

## فراوانی هاپلوتایپ G691S/S904S پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در جمعیت ایرانی

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۷/۲۷ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۸/۲۰

**زمینه و هدف:** سرطان مدولاری تیروئید (MTC) به دو شکل اسپورادیک (۷۵٪) موارد ارثی (۲۵٪) بروز می‌کند. اثر جهش‌های بد معنی پروتوآنکوژن RET در پیشرفت بیماری به خوبی مشخص شده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی هاپلوتایپ G691S/S904S در بیماران MTC و خانواده آنها بود.

**روش بررسی:** مطالعه حاضر در طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۸۳ در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بر روی ۳۵۸ فرد شامل ۲۱۳ بیمار و ۱۴۵ نفر از اعضای خانواده آنها به انجام رسید. مولکول DNA ژنومیک این افراد از لکوسیت‌های خون محیطی به روش استاندارد نمک اشباع و پروتئیناز K استخراج شد. تغییرات نوکلئوتیدی به روش PCR و Direct DNA sequencing مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج حاصل از سکانس DNA، ۱۸۹ فرد (۱۱۹ بیمار، ۷۰ نفر اعضای خانواده) دارای جهش بدمعنی G691S (rs1799939) در اگزون ۱۱ و جهش هم‌معنی S904S (rs1800863) در اگزون ۱۵ پروتوآنکوژن RET بودند. فراوانی آلی هاپلوتایپ G691S/S904S در بیماران ۳۵/۰۲٪ و در اعضای خانواده آنها ۲۹/۹۲٪ بود.

**نتیجه‌گیری:** داده‌های به‌دست آمده نشان‌دهنده فراوانی هاپلوتایپ G691S/S904S ژن RET در میان بیماران MTC و اعضای خانواده آنها در جمعیت ایرانی می‌باشد. تغییرات نوکلئوتیدی G691S و S904S به‌طور کامل عدم تعادل پیوستگی را دارا می‌باشند. بنابراین نتایج آنها به شکل هاپلوتایپ گزارش شده است. بررسی ارتباط بین هاپلوتایپ ذکر شده و بروز بیماری MTC در مطالعات آتی می‌تواند در شناسایی اثرات احتمالی این هاپلوتایپ موثر باشد.

**کلمات کلیدی:** سرطان تیروئید، مدولاری، پروتوآنکوژن RET، هاپلوتایپ G691S/S904S.

سارا شیخ‌الاسلامی  
مرجان ظریف یگانه، لاله حقوقی راد  
مریم سادات دانشپور، مهدی هدایتی \*

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، مرکز  
تحقیقات جافی، پژوهشکده غدد درون‌ریز و  
متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،  
تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه شهید چمران،  
ولنجک، خ یمن، ابتدای خیابان پروانه، پلاک ۲۴،  
پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، مرکز  
تحقیقات جافی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی،  
کدپستی: ۱۹۸۵۷۱۷۴۱۳

تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۰۰

E-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

### مقدمه

اسپورادیک و در ۲۵٪ موارد از نوع ارثی اتوزومال غالب، می‌باشد.<sup>۱،۲</sup> نوع ارثی MTC به سه زیر گروه تقسیم‌بندی می‌شود: نئوپلازی اندوکراین چندگانه نوع 2A (MEN2A)، نئوپلازی اندوکراین چندگانه نوع 2B (MEN2B)، MTC خانوادگی (F.MTC).<sup>۳</sup> اختلال MEN2A بیماری است که با علائمی مانند فتوکروموسیتوما دو طرفه، تومورهای چندگانه غدد پاراتیروئید (آدنوم‌های پاراتیروئید، هایپرپاراتیروئیدهای

سرطان تیروئید شایع‌ترین نئوپلازی اندوکراین بوده و حدود ۱٪ کل سرطان‌ها را شامل می‌شود.<sup>۱</sup> کارسینوم مدولاری تیروئید (MTC) نئوپلازی نادر سلول‌های ترشح‌کننده کلسی‌تونین بوده و ۱۰-۵٪ کل سرطان‌های تیروئید را در بر می‌گیرد. MTC در ۷۵٪ موارد از نوع

