جهش‌های ژرم‌لاین اگزون ۲ پروتوآنکوژن RET در جمعیت ایرانی مبتلا به کارسینومای مدولاری تیروئید

حسنا حسان‌منش [۱](M.Sc)، مرجان ظریف یگانه [۲](M.Sc)، سارا شیخ‌الاسلامی [۲](M.Sc)، داریوش فرهود [۳](Ph.D)، مهدی هدایتی [۲*](Ph.D)

۱- *گروه زیست‌شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آذربایجان شرقی، ایران*

۲- *مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران*

۳- *دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران*

چکیده

سابقه و هدف: کارسینومای مدولاری تیروئید (Medullary thyroid carcinoma,MTC) ۵-۱۰٪ کل انواع سرطان‌های تیروئید بوده که توارث آن به صورت اتوزوم بارز می‌باشد. ارتباط جهش اگزون‌های ۱۶-۱۰ پروتوآنکوژن RET با MTC به‌خوبی نشان داده شده است. از آن‌جایی‌که بررسی سایر اگزون‌های این ژن کم‌تر مورد توجه بوده است، هدف از مطالعه حاضر تعیین فراوانی جهش‌های ژرم‌لاین اگزون۲ پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به MTC در جمعیت ایرانی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۲۲۳ نفر (۱۲۵ بیمار و ۹۸ نفر اعضای خانواده) مورد بررسی قرار گرفتند. محتوای DNA ژنومی با روش استاندارد نمک اشباع /پروتئیناز کا استخراج شد. اگزون ۲ و نواحی اینترون اطراف آن با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تکثیر شدند و تعیین ژنوتیپ با روش تعیین توالی مستقیم DNA انجام شد.

یافته‌ها: در پژوهش حاضر تغییرات نوکلئوتیدی c135G>A/A45A (rs1800858) در اگزون۲، c.337+9G>A (rs2435351) و c.337+137G>T (rs2505530) در اینترون۲ ژن RET یافت گردید. در میان بیماران و خویشاوندان، بیش‌ترین و کم‌ترین فراوانی ژنوتیپی و آللی به‌ترتیب مربوط به c.337+137G>T (rs2505530) و c135G>A/A45A (rs1800858) بود. بین تغییرات نوکلئوتیدی یافت شده و نوع فنوتیپ بیماری، جنسیت و قومیت رابطه‌ی معنی‌داری یافت نشد.

نتیجه‌گیری: جهشی که منجر به تغییر اسیدآمینه در اگزون۲ و یا جایگاه پیرایش اینترون یک-اگزون۲ (GT) و اگزون۲-اینترون۲ (AG) شود، یافت نگردید. به نظر نمی‌رسد بررسی وجود جهش در اگزون۲ این ژن در بیماران مبتلا به MTC دارای اهمیت باشد. با این وجود، بررسی ارتباط واریانت‌های یافته شده با وجود یا عدم وجود سایر جهش‌ها در اگزون‌های اصلی ژن RET و هم‌چنین یافتن هاپلوتایپ‌های احتمالی در ارتباط با بیماری توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کارسینومای مدولاری تیروئید، سرطان تیروئید، جهش ژرم‌لاین، پروتوآنکوژن RET، اگزون۲.

مقدمه

سرطان تیروئید شایع‌ترین تومور بدخیم سیستم اندوکرین است و تقریباً ۱٪ کل سرطان‌ها در انسان را شامل می‌شود [۱]. کارسینومای مدولاری تیروئید (Medullary thyroid carcinoma, MTC) توموری بدخیم بوده که از سلول‌های پارافولیکولار C منشا گرفته و

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۲۵۰۰

Email: hedayati@endocrine.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۱۷

مسئول ۱۰-۵٪ کل انواع سرطان‌های تیروئید است [۲-۴] MTC به شکل ارثی (۲۵٪) و یا به شکل تک‌گیر (۷۵٪) رخ می‌دهد [۶،۵] MTC ارثی به‌وسیله‌ی جهش‌های ژرم‌لاین در پروتوآنکوژن RET ایجاد می‌شود. هم‌چنین جهش‌های سوماتیکی این ژن در ایجاد نوع MTC تک‌گیر دخیل است. الگوی وراثتی MTC ارثی، اتوزوم بارز با نفوذ متغیر و وابسته به سن می‌باشد. به غیر از غده تیروئید، برخی ارگان‌های دیگر (مانند غدد پاراتیروئید و آدرنال) نیز درگیر می‌شوند [۷-۱۰]. سه نوع MTC ارثی شناخته شده است: نشانگان نئوپلازی اندوکرین چندگانه نوع دو A (Multiple Endocrine Neoplasia type 2; MEN 2) و B و نوع MTC خانوادگی (Familial MTC; FMTC). MEN2A، MEN2B و FMTC از لحاظ شیوع، ژنتیک، سن شروع، ارتباط با سایر بیماری‌ها، تهاجم و پیش‌آگهی از یک‌دیگر متمایزند [۱۲،۱۱،۳].

