● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۳، ص ۲۶۰-۲۴۹، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

جهش‌های نقطه‌ای اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید

مرجان ظریف یگانه[۱]، سارا شیخ‌الاسلامی[۱]، گلنوش دهباشی یهبهانی[۲]، سمانه فراشی[۳]، لاله حقوقی راد[۳]، فریدون عزیزی[۴]، مهدی هدایتی[۵*]

خلاصه

مقدمه: سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی سیستم غدد درون‌ریز است. سرطان مدولاری تیروئید (Medullary thyroid carcinoma یا MTC) توموری بدخیم و مهاجم بوده که از سلول‌های پارافولیکولار تیروئید منشأ می‌گیرد. بیماری MTC به دو صورت ارثی (۲۵ درصد) و تک‌گیر (۷۵ درصد) بوده که نوع ارثی آن دارای توارث اتوزوم بارز می‌باشد. ارتباط جهش‌های نقطه‌ای پروتوآنکوژن RET (RE-arranged during transfection) با MTC (به‌ویژه اگزون‌های ۱۶، ۱۱ و ۱۰) به خوبی مشخص شده است. هدف از این مطالعه، تعیین نوع و فراوانی جهش‌های ژرم لاین اگزون ۱۰ این ژن در بیماران مبتلا به MTC بود.

روش: در مطالعه حاضر ۳۴۷ نفر شامل ۲۰۷ بیمار و ۱۴۰ نفر از اعضای درجه اول خانواده آنان مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه DNA (Deoxyribonucleic acid) ژنومی با استفاده از روش نمک اشباع- پروتئیناز K از لکوسیت‌های خون محیطی استخراج گردید. بررسی وجود جهش در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET نیز با روش PCR-Sequencing (Polymerase chain reaction-Sequencing) انجام گرفت.

یافته‌ها: ۱۴ جهش بدمعنی (Missense) (۱۰ جهش در مردان و ۴ جهش در زنان) در کدون‌های سیستئینی ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰ پروتوآنکوژن RET در ۱۱ بیمار و ۳ نفر از اعضای خانواده آنان یافت شد (۳/۶ درصد) که شامل چهار جهش C611Y در سه FMTC (Familial MTC) و یک خویشاوند، یک C618R در FMTC، یک C618S در sMTC (Sporadic MTC)، یک C620G در sMTC، چهار C620R در سه sMTC و یک FMTC و سه C620F در یک FMTC و دو خویشاوند آنان بود. شایع‌ترین جهش اگزون ۱۰ در مبتلایان به FMTC و sMTC به ترتیب در جهش‌های C611Y و C620R بود. در این مطالعه. جهشی در کدون سیستئینی ۶۰۹ اگزون ۱۰ یافت نگردید.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر شش نوع جهش بدمعنی در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET در نوع غیر سندرمی MTC یافت گردید. با توجه به نتایج حاصل شده، بررسی وجود جهش به ویژه در اگزون‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۶ این ژن در بیماران و اعضای خانواده آنان به روش تعیین توالی DNA توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سرطان مدولاری تیروئید، پروتوآنکوژن RET، اگزون ۱۰، جهش ژرم لاین، جمعیت ایرانی

۱- دانشجوی دوره دکترا، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ۲- کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ۳- کارشناس ارشد ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ۴- استاد، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ۵- دانشیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** hedayati@endocrine.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۲/۲۰ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۳/۵/۲۹ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۳/۷/۲

مقدمه

پروتوآنکوژن RET (RE-arranged during transfection) نوعی گیرنده تیروزین کیناز غشایی است که سیگنال‌های رشد و تمایز را منتقل می‌کند. مطالعات نشان داده است که انتقال سیگنال RET از طریق مسیرهای RAF-MERK-ERK و PI3K-AKT-mTOR انجام می‌گیرد (۱). Ishizaka و همکاران با استفاده از روش هیبرید کردن فلورسانس درجا (Fluorescence in situ hybridization یا FISH) پروتوآنکوژن RET را در ناحیه کروموزومی ۱۰q۱۱.۲ جایابی نمودند (۲). همچنین با اثبات وجود اثر ترانسفورماسیون، ژن RET به عنوان یک آنکوژن معرفی شد (۳). این تیروزین کیناز غشایی نقش مهمی را در تکامل، تمایز و مهاجرت اعصاب روده در طی دوران جنینی و نیز رشد نئوپلاستی سلول‌های مشتق شده از ستیغ عصبی ایفا می‌کند و در تکامل کلیه در پستانداران نیز دخیل است (۴، ۱).

گیرنده RET در داخل غشای سلول قرار می‌گیرد و دارای ناحیه‌های غنی از سیستئین، چهار ناحیه شبه کادهرین، یک جایگاه اتصال کلسیم در بخش خارج سلولی و دو بخش دارای فعالیت تیروزین کینازی داخل سلولی می‌باشد. عملکرد RET بر اساس اتصال لیگاندها و کمک گیرنده، دیمر شدن RET از طریق ناحیه غنی از سیستئین (خارج سلولی) و اتوفسفریله شدن ناحیه کاتالیک تیروزین کیناز (داخل سلول) صورت می‌گیرد. این فرایند منجر به انتشار سیگنال به داخل سلول و در نتیجه تغییر در بیان ژنی خاص، گسترش و تمایز سلول‌های عصبی غدد درون‌ریز و همچنین پاسخ‌های بیولوژیک می‌گردد (۱). گیرنده RET از طریق بازآرایی‌های سیتوژنتیک می‌تواند به آنکوژن فعالی تبدیل گردد (۵).