اعضای خانواده را تعدیل می‌کند.<sup>۱۵</sup> در مطالعه دیگری این فرضیه رد شده است.<sup>۷</sup>

از آنجایی که در مورد وجود ارتباط بین هاپلوتایپ G691S/S904S و بروز MTC در مطالعات مختلف اختلاف نظر وجود دارد و همچنین اطلاعات پایه‌ای در مورد فراوانی این هاپلوتایپ در جمعیت ایرانی مبتلا به MTC وجود ندارد، از این روی مطالعه حاضر با هدف، بررسی فراوانی G691S/S904S در بیماران MTC و اعضای خانواده شان در جمعیت ایرانی انجام گردید.

## روش بررسی

نمونه‌گیری: در طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۸۳، ۲۱۳ بیمار مبتلا به MTC، به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به منظور غربالگری ژنتیکی پروتوآنکوژن RET ارجاع داده شده‌اند. افراد به صورت داوطلبانه و با تکمیل فرم رضایت‌نامه در مطالعه شرکت کردند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مورد تایید قرار گرفت.

نمونه‌برداری هیستوپاتولوژی به روش اسپیراسیون سوزنی (FNA) به منظور تشخیص بیماری MTC مورد استفاده قرار گرفت. متغیرهای مورد بررسی شامل، سن، جنس، سابقه بیماری و وجود جهش در کدون ۶۹۱ و ۹۰۴ بود. اطلاعات مربوط به سن، جنس و سابقه بیماری از هر فرد توسط پرسشنامه جمع‌آوری شد. در صورت وجود هر جهشی در اگزون‌های پروتوآنکوژن RET، از اعضای خانواده درجه اول دعوت به عمل آمد. در نهایت ۱۴۵ فرد از اعضای خانواده بیماران در این مطالعه شرکت کردند.

استخراج DNA ژنومیک: DNA ژنومیک این افراد از لکوسیت‌های خون محیطی به روش استاندارد نمک اشباع و پروتییناز K استخراج شده و در  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند. کیفیت DNA استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتر تعیین شده و غلظت آن در ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر به دست آمد. به منظور شناسایی جهش‌های ۶۹۱ (GGT>AGT، Gly>Ser) و ۹۰۴ (TCC>TCG، Ser>Ser)، نمونه‌های DNA به روش Polymerase Chain Reaction (PCR) و توسط الیگومر پرایمرهای خاص خود تکثیر شد (جدول ۱). شرایط

اولیه، در یک بیمار و یا خانواده، بروز می‌کند. اختلال MEN2B از طریق پیشرفت سریع فرم تهاجمی MTC در افراد مبتلا (به خصوص در سال‌های اولیه زندگی)، فنوکروموسیتوما، عدم وجود هاپیرپاراتیروئیدیسم و علائم فیزیکی قابل مشاهده، مانند برجستگی‌های روی لب‌ها و زبان، گانگلیونوروماتوز روده، تغییر شکل اسکلتی، شناسایی می‌گردد. بیماری FMTC با بررسی سابقه قوی MTC در خانواده و شیوع بسیار پایین مسیرهای مرتبط با MEN2 مشخص می‌گردد.<sup>۱۵</sup>

مطالعات مولکولی، MTC اثری را با پروتوآنکوژن Rearranged (RET) during Transfection مرتبط می‌دانند. ژن RET در موقعیت کروموزوم 10q11.2 قرار گرفته و حاوی ۲۱ اگزون کدکننده رسپتور تیروزین کینازی می‌باشد. این کمپلکس ایفا کننده نقشی حیاتی در تکثیر سلولی و تفرق بافت، تفکیک بافت‌های مشتق شده از سلول‌های تاج عصبی مانند سلول‌های C غده تیروئید است.<sup>۱۶</sup> پروتیین RET، پروتیین تیروزین کینازی است که سه زنجیره تشکیل می‌گردد: زنجیره خارج سلولی حاوی ناحیه غنی از سیستین، زنجیره بین‌غشایی و زنجیره داخل سلولی تیروزین کینازی دخیل در سفریله شدن RET و سیگنال‌های پایین رونده.<sup>۱۷</sup> این پروتیین از طریق باندشدن لیگاند محلول Glial cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) فعال شده و نیازمند کورسپتور خانواده GDNF آلفا (GFR $\alpha$ ) می‌باشد.<sup>۱۸</sup>