پروتوآنکوژن RET (Rearranged during Transfection) در انسان در ناحیه کروموزومی 10q11.2 واقع بوده و دارای ۲۱ اگزون است [۱۳،۴-۱۵]. ژن RET نوعی گیرنده تیروزین کیناز غشایی را رمز می‌کند که متشکل از سه بخش می‌باشد: یک بخش اتصالی- لیگاند خارج سلولی با ۴ تکرار شبه کادهرین، جایگاه اتصال کلسیم و یک ناحیه غنی از سیستئین که انتقال پیام‌های خارج سلولی تکثیر، رشد، تمایز، مهاجرت، بقا و آپوپتوز سلولی را انجام می‌دهد [۱۶-۱۸]، یک بخش داخل غشایی هیدروفوب و یک بخش سیتوپلاسمی (متشکل از دو ناحیه تیروزین کینازی که به‌وسیله‌ی درج ۲۷ آمینواسید از هم جدا شده‌اند). این گیرنده تیروزین کیناز از طریق یک کمپلکس متشکل از خانواده فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از رده سلول گلیال (GDNF, Glial cell-derived neurotrophic factor) لیگاندها و کورسپتورها فعال می‌شود. کمپلکس لیگاند GFRα- (گیرنده α خانواده GDNF) همراه با بخش خارج سلولی RET، اتوفسفوریلاسیون توالی‌های تیروزین داخل سلولی را تقویت می‌کنند [۱۶،۱۹-۲۱].

جهش‌های نقطه‌ایی در ناحیه خارج سلولی پروتوآنکوژن RET در ایجاد سلول‌های بدخیمی که از ستیغ عصبی منشأ می‌گیرند، دخالت دارند و می‌توانند در هر دو رده سلول سوماتیک و ژرم‌لاین روی دهد [۲۳،۲۲،۱۰،۹،۷]. جهش‌های ژرم‌لاین با اختلالاتی از جمله بیماری هیرشپرونگ (HSCR) و MEN2 ارتباط دارد [۲۵،۲۴]. جهش‌های ژرم‌لاین RET در ۹۸٪ MEN2A، ۹۵٪ MEN2B و ۸۸٪ FMTC مشاهده می‌شود [۲۶،۴].

پلی‌مورفیسم c135G>A/A45A (rs1800858) اگزون ۲ پروتوآنکوژن (RET با فنوتیپ بالینی هایپرپلازی سلول C، MTC تک‌گیر، PTC کارسینومای پاپیلاری تیروئید، HSCR، MEN 2A و FMTC ارتباط دارد [۲۷-۲۹]. جهش خاموش c135G>A/A45A (rs1800858) در کدون ۴۵ (nt43100520) اگزون ۲ پروتوآنکوژن RET و در اثر تغییر نوکلئوتیدی GCG به GCA بدون تغییر در آمینواسید شماره ۴۵، (آلانین به آلانین) ایجاد می‌گردد و در واقع یک جهش نقطه‌ایی Transition substitution (Neutral) می‌باشد.

از آن‌جایی‌که برخی از بیماران فاقد جهش در اگزون‌های Hotspot هستند و نیز به‌دلیل این‌که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی اگزون ۲ پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به MTC در جمعیت ایرانی به انجام نرسیده است [۳۰،۲۲،۸،۷-۳۳]، مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی جهش‌های ژرم‌لاین اگزون ۲ پروتوآنکوژن RET در این بیماران به انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی است و افراد به روش نمونه‌گیری آسان انتخاب شدند، بدین ترتیب که افراد مبتلا به MTC در بیمارستان‌های دانشگاهی و مراکز درمانی نقاط مختلف کشور بر اساس شواهد آسیب‌شناختی تشخیص داده شده و تحت عمل جراحی قرار گرفتند و سپس به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی پژوهشکده غدد د رون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به‌منظور

غربالگری ژنتیکی پروتوآنکوژن RET ارجاع داده شدند. افراد داوطلب جهت شرکت در این مطالعه فراخوانده شده و پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه وارد مطالعه شدند. اطلاعات مربوط به افراد از طریق تهیه‌ی پرسش‌نامه و تکمیل آن، مصاحبه، و بخشی نیز از پرونده آنان به‌دست آمد. داده‌های حاصل از آزمایشات مولکولی در فرم جمع‌آوری اطلاعات در کامپیوتر (نرم‌افزار Spss) به ثبت رسید. در این مطالعه توصیفی داده‌های ژنتیکی حاصله تعیین فرکانس آللی شده و شجره افراد خانواده ترسیم شد. این آنالیزها با برنامه کامپیوتری Progeny7 انجام شد. پس از بررسی جهش پروتوآنکوژن RET در صورتی که بیمار دارای جهش بود، بستگان درجه اول بیمار (به‌منظور پیشگیری و تشخیص زودرس بیماری) جهت بررسی ژنتیکی فراخوانده شدند.