پروتوآنکوژن RET دارای چهار لیگاند متعلق به خانواده لیگاندهای GDNF (Glial cellline derived neurotrophic factor) یا GFLs (GDNF family ligands) و شامل PSPN (Persephin)، ARTN (Artemin)، NRTN (Neurturin) و GDNF است (۹-۶). فعال شدن RET با هر یک از این چهار لیگاند از طریق یکی از کمک گیرنده‌های GFRα (GDNF family receptors α) انجام می‌گیرد. اتصال GDNF-GFRα1 نیز توسط بر هم‌کنش‌های مولکول GFRα با اولین ناحیه شبه کادهرین و ناحیه غنی از سیستئین مولکول RET صورت می‌گیرد. کدون‌های سیستئینی ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰ (اگزون ۱۰) و ۶۳۰ و ۶۳۴ (اگزون ۱۱) رمز کننده ناحیه مهم غنی از سیستئین پروتئین RET هستند (۱۱، ۱۰).

سرطان تیروئید شایع‌ترین بدخیمی سیستم غدد درون‌ریز می‌باشد که از سلول‌های فولیکولار یا پارافولیکولار غده تیروئید منشأ می‌گیرد. این سرطان مسؤول یک درصد انواع سرطان‌ها در انسان است. بیش از ۹۰ درصد سرطان‌های تیروئید از سلول‌های فولیکولار مشتق می‌شوند (۱۳، ۱۲). درصد اندکی از تومورهای تیروئید (۱۰-۵ درصد) از سلول‌های C یا همان سلول‌های پارافولیکولار منشأ می‌گیرد که منجر به سرطان مدولاری تیروئید (Medullary thyroid carcinoma یا MTC) می‌گردد (۱۴، ۱۲). سرطان مدولاری تیروئید می‌تواند به صورت تک‌گیر (غیر خانوادگی، ۸۰-۷۰ درصد) و یا ارثی (خانوادگی، ۳۰-۲۰ درصد) رخ دهد (۱۶، ۱۵). نوع ارثی این بیماری نیز به دو فرم سندرمی MEN2B و MEN2A (Multiple endocrine neoplasia type 2 A) و غیر سندرمی (Familial MTC یا FMTC) تقسیم می‌شود (۱۷). این سه نوع MTC از لحاظ بروز، ژنتیک، نفوذ وابسته به سن، ارتباط با سایر بیماری‌ها، شدت و پیشرفت بیماری با یکدیگر متفاوت هستند (۱۹، ۱۸). مشخصه FMTC، رخداد خانوادگی MTC بدون وجود بیماری‌های دیگر است (۲۰). MEN2A با مشخصه‌های اصلی MTC، فئوکروموسیتوما (Pheochromocytoma یا Pheo) و یا پرکاری غدد پاراتیروئید مشخص می‌گردد (۲۱، ۲۰). شدیدترین نوع خانوادگی MTC، بیماری MEN2B است که دارای علایمی مانند گانگلیونوروماتوزیس، لب‌های برجسته، اسهال، نوروماهای مخاطی، Pheo و شروع بسیار زودرس MTC (در سنین کودکی) می‌باشد (۲۱، ۲۰، ۱۴، ۱۳).

جهش‌های گوناگون کسب عملکرد در پروتوآنکوژن RET به ویژه در اگزون ۱۰ (کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰)، اگزون ۱۱ (کدون‌های ۶۳۰ و ۶۳۴) و اگزون ۱۶ (کدون ۹۱۸) این ژن در ارتباط با FMTC، MEN2B، MEN2A و MTC و جهش‌های از دست دادن عملکرد آن با بیماری هیرشپرونگ (Hirschsprung یا HSCR) به خوبی نشان داده شده است (۲۶-۲۲). بر اساس مطالعات موجود، تاکنون

گزارش‌های اندکی در مورد جهش‌های پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به MTC در جمعیت ایرانی گزارش شده است (۳۰-۲۷). در پژوهش حاضر، جهش‌های ژرم لاین یکی از اگزون‌های اصلی پروتوآنکوژن RET (اگزون ۱۰) در بیماران مبتلا به MTC و اعضای درجه یک خانواده آنان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

غربالگری جهش‌های پروتوآنکوژن RET به منظور مدیریت بهینه در درمان بیماران مبتلا به MTC 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 (به عنوان یک مرکز ارجاعی) در حال اجرا می‌باشد. مطالعه توصیفی- مقطعی حاضر نیز بخشی از پروژه تحقیقاتی در زمینه بیماران مبتلا به MTC در این مرکز بود.