در اکثریت خانواده‌های مبتلا به MEN2A یکی از شش جهش نقطه‌ای در باقی مانده‌های سیستین محافظت‌شده در اگزون ۱۰ (کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸، ۶۲۰) و یا اگزون ۱۱ (کدون‌های ۶۳۰، ۶۳۴) در زنجیره خارج سلولی دیده شده است.<sup>۱۲، ۱۸-۲۰</sup> در موارد FMTC، جهش‌های RET اساساً در شش کدون گزارش شده برای موارد MEN2A و همچنین اگزون ۱۳ (کدون ۷۶۸)، یا در اگزون ۱۵ (کدون ۸۹۱)، در ناحیه داخل سلولی RET مشاهده می‌شود.<sup>۱۲، ۱۸، ۲۱</sup> جهش کدون ۹۱۸ در اگزون ۱۶ ژن RET در زنجیره تیروزین کینازی، در بروز اکثریت موارد MEN2B دخیل می‌باشد.<sup>۱۵</sup>

برای اولین بار، پلی مورفیسم G691S و S94S در سال ۱۹۹۴ شناسایی شد.<sup>۱۳، ۱۴</sup> مطالعات اخیر، G691S در اگزون ۱۱ و S94S در اگزون ۱۵ مسیر RET با خطر پیشرفت SMTC مرتبط دانسته‌اند.<sup>۷</sup> به نظر می‌رسد، این دو تغییر نوکلئوتیدی سن بروز تومور MTC در

زن) با میانگین سنی  $38/77 \pm 13/64$  سال و ۱۴۵ فرد از اعضای خانواده درجه اول ۳۱ بیمار، شامل ۴۵/۵۲٪ مرد و ۵۴/۴۸٪ زن، با میانگین سنی  $25/00 \pm 15/49$  سال بودند. ۱۴ نمونه به دلیل کیفیت پایین DNA از مطالعه حذف شدند. بنابراین بررسی جهش‌های ژرم لاین RET در ۳۲۴ شرکت‌کننده شامل، ۲۰۷ بیمار مبتلا به MTC و ۱۳۷ نفر از اعضای خانواده آنها به انجام رسید. بیماران شامل ۳۹ (۱۸/۴۸٪) مورد با فنوتیپ FMTC، ۸ (۳/۶۸٪) مورد با فنوتیپ MEN2A، ۳ (۱/۴۵٪) نفر با فنوتیپ MEN2B، ۳ (۱/۵۴٪) مورد مبتلا به فتوکروموسیتوما و ۱۵۴ (۷۴/۰۴٪) مورد مبتلا به SMTC می‌باشند. دو پلی‌مورفیسم ژرم لاین در ژن RET، در کدون ۶۹۱ (GGT>AGT)، rs1799939، exon 11 که منجر به جایگزینی اسیدآمینه گلایسین با سرین شده و کدون ۹۰۴ (TCC>TCG)، exon15، rs1800863 که در نوع اسیدآمینه تغییر ایجاد نمی‌کند، یافت شد.

علاوه بر آن، فراوانی الی هر یک از این دو پلی‌مورفیسم در جمعیت بیمار (۳۵/۰۲٪) و اعضای خانواده آنها (۲۹/۹۲٪) یکسان می‌باشد. به منظور بررسی عدم تعادل پیوستگی با توجه به فرمول‌های D و r2، ال‌های A و G (S904S و G691S SNPs) در عدم تعادل پیوستگی کامل بودند (عدم رخداد نوترکیبی در آنها، D=1 و r2=1). بنابراین با توجه به آنکه تغییرات نوکلئوتیدی S904S و G691S به‌طور کامل عدم تعادل پیوستگی دارند، نتایج آنها در کنار یکدیگر و به صورت هاپلوتایپ G691S/S904S گزارش شدند (نمودار ۱). ۱۱۹ نمونه از ۲۰۷ بیمار مبتلا به MTC (۵۷/۴۸٪) و ۷۰ نفر از ۱۳۷ فرد اعضای خانواده بیماران (۵۱/۰۹٪)، هاپلوتایپ G691S/S904S در آنها مشاهده شد.