در مطالعه حاضر بیماران شرکت‌کننده در پنج گروه فنوتیپی sMTC (سرطان مدولاری تیروئید اسپورادیک)، FMTC، MEN2A، MEN2B و فئوکروموسیتوما طبقه‌بندی شدند. بیش‌ترین تعداد بیماران در نوع sMTC و کم‌ترین تعداد در نوع MEN2B مشاهده شد. در پژوهش حاضر جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۲۳ فرد (با توجه به فرمول $N_{min}= \log (1-\pi)$ /$2\log (1 - f_{min})$ حجم نمونه محاسبه گردید) بوده که متشکل از ۱۲۵ بیمار (sMTC۸۷، FMTC۳۰، MEN2A۵، MEN2B۱، pheo۲) و ۹۸ خویشاوند درجه اول آنان بود. حداکثر سن ۷۱ سال و حداقل آن یک سال بود. جدول ۱ خصوصیات دموگرافیک و فراوانی جمعیت مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

جدول ۱. خصوصیات دموگرافیک و فراوانی جمعیت مورد مطالعه

	زن	مرد	سن (mean±SD)	درصد فراوانی
sMTC	۵۲	۳۵	۴۲/۰۷±۱۳/۷۸	۳۹/۰
FMTC	۱۷	۱۳	۳۲/۹۳±۱۳/۶۴	۱۳/۵
MEN2A	۳	۲	۴۴±۹/۴۳	۲/۲
MEN2B	۱	–	۱۳	۰/۴
فئوکروموسیتوم	۲	–	۱۹/۵۰±۴/۹۵	۰/۹
خویشاوند	۵۶	۴۲	۳۲/۲۷±۷۹/۱۵	۴۳/۹

بررسی ژنتیکی: ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی در وضعیت نشسته از افراد مورد مطالعه اخذ شد. پس از تهیه‌ی خون محیطی افراد، DNA ژنومی با استفاده از روش نمک اشباع/ پروتئینازکا (Salting out/ Proteinase K) استخراج شد. در جهت استخراج DNA از گلبول‌های سفید خون (در طی سه مرحله اصلی لیز سلول، جداسازی DNA از سایر ماکرومولکول‌ها و رسوب DNA، آب مقطر دیونیزه استریل، بافر لیزکننده هسته [Tris 10 mM) pH 7.5, EDTA (TES) (10 mM), NaCl (150 mM) (Saline)]، ۰/۲۵ میلی‌لیتر SDS ۱۰٪ (Sodium dodecyl sulphate)، ۰/۱میلی‌لیتر پروتئیناز K ۱٪، ۲ میلی‌لیتر NaCl اشباع شده‌ی ۵ مولار، ۵ میلی‌لیتر محلول ایزوپروپانول ۱۰۰٪، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ سرد و ۱۰۰ میکرولیتر بافر [Tris (10 mM) pH 7/5 EDTA (1mM)] 1×TE مورد استفاده قرار گرفتند.

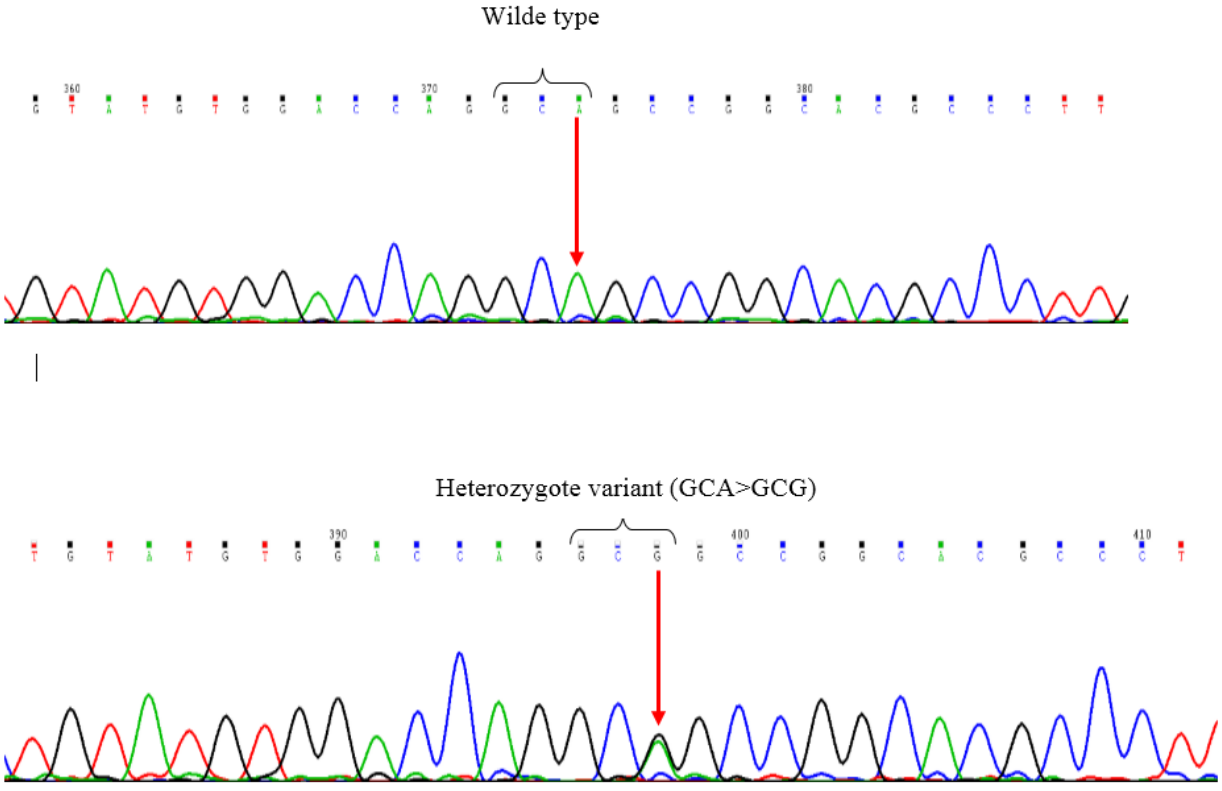
پس از استخراج DNA به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت DNA و آگاهی از غلظت و میزان خالص بودن آن جذب نوری نمونه DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر (OD)، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (ND-1000 ساخت شرکت Nano Drop– آمریکا) تعیین غلظت شدند و بر این اساس تا غلظت ۵۰ ng/µl رقیق شدند. برای تکثیر قطعه مورد نظر (۹۲۴ bp) که متشکل از اگزون ۲ (به منظور بررسی تغییرات نوکلئوتیدی) و بخشی از اینترون یک و دو (به‌منظور بررسی نقاط مربوط به پیرایش از لحاظ وجود تغییرات نوکلئوتیدی) بود، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. برای این منظور جفت پرایمر اختصاصی رفت ′۵-ATGGGTGGCAGTGTCTCCT-3′ و برگشت ′۵-TTTTCCAGCCCCACTTACTC-3′ با استفاده از نرم‌افزارهای Primer 3 و Gene runner طراحی شد. واکنش PCR قطعات مورد نظر، در شرایط بهینه مخصوص قطعه مورد نظر به انجام رسید. به‌طور کلی واکنش PCR در حجم ۳۰ میکرولیتر با شرایط زیر انجام گرفت: به محتوی تیوپ ml ۰/۲ (PCR Ready Mix kit, ZellBio Co, Germany) یک میکرولیتر پرایمر رفت (۱۰ pµ)، یک میکرولیتر پرایمر برگشت