۳۴۷ نفر شامل ۲۰۷ بیمار مبتلا [۱۵۴ نفر sMTC (Sporadic MTC)، ۸ نفر MEN2A، ۳۸ نفر FMTC، ۳ نفر MEN2A و ۴ نفر Pheo] و ۱۴۰ نفر اعضای درجه اول خانواده آنان مورد بررسی قرار گرفتند. روش نمونه‌گیری به صورت در دسترس زمان‌دار بود و نمونه‌گیری از افراد مراجعه کننده در فاصله زمانی معین انجام گرفت. افراد مورد مطالعه بر اساس یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی به گروه‌های فوق طبقه‌بندی و پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه وارد مطالعه شدند. افراد مبتلا به MTC در بیمارستان های دانشگاهی و مراکز درمانی نقاط مختلف کشور بر اساس شواهد آسیب‌شناسی تشخیص داده شده و تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند. از افراد مورد بررسی ۵ میلی‌لیتر خون محیطی اخذ [در لوله‌های حاوی ۲۵۰ میکرولیتر EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۵ مولار] و محتوای DNA (Deoxyribonucleic acid) ژنومی با استفاده از روش استاندارد نمک اشباع- پروتئیناز K از خون محیطی افراد استخراج شد (۲۹، ۲۷).

برای تکثیر اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET از پرایمرهای اختصاصی ´F5GCGCCCCAGGAGGCTGATGC3´ و ´R5CGTGGTGGTCCCGCCGCC3´ استفاده گردید. واکنش PCR (Polymerase chain reaction) در حجم ۵۰ میکرولیتر با شرایط زیر انجام گرفت: ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۳ میکرولیتر (۱۰ میلی‌مول) dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates)، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای اگزون ۱۰ (۱۰ pμ)، ۰/۲۵ میکرولیتر (۵۰ میلی‌مول) کلرید منیزیم، ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) DNA و ۱ واحد آنزیم تک پلی‌مراز.

واکنش‌ها در ترموسایکلر اتوماتیک انجام شد (peqSTAR 96X HP, Peclab Co, Germany). شرایط PCR برای اگزون ۱۰ شامل ۳۰ چرخه دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشت شدن، دمای ۶۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای بازسرشت شدن، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای تکثیر و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی بود (۲۹، ۲۷). به منظور تأیید انجام موفقیت آمیز بودن PCR، محصولات حاصل از آن با ژل پلی‌آکریل آمید ۸ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره بررسی شد. بعد از کنار گذاشتن نمونه‌هایی که به لحاظ کمی و یا کیفی مناسب نبودند، ۳۴۷ نمونه باقی ماند که تعیین توالی گردید و محاسبات فرکانس آللی و ژنوتیپی بر اساس آن‌ها صورت گرفت. پس از انجام تعیین توالی، فایل‌های کروماتوگرام با استفاده از نرم‌افزار Chromas 2.33 و NCBI Blast تجزیه و تحلیل شد. پس از بررسی جهش پروتوآنکوژن RET و در صورتی که بیمار دارای جهش بود، بستگان درجه اول او نیز برای بررسی ژنتیکی فراخوانده شدند.

نتایج

تعداد (درصد) و سن شرکت کنندگان مطالعه در جدول ۱ و فراوانی فنوتیپ‌های موجود در بیماران در جدول ۲ آمده است. تمامی افراد بیمار تحت جراحی تیروئیدکتومی (برداشت کامل یا بخشی از غده تیروئید) و یا آدرنالکتومی (برداشتن کامل و یا قسمتی از یک یا هر دو غده فوق کلیه) قرار گرفته بودند.

جدول ۱. *اطلاعات دموگرافیک بیماران و اعضای خانواده آنان*

شرکت کنندگان	کل	زن	مرد	سن (سال) (میانگین ± انحراف معیار)	نسبت زن:مرد
	فراوانی- تعداد (درصد)				
بیماران	(۵۹/۷) ۲۰۷	(۵۵/۶) ۱۱۵	۹۲ (۴۴/۴)	۳۹/۱۹ ± ۱۳/۵۶	۱:۱/۲۵
خویشاوندان درجه یک	(۴۰/۳) ۱۴۰	۷۶ (۵۴/۳)	۶۴ (۴۵/۷)	۲۵/۲۲ ± ۱۵/۳۳	۱:۱/۱۸
جمع	۳۴۷ (۱۰۰)	۱۹۱ (۵۵)	۱۵۶ (۴۵)	۳۳/۸۰ ± ۱۷/۷۹	۱:۱/۲۲

جدول ۲. *فراوانی فنوتیپ‌های یافت شده در بیماران*

بیماران	FMTC	MEN2A	MEN2B	sMTC	Pheo
	تعداد (درصد)				
زن	۲۱ (۱۰/۲)	۴ (۱/۹)	۲ (۱/۰)	۸۷ (۴۲/۰)	۱ (۰/۵)
مرد	۱۷ (۸/۲)	۴ (۱/۹)	`۱ (۰/۵)	۶۷ (۳۲/۷)	۲ (۱/۰)
جمع	۳۸ (۱۸/۴)	۸ (۳/۹)	۳ (۱/۵)	۱۵۵ (۷۴/۷)	۳ (۱/۵)

MEN2A: Multiple endocrine neoplasia type 2 A; MEN2B: Multiple endocrine neoplasia type 2 B; FMTC: Familial medullary thyroid carcinoma; sMTC: Sporadic medullary thyroid carcinoma; Pheo: Pheochromocytoma

به طور کلی فراوانی کم‌کاری تیروئید، پرکاری تیروئید و گواتر به ترتیب ۳۱، ۹ و ۵ نفر بود (جدول ۳). در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین کم‌کاری تیروئید، پرکاری تیروئید و گواتر با ابتلا به MTC یافت نگردید.

