

جهش‌های ژرم لاین آگزون ۱۹ ژن پروتوآنکوژن RET در سرطان مدولاری تیروئید در یک نمونه جمعیت ایرانی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۰۸ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۱۱ آنلاین: ۱۳۹۴/۰۵/۱۰

زمینه و هدف: سرطان مدولاری تیروئید ۱۰-۵٪ از کل سرطان‌های غده تیروئید را شامل می‌شود. ارتباط جهش‌های پروتوآنکوژن RET در پیدایش سرطان تیروئید مشخص شده است. از این‌روی، شناسایی جهش‌های ژن RET امکان تشخیص زود هنگام افراد در معرض خطر بیماری را ممکن می‌سازد. هدف از مطالعه، تعیین وضعیت جهش‌های آگزون ۱۹ ژن پروتوآنکوژن RET و ارتباط آن با سرطان مدولاری تیروئید در افراد مورد بررسی در نمونه‌ای از جمعیت ایرانی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تحلیلی از نوع مورد-شاهدی، که در آزمایشگاه پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در فاصله زمانی خرداد ۱۳۹۲ لغایت خرداد ۱۳۹۳ صورت پذیرفت، تعداد ۱۱۰ فرد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید مورد بررسی قرار گرفتند. محتوای DNA ژنومی از گویچه‌های سفید خون محیطی با روش استاندارد نمک اشباع/پروتئیناز K استخراج شد. آگزون ۱۹ پروتوآنکوژن RET با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد. محصول واکنش جهت تایید تکثیر قطعه مورد نظر، الکتروفورز و سپس جهت بررسی موتاسیون، مستقیماً تعیین توالی شدند.

یافته‌ها: در این بررسی دو تغییر نوکلئوتیدی (rs2075912 (Y:T/C) و rs2075913 (W:T/A) در آگزون ۱۹ پروتوآنکوژن RET در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید مشاهده شد و فراوانی هر دو تغییر نوکلئوتیدی در مردان بیش از زنان بود. در موقعیت rs2075912 و rs2075913 به ترتیب ۱۱/۲٪ و ۶/۳٪ درصد در مردان فراوان‌تر بود. اما ارتباط معناداری میان سن و جنس با جهش‌های rs2075912 (P=۰/۱۹) و rs2075913 (P=۰/۰۶) مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: احتمالاً در کنار جهش‌های سایر آگزون‌های ژن پروتوآنکوژن RET، از جهش‌های آگزون ۱۹ نیز در تشخیص زود هنگام و تایید سرطان مدولاری تیروئید بتوان بهره گرفت.

کلمات کلیدی: سرطان مدولاری تیروئید، پروتوآنکوژن RET، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، آگزون ۱۹.

هدی گلاب قدکساز^۱

محمود دهقانی اشکذری^۱

مهدی هدایتی^{۲*}

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اشکذر، اشکذر، ایران.

۲- گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شهید چمران، ولنجک، خ یمن، ابتدای خیابان پروانه، پلاک ۲۴، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، کد پستی: ۱۹۸۵۷۱۷۴۱۳
تلفن: ۰۲۱- ۲۲۴۳۲۴۹۸
E-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

مقدمه

سرطان پاپیلاری تیروئید (۸۰٪)، سرطان فولیکولار تیروئید (۱۱٪)، سرطان سلول هرتل (۳٪) و سرطان آناپلاستیک تیروئید (۲٪) می‌باشد. سرطان مدولاری تیروئید از سلول‌های غیرفولیکولار (سلول‌های پارافولیکولار C) منشاء گرفته و حدود ۴٪ از سرطان‌های تیروئید را ناشی می‌شود.^۳

سرطان مدولاری میزان ۸-۵٪ از تمام تومورهای تیروئید را شامل

سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی در سیستم غدد درون‌ریز است که حدود ۱٪ از کل سرطان‌های انسانی را به خود اختصاص داده است.^{۱،۲} سرطان تیروئید می‌تواند از سلول‌های فولیکولی و یا غیرفولیکولی تیروئید به‌وجود آید. سرطان‌های فولیکولی شامل

۲A، نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع ۲B و سرطان مدولاری تیروئید فامیلی شناخته شده است.^{۱۹،۱۸} در اکثر خانواده‌های مبتلا به نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع ۲A (بیش از ۹۰٪) جهش‌های نقطه‌ای در پروتوآنکوژن RET (از نوع جهش‌های بد معنی) وجود دارد که در کدون‌های دامنه خارج سلولی گیرنده یعنی کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸، ۶۲۰ و (اگزون ۱۰) و کدون ۶۳۴ (اگزون ۱۱) رخ می‌دهد.^{۲۱،۲۰}