(۱۰ pμ)، یک میکرولیتر DNA (۵۰ ng/μl) و ۲۷ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده گردید (جدول ۲). واکنش‌ها در ترموسایکلر اتوماتیک انجام شد (peqSTAR 96X HP, PEQLAB Co, Germany). شرایط PCR برای اگزون ۲ شامل دمای ۹۴°C به مدت ۱۰ دقیقه برای دناتوراسیون اولیه، ۳۰ چرخه دمای ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه برای دناتوراسیون دوم، دمای ۶۳/۶ °C به مدت ۱ دقیقه برای اتصال پرایمرها، ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه برای تکثیر و ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی بود.

در این پژوهش جهت تایید صحت و کیفیت تکثیر قطعه DNA مورد نظر از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید ۶٪ (به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۲۰۰ میلی‌ولت) استفاده شد. به‌منظور رؤیت قطعات DNA در صورت وجود، از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده گردید. نمونه‌های مناسب جهت تعیین ژنوتیپ، تعیین توالی شدند. کروماتوگرام‌های سکانس توسط نرم‌افزار Chromas 2.33 آنالیز شده و به منظور مقایسه با سکانس ژن رفرانس RET از بلاست سایت NCBI استفاده شد. شکل ۱ تصویری از نتیجه تعیین توالی یک نمونه جهش‌دار می‌باشد. آنالیز و گزارش میزان فراوانی آللی و ژنوتیپی نمونه‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 20 به انجام رسید.

جدول ۲. غلظت اجزای واکنش PCR

غلظت	اجزای واکنش PCR(در تیوبهای لیوفلیزه)
۰/۶۶ U	آنزیم DNA Top پلی‌مراز
۱۶۶/۶ μM	Each: dNTPs
۶/۶ mM	Tris-HCl (pH 9.0)
۲۰ mM	KCl
۱ mM	$MgCl_2$
۱۰ Pmol	پرایمر رفت
۱۰ Pmol	پرایمر برگشت
ng/μl۵۰	DNA
۲۷ μl	آب مقطر استریل
۳۰μl	حجم کل واکنش



شکل ۱. تصویری از کروماتوگرام مربوط به جهش A45A

نتایج

در مطالعه حاضر از ۲۲۳ فرد مورد بررسی، ۳۳ نمونه (۱۸ بیمار و ۱۵ خویشاوند درجه اول آنان) به دلیل نامناسب بودن کیفیت DNA و یا به دلیل نامناسب بودن کیفیت سکانس از مطالعه خارج شدند. نتایج ذکر شده در ادامه بر اساس ۱۹۰ فرد باقی‌مانده می‌باشد.

بررسی توالی نوکلئوتیدی اگزون ۲ و بخشی از ناحیه اینترونی اطراف آن در پروتوآنکوژن RET، سه نوع تغییر نوکلئوتیدی c135G>A/A45A (rs1800858) در ناحیه اگزونی، c.337+9G>A (rs2435351) و c.337+137G>T (rs2505530) در ناحیه اینترونی را مشخص نمود. جدول ۳ تغییرات نوکلئوتیدی یافت شده را به تفکیک جنسیت، هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی نشان می‌دهد. علاوه بر این، رخداد هم‌زمان تغییرات نوکلئوتیدی مذکور در بیماران به تفکیک فنوتیپ‌های مختلف و در خویشاوندان بررسی شده است (جدول ۴).

