جهش‌های ژرم‌لاین اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروییید در جمعیت ایرانی

مرجان ظریف یگانه[۱]، سمیرا کبیری[۲]، سارا شیخ‌الاسلامی[۱]، حسنا حسان منش[۲]، مهدی هدایتی[۱*]

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲- گروه زیست‌شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آذربایجان شرقی، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، تهران، ایران.
تلفن: ۲۲۴۳۲۵۰۰ -۰۲۱
E-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۱۸ ویرایش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲۷ آنلاین: ۱۳۹۵/۱۲/۲۸

زمینه و هدف: سرطان تیروییید شایعترین سرطان غدد درون‌ریز می‌باشد. ۱۰-۵٪ کل انواع سرطان‌های تیروییید را سرطان مدولاری تیروییید تشکیل می‌دهد. وجود جهش‌های پروتوآنکوژن RET به‌ویژه در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ و ۱۶ در ایجاد سرطان مدولاری تیروییید به‌خوبی نشان داده شده است. بنابراین، شناسایی جهش‌های این ژن امکان تشخیص زود هنگام بیماری را برای افرادی که علایم بیماری را بروز نداده‌اند، ایجاد می‌کند. هدف از مطالعه حاضر، تعیین جهش اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروییید و اعضای درجه یک خانواده آنان در جمعیت ایرانی بود.

روش بررسی: مطالعه حاضر بر روی ۳۱۱ نفر (۱۹۰ بیمار و ۱۲۱ نفر اعضای خانواده آن‌ها) به‌روش نمونه‌گیری ساده با تشخیص پاتولوژی و ارجاع به پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد (مهرماه ۱۳۹۲ تا ۱۳۹٤). محتوای DNA ژنومی با روش استاندارد نمک اشباع/پروتیینازکا استخراج شد. تعیین جهش اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET با استفاده از روش PCR-Sequencing انجام شد.

یافته‌ها: تعداد ۲۰ جهش بدمعنی در کدون ۹۸۲ شامل c.2944C>T, CGC>TGC، p.Arg982Cys (rs17158558) اگزون ۱۸ پروتوآنکوژن RET یافت گردید، از این تعداد، ۱٦ جهش هتروزیگوت و چهار جهش هموزیگوت بودند. همچنین، ۱٥٤ تغییر نوکلئوتیدی G>A (rs2742236) در اینترون ۱۸ و چهار تغییر نوکلئوتیدی C>T (rs370072408) در اینترون ۱۷ مشاهده شد. در اگزون ۱۷ جهشی یافت نگردید.

نتیجه‌گیری: از آن‌جایی‌که جهش یافت شده در کدون ۹۸۲ اگزون ۱۸، جز جهش‌های بدمعنی بوده و منجر به تغییر اسیدآمینه آرژینین به سیستئین در ساختار پروتیین تیروزین‌کیناز RET می‌گردد و همچنین با توجه به امتیاز SIFT(0.01) و Polyphen(0.955) این جهش، می‌توان آن‌را جز جهش‌های خطرناک درنظر گرفت. ازطرفی چون فراوانی این جهش در بین بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروییید در این مطالعه ٦/٤٪ محاسبه گردید، از این‌رو در صورت تایید پاتوژن بودن این جهش، احتمالا بررسی اگزون ۱۸ نیز جز آزمایش ژنتیکی غربالگری RET مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان مدولاری تیروییید، جهش ژرم‌لاین، پروتوآنکوژن RET.

مقدمه

سرطان تیروییید شایعترین تومور بدخیم سیستم اندوکرین می‌باشد و حدود ۱٪ تمامی سرطان‌ها در انسان را شامل می‌شود.[۱] سرطان مدولاری تیروییید (Medullary thyroid carcinoma, MTC) توموری بدخیم، برگرفته از سلول‌های پارافولیکولار C بوده و ۱۰-۵٪ کل انواع سرطان‌های تیروییید را شامل می‌شود.[۲و۳] سرطان مدولاری تیروییید به دو صورت تک‌گیر (Sporadic) ۷۵٪ و ارثی (Hereditary) ۲۵٪

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

می‌باشد. نوع ارثی به سه صورت سندرم نئوپلازی اندوکرین چندگانه (Multiple endocrine neoplasia type 2) نوع MEN2A ،MEN2B و سرطان مدولاری تیرویید خانوادگی (Familial MTC, FMTC) است.[۴و۵] سرطان مدولاری تیرویید ارثی به وسیله جهش‌های ژرم‌لاین در پروتوآنکوژن RET ایجاد می‌شود، جهش‌های سوماتیکی این ژن در سرطان مدولاری تیرویید تک‌گیر دخالت دارد.[۶] نوع ارثی این بیماری دارای الگوی وراثتی اتوزوم بارز با نفوذ متغیر و وابسته به سن می‌باشد.[۷و۸]