شایع‌ترین جهش در کدون ۶۳۴ بوده که در بیش از ۶۰٪ از تمام سرطان مدولاری تیروئید ژنتیکی شناسایی شده است.^{۲۴-۲۲} سرطان مدولاری تیروئید با قدرت تهاجم بالا و پیش‌آگهی بد، یکی از بدخیم‌ترین سرطان‌های تیروئید به شمار می‌رود^{۲۵} از سوی دیگر موتاسیون‌های فرم خانوادگی این سرطان به ذخیره ژنتیکی هر جمعیتی بستگی دارند.^{۲۶} عمده مطالعات در این زمینه محدود به اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ بوده است^{۲۷-۲۳} و بررسی محدودی در مورد موتاسیون‌های اگزون ۱۹ پروتوآنکوژن RET در جمعیت‌های دیگر صورت گرفته است.^{۳۲،۳۱}

این مسئله که آیا موتاسیون اگزون ۱۹ پروتوآنکوژن RET با این بیماری ارتباط دارد یا خیر در جمعیت ایرانی بررسی نشده است. این مطالعه با هدف بررسی موتاسیون‌های اگزون ۱۹ ژن پروتوآنکوژن RET در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید انجام شد.

روش بررسی

با توجه به شیوع پایین سرطان مدولاری تیروئید، در این مطالعه تحلیلی از نوع مورد-شاهدی، شاهدهی، نمونه‌گیری به‌صورت ساده و غیرتصادفی در آزمایشگاه پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در فاصله زمانی خرداد ۱۳۹۲ لغایت خرداد ۱۳۹۳ صورت پذیرفت. جهت تعیین حجم نمونه، با در نظر گرفتن فرکانس آلی $0.2/5$ ($1-\pi=0.01$ ، $f_{min}=2/5$) حداقل حجم نمونه ۹۱ نفر محاسبه شد که با حدود ۱۵٪ ضریب اطمینان، ۱۱۰ نفر در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفتند. افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید پس از تایید سرطان مدولاری آن در گزارش پاتولوژی جهت بررسی ژنتیکی به پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ارجاع داده شدند. میزان

می‌شود و محصول ترش‌حی اصلی آن کلسی‌تونین است. سرطان مدولاری تیروئید در حدود ۷۵٪ از موارد به‌صورت پراکنده (Sporadically) و یا به‌صورت سندرم وراثتی نئوپلازی متعدد غدد درون‌ریز نوع ۲ ظاهر می‌شود.^{۴-۶} فرم ارثی آن با جهش ژرمینال در پروتوآنکوژن RET همراه بوده و به‌صورت یک بیماری اتوزوم غالب با نفوذ بالا و فنوتیپ متغیر بروز می‌کند. سرطان مدولاری تیروئید وراثتی تحت عنوان نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع ۲ (Multiple Endocrine Neoplasia type 2) به سه شکل بالینی مجزا طبقه‌بندی می‌شود: نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع ۲A، نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع ۲B و سرطان مدولاری تیروئید فامیلی (Familial Medullary Thyroid Carcinoma).^{۷،۸} حدود ۸۰-۵۰٪ از جهش‌های سوماتیک پروتوآنکوژن RET (M918T/ATG/متیونین ← ACG /ترئونین) در اگزون ۱۶ است.^{۹-۱۲}

پروتوآنکوژن RET، بر روی کروموزوم ۱۰ واقع بوده و این پروتوآنکوژن، کدکننده گیرنده تیروزین کیناز است و در سلول‌های برگرفته از ستیغ عصبی، یعنی سلول‌های پارافولیکولار تیروئید (سلول‌های C)، سلول‌های کروموفین مدولای آدرنال و شبکه عصبی اتونوم روده بیان می‌شود. پروتیین RET از سه ناحیه خارج سلولی، عرض غشایی و بخش داخل سلولی که حاوی دو ناحیه تیروزین کینازی است تشکیل شده است. وجود جهش در دامنه خارجی، اغلب در نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع ۲A دیده می‌شود که حتی در غیاب لیگاند، (در لغت‌نامه‌های فارسی نیز لیگاند ترجمه شده و نویسندگان معادلی برای آن نیافتند) منجر به دایمیرزاسیون RET و فعال‌سازی مسیرهای انتقال پیام به داخل سلول می‌شود. جهش در ناحیه تیروزین کیناز داخل سلولی که در نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع ۲B دیده می‌شود، ویژگی سوبسترای RET را به دلیل تغییرات ساختاری در این ناحیه تغییر می‌دهد. در نتیجه RET جهش یافته، دیگر نیازی به دایمیرزاسیون (جفت شدن، دو تایی شدن) جهت فعال شدن ندارد.^{۱۳،۱۴}

