



جهش‌های نقطه‌ای 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 هیرشپرونک (HSCR) و MEN2 ارتباط دارد [۲۵، ۲۴]. جهش‌های ژرم‌لاین RET در ۹۸٪ MEN2A، ۹۵٪ MEN2B و ۸۸٪ FMTC مشاهده می‌شود [۲۶، ۴].

پلی مورفیسم c135G>A/A45A (rs1800858) آنگوزن 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) آنگوزن 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 نقطه‌ای (Neutral) Transition substitution می‌باشد.

از آنجایی که برخی از بیماران فاقد جهش در آنگوزن‌های Hotspot هستند و نیز به دلیل این که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی آنگوزن ۲ پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به MTC در جمعیت ایرانی به انجام نرسیده است [۲۲، ۲۰، ۳۰-۳۳]، مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی جهش‌های ژرم‌لاین آنگوزن 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 درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به منظور

مستول ۱۰-۵٪ کل انواع سرطان‌های تیروئید است [۲-۴] MTC به شکل ارثی (۲۵٪) و یا به شکل تک‌گیر (۷۵٪) رخ می‌دهد [۵، ۶] MTC ارثی به وسیله‌ی 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 نشوپیلازی اندوکراین چندگانه نوع دو A (Multiple Endocrine Neoplasia type 2; MEN 2) و نوع B و Neoplasia type 2; MEN 2) FMTC و MEN2B، (Familial MTC; FMTC). MEN2A از لحاظ شیوع، ژنتیک، سن شروع، ارتباط با سایر بیماری‌ها، تهاجم و پیش‌آگهی از یک‌دیگر متمایزند [۱۱، ۱۲، ۱۳].

پروتوآنکوژن RET (Rearranged during Transfection) در انسان در ناحیه کروموزومی 10q11.2 واقع بوده و دارای ۲۱ آنگوزن است [۴، ۱۳-۱۵]. ژن RET نوعی گیرنده تیروزین کیناز غشایی را رمز می‌کند که متشکل از سه بخش می‌باشد: یک بخش اتصال- 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 به وسیله‌ی 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-GFR $\alpha$ - (گیرنده  $\alpha$  خانواده GDNF) هم‌راه با بخش خارج سلولی RET، اتوفسفریلاسیون توالی‌های تیروزین داخل سلولی را تقویت می‌کنند [۱۶، ۱۹-۲۱].

رسی ژنتیکی: ۱۰ میلی لیتر خون وریدی در وضعیت نشسته از افراد مورد مطالعه اخذ شد. پس از تهیه خون محیطی افراد، DNA ژنومی با استفاده از روش نمک اشباع/ پروتئینازکا (Salting out/ Proteinase K) استخراج شد. در جهت استخراج DNA از گلبول های سفید خون (در طی سه مرحله اصلی لیز سلول، جداسازی DNA از سایر ماکرومولکول ها و رسوب DNA، آب مقطر دیونیزه استریل، بافر لیزکننده هسته [Tris 10 mM] pH 7.5, EDTA (Saline) (150 mM), NaCl (10 mM), ۰/۲۵ میلی لیتر ۱۰٪ SDS (Sodium dodecyl sulphate)، ۰/۸ میلی لیتر پروتئیناز K ۱٪، ۲ میلی لیتر NaCl اشباع شده ۵ مولار، ۵ میلی لیتر محلول ایزوپروپانول ۱۰۰٪، ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ سرد و ۱۰۰ میکرولیتر بافر [Tris (10 mM) pH 7/5 EDTA 1xTE] (1mM) 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 آگزون ۲ (به منظور بررسی تغییرات نوکلئوتیدی) و بخشی از اینترون یک و دو (به منظور بررسی نقاط مربوط به پیرایش از لحاظ وجود تغییرات نوکلئوتیدی) بود، از واکنش زنجیره ای پلی مرز استفاده شد. برای این منظور جفت پرایمر اختصاصی رفت ۵' -ATGGGTGGCAGTGTCTCCT-3' و برگشت ۵' -TTTCCAGCCCCACTTACTC-3' با استفاده از نرم افزارهای Primer 3 و Gene runner طراحی شد. واکنش PCR قطعات مورد نظر، در شرایط بهینه مخصوص قطعه مورد نظر به انجام رسید. به طور 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