جدول ۳. *فراوانی کم‌کاری تیروئید، پرکاری تیروئید و گواتر در افراد مورد مطالعه*

فراوانی / بیماری	بیماران (۲۰۷ نفر)	خویشاوندان (۱۴۰ نفر)	Pheo	sMTC	MEN2B	MEN2A	FMTC
			۳	۱۵۵	۳	۸	۳۸
کم‌کاری تیروئید [تعداد (درصد)]	۱۵ (۷/۲)	۱۶ (۱۱/۴)	۰	۲	۰	۰	۳
پرکاری تیروئید [تعداد (درصد)]	۷ (۳/۴)	۲ (۱/۴)	۰	۵	۰	۱	۱
گواتر [تعداد (درصد)]	۴ (۱/۹)	۱ (۰/۷)	۰	۴	۰	۰	۰

MEN2A: Multiple endocrine neoplasia type 2 A; MEN2B: Multiple endocrine neoplasia type 2 B; FMTC: Familial medullary thyroid carcinoma; sMTC: Sporadic medullary thyroid carcinoma; Pheo: Pheochromocytoma

در پژوهش حاضر ۱۴ جهش بدمعنی (Missense) در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET در ۱۱ بیمار و ۳ نفر از خویشاوندان درجه یک آنان یافت گردید. از این تعداد ۹ جهش به صورت انتقالی (Transition) و ۵ جهش به صورت متقاطع (Transversion) در سه کدون سیستئینی ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰ بود که شامل چهار C611Y در سه بیمار FMTC و یک خویشاوند، یک C618R در بیمار FMTC، یک C618S در بیمار sMTC، یک C620G در بیمار sMTC، چهار C620R در یک بیمار FMTC و سه بیمار sMTC و سه C620F در یک بیمار FMTC و دو خویشاوند بود (جدول ۴).

جدول ٤. *جهش‌های یافت شده در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET (RE-arranged during transfection) در بیماران و خویشاوندان آنان*

فراوانی کدون‌های جهش یافته	تغییر نوکلئوتیدی	وضعیت بالینی	فراوانی آللی (درصد)
C611Y (٤ نفر)	TGC611TAC	FMTC (۳ نفر) خویشاوندان (۱ نفر)	۱/۴۰
C618R (۱ نفر)	TGC618CGC	FMTC (۱ نفر)	۰/۱۴
C618S (۱ نفر)	TGC618AGC	sMTC (۱ نفر)	۰/۱۴
C620G (۱ نفر)	TGC620GGC	sMTC (۱ نفر)	۰/۱۴
C620R (٤ نفر)	TGC620CGC	FMTC (۱ نفر) sMTC (۳ نفر)	۰/۵۷
C620F (۳ نفر)	TGC620TTC	FMTC (۱ نفر) sMTC (۲ نفر)	۰/۴۳

FMTC: Familial medullary thyroid carcinoma; sMTC: Sporadic medullary thyroid carcinoma

با وجود این که تعداد زنان بیمار در مطالعه حاضر بیشتر از مردان بود، اما جهش‌های اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET به طور معنی‌داری در مردان بیشتر از زنان مشاهده شد (۱۰ جهش در مردان و ۴ جهش در زنان) (P = ۰/۰۳، آزمون Fisher exact). تحلیل آماری Spearman نیز ارتباط خطی را با جنسیت و وجود جهش در این اگزون نشان داد. همچنین فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی جهش‌های اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET در این مطالعه به ترتیب ۶/۷۶ و ۳/۶۲ درصد بود.

از آن‌جایی که مطالعه حاضر بخشی از یک پروژه در حال اجرا در مورد بررسی تمامی اگزون‌های مهم پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به MTC بود، نتایج تجزیه و تحلیل یافته‌ها نشان داد که تمام افراد دارای جهش اگزون ۱۰ (به جز یک نفر) دارای هاپلوتایپ G691S/S604S (exon11/exon15) نیز بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر از ۲۰۷ فرد مبتلا به MTC، شایع‌ترین فنوتیپ‌ها به ترتیب عبارت از sMTC، FMTC، MEN2A، Pheo و MEN2B بود. بررسی اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET، شش نوع جهش متفاوت را فقط در بیماران مبتلا به sMTC و FMTC نشان داد. این جهش‌ها تنها به سه کدون مهم سیستئینی این ژن (۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰) محدود بود. شایع‌ترین جهش به کدون ۶۲۰ و پس از آن به کدون‌های ۶۱۱ و ۶۱۸ ارتباط داشت. در بیماران مبتلا به MEN2A، MEN2B و Pheo هیچ جهشی در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET یافت نگردید؛ این در حالی است که جهش‌های مختلفی در چهار کدون سیستئینی اگزون ۱۰ این ژن (۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰) در بسیاری از جمعیت‌های بیماران مبتلا به MEN2A گزارش شده است (۳۴-۳۱).

