52 (55.9%) pediatric PTC patients. All fusions included known oncogenes, *RET*, *NTRK1*, *NTRK3*, *ALK*, *BRAF*, or *MET*. Ten different types of *RET* fusions were identified in 26 patients, four different types of *NTRK3* fusions were detected in 14 patients, 1 type of *ALK* fusion was found in 6 patients, 2 types of *NTRK1* fusions were identified in 3 patients, 2 types of *BRAF* fusions were detected in 2 patients, and 1 type of *MET* fusion was found in 1 patient (Fig. 1A). A total of 20 types of different fusion genes were identified, of which 11 were interchromosomal and 9 were intrachromosomal rearrangements (Fig. 1B, C). Two coexisting *RET* fusions were detected in one PTC nodule, the first *ACBD5/RET* fusion comprised a juxtaposition of exon 11 of the *ACBD5* gene and exon 12 of the *RET* gene, and the second *BBIP1/RET* fusion was a juxtaposition of exon 1 of the *BBIP1* gene and exon 8 of the *RET* gene.

The most common fusion gene was the *CCDC6/RET* rearrangement found in 13 patients (14%), 1 of whom had an isoform, including also a part of exon 9 of the *RET* gene (20). Other common rearrangements were *ETV6/NTRK3* identified in 10 patients (10.8%), *NCOA4/RET* and *STRN/ALK* detected (identical) in 6 patients (6.5%), and *RBPMS/NTRK3* found in 2 patients (2.2%). The remaining fusions were not recurrent. Both *BRAF* fusions with partner genes *CUL1* and *OPTN* were reciprocal. The *IRF2BP2/NTRK1* fusion gene had two isoforms, the first isoform was a fusion of exon 1 and the second isoform was of exon 2 of the *IRF2BP2* gene with exon 10 of the *NTRK1* gene. Each isoform was found in a different patient. No fusion gene-positive patient had a known history of radiation exposure before diagnosis of PTC.

Fusion gene correlations with clinical and pathological data

Clinical and pathological data that correlated with the presence of fusion genes are shown in Figure 2. A more detailed graphical view of age-specific fusion-positive and fusion-negative cases is displayed in Supplementary Figure S1.

Samples positive for the fusion gene were compared with samples that did not harbor this type of mutation, and the results of the comparison are summarized in Table 1. Fusion-positive samples were significantly associated with the mixture of

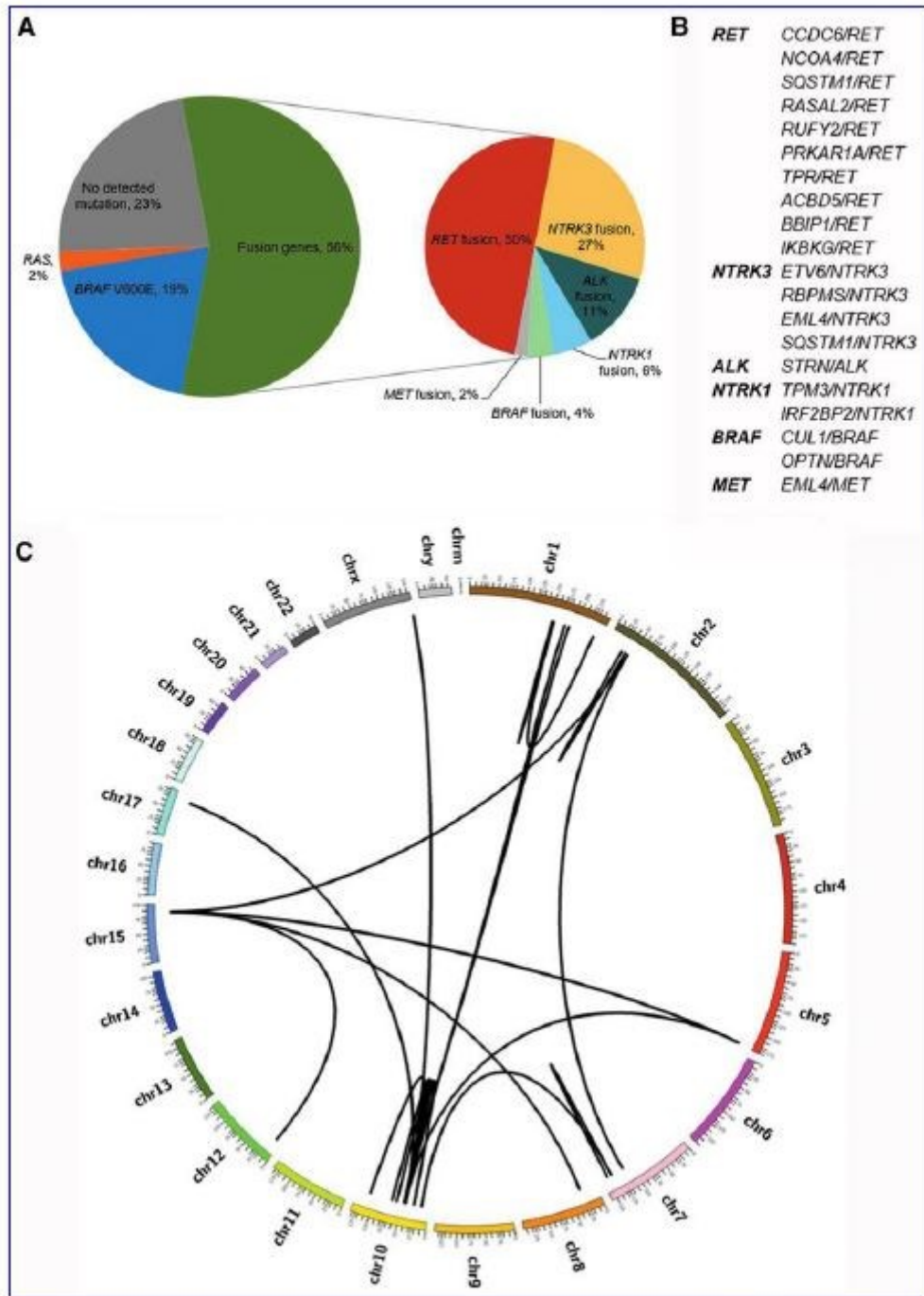


FIG. 1. (A) Mutational analysis of point alterations and fusion genes detected in pediatric PTC patients. (B) Summary of found fusion genes. (C) Circos plot of 20 different types of rearrangements identified in pediatric PTCs. The most prevalent were interchromosomal rearrangements. PTC, papillary thyroid carcinoma.

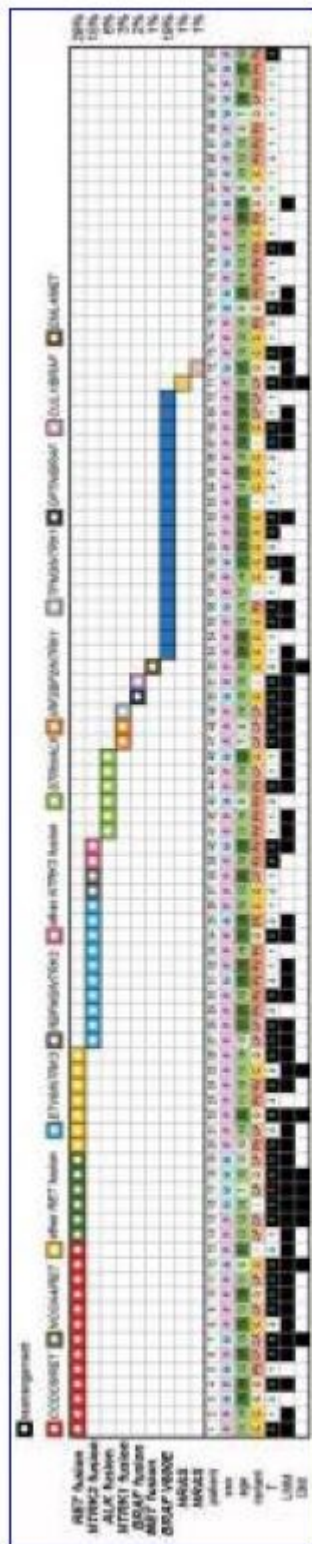


FIG. 2. The plot of genetic alterations detected in pediatric PTC patients. Clinical and pathological data, including sex, age at diagnosis, histological variant, tumor classification, lymph node metastases, and distant metastases; F, female; M, male; C, classical and follicular variants; CF, follicular variant; O, other variant; T, tumor size and extension; LNM, lymph node metastases; DM, distant metastases.

classical and follicular variants of PTC ($p=0.013$), while samples lacking a fusion gene were associated with the classical variant of PTC ($p=0.025$). In addition, fusion-positive samples were also significantly associated with extra-thyroidal extension ($p=0.012$), higher T classification (T3/4) of tumor ($p=0.009$), lymph node ($p < 0.001$) and distant metastases ($p=0.021$), chronic lymphocytic thyroiditis ($p=0.001$), and frequent occurrence of psammoma bodies ($p=0.004$). In addition, patients positive for the fusion gene received more doses of RAI treatment ($p=0.008$).

The samples harboring fusion genes also differed from each other according to the fused oncogene involved. Statistical analysis could only be performed between *RET* fusion and *NTRK3* fusion-positive samples due to the low number of specimens with *ALK*, *NTRK1*, *BRAF*, and *MET* fusions. The comparison of clinical and pathological data between *RET* fusion and *NTRK3* fusion-positive PTCs is shown in Table 1. *RET* fusion-positive PTCs were significantly associated with a lower mean age of patients at the time of diagnosis ($p=0.035$), lymph node ($p=0.033$) and distant metastases ($p=0.020$), and frequent occurrence of psammoma bodies ($p=0.006$). *NTRK3* fusion-positive PTCs were significantly associated with the follicular variant of PTC ($p=0.013$). *RET* fusion-positive tumors were observed in 42.3% (11/26) patients of prepubertal age (up to 12 years) compared with 7.1% (1/14) of *NTRK3* fusion-positive patients ($p=0.021$) (Fig. 2).

The genetic cause of PTC was detected in all patients with distant metastases ($n=10$). In only one case, the point mutation *HRAS*^{G61R} was found, in the remaining nine cases, a fusion gene was identified (4 × *NCOA4/RET*, 2 × *CCDC6/RET*, 1 × *RASAL2/RET*, 1 × *EML4/MET*, and 1 × the co-occurrence of *ACBD5/RET* with *BBIP1/RET*).

Detection of point mutations

All 93 pediatric PTC samples were also screened for point mutations in *BRAF*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, and *TERT* genes. In 18 (19%) patients, the *BRAF*^{V600E} mutation was found, and the *HRAS*^{G61R} mutation and *NRAS*^{G61K} mutation were detected identical in one patient (Fig. 1A). No mutation was found in the *KRAS* gene and in the promoter region of the *TERT* gene. The *HRAS*-positive patient underwent radiation treatment for Hodgkin's lymphoma.

The co-occurrence of a fusion gene and somatic point alteration was not identified. Thus, our extended genetic analyses revealed a point mutation or a fusion gene in a total of 72/93 (77.4%) pediatric PTCs. The oncogenic alteration in 21/93 (22.6%) PTCs remained unidentified. Clinical and pathological features of samples are summarized in Supplementary Table S2. Most of these tumors were follicular variants of PTCs, T1/T2 tumor samples. No patient had a recurrent or persistent structural disease, only one patient had a biochemical persistent disease and the other patients remained in remission.

Discussion

An extended investigation of fusion genes in PTC using next-generation sequencing allowed detection of known as well as novel fusion genes (21). Recently, fusion gene studies have been reported in adult patients using comprehensive RNA sequencing panels (22–24) or studies on a specific fusion gene in adult cohorts have also been performed (25,26). To the best of our knowledge, this is the most comprehensive

TABLE 1. COMPARISON OF CLINICAL AND PATHOLOGICAL FEATURES BETWEEN FUSION GENE-POSITIVE AND FUSION GENE-NEGATIVE PAPILLARY THYROID CARCINOMAS AND BETWEEN RET FUSION AND NTRK3 FUSION-POSITIVE PAPILLARY THYROID CARCINOMAS

	Fusion-positive PTC		Fusion-negative PTC		RET fusion-positive PTC		NTRK3 fusion-positive PTC		p
	n = 52	n = 41	n = 26	n = 14	n = 26	n = 14			
Patients									
Females/males	39/13	29/12	18/8	11/3					0.404
Age at diagnosis, years (mean ± SD)	41.1 ± 3.4	45 ± 3.3	33.6 ± 3.5	15.9 ± 2.4					0.035
History of radiation exposure	0	2	0	0					1
History of prior malignancy before the diagnosis of PTC	0	3	0	0					1
Tumor size									
Mean ± SD (mm)	24.4 ± 14.2	19 ± 12.3	27.4 ± 15.9	20.1 ± 10.4					0.131
Microcarcinoma (≤10 mm) (%)	6 (11.5)	11 (26.8)	2 (7.7)	1 (7.1)					0.737
Histological variant^a									
Classical (%)	10 (20.4)	16 (42.1)	5 (20.8)	2 (14.3)					0.483
Mixture of classical and follicular (%)	16 (32.7)	4 (10.5)	9 (37.5)	3 (21.4)					0.256
Follicular (%)	16 (32.7)	13 (34.2)	4 (16.7)	8 (57.1)					0.013
Other (%)	7 (14.3)	5 (13.2)	6 (25.0)	1 (7.1)					0.177
Pathological characteristics									
Multifocality (%)	29 (55.8)	21 (51.2)	15 (57.7)	7 (50.0)					0.446
Extrathyroidal extension (%)	27 (51.9)	11 (26.8)	16 (61.5)	6 (42.9)					0.212
Intravascular invasion (%)	17 (32.7)	7 (17.1)	11 (42.3)	2 (14.3)					0.071
T1/T2 classification (%)	23 (44.2)	29 (70.7)	8 (30.8)	8 (57.1)					0.100
T3/T4 classification (%)	29 (55.8)	12 (29.3)	18 (69.2)	6 (42.9)					
Lymph node metastases (%)	42 (80.8)	16 (39.0)	23 (88.5)	8 (57.1)					0.033
Distant metastases (%)	9 (17.3)	1 (2.4)	8 (30.8)	0					0.020
Chronic lymphocytic thyroiditis (%)	35 (67.3)	14 (34.1)	17 (65.4)	12 (85.7)					0.159
Frequent psammoma bodies (%)	12 (23.1)	1 (2.4)	10 (38.5)	0					0.006
RAI therapy^b									
No RAI therapy (%)	2 (4.0)	6 (16.2)	1 (4.0)	1 (7.1)					0.877
One dose (%)	21 (42.0)	22 (59.5)	12 (48.0)	6 (42.9)					0.739
Two or more doses (%)	26 (52.0)	9 (24.3)	11 (44.0)	7 (50.0)					0.489
Follow-up^c									
Remission (%)	30 (62.5)	25 (71.4)	14 (56.0)	11 (84.6)					0.078
Biochemical persistence (%)	10 (20.8)	6 (14.1)	7 (28.0)	1 (7.7)					0.150
Recurrence/persistence (%)	7 (14.6)	4 (11.4)	3 (12.0)	1 (7.7)					0.829
Reoperation of metastases (%)	2 (4.2)	3 (8.6)	0	0					1
Disease-specific mortality (%)	1 (2.0)	0	1 (4.0)	0					1

Values highlighted in bold were statistically significant.

Biochemical persistent disease was defined as the presence of a basal thyroglobulin blood serum level higher than 1 µg/L or detectable levels of thyroglobulin antibodies at least one year after surgery. Recurrent/persistent disease was defined as occurrence of a newly identified or persistent structural disease at least one year after surgery.

^aIn three fusion-positive cases, from which two were RET fusion-positive patients, and in three fusion-negative cases, the histological variant was not provided.

^bIn two fusion-positive cases, from which one was an RET fusion-positive patient, and in four fusion-negative cases, RAI therapy records were not provided. One RET fusion-positive patient died before RAI therapy.

^cFour fusion-positive cases, from which one was an RET fusion-positive patient and one was an NTRK3 fusion-positive patient, and six fusion-negative cases were not classified due to short-term follow-up.

PTC, papillary thyroid carcinoma; RAI, radioiodine; SD, standard deviation.

study of the largest pediatric PTC cohort that has been analyzed using RNA-targeted sequencing.

The total detection rate of fusion genes was 56% and these chromosomal rearrangements were found only in pediatric PTC patients without a known radiation history. The frequency is higher in comparison with other studies of sporadic patients, except the Ukrainian study, in which 64.7% of sporadic patients had the *RET/PTC* rearrangement (10). Previously reported frequencies ranged from 23.7% to 49% (11,17,27–29). However, this depends on the number of tested fusion genes or the size of the cohort. Compared with the detection rate of fusion genes in adults, ranging from 7.8% to 15.3% (22–24), the frequency in pediatric PTC patients is higher. Based on current knowledge, we can only speculate that the more frequent occurrence of fusion genes in pediatric PTC patients may be due to a lower frequency of PTC-associated point mutations whose frequencies increase with aging.

Fusion-positive PTCs in pediatric patients were compared with fusion-negative PTCs and were significantly associated with the mixture of classical and follicular variants of PTC, more aggressive disease (extrathyroidal extension and local and distant metastases), chronic lymphocytic thyroiditis, frequent psammoma bodies, and more doses of RAI treatment. In the literature, this comparison between fusion-positive and fusion-negative PTCs in pediatric patients is lacking. In one study, fusion gene-positive tumors were compared with tumors harboring the *BRAF*^{V600E} mutation, and those with fusions were larger in size with more frequent diffuse infiltration of the thyroid and lymphatic invasion (29). In another study, tumors harboring the fusion gene or *BRAF*^{V600E} mutation were grouped together and compared with tumors negative for genetic alterations. Mutation-positive cases had a significantly larger tumor size (17). In the adult PTC cohort, fusion-positive cases were strongly associated with extensive metastases, local invasion, larger tumor size, and higher tumor stage (23).

RET fusions are the most common fusion events in pediatric PTCs. With the detection rate of 28%, this study is consistent with the previously reported frequencies of 24.6–37% (6,17). Ten fusion partner genes with the *RET* gene were reported. *CCDC6/RET* and *NCOA4/RET* rearrangements were recurrent, and *SQSTM1/RET*, *RASAL2/RET*, *RUFY2/RET*, *PRKARIA/RET*, and *ACBD5/RET* fusion genes were not recurrent, but have been previously described in PTC (30–34). To the best of our knowledge, *TPR/RET*, *BBIP1/RET*, and *IKBK/RET* rearrangements are novel.

RET fusions were associated with the most aggressive disease (more frequent lymph node and distant metastases), even compared with *NTRK3* fusions. The mean age of *RET* fusion-positive patients was significantly lower than the mean age of *NTRK3* fusion-positive patients, and *RET* fusions were associated with distant metastases compared with *NTRK3* fusions. In particular, the *NCOA4/RET* rearrangement was associated with more aggressive tumor behavior (6), which was also confirmed in our study. *RET* fusion-positive tumors were significantly associated with frequent psammoma bodies, as previously suggested (29). In another study, psammoma bodies correlated with more aggressive PTC behavior, but not with any particular mutation (35).

NTRK3 fusions were found in 15% of pediatric PTCs, which was comparable with a detection rate of 5.9–22% previously published (14,29,36). Four different fusion partner genes were found and all of these fusions have been

previously reported in PTC (22,23,33). The *ETV6/NTRK3* fusion gene was the second most common rearrangement in our and another study (36) and was detected in sporadic as well as in radiation-associated PTCs (11).

Compared with *RET* fusion-positive patients, *NTRK3* fusion-positive patients had clinically and pathologically less extensive disease and none of the patients had distant metastases. Furthermore, *NTRK3* fusions were significantly more frequent with the follicular variant of PTC, and an association with the histological variant was also observed in other studies (11,26,36,37). The mixture of classical and follicular variants was also found in our study as well as in other studies (22,25). The aggressiveness of *NTRK3* fusions is still unclear. *NTRK3* fusions have also been published in adults with anaplastic thyroid carcinoma (*VIM/NTRK3*) and poorly differentiated thyroid carcinoma (*ETV6/NTRK3*) (16,38).

ALK fusions were detected in 6% of pediatric PTCs that could only be compared with a few studies investigating *ALK* fusions in pediatric cohorts (16,18,29), of which *ALK* fusions were detected in only one study with a detection rate of 3/14 (21%) (16). One type of *ALK* fusion, *STRN/ALK*, was found in our study. This particular fusion gene has also been described in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas (39), and recently, the *CCDC6/ALK* fusion has been found in medullary thyroid carcinoma in a pediatric patient (40).

NTRK1 fusions are rare. In our study, *NTRK1* fusions were found in 3% of cases, *TPM3/NTRK1* and two isoforms of *IRF2BP2/NTRK1*. These fusions have been previously described (22,23,41), and *TPM3/NTRK1* has recently been found in RAI-refractory advanced thyroid cancer in an adult woman (33). In other studies, *NTRK1* and *NTRK3* fusions were frequently evaluated together and not separately as in this study. However, it seems that *NTRK1* fusion-positive tumors had different features from *NTRK3* fusion-positive tumors. In this study, *NTRK1* fusions were detected in three samples, which was an insufficient number to conduct a statistically evaluable comparison. In one study, another type of *NTRK1* rearrangement, *TFG/NTRK1*, was found in an 11-year-old girl with distant metastases in the lungs and a very rapidly growing tumor (42).

Two *BRAF* fusions were detected in two samples (2%), *CUL1/BRAF* and *OPTN/BRAF*. To our knowledge, *OPTN/BRAF* is a novel fusion and *CUL1/BRAF* has not been previously described in thyroid cancer, but has been reported in ovarian cancer and melanoma (43,44). For the first time in pediatric PTC, *BRAF* fusions, *AKAP9/BRAF* and *AGK/BRAF*, were identified in radiation-exposed PTCs from Ukraine (11). The worldwide detection rate of *AGK/BRAF* fusion differs, probably depending on geographic location. The *AGK/BRAF* fusion was found in 19% of predominantly sporadic PTCs of pediatric patients from Brazil (45) and in 2% of pediatric PTCs from Ukraine (11), while this type of rearrangement was not detected in pediatric patients from the United States or, in our case, from the Czech Republic (16,18,29). Both of the *BRAF* fusions we found were reciprocal, which was in line with previous reports, where reciprocal *BRAF* fusions even with other partner genes (*AGK* and *OSBPL9*) were detected (11,24).

EMLA/MET was the only identified *MET* fusion; to our knowledge, it is novel and the first detected *MET* fusion in pediatric PTC. *MET* fusion (*TFG/MET*) has been previously described in one adult sample of thyroid cancer (22). A 15-

year-old girl positive for *EML4/MET* fusion had multifocal carcinoma with extrathyroidal extension, angioinvasion, metastases in 18 lymph nodes, and distant metastases to the lung. She received five doses of RAI treatment with a cumulative dose of 700 mCi (25.9 GBq) during a period of four years and now she is in remission.

Fusion genes occur mostly without an additional mutation. *RET*, *NTRK3*, *ALK*, and *BRAF* fusions were also found in microcarcinomas, suggesting the driver potential of these fusion genes in early stages of PTC development. We detected only one co-occurrence of *ACBD5/RET* and *BBIP1/RET* rearrangements in one sample. The co-occurrence of fusion genes with a very unusual high frequency of 11% was reported (17). On the other hand, fusion genes in our study were mutually exclusive with the *BRAF* or *RAS* mutation, as suggested by other studies (17,25), except one study describing the co-occurrence of *ETV6/NTRK3* and the *BRAF^{V600E}* mutation (36). In anaplastic thyroid carcinomas, *NTRK* fusions also co-occurred with *TP53* and *TERT* point mutations (16,38).

Our study has some shortcomings. No functional analyses of novel fusion genes were performed. However, all five novel fusion genes (*TPR/RET*, *IKBK/RET*, *BBIP1/RET*, *OPTN/BRAF*, and *EML4/MET*) contained a known oncogene whose kinase domain was a part of the fusion gene. The *TPR*, *IKBK*, *OPTN*, and *EML4* partner genes encode proteins, which comprise a coiled-coil dimerization domain that was also a part of a particular fusion gene and is required for oncogenic activation. The *BBIP1* partner gene encodes a protein of not well-known structure. All partner genes are expressed in the thyroid gland. In other studies, rearrangements containing *RET*, *NTRK3*, *BRAF*, or *MET* genes were detected and functional analyses were performed. Oncogenic activities of fusion genes were confirmed in all cases (46–48). Further studies of the fusion gene detection in other pediatric populations are needed to assess correlations between certain fusion genes and clinical–pathological features.

In summary, fusion events were found in 56% of pediatric PTCs, together with point driver mutations in the *BRAF* and *RAS* genes, a genetic alteration was detected in 77% of pediatric PTC cases. Fusion gene-positive pediatric PTC cases had more aggressive disease with more frequent extrathyroidal extension and lymph node and distant metastases and consequently received more doses of RAI treatment than patients without fusion genes. Twenty different types of fusion genes were identified, including *RET*, *NTRK3*, *ALK*, *NTRK1*, *BRAF*, and *MET* fusions. Five fusion genes were novel and one fusion gene has not been described in thyroid cancer. Molecular testing for fusion genes could be useful for pediatric patients with PTC for evaluating, prognosis, and identifying targets for targeted treatment in those who fail standard therapy.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This work was supported by grants from the Ministry of Health of the Czech Republic AZV (16-32665A) and MH CZ—DRO (Institute of Endocrinology—EÚ, 00023761).

Supplementary Material

Supplementary Figure S1
Supplementary Table S1
Supplementary Table S2

References

- Hogan AR, Zhuge Y, Perez EA, Koniaris LG, Lew JI, Sola JE 2009 Pediatric thyroid carcinoma: incidence and outcomes in 1753 patients. *J Surg Res* **156**:167–172.
- Cho YY, Jang HW, Joung JY, Park S-M, Jeong DJ, Kim SW, Chung JH 2015 Trends in thyroid cancer incidence in Korean children (1999–2012) based on palpation and nonpalpation detection methods. *Eur Thyroid J* **4**:252–259.
- Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A 2014 Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* **64**:83–103.
- Francis GL, Waguespack SG, Bauer AJ, Angelos P, Benvenega S, Cerutti JM, Dinauer CA, Hamilton J, Hay ID, Luster M, Parisi MT, Rachmiel M, Thompson GB, Yamashita S, American Thyroid Association Guidelines Task F 2015 Management Guidelines for Children with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* **25**:716–759.
- Alzahrani AS, Alswailem M, Moria Y, Almutairi R, Alo-taibi M, Munagan AK, Qasem E, Alghamdi B, Al-Hindi H 2018 Lung metastasis in pediatric thyroid cancer: radiological pattern, molecular genetics, response to therapy, and outcome. *J Clin Endocrinol Metab* **104**:103–110.
- Galuppini F, Vianello F, Censi S, Barollo S, Bertazza L, Carducci S, Colato C, Manso J, Rugge M, Iacobone M, Watutantrige Fernando S, Pennelli G, Mian C 2019 Differentiated thyroid carcinoma in pediatric age: genetic and clinical scenario. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**:552–552.
- Paulson VA, Rudzinski ER, Hawkins DS 2019 Thyroid cancer in the pediatric population. *Genes* **10**:723.
- Hay ID, Gonzalez-Losada T, Reinalda MS, Honetschlager JA, Richards ML, Thompson GB 2010 Long-term outcome in 215 children and adolescents with papillary thyroid cancer treated during 1940 through 2008. *World J Surg* **34**:1192–1202.
- Gertz RJ, Nikiforov YE, Rehrauer W, McDaniel L, Lloyd RV 2016 Mutation in *BRAF* and other members of the MAPK pathway in papillary thyroid carcinoma in the pediatric population. *Arch Pathol Lab Med* **140**:134–139.
- Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA 1997 Distinct pattern of *ret* oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* **57**:1690–1694.
- Ricarte-Filho JC, Li S, Garcia-Rendules MER, Montero-Conde C, Voza F, Knauf JA, Heguy A, Viale A, Bogdanova T, Thomas GA, Mason CE, Fagin JA 2013 Identification of kinase fusion oncogenes in post-Chernobyl radiation-induced thyroid cancers. *J Clin Invest* **123**:4935–4944.
- Fugazzola L, Flotti S, Pinchera A, Vorontsova TV, Mondellini P, Bongarzone I, Greco A, Astakhova L, Butti MG, Demidchik EP, Pacini F, Pierotti MA 1995 Oncogenic rearrangements of the *RET* proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res* **55**:5617–5620.
- Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, Basolo F, Demidchik EP, Miccoli P,

- Pinchera A, Pacini F 2001 RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:3211–3216.
14. Mitsutake N, Fukushima T, Matsuse M, Rogounovitch T, Saenko V, Uchino S, Ito M, Suzuki K, Suzuki S, Yamashita S 2015 BRAF V600E mutation is highly prevalent in thyroid carcinomas in the young population in Fukushima: a different oncogenic profile from Chemobyl. *Sci Rep* **5**:16976.
 15. Ballester LY, Sarabia SF, Sayeed H, Patel N, Baalwa J, Athanassaki I, Hernandez JA, Fang E, Quintanilla NM, Roy A, López-Terrada DH 2016 Integrating molecular testing in the diagnosis and management of children with thyroid lesions. *Pediatr Dev Pathol* **19**:94–100.
 16. Vanden Borre P, Schrock AB, Anderson PM, Morris JC, III, Heilmann AM, Holmes O, Wang K, Johnson A, Waguespack SG, Ou S-HI, Khan S, Fung K-M, Stephens PJ, Erlich RL, Miller VA, Ross JS, Ali SM 2017 Pediatric, adolescent, and young adult thyroid carcinoma harbors frequent and diverse targetable genomic alterations, including kinase fusions. *Oncologist* **22**:255–263.
 17. Cordioli MICV, Moraes L, Bastos AU, Besson P, Alves MTdS, Delcelo R, Monte O, Longui C, Cury AN, Cerutti JM 2017 Fusion oncogenes are the main genetic events found in sporadic papillary thyroid carcinomas from children. *Thyroid* **27**:182–188.
 18. Picarsic JL, Buryk MA, Ozolek J, Ranganathan S, Monaco SE, Simons JP, Witchel SF, Gurtunca N, Joyce J, Zhong S, Nikiforova MN, Nikiforov YE 2016 Molecular characterization of sporadic pediatric thyroid carcinoma with the DNA/RNA ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Pediatr Dev Pathol* **19**:115–122.
 19. Pekova B, Dvorakova S, Sykorova V, Vacinova G, Vaclavikova E, Moravcova J, Katra R, Vlcek P, Sykorova P, Kodetova D, Vecelak J, Bendlova B 2019 Somatic genetic alterations in a large cohort of pediatric thyroid nodules. *Endocr Connect* **8**:796–805.
 20. Halkova T, Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, Vecelak J, Sykorova P, Vlcek P, Reboun M, Katra R, Kodetova D, Schrupf M, van Wezel T, Morreau H, Bendlova B 2015 A novel RET/PTC variant detected in a pediatric patient with papillary thyroid cancer without ionization history. *Hum Pathol* **46**:1962–1969.
 21. Yakushina VD, Lerner LV, Lavrov AV 2018 Gene fusions in thyroid cancer. *Thyroid* **28**:158–167.
 22. Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, Asa SL, Auman JT, Balasundaram M, Balu S, Baylin SB 2014 Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* **159**:676–690.
 23. Lu Z, Zhang Y, Feng D, Sheng J, Yang W, Liu B 2017 Targeted next generation sequencing identifies somatic mutations and gene fusions in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget* **8**:45784–45792.
 24. Liang J, Cai W, Feng D, Teng H, Mao F, Jiang Y, Hu S, Li X, Zhang Y, Liu B, Sun ZS 2018 Genetic landscape of papillary thyroid carcinoma in the Chinese population. *J Pathol* **244**:215–226.
 25. Seethala RR, Chiosea SI, Liu CZ, Nikiforova MN, Nikiforov YE 2017 Clinical and morphologic features of ETV6-NTRK3 translocated papillary thyroid carcinoma in an adult population without radiation exposure. *Am J Surg Pathol* **41**:446–457.
 26. Bastos AU, de Jesus AC, Cerutti JM 2018 ETV6-NTRK3 and STRN-ALK kinase fusions are recurrent events in papillary thyroid cancer of adult population. *Eur J Endocrinol* **178**:83–91.
 27. Mostoufi-Moab S, Labourier E, Sullivan L, LiVolsi V, Li Y, Xiao R, Beaudenon-Huibregtse S, Kazahaya K, Adzick NS, Baloch Z, Bauer AJ 2018 Molecular testing for oncogenic gene alterations in pediatric thyroid lesions. *Thyroid* **28**:60–67.
 28. Nikita ME, Jiang W, Cheng S-M, Hantash FM, McPhaul MJ, Newbury RO, Phillips SA, Reitz RE, Waldman FM, Newfield RS 2016 Mutational analysis in pediatric thyroid cancer and correlations with age, ethnicity, and clinical presentation. *Thyroid* **26**:227–234.
 29. Prasad ML, Vyas M, Home MJ, Virk RK, Morotti R, Liu Z, Tallini G, Nikiforova MN, Christison-Lagay ER, Udelsman R, Dinuer CA, Nikiforov YE 2016 NTRK fusion oncogenes in pediatric papillary thyroid carcinoma in northeast United States. *Cancer* **122**:1097–1107.
 30. Kato S, Subbiah V, Marchlik E, Elkin SK, Carter JL, Kurzrock R 2017 RET alterations in diverse cancers: next-generation sequencing of 4,871 patients. *Clin Cancer Res* **23**:1988–1997.
 31. Ritterhouse L, Dias-Santagata D, Nardi V, Iafrate AJ, Le LP, Lenerz JK 2016 The landscape of clinically actionable ALK/MET/RET/ROS1 fusions to reveal a shared pattern of protein domains in fusion partners. *J Clin Oncol* **34**:11560–11560.
 32. Staubitz JI, Schad A, Springer E, Rajalingam K, Lang H, Roth W, Hartmann N, Musholt TJ 2019 Novel rearrangements involving the RET gene in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Genet* **230**:13–20.
 33. van der Tuin K, Ventayol M, Corver W, Khalifa M, Ruano D, Corssmit E, Hes FJ, Links TP, Smit J, Plantinga TS, Kapiteijn E, van Wezel T, Morreau H 2019 Targetable gene fusions identified in radioactive iodine-refractory advanced thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* **180**:235–241.
 34. Hamatani K, Eguchi H, Koyama K, Mukai M, Nakachi K, Kusunoki Y 2014 A novel RET rearrangement (ACB-D5/RET) by pericentric inversion, inv(10)(p12.1;q11.2), in papillary thyroid cancer from an atomic bomb survivor exposed to high-dose radiation. *Oncol Rep* **32**:1809–1814.
 35. Pyo JS, Kang G, Kim DH, Park C, Kim JH, Sohn JH 2013 The prognostic relevance of psammoma bodies and ultrasonographic intratumoral calcifications in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* **37**:2330–2335.
 36. Leeman-Neill RJ, Kelly LM, Liu P, Brenner AV, Little MP, Bogdanova TI, Evdokimova VN, Hatch M, Zurnadzy LY, Nikiforova MN, Yue NJ, Zhang M, Mabuchi K, Tronko MD, Nikiforov YE 2014 ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer. *Cancer* **120**:799–807.
 37. Pfeifer A, Rusinek D, Zebracka-Gala J, Czarniecka A, Chmielik E, Zembala-Nożyńska E, Wojtaś B, Gielniewski B, Szpak-Ulczoł S, Oczko-Wojciechowska M, Krajewska J, Polanska J, Jarzab B 2019 Novel TG-FGFR1 and TRIM33-NTRK1 transcript fusions in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **58**:558–566.
 38. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S 2019 Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol* **32**:147–153.
 39. Kelly LM, Barila G, Liu P, Evdokimova VN, Trivedi S, Panebianco F, Gandhi M, Carty SE, Hodak SP, Luo J, Dacic S, Yu YP, Nikiforova MN, Ferris RL, Altschuler DL, Nikiforov YE 2014 Identification of the transforming STRN-ALK fusion as a potential therapeutic target in the