پروتوآنکوژن RET در ناحیه کروموزومی 10q11.21 قرار گرفته و دارای ۲۱ اگزون است. این ژن یک گیرنده‌ی تیروزین کیناز غشایی را رمز می‌کند که در انتقال سیگنال‌های رشد و تمایز سلول دارای اهمیت است. نقش این ژن در فرآیند تکامل جنین به ویژه تکامل کلیه و سلول‌های منشاء گرفته از ستیغ عصبی مشخص شده است.[۲و۳و۹و۱۰] گیرنده RET دارای ناحیه‌ای غنی از سیستئین و چهار جایگاه شبه کادهرین و یک جایگاه اتصال به کلسیم در بخش خارج سلولی، و بخش تیروزین کینازی در داخل سلول و یک ناحیه داخل غشایی، می‌باشد. با اتصال لیگاندهایی مانند Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) به این گیرنده، دو ناحیه کاتالیتیکی آن کنار هم قرار گرفته، پروتیین RET دایمر شده و سپس ترانس فسفوریلاسیون واحدهای تیروزین آن روی می‌دهد که باعث انتشار سیگنال به داخل سلول می‌گردد.[۱۱-۱۴]

از بین رفتن عملکرد پروتوآنکوژن RET منجر به ایجاد بیماری‌هایی مانند هیرشپرونگ و افزایش فعالیت آن باعث ایجاد سرطان می‌شود.[۳و۱۰] از آن‌جایی‌که RET یک پروتوآنکوژن است، جهش در یک آلل آن برای ایجاد تغییرات نئوپلاستی کفایت می‌کند.[۴] شایعترین جهش‌ها در ژن RET. در کدون‌های سیستئینی ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰ (اگزون ۱۰) و ۶۳۰، ۶۳۴ (اگزون ۱۱) و برخی کدون‌های غیر سیستئینی مثل کدون ۸۰۴ (اگزون ۱۴)، ۸۸۳ (اگزون ۱۵) و ۹۱۸ (اگزون ۱۶) یافت شده و احتمالا قدرت آنکوژنی متفاوت جهش‌های RET به جایگاه تغییر اسید آمینه بستگی دارد که باعث ایجاد فنوتیپ‌های گوناگون در سرطان مدولاری تیرویید می‌شود.[۱۵-۱۸] بررسی‌های ژنتیکی به‌ویژه برای اعضا درجه اول بیماران مهم است. اگر در اعضا درجه اول آن‌ها جهش دیده نشود احتمال بروز بیماری در آن‌ها مانند جمعیت عادی بوده و نیازی به انجام اقدامات پیشگیرانه مانند تیروییدکتومی ندارند.[۴و۹] از آن‌جایی‌که تاکنون در ایران مطالعه‌ای در زمینه بررسی جهش در اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET صورت نگرفته است،[۷و۲۲-۱۷] مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی جهش‌های ژرم‌لاین اگزون ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیرویید در جمعیت ایرانی به انجام رسید.

روش بررسی

غربالگری ژنتیکی جهش‌های پروتوآنکوژن RET به‌منظور مدیریت بهینه در درمان بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیرویید و پیشگیری از بروز این بیماری در اعضای خانواده بیماران، از سال ۱۳۸۰ تاکنون در پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (به‌عنوان یک مرکز ارجاعی) در حال اجرا می‌باشد. مطالعه توصیفی-مقطعی حاضر نیز بخشی از پروژه تحقیقاتی در زمینه بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیرویید در این مرکز بود (مهرماه ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴).

جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش شامل ۳۱۱ نفر از بیماران و خویشاوندان درجه اول آن‌ها به روش نمونه‌گیری آسان انتخاب شدند. این افراد به صورت داوطلبانه و پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه وارد مطالعه شدند که از این تعداد ۱۹۰ بیمار و ۱۲۱ نفر از اعضای درجه اول خانواده آن‌ها بودند.

بررسی ژنتیکی: پس از تهیه ml ۱۰ خون محیطی از افراد، DNA ژنومی به روش نمک اشباع/پروتیناز کا استخراج شد. برای تکثیر اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ با استفاده از روش PCR از پرایمرهای اختصاصی ('3- F5'-GTCCCACGAGGCTCAGAGAT) و (R5'- 'CCTCCCATGCCTGTCTGTAG-3') برای اگزون ۱۸ و پرایمر (F5'- CTTCCCCACCTTCATGCTAC -3') و (5'- 'CCTCCCTAAGTGTCCTGCTG-3') برای اگزون ۱۷ استفاده شد. واکنش PCR در حجم µl ۳۵ با شرایط زیر انجام گرفت: Tag DNA Polymerase (0.5 U)، dNTP(142.85 µm)، 5.75) Tric-Hcl pH=9 (Mm، KCl (17.14 Mm)، MgCl2 (0.85 Mm) و µl ۱ از پرایمرهای رفت و برگشت (pmol/µl) ۱۰، نمونه DNA (ng/µl) ۱۰۰ و µl ۳۲ آب مقطر استریل. واکنش در ترموسایکلر اتوماتیک انجام شد (peqSTAR 96X HP, Peclab Co, Germany) شرایط PCR برای

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

اگزون ۱۸ شامل ۳۰ چرخه دمایی $94^{\circ}C$ ٤ به مدت ۱۰ دقیقه برای دناتوراسیون اولیه، دمای $94^{\circ}C$ ٤ به مدت ٤٥ ثانیه برای دناتوراسیون دوم، دمای $60^{\circ}C$ ٦ به مدت ٤٥ ثانیه برای اتصال پرایمرها، $72^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه برای تکثیر و $72^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی بود.