جالب توجه آن است که با بررسی وضعیت میزان حفاظت شدگی توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET در ۳۱ گونه مختلف (داده‌ها نشان داده نشده است)، مشخص گردید که اولین و دومین نوکلئوتید کدون‌های بسیار مهم سیستئنی ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰ (نوکلئوتیدهای T و G کدون TGC که رمز کننده آمینواسید سیستئین در اگزون ۱۰ است) در تمام گونه‌ها یکسان و در طی تکامل بسیار حفاظت شده هستند و این امر بیانگر اهمیت ویژه کدون‌های سیستئینی اگزون ۱۰ در پروتوآنکوژن RET می‌باشد.

ناحیه غنی از سیستئین RET از طریق پیوندهای دی‌سولفیدی در پایداری ساختار سوم این پروتئین نقش

دارد (۱۱، ۱۰). جهش‌های بدمعنی در هر یک از شش کدون سیستئینی گیرنده تیروزین کیناز RET اگزون ۱۰ (کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰) و اگزون ۱۱ (کدون‌های ۶۳۰ و ۶۳۴) در ناحیه غنی از سیستئین خارج سلولی این پروتئین منجر به دو تایی شدن مستقل از لیگاند و فعال شدن پایدار این گیرنده از طریق دوتایی‌های یک جور حاصل از پیوندهای دی‌سولفیدی می‌گردد که در نهایت منجر به اتوفسفریله شدن توالی‌های تیروزینی خاص در ناحیه کینازی داخل سلولی گیرنده RET می‌شود (۳۶، ۳۵).

در بیماران مبتلا به MEN2A، جهش‌های پروتوآنکوژن RET بیشتر در یکی از شش توالی سیستئینی ذکر شده رخ می‌دهد (۳۸، ۳۷، ۲۶، ۲۴، ۲۰). بیشترین جهش‌های پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به FMTC علاوه بر توالی‌های سیستئینی، در کدون‌های ۷۹۸، ۸۰۴ و ۸۹۱ که در ناحیه تیروزین کینازی داخل سلولی قرار دارد، یافت می‌شود (۴۱-۳۸، ۲۰). جهش‌ها در فنوتیپ بیماران مبتلا به MEN2B به ناحیه تیروزین کینازی داخل سلولی پروتوآنکوژن RET محدود شده است که به طور عمده شامل کدون ۹۱۸ (اگزون ۱۶) و کمتر کدون ۸۸۳ (اگزون ۱۵) می‌باشد (۴۴-۴۲).

بر اساس اطلاعات و داده‌های موجود در پایگاه‌های معتبر ثبت جهش (۴۸-۴۵)، تاکنون نزدیک به ۵۰ نوع جهش گوناگون شامل جهش‌های بدمعنی، بی‌معنی (Nonsense)، هم‌معنی (Synonymous) و همچنین حذف‌های ۷ و ۴۸ نوکلئوتیدی در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET شناسایی شده است و بیشتر این جهش‌ها در انواع مختلفی از سرطان‌ها به ویژه سرطان تیروئید و بیماری HSCR یافت می‌شود. مهم‌ترین و شایع‌ترین این جهش‌ها مربوط به کدون‌های سیستئینی ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰ می‌باشد (جدول ۵). بیشترین تغییر نوکلئوتیدی در اگزون ۱۰ مربوط به کدون سیستئینی ۶۰۹ است که شامل ۹ نوع تغییر نوکلئوتیدی که منجر به شش تغییر آمینواسیدی (جهش بدمعنی)، یک جهش بی‌معنی و یک جهش هم‌معنی می‌باشد. این تغییرات نوکلئوتیدی با فنوتیپ‌های بیماری‌های MEN2A، HSCR و سرطان تیروئید مرتبط بود (جدول ۵).

نکته جالب توجه آن است که در ۲۰۷ بیمار مبتلا به MTC مطالعه حاضر، هیچ جهشی در کدون سیستئینی ۶۰۹ که شایع‌ترین کدون جهش یافته در اگزون ۱۰ بسیاری از جمعیت‌ها می‌باشد، یافت نگردید.