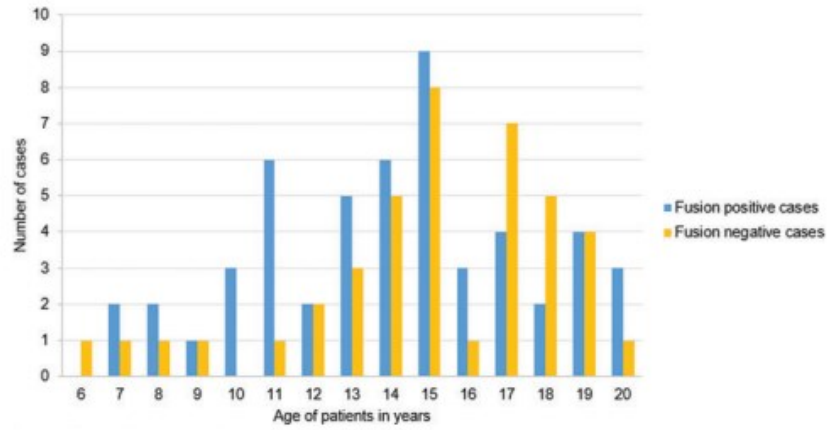
- aggressive forms of thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci* **111**:4233–4238.
40. Hillier K, Hughes A, Shamberger RC, Shusterman S, Perez-Atayde AR, Wassner AJ, Iafrate AJ, Dubuc A, Janeway KA, Rothenberg SM, Cox MC, Randolph GW, Wirth LJ, Tsai H, Church A, DuBois SG 2019 A novel ALK fusion in pediatric medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* **29**:1704–1707.
 41. Greco A, Miranda C, Pierotti M 2010 Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* **321**:44–49.
 42. Shimura K, Shibata H, Mizuno Y, Amano N, Hoshino K, Kuroda T, Kameyama K, Matsuse M, Mitsutake N, Sugino K, Yoshimura NJ, Hasegawa T, Ishii T 2019 Rapid growth and early metastasis of papillary thyroid carcinoma in an adolescent girl with Graves' disease. *Horm Res Paediatr* **91**:210–215.
 43. Grisham RN, Sylvester BE, Won H, McDermott G, DeLair D, Ramirez R, Yao Z, Shen R, Dao F, Bogomolny F, Makker V, Sala E, Soumerai TE, Hyman DM, Socci ND, Viale A, Gershenson DM, Farley J, Lavine DA, Rosen N, Berger MF, Spriggs DR, Aghajanian CA, Solit DB, Iyer G 2015 Extreme outlier analysis identifies occult mitogen-activated protein kinase pathway mutations in patients with low-grade serous ovarian cancer. *J Clin Oncol* **33**:4099–4105.
 44. Botton T, Talevich E, Mishra VK, Zhang T, Shain AH, Berquet C, Gagnon A, Judson RL, Ballotti R, Ribas A, Herlyn M, Rocchi S, Brown KM, Hayward NK, Yeh I, Bastian BC 2019 Genetic heterogeneity of BRAF fusion kinases in melanoma affects drug responses. *Cell Rep* **29**: 573–588.
 45. Sisdelli L, Cordioli MICV, Vaisman F, Moraes L, Colozza-Gama GA, Alves Jr PAG, Araújo Jr ML, Alves MTS, Monte O, Longui CA, Cury AN, Carvalheira G, Cerutti JM 2019 AGK-BRAF is associated with distant metastasis and younger age in pediatric papillary thyroid carcinoma. *Pediatr Blood Cancer* **66**:e27707.
 46. Iyama K, Matsuse M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko V, Suzuki K, Ashizawa M, Ookouchi C, Suzuki S, Mizunuma H, Fukushima T, Suzuki S, Yamashita S 2017 Identification of three novel fusion oncogenes, SQSTM1/NTRK3, AFAP1L2/RET, and PPF1BP2/RET, in thyroid cancers of young patients in Fukushima. *Thyroid* **27**:811–818.
 47. He H, Li W, Yan P, Bundschuh R, Killian JA, Labanowska J, Brock P, Shen R, Heerema NA, de la Chapelle A 2018 Identification of a recurrent LMO7-BRAF fusion in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* **28**:748–754.
 48. Lu H, Villafane N, Dogruluk T, Grzeskowiak CL, Kong K, Tsang YH, Zagorodna O, Pantazi A, Yang L, Neill NJ, Kim YW, Creighton CJ, Verhaak RG, Mills GB, Park PJ, Kucherlapati R, Scott KL 2017 Engineering and functional characterization of fusion genes identifies novel oncogenic drivers of cancer. *Cancer Res* **77**:3502–3512.

Address correspondence to:

Barbora Pekova, MSc
 Department of Molecular Endocrinology
 Institute of Endocrinology
 Narodni 8
 Prague 1 11694
 Czech Republic

E-mail: bpekova@endo.cz

Supplementary Data



SUPPLEMENTARY FIG. S1. Graph showing age distribution of pediatric patients with fusion-positive PTC compared with fusion-negative PTC. PTC, papillary thyroid carcinoma.

SUPPLEMENTARY TABLE S1. PRIMER SEQUENCES OF THE *ACTB* GENE AND FUSION GENES FOR THE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

<i>Gene</i>	<i>Primer sequence</i>	<i>Location</i>	<i>Product size</i>
<i>ACTB</i>	F: AGCCTCGCCTTTGCCGA R: CTGGTGCCTGGGGCG	Exon 1 Exon 2	168
<i>Gene fusion</i>	<i>Primer sequence</i>	<i>Location</i>	<i>Product size</i>
<i>CCDC6/RET</i>	F: CGCGACCTGCGCAA R: CAAGTCTTCCGAGGGAATTCC	Exon 1 Exon 12	183
<i>NCOA4/RET</i>	F: CCCAGGACTGGCTTACCC R: CAAGTCTTCCGAGGGAATTCC	Exon 8 Exon 12	81
<i>SQSTM1/RET</i>	F: AAGCCGGGTGGGAATGT R: AACCAAGTCTTCCGAGGGA	Exon 6 Exon 12	126
<i>RASAL2/RET</i>	F: CATGCTGAGATGCAAGCAGT R: AACCAAGTCTTCCGAGGGA	Exon 15 Exon 12	93
<i>RUFY2/RET</i>	F: TTTAATGAAAACACAGCAGCACC R: AACCAAGTCTTCCGAGGGA	Exon 9 Exon 12	67
<i>PRKARIA/RET</i>	F: TGTGAAATTGTGGGGCATCG R: AACCAAGTCTTCCGAGGGA	Exon 7 Exon 12	88
<i>TPR/RET</i>	F: GAGGTGGAACAAAGGCATACA R: AACCAAGTCTTCCGAGGGA	Exon 20 Exon 12	78
<i>ACBD5/RET</i>	F: TCATCAACATCAACATTGCAGACT R: AACCAAGTCTTCCGAGGGA	Exon 11 Exon 12	84
<i>BBIP1/RET</i>	F: CTTCCGAGTCTCACCGTTAC R: AGCCGTCTCTTGCTGACTG	Exon 1 Exon 8	115
<i>IKBK/RET</i>	F: CAAGATTGTGATGGAGACCGTT R: AACCAAGTCTTCCGAGGGA	Exon 7 Exon 12	79
<i>ETV6/NTRK3</i>	F: ACAGCCGGAGGTCATACTGCAT R: TGATGCCGTGGTTGATGTGGT	Exon 4 Exon 14	107
<i>RBPMS/NTRK3</i>	F: CTCTGCCCAACACTGTACCTCA R: TGATGCCGTGGTTGATGTGGT	Exon 5 Exon 14	111
<i>EML4/NTRK3</i>	F: ATCTCTGAAGATCATGTGGCCT R: TGATGCCGTGGTTGATGTGGT	Exon 2 Exon 14	118
<i>SQSTM1/NTRK3</i>	F: GAACGTTGGGGAGAGTGTGG R: CTGAGTCCCTCCTCACCCTGAT	Exon 5 Exon 14	77
<i>STRN/ALK</i>	F: CGGGACAGAATTGAATCAGGGA R: AGCTCCATCTGCATGGCTTG	Exon 3 Exon 20	96
<i>TPM3/NTRK1</i>	F: TTGCTGAGAGATCGGTAGCCAAG R: CGGGTCTCCAGATGTGCTGTT	Exon 7 Exon 10	77
<i>IRF2BP2/NTRK1</i>	F: GGCCCTTCGAGAGCAAGTTAAGA R: CGGGTCTCCAGATGTGCTGTT	Exon 1 Exon 10	71
<i>IRF2BP2/NTRK1</i>	F: TCCTCTTTTGTGTCTCCGCCAC R: CGGGTCTCCAGATGTGCTGTT	Exon 2 Exon 10	97
<i>CUL1/BRAF</i>	F: TCTTGCAGCAGAATCCAGTT R: CATCACCACGAAATCCTTGGTCTC	Exon 7 Exon 9	72
<i>BRAF/CUL1</i>	F: AATTTGGGCAACGAGACCG R: ACTCTTCGTTGTTCTCAAGC	Exon 8 Exon 8	109
<i>OPTN/BRAF</i>	F: CCAGCGGCTCCTCAGAAGAT R: CATCACCACGAAATCCTTGGTCTC	Exon 4 Exon 9	78
<i>BRAF/OPTN</i>	F: AATTTGGGCAACGAGACCG R: TTCTTTTACTGACCCTTCTGCTTC	Exon 8 Exon 5	104
<i>EML4/MET</i>	F: TGTAGAGCCACACCTGGGAAA R: ACTGCATTGTCCGCATGAACC	Exon 13 Exon 15	80

SUPPLEMENTARY TABLE S2. CLINICAL
AND PATHOLOGICAL FEATURES OF PAPILLARY THYROID
CARCINOMAS WITHOUT DETECTED MUTATIONS

	<i>PTCs without detected mutations</i>
	<i>n = 21</i>
Patients	
Females/males	12/9
Age at diagnosis, years (mean ± SD)	13.5 ± 3.4
Tumor size	
Mean ± SD (mm)	19.0 ± 14.3
Microcarcinoma (≤10 mm) (%)	7 (33.3)
Histological variant	
Classical (%)	4 (19.0)
Mixture of classical and follicular (%)	1 (4.8)
Follicular (%)	12 (57.1)
Other (%)	4 (19.0)
Pathological characteristics	
Multifocality (%)	9 (42.9)
Extrathyroidal extension (%)	3 (14.3)
Intravascular invasion (%)	3 (14.3)
T1/T2 classification (%)	17 (81.0)
T3/T4 classification (%)	4 (19.0)
Lymph node metastases (%)	5 (23.8)
Distant metastases (%)	0
Chronic lymphocytic thyroiditis (%)	8 (38.1)
Frequent psammoma bodies (%)	1 (4.8)
Radioiodine therapy^a	
No radioiodine therapy (%)	4 (21.1)
One dose (%)	14 (73.7)
Two or more doses (%)	1 (5.3)
Follow-up^b	
Remission (%)	18 (94.7)
Biochemical persistence (%)	1 (5.3)
Recurrence/persistence (%)	0
Reoperation of recurrent metastases (%)	0
Disease-specific mortality (%)	0

^aIn two cases, radioiodine therapy records were not provided.

^bTwo cases were not classified due to short-term follow-up.
PTC, papillary thyroid carcinoma; SD, standard deviation.

3.3 Publikace č. 3: *NTRK* Fusion Genes in Thyroid Carcinomas: Clinicopathological Characteristics and Their Impact on Prognosis

Souhrn:

Dříve publikované studie týkající se *NTRK* fúzních genů u nádorů štítné žlázy čítaly velice omezený počet jedinců. Klinická a patologická data nebyla příliš popsána nebo byla zkeslena nevhodným výběrem vyšetřovaného souboru. Cílem této práce bylo detekovat *NTRK* fúzní geny u rozsáhlého souboru nádorů štítné žlázy, korelovat je s klinickými a patologickými daty, porovnat kohorty dospělých a dětských jedinců s karcinomem pozitivním na *NTRK* fúzní gen a zpracovat účinnost léčby jednotlivých pacientů.

Z celkového souboru pacientů jsme *NTRK* fúzní geny detekovali u 57 pacientů s PTC a dvou pacientů s PDTC. Dětských a dospívajících pacientů pozitivních na tyto fúzní geny bylo zaznamenáno 17, dospělých 42. Prevalence *NTRK* fúzních genů byla výrazně vyšší v pediatrickém (16,7 %) než v dospělém souboru (5,7 %). Byla porovnána klinická a patologická data pediatrických a dospělých pacientů a nebyl zjištěn žádný významný rozdíl ve sledovaných kategoriích. Celkově byly *NTRK* fúzní geny asociovány s folikulárním uspořádáním nádoru, chronickou lymfocytární tyreoiditidou a lokálními metastázami, které se vyskytovaly se signifikantně vyšší četností u karcinomů větších než 2 cm. Celkem bylo odhaleno osm různých typů *NTRK* fúzních genů, čtyři různé partnerské geny fúzovaly s onkogenem *NTRK1* a další čtyři partnerské geny s onkogenem *NTRK3*. Porovnáním karcinomů pozitivních na *NTRK1* a *NTRK3* fúzní gen jsme zjistili, že karcinomy pozitivní na *NTRK1* fúzní gen vykazují vyšší frekvenci multifokality a invazivity nádoru. Pacienti s větší velikostí nádoru, přítomnými metastázami a detekovanou patogenní mutací v promotoru *TERT* genu či genu *TP53* měli horší prognózu.

Význam publikace:

Publikace představuje významný přínos k poznání genetického pozadí nádorů štítné žlázy a výsledky jsou využitelné při stanovení diagnózy, určení vhodného rozsahu operace, specifikování prognózy i léčebné strategii. V době publikace se jednalo o největší popsáný soubor pacientů s karcinomy štítné žlázy pozitivní na *NTRK* fúzní geny na světě.

Podíl na publikaci:

Můj podíl na práci zahrnoval: 1) izolaci nukleových kyselin ze zmražených tkání štítné žlázy (nově shromážděné vzorky), 2) sekvenaci genů *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *TERT*, *TP53* a

vyhodnocení sekvenačních dat, 3) analýzu vybraných fúzních genů pomocí real-time PCR, 4) analýzu pomocí *NTRK* Gene Fusions Detection kitu, 5) přípravu všech knihoven na RNA sekvenaci, 6) RNA sekvence vzorků, 7) bioinformatické vyhodnocení dat, 8) navržení a optimalizaci primerů pro detekci *NTRK* fúzních genů pomocí real-time PCR, 9) zpracování a vyhodnocení klinických dat, 10) provedení klinicko-genetické korelace, 11) statistické zhodnocení, 12) vytvoření tabulek a obrázků, 13) sepsání celého rukopisu

Article

NTRK Fusion Genes in Thyroid Carcinomas: Clinicopathological Characteristics and Their Impacts on Prognosis

Barbora Pekova ^{1,*}, Vlasta Sykorova ¹, Karolina Mastnikova ¹, Eliska Vaclavikova ¹, Jitka Moravcova ¹, Petr Vlcek ², Petr Lastuvka ³, Milos Taudy ³, Rami Katra ⁴, Petr Bavor ⁵, Daniela Kodetova ⁶, Martin Chovanec ⁷, Jana Drozenova ⁸, Jaromir Astl ⁹, Petr Hrabal ¹⁰, Josef Vcelak ¹ and Bela Bendlova ¹

- ¹ Department of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, 11694 Prague, Czech Republic; vsykorova@endo.cz (V.S.); kmastnikova@endo.cz (K.M.); evaclavikova@endo.cz (E.V.); jmoravcova@endo.cz (J.M.); jvcelak@endo.cz (J.V.); bbendlova@endo.cz (B.B.)
- ² Department of Nuclear Medicine and Endocrinology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, 15006 Prague, Czech Republic; petr.vlcek@fnmotol.cz
- ³ Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, 15006 Prague, Czech Republic; petr.lastuvka@fnmotol.cz (P.L.); milos.taudy@fnmotol.cz (M.T.)
- ⁴ Department of Ear, Nose and Throat, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, 15006 Prague, Czech Republic; rami.katra@fnmotol.cz
- ⁵ Department of Surgery, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, 15006 Prague, Czech Republic; petr.bavor@fnmotol.cz
- ⁶ Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, 15006 Prague, Czech Republic; daniela.kodetova@fnmotol.cz
- ⁷ Department of Otorhinolaryngology, Charles University, 3rd Faculty of Medicine, University Hospital Kralovske Vinohrady, 10034 Prague, Czech Republic; martin.chovanec@fnkv.cz
- ⁸ Department of Pathology, Charles University, 3rd Faculty of Medicine, University Hospital Kralovske Vinohrady, 10034 Prague, Czech Republic; jana.drozenova@fnkv.cz
- ⁹ Department of Otorhinolaryngology and Maxillofacial Surgery, Military University Hospital, 16902 Prague, Czech Republic; jaromir.astl@uvn.cz
- ¹⁰ Department of Pathology, Military University Hospital, 16902 Prague, Czech Republic; petr.hrabal@uvn.cz
- * Correspondence: bpekova@endo.cz



Citation: Pekova, B.; Sykorova, V.; Mastnikova, K.; Vaclavikova, E.; Moravcova, J.; Vlcek, P.; Lastuvka, P.; Taudy, M.; Katra, R.; Bavor, P.; et al. NTRK Fusion Genes in Thyroid Carcinomas: Clinicopathological Characteristics and Their Impacts on Prognosis. *Cancers* **2021**, *13*, 1932. <https://doi.org/10.3390/cancers13081932>

Academic Editors: Chan Kwon Jung and Andrey Blychikov

Received: 8 March 2021
Accepted: 11 April 2021
Published: 16 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: NTRK fusion genes are important but not well studied molecular markers in thyroid cancer. Their identification could help improve diagnosis and prognosis, and determine appropriate treatment. The aims of this study were to identify NTRK fusion-positive thyroid tumors in a large cohort of different thyroid tumors, to characterize these tumors by molecular, clinical and pathological features and to evaluate the impact of NTRK-rearranged tumors on prognosis of the disease. A suitable approach for selective NTRK fusion gene testing in thyroid cancer samples was created and utilized. In a cohort of 59 NTRK-rearranged carcinomas, characteristic features were described and recommendations for surgery and prognostic factors were determined thanks to the long-term follow-up of patients.

Abstract Chromosomal rearrangements of NTRK genes are oncogenic driver mutations in thyroid cancer (TC). This study aimed to identify NTRK fusion-positive thyroid tumors and to correlate them with clinical and pathological data and determine their prognostic significance. The cohort consisted of 989 different TC samples. Based on the detected mutation, samples were triaged, and those that were positive for a BRAF, HRAS, KRAS, NRAS, RET, RET/PTC or PAX8/PPAR γ mutation were excluded from further analyses. NTRK fusion gene testing was performed in 259 cases, including 126 cases using next-generation sequencing. NTRK fusion genes were detected in 57 of 846 (6.7%) papillary thyroid carcinomas and in 2 of 10 (20.0%) poorly differentiated thyroid carcinomas. A total of eight types of NTRK fusions were found, including ETV6/NTRK3, EML4/NTRK3, RBPMS/NTRK3, SQSTM1/NTRK3, TPM3/NTRK1, IRF2BP2/NTRK1, SQSTM1/NTRK1 and TPR/NTRK1. NTRK fusion-positive carcinomas were associated with the follicular growth pattern, chronic lymphocytic thyroiditis and lymph node metastases. NTRK1-rearranged carcinomas showed a higher frequency of

multifocality and aggressivity than *NTRK3*-rearranged carcinomas. Tumor size, presence of metastases, positivity for the *NTRK3* or *NTRK1* fusion gene and a late mutation event (*TERT* or *TP53* mutation) were determined as factors affecting patient prognosis. *NTRK* fusion genes are valuable diagnostic and prognostic markers.

Keywords: *NTRK*; fusion gene; papillary thyroid carcinoma; poorly differentiated thyroid carcinoma; clinicopathological feature; follow-up; prognosis; outcome

1. Introduction

Thyroid cancer (TC) is the most common endocrine malignancy with a still increasing incidence. The prognosis of TC varies primarily depending on the type and stage of the tumor. In the case of papillary thyroid carcinoma (PTC), the prognosis is very favorable and the 10-year overall survival rate is 97% [1]. On the other hand, poorly differentiated thyroid carcinoma (PDTC) carries a worse prognosis, and anaplastic thyroid carcinoma (ATC) has a median survival of 6 months [2]. The clinical outcome of the disease is associated with various mutations occurring in TC. The most common mutation in TC is the *BRAF* V600E mutation, which has appeared to be associated with a higher risk of cancer recurrence [3]. However, this association has recently been disputed [4]. *TERT* promoter mutations are associated with distant metastases and a higher risk of mortality in advanced cases of TC [5]. Differentiated thyroid tumors harboring *RAS* mutations without any co-alterations have excellent prognosis [6]. Other genetic alterations occurring in TC are rearrangements of *NTRK*, *RET*, *ALK*, *BRAF*, *MET*, *FGFR*, *PPAR γ* or *ROS1* genes whose associations with the outcome of the disease are not yet well known.

A rearrangement involving one of the neurotrophic-tropomyosin receptor kinase (*NTRK*) genes belonging to the *NTRK* family represents a significant oncogenic event in TC. The *NTRK* family includes three genes, *NTRK1*, *NTRK2* and *NTRK3*, encoding tropomyosin receptor kinases A, B and C, respectively. Fusions involving a kinase domain of *NTRK* gene lead to uncontrolled activation of the tyrosine receptor kinase (TRK) and subsequently the MAPK, PI3K/AKT and PLC γ pathways [7].

In TC, *NTRK* fusions have been reported in PTC, Hürthle cell carcinoma (HCC), PDTC and ATC [8,9]. The presence of *NTRK* fusions in TC is rare and the frequency ranges from 2.3 to 3.4% in predominantly adult cohorts [8,10–12]. In pediatric TC, *NTRK* fusions are approximately eight times more common than in adults; the frequency is between 18.3% and 25.9% [13–15]. Clinicopathological characteristics and long-term disease development are not well understood due to limited *NTRK* fusion-positive cohorts. Recently, there has been a growing interest in testing and characterizing *NTRK* fusion genes because they are therapeutically targetable. *NTRK* fusion-positive tumors are sensitive to TRK inhibitors, such as larotrectinib, which appears to be well tolerated and effective [16].

This study aimed to determine clinical and pathological features of a large cohort of *NTRK* fusion-positive thyroid tumors, to compare these characteristics between *NTRK3* and *NTRK1* fusion-positive tumors and to determine the prognostic significance of *NTRK* fusion genes based on long-term follow-up of patients with TC harboring this mutation.

2. Materials and Methods

2.1. The Cohort

A total of 989 (851 PTCs, 86 medullary thyroid carcinomas (MTCs), 19 follicular thyroid carcinomas (FTCs), 13 ATCs, 10 PDTCs and 10 HCCs) thyroid cancer tissues, 30 borderline thyroid tumor tissues (17 follicular tumors of uncertain malignant potential (FT-UMPs), 13 non-invasive follicular tumors with papillary-like nuclear features (NIFTPs)) and 194 benign thyroid tissues were collected from patients who underwent thyroid surgery at the Motol University Hospital (between years 2003 and 2020), the University Hospital Kralovske Vinohrady (between years 2016 and 2020) and the Military University Hospital

(between years 2019 and 2020) in Prague. All samples except 65 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) were fresh frozen thyroid tissues. Detailed clinical and pathological data were collected from all patients whose tumors were positive for the NTRK fusion gene.

2.2. Nucleic Acid Extraction

DNA and RNA were extracted from fresh frozen thyroid tissues using the AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) or the AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen) and from FFPE thyroid tissues using the AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen) according to the instructions in the manuals. The concentrations and purity of samples were measured using a fluorometer (Qubit 2.0, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and a spectrophotometer (QIAxpert, Qiagen), respectively.

2.3. NTRK Fusion Genes in Pediatric Samples

Analyses of NTRK fusion genes in pediatric PTC specimens ($n = 93$) using the QIASeq Targeted RNAscan panel (Qiagen) or the FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung (CTL) panel (ArcherDx, Boulder, CO, USA) were described previously [13]. New pediatric PTC samples collected during year 2020 ($n = 11$) were analyzed by the same procedure as the adult TC samples described below.

2.4. Analyses of Point Mutations, RET/PTC and PAX8/PPAR γ Rearrangements

First, detection of mutations in the BRAF, HRAS, KRAS, NRAS, TERT, and TP53 genes, and RET/PTC1, RET/PTC3, and PAX8/PPAR γ rearrangements in PTC, ATC, PDTC, FTC and HCC samples was performed. Mutations in the RET, HRAS and KRAS genes were analyzed in MTC samples. Libraries were prepared from purified PCR products of genes BRAF (exon 15), HRAS (exons 2 and 3), KRAS (exons 2 and 3), NRAS (exons 2 and 3), TP53 (exons 4, 5, 6, 7, 8 and 9) and RET (exons 8, 10, 11, 13, 14, 15 and 16) using the Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) and subsequently sequenced on the MiSeq sequencer (Illumina). The promoter of the TERT gene was screened for the C228T and C250T mutations using capillary sequencing on the CEQ 8000 instrument (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). A more detailed procedure was described in our previous study [17].

For RET/PTC and PAX8/PPAR γ rearrangements detection, total RNA was reverse transcribed into cDNA by the same procedure as reported previously [13]. Subsequently, cDNA was diluted five times and amplified using the TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), gene-specific primers and hydrolysis probes designed using the Primer3Plus software tool. Primer and probe sequences are summarized in Supplementary Table S1. Amplification of the ACTB gene was used as a cDNA quality control. Each experiment included a negative control where RNase-free water was used instead of template cDNA. Real-time PCR was performed as follows by the Light Cycler[®] 480 (Roche, Penzberg, Germany): 50 °C for 2 min, 95 °C for 20 s, followed by 40 cycles of 95 °C for 3 s and 60 °C for 30 s. The evaluation was performed by the Light Cycler[®] 480 SW 1.5.1. (Roche).

2.5. NTRK Fusion Genes Detection

Based on the previously detected mutations, specimens were selected for analyses of the NTRK fusion genes. Samples positive for the BRAF, HRAS, KRAS, NRAS, RET, RET/PTC or PAX8/PPAR γ mutation were excluded from the further analyses. In contrast, samples in which the TERT or TP53 mutation was identified were included in further testing.

A total of 259 (205 PTCs, 16 sporadic MTCs, 13 FTCs, 9 ATCs, 6 PDTCs, and 10 HCCs) thyroid tissue samples were retrospectively analyzed using the NTRK Gene Fusions Detection Kit (AmoyDx, Xiamen, China) according to the manufacturer's instructions. This Real-Time PCR kit allows to detect 109 different NTRK1, NTRK2 or NTRK3 fusions.

Real-time PCR was performed using the Light Cycler[®] 480 (Roche) and the results were evaluated by the Light Cycler[®] 480 SW 1.5.1. (Roche).

An extended analysis of next-generation sequencing was performed for a total of 126/259 thyroid tissue samples (93 PTCs, 16 sporadic MTCs, 2 FTCs, 9 ATCs, and 6 PDTCs) using the FusionPlex CTL panel (ArcherDx) allowing to detect novel fusion genes as well. The manufacturer's instructions were followed. Briefly, RNA was reverse transcribed using random primers into cDNA. The adapters containing unique molecular tags and sample indexes (i5) were ligated to modified ends of cDNA. Then, two rounds of PCR followed. Other sample indexes (i7) were added during the second PCR. Purified and quantified libraries were paired-end sequenced on the MiSeq sequencer (Illumina). Bioinformatic analysis was performed using the Archer Analysis software version 6.0.4. (ArcherDx). For a gene fusion to be considered as valid, at least five high-quality unique reads had to span the breakpoint and a minimum of three reads had to have a unique start site.

The gene-specific primers and hydrolysis probes were designed for all identified *NTRK* fusion genes using the Primer3Plus software tool. Primer and probe sequences are summarized in Supplementary Table S1. All *NTRK* fusion-positive samples were verified using these primers and probes by real-time PCR. PCR conditions were the same as for *RET/PTC* or *PAX8/PPAR γ* rearrangements detection. A total of 30 borderline thyroid samples and 194 benign thyroid samples were screened by this procedure for all these identified *NTRK* fusion genes.

2.6. Statistical Analysis

Categorical variables were compared by use of the Fisher's exact test, and continuous variables were compared by use of the t-test. Statistical analyses were performed using the Simple Interactive Statistical Analysis (SISA, <https://www.quantitativeskills.com/sisa/>) and GraphPad tools (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A *p* value < 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Clinical and Pathological Features

The analyses revealed *NTRK* fusion gene in 59 patients with TC, in 57 of 846 (6.7%) patients with PTC in 2 of 10 (20.0%) patients with PDTC. No *NTRK* fusion gene was detected in 16 MTCs, 13 FTCs, 9 ATCs, 10 HCCs, 30 borderline thyroid tumors or 190 benign thyroid tissues subjected to *NTRK* fusion analyses. cDNA from five FFPE PTCs and four benign fresh frozen thyroid tissues were not of sufficient quality for analyses.

Clinical and pathological data of patients with TC harboring *NTRK* fusion are summarized in Table 1. In this cohort, the female to male ratio was 3.5:1 and the mean age of diagnosis was 32.8 ± 16.0 (range 6–77 years). The cohort consisted of 17 pediatric (<20 years of age) and of 42 adult patients. Before the diagnosis of TC, only one patient suffered from a malignant disease (sigmoid colon cancer) and underwent radiation therapy. Four patients underwent hemithyroidectomy followed by total thyroidectomy, 55 patients underwent total thyroidectomy during one surgery and 37 patients also underwent lymph node (LN) dissection. The mean tumor size was 20.9 ± 11.9 mm (range 5–55 mm). A microcarcinoma (≤ 10 mm) was revealed in 13.6% of patients. A follicular growth pattern was shown to be present in 78.0% of cases, of which in 47.5% of cases it formed the whole tumor or was predominant, and in 30.5% of cases it was found mixed with a papillary growth pattern (approximately in a similar proportion). Only 13.6% of cases had predominantly papillary architecture. Both cases of PDTC had coexisting PTC component with a mixed papillary and follicular growth pattern. Multifocality, extrathyroidal extension and intravascular invasion were identified in 44.1%, 40.7% and 23.5% of cases, respectively. LN metastases were found in 54.2% of patients and distant metastases in 6.8% of patients, in all cases affecting lungs. Chronic lymphocytic thyroiditis (CLT) was identified in 65.5% of cases. Detailed data on individual cases are described in Supplementary Table S2.

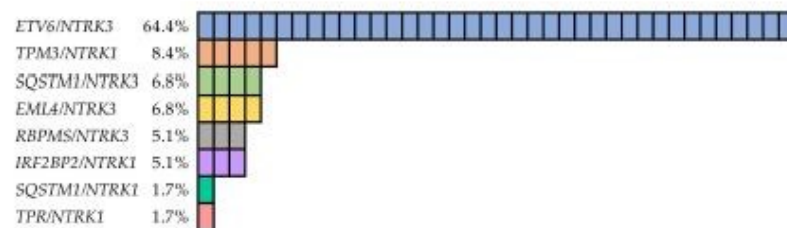
Table 1. Clinicopathological features of *NTRK* fusion-positive carcinomas.