غربالگری ژنتیکی پروتوآنکوژن RET ارجاع داده شدند. افراد داوطلب جهت شرکت در این مطالعه فراخوانده شده و پس از تکمیل فرم رضایت نامه وارد مطالعه شدند. اطلاعات مربوط به افراد از طریق تهیه پرسش نامه و تکمیل آن، مصاحبه، و بخشی نیز از پرونده آنان به دست آمد. داده های حاصل از آزمایشات مولکولی در فرم جمع آوری اطلاعات در کامپیوتر (نرم افزار Spss) به ثبت رسید. در این مطالعه توصیفی داده های ژنتیکی حاصله تعیین فرکانس آلی 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 (به منظور پیشگیری و تشخیص زودرس بیماری) جهت بررسی ژنتیکی فراخوانده شدند.

در مطالعه حاضر بیماران شرکت کننده در پنج گروه فنوتیپی sMTC (سرطان مدولاری تیروئید اسپورادیک)، FMTc، MEN2A، MEN2B و فتوکروموسیتوما طبقه بندی 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 (sMTC ۸۷، FMTc ۳۰، MEN2A ۵، MEN2B ۱، pheo ۲) 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 می دهد.

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
فتوکروموسیتوم	۲	-	۱۹/۵۰±۴/۹۵	۰/۹
خویشاوند	۵۶	۴۲	۳۲/۲۷±۷۹/۱۵	۴۳/۹

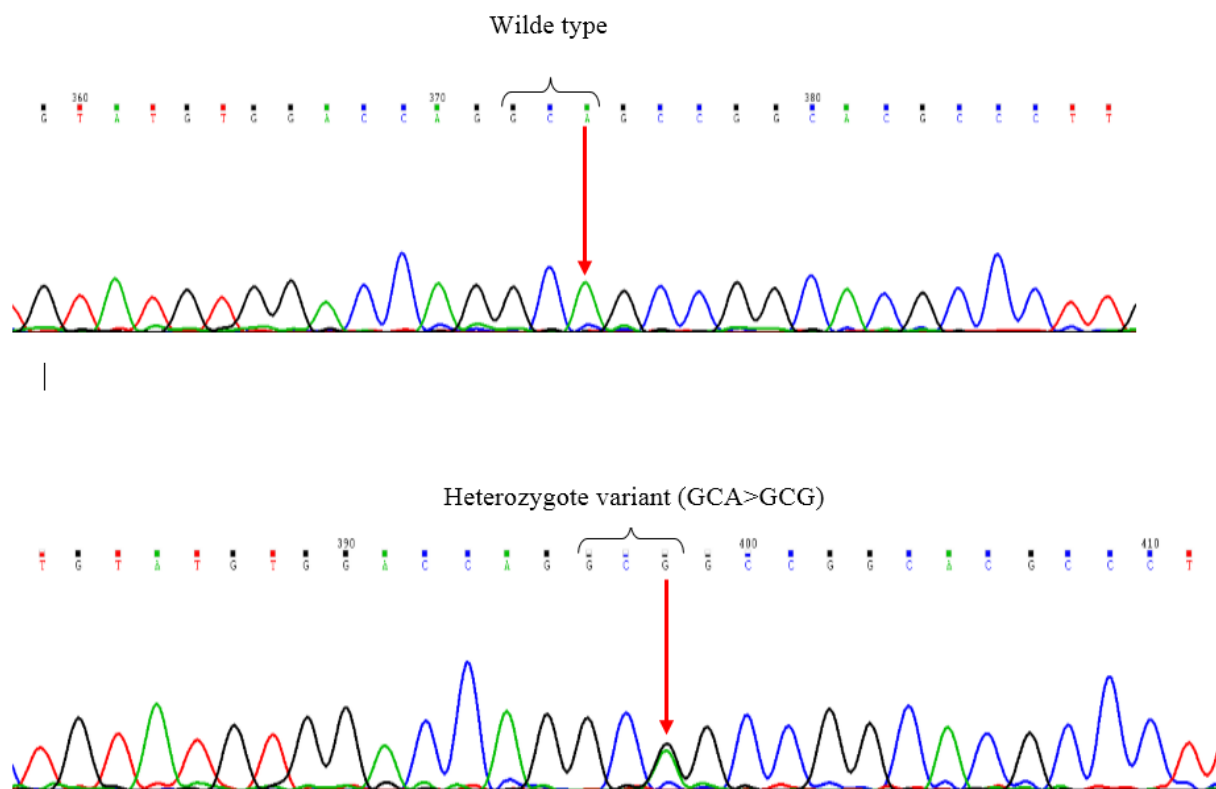
شد. شکل ۱ تصویری از نتیجه تعیین توالی یک نمونه جهش دار می باشد. آنالیز و گزارش میزان فراوانی آلی و ژنوتیپی نمونه ها توسط نرم افزار SPSS 20 به انجام رسید.