۹۳ بیمار مبتلا به MTC و ۵۸ نفر از اعضای خانواده آنها

PCR آگزون ۱۱ شامل دناتوراسیون اولیه در  $96^{\circ}\text{C}$  به مدت یک دقیقه، به دنبال آن ۳۰ سیکل دناتوراسیون در دمای  $96^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها در  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت یک دقیقه، دمای گسترش در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ ثانیه و در انتها گسترش نهایی در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه، بود. شرایط PCR آگزون ۱۵ شامل دناتوراسیون اولیه در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت سه دقیقه، به دنبال آن ۳۵ سیکل دناتوراسیون در دمای  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها در  $56^{\circ}\text{C}$  به مدت یک دقیقه، دمای گسترش در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت یک دقیقه و در انتها گسترش نهایی در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه، بود. نمونه‌های حاصل از PCR بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز شدند.

حضور و عدم حضور جهش به روش direct DNA sequencing (ABI 3100 Genetic Analyzer and Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit®, Applied Biosystems, California, USA) مشخص شد.

کروماتوگرام‌های سکانس توسط نرم‌افزار Chromas ver. 2.33 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia) آنالیز شده و به منظور مقایسه با سکانس ژن رفرانس RET از بلاست سایت NCBI استفاده شد. آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SPSS و پیراست ۲۰ و به روش  $\chi^2$  به انجام رسید. عدم تعادل پیوستگی تغییرات نوکلئوتیدی یافت شده از طریق فرمول D و r2 به انجام رسید.

## یافته‌ها

از بین ۳۵۸ فرد شرکت‌کننده، ۲۱۳ بیمار (۴۴/۱۳٪ مرد و ۵۵/۸۷٪

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده به منظور تکثیر آگزون‌های ۱۱، ۱۵ پروتوانکوژن RET (Rearranged during Transfection)

آگزون	پرایمر	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) <sup>۲</sup>	طول قطعه (bp) <sup>۱</sup>
۱۱	Forward: ataccgagcctgtaccagct	۵۹/۶	۴۹۷
	Reverse: cacagactgtccccacacag	۶۰/۲	
۱۵	Forward: ggctccaccagcccctac	۶۳/۱	۳۳۴
	Reverse: tcggatcttctcaggcttc	۵۷/۶	

<sup>۱</sup>base pair, <sup>۲</sup> Melting temperature

جدول ۲: توزیع فراوانی جهش‌های G691S و S904S در بیماران مبتلا به Medullary Thyroid Carcinoma و اعضای خانواده‌شان

اگزون	کدون	تغییر نوکلئوتیدی	تغییر آمینواسید	هموزیگوت	هتروزیگوت	<sup>5</sup> Pheo	<sup>4</sup> sMTC	<sup>3</sup> MEN2B	<sup>2</sup> MEN2A	<sup>1</sup> FMTC	خویشاوندان
۱۱	۶۹۱	(GGT>AGT)	<sup>6</sup> Gly>Ser	۳۸	۱۵۱	۳	۸۵	-	۸	۲۳	۷۰
۱۵	۹۰۴	(TCC>TCG)	<sup>7</sup> Ser>Ser	۳۸	۱۵۱	۳	۸۵	-	۸	۲۳	۷۰

<sup>1</sup>Familial Medullary Thyroid Carcinoma, <sup>2</sup>Multiple Endocrine Neoplasia type 2A, <sup>3</sup>Multiple Endocrine Neoplasia type 2B, <sup>4</sup>Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma, <sup>5</sup>Pheochromocytoma, <sup>6</sup>Glycine, <sup>7</sup>Serine

<sup>1</sup>سرطان مدولاری تیروئید خانوادگی، <sup>2</sup>آدنوم‌های متعدد اندوکراین نوع 2A، <sup>3</sup>آدنوم‌های متعدد اندوکراین نوع 2B، <sup>4</sup>سرطان مدولاری تیروئید اسپورادیک، <sup>5</sup>فتوکروموسیتوما