	<i>NTRK</i> Fusion-Positive Carcinomas (%) <i>n</i> = 59
Patients	
Females/males	46/13
Age at diagnosis (mean ± SD)	32.8 ± 16.0
History of radiation exposure before the diagnosis of TC	1 (1.7)
History of prior malignancy before the diagnosis of TC	1 (1.7)
Tumor size	
Mean ± SD (mm)	20.9 ± 11.9
Microcarcinoma (≤10 mm)	8 (13.6)
Histology	
Predominantly papillary growth pattern	8 (13.6)
Mixture of papillary and follicular growth pattern	18 (30.5)
Predominantly follicular growth pattern	28 (47.5)
Tall cell variant	2 (3.4)
Clear cell variant	1 (1.7)
PDTC	2 (3.4)
Pathological characteristics	
Multifocality	26 (44.1)
Extrathyroidal extension	24 (40.7)
Intravascular invasion ¹	12 (23.5)
Lymph node metastases	32 (54.2)
Distant metastases	4 (6.8)
Chronic lymphocytic thyroiditis ²	38 (65.5)
Frequent psammoma bodies ³	6 (10.3)

¹ Data from eight samples were not available. ^{2,3} Data from one sample were not available. SD standard deviation, TC thyroid cancer, PDTC poorly differentiated thyroid carcinoma.

3.2. *NTRK* Fusion Genes

A total of eight types of *NTRK* fusions were found, including *ETV6/NTRK3* (four isoforms), *EML4/NTRK3*, *RBPMS/NTRK3*, *SQSTM1/NTRK3*, *TPM3/NTRK1*, *IRF2BP2/NTRK1* (two isoforms), *SQSTM1/NTRK1* and *TPR/NTRK1* (Figure 1). All fusion genes were in-frame. Transcripts of genes involved are listed in Supplementary Table S3. The *ETV6/NTRK3* fusion gene represented the majority (38/59) of positive cases. The most common isoform was the *ETV6* (exon 4)/*NTRK3* (exon 14), which was detected in one case together with the *ETV6* (exon 5)/*NTRK3* (exon 14) isoform. Furthermore, in one PDTC case, two rare isoforms *ETV6* (exon 2)/*NTRK3* (exon 14) and *ETV6* (exon 5)/*NTRK3* (exon 15) were identified. The *TPM3/NTRK1* fusion gene was detected in a significantly smaller group of samples (5/59), similarly to the *SQSTM1/NTRK3* (4/59), *EML4/NTRK3* (4/59), *RBPMS/NTRK3* (3/59) and *IRF2BP2/NTRK1* (3/59) fusion genes. Two isoforms of the *IRF2BP2/NTRK1* fusion gene, *IRF2BP2* (exon 1)/*NTRK1* (exon 10) in two cases and *IRF2BP2* (exon 2)/*NTRK1* (exon 10) in one case were identified. The *SQSTM1/NTRK1* was identified in the second PDTC case and the *TPR/NTRK1* was found in one PTC.

**Figure 1.** Frequencies of different types of *NTRK* fusion genes detected in thyroid cancer.

Co-alterations were identified in two samples and in both cases with *TPM3/NTRK1*. In the first case, the co-alteration was the *TERT* C228T mutation and in the second case, the *TP53* K320* nonsense mutation. In one patient with multifocal PTC, the *ETV6/NTRK3* rearrangement was identified in a nodule in the right thyroid lobe and the *BRAF* V600E mutation in a nodule in the left thyroid lobe.

The carcinomas harboring *NTRK3* fusions ($n = 49$) were compared to the carcinomas with *NTRK1* fusions ($n = 10$) (Table 2). *NTRK3* fusion genes were almost 5 times more common than *NTRK1* fusions. The carcinomas positive for *NTRK1* fusions had a significantly more common mixture of papillary and follicular growth patterns ($p = 0.006$) than the carcinomas positive for *NTRK3* fusions, which had mostly predominant follicular growth patterns. Other differences were the significantly higher frequencies of multifocality ($p = 0.015$), extrathyroidal extension ($p = 0.008$), intravascular invasion ($p = 0.024$) and distant metastases ($p = 0.013$) of *NTRK1* fusion-positive carcinomas. The patients with carcinomas harboring *NTRK1* fusions had LN metastases 80% of the time compared to 49% of time for *NTRK3* fusion-positive carcinomas. However, the difference only approached the limit of statistical significance ($p = 0.072$).

Table 2. Comparison of clinical and pathological features between *NTRK3* and *NTRK1* fusion-positive carcinomas.

	<i>NTRK3</i> Fusion-Positive Carcinomas (%) $n = 49$	<i>NTRK1</i> Fusion-Positive Carcinomas (%) $n = 10$	<i>p</i>
Patients			
Females/males	39/10	7/3	0.383
Age at diagnosis (mean \pm SD)	32.0 \pm 14.4	36.4 \pm 21.9	0.426
History of radiation exposure before the diagnosis of TC	0	1 (10.0)	0.169
History of prior malignancy before the diagnosis of TC	0	1 (10.0)	0.169
Tumor size			
Mean \pm SD (mm)	20.0 \pm 11.0	25.3 \pm 14.6	0.195
Microcarcinoma (≤ 10 mm)	6 (12.2)	2 (20.0)	0.409
Histology			
Predominantly papillary growth pattern	8 (16.3)	0	0.203
Mixture of papillary and follicular growth pattern	11 (22.4)	7 (70.0)	0.006
Predominantly follicular growth pattern	26 (53.1)	2 (20.0)	0.057
Tall cell variant	2 (4.1)	0	1
Clear cell variant	1 (2.0)	0	1
PDTC	1 (2.0)	1 (10.0)	0.313
Pathological characteristics			
Multifocality	18 (36.7)	8 (80.0)	0.015
Extrathyroidal extension	16 (32.7)	8 (80.0)	0.008
Intravascular invasion ¹	7 (16.7)	5 (55.6)	0.024
Lymph node metastases	24 (49.0)	8 (80.0)	0.072
Distant metastases	1 (2.0)	3 (30.0)	0.013
Chronic lymphocytic thyroiditis ²	34 (70.8)	4 (40.0)	0.069
Frequent psammoma bodies ³	4 (8.3)	2 (20.0)	0.274

Values highlighted in bold were statistically significant. ¹ Data from seven *NTRK3* fusion-positive samples and from one *NTRK1* fusion-positive sample were not available. ^{2,3} Data from one *NTRK3* fusion-positive sample were not available. SD standard deviation, TC thyroid cancer, PDTC poorly differentiated thyroid carcinoma.

Clinicopathological features of *NTRK* fusion-positive carcinomas were also compared between pediatric and adult patients (Supplementary Table S4). No statistically significant difference was observed between these cohorts.

3.3. Treatment and Follow-Up

The median follow-up was 63 months (range: 2–203 months). Fifty-one (86.4%) patients received radioactive iodine (RAI) treatment; eight patients (13.6%) received no RAI treatment due to microcarcinoma without aggressive features. The median cumulative

dose of RAI per patient was 6.3 GBq (range: 1.9–28.0 GBq). Most patients (84.3%) were RAI responsive and accumulated RAI in thyroid remnants or in metastases. In addition to RAI therapy, both PDTC cases were also treated with external beam radiotherapy. The first patient with PDTC harboring two rare isoforms of *ETV6/NTRK3* fusions discontinued radiation treatment due to intolerance and subsequently died. The second patient with PDTC harboring *SQSTM1/NTRK1* was still alive (12 months after surgery). One patient with PTC and other two malignancies (sigmoid colon cancer diagnosed before TC and breast cancer diagnosed after TC), harboring *TPM3/NTRK1* and *TERT C228T* mutations in PTC, underwent chemotherapy treatment and subsequently died.

Each responses to treatment was determined using definitions and criteria in the 2015 American Thyroid Association Guidelines as an excellent response (ER), an indeterminate response (IR), a biochemical incomplete response (BIR), a structural incomplete response (SIR), [18] or death. The response to treatment was assessed in the following time periods after surgery: 6 months to 2 years, 2–5 years, 5–10 years, 10 years or more and current response. Detailed follow-ups describing the courses of treatment in individual patients are displayed in Figure 2. Follow-up data of one patient were unknown and two patients were not evaluated due to short-term follow-up (less than six months after surgery).

Initially, during two years of treatment, 58.9% of *NTRK* fusion-positive patients had ER, 16.1% had IR and 25.0% had SIR. When patients were grouped according to the *NTRK3* or *NTRK1* mutation, 63.8% of *NTRK3* fusion-positive patients had ER and 21.3% had SIR. In the case of *NTRK1* mutation, more patients had SIR (44.4%) than ER (33.3%). During follow-up, three patients from the cohort who until then had SIR, died. One patient succumbed to PDTC; another two PTC patients were polymorbid. In *NTRK* fusion-positive cohort, the 2, 5 and 10-year overall survival rates were 100.0% (40/40), 96.7% (29/30) and 85.0% (17/20), respectively. However, during follow-up, response to treatment had an improving tendency in *NTRK3* as well as in *NTRK1* fusion-positive patients (Figure 3). After 10 years of follow-up, 82.3% of patients had ER, 11.8% had IR, 5.9% had BIR and no patient had an SIR. No case of recurrence was reported during follow-up when the ER to the patient's treatment changed to BIR, SIR, IR or death. The patients without metastases had predominantly ER, and 16.7% of them had IR. Only one patient from the cohort who had SIR improved to ER. The reason for the improvement of the patient's condition was the resection of LN metastases seven years after the initial surgery and subsequent RAI therapy.

The prognosis of the disease also depended on the size of the tumor. All patients with a microcarcinoma (≤ 10 mm) had ER to treatment. However, it should be mentioned that one patient with an 11 mm carcinoma had metastases in 25 LN and also in the lungs. After 12 years of follow-up, the patient still had a high level of thyroglobulin antibodies. The patients with the tumor size ≤ 20 mm ($n = 38$) had LN metastases 36.8% of the time; and during the initial 2 years of treatment, 68.6% had ER, 17.1% had IR and 14.3% had SIR. The patients with tumors larger than 20 mm ($n = 21$) had LN metastases 85.7% of the time; and during the initial 2 years of treatment, 42.9% had an ER, 14.3% had IR and 42.9% had SIR. Both patients with PDTC had a tumor larger than 40 mm.

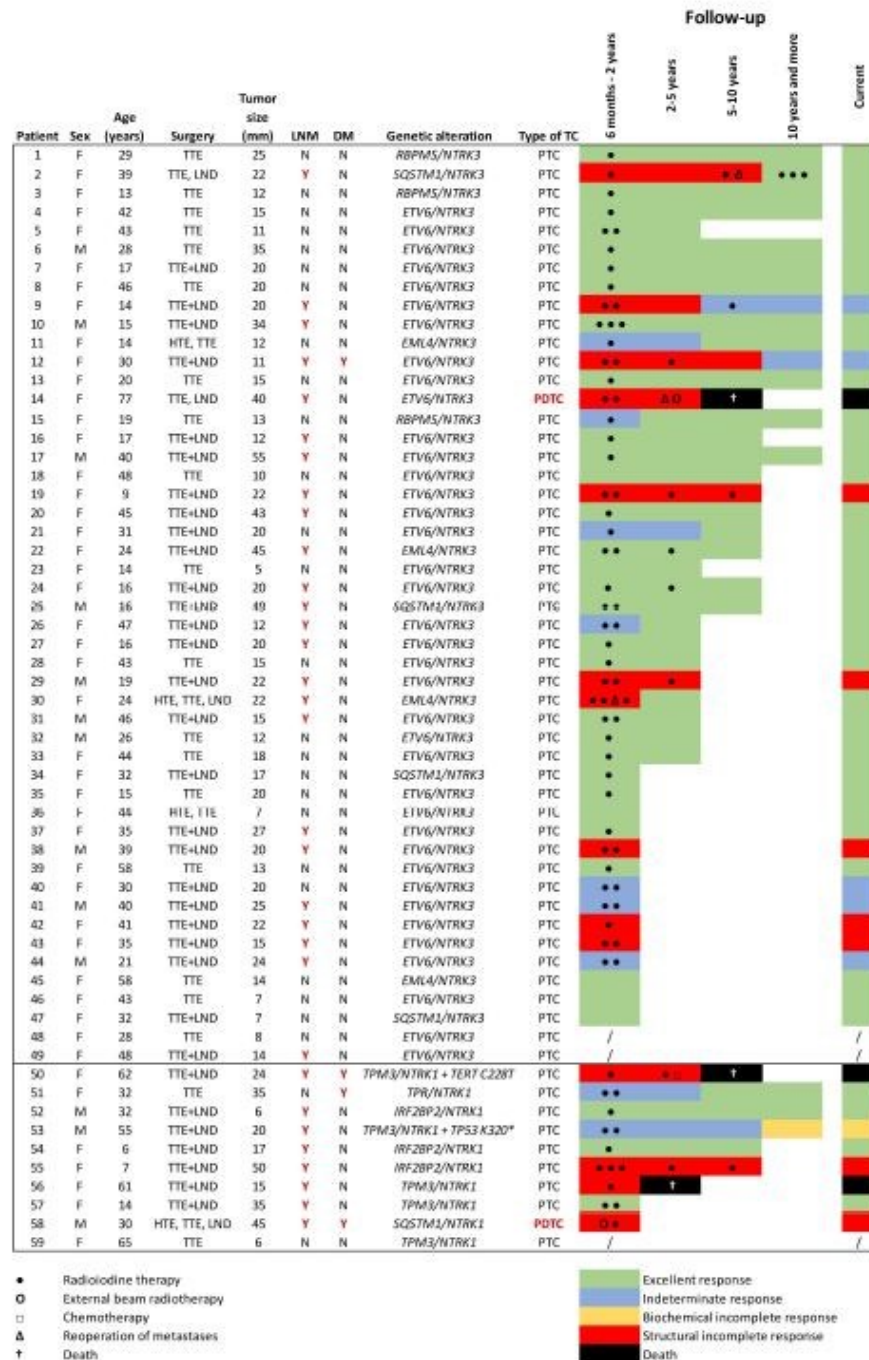


Figure 2 Detailed follow-ups and the outcomes of patients harboring *NTRK* fusion-positive carcinomas. F, female; M, male; the, hemithyroidectomy; TTE, total thyroidectomy; LND, lymph node dissection; LNM, lymph node metastases; DM, distant metastases; TC, thyroid cancer; Y, yes; N, no; PTC, papillary thyroid carcinoma; PDTC, poorly differentiated thyroid carcinoma.

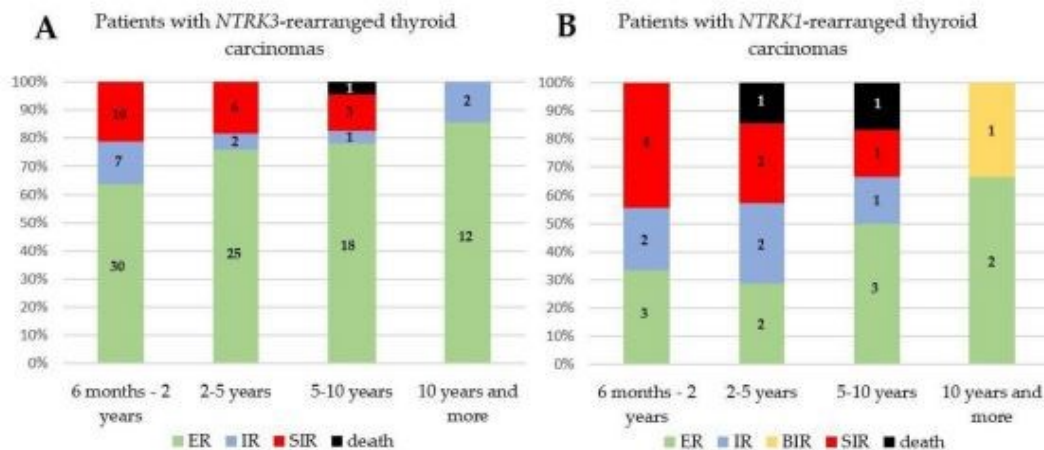


Figure 3. A graphical representation of the responses to treatment of the patients harboring *NTRK3* (A) and *NTRK1* (B) fusion-positive carcinomas after surgery. ER, excellent response; IR, indeterminate response; BIR, biochemical incomplete response; SIR, structural incomplete response.

4. Discussion

Molecular testing of genetic alterations in TC can be beneficial in several ways. It can help to establish preoperative diagnosis, the extent of surgery that is possible, estimate prognosis and determine appropriate treatment. Molecular markers, such as the *BRAF* V600E mutation or the *TERT* mutation, have been well studied in large cohorts, and the management of thyroid nodules harboring these mutations has also been recommended in the American and the European Thyroid Association Guidelines [18,19]. However, data on *NTRK* fusion genes in TC are very limited due to their rare occurrence, and therefore there are only small cohorts of *NTRK* fusion-positive samples that are described and characterized [10–12,15,20–24]. Another reason is their more expensive and challenging accurate testing requiring RNA of suitable quality.

In this study, we retrospectively screened a large cohort of different thyroid tissue samples, including PTCs, PDTCs, ATCs, HCCs, FTCs, sporadic MTCs, NIFTPs, FT-UMP and benign thyroid tissues, for *NTRK* fusion genes. *NTRK* fusion genes were detected in 59 TC samples, which to the best of our knowledge represents the largest cohort of *NTRK* fusion-positive samples in TC worldwide. The prevalence was 6.0% in all tested types of TC and 6.7% in PTCs, which was slightly higher than the prevalence around of 3% reported in PTCs in the literature [8,10–12]. One of the reasons for this result was a higher proportion of pediatric PTCs ($n = 104$) in our cohort, which are known to harbor *NTRK* fusions with a higher frequency (around 20%) [13–15]. After dividing the subjects into pediatric and adult patients, the prevalences of *NTRK* fusion genes in PTCs were 16.3% and 5.7%, respectively. No *NTRK* fusion gene was detected in any benign tissue sample (benign tumors, CLT). Thus, all eight tested types of *NTRK* fusions seem to be associated with a 100% probability of malignancy.

The low detection rate of *NTRK* fusions in adult PTC samples could discourage routine testing. However, as reported in another study, after elimination of samples harboring the *BRAF* V600E mutation, the detection rate of *NTRK* fusion genes increased up to 20% [11]. *NTRK* fusions are typically mutually exclusive with the *BRAF*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* and other driver mutations [8,10,12,13,22]. Therefore, in our study, the samples positive for mutations in the *BRAF*, *HRAS*, *KRAS* and *NRAS* genes, and for *RET/PTC* or *PAX8/PPAR γ* were excluded from the *NTRK* fusion gene analyses, and then the detection rate of *NTRK* fusions was 22.8%. The co-occurrence of *NTRK* fusions with the *BRAF* V600E mutation has been described, but is very rare [21,23]. In contrast, the co-occurrence with late mutation events such as *TERT* or *TP53* mutations has been reported in several studies [9,25,26] and

was also confirmed in this study. In one multifocal PTC in our study, the *NTRK* fusion gene was found in one thyroid nodule and the *BRAF* V600E mutation in another. Thus, it is important to point out the need to test all nodules in a case of multifocal TC due to the possibility of detection of different mutations, which could affect the patient's treatment.

All eight identified *NTRK* fusion types have been previously described and are recurrent in TC [27]. One rare isoform, *ETV6*(exon 2)/*NTRK3*(exon 14), detected in the PDTC sample, is unlikely to be oncogenic due to the lack of the SAM domain of *ETV6* necessary for the fusion protein oligomerization. The SAM domain is encoded by exons 3 and 4 of the *ETV6* gene. The same PDTC sample also harbored another isoform, *ETV6*(exon 5)/*NTRK3*(exon 15), whose exons 3 and 4 of the *ETV6* gene were preserved. Only *NTRK1* and *NTRK3* fusions were identified similarly to other studies [11,22,25]. *NTRK2* fusions generally occur in other types of cancer, especially in gliomas. However, one case of the *NTRK2* fusion (*CRNDE/NTRK2*) in ATC has been described in the literature [28].

In this study, we performed a detailed clinicopathological review to investigate characteristic features of *NTRK* fusion-positive tumors. *NTRK* fusions were associated with the follicular growth pattern, as was also observed previously [11,14,20,21,25]. The predominant follicular pattern was more common in *NTRK3* than in *NTRK1* fusion-positive carcinomas, in which the follicular architecture mostly co-occurred with foci of papillary formation. Additionally, in most (65.5%) patients with *NTRK* fusion-positive carcinomas, the CLT was identified. The same findings were concluded in other studies, in which, surprisingly, similar frequencies of CLT were found (66.7% and 69.2%) [20,22].

Regarding the aggressiveness of *NTRK* fusion-positive carcinomas, data from the publications differed. Chu et al. suggested that *NTRK* fusion-positive carcinomas are associated with clinically aggressive disease with a high metastatic rate. In their first publication including ten *NTRK* fusion-positive PTCs, the mean tumor size was 54.2 ± 23.0 mm; 100% of patients had lymphovascular invasion and LN metastases; and 60% of patients had distant metastases [25]. Their following publication included additional *NTRK* fusion-positive patients with a total of 18 patients. Extrathyroidal extension and LN metastases were then identified in 61.1% and 77.8% of patients, respectively [27]. Fazeli et al. identified distant metastases in 77% of PTC/PDTC patients [23]. All these studies were biased due to case selection, in the case of Chu et al., the authors selected cases based on unusual morphology and advanced presentation. Fazeli et al. chose patients with advanced or RAI refractory cancer [23,27].

In our study, there was no case selection based on the aggressivity of disease. The mean tumor size was 20.9 ± 11.9 and extrathyroidal extension was identified in 40.7%, multifocality in 44.1%, vascular invasion in 23.5%, LN metastases in 54.2% and distant metastases in 6.8%. These findings are in accordance with data found in studies of small cohorts, in which also no selection based on aggressivity of disease was applied: mean tumor size 19.1–33.0 mm [11,12,15,20,22], extrathyroidal invasion in 0–33.3% [11,15,20,22], multifocality in 23.1–66.7% [15,20,22], vascular invasion 16.7–71.4% [15,20], LN metastases in 41.7–72.7% [11,12,15,20,22] and distant metastases in 8% [11,20].

Furthermore, based on our data, *NTRK1* fusion-positive carcinomas were significantly associated with a higher frequency of tumor multifocality and distant metastases, and were more invasive than the carcinomas harboring a *NTRK3* fusion. There are no records of comparison between *NTRK1* and *NTRK3* fusion-positive carcinomas in the literature. In addition, in two of our *NTRK1* fusion-positive cases, we identified a late mutation event (*TEK* and *TP53* mutation), known to correlate with progressive disease behavior [29]. In contrast, in the literature, late mutation events were detected more frequently along with *NTRK3* fusions than with *NTRK1* fusions, in four and two cases, respectively [9,26,27,30].

In this study, we identified two cases of PDTC harboring a *NTRK* fusion gene. Both carcinomas also had a PTC component of a mixed papillary and follicular growth pattern. Thus, we hypothesize that both PTCs harboring a *NTRK* fusion dedifferentiated to PDTCs. In both PDTCs, only *NTRK* fusion was detected without further mutations, so we assume that it was a *NTRK* fusion-driven progression. This finding was also supported by two

studies, in which PDTCs with a PTC component were observed [28,31]. The same feature for both PDTCs was the tumor size larger than 40 mm, indicating the importance of early surgery due to a risk of dedifferentiation of large carcinomas harboring a *NTRK* fusion gene.

Tumor size was also one of the factors affecting the outcome that were identified during follow-up of patients. We demonstrated that the size of the *NTRK* fusion-positive carcinoma was directly related to the frequency of metastases. The patients with the tumor size ≤ 20 mm had LN metastases in 36.8% of the time, and those with a tumor larger than 20 mm had LN metastases 85.7% of the time. All patients with microcarcinomas had excellent prognosis and almost all patients without metastases achieved a favorable outcome. On the other hand, more than half of patients with metastases suffered from persistent disease and three patients died. Other indicators of worse outcome were *TERT* or *TP53* co-mutations and the presence of *NTRK1* fusion. However, it seems that recurrence risk is very low. No case was observed in which the patient had structural disease after remission. It is important to note that most patients underwent relatively radical surgery and received RAI treatment.

Follow-up data of patients with *NTRK* fusion-positive TC are very scarce in the literature. Two studies reported that most patients had no evidence of disease [11,20]. Different data were observed in a study biased with case selection based on the aggressivity of disease. Chu et al. reported that from 11 patients with evaluable follow-up, only two patients (18.2%) achieved remission, and the remaining nine patients (81.8%) had recurrence or persistence of the disease. Interestingly, both patients with no evidence of disease had a tumor of the smallest size (21 and 35 mm) from the cohort, harbored a *NTRK3* fusion gene and lacked any late mutation event [27].

Carcinomas of most patients in our study were RAI-avid. Therefore, RAI treatment seems to be a “gold standard” therapy for most *NTRK* fusion-positive carcinomas. In our study, to none of the patients had a TRK inhibitor been administrated. However, in the case of advanced or RAI-refractory carcinomas, patients may benefit from this kind of treatment. For the TRK inhibitor larotrectinib, a response rate of more than 75% was observed regardless of cancer type and was well tolerated by patients [32].

Due to the high risk of multifocality and 100% probability of malignancy, total thyroidectomy may be recommended as a minimal surgical procedure in the case of pre-operative detection of the oncogenic *NTRK* fusion gene in the thyroid nodule. Cervical ultrasonography with LN mapping of central and lateral compartments should be pre-operatively performed. In the case of a nodule larger than 20 mm or the presence of late mutation event (*TERT* or *TP53* mutation), prophylactic central LN dissection should be considered.

This study had a few limitations. First, as already mentioned, no patient received TRK inhibitor therapy. Second, 133 samples were only analyzed by real-time PCR, so that novel *NTRK* fusion genes could not be identified in these samples.

5. Conclusions

In conclusion, we detected the *NTRK* fusion gene in 59 (6.0%) TC samples. These samples were associated with the follicular growth pattern of TC, chronic lymphocytic thyroiditis and a high rate of LN metastases, especially in larger carcinomas. Furthermore, *NTRK1* fusion-positive carcinomas differed from carcinomas harboring the *NTRK3* fusion gene by higher frequencies of tumor multifocality, distant metastases and carcinoma invasiveness. Additionally, we reported that the size of the tumor, positivity for *NTRK3* or *NTRK1* fusion, the presence of metastases and late mutation events may provide prognostic information for patient outcomes. Based on all these findings, testing of *NTRK* fusions could help to establish diagnosis, advise on extent of surgery, specify prognosis and set up personalized treatments.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13081932/s1>. Supplementary Table S1: Sequences of primers and hydrolysis probes

designed for the *ACTB* gene and the detection of *NTRK* fusion genes using real-time PCR. Supplementary Table S2: Comprehensive clinicopathological data on *NTRK* fusion-positive carcinomas. Supplementary Table S3: Transcripts of genes involved in *NTRK* rearrangements Supplementary Table S4: Comparison of clinical and pathological features between pediatric and adult *NTRK* fusion-positive carcinomas.

Author Contributions: Conceptualization, B.P., V.S. and B.B.; sample and data collection, P.L., M.T., R.K., P.B., M.C. and J.A.; pathological assessment, D.K., J.D. and P.H.; clinical data evaluation, P.V.; methodology, B.P.; experimental investigation, B.P., V.S., K.M., J.M. and E.V.; software, J.V.; writing—original draft preparation, B.P.; writing—review and editing, B.B., V.S. and E.V.; supervision, J.V. and B.B.; funding acquisition, B.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic AZV (NU21-01-00448) and MH CZ—DRO (Institute of Endocrinology—EÚ, 00023761) grants.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology in Prague (approval number F192).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on reasonable request from corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Ito, Y.; Miyauchi, A.; Kihara, M.; Fukushima, M.; Higashiyama, T.; Miya, A. Overall Survival of Papillary Thyroid Carcinoma Patients: A Single-Institution Long-Term Follow-Up of 5897 Patients. *World J. Surg.* **2018**, *42*, 615–622. [CrossRef] [PubMed]
- Nachalon, Y.; Stern-Shavit, S.; Bachar, G.; Shvero, J.; Limon, D.; Popovtzer, A. Aggressive Palliation and Survival in Anaplastic Thyroid Carcinoma. *JAMA Otolaryngol. Neck Surg.* **2015**, *141*, 1128–1132. [CrossRef]
- Enumah, S.; Fingeret, A.; Parangi, S.; Dias-Santagata, D.; Sadow, P.M.; Lubitz, C.C. BRAFV600E Mutation is Associated with an Increased Risk of Papillary Thyroid Cancer Recurrence. *World J. Surg.* **2020**, *44*, 2685–2691. [CrossRef] [PubMed]
- Li, X.; Kwon, H. The Impact of BRAF Mutation on the Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma: A Meta-Analysis. *Cancers* **2020**, *12*, 2056. [CrossRef]
- Yang, J.; Gong, Y.; Yan, S.; Chen, H.; Qin, S.; Gong, R. Association between TERT promoter mutations and clinical behaviors in differentiated thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Endocrine* **2019**, *67*, 44–57. [CrossRef]
- Xing, M. Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: A blurred picture now emerging clearer. *BMC Med.* **2016**, *14*, 1–4. [CrossRef] [PubMed]
- Vaishnavi, A.; Le, A.T.; Doebele, R.C. TRKING Down an Old Oncogene in a New Era of Targeted Therapy. *Cancer Discov.* **2014**, *5*, 25–34. [CrossRef]
- Solomon, J.P.; Linkov, I.; Rosado, A.; Mullaney, K.; Rosen, E.Y.; Frosina, D.; Jungbluth, A.A.; Zehir, A.; Benayed, R.; Drilon, A.; et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: Diagnostic implications and pitfalls. *Mod. Pathol.* **2020**, *33*, 38–46. [CrossRef]
- Van Der Tuin, K.; Garcia, M.V.; Corver, W.E.; Khalifa, M.N.; Neto, D.R.; Corssmit, E.P.M.; Hes, E.J.; Links, T.P.; Smit, J.W.A.; Plantinga, T.S.; et al. Targetable gene fusions identified in radioactive iodine refractory advanced thyroid carcinoma. *Eur. J. Endocrinol.* **2019**, *180*, 235–241. [CrossRef]
- Agrawal, N.; Akbani, R.; Aksoy, B.A.; Ally, A.; Arachchi, H.; Asa, S.L.; Auman, J.T.; Balasundaram, M.; Balu, S.; Baylin, S.B.; et al. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell* **2014**, *159*, 676–690. [CrossRef]
- Lee, Y.-C.; Chen, J.-Y.; Huang, C.-J.; Chen, H.-S.; Yang, A.-H.; Hang, J.-F. Detection of NTRK1/3 Rearrangements in Papillary Thyroid Carcinoma Using Immunohistochemistry, Fluorescent In Situ Hybridization, and Next-Generation Sequencing. *Endocr. Pathol.* **2020**, *31*, 348–358. [CrossRef] [PubMed]
- Liang, J.; Cai, W.; Feng, D.; Teng, H.; Mao, F.; Jiang, Y.; Huajing, T.; Li, X.; Zhang, Y.; Liu, B.; et al. Genetic landscape of papillary thyroid carcinoma in the Chinese population. *J. Pathol.* **2018**, *244*, 215–226. [CrossRef]
- Pekova, B.; Sykorova, V.; Dvorakova, S.; Vaclavikova, E.; Moravcova, J.; Kutra, R.; Astl, J.; Vlcek, P.; Kodetova, D.; Vcelak, J.; et al. RET, NTRK, ALK, BRAF, and MET Fusions in a Large Cohort of Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid* **2020**, *30*, 1771–1780. [CrossRef]
- Picarsic, J.L.; Buryk, M.A.; Ozolek, J.A.; Ranganathan, S.; Monaco, S.E.; Simons, J.P.; Witchel, S.F.; Gurtunca, N.; Joyce, J.; Zhong, S.; et al. Molecular Characterization of Sporadic Pediatric Thyroid Carcinoma with the DNA/RNA ThyroSeq v2 Next-Generation Sequencing Assay. *Pediatr. Dev. Pathol.* **2016**, *19*, 115–122. [CrossRef] [PubMed]