مطالعات متعدد ارتباط میان جهش‌های ویژه پروتوآنکوژن RET و سن شروع و تهاجم سرطان مدولاری تیروئید، وجود یا فقدان دیگر نئوپلاسم‌های غدد درون‌ریز (فنوتیپ) را نشان می‌دهد.^{۱۷-۱۵} چندین جهش مستقل در پروتوآنکوژن RET در اگزون‌های ۵، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶، به‌عنوان علل نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع

با استفاده از MedCalc (version 13.3 Mariakerke, Belgium) انجام گرفت. همچنین از PowerMarker, version 3.25 (Liu and Muse 2005) جهت بررسی تعادل هاردی واینبرگ فراوانی الی استفاده شد. بررسی ارتباط بین جنسیت افراد و جهش‌های هر دو جایگاه از Chi-square test استفاده گردید.

یافته‌ها

افراد مورد مطالعه در این بررسی ۱۱۰ فرد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید بودند که از این تعداد ۶۱ نفر زن (۵۵/۵٪) و ۴۹ نفر مرد (۴۴/۵٪) بودند. میانگین سنی بیماران، بدون تفکیک جنسیتی معادل ۳۸/۵۸ سال و انحراف استاندارد برای داده‌ها ۱۴/۰۰ بود. در بررسی انجام شده، جمعیت مورد مطالعه از توزیع نرمال برخوردار بودند. پس از بررسی توالی‌ها در دو ناحیه غیر کدون rs2075912 و rs2075913، اگزون ۱۹ پروتوآنکوژن RET به ترتیب تغییرات نوکلئوتیدی Y:T/C و W:T/A مشاهده شد. درصد ال‌های وحشی و موتانت در ناحیه rs2075912، rs2075913 در افراد هموزیگوت طبیعی، هتروزیگوت و هموزیگوت غیرطبیعی در جدول ۱ به تفکیک نشان داده شده است.

علی‌رغم اینکه در هر دو جایگاه تعداد زنان هموزیگوت و هتروزیگوت نسبت به مردان هموزیگوت و هتروزیگوت بیشتر بوده ولی این اختلاف معنادار نبود، (P=۰/۱۹) برای ناحیه rs2075912 و (P=۰/۶) برای ناحیه rs2075913 به‌دست آمد. همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده ارتباط معناداری بین سن افراد و دو جهش مذکور

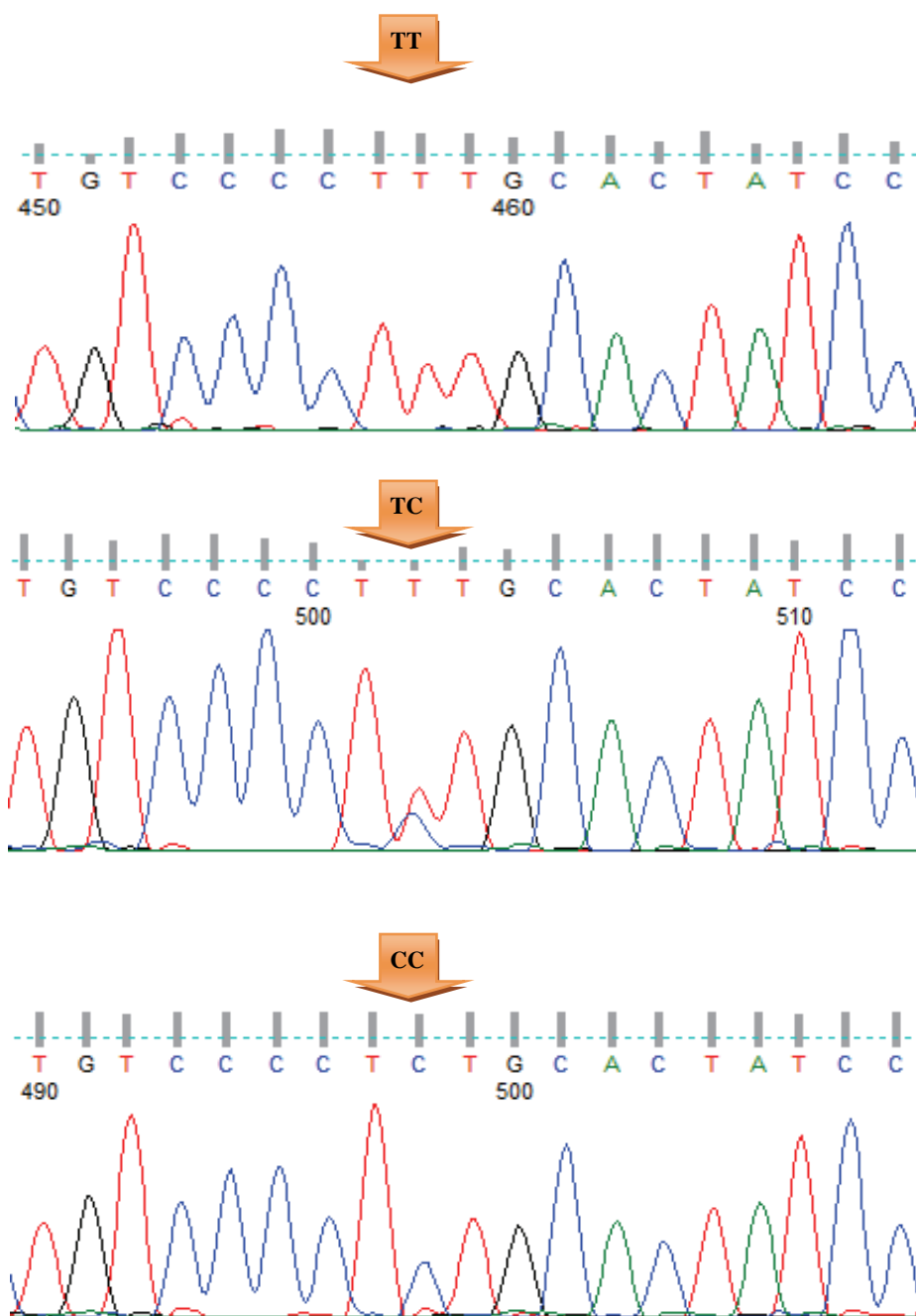
۱۰ ml خون وریدی از ورید آرنجی دست چپ در وضعیت نشسته گرفته شد و در لوله حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) ریخته شد. سپس پلاسمای مربوط به نمونه‌ها با Eppendorf 5702R Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۰۰۰ دور در دقیقه از سلول‌های خونی جداسازی شدند. استخراج و خالص‌سازی DNA سلول‌های یاد شده به کمک روش استاندارد نمک اشباع/ پروتئیناز K انجام شد.^{۳۳}