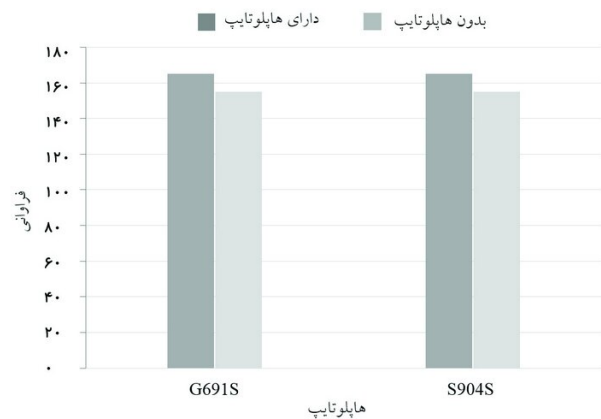
### G691S/S904S گزارش شدند.

یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر در جمعیت ایرانی مشابه مطالعه انجام شده توسط Ceolin و همکاران بوده است.<sup>۱۸</sup> متأسفانه در این مطالعه، گروه کنترل به منظور مقایسه جمعیت بیمار با جمعیت سالم وجود نداشت، با این وجود مطالعات دیگر بیانگر فراوانی بیشتر جهش G691S در بیماران مبتلا به MTC نسبت به جمعیت کل می‌باشد.<sup>۱۸ و ۱۹</sup>

در مطالعه حاضر، هاپلوتایپ یافت شده در کلیه فنوتیپ‌های MTC وجود داشته است. تعدادی از مطالعات بیانگر ارتباط، تغییر نوکلئوتیدی G691S و S904S مرتبط با اسپورادیک MTC و MEN2A می‌باشد.<sup>۲۰ و ۲۱</sup> از سوی دیگر، به نظر می‌رسد بین دو تغییر نوکلئوتید مذکور با سن بروز MTC در اعضای خانواده بیماران ارتباط وجود دارد. این فرضیه نیازمند انجام مطالعات بیشتر می‌باشد.<sup>۲۵</sup> بنابراین به نظر می‌رسد، اطلاعات حاضر می‌تواند به نحوی بیان‌کننده نقش قوی این پلی مورفیسم در بیماری MTC باشد.

مطالعات نشان داده‌اند، یکی از مکانیسم‌های محتمل پلی مورفیسم G691S افزایش آنکوژنیک بودن RET نسبت به دیگر جهش‌های RET باشد.<sup>۲۰ و ۲۲</sup> از سوی دیگر، تغییر نوکلئوتیدی در مولکول DNA می‌تواند منجر به وجود آمدن مکان اسپیلیسینگ جدید، کوتاه‌شدن پروتیین، اتصال لیگاند نادرست، اتصال Micro RNA، تغییر ساختار، پایداری RNA، تغییر در تعداد نسخه‌ها و تغییر در ساختار ثانویه پروتیین گردد.<sup>۱۸</sup>

جهش‌های ژن RET فاکتوری حیاتی در مدیریت بیماری بوده، به



نمودار ۱: توزیع فراوانی وجود و یا عدم وجود هاپلوتایپ G691S و S904S در جمعیت مورد مطالعه

هاپلوتایپ هتروزیگوت و ۲۶ بیمار و ۱۲ نفر از اعضای خانواده آنها هاپلوتایپ هموزیگوت داشتند (جدول ۲). هیچگونه اختلاف آماری معناداری بین سن بروز بیماری و حضور هاپلوتایپ G691S/S904S مشاهده نشد.

## بحث

در این مطالعه، دو تغییر نوکلئوتیدی G691S و S904S در عدم تعادل پیوستگی کامل با یکدیگر بوده و به صورت هاپلوتایپ

حاضر به عنوان جهش‌های آنکوژنیک در نظر گرفته نمی‌شود، بهتر است نقش عملکردی آن مورد بررسی قرار گیرد. مطالعات آتی می‌تواند روشن‌کننده شیوع این هاپلوتایپ و تاثیر آن بر خصوصیات فنوتیپی MTC شود.