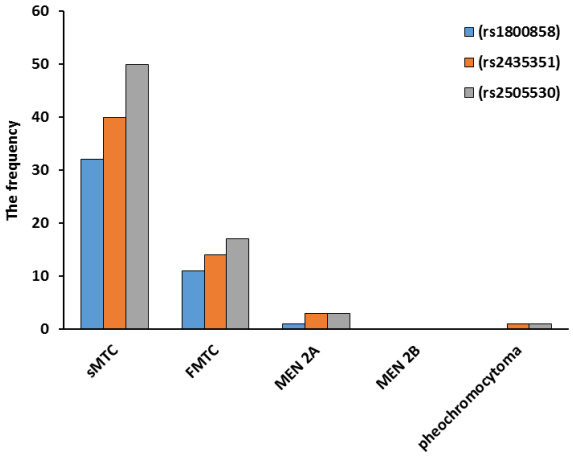
تغییر نوکلئوتیدی c135G>A/A45A (rs1800858)، کم‌ترین میزان فراوانی آللی و ژنوتیپی جمعیت مورد مطالعه را به خود اختصاص داده بود و بیش‌ترین فراوانی ژنوتیپی و آللی متعلق به حاملین تغییر نوکلئوتیدی c.337+137G>T (rs2505530) بود. لازم به‌ذکر است که بیمار MEN2B فاقد این سه تغییر نوکلئوتیدی و نیز بیماران فئوکروموسیتوم فاقد تغییر نوکلئوتیدی c135G>A/A45A (rs1800858) بودند. درصد فراوانی ژنوتیپی و آللی بیماران و خویشاوندان (حامل جهش‌های یافت شده) جمعیت مورد بررسی در جدول ۳ ذکر شده است. شکل ۲ فراوانی تغییرات نوکلئوتیدی یافت شده را در فنوتیپ‌های مختلف نشان می‌دهد.

جدول ۳. درصد فراوانی ژنوتیپی و آللی در دو گروه بیمار و خویشاوند جمعیت مورد بررسی

نوع تغییر نوکلئوتیدی	بیماران/ خویشاوندان	هتروزایگوت			هموزایگوت			درصد فراوانی	
		زن	مرد	کل	زن	مرد	کل	ژنوتیپی	آللی
A45A (rs1800858)	بیماران	۲۳	۱۱	۳۴	۸	۲	۱۰	٪۴۱/۱	٪۲۵/۲۳
	خویشاوندان	۱۶	۸	۲۴	۱	۴	۵	٪۳۴/۹	٪۱۹/۳۱
G>A (rs2435351)	بیماران	۲۳	۱۸	۴۱	۷	۱۰	۱۷	٪۵۴/۲	٪۳۵/۰۴
	خویشاوندان	۱۴	۲۴	۳۸	۳	۴	۷	٪۵۴/۲	٪۲۹/۵۴
G>T (rs2505530)	بیماران	۲۶	۲۲	۴۸	۱۲	۱۱	۲۳	٪۶۶/۴	٪۴۳/۹۲
	خویشاوندان	۲۶	۱۶	۴۲	۵	۵	۱۰	٪۶۲/۷	٪۳۵/۲۲

جدول ۴. رخداد همزمان تغییرات نوکلئوتیدی A45A (rs1800858)، G>A (rs2435351) وG>T (rs2505530) در بین دو گروه بیمار و خویشاوند جمعیت مورد مطالعه

بیماران/ خویشاوندان	rs1800858 rs2435351 rs2505530	rs1800858 rs2435351	rs1800858 rs2505530	rs2435351 rs2505530
sMTC	۱۱	۱۱	۱۴	۳۹
FMTC	۴	۴	۶	۱۴
MEN 2A	۱	۱	۱	۳
خویشاوند	۹	۱۱	۹	۴۱
فئوکروموسیتوم	–	–	–	۱
کل	۲۵	۲۷	۳۰	۹۹



شکل ۲. فراوانی تغییرات نوکلئوتیدی در فنوتیپهای مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، سه نوع تغییر نوکلئوتیدی c.337+9G>A ،c135G>A/A45A (rs1800858) (rs2435351) و c.337+137G>T (rs2505530) در ۱۹۰ فرد (۱۰۷ بیمار و ۸۳ خویشاوند) یافت گردید اما تغییر نوکلئوتیدی در Splice Site ′5 (GT) و ′3 (AG) مشاهده نشد.

