

Badania genetyczne protoonkogenu RET (kodującego receptorową kinazę tyrozynową) prowadzone u chorych z rakiem rdzeniastym tarczycy umożliwiają wczesne wykrycie i podjęcie działań profilaktycznych u członków rodziny będących nosicielami mutacji. Opisanie mutacji o charakterze autosomalnym dominującym zlokalizowane są w eksonach: 10, 11, 13, 14, 15 i 16 tego genu i w większości przypadków dotyczą konserwatywnego regionu bogatego w reszty cysteinowe. Opublikowane do tej pory badania wskazują na istnienie korelacji pomiędzy genotypem a określonym fenotypem – tj. obecnością izolowanego raka rdzeniastego tarczycy i współwystępowaniem innych chorób, takich jak guz chromochłonny nadnerczy czy gruczolak przytarczyc (zespoły MEN 2). W przypadku raka rdzeniastego tarczycy mutacje protoonkogenu RET doprowadzają do uaktywnienia receptora znajdującego się w obrębie błony komórkowej, co w konsekwencji doprowadza do wzrostu syntezy białek biorących m.in. udział w procesach proliferacji komórek, natomiast mutacje powodujące utratę funkcji receptora występują w chorobie Hirschsprunga (aganglionozie jelita grubego). Najczęściej pojawiającym się defektem genetycznym w raku rdzeniastym tarczycy są mutacje punktowe w obrębie kodonu 634 eksonu 11 protoonkogenu RET. Ze względu na możliwość wczesnego pojawienia się transformacji nowotworowej wskazane jest wykonanie tyreoidektomii profilaktycznej u nosiciela mutacji, a wiek, w którym należy wykonać zabieg, uwarunkowany jest miejscem mutacji. W pracy przedstawiono podstawowe informacje dotyczące roli RET oraz defektów genetycznych jego genu prowadzących do rozwoju raka rdzeniastego tarczycy.

Słowa kluczowe: rak rdzeniasty tarczycy, genetyka, MEN 2, diagnostyka, badania przesiewowe

Diagnostyka molekularna dziedzicznej postaci raka rdzeniastego tarczycy

Molecular diagnostics of hereditary medullary thyroid carcinoma

Katarzyna Ziemińska¹, Marta Kaczmarek², Justyna Hoppe-Gołębiowska², Ryszard Słomski², Jerzy Sowiński¹

¹Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

²Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

Powiązanie w 1993 r. mutacji w obrębie protoonkogenu RET z występowaniem postaci rodzinnych raka rdzeniastego tarczycy (RRT) umożliwiło wdrożenie szczegółowych badań genetycznych wśród członków rodzin chorych z RRT. Celem tych badań jest wykrycie predyspozycji do nowotworu oraz prawdopodobieństwa wystąpienia innych dodatkowych schorzeń, co w konsekwencji pozwala obecnie na zastosowanie u chorych wczesnych działań profilaktycznych i leczniczych. Dziedziczna postać tego nowotworu stanowi ok. 20–25 proc. wszystkich przypadków RRT [1, 2].

Protoonkogen RET (*rearranged during transfection*) znajduje się w regionie centromerowym chromosomu 10 (10q11.2) i koduje receptorową kinazę tyrozynową (RKT) [3]. Ekspresja protoonkogenu RET odbywa się w komórkach pochodzących z grzebienia nerwowego: komórkach C tarczycy, komórkach chromochłonnych, tkance nerwowej współczulnej przewodzącej pokarmowego, a także w wywodzących się z tych komórek guzach neuroendokrynych, jak RRT, guz chromochłonny czy neuroblastoma [4]. Białko receptorowe kodowane przez protoonkogen RET w obecności koreceptora wiąże specyficzne czynniki neurotroficzne, takie jak GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), neurturyna, artemina i persefina. Niektóre z tych czynników w okresie embrionalnym wspólnie z RET biorą udział m.in. w rozwoju nerek oraz układu nerwowego jelit [5–7]. Aktywacja receptora powoduje indukcję lub zahamowanie ekspresji wielu genów. Wśród do tej pory zidentyfikowanych, a pozostających pod kontrolą RET, znajdują się np. gen cykliny 1, katepsyny B i L, kofiliny, stanniokalcyne czy też kolagenu typu I i II oraz aneksyny. Białka kodowane przez te geny mają m.in. wpływ na hiperplazję komórek, ich zdolność do przemieszczania się i inwazji, co ułatwia rozwój i rozprzestrzenianie nowotworu [7].

