

## جهش‌های رایج در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET

## در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید

شکوفه رزقی بارز<sup>۱</sup> BSc، مرجان ظریف یگانه<sup>۲</sup> MSc، سارا شیخ‌الاسلامی<sup>۱</sup> MSc، لاله حقوقی‌راد<sup>۲</sup> MSc،فریدون عزیزی<sup>۳</sup> PhD، مهدی هدایتی<sup>\*</sup> PhD<sup>\*</sup> مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران

## چکیده

**اهداف:** سرطان مدولاری تیروئید ۱۰-۵٪ کل انواع سرطان‌های تیروئید را در بر می‌گیرد. نقش مهم جهش‌های پروتوآنکوژن RET در پیدایش MTC به‌خوبی مشخص شده است. هدف از این مطالعه، بررسی شیوع ۷ جهش ژرم‌لاین رایج اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET در افراد مبتلا به MTC در جمعیت ایرانی بود.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع توصیفی در سال ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۹ انجام شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۱۷ نفر از بیماران مبتلا به MTC و خویشاوندان درجه اول آنان بود که به‌روش نمونه‌گیری آسان انتخاب شدند. محتوای DNA ژنومی خون محیطی با روش استاندارد نمک اشباع/پروتئینازکا استخراج شد. به‌منظور شناسایی جهش‌های مورد نظر در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET از روش PCR-RFLP استفاده شد.

**یافته‌ها:** بین افراد مورد مطالعه (نسبت زن به مرد ۱/۴:۱، میانگین سن ۳۳/۴±۱۵/۸ سال) با بررسی الگوهای حاصل از RFLP، ۹ جهش در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET شناسایی شد. از این تعداد، ۷ جهش مربوط به کدون ۶۱۸ و ۲ جهش مربوط به کدون ۶۲۰ بود. در کدون ۶۱۸ اگزون ۱۰ بیشترین جهش مربوط به تغییر اسید آمینه سیستئین به فنیل‌آلانین بود. در کدون ۶۱۱ نیز جهشی یافت نشد.

**نتیجه‌گیری:** شیوع جهش در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET در جمعیت مورد مطالعه ۶٪ است. بر این اساس، بررسی وجود جهش‌های رایج پروتوآنکوژن RET در بیماران و خانواده آنان به‌ویژه در سایر اگزون‌های مستعد به جهش (۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶) به‌روش دقیق تعیین توالی DNA توصیه می‌شود.

**کلیدواژه‌ها:** سرطان مدولاری تیروئید، پروتوآنکوژن RET، جهش ژرم‌لاین، اگزون ۱۰

## Common mutations in exon 10 of RET proto-oncogene in patients with medullar thyroid carcinoma

Rezghi Barez Sh.<sup>1</sup> BSc, Zarif Yegane M.<sup>2</sup> MSc, Sheykhoh Eslami S.<sup>1</sup> MSc, Hoghoughi Rad L.<sup>2</sup> MSc, Azizi F.<sup>3</sup> PhD, Hedayati M.\* PhD

<sup>\*</sup>Obesity Research Center, Research Institute of Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>1</sup>Department of Biology, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Obesity Research Center, Research Institute of Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Endocrine Research Center, Research Institute of Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

**Aims:** Medullary thyroid carcinoma accounts for 5-10% of total types of thyroid cancers. An important role of mutations in the RET proto-oncogene in MTC has been well identified. The purpose of this study was to determine the prevalence of seven common germ-line mutations of the RET proto-oncogene in exon 10 in Iranian MTC patients.

**Materials & Methods:** This descriptive study was performed in year 2009-2010. The study population was 217 MTC patients and their first-degree relatives who were selected by simple sampling method. Genomic DNA content of peripheral blood was extracted according to standard salting out/Proteinase K method. Mutation detection in RET proto-oncogene in exon 10 was assessed through PCR-RFLP method.

**Results:** In 217 individuals (Female: Male 1.4:1, mean age 33.4±15.8 years), 9 mutations were identified at codons 618 (7 mutations) and 620 (2 mutations) in RET proto-oncogene exon 10. The most common amino-acid change was Cys618Phe. In addition, no mutation was found in codon 611.