شرایط PCR برای اگزون ۱۷ شامل ۳۰ چرخه دمایی $94^{\circ}C$ ٤ به مدت ۱۰ دقیقه برای دناتوراسیون اولیه، دمای $94^{\circ}C$ ٤ به مدت ٤٥ ثانیه برای دناتوراسیون دوم، دمای $62/3^{\circ}C$ ٦۲/۳ به مدت ٤٥ ثانیه برای اتصال پرایمرها، $72^{\circ}C$ ۷۲ به مدت یک دقیقه برای تکثیر و $72^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی بود. به منظور رویت قطعات، از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده گردید و نمونه‌های مناسب جهت تعیین ژنوتایپ، تعیین توالی شدند. کروماتوگرام‌های سکانس به‌منظور مقایسه با سکانس ژن رفرانس از Chromas software, version 2.33 (www.technelysium.com.au/chromas.html) استفاده شد.

یافته‌ها

جمعیت مورد مطالعه شامل ۳۱۱ نفر بود (۱۷۰ زن و ۱٤۱ مرد) که از این تعداد ۱۹۰ نفر مبتلا به سرطان مدولاری تیروییدو ۱۲۱ نفر اعضا درجه اول بیماران بودند. از ۱۹۰ فرد بیمار، ۱۰٦ بیمار زن و ۸٤ بیمار مرد بودند. از ۱۲۱ نفر اعضا خانواده بیماران نیز ٦٤ نفر زن و ۷٥ نفر مرد بودند. از ۱۹۰ فرد مبتلا ۳٤ نفر سرطان مدولاری خانوادگی و هفت نفر نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع A، سه نفر نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع B، یک نفر فئوکروموسیتوما و ۱٤٥ نفر مبتلا به سرطان مدولاری تک‌گیر بودند. میانگین سنی در این جمعیت ۱٥/۲±۳٤/٥ سال و حداکثر سن ۷۱ سال و کمترین سن یک سال بود.

در جمعیت مورد بررسی، تعداد ۲۰ جهش بدمعنی در کدون ۹۸۲: p.Arg982Cys ،c.2944C>T, CGC>TGC (rs:17158558)، یافت گردید که ۱۳ مورد از این جهش‌ها در بیماران و هفت مورد آن‌ها در اعضای خانواده آنان مشاهده شد. از این تعداد پنج مورد در زنان و ۱٥ مورد در مردان بود. در اگزون ۱۷ نیز جهشی مشاهده نشد. فراوانی آللی برای آلل نرمال در کدون ۹۸۲، ۹٦٪ و برای آلل جهش یافته در این کدون، ٤٪ بود. در گروه مورد بررسی، اگزون‌های اصلی ژن RET نیز تعیین جهش شده بودند (اگزون‌های ۱۰، ۱۱، ۱٦) و پس از مقایسه داده‌های اگزون ۱۸، مشخص شده که تمامی افراد دارای جهش در کدون ۹۸۲، دارای هاپوتایپ G691S/S904S (اگزون‌های ۱۱/۱٥) بودند. همچنین در این افراد، تعداد هفت جهش Hotspot به‌ترتیب شامل: یک مورد C620G (اگزون ۱۰)، یک مورد C630Y (اگزون ۱۱)، سه مورد C634F (اگزون ۱۱) و دو مورد R886Q (اگزون ۱٥) شناسایی گردید.

تغییر نوکلئوتیدی G>A در اینترون ۱۸ (rs2742236) با فراوانی آللی ۷۱٪ برای آلل G و ۲۹٪ برای آلل A در ۸۹ بیمار و ٦٥ نفر از اعضای خانواده شناسایی گردید. همچنین چهار تغییر نوکلئوتیدی C>T (rs370072408) در سه فرد بیمار و نفر از اعضای خانواده و دو تغییر نوکلئوتیدی A>G (rs72781242) نیز در اینترون ۱۷، تنها در اعضای خانواده بیماران یافت گردید.

بحث

در پژوهش حاضر در اگزون ۱۸ ژن پروتوآنکوژن RET تعداد ۲۰ جهش بدمعنی در کدون ۹۸۲ این ژن شناسایی شد، این جهش منجر به تغییر اسیدآمینه آرژینین به سیستئین شده که طی آن آلل C به T تبدیل می‌شود (CGC 982 TGC). از این تعداد جهش، هشت جهش در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تک‌گیر، پنج جهش در بیماران سرطان مدولاری خانوادگی و هفت جهش در اعضای خانواده بیماران بود. در اگزون ۱۷ این ژن نیز جهشی یافت نگردید.