جدول ۲. غلظت اجزای واکنش PCR

غلظت	اجزای واکنش PCR (در تیوبهای لیوفلیزه)
۰/۶۶ U	آنزیم DNA Top پلی مرز
۱۶۶/۶ $\mu$ M	Each: dNTPs
۶/۶ mM	Tris-HCl (pH 9.0)
۲۰ mM	KCl
۱ mM	MgCl <sub>2</sub>
۱۰ Pmol	پرایمر رفت
۱۰ Pmol	پرایمر برگشت
ng/ $\mu$ l ۵۰	DNA
۲۷ $\mu$ l	آب مقطر استریل
۳۰ $\mu$ l	حجم کل واکنش

(۱۰  $\mu$ m)، یک میکرولیتر DNA (۵۰ ng/ $\mu$ l) و ۲۷ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده گردید (جدول ۲). واکنش ها در ترموسایکلر اتوماتیک انجام شد (peqSTAR 96X HP, PEQLAB Co, Germany). شرایط PCR برای اگزون ۲ شامل دمای  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه برای دناتوراسیون اولیه،  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه برای دناتوراسیون دوم، دمای  $63/6^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه برای اتصال پرایمرها،  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه برای تکثیر و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی بود.

در این پژوهش جهت تایید صحت و کیفیت تکثیر قطعه DNA مورد نظر از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۶٪ (به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۲۰۰ میلی ولت) استفاده شد. به منظور رؤیت قطعات DNA در صورت وجود، از رنگ آمیزی نترات نقره استفاده گردید. نمونه های مناسب جهت تعیین ژنوتیپ، تعیین توالی شدند. کروماتوگرام های سکانس توسط نرم افزار Chromas 2.33 آنالیز شده و به منظور مقایسه با سکانس ژن فرانس RET از بلاست سایت NCBI استفاده



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 باقی مانده می باشد.

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

تفکیک فنوتیپ های مختلف و در خویشاوندان بررسی شده است (جدول ۴).

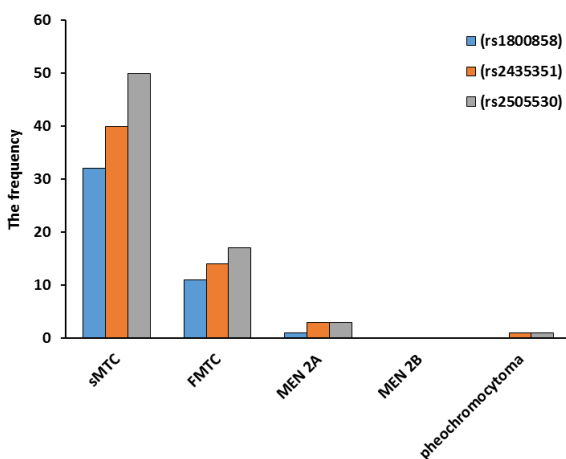
تغییر نوکلئوتیدی (rs1800858) c135G>A/A45A کمترین میزان فراوانی آللی و ژنوتیپی جمعیت مورد مطالعه را به خود اختصاص داده بود و بیشترین فراوانی ژنوتیپی و آللی متعلق به حاملین تغییر نوکلئوتیدی c.337+137G>T (rs2505530) بود. لازم به ذکر است که بیمار MEN2B فاقد این سه تغییر نوکلئوتیدی و نیز بیماران فنوکروموسیتوم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