**Conclusion:** The mutations frequency of the RET proto-oncogene in exon 10 is 6% in the studied population. Accordingly, existence of the common mutations in the RET proto-oncogene in all MTC patients and their families is recommended particularly in other exons (11, 12, 13, 14, 15, 16) with a direct DNA sequencing method.

**Keywords:** Medullary Thyroid Carcinoma, RET Proto-oncogene, Germ-line Mutation, Exon 10

## مقدمه

از بین رفتن عملکرد پروتئوآنکوژن RET منجر به ایجاد بیماری‌هایی مانند هیرشپورنگ می‌شود و افزایش فعالیت آن در پیدایش سندروم‌های سرطانی نقش دارد [۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰]. از آنجایی که RET یک پروتئوآنکوژن است، جهش در یک آلل آن برای ایجاد تغییرات نئوپلاستی کافی است [۱۰]. جهش‌های ژرم‌لاین در پروتئوآنکوژن RET باعث ایجاد نوع ارثی و جهش‌های سوماتیک در آن منجر به نوع تک‌گیر MTC می‌شود [۳، ۲۱، ۲۲]. بیش از ۹۰٪ خانواده‌های MEN2A و FMTC دارای جهش‌های بدمعنی در یکی از توالی‌های سیستمی حفاظت‌شده در کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸، ۶۲۰ (در اگزون ۱۰) یا کدون‌های ۶۳۰ یا ۶۳۴ (در اگزون ۱۱) در ناحیه خارج سلولی غنی از سیستئین هستند [۱۹، ۲۳، ۲۴، ۲۵]. همچنین برخی جهش‌ها نیز در کدون‌های غیرسیستئین مانند کدون ۸۰۴ اگزون ۱۴ و کدون ۸۸۳ اگزون ۱۵ برای FMTC و MEN2A گزارش شده است [۱۸، ۱۹، ۲۶]. در MEN2B نیز جهش در کدون ۹۱۸ اگزون ۱۶ رخ می‌دهد [۱۰]. تقریباً ۸۵٪ بیماران مبتلا به FMTC دارای جهش در کدون ۶۱۸، ۶۲۰ و ۶۳۴ در پروتئوآنکوژن RET هستند. ۱۰-۵٪ این بیماران نیز دارای جهش در کدون‌های ۸۹۱، ۸۰۴ و ۷۶۸ هستند [۲۷]. به نظر می‌رسد که قدرت آنکوژنی متفاوت جهش‌های RET به جایگاه تغییر اسیدآمینه در آن بستگی دارد که در نهایت، مسئول فنوتیپ‌های گوناگون مشاهده‌شده در MEN2 و FMTC است. جهش‌های ژرم‌لاین این پروتئوآنکوژن در بیش از ۹۵٪ موارد MEN2 مشاهده شده است [۴]. این جهش‌ها منجر به حذف سیستئین در پروتئین RET شده و در نتیجه، شرایط فعالیت تیروزین‌کینازی پایدار آن از طریق تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی همودایمرهای RET، حتی در شرایط نبودن لیگاند نیز فراهم می‌شود [۱۵، ۱۹، ۲۸، ۲۹]. همان‌گونه که اشاره شد، MTC کارسینومای مهاجم تیروئید است که بهبودی آن به میزان بالایی به تشخیص زودهنگام آن بستگی دارد [۲۱]. بررسی‌های ژنتیکی، به‌ویژه برای بستگان درجه اول بیماران دارای اهمیت بسیاری است. اگر در اعضای خانواده، جهش پروتئوآنکوژن RET مشاهده نشود، احتمال بروز MTC در آنان مشابه جمعیت عادی بوده و نیازی به انجام اقدامات پیشگیرانه (مانند تیروئیدکتومی) نخواهد بود. همچنین شناسایی آلل‌های جهش‌یافته در اعضای خانواده بیمار، توارث بیماری را پیش‌بینی کرده و اساسی را برای تیروئیدکتومی پیشگیرانه حتی در کودکان زیر ۶ سال فراهم می‌کند [۲۴، ۲۵، ۳۰]. علاوه بر این، آزمایش ژنتیکی، افراد غیرحامل را از اضطراب و بررسی سالیانه به‌منظور جستجوی سرطان‌رهای می‌بخشد [۳۱]. مطالعه حاضر که برخی نتایج آن قبلاً منتشر شده است [۲۶، ۳۲، ۳۳]، اولین مطالعه در این زمینه در ایران است. هدف از این مطالعه، بررسی شیوع جهش‌های شایع اگزون‌های ۱۰ در بیماران ایرانی مبتلا به MTC بود.