جهش‌های سوماتیک و ژرم‌لاین پروتوآنکوژن RET در ایجاد سرطان مدولاری تیروییدبه خوبی شناخته شده است.[۲۳] تاکنون مطالعات زیادی بر روی اگزون‌های ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱٤، ۱٥ و ۱٦ این ژن صورت گرفته است که جهش‌های ژرم‌لاین اگزون‌های ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱٤ و ۱٥ RET بیش از سایرین در بروز سندرم‌های نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع A و سرطان مدولاری خانوادگی موثر بوده است.[۲٤]

در واقع، بیشترین جهش‌های بدمعنی در نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع A و سرطان مدولاری خانوادگی در توالی‌های سیستئینی حفاظت شده در کدون‌های ٦۰۹، ٦۱۱، ٦۱۸، ٦۲۰ (اگزون ۱۰) و کدون‌های ٦۳۰ یا ٦۳٤ (اگزون ۱۱) و یا در ناحیه

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

جدول ۱: انواع جهش‌های گزارش شده در اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET.[۳۰-۲۷]

فنوتایپ مرتبط	کدون	تغییر اسید آمینه	نوع جهش	واریانت	اگزون‌ها
کارسینومای پوست	۹۳۶	Ser/Phe	واریانت بد معنی	COSM3437797, COSM3437798	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۴۰	Leu/Leu	واریانت هم‌معنی	rs780967888	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۴۱	Leu/Leu	واریانت هم‌معنی	rs747696868	
بیماری هیرشپرونگ	۹۴۲	Trp/*	ایجاد کدون پایان	KinMutBase_RET_DNA:g.47631G>A, CM951129	
Aganglionosis, total colonic	۹۴۲	Trp/Cys	واریانت بد معنی	KinMutBase_RET_DNA:g.47632G>C, CM001787	
بیماری هیرشپرونگ	۹۴۳	GCTGTG^(943)GAGggagATCG	درج شدگی	CI094261	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۴۴	Ile/Ser	واریانت بد معنی	rs794728686	
کارسینومای روده بزرگ، ملانومای بدخیم	۹۴۴	Ile/Ile	واریانت هم‌معنی	COSM3437800	
کارسینومای کلیه	۹۴۴	Ile/Met	واریانت بد معنی	COSM1675176, COSM1675177	
کارسینومای روده بزرگ، ملانومای بدخیم	۹۴۴	Ile/Ile	واریانت هم‌معنی	COSM3437799, rs755606269	
Thymoma	۹۴۵	Val/Met	واریانت بد معنی	rs587780811, COSM5095531, COSM5095530	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۴۶	Thr/Ile	واریانت بد معنی	rs794728687	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۴۷	c.2839del C (Leu/X)	تغییر در چارچوب خوانش	rs794728691	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۴۸	Gly/Gly	واریانت هم‌معنی	rs749196396	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۴۹	c.2846delG (Gly/X)	تغییر در چارچوب خوانش	rs794728689	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۵۰	Asn/Ile	واریانت بد معنی	rs770639985	اگزون شماره ۱۷
سرطان پستان	۹۵۱	P951fs*	حذف و تغییر در چارچوب خوانش	COSM5212496	
سرطان پستان	۹۵۱	c.2850_2856delCCCCTAT, P951fs*12	حذف	COSM5212495	
تومور روده بزرگ	۹۵۱	Pro/Ala	واریانت بد معنی	COSM5140267, COSM5140266	
بیماری هیرشپرونگ	۹۵۳	Pro/Leu	واریانت بد معنی	CM119579	
بیماری هیرشپرونگ	۹۵۴	Gly/Gly	واریانت هم‌معنی	CM033980	
بیماری هیرشپرونگ	۹۵۴	ATCCT^(954)GGGATtTCC	درج‌شدگی	CI951972	
بدخیمی روده بزرگ، اندومتریوم	۹۵۹	Arg/Trp	واریانت بد معنی	rs587778658, COSM918126, COSM1584948	
بدخیمی روده بزرگ	۹۵۹	Arg/Gln	واریانت بد معنی	rs745650861, COSM1223555	
بیماری هیرشپرونگ	۹۶۱	Ph/Leu	واریانت بد معنی	CM033981	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۶۲	Asn/Ser	واریانت بد معنی	rs369804828	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۶۲	Asn/Asn	واریانت هم‌معنی	rs772329940	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۶۴	Leu/Leu	واریانت هم‌معنی	rs533682776	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۶۶	Thr/Ile	واریانت بد معنی	rs760765930	
بدخیمی تخمدان	۹۶۶	Thr/Thr	واریانت هم‌معنی	COSM80440, rs373693875	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۶۷	Gly/Ser	واریانت بد معنی	rs777007074	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۶۸	His/Tyr	واریانت بد معنی	rs762448300	
Aganglionosis, total colonic	۹۶۹	Arg/Trp	واریانت بد معنی	CM001788, KinMutBase	