اطلاعات و داده‌های موجود در پایگاه‌های معتبر ثبت جهش نشان می‌دهد که تاکنون هفت تغییر نوکلئوتیدی در کدون ۶۱۱ پروتوآنکوژن RET شناسایی شده (جدول ۵) که شش نوع آن منجر به جهش‌های بدمعنی و یکی منجر به جهش هم‌معنی در این کدون سیستئینی گردیده است (۴۸-۴۵). در مطالعه حاضر تنها یک جهش بدمعنی در کدون ۶۱۱ در چهار بیمار مبتلا به MTC یافت شد که منجر به تغییر آمینواسید سیستئین به تیروزین گردید. همان‌گونه که در جدول ۵ ملاحظه می‌شود، هشت نوع جهش مختلف در کدون سیستئینی ۶۱۸ شناسایی شده است که از این تعداد، شش جهش بدمعنی، یک جهش بی‌معنی و یک جهش نیز هم‌معنی بود. در مطالعه حاضر تنها دو جهش بدمعنی مختلف در کدون ۶۱۸ در یک بیمار مبتلا به FMTC و یک بیمار مبتلا به sMTC یافت شد که تغییر نوکلئوتیدی سیستئین به سرین و آرژینین را به دنبال داشت.

تاکنون هشت جهش مختلف در کدون ۶۲۰ اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET شناسایی شد که شامل هفت جهش بدمعنی و یک جهش هم‌معنی می‌باشد. در مطالعه حاضر کدون ۶۲۰ شایع‌ترین کدون جهش یافته در بیماران مبتلا به sMTC (شش جهش) بود. به عبارت دیگر، جهش در کدون ۶۲۰ بیش از نیمی از جهش‌ها را به خود اختصاص داده بود. همچنین هیچ جهش بدمعنی و یا هم‌معنی در کدون‌های سیستئینی و نیز هیچ گونه جهشی در کدون‌های غیر سیستئینی اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET مشاهده نگردید.

به طور کلی نتایج حاصل از مطالعه حاضر بیانگر آن بود که جهش‌های اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET در جمعیت MTC مورد بررسی به جهش‌های نقطه‌ای بدمعنی در سه کدون سیستئینی ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰ فقط در مبتلایان به FMTC و sMTC محدود می‌شود. همچنین هیچ گونه جهشی در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET در نوع سندرمی MTC (سندرم‌های MEN2) یافت نگردید.

جدول ۵. جهش‌های گوناگون گزارش شده تاکنون در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن *RET (RE-arranged during transfection) (۴۸-۴۵)*

شماره دسترسی	تغییر نوکلئوتید	تغییر اسیدآمینه	کدون	فنوتیپ	(T) Transition (V) Transversion
CM001784	GGC-GAC	Gly-Asp	۵۸۸	Total colonic aganglionosis	T
COSM20890	GTT-ATT	Val-Ile	۵۹۱	سرطان تیروئید	T
COSM979	48bp Inframe deletion	16 aa del	۵۹۲-۶۰۷	HSCR	-
COSM32405	GGA-GAA	Gly-Glu	۵۹۳	سرطان روده بزرگ	T
COSM979	GGA-TGA	Gly-Term	۵۹۳	سرطان روده بزرگ	V
COSM1603444	CCT-CTT	Pro-Leu	۵۹۶	سرطان کبد	T
COSM241394	CGG-CAG	Arg-Gln	۶۰۰	سرطان کبد	T
COSM401039	GGG-TGG	Gly-Trp	۶۰۱	سرطان ریه	V
CM014743	AAA-CAA	Lys-Gln	۶۰۳	سرطان تیروئید	T
CM083079	TAT-TGT	Tyr-Cys	۶۰۶	MTC	T
rs199921511	TAT-CAC	Tyr-His	۶۰۶	-	T
CM020766	TGC-AGC	Cys-Ser	۶۰۹	HSCR	V
CM961242	TGC-CGC	Cys-Arg	۶۰۹	MEN2A	T
CM961243	TGC-GGC	Cys-Gly	۶۰۹	MEN2A	V
CM941226	TGC-TAC	Cys-Tyr	۶۰۹	سرطان تیروئید	T
CM014088	TGC-TCC	Cys-Ser	۶۰۹	سرطان تیروئید	V
CM077964	TGC-TTC	Cys-Phe	۶۰۹	سرطان تیروئید	V
CM941227	TGC-TGG	Cys-Trp	۶۰۹	HSCR	V
	TGC-TGT	Cys-Cys	۶۰۹	-	T
COSM95656	TGC-TGA	Cys-Term	۶۰۹	سرطان ریه	V
CM961247	TGC-AGC	Cys-Ser	۶۱۱	سرطان تیروئید	V
CM961247	TGC-CGC	Cys-Arg	۶۱۱	MEN2A	T
CM981703	TGC-GGC	Cys-Gly	۶۱۱	سرطان تیروئید	V
CM961244	TGC-TAC	Cys-Tyr	۶۱۱	MEN2A	T
CM961245	TGC-TTC	Cys-Phe	۶۱۱	MEN2A	V
CM930642	TGC-TGG	Cys-Trp	۶۱۱	MEN2A	V
	7bp Inframe deletion	3 aa deletion	۶۱۲-۶۱۴	HSCR	-
rs80069458	TGC-TGT	Cys-Cys	۶۱۱	-	T