سرطان تیروئید شایع‌ترین تومور بدخیم سیستم اندوکراین بوده و مسئول حدود ۱٪ تمامی سرطان‌ها در انسان است [۱]. این بیماری معمولاً به ۴ نوع تومور تهاجمی پاپیلاری، فولیکولار، مدولاری و آناپلاستیک تقسیم می‌شود [۲]. کارسینومای مدولاری تیروئید (MTC)، توموری بدخیم با منشا سلول‌های پارافولیکولار C مشتق‌شده از ستیغ عصبی است و ۱۰-۵٪ کل انواع سرطان‌های تیروئید را شامل می‌شود [۳، ۴، ۵]. در حدود ۲۵٪ موارد MTC، از نوع ارثی و ۷۵٪ آن از نوع تک‌گیر است. نوع ارثی MTC دارای الگوی وراثتی اتوزوم بارز با نفوذ متغیر و وابسته به سن است [۶، ۷]. در این شکل از بیماری به‌غیر از غده تیروئید، برخی ارگان‌های دیگر همانند غدد پاراتیروئید و آدرنال نیز درگیر می‌شوند [۶]. انواع ارثی MTC به ۳ صورت سندروم نئوپلازی اندوکراین چندگانه نوع ۲ (MEN2) A و B و نوع MTC غیر MEN2 خانوادگی (FMTC) است. سندروم MEN2A که ۷۵٪ نوع ارثی این بیماری را شامل می‌شود، دارای تظاهرات بالینی شامل MTC، فتوکروموسیتوما و هیپرپلازی پاراتیروئید بوده، در حالی که MEN2B شامل MTC، فتوکروموسیتوما، نوروماهای مخاطی، گانگلیونوروماتوز روده و ظاهر شبه مارفانی است [۶، ۷، ۸، ۹]. احتمال درمان در تومورهای مدولاری اگر بیش از متاستاز تشخیص داده شوند، وجود دارد. اما اگر متاستاز رخ داده باشد، احتمال بهبودی کمتر خواهد بود [۲].

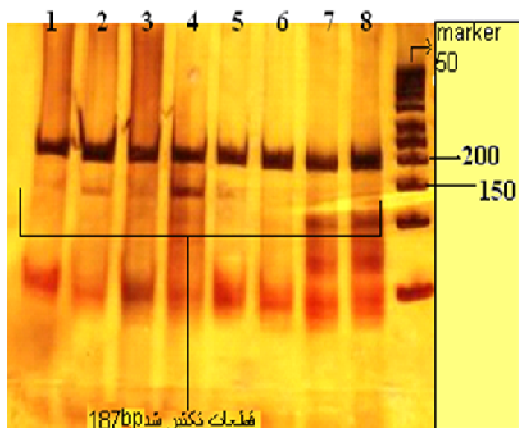
در سال ۱۹۸۷ آنالیز پیوستگی ژنتیکی، ارتباط MEN2 را با ناحیه‌ای در نزدیک سانترومر کروموزوم ۱۰ نشان داد. پس از آن، ارتباط بین جهش‌های نقطه‌ای پروتئوآنکوژن RET و دو بیماری MEN2A و MEN2B، به ترتیب در سال‌های ۱۹۹۳ و ۱۹۹۴ به اثبات رسید [۱۰]. پروتئوآنکوژن RET در ناحیه کروموزومی 10q11.21 قرار گرفته و دارای ۲۱ اگزون است [۶]. این ژن یک گیرنده تیروزین‌کیناز (RTK) غشایی را رمز می‌کند که در انتقال سیگنال‌های رشد و تمایز سلول بسیار حایز اهمیت است. همچنین نقش این ژن در فرآیند تکامل جنین به‌ویژه تکامل کلیه و سلول‌های منشاگرفته از ستیغ عصبی به‌خوبی نشان داده شده است [۱۱]. گیرنده RET در غشای سلول، دارای ناحیه‌ای غنی از سیستئین، ۴ ناحیه شبه‌کادهرین، یک جایگاه اتصال کلسیم در بخش خارج سلولی و فعالیت تیروزین‌کینازی در بخش داخل سلولی است [۱۲، ۱۳، ۱۴]. با اتصال لیگاند به این گیرنده، دو ناحیه کاتالیتیکی آن کنار هم قرار گرفته، پروتئین RET دایمر شده و سپس ترانس فسفوریلایسیون واحدهای تیروزین آن روی می‌دهد. سپس فسفوتیروزین‌ها باعث تجمع پروتئین‌های داخل سلولی می‌شود که دارای بخش باندشونده فسفوتیروزین و SH2 هستند. این فرآیند منجر به انتشار سیگنال به داخل سلول [۱۵] و در نتیجه، تغییر در بیان ژنی خاص، گسترش و تمایز سلول‌های نورواندوکراین و همچنین پاسخ‌های بیولوژیکی می‌شود [۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹].

## مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی است که در سال ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۹ انجام شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۱۷ نفر از بیماران مبتلا به MTC و خوشخوانندان درجه اول آنان بود که به‌روش نمونه‌گیری آسان انتخاب شدند. این افراد به‌صورت داوطلبانه و پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه وارد مطالعه شدند. افراد مبتلا به MTC در بیمارستان‌های دانشگاهی و مراکز درمانی نقاط مختلف کشور، براساس شواهد آسیب‌شناختی تشخیص داده شده و تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند. پس از بررسی جهش پروتوآنکوژن RET، در صورتی که بیمار دارای جهش بود، بستگان درجه اول او نیز برای بررسی ژنتیکی فراخوانده شدند. حداقل حجم نمونه با استفاده از فرمول، ۱۵۲ نفر تعیین شد که پس از ریزش، ۱۵۰ نفر فرد بیمار و با خانواده آنها در مجموع ۲۱۷ نفر مورد بررسی قرار گرفتند.

برای تعیین ژنوتیپ، پس از تهیه ۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی افراد، DNA ژنومی با استفاده از روش استاندارد نمک اشیاع/پروتئیناز K استخراج شد. برای تکثیر اگزون ۱۰ با استفاده از روش PCR از پرایمرهای (10F 5' GCGCCCCAGGAGGCTGATGC (3' استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر با شرایط ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۳ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از پرایمرهای اگزون ۱۰ (۱۰ میکرومولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر

MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر DNA (۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و یک واحد آنزیم تک‌پلی‌مراز انجام گرفت. واکنش‌ها در ترموسایکلر اتوماتیک انجام شد. شرایط PCR برای اگزون ۱۰ شامل ۳۰ چرخه دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشت شدن، دمای ۶۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای بازسرشت شدن، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی بود. به‌منظور تایید انجام موفقیت‌آمیز PCR، محصولات حاصل از آن با ژل پلی‌آکریل‌امید ۸٪ و رنگ‌آمیزی نیترات‌نقره چک شدند (شکل ۱).



شکل ۱) محصول PCR (۱۸۷ نوکلئوتیدی) که روی ژل پلی‌آکریل‌امید ۸٪ بارگذاری و با روش نیترات‌نقره رنگ‌آمیزی شده است.

جدول ۱) جهش‌های پروتوآنکوژن RET در اگزون ۱۰ و الگوی حاصل از عملکرد آنزیم‌های محدودکننده

جهش RET	باز طبیعی (جهش یافته)	آنزیم	طول قطعات (جفت‌باز)		
			قبل از برش	آلل طبیعی	آلل جهش‌یافته
C611W	TGC (TGG)	NlaIV	۱۸۷	۹، ۲۸، ۷۲، ۷۸	۶۵+۹، ۲۸، ۷۲، ۱۳
C618Y	TGC (TAC)	RsaI	۱۸۷	۱۸۷	۱۳۱+۵۶
C618F	TGC (TTC)	MboII	۱۸۷	۱۵۸، ۲۹	۱۲۴+۳۴، ۲۹
C618R	TGC (CGC)	CfoI	۱۸۷	۱۸۴، ۳	۱۲۹+۳، ۵۵
C618S	TGC (AGC)	MboII	۱۸۷	۱۵۸، ۲۹	۱۳۹+۱۹، ۲۹
C620R	TGC (CGC)	BstUI	۱۸۷	۱۸۷	۱۳۸+۴۹
C620F	TGC (TTC)	TaqI	۱۸۷	۱۸۷	۱۳۸+۴۹