بنا بر گزارش Oliver Gimm و همکاران (۱۹۹۹)، فراوانی پلی‌مورفیسم c135G>A/A45A (rs1800858) ژرم‌لاین ۵۰ بیمار MTC تک‌گیر (۳۸ نژاد آلمانی، ۱۲ نژاد ایالات متحده) و افراد سالم مشابه بود [۳۴]. Arancha Cebrian و همکاران (۲۰۰۵) نیز در مطالعه‌ای بر روی ۱۳۵ بیمار MTC تک‌گیر و ۵۳۳ فرد سالم از جمعیت انگلستان، بیان نمودند که پلی‌مورفیسم c135G>A/A45A (rs1800858) با MTC تک‌گیر ارتباطی نداشت. در این مقاله اشاره شد که آلل فوق ممکن است نقشی حفاظتی در مقابل پیشرفت این بیماری داشته باشد [۳۵]. Raquel M. Fernández و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه‌ای بر روی ۵۸ بیمار MTC تک‌گیر و ۱۰۰ فرد سالم اسپانیایی، عنوان کرد که فراوانی آللی c135G>A/A45A (rs1800858) در دو گروه بیمار و سالم مشابه بود و تفاوت معنی‌داری نداشت [۳۶]. در مطالعه مورد-شاهد در یک مجموعه بزرگ MTC تک‌گیر ایتالیایی و در یک گروه سالم همسان، پلی‌مورفیسم c135G>A/A45A (rs1800858) در ۸۲ بیمار و ۱۰۶ سالم مشاهده شد. این پلی‌مورفیسم توزیع معنی‌داری در بیماران MTC تک‌گیر (در مقایسه با افراد سالم) نشان نداد [۳۷]. Samuel W. Moore و همکاران (۲۰۰۷) در یک مطالعه انجام شده در جمعیت آفریقای جنوبی بر روی ۲۵ بیمار از ۱۰ خانواده مبتلا به فنوتیپ‌های MEN 2، فراوانی آللی پلی‌مورفیسم c135G>A/A45A (rs1800858) را در گروه سالم سیاه پوست (n=۶۰)، گروه سالم با پوست رنگی (اجداد مختلف) (n=۵۸)، گروه سالم سفید پوست (n=۵۰) و بیماران MTC، به‌ترتیب ۰/۰۶، ۰/۳۱، ۰/۵ و ۰/۱۲ گزارش کرد [۳۸]. Chin-Feng Chang و همکاران (۲۰۰۹) پلی‌مورفیسم c135G>A/A45A (rs1800858) را در بیماران MTC تک‌گیر (فاقد جهش در اگزون‌های Hotspot) تایوانی یافت [۳۹]. Gisella Figlioli و همکاران (۲۰۱۳) در نتیجه متاآنالیز پلی‌مورفیسم c135G>A/A45A (rs1800858) این نکته را متذکر شد که در آنالیز کلی از نظر آماری ارتباط معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم و sMTC یافت نشد [۴۰]. در مطالعه‌ی حاضر نیز بین این پلی‌مورفیسم و فنوتیپ‌های جمعیت مورد مطالعه (sMTC، FMTC، MEN 2A، MEN 2B و فئوکروموسیتوم) ارتباطی یافت نگردید.

در مطالعه‌ی دیگری که X.-P.Qi و همکاران (۲۰۱۲) به گزارش جهش ژرم‌لاین p.C618S در یک شجره چینی مبتلا به کارسینومای فامیلی مدولاری تیروئید پرداختند، پلی‌مورفیسم c135G>A/A45A (rs1800858) در ۱۳ فرد دارای جهش p.C618S مشاهده شد. علاوه بر این، در ۱۰ عضو سالم (که همگی p.L769L و IVS19+15T>C داشتند و ۸۰٪ نیز دارای p.A432A بودند)، ۹ فرد (۹۰٪) دارای c135G>A/A45A (rs1800858) بود اما هیچ‌یک شواهدی از ناهنجاری تیروئیدی مرتبط با جهش‌های RET را بروز ندادند [۴۱].

در جمعیت برزیلی، در نتیجه‌ی آنالیز گسترده ژن RET توسط Susan C. Lindsey و همکارانش (۲۰۱۲) علاوه بر تغییر نوکلئوتیدی c135G>A/A45A (rs1800858)، تغییر نوکلئوتیدی c.337+9G>A (rs2435351) نیز در اینترون ۲ ژن RET بیماران MTC تک گیر (که فاقد جهش در اگزون‌های ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵ یا ۱۶ ژن RET بودند) گزارش گردید [۴۲]. شایان ذکر است که مطالعه جمعیتی در مورد ارتباط c.337+137G>T (rs2505530) با بیماری خاص، مقاله‌ای یافت نشد.

در مطالعه‌ی حاضر، بیش‌ترین فراوانی آللی مربوط به c.337+137G>T (rs2505530) و سپس c.337+9G>A (rs2435351) و c135G>A/A45A (rs1800858) بود. تغییرات نوکلئوتیدی c135G>A/A45A (rs1800858)،

c.337+137G>T و c.337+9G>A (rs2435351) (rs2505530) هیچ‌گونه رابطه‌ی معنی‌داری با سن، نوع فنوتیپ بیماری، جنسیت و قومیت در بین دو گروه بیمار و خویشاوند جمعیت مورد بررسی نداشتند (P>۰/۰۵).