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

نوع تغییر نوکلئوتیدی	بیماران / خویشاوندان	هتروزیگوت		هموزایگوت		درصد فراوانی	
		زن	مرد	کل	زن	مرد	کل
A45A (rs1800858)	بیماران	۲۳	۱۱	۳۴	۸	۲	۱۰
	خویشاوندان	۱۶	۸	۲۴	۱	۴	۵
G>A (rs2435351)	بیماران	۲۳	۱۸	۴۱	۷	۱۰	۱۷
	خویشاوندان	۱۴	۲۴	۳۸	۳	۴	۷
G>T (rs2505530)	بیماران	۲۶	۲۲	۴۸	۱۲	۱۱	۲۳
	خویشاوندان	۲۶	۱۶	۴۲	۵	۵	۱۰

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

بیماران / خویشاوندان	rs1800858 rs2435351 rs2505530	rs1800858 rs2435351 rs2505530	rs1800858 rs2435351 rs2505530	rs2435351 rs2505530
sMTC	۱۱	۱۱	۱۱	۳۹
fMTC	۴	۴	۴	۱۴
MEN 2A	۱	۱	۱	۳
خویشاوند	۹	۹	۹	۴۱
فنوکروموسیتوم	-	-	-	۱
کل	۲۵	۲۷	۲۷	۹۹



شکل ۲. فراوانی تغییرات نوکلئوتیدی در فنوتیپ های مختلف

## بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، سه نوع تغییر نوکلئوتیدی (rs1800858) c.337+9G>A، c.135G>A/A45A (rs2435351) و (rs2505530) c.337+137G>T در ۱۹۰ فرد (۱۰۷ بیمار و ۸۳ خویشاوند) یافت گردید اما تغییر نوکلئوتیدی در 5' Splice Site (GT) و 3' (AG) مشاهده نشد.

بنا بر گزارش Oliver Gimm و همکاران (۱۹۹۹)، فراوانی پلی مورفیسم (rs1800858) c.135G>A/A45A ژرم لاین ۵۰ بیمار MTC تک گیر (۳۸ نژاد آلمانی، ۱۲ نژاد ایالات متحده) و افراد سالم مشابه بود [۳۴]. Arancha و همکاران (۲۰۰۵) نیز در مطالعه‌ای بر روی ۱۳۵ بیمار MTC تک گیر و ۵۳۳ فرد سالم از جمعیت انگلستان، بیان نمودند که پلی مورفیسم c.135G>A/A45A (rs1800858) با MTC تک گیر 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 تک گیر و ۱۰۰ فرد سالم اسپانیایی، عنوان کرد که فراوانی آللی c.135G>A/A45A (rs1800858) در دو گروه بیمار و سالم مشابه بود و تفاوت معنی داری نداشت [۳۶]. در مطالعه مورد-شاهد در یک مجموعه بزرگ MTC تک گیر ایتالیایی و در یک گروه سالم همسان، پلی مورفیسم (rs1800858) c.135G>A/A45A در ۸۲ بیمار و ۱۰۶ سالم مشاهده شد. این پلی مورفیسم توزیع معنی داری در بیماران MTC تک گیر (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 پلی مورفیسم (rs1800858) c.135G>A/A45A 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، به ترتیب ۰/۰۶، ۰/۳۱، ۰/۵ و ۰/۱۲ گزارش کرد

[۳۸]. Chin-Feng Chang و همکاران (۲۰۰۹) پلی مورفیسم (rs1800858) c.135G>A/A45A را در بیماران MTC تک گیر (فاقد جهش در آگزون‌های Hotspot) تایوانی یافت [۳۹]. Gisella Figlioli و همکاران (۲۰۱۳) در نتیجه متآنالیز پلی مورفیسم (rs1800858) c.135G>A/A45A این نکته را متذکر شد که در آنالیز کلی از نظر آماری ارتباط معنی داری بین این پلی مورفیسم و sMTC یافت نشد [۴۰]. در مطالعه‌ی حاضر نیز بین این پلی مورفیسم و فنوتیپ‌های جمعیت مورد مطالعه (sMTC، FMTC، MEN 2A، MEN 2B) و فنوکروموسیتوم ارتباطی یافت نگردید.