## نتایج

جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۱۷ نفر بود (۱۲۶ زن و ۹۱ مرد با نسبت ۱/۴ به ۱) که از این تعداد، ۱۵۰ نفر مبتلا به MTC و ۶۷ نفر اعضای به‌ظاهر سالم خانواده بیماران بودند. از ۱۵۰ فرد بیمار، ۸۸ نفر زن و ۶۲ نفر مرد با نسبت ۱/۴ به ۱ بودند. متوسط سن نیز در جمعیت مورد مطالعه ۳۳/۴±۱۵/۸ سال بود.

در بین این افراد، در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET تعداد ۹ جهش یافت شد که ۸ مورد از جهش‌ها در بیماران و یک جهش در اعضای خانواده آنان مشاهده شد. از ۹ جهش، ۶ مورد در زنان و ۳ مورد در

سپس محصول PCR اگزون ۱۰ در مجاورت مقادیر مناسب از آنزیم‌های محدودکننده CfoI، TaqI، BstUI، MboII، RsaI، NlaIV و CfoI قرار گرفت [۳۴]. شرایط انکوباسیون براساس دستورالعمل شرکت‌های تولیدکننده تنظیم شد. جدول ۱، الگوهای RFLP حاصل از عمل آنزیم‌ها را در شرایط وجود یا فقدان جهش‌های اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET نشان می‌دهد. محصول حاصل از هضم احتمالی این آنزیم‌ها، با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌امید ۱۰٪ و سپس رنگ‌آمیزی با نیترات نقره آشکار شد و تصویر ژل الکتروفورز، داده کسب‌شده برای آنالیز محسوب شد (شکل ۲).

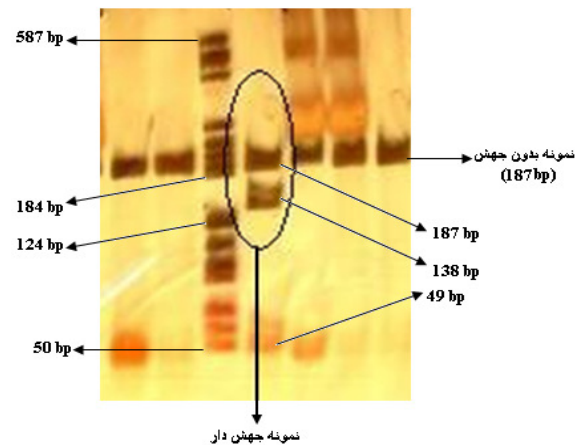
**جدول ۲)** سه سطح خطر و جهش‌های مربوط به آنها به‌همراه زمان تیروئیدکتومی پیشنهادی

سطح	کدون جهش	سن تیروئیدکتومی پیشگیرانه
گروه اول	۷۹۰، ۷۹۱، ۸۰۴	سن ۵ الی ۱۰ سالگی
گروه دوم	۶۰۹، ۶۳۰، ۷۶۸	تا سن ۵ سالگی
گروه سوم	۶۱۱، ۶۱۸، ۶۲۰، ۶۳۴	در ۶ ماه نخست زندگی (ترجیحاً ماه اول)
گروه سوم	۸۸۳، ۹۱۸، ۹۲۲	