شایع‌ترین جهش‌ها در پروتوآنکوژن RET در کدون‌های سیستئین ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸، ۶۲۰ (اگزون ۱۰) و ۶۳۴ (اگزون ۱۱) و برخی کدون‌های غیرسیستئین مانند کدون ۸۰۴ (اگزون ۱۴)، ۸۸۳ (اگزون ۱۵) و ۹۱۸ (اگزون ۱۶) یافت شده است. به‌نظر می‌رسد که قدرت آنکوژنی متفاوت جهش‌های RET به جایگاه تغییر اسیدآمینه بستگی دارد که در نهایت مسئول فنوتیپ‌های گوناگون مشاهده شده در MTC است [۲۲،۸،۷, ۴۶-۴۳،۳۲،۲۵]. بدیهی است که عدم مشاهده جهش در اگزون‌های Hot spot پروتوآنکوژن RET افراد نمی‌تواند احتمال وجود جهش در سایر اگزون‌ها را نفی نماید و از آن‌جایی‌که در جمعیت مورد بررسی تنها اگزون‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۶ پروتوآنکوژن RET مطالعه شده است، پیشنهاد می‌شود که در مطالعه‌های آینده سایر اگزون‌ها به‌ویژه اگزون‌های ۱۳، ۱۴، ۱۵ و در صورت لزوم سایر اگزون‌های غیر Hot spot (هر چند که در حال حاضر تشخیص و پیشگیری از MTC از طریق بررسی جهش‌های پروتوآنکوژن RET در اگزون‌های غیر Hot spot ضروری به نظر نمیرسد) با روش دقیق تعیین توالی DNA از لحاظ وجود جهش‌های شایع یا جهش‌های جدید این ژن در بیماران MTC ایرانی و نیز ارتباط واریانت‌های یافته شده با وجود یا عدم وجود سایر جهش‌ها در سایر اگزون‌های ژن RET، ارتباط این نوع جهش‌ها با وضعیت بالینی و روند پیشرفت بیماری در افراد، مورد بررسی قرار گیرند. علاوه بر این، انجام مطالعات مورد-شاهد اگزون ۲، مطالعه و یافتن هاپلوتایپ‌های احتمالی در بیماران MTC ایرانی و خانواده‌ی آنان، افزایش حجم نمونه، مقایسه داده‌های حاصل با داده‌های پاتولوژی بیماران، در تحقیقات آتی در جهت تکمیل گزارش مدنظر قرار خواهد گرفت.

تشکر و قدردانی

از تمامی بیماران و خویشاوندانشان که حاضر به مشارکت در این مطالعه شدند و از همکاری بزرگوارانه متخصصین غدد که در تشخیص و معرفی بیماران بسیار همکاری نمودند و هم‌چنین از زحمات بی‌دریغ و کمک‌های فنی کارکنان زحمتکش آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی سپاس‌گزاریم. این مطالعه با حمایت و کمک مالی پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسید.

منابع

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012; 62: 10-29.

[2] Strosberg JR. Update on the management of unusual neuroendocrine tumors: pheochromocytoma and paraganglioma, medullary thyroid cancer and adrenocortical carcinoma. Sem Oncol 2013; 40: 120-133.

[3] Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. Clin Endoc (Oxf) 2004; 61: 299-310.

[4] Randolph GW, Maniar D. Medullary carcinoma of the thyroid. Cancer Control 2000; 7: 253-261.

[5] Hoff AO, Hoff PM. Medullary thyroid carcinoma. Hematol Oncol Clin North Am 2007; 21: 475-488.

[6] Roman S, Lin R, Sosa JA. Prognosis of medullary thyroid carcinoma: demographic, clinical, and pathologic predictors of survival in 1252 cases. Cancer 2006; 107: 2134-2142.

[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: 564-569.

[8] 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.

[9] 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: 458-460.

[10] 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 Endoc Metab 1996; 81: 1619-1622.

[11] Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American thyroid association. Thyroid 2009; 19: 565-612.

[12] Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 5658-5671.

[13] Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, et al. Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. Oncogene 1989; 4: 1519-1521.

[14] Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA, et al. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. Nature 1987; 328: 170-172.

[15] Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. Cell 1985; 42: 581-588.

[16] Mulligan LM. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. Nat Rev Cancer 2014; 14: 173-186.

[17] Arighi E, Borrello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. Cytokine Growth Factor Rev 2005; 16: 441-467.

[18] Ibanez CF. Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013; 5.

[19] Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. Nat Rev Neurosci 2002; 3: 383-394.

[20] Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. Cytokine Growth Factor Rev 2001; 12: 361-373.

[21] Wang X. Structural studies of GDNF family ligands with their receptors-Insights into ligand recognition and activation of receptor tyrosine kinase RET. Biochim Biophys Acta 2013; 1834: 2205-2212.

[22] Sheikholeslami SZ, Hoghooghi Rad L, Ghadaksaz Golab H, Hedayati M. Haplotype frequency of G691S/S904S in the RET proto-oncogene in patients with medullary thyroid carcinoma. Iranian J Public Health 2014; 43: 235-240.

[23] 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: 1575-1579.

[24] Panza E, Knowles CH, Graziano C, Thapar N, Burns AJ, Seri M, et al. Genetics of human enteric neuropathies. Progress Neurobiol 2012; 96: 176-189.

[25] Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2. Clinics (Sao Paulo) 2012; 67: 69-75.

[26] Moley JF, Debenedetti MK, Dilley WG, Tisell LE, Wells SA. Surgical management of patients with persistent or recurrent medullary thyroid cancer. J Intern Med 1998; 243: 521-526.