پس از کدگذاری نمونه‌ها، غلظت DNA هر نمونه با خواندن جذب نوری (Optical Density) آنها مشخص گردید و سپس در ۸-۲ °C نگهداری شد. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ناحیه ژنومی اگزون ۱۹، تنظیم و برای تمامی نمونه‌های بیمار، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد.

قطعه مورد نظر با دو پرایمر Forward با توالی 5'-GCCCTGGAGATAAGACGCTG-3' و پرایمر Reverse با توالی 5'-CAACCTCGCTACCCCTGATG-3' تکثیر شده و محصولات حاصل، روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ بارگذاری گردیدند، پس از الکتروفورز، به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند تا فرآیند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شده و از تکثیر قطعه مورد نظر اطمینان حاصل شود. نمونه‌های مثبت جهت تعیین توالی DNA به Bioneer (Bioneer Co., Daedeok-gu, Daejeon, Korea) ارسال شدند. توالی قطعه مورد نظر با استفاده از Chromas, version 2.33 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia) (DNASTAR software, Madison, WI, USA) و تطبیق با توالی طبیعی بررسی شدند. بررسی ارتباط جنسیت با جهش‌های اگزون مورد نظر، از آزمون همبستگی پیرسون

جدول ۱: درصد ال‌های وحشی و موتانت در افراد هموزیگوت طبیعی، هتروزیگوت و هموزیگوت غیرطبیعی و نیز در زنان و مردان در ناحیه rs2075912 و rs2075913 در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید

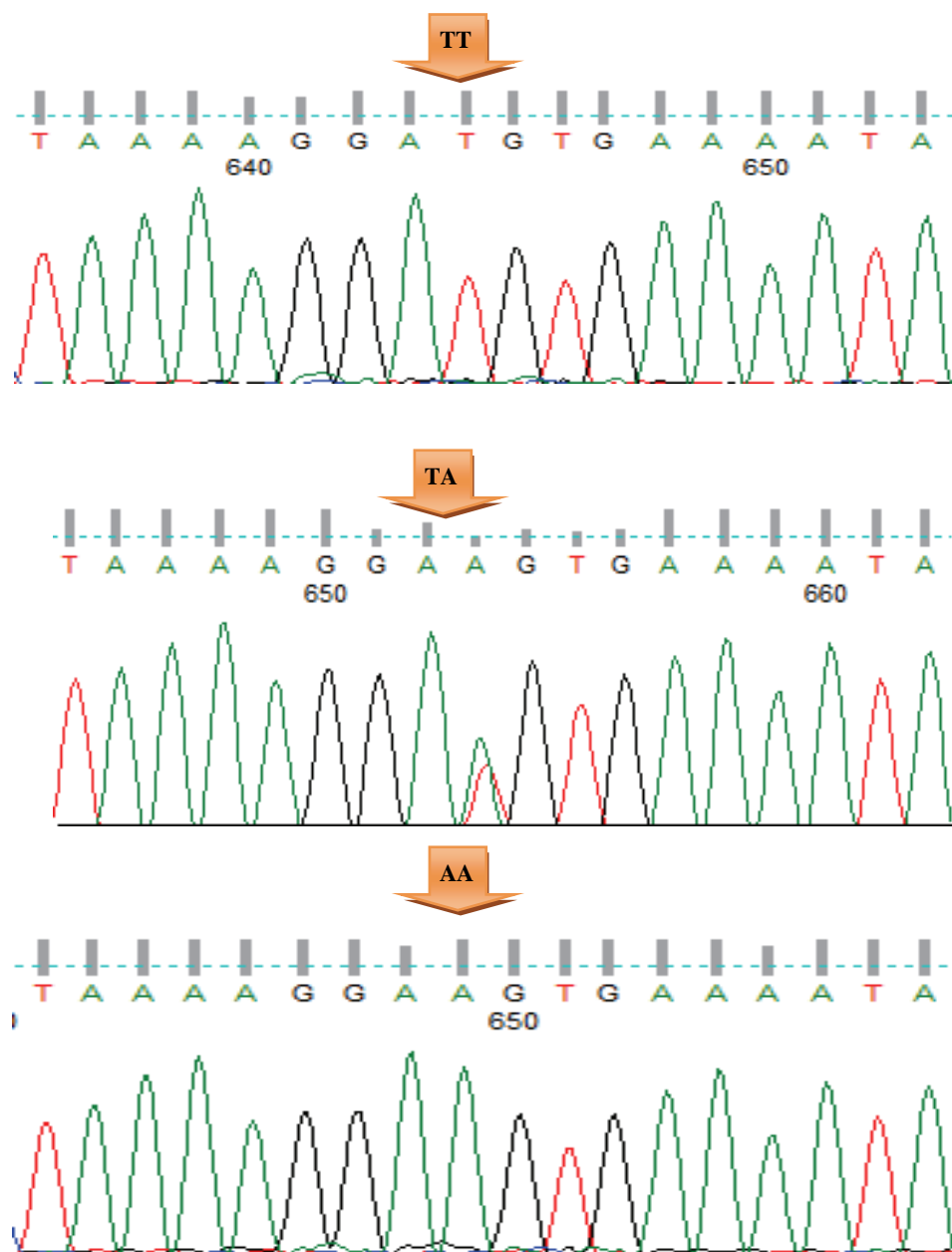
جایگاه جهش	جنس (تعداد)	درصد		
		هموزیگوت طبیعی TT	هتروزیگوت TC	هموزیگوت غیرطبیعی CC
rs2075912	زن (نفر ۶۱)	۹/۸	۲۷/۹	۶۲/۳
	مرد (نفر ۴۹)	۸/۲	۱۸/۴	۷۳/۵
rs2075913	زن (نفر ۶۱)	۱۱/۵	۳۷/۷	۵۰/۸
	مرد (نفر ۴۹)	۱۰/۲	۳۲/۷	۵۷/۱



شکل ۱: توالی نمونه هموزیگوت طبیعی (TT)، هتروزیگوت (TC) و هموزیگوت غیرطبیعی (CC) ناحیه rs2075912 پروتوآنکوژن RET

۰/۲۱۹۴ تا ۰/۱۷۵۳- برای ناحیه rs2075913 به دست آمد. دو نمونه از نتایج تعیین توالی مستقیم مربوط به دو تغییر نوکلئوتیدی یافت شده در اشکال ۱ و ۲ آورده شد.

مشاهده نشد، ($P=0/43$)، ضریب همبستگی ۰/۰۸۰ و محدوده اطمینان ۰/۲۷۳۶ تا ۰/۱۱۸۸- برای ناحیه rs2075912 و ($P=0/82$)، ضریب همبستگی ۰/۰۲۳ و محدوده اطمینان ۰/۹۵:



شکل ۲: توالی نمونه هموزیگوت طبیعی (TT)، هتروزیگوت (TA) و هموزیگوت غیرطبیعی (AA) ناحیه rs2075913 پروتوآنکوژن RET

بحث

داد. بر اساس راهنمای انجمن تیروئید آمریکا بررسی جهش در ژن RET برای تشخیص نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع ۲A، نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع ۲B و سرطان مدولاری تیروئید فامیلی در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید و غربالگری

یافته‌های این پژوهش، در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید دو جهش (W: T/A) و (Y: T/C) اگزون شماره ۱۹ ژن RET را نشان