CM941230	TGC-AGC	Cys-Ser	٦١٨	سرطان تیروئید	V
CM941231	TGC-CGC	Cys-Arg	٦١٨	سرطان تیروئید	T
CM941232	TGC-GGC	Cys-Gly	٦١٨	MEN2A	V
CM941228	TGC-TAC	Cys-Tyr	٦١٨	MTC	T
CM941229	TGC-TCC	Cys-Ser	٦١٨	MEN2A	V
CM961248	TGC-TTC	Cys-Phe	٦١٨	MEN2A	V
	TGC-TGT	Cys-Cys	٦١٨	–	T
CM066211	TGC-TGA	Cys-Term	٦١٨	MEN2A	V
CM941235	TGC-AGC	Cys-Ser	٦٢٠	سرطان تیروئید	V
CM941236	TGC-CGC	Cys-Arg	٦٢٠	سرطان تیروئید	T
CM971302	TGC-GGC	Cys-Gly	٦٢٠	MEN2A	V
CM930643	TGC-TAC	Cys-Tyr	٦٢٠	MEN2A	T
CM941233	TGC-TCC	Cys-Ser	٦٢٠	سرطان تیروئید	V
CM941234	TGC-TTC	Cys-Phe	٦٢٠	سرطان تیروئید	V
CM981704	TGC-TGG	Cys-Trp	٦٢٠	سرطان تیروئید	V
rs79890926	TGC-TGT	Cys-Cys	٦٢٠	–	T
rs201979255	CCC-CCG	Pro-Pro	٦٢٢	–	V
COSM918114	GAA-AAA	Glu-Lys	٦٢٣	سرطان آندومتر	T
CM991097	CAG-AAG	Gln-Lys	٦٢٦	HSCR	V
rs147692872	CAG-CAA	Glu-Glu	٦٢٦	–	T

HSCR: Hirschsprung; MTC: Medullary thyroid carcinoma; MEN2A: Multiple endocrine neoplasia type 2 A

سپاسگزاری

هزینه‌های اجرای تحقیق حاضر توسط مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تأمین شده است. نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس خود را از بیماران و خانواده آنان، پزشکان متخصص غدد و همچنین کارکنان آزمایشگاه ژنتیک مولکولی ابراز می‌دارند.

References

1. Ibanez CF. Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(2).
2. 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(12): 1519-21.
3. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 1985; 42(2): 581-8.
4. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 1994; 367(6461): 380-3.
5. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990; 60(4): 557-63.
6. Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson EM, Jr., et al. Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 1996; 384(6608): 467-70.
7. Treanor JJ, Goodman L, de SF, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996; 382(6586): 80-3.
8. Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, et al. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* 1998; 21(6): 1291-302.
9. Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG, et al. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 1998; 20(2): 245-53.
10. Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, et al. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 1996; 381(6585): 785-9.
11. Kjaer S, Ibanez CF. Identification of a surface for binding to the GDNF-GFR alpha 1 complex in the first cadherin-like domain of RET. *J Biol Chem* 2003; 278(48): 47898-904.
12. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 292-306.
13. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(3): 184-99.
14. Oberg K. The genetics of neuroendocrine tumors. *Semin Oncol* 2013; 40(1): 37-44.
15. Roman S, Lin R, Sosa JA. Prognosis of medullary thyroid carcinoma: demographic, clinical, and pathologic predictors of survival in 1252 cases. *Cancer* 2006; 107(9): 2134-42.
16. Campbell MJ, Seib CD, Gosnell J. Vandetanib and the management of advanced medullary thyroid cancer. *Curr Opin Oncol* 2013; 25(1): 39-43.
17. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Mol Cell Endocrinol* 2014; 386(1-2): 2-15.
18. 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(12): 5658-71.
19. 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(6): 565-612.

20. 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.
21. Romei C, Cosci B, Renzini G, Bottici V, Molinaro E, Agate L, et al. RET genetic screening of sporadic medullary thyroid cancer (MTC) allows the preclinical diagnosis of unsuspected gene carriers and the identification of a relevant percentage of hidden familial MTC (FMTC). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; 74(2): 241-7.
22. Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, Pelet A, Dow E, Abel L, et al. Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 1994; 367(6461): 378-80.
23. Manie S, Santoro M, Fusco A, Billaud M. The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet* 2001; 17(10): 580-9.
24. Pasini B, Rossi R, Ambrosio MR, Zatelli MC, Gullo M, Gobbo M, et al. RET mutation profile and variable clinical manifestations in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung's disease. *Surgery* 2002; 131(4): 373-81.
25. Boikos SA, Stratakis CA. Molecular mechanisms of medullary thyroid carcinoma: current approaches in diagnosis and treatment. *Histol Histopathol* 2008; 23(1): 109-16.
26. Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Renzini G, Molinaro E, et al. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(3): 682-7.
27. 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.
28. 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.
29. Hedayati M, Zarif Yeganeh ZY, 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. *Journal of Thyroid Research* 2011; 2011: 1.
30. Sheikholeslami S, Zarif Yeganeh M, Hoghooghi Rad L, Golabghadaksaz H, Hedayati M. Haplotype frequency of G691S/S904S in the RET proto-onco-gene in patients with medullary thyroid carcinoma. *Iranian J Publ Health* 2014; 43(2): 235-40.
31. Frank-Raue K, Rybicki LA, Erlic Z, Schweizer H, Winter A, Milos I, et al. Risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germline RET mutations located in exon 10. *Hum Mutat* 2011; 32(1): 51-8.
32. Qari F. RET codon 618 mutations in Saudi families with multiple endocrine neoplasia Type 2A and familial medullary thyroid carcinoma. *Ann Saudi Med* 2013; 33(2): 155-8.
33. Neocleous V, Skordis N, Portides G, Efstathiou E, Costi C, Ioannou N, et al. RET proto-oncogene mutations are restricted to codon 618 in Cypriot families with multiple endocrine neoplasia 2. *J Endocrinol Invest* 2011; 34(10): 764-9.