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

ادامه جدول ۱

فنوتایپ مرتبط	کدون	تغییر اسید آمینه	نوع جهش	واریانت	اگزون‌ها
بدخیمی روده بزرگ و دستگاه ادراری	۹۶۹	Arg/Gln	واریانت بد معنی	COSM1297245, COSM4721086	اگزون شماره ۱۷
بدخیمی ریه	۹۶۹	Arg/Leu	واریانت بد معنی	COSM3978500, COSM3978501	
بیماری هیرشپرونگ	۹۷۲	Arg/Gly	واریانت بد معنی	rs76534745, CM941247, KinMutBase_RET_DNA:g.47720A>G	
بیماری هیرشپرونگ	۹۷۳	Pro/Lue	واریانت بد معنی	CM941248, KinMutBase_RET_DNA:g.47724C>T	
بدخیمی روده بزرگ	۹۷۴	Asp/Asp	واریانت هم معنی	COSM20434	
نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع 2A	۹۷۷	Ser/Arg	واریانت بد معنی	rs375414982	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۷۸	Glu/Lys	واریانت بد معنی	rs758800351	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۷۹	Glu/Gly	واریانت بد معنی	rs752352085	
بدخیمی روده بزرگ	۹۸۰	Met/Thr	واریانت بد معنی	KinMutBase_RET_DNA:g.47745T>C, rs794728688, CM962699, COSM1675178, COSM1675179	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۸۱	Tyr/Tyr	واریانت هم معنی	rs147318495	
نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع 2A، بیماری هیرشپرونگ	۹۸۲	Arg/Cys	واریانت بد معنی	CM033451, KinMutBase_RET_DNA:g.48824C>T, rs17158558, COSM427546, COSM3997965	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۸۲	Arg/Leu	واریانت بد معنی	rs368550200	
بدخیمی ریه	۹۸۲	Arg/His	واریانت بد معنی	COSM1264016, rs368550200	
بدخیمی روده بزرگ	۹۹۱	Glu/Lys	واریانت بد معنی	COSM1957271, COSM1957272	
بیماری هیرشپرونگ، تومور کبد	۹۹۲	Pro/Leu	واریانت بد معنی	CM119580, rs758191409, COSM3665731, COSM3665730	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۹۴	Lys/Asn	واریانت بد معنی	rs199718928	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۹۶	Pro/Pro	واریانت هم معنی	rs145798106	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۹۹۷	Val/Leu	واریانت بد معنی	rs781236624	
بدخیمی دستگاه ادراری	۹۹۹	Ala/Glu	واریانت بد معنی	COSM3790782, rs748288493, COSM3790781	
نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع 2A	۹۹۹	Ala/Ala	واریانت هم معنی	rs376487144	اگزون شماره ۱۸
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۱۰۰۲	Ser/Arg	واریانت بد معنی	rs773872326	
بدخیمی‌های خونی	۱۰۰۲	Ser/Asn	واریانت بد معنی	rs763489828, COSM327231	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۱۰۰۲	Ser/Ser	واریانت هم معنی	rs370970483	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۱۰۰۶	Glu, Lys/Glu	حذف شدگی در چارچوب خوانش	rs775993413	
بدخیمی اندومتر	۱۰۰۶	Glu/Asp	واریانت بد معنی	COSM1584947, COSM918127	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۱۰۰۷	Lys/Glu	واریانت بد معنی	rs774840230	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۱۰۰۷	Lys/Met	واریانت بد معنی	rs759798237	
نئوپلازی چندگانه درونریز نوع 2A	۱۰۰۷	Lys/Asn	واریانت بد معنی	rs786204098	
بدخیمی ریه	۱۰۰۸	Met/Thr	واریانت بد معنی	COSM1187933	
سرطان مدولاری تیروئید	۱۰۰۹	Met/Val	واریانت بد معنی	CM109934	
معده	۱۰۰۹	Met/Val	واریانت بد معنی	COSM4014174, rs375213011	
معده	۱۰۰۹	Met/Val	واریانت بد معنی	COSM4014173	
عدم وجود فنوتایپ مشخص	۱۰۱۱	Lys/Glu	واریانت بد معنی	rs368345402	

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

خارج سلولی غنی از سیستئینی می‌باشند. همچنین برخی جهش‌ها در کدون‌های غیرسیستئین مانند کدون ۸۰٤ اگزون ١٤، کدون ۸۸۳ اگزون ۱۵ نیز در بیماران سرطان مدولاری خانوادگی و MEN2A مشاهده می‌گردد.[۲۵و۲۶]