الل جهش یافته (A) ۷۷٪، در جمعیت آسیایی، الل طبیعی (T) ۶۳٪ و الل جهش یافته (A) ۳۷٪ و در جمعیت اروپایی، الل طبیعی (T) ۲۴٪ و الل جهش یافته (A) ۷۶٪ گزارش شده است.^{۳۷} بر اساس داده‌های به‌دست آمده در این مطالعه، در بررسی جهش‌های پروتوآنکوژن RET در سرطان مدولاری تیروئید دو نکته حایز اهمیت است. اول اینکه بر اساس یافته‌های پژوهشگران کشورهای مختلف و نیز راهنماهای بالینی معتبر مانند راهنمای American Thyroid Association (ATA)، بررسی جهش‌های پروتوآنکوژن RET در سرطان مدولاری تیروئید و یا سندرم‌هایی که سرطان مدولاری هم وجود دارد، حایز اهمیت است. نکته دوم اینکه، تنوع جهش‌های یاد شده ناگزیر در تمامی جمعیت‌ها یکسان نبوده و بنابراین نیاز به بررسی و تایید در جمعیت‌های مختلف دارد.

پس بررسی تمامی نواحی این ژن در تمامی جمعیت‌ها توصیه می‌گردد. جهش‌های اگزون ۱۹ نیز در جمعیت ایرانی جهت تشخیص و یا تایید تشخیص سرطان مدولاری تیروئید کمک‌کننده خواهد بود. در پایان یادآوری می‌شود در این مطالعه توصیفی، تنها وجود و ارتباط جهش یا پلی‌مورفیسم بررسی شده است و نمی‌توان بیماری‌زا بودن جهش یا پلی‌مورفیسم را نتیجه‌گیری نمود.

در نهایت، علاوه بر جهش در اگزون‌های ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ ژن پروتوآنکوژن RET، به‌احتمال بتوان از جهش‌های اگزون ۱۹ نیز در تشخیص زود هنگام و تایید سرطان مدولاری تیروئید بهره گرفت.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی ارتباط جهش‌های اگزون ۱۹ ژن پروتوآنکوژن RET با سرطان مدولاری تیروئید در یک نمونه جمعیت ایرانی" مصوب شورای پژوهشی پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه شهید بهشتی تهران در سال ۹۳ می‌باشد. از حمایت پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه شهید بهشتی تهران در این خصوص سپاسگزاری می‌گردد.

بستگان درجه اول به عنوان شاخص خطر نئوپلاسم در اعضای خانواده، ضروری می‌باشد. به عبارتی این راهنما لزوم تجزیه و تحلیل جهش‌های ژن RET در سرطان مدولاری تیروئید را مورد تاکید قرار می‌دهد. جهش ژن RET یک عامل مهم برای بیمار و وابستگان وی در تصمیم‌گیری انجام عمل تیروئیدکتومی کامل یا جزیی و یا سن اقدام به جراحی می‌باشد.^{۳۴}

با توجه به شیوع جهش‌ها در اگزون‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۶ پروتوآنکوژن RET، در اکثر جمعیت‌ها بررسی سایر نواحی این ژن به فراموشی سپرده شده است. در مطالعه حاضر در بررسی جهش‌های اگزون ۱۹ ژن RET در دو جایگاه (Y:T/C) rs2075912 و (W:T/A) rs2075913 تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شد. جهش در جایگاه rs2075912 باعث تغییر نوکلئوتید تیمین به سیتوزین شده است همچنین در جایگاه rs2075913 تغییر نوکلئوتید تیمین به آدنین رخ داده است. در این مطالعه ارتباط معناداری بین سن و جهش‌ها و نیز بین جنسیت و جهش‌ها مشاهده نشد.

مطالعه مشابهی که توسط Kaldrymides و همکارانش در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در جمعیت یونانی صورت گرفته تغییراتی مشاهده نشده است.^{۳۳} در مطالعه‌ای که توسط Moore و همکارانش در بیماران مبتلا به نئوپلازی‌های متعدد اندوکراین نوع ۲B در آفریقای شمالی انجام شد، تغییرات IVS19-37G/C و D1017N مشاهده شده است.^{۳۵} تغییر نوکلئوتیدی rs2075912 در جمعیت‌های مختلف، متفاوت بروز کرده است، در جمعیت آفریقایی، الل طبیعی (T) ۷٪ و الل جهش یافته (C) ۹۳٪، در جمعیت آمریکایی، الل طبیعی (T) ۱۷٪ و الل جهش یافته (C) ۸۳٪، در جمعیت آسیایی، الل طبیعی (T) ۵۱٪ و الل جهش یافته (C) ۴۹٪ و در جمعیت اروپایی، الل طبیعی (T) ۵۱٪ و الل جهش یافته (C) ۴۹٪ گزارش شده است.^{۳۶}

بروز تغییر نوکلئوتیدی rs2075913 نیز در جمعیت‌های مختلف، متفاوت بوده است. در جمعیت آفریقایی، الل طبیعی (T) ۲۱٪ و الل جهش یافته (A) ۷۹٪، در جمعیت آمریکایی، الل طبیعی (T) ۲۳٪ و

References

- Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikhol Eslami S, Rezghi Barez S, Hoghoghi Rad L, Azizi F. Predominant RET germline muta-

tions in exons 10, 11, and 16 in Iranian patients with hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Thyroid Res* 2011;2011:264248.