15. Prasad, M.L.; Vyas, M.; Horne, M.J.; Virk, R.K.; Morotti, R.; Liu, Z.; Tallini, G.; Nikiforova, M.N.; Christison-Lagay, E.R.; Udelsman, R.; et al. NTRK fusion oncogenes in pediatric papillary thyroid carcinoma in northeast United States. *Cancer* **2016**, *122*, 1097–1107. [CrossRef]
16. Hong, D.S.; DuBois, S.G.; Kummar, S.; Farago, A.F.; Albert, C.M.; Rohrberg, K.S.; van Tilburg, C.M.; Nagasubramanian, R.; Berlin, J.D.; Federman, N.; et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: A pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 531–540. [CrossRef]
17. Pekova, B.; Dvorakova, S.; Sykorova, V.; Vacinova, G.; Vaclavikova, E.; Moravcova, J.; Katra, R.; Vloek, P.; Sykorova, P.; Kodetova, D.; et al. Somatic genetic alterations in a large cohort of pediatric thyroid nodules. *Endocr. Connect.* **2019**, *8*, 796–805. [CrossRef]
18. Haugen, B.R.; Alexander, E.K.; Bible, K.C.; Doherty, G.M.; Mandel, S.J.; Nikiforov, Y.E.; Pacini, F.; Randolph, G.W.; Sawka, A.M.; Schlumberger, M.; et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* **2016**, *26*, 1–133. [CrossRef] [PubMed]
19. Paschke, R.; Cantara, S.; Crescenzi, A.; Jarzab, B.; Musholt, T.J.; Simoes, M.S. European Thyroid Association Guidelines regarding Thyroid Nodule Molecular Fine-Needle Aspiration Cytology Diagnostics. *Eur. Thyroid J.* **2017**, *6*, 115–129. [CrossRef]
20. Seethala, R.R.; Chiosea, S.I.; Liu, C.Z.; Nikiforova, M.; Nikiforov, Y.E. Clinical and Morphologic Features of ETV6-NTRK3 Translocated Papillary Thyroid Carcinoma in an Adult Population Without Radiation Exposure. *Am. J. Surg. Pathol.* **2017**, *41*, 446–457. [CrossRef]
21. Leeman-Neill, R.J.; Bs, L.M.K.; Liu, P.; Brenner, A.V.; Leeman-Neill, R.J.; Bogdanova, T.I.; Evdokimova, V.N.; Hatch, M.; Zurnadzy, L.Y.; Nikiforova, M.N.; et al. ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer. *Cancer* **2014**, *120*, 799–807. [CrossRef]
22. Abi-Raad, R.; Prasad, M.L.; Adeniran, A.J.; Cai, G. Fine-needle aspiration cytomorphology of papillary thyroid carcinoma with NTRK gene rearrangement from a case series with predominantly indeterminate cytology. *Cancer Cytopathol.* **2020**, *128*, 803–811. [CrossRef] [PubMed]
23. Fazeli, S.; Dadu, R.; Waguespack, S.G.; Sherman, S.I.; Busaidy, N.I.; Hu, M.I.; Jimenez, C.; Habra, M.A.; Williams, M.; Altameemi, L.; et al. MON-491 TRK-Fusion Thyroid Cancer: A Clinical Overview in a Large Population at a Single Cancer Center. *J. Endocr. Soc.* **2020**, *4*. [CrossRef]
24. Pfeifer, A.; Rusinek, D.; Zebracka-Gala, J.; Czarniecka, A.; Chmielik, E.; Zembala-Nożyńska, E.; Wojtaś, B.; Gielniewski, B.; Szpak-Ulczok, S.; Oczko-Wojciechowska, M.; et al. Novel FGFR1 and TRIM33-NTRK1 transcript fusions in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosom. Cancer* **2019**, *58*, 558–566. [CrossRef]
25. Chu, Y.-H.; Dias-Santagata, D.; Farahani, A.A.; Boyraz, B.; Faquin, W.C.; Nosé, V.; Sadow, P.M. Clinicopathologic and molecular characterization of NTRK-rearranged thyroid carcinoma (NRTC). *Mod. Pathol.* **2020**, *33*, 2186–2197. [CrossRef] [PubMed]
26. Gatalica, Z.; Xiu, J.; Swensen, J.; Vranic, S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod. Pathol.* **2019**, *32*, 147–153. [CrossRef] [PubMed]
27. Chu, Y.-H.; Wirth, L.J.; Farahani, A.A.; Nosé, V.; Faquin, W.C.; Dias-Santagata, D.; Sadow, P.M. Clinicopathologic features of kinase fusion-related thyroid carcinomas: An integrative analysis with molecular characterization. *Mod. Pathol.* **2020**, *33*, 2458–2472. [CrossRef]
28. Xu, B.; Fuchs, T.L.; Dogan, S.; Landa, I.; Katabi, N.; Fagin, J.A.; Tuttle, R.M.; Sherman, E.J.; Gill, A.J.; Ghossein, R. Dissecting Anaplastic Thyroid Carcinoma: A Comprehensive Clinical, Histologic, Immunophenotypic, and Molecular Study of 360 Cases. *Thyroid* **2020**, *30*, 1505–1517. [CrossRef] [PubMed]
29. Tavares, C.; Melo, M.; Teijeiro, J.M.C.; Soares, P.; Sobrinho-Simões, M. ENDOCRINE TUMOURS: Genetic predictors of thyroid cancer outcome. *Eur. J. Endocrinol.* **2016**, *174*, R117–R126. [CrossRef]
30. Borre, P.V.; Schrock, A.B.; Anderson, P.M.; Morris, J.C.; Heilmann, A.M.; Holmes, O.; Wang, K.; Johnson, A.; Waguespack, S.G.; Ou, S.I.; et al. Pediatric, Adolescent, and Young Adult Thyroid Carcinoma Harbors Frequent and Diverse Targetable Genomic Alterations, Including Kinase Fusions. *Oncologist* **2017**, *22*, 255–263. [CrossRef]
31. Duan, H.; Li, Y.; Hu, P.; Gao, J.; Ying, J.; Xu, W.; Zhao, D.; Wang, Z.; Ye, J.; Lizaso, A.; et al. Mutational profiling of poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinoma by the use of targeted next-generation sequencing. *Histopathology* **2019**, *75*, 890–899. [CrossRef] [PubMed]
32. Kummar, S.; Lassen, U.N. TRK Inhibition: A New Tumor-Agnostic Treatment Strategy. *Target. Oncol.* **2018**, *13*, 545–556. [CrossRef] [PubMed]

Supplementary Table S1. Sequences of primers and hydrolysis probes designed for the *ACTB* gene and the *NTRK* fusion genes detection using Real-Time PCR

Gene	Primer/probe	Sequences	Location
<i>ACTB</i>	primer	F: TCTACAATGAGCTGCGTGTG	Exon 3
	primer	R: AGCCTGGATAGCAACGTACA	Exon 4
	probe	HEX-CAAGGCCAACCGCGAGAAGA	Exon 3
Gene fusion	Primer/probe	Sequences	Location
<i>RET/PTC1</i>	primer	F: GCAAAGCCAGCGTTACCAT	Exon 1
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
<i>RET/PTC3</i>	primer	F: GCAGACCTTGAGAACAGTCA	Exon 8
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
<i>PAX8/PPARγ</i>	primer	F: TCGACTCACCAGACCTACCC	Exon 8
	primer	F: GTGTACGGGCAGTTCACG	Exon 9
	primer	F: CTATGCCTCCTCTGCCATC	Exon 10
	primer	R: GAGAGATCCACGGAGCTGAT	Exon 2
	probe	FAM-GAGATGCCATTCTGGCCACC	Exon 2
<i>ETV6/NTRK3</i>	primer	F: CAGGATGGAGGAAGACTCG	Exon 2
	primer	F: CTGCATCAGAACCATGAAGA	Exon 4
	primer	F: CATGCCATTGGGAGAATAG	Exon 5
	primer	R: GTGGTTGATGTGGTGCAGT	Exon 14
	primer	R: TTTCCAAAGGCTCCCTCAC	Exon 15
	probe	FAM-CCCGTGGCTGTCATCAGTGG	Exon 14
	probe	FAM-GGAGAGACATCGTGCTGAAGCGA	Exon 15
<i>RBPM5/NTRK3</i>	primer	F: ACCTCAGTTCATTGCCAGAG	Exon 5
	primer	R: GTGGTTGATGTGGTGCAGT	Exon 14
	probe	FAM-CCCGTGGCTGTCATCAGTGG	Exon 14
<i>EML4/NTRK3</i>	primer	F: TCATGTGGCCTCAGTAAA	Exon 2
	primer	R: GTGGTTGATGTGGTGCAGT	Exon 14
	probe	FAM-CCCGTGGCTGTCATCAGTGG	Exon 14
<i>SQSTM1/NTRK3</i>	primer	F: AGCTGCCCTTAGCCCTCT	Exon 5
	primer	R: GTGGTTGATGTGGTGCAGT	Exon 14
	probe	FAM-CCCGTGGCTGTCATCAGTGG	Exon 14
<i>TPM3/NTRK1</i>	primer	F: CTGAGAGATCGGTAGCCAAG	Exon 7
	primer	R: AAAGGTGTTTCGTCCTTCTTC	Exon 10
	probe	FAM-CTAACAGCACATCTGGAGACCCGG	Exon 10
<i>IRF2BP2/NTRK1</i>	primer	F: CCCTTCGAGAGCAAGTTTAAAG	Exon 1
	primer	F: CCACTGCCTCACCTCATT	Exon 2
	primer	R: AAAGGTGTTTCGTCCTTCTTC	Exon 10
	probe	FAM-CTAACAGCACATCTGGAGACCCGG	Exon 10
<i>SQSTM1/NTRK1</i>	primer	F: AGCTGCCCTTAGCCCTCT	Exon 5
	primer	R: AAAGGTGTTTCGTCCTTCTTC	Exon 10
	probe	FAM-CTAACAGCACATCTGGAGACCCGG	Exon 10
<i>TPR/NTRK1</i>	primer	F: CCAAGTTGCTTCTCAGTCTTC	Exon 21
	primer	R: AAAGGTGTTTCGTCCTTCTTC	Exon 10
	probe	FAM-CTAACAGCACATCTGGAGACCCGG	Exon 10

Supplementary Table S2. Transcripts of genes involved in *NTRK* rearrangements

Gene	Transcript
<i>ETV6</i>	NM_001987.4
<i>RBPMS</i>	NM_006867.4
<i>EML4</i>	NM_019063.3
<i>SQSTM1</i>	NM_003900.4
<i>TPM3</i>	NM_153649.3
<i>IRF2BP2</i>	NM_182972.2
<i>TPR</i>	NM_003292.2
<i>NTRK3</i>	NM_002530.3
<i>NTRK1</i>	NM_002529.3

Supplementary Table S3. Comparison of clinical and pathological features of *NTRK* fusion-positive carcinomas between pediatric and adult patients

	<i>NTRK</i> fusion-positive carcinomas in pediatric patients (%) n = 17	<i>NTRK</i> fusion-positive carcinomas in adult patients (%) n = 42	<i>p</i>
Patients			
Females/males	14/3	32/10	0.444
Age at diagnosis (mean ± SD)	14.2 ± 3.6	40.3 ± 12.6	
Tumor size			
Mean ± SD (mm)	22.5 ± 12.2	20.3 ± 11.7	0.521
Microcarcinoma (≤10 mm)	1 (5.9)	7 (16.7)	0.260
Histology			
Predominantly papillary growth pattern	2 (11.8)	6 (14.3)	0.740
Mixture of papillary and follicular growth pattern	6 (35.3)	12 (28.6)	0.416
Predominantly follicular growth pattern	8 (47.1)	20 (47.6)	0.627
Tall cell variant	0	2 (4.8)	1
Clear cell variant	1 (5.9)	0	0.288
PDTC	0	2 (4.8)	1
Pathological characteristics			
Multifocality	10 (58.8)	16 (38.1)	0.123
Extrathyroidal extension	9 (52.9)	15 (35.7)	0.177
Intravascular invasion ¹	5 (29.4)	7 (20.6)	0.357
Lymph node metastases	11 (64.7)	21 (50.0)	0.231
Distant metastases	0	4 (9.5)	0.246
Chronic lymphocytic thyroiditis ²	13 (76.5)	25 (61.0)	0.206
Frequent psammoma bodies ³	1 (5.9)	5 (12.2)	0.426

¹ Data from eight adult *NTRK* fusion-positive samples were not available

^{2,3} Data from one adult *NTRK* fusion-positive sample were not available

SD standard deviation, TC thyroid cancer, PDTC poorly differentiated thyroid carcinoma

Supplementary Table S4. Comprehensive clinicopathological data on *NTRK* fusion-positive carcinomas

Patient	Sex	Age	Surgery	Tumor size (mm)	Histology	Multifocality	Extrathyroidal extension	Intravascular invasion	Lymph node metastases	Distant metastases	Chronic lymphocytic thyroiditis	Frequent psammoma bodies	Genetic alteration	Type of thyroid cancer
1	F	29	TTE	25	pf	N	N	N	N	N	N	N	<i>RBPM5/NTRK3</i>	PIC
2	F	39	TTE, LND	22	pf	Y	N	N	Y	N	Y	Y	<i>SQSTM1/NTRK3</i>	PIC
3	F	13	TTE	12	p	N	Y	N	N	N	Y	N	<i>RBPM5/NTRK3</i>	PIC
4	F	42	TTE	15	f	Y	Y	not available	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
5	F	43	TTE	11	tall cell variant	Y	N	not available	N	N	Y	Y	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
6	M	28	TTE	35	pf	N	N	not available	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
7	F	17	TTE+LND	20	f	Y	N	N	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
8	F	46	TTE	20	f	N	N	N	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
9	F	14	TTE+LND	20	f	Y	N	N	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
10	M	15	TTE+LND	34	f	N	N	N	Y	N	N	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
11	F	14	HTE, TTE	12	f	Y	Y	N	N	N	Y	N	<i>EML4/NTRK3</i>	PIC
12	F	30	TTE+LND	11	pf	N	N	N	Y	Y	Y	Y	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
13	F	20	TTE	15	f	N	N	N	N	N	N	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
14	F	77	TTE, LND	40	PDTC	N	Y	N	Y	N	N	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PDTCC
15	F	19	TTE	13	pf	N	N	N	N	N	Y	N	<i>RBPM5/NTRK3</i>	PIC
16	F	17	TTE+LND	12	f	N	N	N	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
17	M	40	TTE+LND	55	tall cell variant	Y	N	Y	Y	N	N	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
18	F	48	TTE	10	f	N	N	Y	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
19	F	9	TTE+LND	22	pf	Y	Y	N	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
20	F	45	TTE+LND	43	f	N	Y	not available	Y	N	N	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
21	F	31	TTE+LND	20	p	N	Y	N	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
22	F	24	TTE+LND	45	p	N	N	Y	Y	N	N	N	<i>EML4/NTRK3</i>	PIC
23	F	14	TTE	5	f	N	N	N	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
24	F	16	TTE+LND	20	pf	N	Y	N	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
25	M	16	TTE+LND	49	f	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	<i>SQSTM1/NTRK3</i>	PIC
26	F	47	TTE+LND	12	f	N	N	Y	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
27	F	16	TTE+LND	20	clear cell variant	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
28	F	43	TTE	15	f	N	N	N	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
29	M	19	TTE+LND	22	f	Y	N	N	Y	N	N	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
30	F	24	HTE, TTE, LND	22	pf	N	N	not available	Y	N	not available	not available	<i>EML4/NTRK3</i>	PIC
31	M	46	TTE+LND	15	f	N	N	N	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
32	M	26	TTE	12	f	Y	Y	N	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
33	F	44	TTE	18	f	N	Y	N	N	N	N	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
34	F	32	TTE+LND	17	pf	Y	N	N	N	N	N	N	<i>SQSTM1/NTRK3</i>	PIC
35	F	15	TTE	20	p	N	N	N	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
36	F	44	HTE, TTE	7	f	Y	N	N	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
37	F	35	TTE+LND	27	f	N	N	N	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
38	M	39	TTE+LND	20	p	N	N	N	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
39	F	58	TTE	13	p	Y	N	N	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
40	F	30	TTE+LND	20	f	N	N	not available	N	N	Y	not available	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
41	M	40	TTE+LND	25	f	Y	Y	not available	Y	N	N	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
42	F	41	TTE+LND	22	f	N	N	N	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
43	F	35	TTE+LND	15	pf	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
44	M	21	TTE+LND	24	pf	Y	Y	N	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
45	F	58	TTE	14	p	N	N	N	N	N	N	N	<i>EML4/NTRK3</i>	PIC
46	F	43	TTE	7	f	N	N	N	N	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
47	F	32	TTE+LND	7	p	N	N	N	N	N	Y	N	<i>SQSTM1/NTRK3</i>	PIC
48	F	28	TTE	8	f	N	N	N	N	N	N	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
49	F	48	TTE+LND	14	f	N	N	N	Y	N	Y	N	<i>ETV6/NTRK3</i>	PIC
50	F	62	TTE+LND	24	pf	Y	N	Y	Y	Y	Y	N	<i>TPM3/NTRK1 + TERT C228T</i>	PIC
51	F	32	TTE	35	f	Y	Y	N	N	Y	N	N	<i>TPR/NTRK1</i>	PIC
52	M	32	TTE+LND	6	pf	Y	Y	not available	Y	N	Y	Y	<i>IRF2BP2/NTRK1</i>	PIC
53	M	55	TTE+LND	20	pf	Y	Y	N	Y	N	Y	N	<i>TPM3/NTRK1 + TP53 K320*</i>	PIC
54	F	6	TTE+LND	17	pf	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	<i>IRF2BP2/NTRK1</i>	PIC
55	F	7	TTE+LND	50	pf	Y	Y	Y	Y	N	N	N	<i>IRF2BP2/NTRK1</i>	PIC
56	F	61	TTE+LND	15	f	N	Y	N	Y	N	N	N	<i>TPM3/NTRK1</i>	PIC
57	F	14	TTE+LND	35	pf	Y	Y	Y	Y	N	N	N	<i>TPM3/NTRK1</i>	PIC
58	M	30	HTE, TTE, LND	45	PDTC	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	<i>SQSTM1/NTRK1</i>	PDTCC
59	F	65	TTE	6	pf	N	N	N	N	N	N	N	<i>TPM3/NTRK1</i>	PIC

F female, M male, HTE hemithyroidectomy, TTE total thyroidectomy, LND lymph node dissection, p predominantly papillary growth pattern, pf mixed papillary and follicular growth pattern, f predominantly follicular growth pattern, Y yes, N no, PIC papillary thyroid carcinoma, PDTC poorly differentiated thyroid carcinoma

3.4 Publikace č. 4: *RET* fusion genes in pediatric and adult thyroid carcinomas: cohort characteristics and prognosis

Souhrn:

RET fúzní geny představují nejčastější mutaci u karcinomů štítné žlázy dětských a dospívajících pacientů. Cílem této práce bylo zanalyzovat *RET* fúzní geny jak u pediatrického, tak i dospělého souboru nádorů štítné žlázy, popsat typické klinické a patologické znaky, porovnat pediatrickou a dospělou kohortu a vyhodnotit odpověď na léčbu na základě mnohaletého sledování pacientů s karcinomem pozitivním na *RET* fúzní gen.

RET fúzní gen jsme v rozsáhlém souboru ($n = 1564$) různých typů tkání štítné žlázy detekovali pouze u papilárního karcinomu. Jednalo se o 113 pozitivních vzorků (76 od dospělých a 37 od pediatrických pacientů), čímž se jednalo o největší popsaný soubor u štítné žlázy na světě. Prevalence byla výrazně vyšší u pediatrických (29,8 %) než u dospělých pacientů (8,7 %). U dětských pacientů pozitivních na *RET* fúzi byla zaznamenána výrazně větší velikost nádoru a častější extratyreoidální extenze a lokální metastázy než u dospělých pacientů s PTC pozitivních na *RET* fúzi. Celkově bylo identifikováno 20 různých partnerských genů, z nichž tři (*FBXO41*, *SSBP2*, *ZMYM2*) nebyly ve spojitosti s *RET* genem dosud v literatuře popsány. PTC pozitivní na *RET* fúzní gen byly porovnány s PTC pozitivními na jiné mutace (*BRAF* V600E, *RAS*, *NTRK* fúzní geny) a na základě statistického zhodnocení bylo zjištěno, že *RET* fúzní geny se pojí s vyšší agresivitou nádoru a metastatickou aktivitou než karcinomy pozitivní na jiné mutace. Navzdory agresivním znakům *RET*-pozitivních karcinomů však byla prognóza z dlouhodobé perspektivy příznivá, třebaže pacienti nedosahovali remise brzy po operaci a polovina pediatrických pacientů měla strukturální onemocnění ještě dva roky po operaci.

Význam publikace:

Význam této studie tkví v hlubším porozumění tematiky *RET* fúzních genů u karcinomů štítné žlázy dospělých a dětských pacientů, jejichž vyšší agresivita vyžaduje včasnou a důkladnou léčbu. Jedná se o největší popsaný soubor pacientů s PTC pozitivními na *RET* fúzními geny na světě.

Podíl na publikaci:

Můj podíl na práci zahrnoval: 1) izolaci nukleových kyselin ze zmražených tkání štítné žlázy (nově shromážděné vzorky), 2) sekvenaci genů: *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *TERT*, *TP53* a vyhodnocení sekvenačních dat, 3) analýzu vybraných fúzních genů pomocí real-time PCR, 4)

přípravu všech knihoven na RNA sekvenaci, 5) RNA sekvenace vzorků, 6) bioinformatické vyhodnocení dat, 7) navržení a optimalizaci primerů pro detekci *RET* fúzních genů pomocí real-time PCR, 8) zpracování a vyhodnocení klinických dat, 9) provedení klinicko-genetické korelace, 10) statistické zhodnocení, 11) vytvoření tabulek a obrázků, 12) sepsání celého rukopisu

RESEARCH

***RET* fusion genes in pediatric and adult thyroid carcinomas: cohort characteristics and prognosis**

Barbora Bulanova Pekova¹, Vlasta Sykorova¹, Karolína Mastníková¹, Eliška Vaclavíková¹, Jitka Moravcová¹, Petr Váček², Lucie Lancová², Petr Lastuvka³, Rami Katra⁴, Petr Bavor⁵, Daniela Kodetová⁶, Martin Chovanec⁷, Jana Droženová⁸, Radoslav Matej⁹, Jaromír Astl⁹, Jiří Hložek⁹, Petr Hrabal¹⁰, Josef Vcelák¹ and Bela Bendlová¹

¹Department of Molecular Endocrinology, Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

²Department of Nuclear Medicine and Endocrinology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

³Departments of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

⁴Department of Ear, Nose and Throat, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

⁵Department of Surgery, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

⁶Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

⁷Department of Otorhinolaryngology, 3rd Faculty of Medicine, University Hospital Kralovské Vinohrady, Prague, Czech Republic

⁸Department of Pathology, 3rd Faculty of Medicine, University Hospital Kralovské Vinohrady, Prague, Czech Republic

⁹Department of Otorhinolaryngology and Maxillofacial Surgery, 3rd Faculty of Medicine and Military University Hospital, Prague, Czech Republic

¹⁰Department of Pathology, Military University Hospital, Prague, Czech Republic

Correspondence should be addressed to B Bulanova Pekova: bpekova@endo.cz

Abstract

Thyroid cancer is associated with a broad range of different mutations, including *RET* (rearranged during transfection) fusion genes. The importance of characterizing *RET* fusion-positive tumors has recently increased due to the possibility of targeted treatment. The aim of this study was to identify *RET* fusion-positive thyroid tumors, correlate them with clinicopathological features, compare them with other mutated carcinomas, and evaluate long-term follow-up of patients. The cohort consisted of 1564 different thyroid tissue samples (including 1164 thyroid carcinoma samples) from pediatric and adult patients. Samples were analyzed for known driver mutations occurring in thyroid cancer. Negative samples were subjected to extensive *RET* fusion gene analyses using next-generation sequencing and real-time PCR. *RET* fusion genes were not detected in any low-risk neoplasm or benign thyroid tissue and were detected only in papillary thyroid carcinomas (PTCs), in 113/993 (11.4%) patients, three times more frequently in pediatric and adolescent patients (29.8%) than in adult patients (8.7%). A total of 20 types of *RET* fusions were identified. *RET* fusion-positive carcinomas were associated with aggressive tumor behavior, including high rates of lymph node (75.2%) and distant metastases (18.6%), significantly higher than in *NTRK* fusion, *BRAF* V600E and *RAS*-positive carcinomas. Local and distant metastases were also frequently found in patients with microcarcinomas positive for the *RET* fusions. 'True recurrences' occurred rarely (2.4%) and only in adult patients. The 2-, 5-, 10-year disease-specific survival rates were 99%, 96%, and 95%, respectively. *RET* fusion-positive carcinomas were associated with high invasiveness and metastatic activity, but probably due to intensive treatment with low patient mortality.

Key Words

- ▶ *RET*
- ▶ fusion gene
- ▶ rearrangement
- ▶ papillary thyroid carcinoma
- ▶ outcome

Endocrine-Related Cancer
(2023) 30, e230117

<https://erc.bioscientifica.com>
<https://doi.org/10.1530/ERC-23-0117>

© 2023 the author(s)
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from <https://erc.bioscientifica.com/> on 01/12/2023 12:11:00. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Introduction

The incidence of thyroid cancer is increasing rapidly worldwide. Uncovering the genetic background of thyroid carcinomas can help determine the diagnosis, prognosis and appropriate treatment of patients. The broad spectrum of genetic alterations found in thyroid cancer includes different types of mutations: somatic point mutations, indels, copy number alterations, and fusion genes (Nikiforov 2011).

Among the fusion genes, the most common and best known are *RET* (rearranged during transfection) fusion genes (also known as *RET/PTC* rearrangements) arising from a chromosomal rearrangement between the *RET* gene and its partner gene. Expression of the fusion gene is driven by the promoter of the partner gene, leading to constitutive activation of the kinase domain of the *RET* gene. This leads to stimulation of the MAPK and PI3K pathways and oncogenesis (Arighi *et al.* 2005).

The *CCDC6/RET* (also known as *RET/PTC1*) fusion gene was discovered in 1987 and described 3 years later (Fusco *et al.* 1987, Grieco *et al.* 1990). It was one of the first reported genetic causes of thyroid cancer. A few years later, *PRKARIA/RET* (*RET/PTC2*) and *NCOA4/RET* (*RET/PTC3*) fusions were identified (Bongarzone *et al.* 1993, Santoro *et al.* 1994). *RET* fusion genes have been studied in association with exposure to ionizing radiation during childhood and the development of thyroid cancer. The genetic landscape of radiation-induced papillary thyroid carcinomas (PTCs) was compared with sporadic PTCs in pediatric patients. *RET* fusions were highly prevalent in both pediatric PTC cohorts but occurred more frequently in radiation-induced PTCs with a predominance of *NCOA4/RET* fusion. In sporadic cases, *CCDC6/RET* fusion was the most common genetic alteration in pediatric thyroid cancer (Nikiforov *et al.* 1997, Ricarte-Filho *et al.* 2013). In adult cohorts, *RET* fusion genes were detected less frequently than in pediatric cohorts (Santoro *et al.* 2020). Studies presenting long-term follow-up of patients with *RET* fusion-positive carcinoma are almost absent. Interest in *RET* fusion genes has recently increased due to the novel possibility of targeted treatment with highly potent and selective *RET* inhibitors – selpercatinib and pralsetinib (Markham 2020a,b).

The objectives of this study were as follows: (i) analysis of genetic alterations with emphasis on *RET* fusion genes in a large series of local malignant and benign thyroid diseases, (ii) characterization of *RET*

fusion-positive cases based on clinical and pathological data, and (iii) evaluation of long-term follow-up of patients with *RET* fusion-positive thyroid carcinoma.

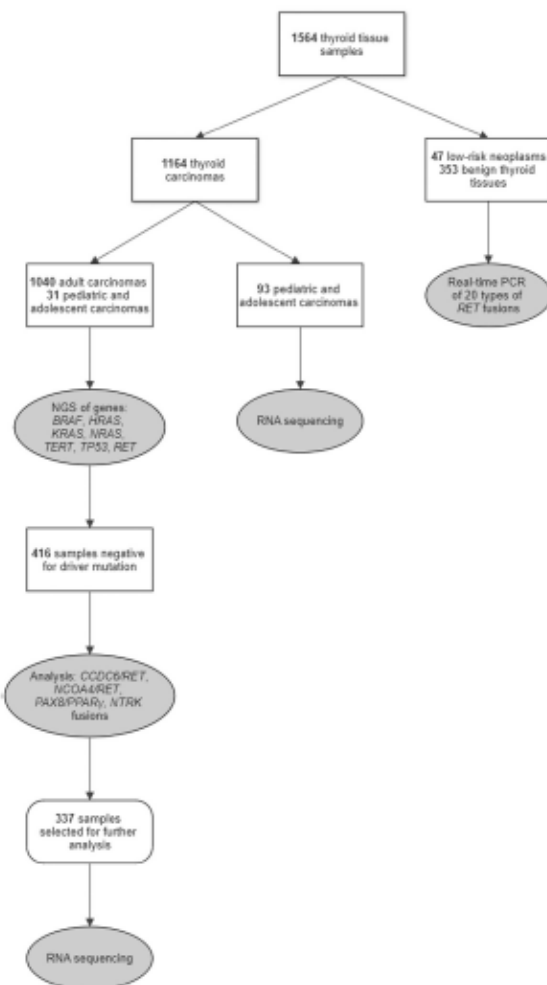
Materials and methods

The cohort

The cohort consisted of a total of 1164 thyroid carcinomas (998 PTCs, 98 medullary thyroid carcinomas (MTCs), 24 follicular thyroid carcinomas (FTCs), 16 anaplastic thyroid carcinomas (ATCs), 11 poorly differentiated thyroid carcinomas (PDTCs), and 17 oncocytic carcinomas (OCAs)), 47 low-risk neoplasms (26 follicular tumors of uncertain malignant potential, 18 noninvasive follicular tumors with papillary-like nuclear features, three hyalinizing trabecular tumors), and 353 benign thyroid tissues (adenomas, hyperplastic nodules, chronic lymphocytic thyroiditis (CLT)) (Fig. 1). Thyroid tissue samples were collected from three Prague hospitals: the Motol University Hospital (between years 2003 and 2022), the University Hospital Kralovske Vinohrady (between years 2016 and 2022), and the Military University Hospital (between years 2019 and 2022). One thousand four hundred eighty-one samples were fresh frozen thyroid tissues and 83 samples were formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) thyroid tissues. Informed consent was obtained from all patients or parents/legal guardians of pediatric patients. All molecular genetic analyses were performed in the laboratory of the Institute of Endocrinology (Department of Molecular Endocrinology). The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Endocrinology in Prague (EK-EÚ/F192/08062020).

Nucleic acid extraction

DNA and RNA from fresh frozen and FFPE tissues were extracted using the AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit and AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen), respectively and the QIAcube Connect automatic isolator (Qiagen). Quantitative and qualitative analysis of all samples was performed using a fluorometer (Qubit 2.0, Invitrogen) and a spectrophotometer (QIAXpert, Qiagen). Nucleic acid from 11 FFPE samples (five PTCs, three MTCs, one FTC, one OCA, one benign thyroid tissue) was insufficient in quality or quantity for further analyses; thus, these samples were excluded from the study.

**Figure 1**

Flowchart illustrates the numbers and types of samples analyzed by different procedures. For pediatric and adolescent carcinomas, RNA sequencing was performed on all samples collected until 2020, and for samples collected between 2020 and 2022, multistage analysis was performed as for carcinomas from adult patients.

RET fusion gene analysis of pediatric samples

The majority of pediatric PTC samples ($n=93$) was analyzed for the presence of *RET* fusion genes using the QIASeq Targeted RNAscan panel (Qiagen) or FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung (CTL) panel (ArcherDx, Boulder, CO, USA) as reported in our previous study (Pekova *et al.* 2020). Pediatric samples ($n=31$) collected between 2020 and 2022 were analyzed using the same procedure as adult samples described below (Fig. 1).

Analysis of point mutations

Adult and newly collected pediatric thyroid cancer samples were first analyzed for point mutations in the following genes: *BRAF* (exon 15), *HRAS* (exons 2 and 3), *KRAS* (exons 2 and 3), *NRAS* (exons 2 and 3), *TERT* (promoter), *TP53* (exons 4, 5, 6, 7, 8, and 9), and *RET* (exons 8, 10, 11, 13, 14, 15, and 16) (Fig. 1). Libraries were prepared using the Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina), quantified using a fluorometer, and sequenced on the MiSeq (Illumina). *TERT* promoter mutations C228T and C250T were analyzed by capillary sequencing on the CEQ 8000 instrument (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) as previously described (Pekova *et al.* 2019) or using the PNAclamp *TERT* Mutation Detection Kit (Panagene) and real-time PCR using the Light Cycler® 480 (Roche).

Analysis of selected fusion genes

Carcinoma samples that were negative for a driver point mutation in the *BRAF*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, or *RET* genes were further analyzed for the *CCDC6/RET*, *NCOA4/RET*, *PAX8/PPAR γ* , and *NTRK* fusions as described in our previous study (Pekova *et al.* 2021) (Fig. 1). This selective analysis approach was chosen because these driver mutations are typically mutually exclusive with other driver mutations (Agrawal *et al.* 2014, Pekova *et al.* 2020, Parimi *et al.* 2023).

RNA sequencing

RNA sequencing was performed on a total of 337 carcinoma samples that were negative for driver mutations in genes *BRAF*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, and *RET* or fusion genes *CCDC6/RET*, *NCOA4/RET*, *PAX8/PPAR γ* , and *NTRK* (Fig. 1).

Libraries were prepared by the FusionPlex CTL panel (ArcherDx) using Anchored Multiplex PCR technology, which allowed detection of novel fusion genes. Briefly, total RNA (250 ng) was reverse-transcribed into cDNA using random primers. The cDNA ends were modified to allow ligation of Archer molecular barcode adapters (including 15 indexes). Two rounds of PCR followed. During the second round PCR, i7 indexes were added. Purified libraries were quantified and pooled to equimolar concentrations. The resulting libraries were subjected to paired-end sequencing on the MiSeq (Illumina). Bioinformatic analysis was performed using the Archer Analysis software version

6.2.7 (ArcherDx). For a gene fusion to be considered valid, the breakpoint had to span at least five high-quality unique reads and at least three reads had to have a unique start site.

Real-time PCR analysis

All *RET* fusion genes identified by the FusionPlex CTL panel were verified by real-time PCR analysis. Total RNA (2 µg) was reverse transcribed to cDNA using random primers, dNTPs, RNase inhibitor and AMV reverse transcriptase (Promega) as described in our previous study (Pekova *et al.* 2020). The cDNA was diluted five times and amplified using the TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) and gene-specific primers and hydrolysis probes that were synthesized based on our design (Supplementary Table 1, see section on supplementary materials given at the end of this article). The *ACTB* gene was used as the reference gene. Each experiment included a positive control and a negative control where RNase-free water was used instead of template cDNA. Real-time PCR was performed as follows on the Light Cycler® 480 (Roche): 50°C for 2 min, 95°C for 20 s followed by 40 cycles of 95°C for 3 s and 60°C for 30 s.