مطالعات گوناگون بیان‌کننده این مطلب است که در نواحی جغرافیایی یکسان، امکان بروز جهشی خاص بیشتر است [۳۶]. به‌عنوان مثال، جهش‌های پروتوآنکوژن RET کدون ۶۳۴ در MEN2A و FMTC کدون ۹۱۸ از ۱۶ در MEN2B، در جمعیت‌های چینی بسیار شایع بوده و حتی می‌توان گفت به این دو جهش محدود شده است [۱۰]. در کشور پرتغال، جهش در کدون ۶۱۱ (Cys611Tyr) از ۱۰ و ۶۳۴ (Cys634Arg) از ۱۱ بیشترین میزان را در بیماران MTC ارثی به خود اختصاص داده است [۳۶]. در نوع تک‌گیر بیماری نیز در جمهوری چک و پرتغال، بیشترین جهش در کدون ۹۱۸ (Met918Thr) بوده است و همچنین در ایالات متحده، بیشترین میزان جهش در نوع ارثی بیماری در کدون ۶۳۴ (MEN2A)، کدون ۹۱۸ (MEN2B)، کدون ۷۶۸ و ۸۰۴ (FMTC) بوده است [۳۴]. جهش در کدون ۷۹۰ و ۷۹۱ در از ۱۳، فراوانی بالایی در آلمان داشته و در اسپانیا نیز جهش در کدون ۶۳۴ (Cys634Tyr) در از ۱۱ رایج بوده است [۳۶]. در تایوان نیز بیشترین جهش در کدون ۶۳۴ (Cys634Pro) در بیماران MEN2 بوده است [۱۶].

براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌توان گفت که به‌طور کلی فراوانی آلی جهش از ۱۰ پروتوآنکوژن RET در ۱۵۰ فرد ایرانی مبتلا به MTC ۶٪ است. ۶۶/۶٪ جهش‌ها (۷ از ۹ جهش) در کدون ۶۱۸ و جابه‌جایی سیستئین با فنیل‌آلانین و ۲۲/۲٪ (۲ از ۹ جهش) در کدون ۶۲۰ و جابه‌جایی سیستئین با تیروزین یا آرژنین بود. در میان جهش‌های بدمعنی در یکی از توالی‌های سیستئین حفاظت‌شده در کدون‌های ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰ بیشترین جهش مربوط به کدون C618F در بیماران ایرانی است. از آن‌جایی که حاملان جهش در کدون ۶۱۸ از ۱۰ احتمال خطر حد واسطی دارند، بنابراین جزء بیماران گروه دوم به‌شمار می‌آیند و برای آنان زمان تیروئیدکتومی تا قبل از ۶ سالگی پیشنهاد شده است. از این رو می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در مورد این بیماران و به‌ویژه اعضای خانواده آنان، انجام بررسی ژنتیکی از نظر وجود جهش‌های پروتوآنکوژن RET بسیار ضروری است. بدیهی است که عدم مشاهده جهش در از ۱۰ افراد نمی‌تواند احتمال وجود جهش در سایر از ۱۰ نفری نماید و از آن‌جایی که در جمعیت مورد بررسی تنها از ۱۰ پروتوآنکوژن RET مطالعه شده است، پیشنهاد می‌شود که در

مردان بود. با وجود آن که تعداد زنان مبتلا به MTC ۱/۴ برابر بیشتر از مردان بیمار بود، میزان جهش در از ۱۰ پروتوآنکوژن RET در زنان نسبت به مردان ۲ برابر بیشتر مشاهده شد. ۷ مورد از جهش‌ها در کدون ۶۱۸ و ۲ مورد در کدون ۶۲۰ از ۱۰ شناسایی شد. تمامی جهش‌های مربوط به کدون سیستئین در از ۱۰ شامل Cys618Phe ۴ مورد، Cys618Tyr یک مورد، Cys618Ser یک مورد، Cys618Arg یک مورد، Cys620Phe یک مورد و Cys620Arg نیز یک مورد بود. همان‌گونه که ملاحظه شد در کدون ۶۱۸ از ۱۰ بیشترین جهش مربوط به تغییر اسیدآمین سیستئین به فنیل‌آلانین بود (۲ مرد و ۲ زن).



**شکل ۲)** نمونه جهش‌دار هتروزیگوت در کدون ۶۲۰ از ۱۰ پروتوآنکوژن RET که با آنزیم BstU I برش خورده است. در صورت عدم وجود جهش همان قطعه ۱۸۷ نوکلئوتیدی روی ژل مشاهده می‌شود. با حضور جهش مذکور و ایجاد یک جایگاه برش، انکوبه نمودن محصول PCR با آنزیم BstU I منجر به ایجاد برش در قطعه ۱۸۷ نوکلئوتیدی شده و در نتیجه، قطعات ۱۳۸ و ۴۹ نوکلئوتیدی حاصل می‌شود.