2. El-Gendia SM, El Tawila GH, Bessab SS, Kobilc AM. Immunohistochemical expression of CD44v6 in differentiated thyroid carcinomas. *Alexandria J Med* 2010;48(3):241-9.
3. Brown RL, de Souza JA, Cohen EE. Thyroid cancer: burden of illness and management of disease. *J Cancer* 2011;2:193-9.
4. Saad MF, Ordonez NG, Rashid RK, Guido JJ, Hill CS Jr, Hickey RC, et al. Medullary carcinoma of the thyroid. A study of the clinical features and prognostic factors in 161 patients. *Medicine (Baltimore)* 1984;63(6):319-42.
5. Raue F, Kotzerke J, Reinwein D, Schroder S, Roher HD, Deckart H, et al. Prognostic factors in medullary thyroid carcinoma: evaluation of 741 patients from the German Medullary Thyroid Carcinoma Register. *Clin Investig* 1993;71(1):7-12.
6. Gilliland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. *Cancer* 1997;79(3):564-73.
7. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JB, Gardner E, et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet* 1994;6(1):70-4.
8. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 1996;276(19):1575-9.
9. Eng C, Mulligan LM, Healey CS, Houghton C, Frilling A, Raue F, et al. Heterogeneous mutation of the RET proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(9):2167-70.
10. Marsh DJ, Learoyd DL, Andrew SD, Krishnan L, Pojer R, Richardson AL, et al. Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;44(3):249-57.
11. Romei C, Elisei R, Pinchera A, Ceccherini I, Molinaro E, Mancusi F, et al. Somatic mutations of the ret protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma are not restricted to exon 16 and are associated with tumor recurrence. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(4):1619-22.
12. Siqueira DR, Romitti M, da Rocha AP, Ceolin L, Meotti C, Estivalet A, et al. The RET polymorphic allele S836S is associated with early metastatic disease in patients with hereditary or sporadic medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2010;17(4):953-63.
13. Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, et al. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(4):1579-83.
14. Borrello MG, Smith DP, Pasini B, Bongarzone I, Greco A, Lorenzo MJ, et al. RET activation by germline MEN2A and MEN2B mutations. *Oncogene* 1995;11(11):2419-27.
15. Frank-Raue K, Buhr H, Dralle H, Klar E, Senninger N, Weber T, et al. Long-term outcome in 46 gene carriers of hereditary medullary thyroid carcinoma after prophylactic thyroidectomy: impact of individual RET genotype. *Eur J Endocrinol* 2006;155(2):229-36.
16. Machens A, Gimm O, Hinze R, Hoppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(3):1104-9.
17. Pinales MK, Graf H, Gross JL, Maia AL. RET codon 634 mutations in multiple endocrine neoplasia type 2: variable clinical features and clinical outcome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(6):2644-9.
18. Ghazi AA, Bagheri M, Tabibi A, Sarvghadi F, Abdi H, Hedayati M, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2A in an Iranian family: clinical and genetic studies. *Arch Iran Med* 2014;17(5):378-82.
19. Majidi M, Haghpanah V, Hedayati M, Khashayar P, Mohajeri-Tehrani MR, Larijani B. A family presenting with multiple endocrine neoplasia type 2B: A case report. *J Med Case Rep* 2011;5:587.
20. Alvandi E, Akrami SM, Chiani M, Hedayati M, Nayer BN, Tehrani MR, et al. Molecular analysis of the RET proto-oncogene key exons in patients with medullary thyroid carcinoma: a comprehensive study of the Iranian population. *Thyroid* 2011;21(4):373-82.
21. Hedayati M, Nabipour I, Rezaei-Ghaleh N, Azizi F. Germline RET mutations in exons 10 and 11: an Iranian survey of 57 medullary thyroid carcinoma cases. *Med J Malaysia* 2006;61(5):564-9.
22. Donis-Keller H. The RET proto-oncogene and cancer. *J Intern Med* 1995;238(4):319-25.
23. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363(6428):458-60.
24. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJ, et al. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J Intern Med* 1995;238(4):343-6.
25. Waguespack S, Wells S, Ross J, Bleyer A. Thyroid cancer. In: Bleyer A, O'Leary M, Barr R, Ries LAG, editors. *Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15 to 29 Years of Age, Including SEER Incidence and Survival: 1975-2000*. Bethesda, Md, USA: National Cancer Institute; 2006. p. 143-54.
26. Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, Duskova J, Vlcek P, Ryska A, et al. New multiple somatic mutations in the RET proto-oncogene associated with a sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 2006;16(3):311-6.
27. Zarif-Yeganeh M, Sheikholeslami S, Dehbashi-Behbahani G, Farashi S, Azizi F, et al. Point mutations in RET proto-oncogene exon 10 in patients with medullary thyroid carcinoma. *J Kerman Univ Med Sci* 2015;22(3):249-60.
28. Sheikholeslami S, Zarif Yeganeh M, Haghoghgi Rad L, Golab Ghadaksaz H, Hedayati M. Haplotype frequency of G691S/S904S in the RET Proto-oncogene in patients with medullary thyroid carcinoma. *Iranian J Publ Health* 2014;43(2):235-40.
29. Zarif Yeganeh M, Sheikholeslami S, Dehbashi Behbahani G, Farashi S, Hedayati M. Skewed mutational spectrum of RET proto-oncogene Exon10 in Iranian patients with medullary thyroid carcinoma. *Tumour Biol* 2015 Feb 20.
30. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia: syndromes of the twentieth century. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(8):2617-20.
31. Da Silva AM, Maciel RM, Da Silva MR, Toledo SR, De Carvalho MB, Cerutti JM. A novel germ-line point mutation in RET exon 8 (Gly(533)Cys) in a large kindred with familial medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5438-43.
32. Kaldrymides P, Mytakidis N, Anagnostopoulos T, Vassiliou M, Tertipi A, Zahariou M, et al. A rare RET gene exon 8 mutation is found in two Greek kindreds with familial medullary thyroid carcinoma: implications for screening. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64(5):561-6.
33. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.
34. de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev* 2006;27(5):535-60.
35. Moore SW, Zaahl MG. Chasing the ubiquitous RET proto-oncogene in South African MEN2 families: Implications for the surgeon. *S Afr J Surg* 2010;48(4):127-31.
36. The Ensemble Project. rs2075912 SNP. [Internet] May 2015 [cited 2015 May 8]. Available from: http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=10:43126269-43127269;v=rs2075912;vdb=variation;vf=1393798
37. The Ensemble Project. rs2075913 SNP. [Internet] May 2015 [cited 2015 May 8]. Available from: http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=10:43126420-43127420;v=rs2075913;vdb=variation;vf=1393799