A total of 400 low-risk neoplasms and benign thyroid tissue samples were screened for all 20 types of *RET* fusion genes identified in carcinoma samples in this study (Fig. 1). Testing of the samples was performed using real-time PCR analysis as described above.

Statistical analysis

Categorical data are summarized as *n* (%). Normally distributed data are summarized as the mean (standard deviation) and non-normally distributed data as the median (range). Categorical variables were compared using the Fisher's exact test or Pearson's chi-squared test, and continuous variables were compared using the *t*-test. Statistical analyses were performed using the Simple Interactive Statistical Analysis and the GraphPad tools (GraphPad Software). A *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Molecular characterization

RET fusion genes were found only in PTCs. No *RET* fusion genes were identified in other types of thyroid

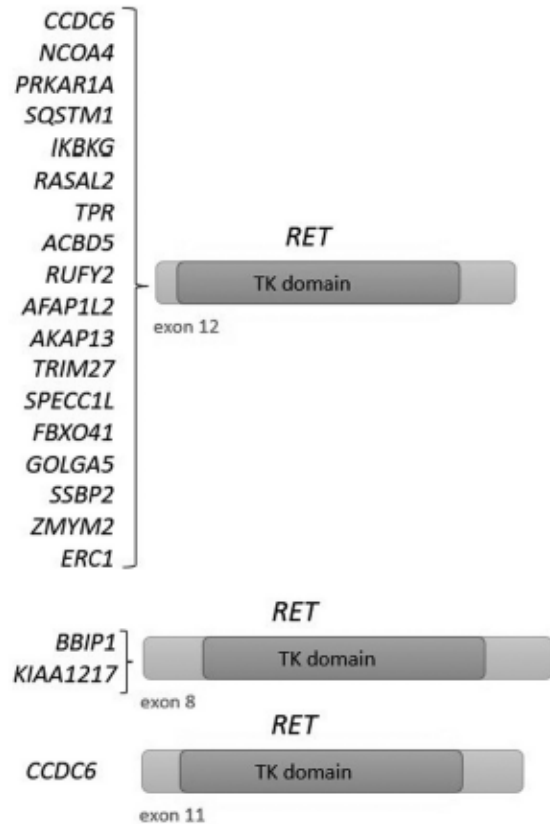


Figure 2
Overview of identified *RET* fusion genes. Partner genes were most frequently fused to exon 12 of the *RET* gene, but in rare cases also to exon 8 and exon 11 of the *RET* gene. TK, tyrosine kinase.

carcinomas, MTCs, FTCs, ATCs, PDTCs, OCAs, or in any low-risk neoplasms or benign thyroid lesions. *RET* fusions were detected in 113/993 (11.4%) patients with PTC.

A total of 20 different types of *RET* fusion genes were identified (Fig. 2). Partner genes were as follows: *ACBD5*, *AFAP1L2*, *AKAP13*, *BBIP1*, *CCDC6*, *ERC1*, *FBXO41*, *GOLGA5*, *IKBKG*, *KIAA1217*, *NCOA4*, *PRKAR1A*, *RASAL2*, *RUFY2*, *SPECC1L*, *SQSTM1*, *SSBP2*, *TPR*, *TRIM27*, *ZMYM2*. The *CCDC6* partner gene was detected predominantly in 67 (59.3%) cases, followed by the *NCOA4* gene, which was found in 25 (22.1%) cases. The partner genes *RUFY2*, *AFAP1L2*, and *PRKAR1A* were also recurrent, while the others were detected in only one case. The *FBXO41/RET*, *SSBP2/RET*, and *ZMYM2/RET* fusion genes were novel, all of them were in-frame. In two cases, two different coexisting *RET* fusions were identified in each sample (*ACBD5/RET*+*BBIP1/RET*;

SPECC1L/RET+FBXO41/RET). In some cases of *CCDC6/RET* and *NCOA4/RET* fusion genes, different isoforms were revealed (Supplementary Table 2).

The *TERT* promoter mutation was detected along with the *CCDC6/RET* fusion in two male patients. In two multifocal cases, the *CCDC6/RET* fusion gene was detected in one nodule and the *BRAF* V600E mutation in the other. In one unique case of a female, different multiple mutations were found in her three thyroid nodules: *CCDC6/RET+NRAS* Q61R in the first nodule, *CCDC6/RET+KRAS* G13D in the second nodule, and *NRAS* Q61R+*PTEN* Q245* in the third nodule. Her lymph node metastases (LNM) were positive only for the *CCDC6/RET* fusion gene.

Clinicopathological characteristics

Clinicopathological data of patients with *RET* fusion-positive carcinoma are summarized in Table 1 and Fig. 3.

The cohort consisted of 113 patients, 85 (75.2%) females and 28 (24.8%) males, with the mean age at diagnosis of 32.6 ± 17.4 years. Four patients had malignant disease (invasive adenocarcinoma of the lung, prostate cancer, dermatofibrosarcoma protuberans, and non-Hodgkin lymphoma) before the diagnosis of PTC. The mean tumor size was 21.8 ± 12.6 mm. Microcarcinoma (≤ 10 mm) had 16% of patients. In one case, only PTC metastases in lymph nodes were found in a patient without an identified primary thyroid tumor. A combination of papillary and follicular growth patterns on histology was predominant, found in 37 cases, and in a further nine cases the specimens also had a component of a solid growth pattern. Less frequent histological subtypes were diffuse sclerosing variant identified in five cases and solid and clear cell variant both in two cases. Multifocality was found in 48.2% of cases and 66.7% of these cases had numerous, in some cases up to hundreds, intrathyroidal

Table 1 Clinical and pathological features of patients harboring *RET* fusion-positive carcinomas.

	All <i>RET</i> fusion-positive PTCs (%) n = 113	Adult (%) n = 76	Pediatric and adolescent (%) n = 37	P
Patients				
Females/males	85/28	59/17	26/11	0.266
Age at diagnosis (mean \pm s.d.)	32.6 \pm 17.4	42.2 \pm 12.8	13.0 \pm 3.8	
Radiation exposure before the diagnosis of PTC	5 (4.4)	5 (6.6)	0	0.132
Malignancy before the diagnosis of PTC	4 (3.5)	4 (5.3)	0	0.199
Tumor size				
Mean \pm s.d. (mm)	21.8 \pm 12.6	19.2 \pm 10.4	26.8 \pm 14.8	0.002
Microcarcinoma (≤ 10 mm)	18 (16.0)	14 (18.4)	4 (10.8)	0.226
Histology				
Predominantly papillary growth pattern	23 (20.4)	17 (22.4)	6 (16.2)	0.309
Mixture of papillary and follicular growth pattern	37 (32.7)	23 (30.3)	14 (37.8)	0.275
Mixture of papillary, follicular, and solid growth pattern	9 (8.0)	5 (6.6)	4 (10.8)	0.331
Predominantly follicular growth pattern	24 (21.2)	17 (22.4)	7 (18.9)	0.437
Other	9 (8.0)	5 (6.6)	4 (10.8)	0.331
Unknown	11 (9.7)	9 (11.8)	2 (5.4)	0.234
Pathological characteristics				
Multifocality	54 (48.2)	34/75 (45.3)	20 (54.1)	0.252
Numerous intrathyroidal microcarcinomas	36 (32.4)	20/75 (26.7)	16/36 (44.4)	0.050
Extrathyroidal extension	47 (43.5)	24/71 (33.8)	23 (62.2)	0.004
Intravascular invasion	34 (33.3)	19/65 (29.2)	15 (40.5)	0.172
Lymph node metastases	85 (75.2)	52 (68.4)	33 (89.2)	0.012
Distant metastases	21 (18.6)	12 (15.8)	9 (24.3)	0.200
Chronic lymphocytic thyroiditis	73 (65.2)	48/75 (64.0)	25 (67.6)	0.439
Frequent psammoma bodies	32 (28.8)	22/75 (29.3)	10/36 (27.8)	0.649

Values highlighted in bold were statistically significant.
PTC, papillary thyroid carcinoma.

<https://erc.bioscientifica.com>
<https://doi.org/10.1530/ERC-23-0117>

© 2023 the author(s)
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
<http://creativecommons.org/licenses/by/>

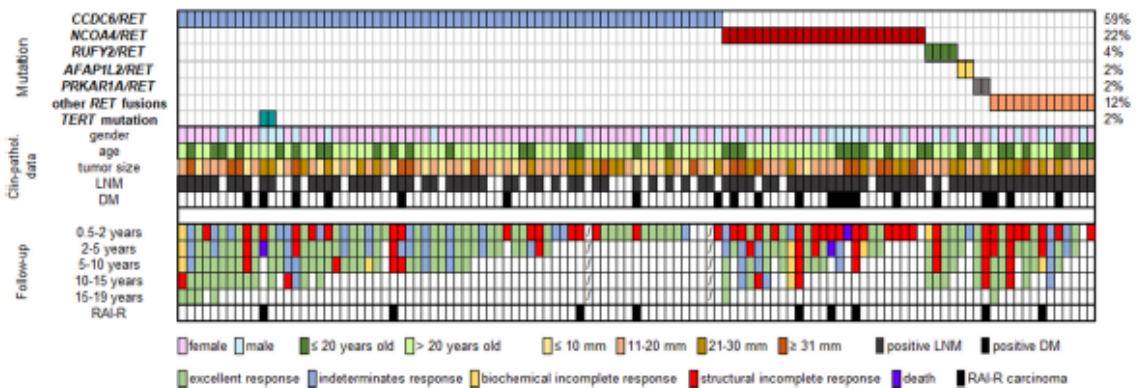


Figure 3 Tile plot of patients with *RET* fusion-positive carcinoma, their clinicopathological and follow-up data. Clinical and pathological data such as gender, age at diagnosis, tumor size, lymph node metastases, and distant metastases are shown. Follow-up data display patient’s response to treatment and cases of radiolodine-refractory carcinomas. LNM, lymph node metastases; DM, distant metastases; RAI-R, radioactive iodine-refractory.

microcarcinomas. Tumors usually showed infiltrative growth in the thyroid parenchyma and were unencapsulated. The majority (75.2%) of patients had LNM, of which 21.2% were located only in the central compartment and 78.8% in the lateral compartment, and 18.6% had evidence of distant metastases (DM), which in all cases affected the lungs, additionally in two cases the bones. The frequency of LNM and DM in association with primary tumor size is shown in Table 2. Tumor size was divided into four categories: ≤ 10 mm, 11–20 mm, 21–30 mm, and ≥31 mm, and the data were analyzed separately for adult and pediatric patients. LNM and DM also occurred frequently in patients with microcarcinoma.

Of the 113 patients with PTC positive for the *RET* fusion gene, 76/869 (8.7%) were adults and 37/124 (29.8%) were pediatric and adolescent patients aged 5 to 20 years. A comparison of the two cohorts is shown in Table 1. Pediatric patients had a significantly larger mean tumor size compared to adults, 26.8 mm vs 19.2 mm ($P=0.002$). Other features in which pediatric patients differed significantly from adults were extrathyroidal extension (62.2% vs 33.8%; $P=0.004$) and LNM (89.2% vs 68.4%; $P=0.012$).

NCOA4/RET fusion-positive carcinomas were compared with carcinomas harboring other *RET* fusions (Table 3). PTCs positive for *NCOA4/RET* were significantly associated with larger tumor size ($P=0.021$) and more frequently had extrathyroidal extension ($P=0.049$), in contrast to carcinomas positive for other *RET* fusions, which were significantly associated with a predominant papillary growth pattern ($P=0.001$) and CLT ($P=0.005$). Patients with PTC positive for *NCOA4/RET* had more frequent LNM and DM than patients with other *RET* fusions; however, the differences only approached the threshold of statistical significance ($P=0.074$ and $P=0.053$, respectively).

Comparison of clinicopathological features between PTCs positive for *RET* fusions and individual groups of PTCs with *NTRK* fusions, *BRAF* V600E and *RAS* mutations was performed (Table 4). Only patients with available clinicopathological data were included. Patients with *RET* fusion-positive PTCs were significantly younger than patients with *BRAF* V600E and *RAS*-mutated carcinomas ($P < 0.001$) and had significantly larger tumor than patients with the *BRAF* V600E-mutated carcinomas ($P < 0.001$). In *RET* fusion-positive PTCs, features associated with higher

Table 2 Frequency of LNM and DM in relation to primary tumor size in adult and pediatric and adolescent patients with *RET* fusion-positive carcinoma.

Patients	Metastases	Tumor size			
		≤10 mm	11–20 mm	21–30 mm	≥ 31 mm
Adults	LNM	11 (73%)	23 (62%)	12 (75%)	6 (75%)
	DM	2 (13%)	4 (11%)	4 (25%)	2 (25%)
Pediatric and adolescent	LNM	3 (75%)	9 (75%)	11 (100%)	10 (100%)
	DM	1 (25%)	1 (8%)	3 (27%)	4 (40%)

<https://erc.bioscientifica.com>
<https://doi.org/10.1530/ERC-23-0117>

© 2023 the author(s)
 Published by Bioscientifica Ltd.
 Printed in Great Britain



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Table 3 Comparison of clinical and pathological features between *NCOA4/RET* and other *RET* fusion-positive PTCs.

	<i>NCOA4/RET</i> -positive PTCs (%) <i>n</i> = 25	Other <i>RET</i> fusion-positive PTCs (%) <i>n</i> = 88	<i>P</i>
Patients			
Females/males	16/9	69/19	0.115
Age at diagnosis (mean ± s.d.)	33.6 ± 19.9	32.4 ± 16.6	0.761
Radiation exposure before the diagnosis of PTC	1 (4.0)	4 (4.5)	0.721
Malignancy before the diagnosis of PTC	1 (4.0)	3 (3.4)	0.638
Tumor size			
Mean ± s.d. (mm)	26.8 ± 15.1	20.3 ± 11.3	0.021
Microcarcinoma (≤10 mm)	1 (4.0)	17 (19.5)	0.050
Histology			
Predominantly papillary growth pattern	0	23 (26.1)	0.001
Mixture of papillary and follicular growth pattern	9 (36.0)	27 (30.7)	0.392
Mixture of papillary, follicular, and solid growth pattern	1 (4.0)	8 (9.1)	0.365
Predominantly follicular growth pattern	8 (32.0)	16 (18.2)	0.114
Other	4 (16.0)	5 (5.7)	0.107
Unknown	3 (12.0)	8 (9.1)	0.456
Pathological characteristics			
Multifocality	15 (60.0)	38/87 (43.7)	0.113
Numerous intrathyroidal microcarcinomas	9/24 (37.5)	26/87 (29.9)	0.317
Extrathyroidal extension	14/23 (60.9)	33/85 (38.4)	0.049
Intravascular invasion	10/21 (47.6)	24/81 (29.6)	0.098
Lymph node metastases	22 (88.0)	63 (71.6)	0.074
Distant metastases	8 (32.0)	13 (14.8)	0.053
Chronic lymphocytic thyroiditis	10 (40.0)	62/87 (71.3)	0.005
Frequent psammoma bodies	6/24 (25.0)	26/87 (29.9)	0.424

Values highlighted in bold were statistically significant.
PTC, papillary thyroid carcinoma.

tumor aggressiveness were detected more often than in PTCs positive for other mutations. LNM and DM were significantly more frequent in patients with *RET* fusions than in patients with other mutations. Multifocality, extrathyroidal extension, and intravascular invasion were significantly more common in *RET* fusion-positive PTCs than in *BRAF* V600E and *RAS*-mutated PTCs.

Treatment and follow-up

Total thyroidectomy (TTE) was performed in all patients except one who underwent hemithyroidectomy (HTE) and whose follow-up data were not available. Two patients underwent first HTE followed by completion to TTE. Lymph node dissection for suspected LNM was performed in 88 (77.9%) patients. Twenty (17.7%) patients had reoperation, including 19 patients for LNM and one patient for elimination of thyroid remnants.

One hundred and four (92%) patients received radioactive iodine (RAI) treatment. Six patients (five adults, one pediatric patient) were not indicated for RAI therapy due to small tumor size (≤12 mm) and the absence of metastases. One pediatric patient died due to late surgical treatment and massive lung metastases before RAI treatment. Follow-up data of two patients were not available. Approximately half of the patients (55% of adult and 46% of pediatric patients) received one therapeutic dose of RAI, 20% of adults and 19% of pediatric patients received two doses, and 18% of adult and 30% of pediatric patients received three or more doses. The median activity administered per therapeutic session was 120 mCi (range: 50–200 mCi) equally in adult and pediatric patients. In addition to RAI therapy, two patients with RAI-refractory PTC were treated with radiotherapy and one of them also with chemotherapy. One patient was on targeted treatment with the *RET* inhibitor selpercatinib.

<https://erc.bioscientifica.com>
<https://doi.org/10.1530/ERC-23-0117>

© 2023 the author(s)
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Table 4 Comparison of clinicopathological features between PTCs positive for *RET* and *NTRK* fusions, *BRAF*V600E and *RAS* mutations.

	RET fusions (%) n = 113	NTRK fusions (%) n = 57	P (RET fusions × NTRK fusions)	BRAF V600E (%) n = 413	P (RET fusions × BRAF V600E)	RAS (%) n = 61	P (RET fusions × RAS)
Patients							
Females/males	85/28	45/12	0.367	323/90	0.289	50/11	0.205
Age at diagnosis (mean ± s.d.)	32.6 ± 17.4	32.1 ± 15.2	0.854	47.1 ± 16.7	<0.001	45.1 ± 17.3	<0.001
Radiation exposure before the diagnosis of carcinoma	5 (4.4)	1 (1.8)	0.343	NA	/	NA	/
Malignancy before the diagnosis of carcinoma	4 (3.5)	1 (1.8)	0.455	32 (7.7)	0.081	4 (6.6)	0.495
Tumor size							
Mean ± s.d. (mm)	21.8 ± 12.6	20.2 ± 11.3	0.420	17.6 ± 10.2	<0.001	20.0 ± 18.5	0.449
Microcarcinoma (≤10 mm)	18 (16.0)	8 (14.0)	0.468	99 (24.0)	0.042	17/60 (28.3)	0.043
Histology (n)							
Predominantly papillary growth pattern	102	57	0.137	375	<0.001	59	0.117
Mixture of papillary and follicular growth pattern	23 (22.5)	8 (14.0)	0.137	193 (51.5)	<0.001	8 (13.6)	0.117
Mixture of papillary and follicular growth pattern	37 (36.3)	18 (31.6)	0.338	114 (30.4)	0.258	6 (10.2)	<0.001
Mixture of papillary, follicular, and solid growth pattern	9 (8.8)	0	0.016	3 (0.8)	<0.001	0	0.013
Predominantly follicular growth pattern	24 (23.5)	28 (49.1)	<0.001	41 (10.9)	0.001	42 (71.2)	<0.001
Other	9 (8.8)	3 (5.3)	0.316	24 (6.4)	0.256	3 (5.1)	0.295
Pathological characteristics							
Multifocality	54/112 (48.2)	25 (43.9)	0.355	146/392 (37.2)	0.036	15/57 (26.3)	0.005
Extrathyroidal extension	47/108 (43.5)	22 (38.6)	0.330	125/408 (30.6)	0.012	6 (9.8)	<0.001
Intravascular invasion	34/102 (33.3)	11/49 (22.4)	0.118	51/376 (13.6)	<0.001	8/58 (13.8)	0.005
Lymph node metastases	85 (75.2)	30 (52.6)	0.003	142/388 (36.6)	<0.001	6/53 (11.3)	<0.001
Distant metastases	21 (18.6)	3 (5.3)	0.013	10/371 (2.7)	<0.001	3/52 (5.8)	0.022
Chronic lymphocytic thyroiditis	73/112 (65.2)	38/56 (67.9)	0.434	NA	/	NA	/
Frequent psammoma bodies	32/111 (28.8)	6/56 (10.7)	0.006	NA	/	NA	/

Values highlighted in bold were statistically significant.
NA, not available.

The patient's tumor infiltrated the respiratory tract, the lesion was inoperable and the patient also had lung metastases. The patient responded well to treatment; he had a partial remission.

Median follow-up was 75 months (range: 4-228 months). Response to treatment was determined based on the definitions and criteria in the 2015 American Thyroid Association Guidelines as an excellent response (ER), an indeterminate response (IR), a biochemical incomplete response (BIR), a structural incomplete response (SIR) (Haugen *et al.* 2015) or death. Response to treatment was assessed in the following time periods after surgery: 0.5-2 years, 2-5 years, 5-10 years, 10-15 years, and 15-19 years. Detailed follow-up data describing the course of treatment for individual patients are shown in Fig. 3. Follow-up data were unknown for two patients and four patients were not evaluated due to short-term follow-up (less than 6 months after surgery).

During the first 2 years after surgery, the number of patients who had ER and SIR to treatment was similar. Later, the patient's response to treatment improved, although only slightly from the fifth year after surgery. Forty-one (38.3%) patients had ER to treatment during the entire follow-up. Two adult patients (2.4%) had a 'true recurrence', a relapse after achieving structural and biochemical disease-free status. LNM were identified

in the first case 4 years after surgery and in the second case 7 years after surgery. Four adult patients (4.8%) had SIR after IR/BIR. In three cases, the evidence of metastases (2x LNM, 1x DM) was found around 10 years after surgery and in one case of DM 5 years after surgery. Twelve patients (14.6%, an equal proportion of pediatric and adult patients) had ongoing SIR more than 2 years after surgery. Three patients (2.7%) died and all of them due to PTC. All were males, two adults and one pediatric patient. Two patients had PTC positive for *NCOA4/RET* and one patient for *CCDC6/RET* along with the *TERT* C228T mutation. The 2-, 5-, 10-year disease-specific survival rates were 99%, 96%, and 95%, respectively, for *RET* fusion-positive patients.

According to published definitions, nine (8.7%) patients had RAI-refractory PTC (Tuttle *et al.* 2019). Among these patients were both adults and children, and most were males. Six carcinomas were RAI-refractory from the start of RAI treatment, and in three cases the refractoriness developed over time. RAI-refractory LNM were in seven cases, of which two patients also had RAI-refractory lung metastases and two patients had only RAI-refractory lung metastases.

Response to treatment was compared between pediatric and adult patients (Fig. 4A). In the first 2 years after surgery, a significantly lower number of pediatric patients than adult patients had an ER to

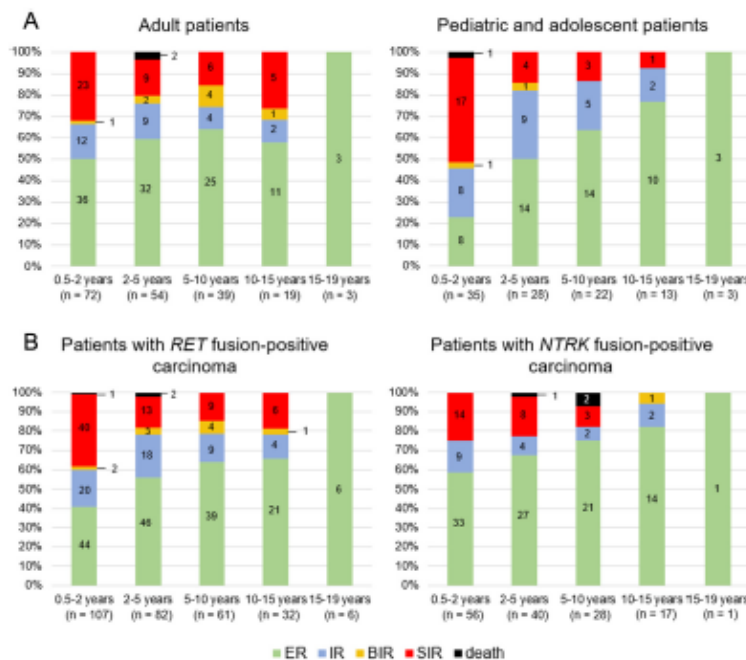


Figure 4 Graphical representation of the responses to treatment during follow-up periods (A) in adult and pediatric and adolescent patients with *RET* fusion-positive carcinomas (B) in all *RET* fusion-positive carcinomas and *NTRK* fusion-positive carcinomas. The numbers in the columns indicate the number of patients. ER, excellent response; IR, indeterminate response; BIR, biochemical incomplete response; SIR, structural incomplete response.

treatment ($P=0.006$), probably due to more advanced disease in pediatric patients. Later, improvement was demonstrable in both cohorts and response to treatment became similar in both groups. Ten years after surgery, more pediatric than adult patients had an ER to treatment due to recurrences in the adult group.

Response to treatment was also compared between *RET* fusion and *NTRK* fusion-positive patients (Fig. 4B). Data on *NTRK* fusion-positive patients were used from our previous study (Pekova *et al.* 2021). In the first 2 years after surgery, a significantly lower percentage of *RET* fusion-positive patients than *NTRK* fusion-positive patients had an ER to treatment ($P=0.023$). Ten years after surgery, no *NTRK* fusion-positive patient had SIR to treatment, in contrast to 19% of *RET* fusion-positive patients.

Discussion

Thyroid cancer is associated with a broad range of different mutations, including *RET* fusion genes. Previously, the frequency of *RET* fusion genes included only the most common *CCDC6/RET* and *NCOA4/RET* fusions, and other *RET* fusions were rarely tested. To our knowledge, this is one of the most comprehensive studies of a *RET* fusion-positive cohort of thyroid carcinomas that has been analyzed and correlated with clinicopathological and follow-up data.

The frequency of *RET* fusion genes in our adult PTC cohort was 8.7%, which is in the range of 4.3–9.1% as previously reported (Agrawal *et al.* 2014, Lu *et al.* 2017, Liang *et al.* 2018, Yang *et al.* 2021, Shi *et al.* 2022, Ullmann *et al.* 2022, Wang *et al.* 2022, Parimi *et al.* 2023). Pediatric and adolescent PTCs harbored *RET* rearrangements more than three times more frequently than adult PTCs, in 29.8% of cases. This result is within the range of 10.4–57.7% previously published results (Ricarte-Filho *et al.* 2013, Galuppini *et al.* 2019, Pekova *et al.* 2020, Macerola *et al.* 2021, Rogounovitch *et al.* 2021, Franco *et al.* 2022, Satapathy & Bal 2022). The variability is likely due to the range of methods used, the size and composition of cohorts and geographic location.

Next-generation sequencing (NGS) is currently the most reliable method for detection of *RET* fusion genes. The use of a comprehensive panel for the detection of fusion genes should be the gold standard, especially in pediatric thyroid carcinomas, in which the occurrence of fusions prevails. A more cost-effective approach using mutational exclusivity of *RET* fusions

with other driver mutations could be applied in adult thyroid carcinomas. First, detection of point driver mutations in the *BRAF* and *RAS* genes would be performed. Negative samples would then be analyzed for the most common *CCDC6/RET* and *NCOA4/RET* fusions, representing approx. Eighty percent of all *RET* fusions by real-time PCR. Negative samples would undergo NGS testing, which would also allow the detection of novel fusion partner genes. To date, at least 50 *RET* partner genes have been described in thyroid cancer, and the number has been rising steeply in recent years (Agrawal *et al.* 2014, Grubbs *et al.* 2015, Yakushina *et al.* 2017, Pekova *et al.* 2020, Lee *et al.* 2021, Rogounovitch *et al.* 2021, Yang *et al.* 2021, Franco *et al.* 2022, Wang *et al.* 2022).

In this study, *RET* fusion genes were detected only in PTCs. A few rare cases of *RET* rearrangements in PDTs, in eight ATCs, and in two MTCs have been described in the literature (Grubbs *et al.* 2015, Landa *et al.* 2016, Yang *et al.* 2021, Parimi *et al.* 2023). There are also studies in which *RET* fusions have been found in benign samples, particularly in Hashimoto's thyroiditis (Wirtschafter *et al.* 1997, Sheils *et al.* 2000, Elisei *et al.* 2001). Most of these studies were performed around year 2000, when the methods used had substantial technical limitations leading to a high risk of false-positive results (Nikiforov 2006). Although no recent case of *RET* fusion in a benign thyroid sample has been reported, their presence in these tissues has been questioned (Nikiforova *et al.* 2002), the occurrence of *RET* fusions in Hashimoto's thyroiditis has been reported in recent review articles (Rangel-Pozzo *et al.* 2020, Nacchio *et al.* 2022). In our study, no *RET* fusion was detected in any of the benign samples. Based on these results we conclude that the identification of an oncogenic *RET* fusion is associated with a 100% probability of malignancy.

Coexistence of CLT with *RET* fusion-positive PTC was found in 65.2% of our cases, similarly in pediatric and adult patients. The frequency of this coexistence is higher than the range of 15–40% reported in the literature for PTC cohorts with unknown genetic background (Kim *et al.* 2009, Babli *et al.* 2018, Lee *et al.* 2020). In another study, the authors found a negative correlation between the coexistence of CLT with PTC and the *BRAF* mutation (Lee *et al.* 2020). In addition, the presence of numerous psammoma bodies was found in our study. The association between them and *RET* fusions has been previously described (Adeniran *et al.* 2006). Thus, the presence of coexisting CLT as well

as numerous psammoma bodies could indicate a higher probability of *RET* fusion gene in PTC.

Other examined clinicopathological features that were abundantly identified in *RET* fusion-positive PTCs were multifocality, extrathyroidal extension, intravascular invasion, LNM, and DM. *RET* fusion-positive carcinomas were associated with aggressive and invasive behavior. This correlation was also noticed by the authors of studies on small *RET* fusion-positive cohorts (Franco *et al.* 2022, Ullmann *et al.* 2022, Wang *et al.* 2022).

Multifocality was detected in 48.2% of *RET* fusion-positive carcinomas, which was significantly higher than in our *BRAF* V600E and *RAS*-mutated PTCs. In another study, multifocality was even found in 86% of *RET* fusion-positive PTCs (Ullmann *et al.* 2022). Most of our patients with multifocal PTC had numerous millimeter-sized intrathyroidal microcarcinomas. The frequency of these cases may have been even higher due to several cases, in which the lobes were filled with carcinomas and may have been formed by the union of multiple foci. The sensitivity of ultrasound for these clinically occult lesions is low. Thus, TTE should be considered in the case of preoperative detection of an oncogenic *RET* fusion gene in a thyroid nodule.

RET-fusion positive patients had a significantly higher incidence of LNM and DM compared to patients with *NTRK* fusions, *BRAF* V600E or *RAS* mutations. In *RET*-fusion positive patients, LNM were identified in 68.4% of adult and 89.2% of pediatric patients. Other studies reached similar results, in which 91–94% of pediatric patients with *RET* fusion-positive PTCs had LNM (Lee *et al.* 2021, Franco *et al.* 2022). In our cohort, the majority of patients had evident multiple LNM in the lateral compartment. The correlation of *RET* fusion-positive PTCs with LNM in the lateral compartment was also noted by the authors of other studies (Rogounovitch *et al.* 2021, Wang *et al.* 2022). Therefore, sonographic evaluation of the lymph nodes in the central and lateral compartments should be performed conscientiously due to the high probability of LNM regardless of tumor size.

Differences were also observed within the *RET* fusion gene cohort. PTCs positive for *NCOA4/RET* had significantly larger tumors and more frequent extrathyroidal extension. In addition, PTCs positive for the *NCOA4/RET* fusion had a tendency to be associated with more LNM and DM, although this finding was not statistically significant. The correlation between the *NCOA4/RET* fusion and higher aggressiveness has

been mentioned in other studies (Galuppini *et al.* 2019, Rogounovitch *et al.* 2021).

Follow-up data on patients with *RET* fusion-positive PTC are very scarce in the literature. In one study, 50% of *RET* fusion-positive pediatric patients achieved remission one year after surgery (Franco *et al.* 2022), a high percentage considering that 94% of patients had LNM and 35% had DM. In another study, 24% and 19% of *RET* fusion-positive pediatric patients had ER and IR/BIR to treatment, respectively, throughout follow-up. SIR to treatment had 57% of patients, of whom 14% achieved ER or biochemical disease without structural evidence of disease at last follow-up (Lee *et al.* 2021). Compared to our study, a similar proportion of patients had SIR to treatment, but significantly more of our pediatric patients achieved clinical improvement. An explanation could be more advanced disease of their patients, 38% vs our 25% patients with DM, and the shorter follow-up in their study (Lee *et al.* 2021). Follow-up data on adult *RET* fusion-positive patients are even scarcer. In one study, none of the *RET* fusion-positive patients relapsed and 2/14 (14%) patients had persistent disease (Ullmann *et al.* 2022).

Only 8.7% of our patients had RAI-refractory carcinoma, which is within the reported range of 5–15% for differentiated thyroid carcinomas (Worden 2014). Only one patient in our cohort had treatment with selpercatinib. Promising results of this type of treatment from other studies have already been published (Lee *et al.* 2021).

Despite more aggressive disease of the *RET*-fusion positive cohort, the 2.4% 'true recurrence', 2.7% cancer-specific mortality, 96% and 95% survival at 5 and 10 years were comparable to data (approximately 1% 'true recurrence', 2–2.5% mortality, 99% and 95% survival at 5 and 10 years) for PTC cohorts with unknown genetic background (Sciuto *et al.* 2009, Ito *et al.* 2018). It is important to note that the majority of patients in our cohort had intensive treatment, relatively radical surgery and many patients underwent repeated RAI therapy. In addition, the patients' condition was regularly monitored over a long period of time, which is essential for a good outcome, as recurrence can occur many years after surgery. It is questionable what the response to treatment would have been with a milder treatment (e.g. lobectomy and no RAI treatment), whether or not the recurrence and mortality rates would have been significantly higher.

A limitation of the study was that no functional analyses of the novel *RET* fusions were performed. However, the portion encoding the *RET* kinase domain was retained intact in all novel *RET* fusions. In addition, all partner genes contained domains enabling dimerization required for oncogenic activation, the *ZMYM2* gene encodes a zing finger protein, the *SSBP2* gene encodes a tumor suppressor protein containing a LisH domain and the *FBOX41* gene encodes an F-box protein containing leucine-rich repeats.