Protoonkogen RET zawiera ponad 60 tys. par zasad i składa się z 21 eksonów [8, 9]. Kodowane przez niego białko receptorowe posiada 3 domeny: zewnątrz-błonową zawierającą fragment homologiczny do kaderyny oraz fragment bogaty w reszty cysteinowe; wewnątrz-błonową i wewnątrzkomórkową zawierającą centrum katalityczne RKT. Większość mutacji (o charakterze punktowym) prowadzących do rozwoju RRT (zespół MEN 2A i rodzinny rak rdzeniasty tarczycy – RRRT) dotyczy fragmentu kodującego region bogaty w cysteiny [10]. Fragment ten jest wysoce konserwatywny, a reszty cysteinowe są istotnym elementem warunkującym drugorzędową i trzeciorzędową strukturę receptora [11]. Mutacje w przeważającej części przypadków zespołu MEN 2A i RRRT doprowadzają do dimeryzacji i autofosforylacji receptora, który normalnie istnieje w formie monomeru i ulega dimeryzacji dopiero po przyłączeniu liganda. W tej sytuacji następuje uaktywnienie kinazy tyrozynowej, co wywołuje ciąg wydarzeń wewnątrzkomórkowych specyficznych dla tej aktywacji [12].

Mutacje mogą być również zlokalizowane w obrębie innych fragmentów genu i w istotny sposób zaburzać funkcjonowanie samej kinazy tyrozynowej (zespół MEN 2B i rzadkie przypadki RRRT) [13].

Mutacje protoonkogenu RET mają charakter autosomalny dominujący, z prawie całkowitą penetracją, ale zmienną ekspresją [14]. Istnieje dość ścisła korela-

Genetic studies of the RET proto-oncogene (which encodes a receptor tyrosine kinase) conducted in patients with medullary thyroid carcinoma enable early diagnosis and prophylactic treatment in members of the family being carriers of the mutation. Described autosomal dominant mutations are localized within exons: 10, 11, 13, 14, 15 and 16 of this gene and in the majority of cases affect a conservative region rich in cysteine residues. Recently published data indicated a correlation between the genotype and a specific phenotype that is presence of isolated medullary thyroid carcinoma and coexistence of other disorders like pheochromocytoma or parathyroid gland adenoma (MEN 2 syndromes). In medullary thyroid carcinoma the RET proto-oncogene mutations lead to the activation of the receptor localized within the cell membrane that in consequence leads to the increased synthesis of proteins taking part among others in the proliferation of the cells, whereas mutations leading to the loss of receptor function appears in Hirschsprung's disease (colon aganglionosis). The most common genetic defects in the medullary thyroid carcinoma are point mutations within codon 634 of exon 11 of the RET proto-oncogene. Due to the possibility of early neoplastic transformation it is recommended to perform prophylactic thyroidectomy in the mutation carrier, and the age of surgery is strongly connected with the site of mutation. This publication reviews elementary information about the role of RET and genetic defects of its gene leading to the development of medullary thyroid carcinoma.

Key words: medullary thyroid carcinoma, genetics, MEN 2, diagnostics, screening

cja pomiędzy genotypem a fenotypem, jakkolwiek niektóre mutacje mogą warunkować występowanie zarówno RRRT, jak i MEN 2A. Wskazuje to na konieczność ścisłej obserwacji chorych do końca ich życia, by wcześniej wykryć ewentualne inne komponenty zespołu MEN 2A. Jeśli w rodzinie wiele osób powyżej 50. roku życia będących nosicielami mutacji ujawnia tylko raka rdzeniastego, można z dużą pewnością rozpoznać jego postać rodzinną (RRRT) [15]. Istnieją jednak przypadki RRRT, w których nie zidentyfikowano jeszcze miejsca mutacji w onkogenie RET. Miejsce defektu genetycznego w RRT warunkuje często moment ujawnienia się i tempo progresji choroby [16].