Germline mutation of exon 19 of RET proto-oncogene in an Iranian population with Medullary thyroid cancer

Hoda Golab Ghadaksaz M.Sc.¹
Mahmood Dehghani Ashkezari Ph.D.¹
Mehdi Hedayati Ph.D.^{2*}

1- Department of Biology, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Iran.

2- Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, No. 24, Alley Parvaneh, Yaman Ave., Velenjak Ave., Chamran High way, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 22432498
E-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

Abstract

Received: 28 Jan. 2015 Accepted: 01 Jun. 2015 Available online: 01 Aug. 2015

Background: Medullary thyroid cancer (MTC), includes 5-10% of all the thyroid cancers. RET proto-oncogene mutations have been found in association with MTC development. Therefore, identification of the mutations in RET can allow early diagnosis of the families who are at the risk of the disease. The goal of this study was to investigate existence and association between mutations in exon 19 of the RET proto-oncogene in an Iranian population medullary thyroid cancer patients and their family members.

Methods: This study was run in the research laboratory of Research Institute for Endocrine Research Center Shahid Beheshti University of Medical Sciences from May, 2013 to May, 2014. In this study, 110 patients with confirmed medullary thyroid carcinoma were selected and examined. At first, the genomic DNA content of the peripheral white blood cells (WBC) of the samples were extracted using a saturated salting out and proteinase K standard method. Exon 19 of the RET proto-oncogene using polymerase chain reaction (PCR) method was amplified. Then the desired PCR products formation was confirmed by electrophoresis technique for true amplification, and finally the amplified samples were used for direct sequenced for finding and assessing any possible mutations

Results: In this study, two nucleotide changes at position rs2075912 (Y: T/C) and position rs2075913 (W: T/A) exon 19 RET proto-oncogene were found in the patients with medullary thyroid cancer. The frequency of both nucleotide changes were higher in men than women with medullary thyroid cancer. The frequency of the rs2075912 and rs2075913 were 11.2 and 6.3% higher in men than women. But in statistical analysis, there was no association between age, sex and the founded two mutations.

Conclusion: In addition to mutations in other exons of proto-RET, mutations in exon 19 can also be used for early detection and confirmation of medullary thyroid carcinomas.

Keywords: medullary thyroid cancer, polymerase chain reaction, RET- proto-oncogene.