In summary, *RET* fusion genes were detected in 11.4% of PTC patients; in 8.7% of adult and 29.8% of pediatric patients with PTC. *RET* fusion-positive carcinomas were associated with aggressive disease, including frequent LNM and DM, especially in cases of *NCOA4/RET*-positive carcinomas, even in early-stage disease, and with increased rates in pediatric and adolescent patients. The presence of the *RET* fusion gene could be indicated by the occurrence of CLT and numerous psammoma bodies. In case of preoperative detection of the *RET* fusion gene, malignancy should be expected, and a high probability of metastases should be anticipated. Recurrences were rare and occurred only in adult patients. Although most patients did not achieve remission soon after surgery and half of the pediatric patients had structural disease in the first 2 years after surgery, the prognosis was favorable from a long-term perspective, but with regular follow-up.

Supplementary materials

This is linked to the online version of the paper at <https://doi.org/10.1530/ERC-23-0117>.

Declaration of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic AZV (NU21-01-00448) and MH CZ-DRO (Institute of Endocrinology, 00023761) grants.

References

Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW & Nikiforov YE 2006 Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *American Journal of Surgical Pathology* **30** 216–222. (<https://doi.org/10.1097/01.pas.0000176432.73455.1b>)

Arighi E, Borrello MG & Sartiola H 2005 *RET* tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **16** 441–467. (<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.05.010>)

Babli S, Payne RJ, Mitmaker E & Rivera J 2018 Effects of chronic lymphocytic thyroiditis on the clinicopathological features of papillary thyroid cancer. *European Thyroid Journal* **7** 95–101. (<https://doi.org/10.1159/000486367>)

Bongarzone I, Monzini N, Borrello MG, Carcano C, Ferraresi G, Arighi E, Mondellini P, Della Porta G & Pierotti MA 1993 Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of *ret* tyrosine kinase and the regulatory subunit R1 alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Molecular and Cellular Biology* **13** 358–366. (<https://doi.org/10.1128/mcb.13.1.358-366.1993>)

Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, Asa SL, Auman JT, Balasundaram M, Balu S & Baylín SB 2014 Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* **159** 676–690. (<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>)

Elisei R, Romei C, Vrontosova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, Basolo F, Demidchik EP, Miccoli P, Pinchera A, *et al.* 2001 *RET/PTC* rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 3211–3216. (<https://doi.org/10.1210/jcem.86.7.7678>)

Franco AT, Ricarte-Filho JC, Isaza A, Jones Z, Jain N, Mostoufi-Moab S, Surrey L, Laetsch TW, Li MM, DeHart JC, *et al.* 2022 Fusion oncogenes are associated with increased metastatic capacity and persistent disease in pediatric thyroid cancers. *Journal of Clinical Oncology* **40** 1081–1090. (<https://doi.org/10.1200/JCO.21.01861>)

Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA, Porta GD & Vecchio G 1987 A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature* **328** 170–172. (<https://doi.org/10.1038/328170a0>)

Galuppini F, Vianello F, Censi S, Barollo S, Bertazza L, Carducci S, Colato C, Manso J, Ruggie M, Iacobone M, *et al.* 2019 Differentiated thyroid carcinoma in pediatric age: genetic and clinical scenario. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* **10** 552. (<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00552>)

Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, Pierotti MA, Della Porta G, Fusco A & Vecchiet G 1990 PTC is a novel rearranged form of the *RET* proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* **60** 557–563. ([https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90659-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90659-3))

Grubbs EG, Ng PK, Bui J, Busaidy NL, Chen K, Lee JE, Lu X, Lu H, Meric-Bernstam E, Mills GB, *et al.* 2015 *RET* fusion as a novel driver of medullary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **100** 788–793. (<https://doi.org/10.1210/jc.2014-4153>)

Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, *et al.* 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* **26** 1–133. (<https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>)

Ito Y, Miyauchi A, Kihara M, Fukushima M, Higashiyama T & Miya A 2018 Overall survival of papillary thyroid carcinoma patients: a single-institution long-term follow-up of 5897 patients. *World Journal of Surgery* **42** 615–622. (<https://doi.org/10.1007/s00268-018-4479-z>)

Kim EY, Kim WG, Kim WB, Kim TY, Kim JM, Ryu JS, Hong SJ, Gong G & Shong YK 2009 Coexistence of chronic lymphocytic thyroiditis is associated with lower recurrence rates in patients with papillary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology* **71** 581–586. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03537.x>)

Landa I, Ibrahimipasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, Dogan S, Ricarte-Filho JC, Krishnamoorthy GP, Xu B, *et al.* 2016 Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic

<https://erc.bioscientifica.com>
<https://doi.org/10.1530/ERC-23-0117>

© 2023 the author(s)
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain



This work is licensed under a Creative Commons
Attribution 4.0 International License.
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

- thyroid cancers. *Journal of Clinical Investigation* **126** 1052–1066. (<https://doi.org/10.1172/JCI185271>)
- Lee I, Kim HK, Soh EY & Lee J 2020 The association between chronic lymphocytic thyroiditis and the progress of papillary thyroid cancer. *World Journal of Surgery* **44** 1506–1513. (<https://doi.org/10.1007/s00268-019-05337-9>)
- Lee YA, Lee H, Im SW, Song YS, Oh DY, Kang HJ, Won JK, Jung KC, Kwon D, Chung EJ, *et al.* 2021 NTRK and RET fusion-directed therapy in pediatric thyroid cancer yields a tumor response and radioiodine uptake. *Journal of Clinical Investigation* **131** e144847. (<https://doi.org/10.1172/JCI144847>)
- Liang J, Cai W, Feng D, Teng H, Mao F, Jiang Y, Hu S, Li X, Zhang Y, Liu B, *et al.* 2018 Genetic landscape of papillary thyroid carcinoma in the Chinese population. *Journal of Pathology* **244** 215–226. (<https://doi.org/10.1002/path.5005>)
- Lu Z, Zhang Y, Feng D, Sheng J, Yang W & Liu B 2017 Targeted next generation sequencing identifies somatic mutations and gene fusions in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget* **8** 45784–45792. (<https://doi.org/10.18632/oncotarget.17412>)
- Macerola E, Proietti A, Poma AM, Ugolini C, Torregrossa L, Vignali P, Basolo A, Materazzi G, Elisei R, Santini F, *et al.* 2021 Molecular alterations in relation to histopathological characteristics in a large series of pediatric papillary thyroid carcinoma from a single institution. *Cancers* **13** 3123. (<https://doi.org/10.3390/cancers13133123>)
- Markham A 2020a Pralsetinib: first approval. *Drugs* **80** 1865–1870. (<https://doi.org/10.1007/s40265-020-01427-4>)
- Markham A 2020b Selpercatinib: first approval. *Drugs* **80** 1119–1124. (<https://doi.org/10.1007/s40265-020-01343-7>)
- Nacchio M, Pisapia P, Pepe F, Russo G, Vignali E, Porcelli T, Luongo C, Iaccarino A, Pagni F, Salvatore D, *et al.* 2022 Predictive molecular pathology in metastatic thyroid cancer: the role of RET fusions. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism* **17** 167–178. (<https://doi.org/10.1080/17446651.2022.2060819>)
- Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H & Fagin JA 1997 Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Research* **57** 1690–1694.
- Nikiforov YE 2006 RET/PTC Rearrangement—a link between Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer...or not. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91** 2040–2042. (<https://doi.org/10.1210/jc.2006-0791>)
- Nikiforov YE 2011 Molecular analysis of thyroid tumors. *Modern Pathology* **24**(Supplement 2) S34–S43. (<https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.167>)
- Nikiforova MN, Caudill CM, Biddinger P & Nikiforov YE 2002 Prevalence of RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas. *International Journal of Surgical Pathology* **10** 15–22. (<https://doi.org/10.1177/106689690201000104>)
- Parimi V, Tolba K, Danziger N, Kuang Z, Sun D, Lin DI, Hiemenz MC, Schrock AB, Ross JS, Oxnard GR, *et al.* 2023 Genomic landscape of 891 RET fusions detected across diverse solid tumor types. *npj Precision Oncology* **7** 10. (<https://doi.org/10.1038/s41698-023-00347-2>)
- Pekova B, Dvorakova S, Sykorova V, Vacinova G, Vaclavikova E, Moravcova J, Katra R, Vlcek P, Sykorova P, Kodetova D, *et al.* 2019 Somatic genetic alterations in a large cohort of pediatric thyroid nodules. *Endocrine Connections* **8** 796–805. (<https://doi.org/10.1530/EC-19-0069>)
- Pekova B, Sykorova V, Dvorakova S, Vaclavikova E, Moravcova J, Katra R, Astl J, Vlcek P, Kodetova D, Vcelak J, *et al.* 2020 RET, NTRK, ALK, BRAF, and MET fusions in a large cohort of pediatric papillary thyroid carcinomas. *Thyroid* **30** 1771–1780. (<https://doi.org/10.1089/thy.2019.0802>)
- Pekova B, Sykorova V, Mastrikova K, Vaclavikova E, Moravcova J, Vlcek P, Lastuvka P, Taudy M, Katra R, Bavor P, *et al.* 2021 NTRK fusion genes in thyroid carcinomas: clinicopathological characteristics and their impacts on prognosis. *Cancers* **13** 1932. (<https://doi.org/10.3390/cancers13081932>)
- Rangel-Pozzo A, Sisdelli L, Cordioli MTV, Vatsman F, Caria P, Mai S & Cerutti JM 2020 Genetic landscape of papillary thyroid carcinoma and nuclear architecture: an overview comparing pediatric and adult populations. *Cancers* **12** 3146. (<https://doi.org/10.3390/cancers12113146>)
- Ricarte-Filho JC, Li S, Garcia-Rendueles ME, Montero-Conde C, Voza E, Knauf JA, Heguy A, Viale A, Bogdanova T, Thomas GA, *et al.* 2013 Identification of kinase fusion oncogenes in post-Chernobyl radiation-induced thyroid cancers. *Journal of Clinical Investigation* **123** 4935–4944. (<https://doi.org/10.1172/JCI69766>)
- Rogounovitch TI, Mankovskaya SV, Fridman MV, Leonova TA, Kondratovitch VA, Konoplya NE, Yamashita S, Mitsutake N & Saenko VA 2021 Major oncogenic drivers and their clinicopathological correlations in sporadic childhood papillary thyroid carcinoma in Belarus. *Cancers* **13** 3374. (<https://doi.org/10.3390/cancers13133374>)
- Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M, Pierotti MA, Vecchio G & Fusco A 1994 Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* **9** 509–516.
- Santoro M, Moccia M, Federico G & Carlomagno F 2020 RET gene fusions in malignancies of the thyroid and other tissues. *Genes* **11** 424. (<https://doi.org/10.3390/genes11040424>)
- Satpathy S & Bal C 2022 Genomic landscape of sporadic pediatric differentiated thyroid cancers: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* **35** 749–760. (<https://doi.org/10.1515/jpem-2021-0741>)
- Sciuto R, Romano L, Rea S, Marandino E, Sperduti I & Maini CL 2009 Natural history and clinical outcome of differentiated thyroid carcinoma: a retrospective analysis of 1503 patients treated at a single institution. *Annals of Oncology* **20** 1728–1735. (<https://doi.org/10.1093/annonc/mdp050>)
- Shells OM, O'Eary JJ, Uhlmann V, Lattich K & Sweeney EC 2000 Ret/PTC-1 activation in Hashimoto thyroiditis. *International Journal of Surgical Pathology* **8** 185–189. (<https://doi.org/10.1177/10668969000800305>)
- Shi M, Wang W, Zhang J, Li B, Lv D, Wang D, Wang S, Cheng D & Ma T 2022 Identification of RET fusions in a Chinese multicancer retrospective analysis by next-generation sequencing. *Cancer Science* **113** 308–318. (<https://doi.org/10.1111/cas.15181>)
- Tuttle RM, Ahuja S, Avram AM, Berner VJ, Bourguet P, Daniels GH, Dillehay G, Draganescu C, Flux G, Führer D, *et al.* 2019 Controversies, consensus, and collaboration in the use of 131I therapy in differentiated thyroid cancer: a joint statement from the American Thyroid Association, the European Association of Nuclear Medicine, the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, and the European Thyroid Association. *Thyroid* **29** 461–470. (<https://doi.org/10.1089/thy.2018.0597>)
- Ullmann TM, Thiesmeyer JW, Lee YJ, Beg S, Mosquera JM, Elemento O, Fahey TJ, Scognamiglio T & Houvras Y 2022 RET fusion-positive papillary thyroid cancers are associated with a more aggressive phenotype. *Annals of Surgical Oncology* **29** 4266–4273. (<https://doi.org/10.1245/s10434-022-11418-2>)
- Wang Z, Tang P, Hua S, Gao J, Zhang B, Wan H, Wu Q, Zhang J & Chen G 2022 Genetic and clinicopathologic characteristics of papillary thyroid carcinoma in the Chinese population: high BRAF mutation allele frequency, multiple driver gene mutations, and RET fusion may indicate more advanced TN stage. *Oncotargets and Therapy* **15** 147–157. (<https://doi.org/10.2147/OTT.S339114>)
- Wirtschafer A, Schmidt R, Rosen D, Kundu N, Santoro M, Fusco A, Mulhaupt H, Atkins JP, Rosen MR, Keane WM, *et al.* 1997 Expression of the RET/PTC fusion gene as a marker for papillary carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. *Laryngoscope* **107** 95–100. (<https://doi.org/10.1097/00005537-199701000-00019>)

Worden F 2014 Treatment strategies for radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **6** 267–279. (<https://doi.org/10.1177/1758834014548188>)
Yakushina VD, Lerner LV & Lavrov AV 2017 Gene fusions in thyroid cancer. *Thyroid* **28** 158–167. (<https://doi.org/10.1089/thy.2017.0318>)

Yang SR, Aypar U, Rosen EY, Mata DA, Benayed R, Mullaney K, Jayakumaran G, Zhang Y, Frosina D, Drilon A, *et al.* 2021 A performance comparison of commonly used assays to detect RET fusions. *Clinical Cancer Research* **27** 1316–1328. (<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3208>)

Received 18 April 2023

Accepted 28 September 2023

Available online 28 September 2023

Version of Record published 26 October 2023

Supplementary Table S1. Sequences of primers and hydrolysis probes designed for the ACTB gene and the RET fusion genes detection using Real-Time PCR

Gene	Primer/probe	Sequences	Location
ACTB	primer	F: TCTACAATGAGCTGCGTGTG	Exon 3
	primer	R: AGCCTGGATAGCAACGTACA	Exon 4
	probe	HEX-CAAGGCCAACCCGCGAGAAGA	Exon 3
Gene fusion	Primer/probe	Sequences	Location
CCDC6/RET	primer	F: GCAAAGCCAGCGTTACCAT	Exon 1
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
NCOA4/RET	primer	F: GCAGACCTTGAGAACAGTCA	Exon 7
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
PAX8/PPAR γ	primer	F: TCGACTCACCAGACCTACCC	Exon 8
	primer	F: GTGTACGGGCAGTTCACG	Exon 9
	primer	F: CTATGCCTCTCTGCCATC	Exon 10
	primer	R: GAGAGATCCACGGAGCTGAT	Exon 2
	probe	FAM-GAGATGCCATTCTGGCCACC	Exon 2
ACBD5/RET	primer	F: TCCTCAGCCACCTCACA	Exon 11
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
AFAP1L2/RET	primer	F: GTCATCAAGGACAACAGGCTTC	Exon 6
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
AKAP13/RET	primer	F: CAGACAGAACGGGACCTGTG	Exon 35
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
BBIP1/RET	primer	F: GGTAATACCGGTTGGATGCT	Exon 2
	primer	R: CTGGGCTCCCCAACAGGCAG	Exon 8
	probe	FAM-TCTCCTTGCCTCCACTCACA	Exon 8
ERC1/RET	primer	F: CTCAACGACAGCTCTCAGCA	Exon 12
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
FBXO41/RET	primer	F: AAGGCCCTACTGCCTTCAAC	Exon 10
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
GOLGA5/RET	primer	F: TGGGCCAGATACATCAGCTC	Exon 7
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
IKBK/RET	primer	F: GCACAAGATTGTGATGGAGACC	Exon 7
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
KIAA1217/RET	primer	F: GCTTTCCTCTGCGTCAAGT	Exon 11
	primer	R: CTGGGCTCCCCAACAGGCAG	Exon 8
	probe	FAM-TCTCCTTGCCTCCACTCACA	Exon 8
PRKAR1A/RET	primer	F: CATCGACCGAGACAGCTATAGAA	Exon 7
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
RASAL2/RET	primer	F: TGCAAGCAGTTATTGATGCAAA	Exon 15
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
RUFY2/RET	primer	F: TGAAAACACAGCAGCACCTAGA	Exon 9
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
SPECC1L/RET	primer	F: AAAGACACTCCACAGAAGACTTCG	Exon 7
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
SQSTM1/RET	primer	F: TGAGAAAGATCGCTTGGAGT	Exon 6
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
SSBP2/RET	primer	F: CAAACCAACAAATGCCAAT	Exon 10
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
TPR/RET	primer	F: GAGGTGGAACAAAGGCATACAC	Exon 20
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
TRIM27/RET	primer	F: ACCAGGGAGCTCCTGCAG	Exon 3
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12
ZMYM2/RET	primer	F: TTCTATGCACATGTACAGTCAGAA	Exon 17
	primer	R: TTCCAAATTCGCCTTCTCCT	Exon 12
	probe	FAM-CCAAAGTGGGAATTCCTCGG	Exon 12

Supplementary Table S2. Isoforms and transcripts of genes involved in *RET* rearrangements

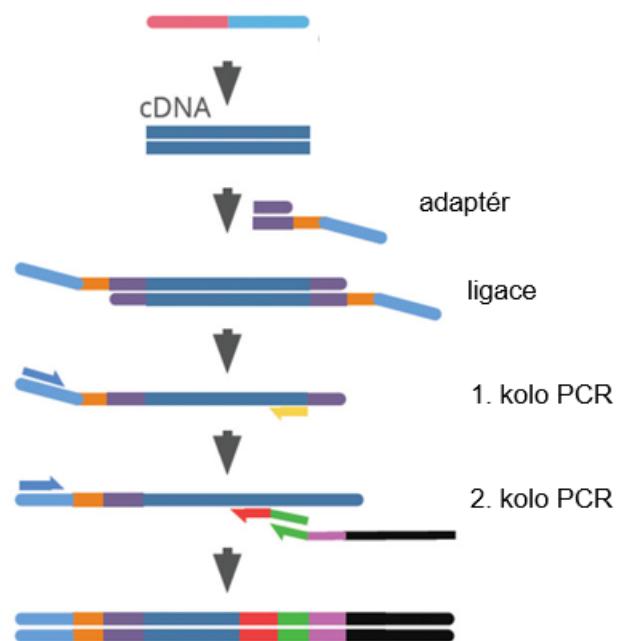
Gene	Exon	Transcript	Gene	Exon	Transcript
<i>ACBD5</i>	11	NM_145698.5	<i>RET</i>	12	NM_020630.4
<i>AFAP1L2</i>	6	NM_032550.2		12	
<i>AKAP13</i>	35	NM_006738.5		12	
<i>BBIP1</i>	2	NM_1195305.3		8	
<i>CCDC6</i>	1	NM_005436.4		12	
<i>CCDC6</i>	1	NM_005436.4		11	
<i>CCDC6</i>	1	NM_005436.4		11+12	
<i>CCDC6</i>	1	NM_005436.4		9	
<i>ERC1</i>	12	NM_178039.3		12	
<i>FBXO41</i>	10	NM_001080410.2		12	
<i>GOLGA5</i>	7	NM_005113.3		12	
<i>IKBKG</i>	7	NM_003639.4		12	
<i>KIAA1217</i>	11	NM_019590.4		8	
<i>NCOA4</i>	6	NM_005437.3		12	
<i>NCOA4</i>	7	NM_005437.3		12	
<i>PRKAR1A</i>	7	NM_002734.4		12	
<i>RASAL2</i>	15	NM_004841.3		12	
<i>RUFY2</i>	9	NM_017987.4		12	
<i>SPECC1L</i>	7	NM_15330.4		12	
<i>SQSTM1</i>	6	NM_003900.4		12	
<i>SSBP2</i>	10	NM_012446.4		12	
<i>TPR</i>	20	NM_003292.2		12	
<i>TRIM27</i>	3	NM_006510.4		12	
<i>ZMYM2</i>	17	NM_003453.4		12	

3.5 Propojující text mezi publikacemi

V rámci první studie zahrnující soubor 83 PTC a 30 benigních nádorů štítné žlázy dětských a dospívajících pacientů jsme kauzální mutaci identifikovali u 42 % pacientů s PTC. Nejčastěji (22 %) se jednalo o *RET/PTC1* nebo *RET/PTC3* fúzní gen. Druhá nejčastější mutace byla *BRAF V600E* u 18 % pacientů s PTC. *RAS* mutace se překvapivě vyskytovaly častěji u benigních uzlů než u PTC.

Na základě častého záchytu dvou typů fúzních genů jsme se rozhodli na souboru provést RNA sekvenaci za účelem detekce případných dalších typů fúzních genů. Soubor vzorků PTC dětských a dospívajících pacientů se nám mezitím podařilo rozšířit o dalších 10 vzorků na celkových 93. Na přípravu knihoven byly zvoleny dva panely, QIAseq Targeted RNAscan Panel (Qiagen) a FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung Kit (ArcherDx), které umožňují detekci i dosud nepopsaných fúzních genů, a to na základě metodiky nazývané Anchored Multiplex PCR (Obr. 7). Princip metodiky je následující. Po úpravě konců cDNA

jsou na ni navázány adaptéry, které obsahují tři různé sekvence: index, unikátní molekulární sekvenci a univerzální sekvenci. Během prvního kola PCR jsou použity forward primery komplementární k univerzální sekvenci na adaptéru a cílené reverse primery na určitý onkogen (např. *RET*, *NTRK*, *ALK*). U druhého kola PCR byly opět použity forward primery komplementární k univerzální sekvenci na adaptéru a druhé genově-specifické reverse primery, na které ještě nasedaly další primery obsahující sekvenci druhých indexů a unikátní molekulární sekvenci. Díky možnosti použití univerzálního primeru je možné sekvenovat úsek, jehož sekvenci neznáme a pomocí bioinformatické analýzy zjistit, o jakou část genu se jedná.



Obrázek 7. Anchored Multiplex PCR technologie umožňující detekovat dosud nepopsané fúzní geny. Převzato a upraveno z <https://www.dlongwood.com/>

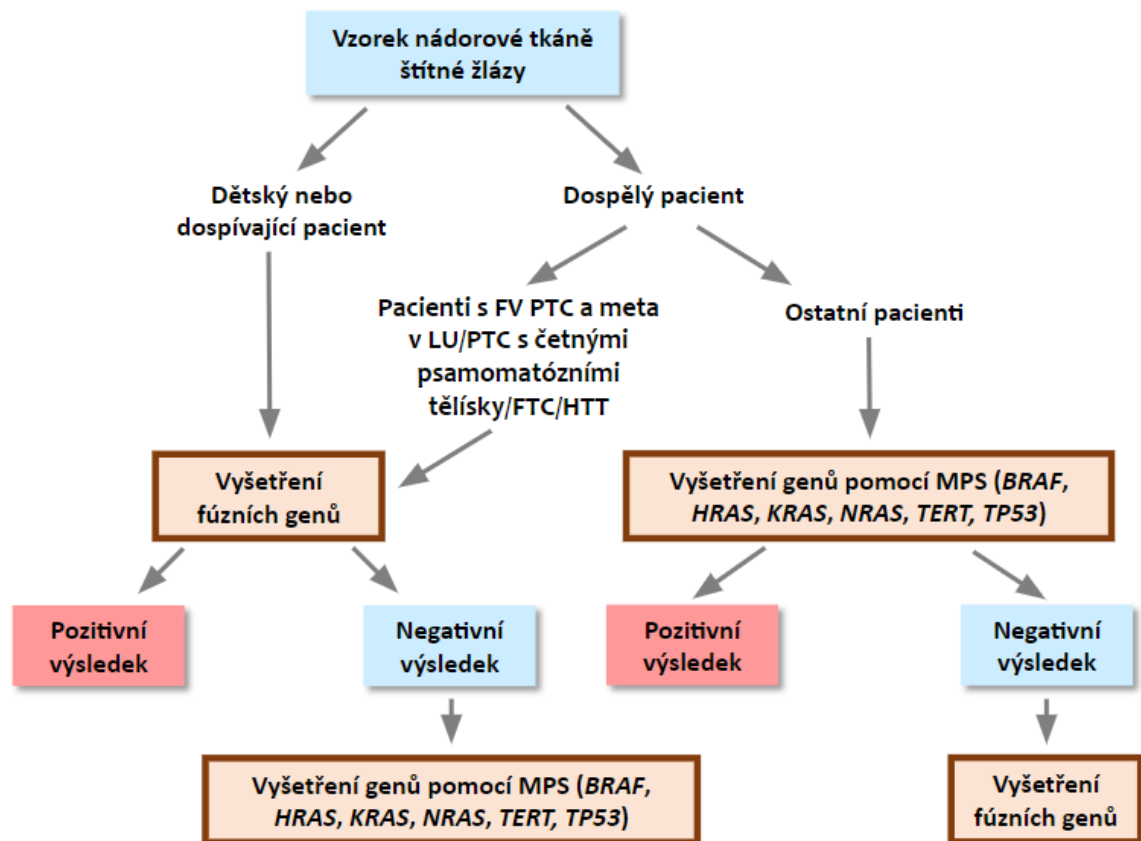
RNA sekvenaci jsme provedli u všech 93 vzorků PTC dětských a dospívajících pacientů. Významným zjištěním bylo, že 56 % vzorků bylo pozitivních na fúzní gen. Celkem jsme detekovali 20 typů fúzních genů, z nichž pět nebylo dosud popsáných, a jeden nebyl do té doby popsán u karcinomů štítné žlázy. Všechny pozitivní nálezy bylo nutné verifikovat jinou metodou. Navrhla jsem proto primery a hydrolyzační sondy na každý typ fúzního genu a všechny pozitivní vzorky ověřila pomocí real-time PCR. Vzhledem k tomu, že jsem zoptimalizovala tuto možnost analýzy, zavedla jsem vyšetření fúzních genů do rutinní praxe. U předoperačních i pooperačních vzorků štítné žlázy testujeme po analýze bodových mutací

v hlavních genech (*BRAF*, *RAS*) i přítomnost různých fúzních genů a u vzorků od dětských a dospívajících pacientů je kvůli jejich vyšší četnosti testujeme primárně.

Dalším z hlavních výstupů publikace č. 2 bylo zjištění, že pediatričtí pacienti, kteří měli karcinom pozitivní na fúzní gen, měli agresivnější a invazivnější onemocnění než pacienti, kteří měli karcinom na fúzní geny negativní. *RET* fúzní geny byly dokonce významně asociovány s častějšími lokálními a distálními metastázami oproti *NTRK* fúzním genům. Zajímalo nás, jak se tyto nejčastější fúzní geny projevují u dospělých pacientů a také i u jiných typů karcinomů než u PTC. Některé publikace popisovaly tyto fúzní geny i u MTC, PDTC, OCA a ATC (Grubbs et al., 2015; Landa et al., 2016; van der Tuin et al., 2019). Díky tomu, že máme v laboratoři archivovaný rozsáhlý soubor různých typů karcinomů štítné žlázy od dospělých pacientů shromažďovaných od roku 2003, rozhodli jsme se jej zanalyzovat na přítomnost *RET* a *NTRK* fúzních genů.

Soubor jsme nejprve začali analyzovat na *NTRK* fúzní geny, protože byl na ně upřen celosvětový zájem. V roce 2019, rok předtím, než vznikla publikace č. 2, bylo schváleno Evropskou lékovou agenturou použití cíleného tyrozinkinázového inhibitoru (TKI) larotrectinibu určeného pro nádory pozitivní na *NTRK* fúzní gen (Scott, 2019). Pro detekci *NTRK* fúzních genů bylo nutné zanalyzovat rozsáhlý soubor vzorků PTC, FTC, OCA, MTC, PDTC, ATC. Vzhledem k jejich vysokému počtu jsme nemohli analýzu provést pomocí panelu s Anchored Multiplex PCR technologií, jelikož tato komplexní analýza je velice nákladná. Na základě naší studie č. 2 jsme zjistili, že se fúzní geny vyskytovaly ve všech případech exkluzivně, v žádném ze vzorků pozitivním na fúzní gen nebyly zjištěny další kauzální mutace jiných genů (např. *BRAF*, *RAS*). Toto naše zjištění bylo podpořeno i údaji v literatuře (Agrawal et al., 2014; Parimi et al., 2023; van der Tuin et al., 2019). Pouze v ojedinělých případech byl v literatuře zaznamenán společný výskyt dvou kauzálních mutací (Leeman-Neill et al., 2014). Soubor vzorků karcinomů štítné žlázy jsme podrobili analýze mutací následujících genů: *BRAF*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *RET* a fúzních genů: *RET/PTC1*, *RET/PTC3* a *PAX8/PPAR γ* . Vzorky, které byly negativní na přítomnost kauzální mutace, jsme analyzovali pomocí *NTRK* Gene Fusions Detection Kit (AmoyDx) za využití real-time PCR a FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung Kitu za využití masivně paralelního sekvenování. Všechny pozitivní nebo hraniční nálezy z *NTRK* Gene Fusions Detection Kitu jsme ověřovali pomocí FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung Kitu. *NTRK* fúzní geny jsme úspěšně detekovali u 59 vzorků karcinomů štítné žlázy. Veškeré pozitivní nálezy jsme verifikovali pomocí navržených primerů a hydrolyzačních sond pomocí analýzy real-time PCR. Navržené primery a sondy jsme uplatnili

v naší rutinní analýze vzorků (Obr. 8). Nejprve analyzujeme geny na přítomnost bodových mutací a v případě negativního výsledku přistupujeme k detekci nejčastějších fúzních genů pomocí real-time PCR. Pokud u odoperovaných nádorových vzorků ani po této analýze nenalezneme mutaci, pokračujeme s RNA sekvenací pomocí FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung Kitu. U vzorků se specifickými histologickými rysy a vzorků od dětských a dospívajících pacientů přistupujeme k analýze fúzních genů ještě před analýzou bodových mutací.



Obrázek 8. Schéma vyšetření nádorových vzorků štítné žlázy používané v naší laboratoři. FTC folikulární karcinom štítné žlázy, FV folikulární varianta (subtyp), HTT hyalinizující trabekulární tumor, MPS masivně paralelní sekvenování, PTC papilární karcinom štítné žlázy

V roce 2021, kdy jsme publikovali článek č. 3 o *NTRK* fúzních genech bylo schváleno Evropskou lékovou agenturou cílené léčivo pro *RET* mutované nádory, TKI selpercatinib (Markham, 2020). Vzhledem k možnosti nové terapie zesílil celosvětový zájem o nádory pozitivní na *RET* mutace a jejich léčbě. O MTC s aktivačními bodovými mutacemi *RET* genu bylo publikováno již mnoho studií (Figlioli et al., 2013). Co se ale týče *RET* fúzních genů, byly popsány malé kohorty převážně dětských pacientů s PTC a publikace se většinou věnovaly pouze dvěma nejčastějším typům *RET* fúzních genů – *RET/PTC1* a *RET/PTC3*. Tato fakta nás

podnítila k provedení komplexní studie týkající se *RET* fúzních genů u pediatrických a dospělých pacientů. Provedli jsme analýzu rozsáhlého souboru vzorků PTC, FTC, OCA, MTC, PDTC, ATC. Podobně jako u publikace č. 3 jsme nejprve z analýzy vyloučili vzorky pozitivní na kauzální mutaci. Dále jsme vzorky analyzovali na přítomnost *RET/PTC1* a *RET/PTC3* fúzních genů. Zbýlý soubor vzorků negativních na přítomnost kauzální mutace jsme analyzovali na další *RET* fúzní geny pomocí FusionPlex Comprehensive Thyroid and Lung Kitu a masivně paralelního sekvenování. *RET* fúzní geny jsme úspěšně detekovali u 113 pacientů, 76 dospělých a 37 dětských a dospívajících pacientů.

4 Diskuze

Jedním z hlavních poznatků této dizertační práce bylo zjištění, že nejčastější genetickou změnou u PTC dětských a dospívajících pacientů jsou fúzní geny vyskytující se v 52/93 (56 %) případech. Tak vysoký záchyt fúzních genů v době publikace byl poměrně unikátní, protože v porovnání s jinými studiemi se jedná o vyšší frekvenci, než bývalo u sporadických PTC dětských a dospívajících pacientů detekováno. V literatuře byly fúzní geny popisovány u 24-49 % případů (Cordioli et al., 2016; Mostoufi-Moab et al., 2017; Nikita et al., 2015; Prasad et al., 2016; Ricarte-Filho et al., 2013). Výjimkou byly studie prováděné před mnoha lety za využití starších a již nepoužívaných metodik, které často dokázaly zachytit jen nejčastější typy fúzních genů nebo naopak měly vyšší podíl falešně pozitivních záchytů a mohl tak být ovlivněn celkový záchyt.