34. Paun DL, Mohora M, Duta C, Dumitrache C. Genetic testing for multiple endocrine neoplasia type 2. *Rom J Intern Med* 2008; 46(2): 159-63.

35. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 1995; 267(5196): 381-3.

36. Arlt DH, Baur B, Wagner B, Hoppner W. A novel type of mutation in the cysteine rich domain of the RET receptor causes ligand independent activation. *Oncogene* 2000; 19(30): 3445-8.

37. 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(2): E364-E369.

38. Frank-Raue K, Rondot S, Schulze E, Raue F. Change in the spectrum of RET mutations diagnosed between 1994 and 2006. *Clin Lab* 2007; 53(5-6): 273-82.

39. Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, van Vroonhoven TJ, Roeher HD, et al. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(16): 1517-25.

40. Machens A, Holzhausen HJ, Thanh PN, Dralle H. Malignant progression from C-cell hyperplasia to medullary thyroid carcinoma in 167 carriers of RET germline mutations. *Surgery* 2003; 134(3): 425-31.

41. 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.

42. Smith DP, Houghton C, Ponder BA. Germline mutation of RET codon 883 in two cases of de novo MEN 2B. *Oncogene* 1997; 15(10): 1213-7.

43. Gimm O, Marsh DJ, Andrew SD, Frilling A, Dahia PL, Mulligan LM, et al. Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(11): 3902-4.

44. Iwashita T, Asai N, Murakami H, Matsuyama M, Takahashi M. Identification of tyrosine residues that are essential for transforming activity of the ret proto-oncogene with MEN2A or MEN2B mutation. *Oncogene* 1996; 12(3): 481-7.

45. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda(MD): National Center for Biotechnology Information, NationalLibrary of Medicine. (dbSNP Build ID: {build ID}) 2013.

46. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutationsin human cancer. Nucleic Acids Res. 2014; 43: D 805–11. doi:10.1093/nar/gku1075

47. Flicek P, Ahmed I, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, et al. Ensembl 2013. Nucleic Acids Res. 2013; 41: D 48-55.doi: 10.1093/nar/gks 1236

48. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2003 update. *Hum Mutat* 2003; 21: 577–81

Point Mutations in RET Proto-Oncogene Exon 10 in Patients with Medullary Thyroid Carcinoma

Marjan Zarif-Yeganeh, M.Sc.[1], Sara Sheikholeslami, M.Sc.[1], Golnoush Dehbashi-Behbahani, M.Sc.[2], Samaneh Farashi, M.Sc.[3], Laleh Hoghooghi-Rad, M.Sc.[3], Fereidoun Azizi, Ph.D. [4], Mehdi Hedayati, Ph.D.[5*]

1. Ph.D. Student, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

3. Master of Human Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Professor, Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5. Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Obesity Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

(Received: 10 May 2014 Accepted: 24 Sep. 2014)

Abstract

Background & Aims: Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy. Medullary thyroid carcinoma (MTC) is an aggressive malignant tumor arising from parafollicular cells of the thyroid. MTC occurs in hereditary (25%, hMTC) or sporadic (75%, sMTC) forms. The hMTC form has an autosomal dominant inheritance. RET proto-oncogene mutations, especially the 10, 11, and 16 exones, are associated with MTC. The aim of this study was to determine the type and frequency of RET proto-oncogene exon 10 in patients with MTC.

Methods: The study participants included 347 individuals, including 207 patients and 140 of their first degree relatives. Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes using salting out/Proteinase K method. All individuals were tested for RET mutations in exon 10 using polymerase chain reaction (PCR)-DNA sequencing method.

Results: A total of 14 germline missense RET mutations were identified in cysteine codons 611, 618, and 620 in 11 patients (10 mutation in males, 4 in females), and 3 of their first-degree relatives (frequency: 3.6%) which were as follows: four C611Y (three FMTC, one relative), one C618R (FMTC), one C618S (sMTC), one C620G (sMTC), four C620R (one FMTC, three sMTC), and three C620F (one FMTC, two relatives). The most predominant mutations in exon 10 in our FMTC and sMTC patients were C611Y and C620R, respectively. We did not find any mutations in cysteine codon 609.

Conclusion: In the present study, 6 different types of missense mutations were identified in exon 10 of RET in the nonsyndromic form of MTC. Based on the results of this study, mutation detection using DNA sequencing in exons 10, 11, and 16 of RET in patients with MTC and their relatives is recommended.

Keywords: Medullary thyroid cancer, RET proto-oncogene, Exon 10, Germline mutation, Iranian population

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(3): 249-260