Opisane do tej pory mutacje znajdują się eksonach 10, 11, 13, 14, 15 i 16 protoonkogenu RET, a pojawienie się tego defektu genetycznego w 100 proc. warunkuje rozwój RRT o charakterze wieloogniskowym [17]. Częstość występowania mutacji genu RET określono na 1 na 500 tys., a dotyczą one najczęściej w przypadku zespołu MEN 2A kodonu 634 w eksonie 11 (70 proc. przypadków) oraz w przypadku zespołu MEN 2B kodonu 918 w eksonie 16 (95 proc. przypadków) [18–20].

Jak już wspomniano wcześniej, niezmiernie istotną korzyścią wynikającą z przeprowadzania badań genetycznych w RRT jest możliwość wykonania profilaktycznej tyreoidektomii u nosicieli zmutowanego genu. Ze względu na wieloogniskowy charakter tego nowotworu (jeśli jego rozwój ma podłoże genetyczne) istnieje ryzyko pojawienia się zmian przerzutowych, niekiedy nawet w bardzo wczesnym wieku [17].

Wieloośrodkowe obserwacje chorych z RRT (np. *EUROMEN Study Group*) prowadzone przez wiele lat pozwoliły na określenie, które z mutacji występują najczęściej, i tak: 62,8 proc. stanowią mutacje kodonu 634; 9,2 proc. – mutacje kodonu 618; 6,8 proc. – mutacje kodonów 620 i 790; 2,4 proc. – mutacje kodonu 791; 1,9 proc. – mutacje kodonów 609, 611, 804 i 918 oraz 0,5 proc. – mutacje kodonu 630 [21]. Wspomniane badania przyniosły również informacje, jak wcześniej u nosiciela mutacji może pojawić się RRT. Przykładowe dane zawarte są w tab. 1.

W Polsce wg rekomendacji Komitetu Referencyjnego Epidemiologii, Diagnostyki i Leczenia Raka Tarczycy badanie genetyczne w RRRT i zespole MEN 2A należy wykonać w 3. –5. roku życia, a profilaktyczną tyreoidektomię w 6. roku życia, natomiast w zespole MEN 2B badanie genetyczne jest konieczne w 1. roku życia, a profilaktyczna tyreoidektomia powinna być wykonana natychmiast po uzyskaniu wyniku pozytywnego [22].

Wszyscy chorzy z RRT powinni być poddani badaniom genetycznym – w pierwszej kolejności analizie eksonów 11 (przede wszystkim kodon 634), 10, 13, 14, 15 i 16 protoonkogenu RET (analiza DNA pochodzącego z leukocytów krwi obwodowej). Znalazienie mutacji u chorego z RRT powinno prowadzić do wykonania badania genetycznego u wszystkich krewnych I stopnia (ryzyko nosicielstwa wynosi 50 proc.). Jeśli badanie genetyczne u chorego z RRT wypadnie negatywnie, wskazane jest wykonanie szczegółowej analizy pozostałych eksonów protoonkogenu RET (ryzyko wystąpienia choroby u krewnego chorego z postacią sporadyczną wynosi 0,18 proc.) [17].

Mutacje protoonkogenu RET prowadzące do RRT mogą występować również w chorobie Hirschsprunga. Pojawia się tu bardzo ciekawy paradoks – mutacje kodonów 609, 618 i 620 mogą doprowadzić do jednoczesnej aktywacji receptora (RRT), jak i utraty jego funkcji (aganglionozę w chorobie Hirschsprunga), co powoduje możliwość współistnienia obu jednostek chorobowych u tego samego chorego [19, 23].

Piśmiennictwo

1. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, et al. Mutations of the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 851-6.
2. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363: 458-60.
3. Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, et al. Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 1988; 3: 571-8.
4. Lloyd RV. RET proto-oncogene mutations and rearrangements in endocrine diseases. *Am J Pathol* 1995; 147: 1539-44.
5. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, et al. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor. *Nature* 1994; 367: 380-3.
6. Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382: 73-6.