سپاسگزاری: نویسندگان مقاله از تمامی شرکت‌کنندگان در این پژوهش و دست‌انکاران طرح، قدردانی می‌نماید. هم چنین از تامین بودجه مالی این طرح توسط پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم شهید بهشتی سپاسگزاری می‌شود. این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی ارتباط جهش‌های ۱۱، ۱۲ و ۱۳ ژن پروتوآنکوژن RET با سرطان مدولاری تیروئید در جمعیت ایران" مصوب پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به کد ۳۷۴ می‌باشد.

عبارت دیگر تصمیم‌گیری نهایی در توتال تیروئیدکتومی و یا تیروئیدکتومی جزئی و نیز سن انجام جراحی در افراد کاندید جراحی با نتیجه جهش RET گرفته می‌شود.<sup>۶</sup>

در مواردی که جهش‌های ارثی وجود دارد، غربالگری ژنتیکی بر روی نمونه‌های خون، به کلیه اعضای خانواده توصیه می‌شود. افرادی که جهش ژرم‌لاین پروتوآنکوژن RET برای آنها مثبت می‌باشند، میزان کلسی‌تونین آنها آزمایش شده و با توجه به وضعیت بالینی و آزمایشگاهی آنها، جراحی تیروئیدکتومی پیشگیری‌کننده به آنها توصیه خواهد شد.<sup>۲۰</sup>

داده‌های حاضر، نشان‌دهنده فراوانی هاپلوتایپ G691S/S904S در بین بیماران مبتلا به MTC و اعضای خانواده آنها در جمعیت ایرانی می‌باشد. با وجود آنکه هاپلوتایپ G691S/S904S در حال

## References

- Öberg K. The genetics of neuroendocrine tumors. *Semin Oncol* 2013;40(1):37-44.
- Abdelhakim A, Barlier A, Kebbou M, Benabdeljalil N, Timinouni M, Taoufiq F, et al. RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer: the Moroccan experience. *J Cancer Res Ther* 2009;5(3):198-202.
- Scurini C, Quadro L, Fattoruso O, Verga U, Libroia A, Lupoli G, et al. Germline and somatic mutations of the RET proto-oncogene in apparently sporadic medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* 1998;137(1):51-7.
- Lesueur F, Cebrian A, Robledo M, Niccoli-Sire P, Svensson KA, Pinson S, et al. Polymorphisms in RET and its coreceptors and ligands as genetic modifiers of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Cancer Res* 2006;66(2):1177-80.
- Robledo M, Gil L, Pollán M, Cebrián A, Ruíz S, Azañedo M, et al. Polymorphisms G691S/S904S of RET as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Res* 2003;63(8):1814-7.
- Sharma BP, Saranath D. RET gene mutations and polymorphisms in medullary thyroid carcinomas in Indian patients. *J Biosci* 2011;36(4):603-11.
- Cebrian A, Lesueur F, Martin S, Leyland J, Ahmed S, Luccarini C, et al. Polymorphisms in the initiators of RET (rearranged during transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(11):6268-74.
- Wagner SM, Zhu S, Nicolescu AC, Mulligan LM. Molecular mechanisms of RET receptor-mediated oncogenesis in multiple endocrine neoplasia 2. *Clinics (Sao Paulo)* 2012;67 Suppl 1:77-84.
- 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.
- 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.
- Rekhi B, Badhe RR, Desouza MA, Chaukar D, D'Cruz AK, Arya S, et al. A unique RET EXON 11 (G691S) polymorphism in an Indian patient with a collision tumor of the thyroid. *Diagn Pathol* 2007;2:39.
- Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikhol Eslami S, Rezghi Barez S, Haghoooghi 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;264248.
- Ceccherini I, Hofstra RM, Luo Y, Stulp RP, Barone V, Stelwagen T, et al. DNA polymorphisms and conditions for SSCP analysis of the 20 exons of the ret proto-oncogene. *Oncogene* 1994;9(10):3025-9.
- Bugalho MJ, Cote GJ, Khorana S, Schultz PN, Gagel RF. Identification of a polymorphism in exon 11 of the RET protooncogene. *Hum Mol Genet* 1994;3(12):2263.
- Gil L, Azañedo M, Pollán M, Cristobal E, Arribas B, García-Albert L, et al. Genetic analysis of RET, GFR alpha 1 and GDNF genes in Spanish families with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Int J Cancer* 2002;99(2):299-304.
- Lewontin RC. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 1988;120(3):849-52.
- Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 1995;29(2):311-22.
- Ceolin L, Siqueira DR, Ferreira CV, Romitti M, Maia SC, Leiria L, et al. Additive effect of RET polymorphisms on sporadic medullary thyroid carcinoma susceptibility and tumor aggressiveness. *Eur J Endocrinol* 2012;166(5):847-54.
- Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Sculli M, Lari R, et al. RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3579-84.