## بحث

از ۲۱۷ فرد مورد بررسی در این پژوهش، تعداد ۹ جهش در از ۱۰ پروتوآنکوژن RET مشاهده شد. براساس مطالعات در جمعیت‌های سفیدپوست گوناگون مبتلا به MTC، فراوانی متفاوتی برای جهش در کدون‌های پروتوآنکوژن RET مشاهده شده است. مطالعات نشان داده‌اند هر یک از جهش‌های این ژن، پیشگویی‌کننده فنوتیپ خاص در افراد مبتلا است [۲۷].

به‌کمک غربالگری ژنتیکی و براساس ویژگی‌های بالینی و پاتولوژیکی، بیماران MEN2 و MTC تک‌گیر به ۳ سطح تقسیم شده‌اند که زمان تیروئیدکتومی پیشنهادشده در آنها متفاوت است [۷]. بیماران دارای جهش‌های سطح یک در خطر بالایی ایجاد MTC و رشد توموری، بیماران سطح ۲ در خطر بالاتر و بیماران سطح ۳ دارای بیشترین خطر ایجاد و رشد زودرس MTC هستند [۳۵]. جهش‌های مربوط به هر سطح در جدول ۲ آورده شده است.

on the Internet]. Bethesda: c1990 [cited 2010 Aug 3]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrezdb=omim>

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 J*. 1998;18(6):3321-9.

13- Bethanis S, Koutsodontis G, Palouka T, Avgoustis C, Yannoukakos D, Bei T. A newly detected mutation of the RET protooncogene in exon 8 as a cause of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hormones*. 2007;6(2):152-6.

14- 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. *Mol Cell Biol J*. 2001;154(2):345-54.

15- Lips CJ, Hoppener JW, Thijssen JH. Medullary thyroid carcinoma: Role of genetic testing and calcitonin measurement. *Ann Clin Biochem*. 2001;38(3):168-79.

16- 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.

17- Colombo-Benkmann M, Li Z, Riemann B, Hengst K, Herbst H. Characterization of the RET protooncogene transmembrane domain mutation S649L associated with nonaggressive medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2008;158(6):811-6.

18- Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V. New multiple somatic mutations in the RET proto-oncogene associated with a sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2006;16(3):321-6.

19- Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutation of MEN2. *Science*. 1995;267:381-3.

20- Lee D, Chan K, Chan S. RET receptor tyrosine kinase isoforms in kidney function and disease. *Oncogene*. 2002;21(36):5582-92.

21- 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.

22- Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V. New multiple somatic mutation in the RET proto-oncogene associated with sporadic MTC. *Thyroid Mar*. 2006;16(3):311-6.

23- Marsh DJ, Andrew SD, Eng C, Learoyd DL. Germline and somatic mutations in an oncogene: RET mutations in inherited medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56(6):1241-3.

24- Kitamura Yu, Goodfellow PJ, Shimizu K, Nagahama M. Novel germline RET proto-oncogene mutations associated with medullary thyroid carcinoma (MTC): Mutation analysis in Japanese patients with MTC. *Oncogene*. 1997;14(25):3103-10.

25- Franklyn J. *Thyroid cancer: A comprehensive guide to clinical management*. New York: Humana Press; 2000.

26- Hedayati M, Nabipour I, Rezaei-Ghaleh N, Azizi F. Germline RET mutations in exons 10 and 11: An Iranian survey of 57 MTC. *Med Malaysia*. 2006;61(5):564-9.

27- Jung J, Uchino S, Lee Y, Park H. A Korean family of familial medullary thyroid cancer with Cys618Ser RET germline mutation. *J Korean Med Sci*. 2010;25(2):226-9.

28- Chappuis-Flament S, Pasini A, De Vita G, Segouffin-Cariou C, Fusco A, Attie T, et al. Dual effect on the RET receptor of MEN 2 mutations affecting specific extracytoplasmic cysteines. *Oncogene*. 1998;17(22):2851-61.