بر اساس داده‌های پایگاه های اطلاعاتی dbSNP, Ensembl, human ،Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) genome mutation database (HGMD) تاکنون در اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET، تعداد ٦٦ نوع جهش شناسایی شده است،[۲۷-۳۰] (جدول ۱) که از این تعداد، ٤٤ نوع جهش بدمعنی، ١٤ نوع جهش خاموش، هفت نوع جهش حذف/اضافه و یک نوع جهش مربوط به کدون پایان زودرس می‌باشند. از این تعداد جهش گزارش شده، تعداد ٤٢ جهش مربوط به اگزون ۱۷ و ٢٤ جهش مربوط به اگزون ۱۸ ژن RET بوده است[۲۸و۳۰] (جدول ۱). شایعترین کدون‌های دارای جهش در اگزون ۱۷ شامل کدون ۹٤٤، ۹۵۱، ۹٦۹ و در اگزون ۱۸ کدون‌های ۹۸۲، ۱۰۰۲، ۱۰۰۷ و ۱۰۰۹ می‌باشند. بیشترین تعداد جهش‌های گزارش شده در اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ ژن RET در انواع مختلفی از بدخیمی‌ها و پس از آن بیماری هیرشپرونگ بوده است.[۳۱-۳٦] همانگونه که گفته شد در پژوهش اخیر، در اگزون ۱۷ ژن RET در جمعیت مورد بررسی جهشی یافت نگردید. اما در اگزون ۱۸ این ژن و در کدون ۹۸۲ c.2944C>T (p.Arg982Cys) تعداد ۲۰ جهش شناسایی شد. در زمینه بررسی اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ ژن RET در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیرویید مطالعات اندکی صورت گرفته است. بر اساس یک پژوهش که توسط Lindsey و همکاران در سال ۲۰۱۲، بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان مدولاری تیرویید در جمعیت برزیلی صورت گرفت، در نتیجه‌ی آنالیز گسترده ژن RET، پلی‌مورفیسمی جدید در اینترون ۱۷، همچنین جهش در کدون ۹۸۲ اگزون ۱۸ (rs17158558) و تغییر نوکلئوتیدی G>A (rs2742236) در اینترون ۱۸ این ژن، در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیرویید تک‌گیر (که فاقد جهش در اگزون‌های ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ١٤، ۱۵ یا ١٦ ژن RET بودند) گزارش گردید.[۳۷] این درحالی‌است که در مطالعه حاضر، هفت نفر از ۲۰ فرد دارای جهش یافت شده در کدون ۹۸۲، دارای جهش Hotspot در اگزون‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۵ بودند. مطالعات نشان داده است جهش c.2944C>T، p.Arg982Cys (rs:17158558) کدون ۹۸۲ در اگزون ۱۸ ژن RET که منجر به جایگزینی توالی سیستئین با آرژینین می‌گردد، در افراد مبتلا به بیماری هیرشپرونگ وجود دارد.[۳۸-٤۰] در مطالعه‌ای که توسط Romeo و همکاران بر روی بیماران مبتلا به هیرشپرونگ در جمعیت ایتالیا صورت گرفت، تغییر در کدون ۹۷۲ اگزون ۱۷ (AGG>GGG، rs76534745) ژن RET که سبب جانشینی آرژینین به گلایسین می‌گردد، در این بیماران مشاهده گردید.[٤۱]

در نتیجه بررسی وجود تغییرات تعداد کپی (CNVs) در برخی از ژن‌های مرتبط با بیماری هیرشپرونگ از جمله RET (اگزون‌های ۱-۲۱) در جمعیت اسپانیایی، جهش نقطه‌ایی هتروزیگوت در کدون ۹۵۳ c.2859T>A (p.Pro953Lys) اگزون ۱۷ ژن RET شناسایی گردید.[٤۲] در مطالعه‌ایی در فنلاند، جهش‌های جدیدی از جمله Frameshift-introducing insertion 47665insT در اگزون ۱۷ و جهش c.2944C>T، p.Arg982Cys (rs:17158558) در اگزون ۱۸ یافت گردید. دو جهش R982C و 47665insT با علایم بالینی سرطان مدولاری تیرویید ارتباط نداشتند، اما ارتباط آن‌ها با بیماری هیرشپرونگ خانوادگی گزارش شده است.[٤۳] از آن‌جایی که جهش یافت شده در کدون ۹۸۲ اگزون ۱۸، جز جهش‌های بدمعنی بوده و منجر به تغییر اسیدآمینه آرژینین به سیستئین در ساختار پروتیین تیروزین‌کیناز RET می‌گردد و همچنین با توجه به امتیاز SIFT(0.01) (امتیازی جهت پیش‌بینی تغییر اسید آمینه) و Polyphen(0.955) (امتیازی جهت پیش بینی، احتمال تاثیر تعویض آمینو اسید در تغییر ساختار و عملکر پروتیین) این جهش، می‌توان آن را جز جهش‌های خطرناک در نظر گرفت. از طرفی چون فراوانی این جهش در بین بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیرویید در جمعیت مورد بررسی، ٦/٤٪ محاسبه گردید، از این‌رو در صورت اثبات بیماری‌زا بودن جهش کدون ۹۸۲ c.2944C>T (p.Arg982Cys)، احتمالا بتوان بررسی ژنتیکی اگزون ۱۸ را نیز جز آزمایش ژنتیکی غربالگری RET مدنظرقرار داد. هر چند این امر به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری: هزینه‌های اجرای این پروژه توسط مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تامین شده است. نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس خود را از بیماران و خانواده آنان، پزشکان متخصص غدد و همچنین پرسنل محترم آزمایشگاه ژنتیک مولکولی ابراز می‌دارند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