20. Plaza-Menacho I, Burzynski GM, de Groot JW, Eggen BJ, Hofstra RM. Current concepts in RET-related genetics, signaling and therapeutics. *Trends Genet* 2006;22(11):627-36.
21. Borrello MG, Aiello A, Peissel B, Rizzetti MG, Mondellini P, Degl'Innocenti D, et al. Functional characterization of the MTC-associated germline RET-K666E mutation: evidence of oncogenic potential enhanced by the G691S polymorphism. *Endocr Relat Cancer* 2011;18(4):519-27.
22. Vandenbosch K, Renard M, Uyttebroeck A, Scirot R, Matthijs G, Legius E. Medullary thyroid carcinoma in a child with a new RET mutation and a RET polymorphism. *Genet Couns* 2005;16(1):95-100.

## The frequency of G691S/S904S Haplotype of RET proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma patients in Iranian population

Sara Sheikholeslami M.Sc.  
Marjan Zarif Yeganeh M.Sc.  
Laleh Hoghooghi Rad M.Sc.  
Maryam Sadat Daneshpour  
Ph.D.  
Mehdi Hedayati Ph.D.\*

Cellular and Molecular Research  
Center, Obesity Research Center,  
Research Institute for Endocrine  
Sciences, Shahid Beheshti Univer-  
sity of Medical Sciences, Tehran,  
Iran.

\* Corresponding author: Cellular and Mo-  
lecular Research Center, Obesity Re-  
search Center, Research Institute for En-  
docrine Sciences, Shahid Beheshti Uni-  
versity of Medical Sciences, No. 24, Par-  
vaneh street, Yaman St., Velenjak,  
Chamran highway, Tehran, Iran.  
Postal code: 1985717413.  
Tel: +98- 21- 2243500  
E-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

### Abstract

Received: 06 Jun. 2014 Accepted: 19 Oct. 2014 Available online: 11 Nov. 2014

**Background:** Medullary thyroid carcinoma (MTC) occurs in both sporadic (75%) and hereditary (25%) forms. The missense mutations of the rearranged during transfection (RET) proto-oncogene in MTC development have been well demonstrated. Several studies have been published that indicate the molecular analysis of RET gene may offer early identification of those patients at high risk to develop MTC and may provide the opportunity for early intervention. The aim of this study was to investigate frequency of G691S/S904S haplotype in MTC patients and their relatives.

**Methods:** From 2004 to 2014, 358 participants were studied, including 213 patients (119 female, 94 male) and 145 their relatives (79 female, 66 male) in cellular and molecular research center of Shahid Beheshti Research Institute for Endocrine Sciences, Tehran, Iran. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes using the standard Salting Out/Proteinase K method. Nucleotide change detection was performed using PCR and direct DNA sequencing methods. The RET mutations and SNPs, sequences were analyzed.

**Results:** According to DNA sequencing results, 189 individuals (119 patients, 70 relatives) had both G691S (rs1799939) missense mutation in exon11 and S904S (rs1800863) synonymous mutation in exon 15 of RET proto-oncogene. The allele frequency of G691S/S904S haplotype was 35.02% in patients and 29.92% in their relatives.

**Conclusion:** The obtained data showed the frequency of G691S/S904S RET gene haplotype among Iranian MTC patients and their relatives. The G691S and S904S nucleotide changes were in complete linkage disequilibrium, so the results were grouped together and referred to as G691S/S904S haplotype. This haplotype are not considered as oncogenic mutations at this time, its functional role should be investigated. Further analysis is needed to demonstrate the association between this haplotype and MTC development.

**Keywords:** haplotypes, medullary, proto-oncogene, thyroid cancer.