29- Eng C, Mulligan LM, Smith DP, Healey CS, Frilling A,

مطالعه‌های آینده سایر اگزون‌ها به‌ویژه اگزون‌های ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۵ و ۱۶ با روش دقیق تعیین توالی DNA از لحاظ وجود جهش‌های شایع یا جهش‌های جدید این ژن در بیماران ایرانی مبتلا به MTC و همچنین ارتباط این نوع جهش‌ها با وضعیت بالینی و روند پیشرفت بیماری در افراد، مورد بررسی قرار گیرد.

## نتیجه‌گیری

شیوع جهش در اگزون ۱۰ پروتوآنکوژن RET در جمعیت مورد مطالعه ۶٪ است. بر این اساس، بررسی وجود جهش‌های رایج پروتوآنکوژن RET در بیماران و خانواده آنان به‌ویژه در سایر اگزون‌های مستعد به جهش، به‌روش دقیق تعیین توالی DNA توصیه می‌شود.

**تشکر و قدردانی:** از همکاری بزرگوارانه پزشکان متخصص 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 شهیدبهشتی سپاسگزاریم.

## منابع

1- Nikiforava MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: Implication for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn J*. 2008;8(1):83-95.

2- Wikipedia Organization [homepage on the Internet]. Francisco: c1999 [cited 2011 Jun 20]. Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/>

3- Dvorakova S, Vaclavikova E, Sykorova V, Vcelak J, Novak Z, Duskova J, et al. Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic Medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Endoc*. 2008;284:21-7.

4- Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Domingues R, Santos JR, Cid MO, et al. Correlation of RET somatic mutations with clinicopathological features in sporadic MTC. *BJC*. 2009;100:1777-83.

5- Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG. Medullary thyroid carcinoma: Recent advances and management updates. *Thyroid*. 1995;5:407-24.

6- Elisei R, Romei C, Cosci B, Agate L, Bottici V, Molinaro E, et al. RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: Experience with 807 individuals at one center. *J Clin Endoc Metb*. 2007;92(12):4725-9.

7- Sippel RS, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Current management of medullary thyroid carcinoma. *Oncologist*. 2008;13:539-47.

8- Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia-syndromes of the twentieth century. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:2617-20.

9- Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN2A and FMTC. *Hum Mol Genet*. 1993;2(7):851-6.

10- 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. *Clinic Endo*. 2007;67:570-6.

11- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) [homepage

mutations of RET in MTC in Iran. *Med J Iran*. 2004;18:95-9. [Persian]

34- Hedayati M, Zarif Yegane M, Daneshpor M, Delbarpor Ahmadi A, Aziz F. Frequent germline mutations in RET poroto-oncogene exons 10 and 11 in hereditary medullary thyroid carcinomas of Iranian patients. *Kowsar Med J*. 2010;(15):17-21. [Persian]

35- Raue F, Frank-Raue K. Genotype-phenotype relationship in multiple endocrine neoplasia type 2: Implications for clinical management. *Hormones*. 2009;8(1):23-8.

36- Prazeres HJ, Rodrigues F, Figueiredo P, Naidenov P, Soares P. Occurrence of the Cys611Tyr mutation and a novel Arg886Trp substitution in the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 families and sporadic medullary thyroid carcinoma cases originating from the central region of Portugal. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(6):659-66.

Raue F, et al. Low frequency of germline mutations in the RET proto-oncogene in patients with apparently sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol*. 1995;43(1):123-7.

30- 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: Primarily study. *Cong Int Bioch*. 2006;24:9-12.

31- Castellone M, Verrienti A, Magendra Roa D, Sponziello M. A novel germline V292M mutation in the extracellular region of RET in a patient with pheochromocytoma and medullary thyroid carcinoma: Functional characterization. *Clin Endocrinol*. 2010;73(4):529-34.

32- Azizi F, Nabipour I, Ghasemi F, Kiai S, Baradar Jalili R. Identification of RET mutation carriers in the Iranian hereditary MTC. *Teb-e-Jonoub*. 2001;4(2):79-87. [Persian]

33- Nabipour I, Haji-Ghasemi F, Kiai SR, Baradar Jalili F. The