Přítomnost *RET* fúzních genů byla dříve dávána do souvislosti s radiačně indukovanými PTC. *RET* fúzní geny jsme v našem souboru pediatrických PTC detekovali ve 30 % případů. Žádný z pacientů s PTC pozitivním na jakýkoliv typ fúzního genu nebyl před diagnózou PTC vystaven ionizujícímu záření, jednalo se o sporadické případy PTC. V roce 1995 vznikly dvě studie zabývající se genetickým pozadím karcinomů štítné žlázy dětských pacientů, kteří byli v kontaminované oblasti v době havárie Černobylské elektrárny roku 1986. U těchto pacientů byly *RET* fúzní geny detekovány shodně v 67 % (Fugazzola et al., 1995; Klugbauer et al., 1995). Nicméně, soubory pacientů byly velice omezené, o šesti a 12 jedincích. Na základě těchto studií vznikla pracovní skupina, která si dala za cíl porovnat genetický profil radiačně indukovaných pediatrických PTC se sporadickými PTC. V roce 1997 vyšla publikace, kde *RET* fúzní gen identifikovali u 87 % radiačně indukovaných a 71 % sporadických pediatrických PTC (Nikiforov et al., 1997). Jedná se o poměrně odlišný záchyt než v naší studii, avšak je nutné podotknout, že v době vzniku výše zmíněné publikace byly používány nepřesné molekulárně genetické metody. O čtyři roky později vznikla obdobná studie, ve které byly *RET* fúzní geny zachyceny u 76 % radiačně indukovaných a 40 % sporadických případů (Elisei et al., 2001). Jak již bylo zmíněno v úvodu, *RET* fúzní gen byla jedna z prvních odhalených genetických příčin karcinomů štítné žlázy, proto jsou prvotní studie zaměřené pouze na *RET* fúzní geny.

Průlomová publikace, která vznikla v roce 2013, porovnává opět kohorty radiačně indukovaných (n = 26) a sporadických (n = 27) PTC dětských a dospívajících pacientů, ale kromě *RET* fúzních genů byly vyšetřeny i další genetické změny. Frekvence *RET* fúzních genů je u obou kohort nižší než u výše zmíněných článků, možným vysvětlením může být použití odlišné metodiky – RNA sekvenace. *RET* fúzní geny u radiačně indukovaných PTC byly

detekovány v 58 % a u sporadických PTC v 26 % případů (Ricarte-Filho et al., 2013). Záchyt u sporadických PTC (26 %) je podobný jako u našeho souboru (30 %).

Dalšími fúzními geny, popsány u PTC, byly *NTRK* fúzní geny. Ricarte-Filho et al. v roce 2013 jako první u karcinomů štítné žlázy popsali fúzní gen *ETV6/NTRK3*, který je nejčastějším *NTRK* fúzním genem. Detekovali jej s téměř stejnou frekvencí (8 a 7 %) v kohortě radiačně indukovaných a sporadických pediatrických PTC. U kohorty radiačně indukovaných PTC navíc identifikovali *TPR/NTRK1* fúzní gen, který jsme v našem dětském souboru nenalezli, ale jeden případ jsme odhalili u dospělého pacienta s PTC (Ricarte-Filho et al., 2013). Celkově jsme *NTRK* fúzní geny v našem dětském souboru detekovali s vyšším výskytem (16 %).

Mutaci *BRAF* V600E Ricarte-Filho et al. našli u 26 % sporadických pediatrických PTC, což je více v porovnání s námi detekovanými 19 % (Ricarte-Filho et al., 2013). Frekvence *BRAF* V600E mutace v souborech dětských pacientů s PTC výrazně kolísá, v literatuře se většinou pohybuje mezi 16 a 63 % (Alzahrani et al., 2016; Henke et al., 2014; Prasad et al., 2016; Sisdelli et al., 2019). Na rozdílnou frekvenci *BRAF* V600E má pravděpodobně vliv geografický původ vzorku, velikost studované kohorty a nastavení věkové hranice. *BRAF* V600E u našeho souboru korelovala s klasickým subtypem PTC a vyšším věkem dětských a dospívajících pacientů, než tomu bylo u pacientů s PTC pozitivních na *RET* fúzní gen. Tato zjištění byla nalezena i v jiných publikacích (Lee et al., 2021; Prasad et al., 2016).

Dalšími hlavními genetickými změnami u PTC jsou mutace v *RAS* genech. *RAS* mutaci, konkrétně *NRAS* Q61R Ricarte-Filho et al. identifikovali u 2/27 (7 %) jedinců se sporadickým pediatrickým PTC (Ricarte-Filho et al., 2013). V našem souboru jsme *RAS* mutaci našli také u 2 z 93 (2 %) případů, konkrétně *HRAS* Q61K a *NRAS* Q61K. Podobný záchyt *RAS* mutací představil Alzahrani et al. ve své publikaci čítající 79 dětských pacientů s PTC. Detekoval dvě *NRAS* mutace, konkrétně Q61R a Q61K (3%) (Alzahrani et al., 2016). Třebaže tato studie zahrnovala vysoký počet vzorků pediatrických PTC, měla velkou nevýhodu v použitém genetickém materiálu. Jako materiál k molekulárně genetické analýze používala parafinové bločky, ze kterých nebylo možné izolovat dostatečně kvalitní RNA vhodnou k vyšetření fúzních genů. Naší velkou výhodou bylo, že jsme u pediatrických PTC jako materiál k molekulárně genetickým analýzám používali zamražené vzorky PTC, které byly po operaci uschovány při -80 °C. Z těchto vzorků jsme izolovali DNA i RNA o velice vysoké kvalitě a množství vhodném pro účely masivně paralelního sekvenování. Další nevýhodou studie od Alzahrani et al. byla analýza bodových mutací pomocí Sangerova sekvenování, u kterého je

problematické odhalení mutací o nízké alelické frekvenci. Nicméně tato studie jako jediná odhalila u pediatrického pacienta s PTC mutací *TERT* C228T (Alzahrani et al., 2016), pokud nezahrnujeme velice pochybnou studii, kde *TERT* C228T mutaci detekovali u 27 % případů pediatrických PTC (Geng et al., 2019). *TERT* mutace jsme v našem souboru nenalezli u žádného dětského nebo dospívajícího pacienta. Tyto mutace se na základě dat z literatury většinou objevují u pacientů nad 40 let a riziko jejich výskytu roste s věkem pacienta pravděpodobně kvůli zkracujícím se délkám telomér (Yang et al., 2022). Dalším překvapivým nálezem u studie Alzahrani et al. byla mutace genu *PIK3CA* detekovaná u dvou případů (Alzahrani et al., 2016). *PIK3CA* se obvykle vyskytují společně s dalšími mutacemi u pokročilých karcinomů štítné žlázy (García-Rostán et al., 2005).

ALK fúzní geny jsme detekovali u 6/93 (6 %) PTC dětských a dospívajících pacientů a ve všech případech se jednalo o *STRN/ALK* fúzní gen. Tento výsledek je možné porovnat pouze se dvěma studii, ve kterých *ALK* fúzní gen u pediatrických pacientů zachytili. V jedné publikaci našli *ALK* fúzní gen ve 3/14 (21 %) pediatrických PTC případů (Vanden Borre et al., 2017). V jiné studii dosáhli stejného výsledku jako v naší studii, kdy detekovali *ALK* fúzní gen v 6/106 (6 %) pediatrických PTC případů. Konkrétně identifikovali partnerské geny *STRN*, *EML4* a *RBMS3* u tří případů, u zbylých tří případů neodhalili, o jaký partnerský gen se jedná (Lee et al., 2021). V jednom unikátním případě byl popsán *CCDC6/ALK* fúzní gen u 10letého pacienta s MTC a distálními metastázami. Tento genetický nálezn měl vliv na změnu léčby pacienta, ze selpercatinibu na crizotinib a později na alectinib. Po šesti dnech *ALK* inhibice klesl pacientovi kalcitonin z 6703 pg/ml na 663 pg/ml (Hillier et al., 2019).

BRAF kináza může být u karcinomů štítné žlázy kromě nejčastější mutace V600E a dalších bodových změn aktivována i vznikem fúzního genu. *BRAF* fúzní geny jsme identifikovaly pouze ve 2/93 (2 %) případech dětských a dospívajících pacientů s PTC. Jednalo se o *OPTN/BRAF* a *CUL1/BRAF* fúzní geny, které v době publikace nebyly u karcinomů štítné žlázy popsány. Dříve Ricarte-Filho et al. ve své průlomové práci popsal *AKAP9/BRAF* a *AGK/BRAF* fúzní geny u radiačně indukovaných PTC dětských pacientů (Ricarte-Filho et al., 2013). *AGK/BRAF* byl poté s překvapivě vysokou frekvencí (19 %) identifikován u převážně sporadických PTC od dětských pacientů s karcinomem štítné žlázy z Brazílie (Sisdelli et al., 2019).

Velmi vzácnými fúzními geny jsou *MET* fúzní geny. *EML4/MET* fúzní gen byl poprvé popsán v naší studii a byl to také první *MET* fúzní gen, který byl u karcinomů štítné žlázy

u pediatrického pacienta vůbec publikován. Do té doby byl u karcinomů štítné žlázy identifikován pouze jeden případ *TFG/MET* fúzního genu u dospělého pacienta (Agrawal et al., 2014). Nyní jsou známy další dva případy PTC pozitivních na *MET* fúzní gen a opět se jedná o *EML4/MET* a *TFG/MET* typy fúzních genů (Chu et al., 2020). Třebaže se *ALK*, *BRAF* a *MET* fúzní geny vyskytují vzácně, má smysl na ně vzorky nádorů štítné žlázy testovat jak předoperačně, kdy mohou pomoci se stanovením diagnózy, tak i pooperačně z hlediska nastavení cílené léčby u pokročilých nebo RAI refrakterních karcinomů štítné žlázy.

Dalším významným výstupem této dizertační bylo porovnání PTC dětských a dospívajících pacientů pozitivních na fúzní gen s PTC negativními na fúzní geny. PTC, u nichž byl detekován fúzní gen, byly agresivnější povahy než PTC, u nichž fúzní gen nebyl objeven. Byla u nich častěji pozorována extratyreoidální extenze, lokální a distální metastázy, chronická lymfocytární tyreoiditida a četná psamomatózní tělíška. Pacientům s PTC pozitivním na fúzní gen bylo podáno více dávek RAI než pacientům s PTC negativním na fúzní gen. V jedné studii, která předcházela té naší, byly porovnávány PTC pozitivní na fúzní gen s PTC pozitivními na *BRAF* V600E mutaci. PTC pozitivní na fúzní gen byly asociovány s jiným histologickým subtypem než klasickým, který koreloval s mutací *BRAF* V600E. Většina PTC pozitivních na fúzní gen byla solidního subtypu. Další odlišnost byla zaznamenána ve velikosti nádoru, kdy PTC pozitivní na fúzní gen byly větší velikosti než PTC pozitivní na mutaci *BRAF* V600E. Dále u PTC pozitivních na fúzní gen byla častěji zjištěna invaze do lymfatických cév a tyreoiditida (Prasad et al., 2016). Stejný způsob porovnání byl zvolen i u jiné novější studie, kdy pediatrické PTC pozitivní na fúzní geny byly významně asociovány s nižším věkem pacientů, větší velikostí nádoru, častější extratyreoidální extenzí, přítomností metastáz v lymfatických uzlinách a na plicích a horší prognózou než PTC pozitivní na mutaci *BRAF* V600E (Lee et al., 2021). K podobným výsledkům dospěla i další novější studie, ve které byly porovnávány pediatrické PTC pozitivní na *RET/NTRK* fúzní gen s PTC pozitivními na *BRAF* V600E a *RAS* mutaci (Franco et al., 2022). Lze tedy shrnout, že PTC dětských a dospívajících pacientů pozitivních na fúzní geny jsou prokazatelně asociovány s agresivnějším chováním tumoru. Zda toto tvrzení platí i pro dospělé pacienty s PTC pozitivními na fúzní gen je zatím předmětem bádání. Nicméně studie Lu et al. tuto hypotézu potvrzuje. PTC pozitivní na fúzní geny u dospělých pacientů byly silně asociovány s přítomností metastáz, lokální invazí, větší velikostí a vyššími stádii nádoru (Lu et al., 2017).

V naší studii jsme šli více do hloubky a porovnali jsme PTC pozitivní na *RET* fúzní gen s PTC pozitivními na *NTRK3* fúzní gen. Zjistili jsme, že pacienti s PTC pozitivním na *RET* fúzní gen

mají významně častěji lokální a distální metastázy. Vzhledem k tomu, že naše studie je jediná, která se takovým porovnáním zabývala, není možné výsledky srovnat s jinými publikacemi.

Hned na počátku odhalování možných genetických příčin PTC dětských a dospívajících pacientů jsem se rozhodla zahrnout do analýzy geny, které byly s karcinomy štítné žlázy asociované v minoritních případech. Na tři takové minoritní geny upozornila velice významná publikace popisující výsledky projektu TCGA, jehož cílem bylo komplexně molekulárně geneticky analyzovat 496 vzorků PTC (Agrawal et al., 2014). Autorům rozsáhlé studie se podařilo odhalit genetický profil v 96,5 % případech, a to mimo jiné i díky analýze fúzních genů a *EIF1AX*, *CHEK2* a *PPM1D* genů, u nichž detekovali somatické mutace. Mutace genu *EIF1AX* našli u šesti případů, z nichž jeden byl pozitivní i na jiné kauzální mutace. Autoři z toho usoudili, že mutace tohoto genu jsou kauzální a jedná se o nový marker PTC. Dnes je již známo, že se mutace *EIF1AX* genu vyskytují i u benigních nádorů štítné žlázy (Castagna et al., 2020) a u maligních případů se vyskytují většinou společně s mutacemi v *RAS* genech (Karunamurthy et al., 2016). I přes tyto poznatky je důležité *EIF1AX* gen analyzovat. Bylo například zjištěno, že varianty v exonu 2 spíše korelují s benigním onemocněním štítné žlázy a varianty v exonu 6 naopak s karcinomy (Karunamurthy et al., 2016). Také byly mutace *EIF1AX* genu nalezeny ve zvýšené míře u PDTC a ATC (Landa et al., 2016). V naší studii jsme nenalezli žádné somatické mutace v genech *EIF1AX*, *CHEK2* a *PPM1D* u PTC dětských a dospívajících pacientů. Alzahrani et al. dospěli k podobnému výsledku ve studii zahrnující 301 pacientů s karcinomem štítné žlázy, z nichž 97 pacientů bylo pediatrických. Somatickou mutaci našli pouze u jednoho vzorku dospělého pacienta, a to v genu *EIF1AX* (Alzahrani et al., 2019). Ani v genech *EZH1* a *IDH1* jsme u pediatrických pacientů nenalezli žádnou genetickou změnu.

Komplexní projekt TCGA je vhodný k porovnání našich výsledků na souboru dětských a dospívajících PTC s genetickým profilem PTC od dospělých pacientů. Projekt TCGA zahrnoval 496 pacientů s PTC, z nichž pouze devět pacientů bylo pediatrických. Nejčastější mutací u PTC dospělých pacientů byla *BRAF* V600E, která byla detekovaná v 60 % případů, což je v porovnání s námi detekovanými 19 % u pediatrických pacientů více než trojnásobek. U *RAS* mutací byl rozdíl mezi dospělou a dětskou kohoutou ještě výrazně větší. *RAS* mutace byly souhrnně u PTC dospělých jedinců nalezeny ve 13 %, zatímco my jsme je u pediatrického souboru PTC identifikovali ve 2 % případů. V TCGA projektu byly fúzní geny detekovány v 15 % případů, což je téměř čtyřikrát méně, než jsme v našem souboru detekovali u pediatrických PTC. Nutné je však zmínit, že *RET* fúzní geny v TCGA projektu detekovali v 6,3 % případů, což je mírně nižší záchyt než 8,7 %, který jsme zjistili u naší kohorty dospělých pacientů s PTC.

U *NTRK* fúzních genů byl také zaznamenán rozdíl mezi naším záchytem a záchytem u TCGA projektu. V naší studii jsme *NTRK* fúzní geny detekovali v 5,7 % PTC dospělých pacientů a autoři TCGA projektu v 2,3 % (Agrawal et al., 2014).

Relativně nízký záchyt fúzních genů u dospělých pacientů by mohl odradit některé laboratoře z jejich testování. Pokud ale vezmeme v potaz, že se fúzní geny a mutace v genech *BRAF* a *RAS* v naprosté většině případů nevyskytují současně u jednoho vzorku karcinomu štítné žlázy, je možné nejdříve analyzovat mutace v genech *BRAF* a *RAS* a až po negativním výsledku přistoupit k testování fúzních genů. U *NTRK* fúzních genů se tak podle jedné studie zvýší záchyt až na 20 % (Lee et al., 2020), u naší studie se záchyt u dospělých pacientů zvýšil na 23 %. Co se týče metodického přístupu u pediatrických pacientů s karcinomem štítné žlázy, měly by být v první řadě vyšetřeny nejběžnější fúzní geny vyskytující se u karcinomů štítné žlázy. V případě negativního výsledku, by mělo následovat vyšetření *BRAF* a *RAS* genů a pokud stále není nalezena genetická příčina nádoru, měl by vzorek podstoupit RNA sekvenaci pro odhalení vzácnějšího fúzního genu.

Molekulárně genetické vyšetření má význam i u předoperačních vzorků z uzlů štítné žlázy dětských a dospívajících pacientů. Výsledky naší studie byly implementovány do European Thyroid Association Guidelines for the management of pediatric thyroid nodules and differentiated thyroid carcinoma publikovaných v roce 2022, kde byla citována i naše publikace (Lebbink et al., 2022). V pokynech je zdůrazněna častá přítomnost fúzních genů u pediatrických pacientů a užitečnost jejich testování u předoperačních vzorků cytologicky zhodnocených jako Bethesda III-V. V našich studiích jsme testovali *RET* a *NTRK* fúzní geny u několika set vzorků z benigních uzlů štítné žlázy, abychom prokázali, že tyto fúzní geny jsou spjaty pouze s malignitou, a abychom pomohli vyvrátit dřívější stále zakořeněnou teorii, že *RET* fúzní geny se vyskytují i u benigních nálezů ve štítné žláze, např. Hashimotově tyreoiditidě (Sheils et al., 2000; Wirtschafter et al., 1997). K těmto nálezům bohužel došlo před více než 20 lety z důvodu použití metod, které měly zásadní technická omezení vedoucí k vysokému riziku falešně pozitivních výsledků. Úspěch v naší snaze jsme zaznamenali, když byl publikován článek Paediatric differentiated thyroid carcinoma: a UK National Clinical Practice Consensus Guideline, kde bylo uvedeno, že *NTRK* fúzní geny jsou asociovány se 100% rizikem malignity a naše publikace byla citována (Howard et al., 2022).

Molekulárně genetické vyšetření má u dětských a dospívajících pacientů s PTC význam nejen z diagnostického hlediska, ale i prognostického a při nastavení vhodné léčby. Asociaci *RET*

fúzních genů s přítomností metastáz v lymfatických uzlinách, která u dětských a dospívajících pacientů dosahuje 89 %, je nutno brát v potaz při indikaci k chirurgickému výkonu. Na rozdíl od *RET* fúzních genů, u *NTRK* fúzních genů riziko metastáz stoupá s velikostí primárního nádoru. Zatímco u uzlů do 2 cm je riziko metastáz do lymfatických uzlin 37%, u uzlů větších než 2 cm je riziko metastáz do lymfatických uzlin 86%. Dále při léčbě RAI je přínosné znát, že čtvrtina pediatrických pacientů s *RET* fúzním genem má distální metastázy. Polovina pediatrických pacientů s PTC pozitivním na *RET* fúzní gen měla v prvních letech po operaci strukturální odpověď na léčbu, což bylo potvrzeno i v jiné studii (Lee et al., 2021). V průběhu dalších let ale u pacientů docházelo k výraznému zlepšení odpovědi na léčbu. U žádného pediatrického pacienta s PTC pozitivním na mutaci *BRAF* V600E jsme nezaznamenali distální metastázy. Na druhou stranou, v porovnání s *RET* fúzními geny, pacienti s PTC pozitivními na *BRAF* V600E podstupovali častěji reoperace kvůli metastázám v lymfatických uzlinách, pravděpodobně z důvodu častější RAI refrakternosti. Ve vzácných případech může molekulárně genetické vyšetření karcinomu štítné žlázy zachránit život pediatrického pacienta při nasazení cílené léčby vázané na konkrétní detekovanou mutaci (Hillier et al., 2019; Lee et al., 2021).

5 Závěr

Tato dizertační práce významně přispívá k lepšímu porozumění molekulárně genetického pozadí PTC u dětských a dospívajících pacientů. Výsledky jsou využitelné nejen v naší laboratoři v rámci rutinního vyšetření, ale i celosvětově. Vytyčené cíle byly splněny:

- 1) *Analyzovat rozsáhlý soubor vzorků pediatrických PTC a odhalit jejich genetický profil.*

Molekulárně genetickou analýzou jsme zjistili, že nejčastější genetickou příčinou PTC dětských a dospívajících pacientů jsou fúzní geny vyskytující se v 56 % případů. Nejčastějším typem byly *RET* fúzní geny, u nichž jsme identifikovali nejvíce typů, dále následovaly *NTRK3* fúzní geny. V ostatních případech jsme našli *ALK*, *NTRK1*, *BRAF* a *MET* fúzní geny. Druhou nejčastější genetickou příčinou byla mutace *BRAF* V600E. U jednotek případů byly detekovány mutace *RAS* genů. Celkově byla genetická příčina zjištěna u 77 % případů.

- 2) *Porovnat agresivitu PTC dětských a dospívajících pacientů na základě jejich genetického pozadí.*

Porovnáním vzorků PTC pozitivních a negativních na fúzní gen jsme odhalili, že PTC pozitivní na fúzní gen jsou významně častěji asociovány s extratyreoidální extenzí nádoru, vyšší T klasifikací a častějšími lokálními a distálními metastázami. U pacientů s PTC pozitivním na *RET* fúzní gen byly častěji pozorovány lokální a distální metastázy než u pacientů s *NTRK3* fúzním genem. Pacientům, kteří měli PTC pozitivní na fúzní gen, bylo podáno více dávek RAI než pacientům s PTC negativním na fúzní gen.

- 3) *Charakterizovat karcinomy dětských i dospělých pacientů pozitivních na *RET* a *NTRK* fúzní geny. Porovnat klinické a histopatologické znaky mezi kohortami dětských a dospělých pacientů.*

NTRK fúzní geny byly asociovány s folikulárním uspořádáním nádoru, metastázami v lymfatických uzlinách a chronickou lymfocytární tyreoididou. *NTRK* fúzní geny jsme detekovali nejen u PTC, ale i dvou případů PDTC s větší velikostí nádoru. Karcinomy menší velikosti a bez přítomnosti metastáz korelovaly s příznivou prognózou. Mezi dětskou a dospělou kohortou nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl.

Zjistili jsme, že *RET* fúzní geny korelují s největší agresivitou pediatrických karcinomů štítné žlázy. Při adekvátní léčbě mají však pacienti s karcinomy pozitivními na tyto fúzní geny příznivou prognózu. Mezi pediatrickou a dospělou kohortou byl zaznamenán významný rozdíl ve velikosti nádoru, pediatričtí pacienti měli nádor výrazně větší, měli častější extratyreoidální extenzi a metastázy v lymfatických uzlinách.

- 4) *Optimalizovat metodu pro detekci širokého spektra fúzních genů pomocí real-time PCR analýzy a zavést analýzu vybraných fúzních genů do rutinní praxe.*

Díky rozsáhlé molekulárně genetické analýze jsme identifikovali různé typy i méně častých nebo dokonce zatím nepopsaných fúzních genů a získali tak pozitivní kontroly. Optimalizovali jsme rychlou a citlivou metodu pro detekci fúzních genů vyskytujících se nejčastěji u PTC dětských a dospívajících pacientů. Metodika spočívá na základě hydrolyzačních sond a real-time PCR a podařilo se ji zavést do rutinní praxe.

6 Seznam literatury

- Agrawal, N., Akbani, R., Aksoy, B. A., Ally, A., Arachchi, H., Asa, Sylvia L., Auman, J. T., Balasundaram, M., Balu, S., Baylin, Stephen B., Behera, M., Bernard, B., Beroukhim, R., Bishop, Justin A., Black, Aaron D., Bodenheimer, T., Boice, L., Bootwalla, Moiz S., Bowen, J., . . . Zou, L. (2014). Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell*, *159*(3), 676-690. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>
- Akaishi, J., Kondo, T., Sugino, K., Ogimi, Y., Masaki, C., Hames, K. Y., Yabuta, T., Tomoda, C., Suzuki, A., Matsuzu, K., Uruno, T., Ohkuwa, K., Kitagawa, W., Nagahama, M., Katoh, R., & Ito, K. (2019). Prognostic Impact of the Turin Criteria in Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma. *World Journal of Surgery*, *43*(9), 2235-2244. <https://doi.org/10.1007/s00268-019-05028-5>
- Ali, S. Z., Baloch, Z. W., Cochand-Priollet, B., Schmitt, F. C., Vielh, P., & VanderLaan, P. A. (2023). The 2023 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid®*, *33*(9), 1039-1044. <https://doi.org/10.1089/thy.2023.0141>
- Aliyev, E., Ladra-González, M. J., Sánchez-Ares, M., Abdulkader-Nallib, I., Piso-Neira, M., Rodríguez-Carnero, G., Vieiro-Balo, P., Pérez-Becerra, R., Gude-Sampedro, F., Barreiro-Morandeira, F., Alvarez, C. V., & Cameselle-Teijeiro, J. M. (2020). Thyroid Papillary Microtumor: Validation of the (Updated) Porto Proposal Assessing Sex Hormone Receptor Expression and Mutational: BRAF: Gene Status. *The American Journal of Surgical Pathology*, *44*(9). https://journals.lww.com/ajsp/fulltext/2020/09000/thyroid_papillary_microtumor_validation_of_the.2.aspx
- Alzahrani, A. S., Murugan, A. K., Qasem, E., Alswailem, M., Al-Hindi, H., & Shi, Y. (2016). Single Point Mutations in Pediatric Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid®*, *27*(2), 189-196. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0339>
- Alzahrani, A. S., Murugan, A. K., Qasem, E., Alswailem, M. M., AlGhamdi, B., Moria, Y., & Al-Hindi, H. (2019). Absence of EIF1AX, PPM1D, and CHEK2 mutations reported in Thyroid Cancer Genome Atlas (TCGA) in a large series of thyroid cancer. *Endocrine*, *63*(1), 94-100. <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1762-6>
- Amatu, A., Sartore-Bianchi, A., Bencardino, K., Pizzutilo, E. G., Tosi, F., & Siena, S. (2019). Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of NTRK gene fusions in cancer. *Annals of Oncology*, *30*, viii5-viii15.
- Asioli, S., Erickson, L. A., Righi, A., Jin, L., Volante, M., Jenkins, S., Papotti, M., Bussolati, G., & Lloyd, R. V. (2010). Poorly differentiated carcinoma of the thyroid: validation of the Turin proposal and analysis of IMP3 expression. *Modern Pathology*, *23*(9), 1269-1278. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.117>
- Baloch, Z. W., Asa, S. L., Barletta, J. A., Ghossein, R. A., Juhlin, C. C., Jung, C. K., LiVolsi, V. A., Papotti, M. G., Sobrinho-Simoes, M., Tallini, G., & Mete, O. (2022). Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol*, *33*(1), 27-63. <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09707-3>
- Bongarzone, I., Monzini, N., Borrello, M. G., Carcano, C., Ferraresi, G., Arighi, E., Mondellini, P., Della Porta, G., & Pierotti, M. A. (1993). Molecular Characterization of a Thyroid Tumor-Specific Transforming Sequence Formed by the Fusion of ret Tyrosine Kinase and the Regulatory Subunit RI α of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase A. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(1), 358-366. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.1.358-366.1993>
- Brancatella, A., & Marcocci, C. (2020). TSH suppressive therapy and bone. *Endocrine Connections*, *9*(7), R158-R172. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0167>

- Cai, Z., Chehab, N. H., & Pavletich, N. P. (2009). Structure and Activation Mechanism of the CHK2 DNA Damage Checkpoint Kinase. *Molecular Cell*, 35(6), 818-829. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.007>
- Castagna, M. G., Pilli, T., Maino, F., Marzocchi, C., Cairano, G. D., & Cantara, S. (2020). EIF1AX c.338-2A>T splice site mutation in a patient with trabecular adenoma and cytological indeterminate lesion. *Arch Endocrinol Metab*, 64(2), 185-189. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000208>
- Cordioli, M. I. C. V., Moraes, L., Bastos, A. U., Besson, P., Alves, M. T. d. S., Delcelo, R., Monte, O., Longui, C., Cury, A. N., & Cerutti, J. M. (2016). Fusion Oncogenes Are the Main Genetic Events Found in Sporadic Papillary Thyroid Carcinomas from Children. *Thyroid*, 27(2), 182-188. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0387>
- Costa, C., Souteiro, P., Paredes, S., Bettencourt-Silva, R., Pedro, J., Ferreira, M. J., Salazar, D., Teixeira, M. R., Oliveira, J., Santos, A. P., & Torres, I. (2022). Male gender as a poor prognostic factor in Medullary Thyroid Carcinoma: behaviour or biological difference? LID - 10.23736/S2724-6507.22.03692-2 [doi]. (2724-6116 (Electronic)).
- Cronin, K. A., Scott, S., Firth, A. U., Sung, H., Henley, S. J., Sherman, R. L., Siegel, R. L., Anderson, R. N., Kohler, B. A., Benard, V. B., Negoita, S., Wiggins, C., Cance, W. G., & Jemal, A. (2022). Annual report to the nation on the status of cancer, part 1: National cancer statistics. *Cancer*, 128(24), 4251-4284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cncr.34479>
- Cunningham, M. E., & Greene, L. A. (1998). A function–structure model for NGF-activated TRK. *The EMBO journal*, 17(24), 7282-7293.
- Das, S. S., Mishra, S., & Kaul, J. M. (2017). Development of Parafollicular Cells and their Relationship with Developing Thyroid Follicles in Human Foetuses. *Journal of clinical and diagnostic research*, 11(7), AC01-AC04.
- Deng, W., Li, J., Dorrah, K., Jimenez-Tapia, D., Arriaga, B., Hao, Q., Cao, W., Gao, Z., Vadgama, J., & Wu, Y. (2020). The role of PPM1D in cancer and advances in studies of its inhibitors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 109956.
- Dinauer, C. A., Breuer, C., & Rivkees, S. A. (2008). Differentiated thyroid cancer in children: diagnosis and management. *Current opinion in oncology*, 20(1), 59-65. <https://doi.org/10.1097/coo.0b013e3282f30220>
- Dratwa, M., Wysoczańska, B., Łacina, P., Kubik, T., & Bogunia-Kubik, K. (2020). TERT—regulation and roles in cancer formation. *Frontiers in immunology*, 11, 589929.
- Elisei, R., Romei, C., Vorontsova, T., Cosci, B., Veremeychik, V., Kuchinskaya, E., Basolo, F., Demidchik, E. P., Miccoli, P., Pinchera, A., & Pacini, F. (2001). RET/PTC Rearrangements in Thyroid Nodules: Studies in Irradiated and Not Irradiated, Malignant and Benign Thyroid Lesions in Children and Adults. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(7), 3211-3216. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.7.7678>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1. 0, cancer incidence and mortality worldwide. *Iarc Cancerbase*, 11.
- Figlioli, G., Landi, S., Romei, C., Elisei, R., & Gemignani, F. (2013). Medullary thyroid carcinoma (MTC) and RET proto-oncogene: Mutation spectrum in the familial cases and a meta-analysis of studies on the sporadic form. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 752(1), 36-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.09.002>
- Francis, G. L., Waguespack, S. G., Bauer, A. J., Angelos, P., Benvenga, S., Cerutti, J. M., Dinauer, C. A., Hamilton, J., Hay, I. D., Luster, M., Parisi, M. T., Rachmiel, M., Thompson, G. B., & Yamashita, S. (2015). Management Guidelines for Children with

- Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*[®], 25(7), 716-759. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0460>
- Franco, A. T., Ricarte-Filho, J. C., Isaza, A., Jones, Z., Jain, N., Mostoufi-Moab, S., Surrey, L., Laetsch, T. W., Li, M. M., DeHart, J. C., Reichenberger, E., Taylor, D., Kazahaya, K., Adzick, N. S., & Bauer, A. J. (2022). Fusion Oncogenes Are Associated With Increased Metastatic Capacity and Persistent Disease in Pediatric Thyroid Cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 40(10), 1081-1090. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01861>
- Fugazzola, L., Pilotti, S., Pinchera, A., Vorontsova, T. V., Mondellini, P., Bongarzone, I., Greco, A., Astakhova, L., Butti, M. G., Demidchik, E. P., Pacini, F., & Pierotti, M. A. (1995). Oncogenic Rearrangements of the RET Proto-Oncogene in Papillary Thyroid Carcinomas from Children Exposed to the Chernobyl Nuclear Accident¹. *Cancer Research*, 55(23), 5617-5620.
- Furlan, J. C., Bedard, Y. C., & Rosen, I. B. (2004). Clinicopathologic significance of histologic vascular invasion in papillary and follicular thyroid carcinomas¹. *Journal of the American College of Surgeons*, 198(3). https://journals.lww.com/journalacs/fulltext/2004/03000/clinicopathologic_significance_of_histologic.1.aspx
- Furukawa, K., Preston, D., Funamoto, S., Yonehara, S., Ito, M., Tokuoka, S., Sugiyama, H., Soda, M., Ozasa, K., & Mabuchi, K. (2013). Long-term trend of thyroid cancer risk among Japanese atomic-bomb survivors: 60 years after exposure. *International Journal of Cancer*, 132(5), 1222-1226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.27749>
- Fusco, A., Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M. T., Pilotti, S., Pierotti, M. A., Porta, G. D., & Vecchio, G. (1987). A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature*, 328(6126), 170-172. <https://doi.org/10.1038/328170a0>
- García-Rostán, G., Costa, A. M., Pereira-Castro, I., Salvatore, G., Hernandez, R., Hermsem, M. J. A., Herrero, A., Fusco, A., Cameselle-Teijeiro, J., & Santoro, M. (2005). Mutation of the PIK3CA Gene in Anaplastic Thyroid Cancer. *Cancer Research*, 65(22), 10199-10207. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4259>
- Geng, J., Liu, Y., Guo, Y., Wang, H., Tai, J., Jin, Y., Zhang, J., Yu, Y., Wang, S., Song, Y., & Ni, X. (2019). Correlation between TERT C228T and clinic-pathological features in pediatric papillary thyroid carcinoma. *Science China Life Sciences*, 62(12), 1563-1571. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9546-5>
- Genpeng, L., Jianyong, L., Jiaying, Y., Ke, J., Zhihui, L., Rixiang, G., Lihan, Z., & Jingqiang, Z. (2018). Independent predictors and lymph node metastasis characteristics of multifocal papillary thyroid cancer. *Medicine (Baltimore)*, 97(5), e9619. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009619>
- Ghossein, R. A., Hiltzik, D. H., Carlson, D. L., Patel, S., Shaha, A., Shah, J. P., Tuttle, R. M., & Singh, B. (2006). Prognostic factors of recurrence in encapsulated Hurthle cell carcinoma of the thyroid gland. *Cancer*, 106(8), 1669-1676. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cncr.21825>
- Greenlee, R. T., Hill-Harmon, M. B., Murray, T., & Thun, M. (2001). Cancer statistics, 2001. *CA: a cancer journal for clinicians*, 51(1), 15-36.
- Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M. T., Melillo, R. M., Donghi, R., Bongarzone, I., Pierotti, M. A., Della Porta, G., Fusco, A., & Vecchiot, G. (1990). PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*, 60(4), 557-563. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90659-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90659-3)

- Grubbs, E. G., Ng, P. K.-S., Bui, J., Busaidy, N. L., Chen, K., Lee, J. E., Lu, X., Lu, H., Meric-Bernstam, F., & Mills, G. B. (2015). RET fusion as a novel driver of medullary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *100*(3), 788-793.
- Guleria, P., Srinivasan, R., Rana, C., & Agarwal, S. (2022). Molecular Landscape of Pediatric Thyroid Cancer: A Review. *Diagnostics*, *12*(12).
- Haigh, P. I. (2000). Anaplastic thyroid carcinoma. *Current Treatment Options in Oncology*, *1*(4), 353-357. <https://doi.org/10.1007/s11864-000-0051-8>
- Harahap, A. S., Sari, D. G., Stephanie, M., Siswoyo, A. D., Zaid, L. S. M., Kartini, D., Ham, M. F., & Tarigan, T. J. E. (2022). Clinicopathological Profile of Thyroid Carcinoma in Young Patients: An Indonesian Single-Center Study. *Journal of Thyroid Research*, *2022*, 9944083. <https://doi.org/10.1155/2022/9944083>
- Harjit, K. D., & Hisham, A. N. (2005). Large Fungating Thyroid Cancers: A Unique Surgical Challenge. *Asian Journal of Surgery*, *28*(1), 48-51. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1015-9584\(09\)60259-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1015-9584(09)60259-1)
- Hay, I. D., Gonzalez-Losada, T., Reinalda, M. S., Honetschlager, J. A., Richards, M. L., & Thompson, G. B. (2010). Long-Term Outcome in 215 Children and Adolescents with Papillary Thyroid Cancer Treated During 1940 Through 2008. *World Journal of Surgery*, *34*(6), 1192-1202. <https://doi.org/10.1007/s00268-009-0364-0>
- Hay, I. D., Johnson, T. R., Kaggal, S., Reinalda, M. S., Iniguez-Ariza, N. M., Grant, C. S., Pittock, S. T., & Thompson, G. B. (2018). Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) in Children and Adults: Comparison of Initial Presentation and Long-Term Postoperative Outcome in 4432 Patients Consecutively Treated at the Mayo Clinic During Eight Decades (1936–2015). *World Journal of Surgery*, *42*(2), 329-342. <https://doi.org/10.1007/s00268-017-4279-x>
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). Pi3k-pkb/akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *4*(9), a011189.
- Heng, Y., Feng, S., Yang, Z., Cai, W., Qiu, W., & Tao, L. (2022). Features of Lymph Node Metastasis and Structural Recurrence in Papillary Thyroid Carcinoma Located in the Upper Portion of the Thyroid: A Retrospective Cohort Study [Original Research]. *Frontiers in Endocrinology*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.793997>
- Henke, L. E., Perkins, S. M., Pfeifer, J. D., Ma, C., Chen, Y., DeWees, T., & Grigsby, P. W. (2014). BRAF V600E mutational status in pediatric thyroid cancer. *Pediatric Blood & Cancer*, *61*(7), 1168-1172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pbc.24935>
- Hess, J. R., Newbern, D. K., Beebe, K. L., Walsh, A. M., & Schafernak, K. T. (2021). High Prevalence of Gene Fusions and Copy Number Alterations in Pediatric Radiation Therapy-Induced Papillary and Follicular Thyroid Carcinomas. *Thyroid®*, *32*(4), 411-420. <https://doi.org/10.1089/thy.2021.0217>
- Hillier, K., Hughes, A., Shamberger, R. C., Shusterman, S., Perez-Atayde, A. R., Wassner, A. J., Iafrate, A. J., Dubuc, A., Janeway, K. A., Rothenberg, S. M., Cox, M. C., Randolph, G. W., Wirth, L. J., Tsai, H., Church, A., & DuBois, S. G. (2019). A Novel ALK Fusion in Pediatric Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid®*, *29*(11), 1704-1707. <https://doi.org/10.1089/thy.2019.0041>
- Hogan, A. R., Zhuge, Y., Perez, E. A., Koniaris, L. G., Lew, J. I., & Sola, J. E. (2009). Pediatric Thyroid Carcinoma: Incidence and Outcomes in 1753 Patients. *Journal of Surgical Research*, *156*(1), 167-172. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.03.098>
- Howard, S. R., Freeston, S., Harrison, B., Izatt, L., Natu, S., Newbold, K., Pomplun, S., Spoudeas, H. A., Wilne, S., Kurzawinski, T. R., & Gaze, M. N. (2022). Paediatric differentiated thyroid carcinoma: a UK National Clinical Practice Consensus Guideline. *Endocrine-Related Cancer*, *29*(11), G1-G33. <https://doi.org/10.1530/ERC-22-0035>

- Howlader N, N. A., Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (2019). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016*.
- Huang, H. (2018). Anaplastic lymphoma kinase (ALK) receptor tyrosine kinase: a catalytic receptor with many faces. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3448.
- Chu, Y.-H., Wirth, L. J., Farahani, A. A., Nosé, V., Faquin, W. C., Dias-Santagata, D., & Sadow, P. M. (2020). Clinicopathologic features of kinase fusion-related thyroid carcinomas: an integrative analysis with molecular characterization. *Modern Pathology*, 33(12), 2458-2472. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0638-5>
- Johansson, E., Andersson, L., Örnros, J., Carlsson, T., Ingeson-Carlsson, C., Liang, S., Dahlberg, J., Jansson, S., Parrillo, L., Zoppoli, P., Barila, G. O., Altschuler, D. L., Padula, D., Lickert, H., Fagman, H., & Nilsson, M. (2015). Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans. *Development*, 142(20), 3519-3528. <https://doi.org/10.1242/dev.126581>
- Jung, C. K., Kim, Y., Jeon, S., Jo, K., Lee, S., & Bae, J. S. (2018). Clinical utility of EZH1 mutations in the diagnosis of follicular-patterned thyroid tumors. *Human Pathology*, 81, 9-17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.04.018>
- Karunamurthy, A., Panebianco, F., Hsiao, S. J., Vorhauer, J., Nikiforova, M. N., Chiosea, S., & Nikiforov, Y. E. (2016). Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules. *Endocrine-Related Cancer*, 23(4), 295-301. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0043>
- Kiess, A. P., Agrawal, N., Brierley, J. D., Duvvuri, U., Ferris, R. L., Genden, E., Wong, R. J., Tuttle, R. M., Lee, N. Y., & Randolph, G. W. (2016). External-beam radiotherapy for differentiated thyroid cancer locoregional control: a statement of the American Head and Neck Society. *Head & neck*, 38(4), 493-498.
- Kim, T. H., Kim, Y.-E., Ahn, S., Kim, J.-Y., Ki, C.-S., Oh, Y. L., Kim, K., Yun, J. W., Park, W.-Y., & Choe, J.-H. (2016). TERT promoter mutations and long-term survival in patients with thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*, 23(10), 813-823.
- Klugbauer, S., Lengfelder, E., Demidchik, E. P., & Rabes, H. M. (1995). High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene*, 11(12), 2459-2467. <http://europemc.org/abstract/MED/8545102>
- Kuhn, E., Teller, L., Piana, S., Rosai, J., & Merino, M. J. (2012). Different Clonal Origin of Bilateral Papillary Thyroid Carcinoma, with a Review of the Literature. *Endocrine Pathology*, 23(2), 101-107. <https://doi.org/10.1007/s12022-012-9202-2>
- Landa, I., Ibrahimasic, T., Boucai, L., Sinha, R., Knauf, J. A., Shah, R. H., Dogan, S., Ricarte-Filho, J. C., Krishnamoorthy, G. P., Xu, B., Schultz, N., Berger, M. F., Sander, C., Taylor, B. S., Ghossein, R., Ganly, I., & Fagin, J. A. (2016). Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(3), 1052-1066. <https://doi.org/10.1172/JCI85271>
- Lavoie, H., Gagnon, J., & Therrien, M. (2020). ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(10), 607-632. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>
- Lebbink, C. A., Links, T. P., Czarniecka, A., Dias, R. P., Elisei, R., Izatt, L., Krude, H., Lorenz, K., Luster, M., Newbold, K., Piccardo, A., Sobrinho-Simões, M., Takano, T., Paul van Trotsenburg, A. S., Verburg, F. A., & van Santen, H. M. (2022). 2022 European Thyroid Association Guidelines for the management of pediatric thyroid nodules and differentiated thyroid carcinoma. *European Thyroid Journal*, 11(6), e220146. <https://doi.org/10.1530/ETJ-22-0146>

- Lee, Y.-C., Chen, J.-Y., Huang, C.-J., Chen, H.-S., Yang, A.-H., & Hang, J.-F. (2020). Detection of NTRK1/3 Rearrangements in Papillary Thyroid Carcinoma Using Immunohistochemistry, Fluorescent In Situ Hybridization, and Next-Generation Sequencing. *Endocrine Pathology*, *31*(4), 348-358. <https://doi.org/10.1007/s12022-020-09648-9>
- Lee, Y. A., Lee, H., Im, S.-W., Song, Y. S., Oh, D.-Y., Kang, H. J., Won, J.-K., Jung, K. C., Kwon, D., Chung, E.-J., Hah, J. H., Paeng, J. C., Kim, J.-h., Choi, J., Kim, O.-H., Oh, J. M., Ahn, B.-C., Wirth, L. J., Shin, C. H., . . . Park, Y. J. (2021). NTRK and RET fusion-directed therapy in pediatric thyroid cancer yields a tumor response and radioiodine uptake. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(18). <https://doi.org/10.1172/JCI144847>
- Leeman-Neill, R. J., Kelly, L. M., Liu, P., Brenner, A. V., Little, M. P., Bogdanova, T. I., Evdokimova, V. N., Hatch, M., Zurnadzy, L. Y., Nikiforova, M. N., Yue, N. J., Zhang, M., Mabuchi, K., Tronko, M. D., & Nikiforov, Y. E. (2014). ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer. *Cancer*, *120*(6), 799-807. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cncr.28484>
- Lene, H. S. V., Jay, H. L., Harald, A., Florent de, V., Margaret, T., Parveen, B., Arthur, S., Robert, J., Peter, I., Ruth, K., Roy, S., Linda, P., Erik, H., Michael, M. H., Adams, M. J., Siegal, S., Marie, L., Ritsu, S., Lena, D., . . . Elaine, R. (2012). A Pooled Analysis of Thyroid Cancer Incidence Following Radiotherapy for Childhood Cancer. *Radiation Research*, *178*(4), 365-376. <https://doi.org/10.1667/RR2889.1>
- Lim, H., Devesa, S. S., Sosa, J. A., Check, D., & Kitahara, C. M. (2017). Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA*, *317*(13), 1338-1348. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.2719>
- Liu, Z., Huang, Y., Chen, S., Hu, D., Wang, M., Zhou, L., Zhou, W., Chen, D., Feng, H., Wei, W., Zhang, C., Zeng, W., & Guo, L. (2019). Minimal extrathyroidal extension affects the prognosis of differentiated thyroid cancer: Is there a need for change in the AJCC classification system? *PLOS ONE*, *14*(6), e0218171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218171>
- LiVolsi, V. A. (2011). Papillary thyroid carcinoma: an update. *Modern Pathology*, *24*(2), S1-S9. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.129>
- Lu, Z., Zhang, Y., Feng, D., Sheng, J., Yang, W., & Liu, B. (2017). Targeted next generation sequencing identifies somatic mutations and gene fusions in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*, *8*(28), 45784-45792. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17412>
- Lubitz, C. C., Sadow, P. M., Daniels, G. H., & Wirth, L. J. (2021). Progress in Treating Advanced Thyroid Cancers in the Era of Targeted Therapy. *Thyroid®*, *31*(10), 1451-1462. <https://doi.org/10.1089/thy.2020.0962>
- Mai, K. T., Khanna, P., Yazdi, H. M., Garth Perkins, D., Veinot, J. P., Thomas, J., Lamba, M., & Nair, B. D. (2002). Differentiated thyroid carcinomas with vascular invasion: a comparative study of follicular, Hürthle cell and papillary thyroid carcinoma. *Pathology*, *34*(3), 239-244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00313020220131291>
- Mao, J., Zhang, Q., Zhang, H., Zheng, K., Wang, R., & Wang, G. (2020). Risk Factors for Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis [Systematic Review]. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.00265>
- Markham, A. (2020). Selpercatinib: First Approval. *Drugs*, *80*(11), 1119-1124. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01343-7>
- Mascarenhas, L., van Tilburg, C. M., Doz, F., Zwaan, C. M., Albert, C. M., Blattman, C., Georger, B., DuBois, S. G., Federman, N., Nagasubramanian, R., Pappo, A. S., Watt,

- T. C., Norenberg, R., Fellous, M. M., De La Cuesta, E. A., Laetsch, T. W., & Xu, R.-h. (2022). Efficacy and safety of larotrectinib in pediatric patients with tropomyosin receptor kinase (TRK) fusion-positive cancer: An expanded dataset. *Journal of Clinical Oncology*, *40*(16_suppl), 10030-10030. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.10030
- Mathiesen, J. S., Kroustrup, J. P., Vestergaard, P., Stochholm, K., Poulsen, P. L., Rasmussen, Å. K., Feldt-Rasmussen, U., Schytte, S., Londero, S. C., Pedersen, H. B., Hahn, C. H., Bentzen, J., Möller, S., Gaustadnes, M., Rossing, M., Nielsen, F. C., Brixen, K., Frederiksen, A. L., & Godballe, C. (2019). Survival and Long-Term Biochemical Cure in Medullary Thyroid Carcinoma in Denmark 1997–2014: A Nationwide Study. *Thyroid®*, *29*(3), 368-377. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0564>
- Mathiesen, J. S., Kroustrup, J. P., Vestergaard, P., Stochholm, K., Poulsen, P. L., Rasmussen, Å. K., Feldt-Rasmussen, U., Schytte, S., Londero, S. C., Pedersen, H. B., Hahn, C. H., Djurhuus, B. D., Bentzen, J., Möller, S., Gaustadnes, M., Rossing, M., Nielsen, F. C., Brixen, K., Frederiksen, A. L., & Godballe, C. (2018). Incidence and prevalence of sporadic and hereditary MTC in Denmark 1960–2014: a nationwide study. *Endocrine Connections*, *7*(6), 829-839. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0157>
- Merino, M., Kasamon, Y., Li, H., Ma, L., Leong, R., Zhou, J., Reaman, G., Chambers, W., Richardson, N., Theoret, M., Pazdur, R., & Gormley, N. (2022). FDA approval summary: Crizotinib for pediatric and young adult patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large cell lymphoma. *Pediatric Blood & Cancer*, *69*(8), e29602. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pbc.29602>
- Milano, A. F. (2018). Thyroid Cancer: 20-Year Comparative Mortality and Survival Analysis of Six Thyroid Cancer Histologic Subtypes by Age, Sex, Race, Stage, Cohort Entry Time-Period and Disease Duration (SEER*Stat 8.3.2) A Systematic Review of 145,457 Cases for Diagnosis Years 1993–2013. *Journal of Insurance Medicine*, *47*(3), 143-158. <https://doi.org/10.17849/in-sm-47-03-143-158.1>
- Mon, R., & Newlon, J. (2015). Anaplastic carcinoma of the thyroid in a 12-year old girl. *Journal of Pediatric Surgery Case Reports*, *3*(9), 404-406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.epsc.2015.08.004>
- Morgenstern, D. A., Mascarenhas, L., Campbell, M., Ziegler, D. S., Nysom, K., Casanova, M., Pappo, A. S., Albert, C. M., Xia, M., Barker, S. S., Wright, J., & Laetsch, T. W. (2021). Oral selpercatinib in pediatric patients (pts) with advanced RET-altered solid or primary CNS tumors: Preliminary results from the phase 1/2 LIBRETTO-121 trial. *Journal of Clinical Oncology*, *39*(15_suppl), 10009-10009. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.10009
- Mostoufi-Moab, S., Labourier, E., Sullivan, L., LiVolsi, V., Li, Y., Xiao, R., Beaudenon-Huibregtse, S., Kazahaya, K., Adzick, N. S., Baloch, Z., & Bauer, A. J. (2017). Molecular Testing for Oncogenic Gene Alterations in Pediatric Thyroid Lesions. *Thyroid®*, *28*(1), 60-67. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0059>
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M. E., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., . . . Gakidou, E. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, *384*(9945), 766-781. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8)
- Nguyen, Q. T., Lee, E. J., Huang, M. G., Park, Y. I., Khullar, A., & Plodkowski, R. A. (2015). Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *American health & drug benefits*, *8*(1), 30.

- Nikiforov, Y. E., Rowland, J. M., Bove, K. E., Monforte-Munoz, H., & Fagin, J. A. (1997). Distinct Pattern of ret Oncogene Rearrangements in Morphological Variants of Radiation-induced and Sporadic Thyroid Papillary Carcinomas in Children¹. *Cancer Research*, 57(9), 1690-1694.
- Nikita, M. E., Jiang, W., Cheng, S.-M., Hantash, F. M., McPhaul, M. J., Newbury, R. O., Phillips, S. A., Reitz, R. E., Waldman, F. M., & Newfield, R. S. (2015). Mutational Analysis in Pediatric Thyroid Cancer and Correlations with Age, Ethnicity, and Clinical Presentation. *Thyroid*[®], 26(2), 227-234. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0401>
- Nilsson, M., & Fagman, H. (2017). Development of the thyroid gland. *Development*, 144(12), 2123-2140. <https://doi.org/10.1242/dev.145615>
- Nixon, I. J., Ganly, I., & Shah, J. P. (2013). Thyroid cancer: Surgery for the primary tumor. *Oral Oncology*, 49(7), 654-658. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.03.439>
- Nixon, I. J., Wang, L. Y., Migliacci, J. C., Eskander, A., Campbell, M. J., Aniss, A., Morris, L., Vaisman, F., Corbo, R., Momesso, D., Vaisman, M., Carvalho, A., Learoyd, D., Leslie, W. D., Nason, R. W., Kuk, D., Wreesmann, V., Morris, L., Palmer, F. L., . . . Shah, J. P. (2016). An International Multi-Institutional Validation of Age 55 Years as a Cutoff for Risk Stratification in the AJCC/UICC Staging System for Well-Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*[®], 26(3), 373-380. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0315>
- O'Neill, C. J., Vaughan, L., Learoyd, D. L., Sidhu, S. B., Delbridge, L. W., & Sywak, M. S. (2011). Management of follicular thyroid carcinoma should be individualised based on degree of capsular and vascular invasion. *European Journal of Surgical Oncology*, 37(2), 181-185. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2010.11.005>
- Ohtsuru, A., Midorikawa, S., Ohira, T., Suzuki, S., Takahashi, H., Murakami, M., Shimura, H., Matsuzuka, T., Yasumura, S., Suzuki, S.-i., Yokoya, S., Hashimoto, Y., Sakai, A., Ohto, H., Yamashita, S., Tanigawa, K., & Kamiya, K. (2019). Incidence of Thyroid Cancer Among Children and Young Adults in Fukushima, Japan, Screened With 2 Rounds of Ultrasonography Within 5 Years of the 2011 Fukushima Daiichi Nuclear Power Station Accident. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 145(1), 4-11. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2018.3121>
- Pacini, F., Vorontsova, T., Demidchik, E. P., Molinaro, E., Agate, L., Romei, C., Shavrova, E., Cherstvoy, E. D., Ivashkevitch, Y., Kuchinskaya, E., Schlumberger, M., Ronga, G., Filesi, M., & Pinchera, A. (1997). Post-Chernobyl Thyroid Carcinoma in Belarus Children and Adolescents: Comparison with Naturally Occurring Thyroid Carcinoma in Italy and France¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(11), 3563-3569. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.11.4367>
- Parimi, V., Tolba, K., Danziger, N., Kuang, Z., Sun, D., Lin, D. I., Hiemenz, M. C., Schrock, A. B., Ross, J. S., & Oxnard, G. R. (2023). Genomic landscape of 891 RET fusions detected across diverse solid tumor types. *npj Precision Oncology*, 7, 10.
- Peiling Yang, S., & Ngeow, J. (2016). Familial non-medullary thyroid cancer: unraveling the genetic maze. *Endocrine-Related Cancer*, 23(12), R577-R595. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0067>
- Penta, L., Cofini, M., Lanciotti, L., Leonardi, A., Principi, N., & Esposito, S. Hashimoto's Disease and Thyroid Cancer in Children: Are They Associated? (1664-2392 (Print)).
- Polat, S. B., Cakir, B., Evranos, B., Baser, H., Cuhaci, N., Aydin, C., & Ersoy, R. (2019). Preoperative predictors and prognosis of bilateral multifocal papillary thyroid carcinomas. *Surgical Oncology*, 28, 145-149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.suronc.2018.12.004>

- Prasad, M. L., Vyas, M., Horne, M. J., Virk, R. K., Morotti, R., Liu, Z., Tallini, G., Nikiforova, M. N., Christison-Lagay, E. R., Udelsman, R., Dinauer, C. A., & Nikiforov, Y. E. (2016). NTRK fusion oncogenes in pediatric papillary thyroid carcinoma in northeast United States. *Cancer*, *122*(7), 1097-1107. <https://doi.org/10.1002/ncr.29887>
- Quaytman, J. A., Nikiforov, Y. E., Nikiforova, M. N., & Morariu, E. (2022). Clinicopathologic features of thyroid nodules with PTEN mutations on preoperative testing. *Endocrine-Related Cancer*, *29*(9), 513-520. <https://doi.org/10.1530/ERC-22-0061>
- Rendl, G., Manzl, M., Hitzl, W., Sungler, P., & Pirich, C. (2008). Long-term prognosis of medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*, *69*(3), 497-505. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03229.x>
- Ricarte-Filho, J. C., Li, S., Garcia-Rendueles, M. E. R., Montero-Conde, C., Voza, F., Knauf, J. A., Heguy, A., Viale, A., Bogdanova, T., Thomas, G. A., Mason, C. E., & Fagin, J. A. (2013). Identification of kinase fusion oncogenes in post-Chernobyl radiation-induced thyroid cancers. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(11), 4935-4944. <https://doi.org/10.1172/JCI69766>
- Robinson, D. R., Wu, Y.-M., & Lin, S.-F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, *19*(49), 5548-5557. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203957>
- Romero, D. (2023). Dabrafenib–trametinib is effective in paediatric high-grade glioma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *20*(11), 734-734. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00820-8>
- Rose, J. F., Wertheim, B. C., & Guerrero, M. A. (2012). Radiation treatment of patients with primary pediatric malignancies: risk of developing thyroid cancer as a secondary malignancy. *American journal of surgery*, *204* 6, 881-886; discussion 886-887.
- Santoro, M., Na, D., Berlingieri, M. T., Bongarzone, I., Paulin, C., Grieco, M., Pierotti, M. A., Vecchio, G., & Fusco, A. (1994). Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene*, *9* 2, 509-516.
- Scott, L. J. (2019). Larotrectinib: first global approval. *Drugs*, *79*, 201-206.
- Sheils, O. M., O'Leary, J. J., Uhlmann, V., Lüttich, K., & Sweeney, E. C. (2000). ret/PTC-1 Activation in Hashimoto Thyroiditis. *International Journal of Surgical Pathology*, *8*(3), 185-189. <https://doi.org/10.1177/106689690000800305>
- Sherman, E. J., Lim, S. H., Ho, A. L., Ghossein, R. A., Fury, M. G., Shaha, A. R., Rivera, M., Lin, O., Wolden, S., Lee, N. Y., & Pfister, D. G. (2011). Concurrent doxorubicin and radiotherapy for anaplastic thyroid cancer: A critical re-evaluation including uniform pathologic review. *Radiotherapy and Oncology*, *101*(3), 425-430. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.09.004>
- Schmid, D., Ricci, C., Behrens, G., & Leitzmann, M. F. (2015). Adiposity and risk of thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, *16*(12), 1042-1054. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/obr.12321>
- Sisdelli, L., Cordioli, M. I. C. V., Vaisman, F., Moraes, L., Colozza-Gama, G. A., Alves Jr, P. A. G., Araújo Jr, M. L., Alves, M. T. S., Monte, O., Longui, C. A., Cury, A. N., Carvalheira, G., & Cerutti, J. M. (2019). AGK-BRAF is associated with distant metastasis and younger age in pediatric papillary thyroid carcinoma. *Pediatric Blood & Cancer*, *66*(7), e27707. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pbc.27707>
- Smallridge, R. C., & Copland, J. A. (2010). Anaplastic Thyroid Carcinoma: Pathogenesis and Emerging Therapies. *Clinical Oncology*, *22*(6), 486-497. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2010.03.013>
- Soussi, T. (2000). The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *910*(1), 121-139.

- Starenki, D., & Park, J.-I. (2015). Pediatric medullary thyroid carcinoma. *Journal of pediatric oncology*, 3(2), 29.
- Taniue, K., & Akimitsu, N. (2021). Fusion genes and RNAs in cancer development. *Non-coding RNA*, 7(1), 10.
- Toraih, E. A., Hussein, M. H., Zerfaoui, M., Attia, A. S., Marzouk Ellythy, A., Mostafa, A., Ruiz, E. M. L., Shama, M. A., Russell, J. O., Randolph, G. W., & Kandil, E. (2021). Site-Specific Metastasis and Survival in Papillary Thyroid Cancer: The Importance of Brain and Multi-Organ Disease. *Cancers*, 13(7).
- Tran, N. H., Wu, X., & Frost, J. A. (2005). B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16244-16253.
- Turcotte, L. M., Liu, Q., Yasui, Y., Arnold, M. A., Hammond, S., Howell, R. M., Smith, S. A., Weathers, R. E., Henderson, T. O., Gibson, T. M., Leisenring, W., Armstrong, G. T., Robison, L. L., & Neglia, J. P. (2017). Temporal Trends in Treatment and Subsequent Neoplasm Risk Among 5-Year Survivors of Childhood Cancer, 1970-2015. *JAMA*, 317(8), 814-824. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.0693>
- Tuttle, R. M., Ahuja, S., Avram, A. M., Bernet, V. J., Bourguet, P., Daniels, G. H., Dillehay, G., Draganescu, C., Flux, G., Führer, D., Giovanella, L., Greenspan, B., Luster, M., Muylle, K., Smit, J. W. A., Van Nostrand, D., Verburg, F. A., & Hegedüs, L. (2019). Controversies, Consensus, and Collaboration in the Use of 131I Therapy in Differentiated Thyroid Cancer: A Joint Statement from the American Thyroid Association, the European Association of Nuclear Medicine, the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, and the European Thyroid Association. *Thyroid®*, 29(4), 461-470. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0597>
- Tuttle, R. M., Haugen, B., & Perrier, N. D. (2017). Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid®*, 27(6), 751-756. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0102>
- Uchikawa, E., Chen, Z., Xiao, G.-Y., Zhang, X., & Bai, X.-c. (2021). Structural basis of the activation of c-MET receptor. *Nature communications*, 12(1), 4074.
- van der Tuin, K., Ventayol Garcia, M., Corver, W. E., Khalifa, M. N., Ruano Neto, D., Corssmit, E. P. M., Hes, F. J., Links, T. P., Smit, J. W. A., Plantinga, T. S., Kapiteijn, E., van Wezel, T., & Morreau, H. (2019). Targetable gene fusions identified in radioactive iodine refractory advanced thyroid carcinoma. *European Journal of Endocrinology*, 180(4), 235-241. <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0653>
- Vanden Borre, P., Schrock, A. B., Anderson, P. M., Morris, J. C., III, Heilmann, A. M., Holmes, O., Wang, K., Johnson, A., Waguespack, S. G., Ou, S. H. I., Khan, S., Fung, K. M., Stephens, P. J., Erlich, R. L., Miller, V. A., Ross, J. S., & Ali, S. M. (2017). Pediatric, Adolescent, and Young Adult Thyroid Carcinoma Harbors Frequent and Diverse Targetable Genomic Alterations, Including Kinase Fusions. *The Oncologist*, 22(3), 255-263. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0279>
- Vetter, I. R. (2014). The structure of the G domain of the Ras superfamily. *Ras superfamily small G proteins: biology and mechanisms 1: general features, signaling*, 25-50.
- Waguespack, S. G., Rich, T. A., Perrier, N. D., Jimenez, C., & Cote, G. J. (2011). Management of medullary thyroid carcinoma and MEN2 syndromes in childhood. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(10), 596-607. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.139>
- Wang, L. Y., & Ganly, I. (2016). Nodal metastases in thyroid cancer: prognostic implications and management. *Future Oncology*, 12(7), 981-994. <https://doi.org/10.2217/fon.16.10>
- Wang, L. Y., Palmer, F. L., Nixon, I. J., Thomas, D., Patel, S. G., Shaha, A. R., Shah, J. P., Tuttle, R. M., & Ganly, I. (2014). Multi-Organ Distant Metastases Confer Worse

- Disease-Specific Survival in Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*®, 24(11), 1594-1599. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0173>
- Wirtschafter, A., Schmidt, R., Rosen, D., Kundu, N., Santoro, M., Fusco, A., Mulhaupt, H., Atkins, J. P., Rosen, M. R., Keane, W. M., & Rothstein, J. L. (1997). Expression of the RET/PTC Fusion Gene as a Marker for Papillary Carcinoma in Hashimoto's Thyroiditis. *The Laryngoscope*, 107(1), 95-100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/00005537-199701000-00019>
- Wong, K. S., Dong, F., Telatar, M., Lorch, J. H., Alexander, E. K., Marqusee, E., Cho, N. L., Nehs, M. A., Doherty, G. M., Afkhami, M., & Barletta, J. A. (2020). Papillary Thyroid Carcinoma with High-Grade Features Versus Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma: An Analysis of Clinicopathologic and Molecular Features and Outcome. *Thyroid*®, 31(6), 933-940. <https://doi.org/10.1089/thy.2020.0668>
- Worden, F. (2014). Treatment strategies for radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 6(6), 267-279. <https://doi.org/10.1177/1758834014548188>
- Wu, Y.-L., Ting, W.-H., Wey, S.-L., Chen, C.-K., Huang, C.-Y., Cheng, S.-P., & Lee, Y.-J. (2011). Poorly differentiated thyroid carcinoma in a 9-year-old boy: case report. 24(9-10), 783-786. <https://doi.org/doi:10.1515/JPEM.2011.209>
- Xing, M. (2016). Clinical utility of RAS mutations in thyroid cancer: a blurred picture now emerging clearer. *BMC Medicine*, 14(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0559-9>
- Yang, H., Park, H., Ryu, H. J., Heo, J., Kim, J. S., Oh, Y. L., Choe, J. H., Kim, J. H., Kim, J. S., Jang, H. W., Kim, T. H., Kim, S. W., & Chung, J. H. (2022). Frequency of TERT Promoter Mutations in Real-World Analysis of 2,092 Thyroid Carcinoma Patients. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 37(4), 652-663. <https://doi.org/10.3803/EnM.2022.1477>
- Zaballos, M. A., & Santisteban, P. (2017). Key signaling pathways in thyroid cancer. *Journal of Endocrinology*, 235(2), R43-R61. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0266>
- Zhang, D., Tang, J., Kong, D., Cui, Q., Wang, K., Gong, Y., & Wu, G. (2018). Impact of Gender and Age on the Prognosis of Differentiated Thyroid Carcinoma: a Retrospective Analysis Based on SEER. *Hormones and Cancer*, 9(5), 361-370. <https://doi.org/10.1007/s12672-018-0340-y>
- Zhang, W., & Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1), 9-18. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>
- Zirilli, G., Valenzise, M., Dionigi, G., Tuccari, G., Romeo, C., Campenni, A., Corrias, A., Tuli, G., Ieni, A., Pajno, G. B., & Wasniewska, M. (2020). Hurthle cell carcinoma in childhood: A retrospective analysis of five cases and review of pediatric literature. *Pediatric Blood & Cancer*, 67(9), e28300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pbc.28300>