در مطالعه‌ی دیگری که X.-P.Qi و همکاران (۲۰۱۲) به گزارش جهش ژرم لاین p.C618S در یک شجره چینی مبتلا به کارسینومای فامیلی مدولاری تیروئید پرداختند، پلی مورفیسم (rs1800858) c.135G>A/A45A در ۱۳ فرد دارای جهش p.C618S مشاهده شد. علاوه بر این، در ۱۰ عضو سالم (که همگی p.L769L و p.IVS19+15T>C داشتند و ۸۰٪ نیز دارای p.A432A بودند)، ۹ فرد (۹۰٪) دارای (rs1800858) c.135G>A/A45A 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 (rs1800858) c.135G>A/A45A، تغییر نوکلئوتیدی (rs2435351) c.337+9G>A نیز در اینترون ۲ ژن RET بیماران MTC تک گیر (که فاقد جهش در آگزون‌های ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵ یا ۱۶ ژن RET بودند) گزارش گردید [۴۲]. شایان ذکر است که مطالعه جمعیتی در مورد ارتباط (rs2505530) c.337+137G>T با بیماری خاص، مقاله‌ای یافت نشد.

در مطالعه‌ی حاضر، بیش‌ترین فراوانی آللی مربوط به (rs2505530) c.337+137G>T و سپس (rs2435351) c.337+9G>A (rs1800858) و (rs2435351) c.135G>A/A45A بود. تغییرات نوکلئوتیدی (rs1800858) c.135G>A/A45A

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 بی دریغ 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, Rezhghi 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.

(rs2435351) c.337+9G>A و c.337+137G>T (rs2505530) هیچ‌گونه رابطه‌ی معنی‌داری با سن، نوع فوتوتیپ بیماری، جنسیت و قومیت در بین دو گروه بیمار و خویشاوند جمعیت مورد بررسی نداشتند ( $P > 0.05$ ).  
شایع‌ترین جهش‌ها در پروتوآنکوژن RET در کدون‌های سیستئین ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸، ۶۲۰ (آگزون ۱۰) و ۶۳۴ (آگزون ۱۱) و برخی کدون‌های غیرسیستئین مانند کدون ۸۰۴ (آگزون ۱۴)، ۸۸۳ (آگزون ۱۵) و ۹۱۸ (آگزون ۱۶) یافت شده است. به نظر می‌رسد که قدرت آنکوژنی متفاوت جهش‌های RET به جایگاه تغییر اسیدآمیننه بستگی دارد که در نهایت مسئول فوتوتیپ‌های گوناگون مشاهده شده در MTC است [۲۲، ۸، ۷].  
۴۶-۴۳، ۳۲، ۲۵]. بدیهی است که عدم مشاهده جهش در آگزون‌های Hot spot پروتوآنکوژن RET افراد نمی‌تواند احتمال وجود جهش در سایر آگزون‌ها را نفی نماید و از آنجایی که در جمعیت مورد بررسی تنها آگزون‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۶ پروتوآنکوژن RET مطالعه شده است، پیشنهاد می‌شود که در مطالعه‌های آینده سایر آگزون‌ها به‌ویژه آگزون‌های ۱۳، ۱۴، ۱۵ و در صورت لزوم سایر آگزون‌های غیر Hot spot (هر چند که در حال حاضر تشخیص و پیشگیری از MTC از طریق بررسی جهش‌های پروتوآنکوژن RET در آگزون‌های غیر Hot spot ضروری به نظر نمی‌رسد) با روش دقیق تعیین توالی DNA از لحاظ وجود جهش‌های شایع یا جهش‌های جدید این زن در بیماران MTC ایرانی و نیز ارتباط واریانت‌های یافته شده با وجود یا عدم وجود سایر جهش‌ها در سایر آگزون‌های 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 آگزون 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



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, Apfelstaedt 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, Bettgowda 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.

[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, Saarna 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, Targari 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

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

Hosna Hesanmanesh (M.Sc)<sup>1</sup>, Marjan Zarif Yeganeh (M.Sc)<sup>2</sup>, Sara Sheikholeslami (M.Sc)<sup>2</sup>, Dariush Farhud (Ph.D)<sup>3</sup>, Mehdi Hedayati (Ph.D)<sup>\*2</sup>

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 and it 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 in 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