References

1. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8(1):83-95.
2. Chang CF, Yang WS, Su YN, Wu IL, Chang TC. Mutational spectrum of multiple endocrine neoplasia type 2 and sporadic medullary thyroid carcinoma in taiwan. *J Formos Med Assoc* 2009;108(5):402-8.
3. Marsh DJ, Andrew SD, Eng C, Learoyd DL, Capes AG, Pojer R, et al. Germline and somatic mutations in an oncogene: RET mutations in inherited medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(6):1241-3.
4. Ainahi A, Kebbou M, Benabdeljalil N, Fechtali T, Timinouni M, Oufara S, et al. RET proto-oncogene mutation analysis in medullary thyroid carcinoma in Moroccan families: primilarly study. *Cong Int Biochimie* 2006;54-7.
5. Colombo-Benkmann M, Li Z, Riemann B, Hengst K, Herbst H, Keuser R, et al. Characterization of the RET protooncogene transmembrane domain mutation S649L associated with nonaggressive medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2008;158(6):811-6.
6. Figlioli G, Landi S, Romei C, Elisei R, Gemignani F. Medullary thyroid carcinoma (MTC) and RET proto-oncogene: mutation spectrum in the familial cases and a meta-analysis of studies on the sporadic form. *Mutat Res* 2013;752(1):36-44.
7. 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.
8. 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.
9. Kitamura Y, Goodfellow PJ, Shimizu K, Nagahama M, Ito K, Kitagawa W, et al. Novel germline RET proto-oncogene mutations associated with medullary thyroid carcinoma (MTC): mutation analysis in Japanese patients with MTC. *Oncogene* 1997;14(25):3103-6.
10. Sippel RS, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Current management of medullary thyroid cancer. *Oncologist* 2008;13(5):539-47.
11. Bethanis S, Koutsodontis G, Palouka T, Avgoustis C, Yannoukakos D, Bei T, et al. A newly detected mutation of the RET protooncogene in exon 8 as a cause of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hormones (Athens)* 2007;6(2):152-6.
12. Cosma MP, Cardone M, Carlomagno F, Colantuoni V. Mutations in the extracellular domain cause RET loss of function by a dominant negative mechanism. *Mol Cell Biol* 1998;18(6):3321-9.
13. Grimm J, Sachs M, Britsch S, Di Cesare S, Schwarz-Romond T, Alitalo K, et al. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J Cell Biol* 2001;154(2):345-54.
14. Lips CJ, Höppener JW, Thijssen JH. Medullary thyroid carcinoma: role of genetic testing and calcitonin measurement. *Ann Clin Biochem* 2001;38(Pt 3):168-79.
15. Machens A, Gimm O, Hinze R, Höppner 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.
16. Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype relationship in multiple endocrine neoplasia type 2. Implications for clinical management. *Hormones (Athens)* 2009;8(1):23-8.
17. Yeganeh MZ, 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;36(7):5225-31.
18. Hedayati M, Zarif Yeganeh M1, Sheikholeslami S1, Afsari F1. Diversity of mutations in the RET proto-oncogene and its oncogenic mechanism in medullary thyroid cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016;53(4):217-27.
19. Yeganeh MZ, Sheikholeslami S, Hedayati M. RET proto oncogene mutation detection and medullary thyroid carcinoma prevention. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(6):2107-17.
20. Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikholeslami S, Daneshpour M, Azizi F. Medullary Thyroid Cancer Screening Using the RET Proto Oncogene Genetic Marker. *Iran J Endocrinol Metab* 2015;17(2):157-70.
21. Sheikholeslami S, Zarif Yeganeh M, Hoghooghi Rad L, Golab Ghadaksaz H, Hedayati M. Haplotype frequency of G691S/S904S in the RET proto-oncogene in patients with medullary thyroid carcinoma. *Iran J Publ Health* 2014;43(2):235-40.
22. Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikhol Eslami S, Rezghi Barez S, Hoghooghi Rad L, Azizi F. Predominant RET germline mutations in Exons 10, 11, and 16 in Iranian Patients with Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma. *J Thyroid Res* 2011;2011:264248.
23. Kouvaraki MA, Shapiro SE, Perrier ND, Cote GJ, Gagel RF, Hoff AO, et al. RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid* 2005;15(6):531-44.
24. Zhou Y, Zhao Y, Cui B, Gu L, Zhu S, Li J, et al. RET proto-oncogene mutations are restricted to codons 634 and 918 in mainland Chinese families with MEN2A and MEN2B. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67(4):570-6.
25. Blank RD, Sklar CA, Dimich AB, LaQuaglia MP, Brennan MF. Clinical presentations and RET protooncogene mutations in seven multiple endocrine neoplasia type 2 kindreds. *Cancer* 1996;78(9):1996-2003.
26. Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 2000;37(11):817-27.
27. Human Genome Mutation Database [database on the Internet]. Available from: http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php.
28. SNP Database [database on the Internet]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.
29. Ensemble [database on the Internet]. Available from: www.http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table.
30. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [database on the Internet]. Available from: http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview
31. 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.
32. Giannakis M, Hodis E, Jasmine Mu X, Yamauchi M, Rosenbluh J, Cibulskis K, et al. RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nat Genet* 2014;46(12):1264-6.
33. Abaan OD, Polley EC, Davis SR, Zhu YJ, Bilke S, Walker RL, et al. The exomes of the NCI-60 panel: a genomic resource for cancer biology and systems pharmacology. *Cancer Res* 2013;73(14):4372-82.
34. Attié T, Pelet A, Edery P, Eng C, Mulligan LM, Amiel J, et al. Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 1995;4(8):1381-6.
35. Garcia-Barceló M, Sham MH, Lee WS, Lui VC, Chen BL, Wong KK, et al. Highly recurrent RET mutations and novel mutations in genes of the receptor tyrosine kinase and endothelin receptor B pathways in Chinese patients with sporadic Hirschsprung disease. *Clin Chem* 2004;50(1):93-100.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