[27] 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: 3025-3029.

[28] Borrego S, Saez ME, Ruiz A, Gimm O, Lopez-Alonso M, Antinolo G, Eng C. Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. J Med Genet 1999; 36: 771-774.

[29] Lesueur F, Corbex M, McKay JD, Lima J, Soares P, Griseri P, et al. Specific haplotypes of the RET proto-oncogene are over-represented in patients with sporadic papillary thyroid carcinoma. J Med Genet 2002; 39: 260-265.

[30] Ghazi AA, Tabibi A, Sarvghadi F, Abdi H, Hedayati M, Pourafkari M, Tirgari F. Run yu multiple endocrine neoplasia Type 2A in an Iranian family: clinical and genetic studies, archives of Iranian medicine. Arch Iranian Med 2014; 17: 378-382.

[31] 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: 373-382.

[32] Hedayati M, Daneshpour M, Delbarpour Ahmadi A, Azizi F. Frequent gerem line mutations in RET proto oncogene exon 10 and 11 in hereditary medullary thyroid carcinom of Iranian population. Kowsar Med J 2010; 1: 17-21. (Persian).

[33] 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.

[34] Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PL, Hoang-Vu C, Raue F, et al. Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. Oncogene 1999; 18: 1369-1373.

[35] 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: 6268-6274.

[36] Fernandez RM, Pecina A, Antinolo G, Navarro E, Borrego S. Analysis of RET polymorphisms and haplotypes in the context of sporadic medullary thyroid carcinoma. Thyroid 2006; 16: 411-417.

[37] Fugazzola L, Muzza M, Mian C, Cordella D, Barollo S, Alberti L, et al. RET genotypes in sporadic medullary thyroid cancer: studies in a large Italian series. Clin Endoc (Oxf) 2008; 69: 418-425.

[38] Moore SW, Appfelstaedt J, Zaahl MG. Familial medullary carcinoma prevention, risk evaluation, and RET in children of families with MEN2. J Pediatr Surg 2007; 42: 326-332.

[39] 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: 402-408.

[40] 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: 36-44.

[41] Qi XP, Ying RB, Ma JM, Liu WT, Du ZF, Fei J, et al. Case report: a p.C618S RET proto-oncogene germline mutation in a large Chinese pedigree with familial medullary thyroid carcinoma. Fam Cancer 2012; 11: 131-136.

[42] 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: 181-186.

[43] Machens A, Brauckhoff M, Holzhausen HJ, Thanh PN, Lehnert H, Dralle H. Codon-specific development of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 3999-4003.

[44] Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Leary R, Bettegowda C, Roberts NJ, et al. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. J Clin Endocrinol Metab 2013; 98: E364-369.

[45] 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: 1104-1109.

[46] Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype relationship in multiple endocrine neoplasia type 2. Implications for clinical management. Hormones (Athens) 2009; 8: 23-28.

Germline mutations of RET proto-oncogene exon 2 in iranian population with medullary thyroid carcinoma

Hosna Hesanmanesh (M.Sc)[1], Marjan Zarif Yeganeh (M.Sc)[2], Sara Sheikholeslami (M.Sc)[2], Dariush Farhud (Ph.D)[3], Mehdi Hedayati (Ph.D)[*2]

1 – Department of Biology, Ahar Branch, Islamic Azad University, East Azerbaijan, Iran

2 – Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences and Metabolism, ShahidBeheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 – School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 7 Jan 2015 ; Accepted: 8 Aug 2015)

Introduction*:* Medullary thyroid carcinoma (MTC) accounts for 5-10% of all thyroid cancers andit is inherited in autosomal dominant pattern. Association of RET proto-oncogene mutations in exons 10-16 with MTC is well recognized. Since less attention has been paid to the study of other exons within the same gene, therefore, the aim of this study was to determine the frequency of germ line mutations in exon 2 of the RET proto-oncogene in patients with MTC in Iranian population.

Materials and Methods*:* There were 223 subjects (125 patients and 98 family members) were participated n this study. Genomic DNA was extracted using standard salting out/proteinase K method. The exon2 and exon-intron boundaries were amplified by using Polymerase Chain Reaction (PCR) and the direct DNA sequencing method was used for genotype analysis.

Results*:* The nucleotide changes c135G>A/A45A (rs1800858) in exon 2 and c.337+9G>A (rs2435351) and c.337+137G>T (rs2505530) were found in intronic region of RET gene. Among patients and relatives, the most and least genotype and allele frequencies were c.337+137G>T (rs2505530) and c135G>A/A45A (rs1800858), respectively. Also we did not find any significant correlation between detected nucleotide changes and disease phenotype, gender and ethnicity.

Conclusion*:* No mutation was detected leading to change in amino acid sequences in exon 2 or in exon-intron splice sites. However, further studies are recommended to identify the probable correlation between detected variations and presence or absence of other mutations in other RET main exons, and also to find haplotype association with the disease.

Keywords*:* Thyroid Neoplasms, Medullary Thyroid Carcinoma, RET Proto oncogene, Germ-Line Mutation, Exon2

* Corresponding author. Tel: +98 21 22432500

hedayati@endocrine.ac.ir