Tab. 1. Przykłady mutacji protoonkogenu RET i ich skojarzenie z określonymi schorzeniami
Table 1. Examples of RET proto-oncogene mutations and their correlations with specific disorders

Ekson	Kodon	Zmiana zasady	Zmiana aminokwasu	Rodzaj schorzenia			Wiek najwcześniejszej diagnozy RRT
				RRRT	MEN 2A	MEN 2B	
10	609	TGC→CGC	Cys→Arg	+	+		5. rok życia
		TGC→TAC	Cys→Tyr		+		
	611	TGC→TAC	Cys→Tyr	+	+		7. rok życia
		TGC→TGG	Cys→Trp		+		
618	TGC→TTC	Cys→Phe	+	+		7. rok życia	
	TGC→AGC	Cys→Ser		+			
	TGC→TCC	Cys→Gly		+			
620	TGC→CGC	Cys→Arg	+	+		11. rok życia	
	TGC→TAC	Cys→Tyr		+			
11	630	TGC→TTC	Cys→Phe	+			15. rok życia
		TGC→CGC	Cys→Arg		+		
	TGC→TAC	Cys→Tyr	+				
634	TGC→TTC	Cys→Phe	+	+		15. mies. życia	
	TGC→CGC	Cys→Arg	+	+			
	TGC→TAC	Cys→Tyr	+	+			
13	768	GAG→GAC	Glu→Asp	+			>20. rok życia
		TTC→TTC	Leu→Phe		+		
	TTG→TTT	Tyr→Phe	+				
790	TTG→TTC	TTG→TTT	Leu→Phe	+	+		12. rok życia
				+	+		
	TAT→TTT	Tyr→Phe		+	+		
14	804	GTG→CTG	Val→Leu	+			6. rok życia
	804+806	GTG→ATG	Val→Met				
TAT→TGC		Tyr→Cys			+		
15	883	GCC→TTC	Ala→Phe	+			13. rok życia
	891	TCG→GCG	Ser→Ala				
16	918	ATG→ACG	Met→Thr			+	9. mies. życia

- Watanabe T, Ichihara M, Hashimoto M, et al. Characterization of gene expression induced by RET with MEN2A or MEN2B mutation. Am J Pathol 2002; 161: 249-56.
- Ceccherini I, Bocciardi R, Yin L, et al. Exon structure and flanking intronic sequences of the human RET proto-oncogene. Biochem Biophys Res Commun 1993; 196: 1288-95.
- Pasini B, Hofstra RMW, Yin L, et al. The physical map of the human RET proto-oncogene. Oncogene 1995; 11: 1737-43.
- Smith DP, Erg C, Ponder BAJ. Mutations of the RET protooncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes and Hirschsprung's disease. J Cell Sci 1994; 18: 43-9.
- Machens A, Gimm O, Hinze R, et al. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 1104-9.
- Santoro M, Carlomagno F, Romano A, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. Science 1995; 267: 381-3.
- Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, et al. Minireview: RET: normal and abnormal functions. Endocrinology 2005; 145: 5448-51.
- Wells SA, Franz C. Medullary carcinoma of the thyroid gland. World J Surg 2000; 24: 952-6.
- Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al. Consensus: guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 5658-71.
- Siggelkow H, Melzer A, Nolte W, et al. Presentation of a kindred with familial medullary thyroid carcinoma and Cys611Phe mutation of the RET proto-oncogene demonstrating low grade malignancy. Eur J Endocrinol 2001; 144: 467-73.
- Massoll N, Mazzaferri EL. Diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. Clin Lab Med 2004; 24: 49-83.
- Russo A, Zanna I, Tubiolo C, et al. Hereditary common cancers: molecular and clinical genetics. Anticancer Res 2000; 20: 4841-51.
- Eng C. The RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. N Engl J Med 1996; 335: 943-51.
- Rossel M, Schuffenecker I, Schlumberger M, et al. Detection of a germline mutation at codon 918 of the RET proto-oncogene in French MEN2B families. Hum Genet 1995; 95: 403-6.
- Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, et al. Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. N Engl J Med 2003; 349: 1517-25.
- Diagnostyka i leczenie złośliwych guzów tarczycy. Rekomendacje Komitetu Naukowego II Konferencji Naukowej Rak Tarczycy 2000.
- Ito S, Iwashita T, Asai N, et al. Biological properties of ret with cysteine mutations correlate with multiple endocrine neoplasia type 2A, familial medullary thyroid carcinoma, and Hirschsprung's disease phenotype. Cancer Res 1997; 57: 2870-2.

Adres do korespondencji

dr med. **Katarzyna Ziemińska**
 Katedra i Klinika Endokrynologii,
 Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych
 Akademia Medyczna
 ul. Przybyszewskiego 49
 60-355 Poznań
 e-mail: kaziem@email.net.pl