36. Chakravarti A. Endothelin receptor-mediated signaling in hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 1996;5(3):303-7.
37. Lindsey SC, Kunii IS, Germano-Neto F, Sittoni MY, Camacho CP, Valente FO, et al. Extended RET gene analysis in patients with apparently sporadic medullary thyroid cancer: clinical benefits and cost. *Horm Cancer* 2012;3(4):181-6.
38. Mulligan LM, Eng C, Attié T, Lyonnet S, Marsh DJ, Hyland VJ, et al. Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the RET proto-oncogene. *Hum Mol Genet* 1994;3(12):2163-7.
39. Pasini B, Borrello MG, Greco A, Bongarzone I, Luo Y, Mondellini P, et al. Loss of function effect of RET mutations causing Hirschsprung disease. *Nat Genet* 1995;10(1):35-40.
40. Moore SW, Zaahl MG. A review of genetic mutation in familial Hirschsprung's disease in South Africa: towards genetic counseling. *J Pediatr Surg* 2008;43(2):325-9.
41. Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccherini I, et al. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 1994;367(6461):377-8.
42. Núñez-Torres R, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. A novel study of copy number variations in Hirschsprung disease using the multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique. *BMC Med Genet*. 2009 Nov 19;10:119.
43. Virtanen VB, Pukkala E, Kivisaari R, Salo PP, Koivusalo A, Arola J, et al. Thyroid cancer and co-occurring RET mutations in Hirschsprung disease. *Endocr Relat Cancer* 2013;20(4):595-602.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]

TUMJ Tehran University Medical Journal, March 2017; Vol. 74, No. 12: 852-860 Original Article

Germline mutation of RET proto-oncogene's exons 17 and 18 in Iranian medullary thyroid carcinoma patients

Marjan Zarif Yeganeh Ph.D. Student[1]
Samira Kabiri M.Sc.[2]
Sara Sheikholeslami Ph.D. Student[1]
Hosna Hesanmanesh M.Sc.[2]
Mehdi Hedayati Ph.D.[1*]

1- Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences and Metabolism, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Biology, Ahar Branch, Islamic Azad University, East Azerbaijan, Iran.

[*]Corresponding author: Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 22432500
E-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

Abstract

Received: 08 Aug. 2016 Revised: 08 Mar. 2017 Accepted: 17 Mar. 2017 Available online: 18 Mar. 2017

Background: Thyroid carcinoma is the most common endocrine malignancy. Medullary thyroid carcinoma (MTC) approximately accounts for 5-10% of all thyroid carcinoma. Nowadays, it is obviously, the mutations in REarranged during transfection (RET) proto-oncogene, especially, mutations in exons 10, 11 and 16 are associated with MTC pathogenesis and occurrence. Thus, early diagnosis of MTC by mutation detection in RET proto-oncogene allows to identify patients who do not have any developed symptoms. The aim of this study was to screening of germline mutations in RET proto-oncogene exons 17 and 18 in MTC patients and their first degree relatives in Iranian population.

Methods: In this cross-sectional study, three hundred eleven participates (190 patients, 121 their relatives) were referred to endocrine research center, Shahid Beheshti University of Medical Science during September 2013 until September 2015. The inclusion criteria were pathological and clinical diagnosis. After whole blood sampling, genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes using the standard Salting Out/Proteinase K method. Nucleotide change detection in exons 17 and 18 was performed using PCR and direct DNA sequencing methods.

Results: In this study, twenty missense mutations [CGC>TGC, c.2944C>T, p.Arg982Cys (rs17158558)] which included 16 heterozygote and 4 homozygote mutations were found in codon 982 (exon 18). In the present study, 154 G>A (rs2742236) and 4 C>T (rs370072408) nucleotide changes were detected in exons 18 and intron 17 respectively. There was no mutation in exon 17.

Conclusion: It seems that because of arginine to cysteine substitutions in RET tyrosine kinase protein structure and its polyphen score (0.955) and SIFT score (0.01) the mutation in codon 982 (exon 18) could be have pathogenic effects. On the other hands, the mentioned mutation frequency was 6.4% among MTC patients, so this mutation of exon 18 could be checked in genetic screening tests of RET proto-oncogene. Although this needs more study.

Keywords: cross-sectional studies, germline mutation, medullary thyroid carcinoma, RET proto-oncogene.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-19]