

Редкий герминальный аллельный вариант с.2657 G>A (p.Arg 886Gln) протоонкогена *RET* у пациентки с медуллярной карциномой щитовидной железы

Амосенко Ф.А.^{1,2}, Ряднинская Н.В.¹, Логинова А.Н.¹, Поляков А.В.¹

¹ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва 115478, e-mail: amosenko@med-gen.ru

² — ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва 115478

Пациентка 55 лет была прооперирована по поводу новообразования в щитовидной железе. При гистологическом исследовании операционного материала обнаружена медуллярная карцинома. Уровень кальцитонина до операции — 400 пг/мл при норме 2–6 пг/мл; после операции — 0,45 пг/мл. С целью исключить наследственную форму карциномы провели молекулярное исследование экзонов 5, 8, 10, 11, 13–16 протоонкогена *RET* методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру. Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови. В экзоне 15 выявили редчайший миссенс-вариант с.2657 G>A (p.R886Q) в гетерозиготном состоянии неизвестного патогенного значения. Родители пробанда были недоступны. Поиск этой замены в контрольной выборке (изучено 200 хромосом) проводили методом мультиплексной лигазной реакции. Миссенс-вариант p.R886Q в этой группе не обнаружен.

Ключевые слова: щитовидная железа, медуллярная карцинома, герминальный миссенс-вариант, протоонкоген *RET*.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

A rare germline allelic variant c.2657 G>A (p.Arg886Gln) in the *RET* protooncogene in a patient with medullary thyroid carcinoma

Amosenko F.A.^{1,2}, Ryadninskaya N.V.¹, Loginova A.N.¹, Polyakov A.V.¹

¹ — Federal State Budgetary Research Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russian Federation

² — Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

We report a rare germline missense variant in the *RET* protooncogene found in a 55-year-old woman with medullary thyroid carcinoma (MTC). Calcitonin before surgery was 400 pg/ml (N = 2–6 pg/ml). Postoperative calcitonin was 0.45 pg/ml. Pheochromocytoma and hyperparathyroidism were excluded. Sanger sequencing of eight exons (5, 8, 10, 11, 13–16) (peripheral blood-derived genomic DNA) of the *RET* gene identified the heterozygous germline missense variant p.Arg886Gln (exon 15). But its clinical significance has not yet been determined. The proband's parents were not available. In the control group we only found wild-type alleles.

Key words: thyroid, medullary carcinoma, germline missense-variant, protooncogene *RET*.

Введение

Медуллярная карцинома щитовидной железы (МКЩЖ) — довольно редкое заболевание, составляющее 5–8% от всех гистологических вариантов тиреоидных раков. Для нее характерна высокая доля наследственных форм (25–30%) [1, 2], обусловленных в основном герминальными активирующими миссенс-мутациями протоонкогена *RET* [3]. Их обнаруживают в 98% семей,отягощенных наследственной МКЩЖ, передающейся потомкам по аутосомно-доминантному типу самостоятельно, или в составе синдромов множественных эндокринных неоплазий второго типа (МЭН 2 синдромы). Риск развития МКЩЖ для носителей герминальных мутаций в гене *RET* близок к 100%. Для этих мутаций установлена четкая генофенотипическая связь [3].

Они позволяют предсказать возраст начала заболевания, его агрессивность, возможность поражения других эндокринных органов, а также проводить пренатальную диагностику, генетическое консультирование и профилактическую тиреоидэктомию. Кроме того, согласно последним данным, чувствительность опухоли к ингибиторам киназы *RET* также определяется ее генотипом. Большинство герминальных *RET*-мутаций, являющихся причиной развития наследственной МКЩЖ, локализованы в экзонах 10,11, и 13–16 [4].

Пациент

Больная 55 лет была прооперирована в больнице № 36 г. Москвы по поводу новообразования в щитовидной железе. При исследовании операционного материала

ла обнаружен узел диаметром 16 мм. По гистологии — медулярный рак. Уровень кальцитонина до операции — 400 пг/мл при норме 2—6 пг/мл; после операции — 0,45 пг/мл. Клинические и биохимические признаки поражения надпочечников и паращитовидных желез (уровень паратгормона в крови, уровни метанефрина и норметанефрина в суточной моче) отсутствуют. Родословная со слов больной не отягощена по эндокринным заболеваниям.

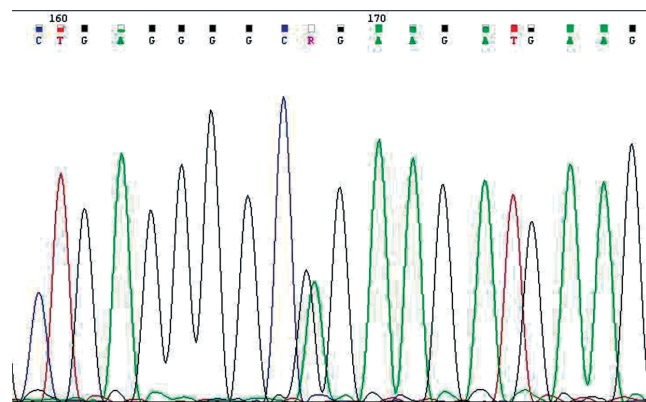
Цель работы. Для исключения возможности наследственной формы МКЩЖ провели молекулярное исследование протоонкогена *RET*.

Материалы и методы

Геномную ДНК пациентки, направленной в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ МГНЦ, выделяли из лимфоцитов периферической крови. Поиск мутаций проводили, используя ПЦР амплификацию и прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру экзонов 5, 8, 10, 11, 13—16 гена *RET*. Поиск замены с.2657 G>A в контрольной выборке проводили методом мультиплексной лигазной реакции с последующей амплификацией (MLPA). Материал для контрольной выборки был получен на станции переливания крови. Дизайн олигонуклеотидных проб для лигирования и универсальных праймеров для ПЦР осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики МГНЦ, синтез — в ООО «Евроген», г. Москва. Использование разработанной нами системы MLPA приводило к образованию фрагментов размером 83 п.н. (аллель G) при анализе ДНК здоровых доноров и 86 п.н. (аллель A) — мутантной ДНК.

Результаты

При анализе структуры гена *RET* в лимфоцитах периферической крови пациентки с МКЩЖ в экзоне 15 был обнаружен миссенс-вариант с.2657 G>A (CGG886CAG) в гетерозиготном состоянии (rs373594744) (рисунок). Эта



Фрагмент результатов прямого автоматического секвенирования экзона 15 протоонкогена *RET*.

транзигция приводит к замене аргинина на глутамин (p.R886Q) во внутриклеточном тирозинкиназном домене белка *RET*. Следует отметить, что за более чем 20-летний период в нашей практике это первая российская пациентка с герминальной заменой в экзоне 15 гена *RET*. Кроме того, выявлены два гетерозиготных полиморфизма: в экзоне 11 (с.2071G>A, p.G691S, rs 1799939) и в экзоне 15 (с.2712C>G, p.S904S, rs 1800863), что исключает делеции этих экзонов гена *RET*. Поскольку ДНК родителей не была доступна для исследования, происхождение выявленной замены не известно. На момент обследования пациентки вариант с. 2657 G>A не был заявлен в базе данных NCBI как мутация, приводящая к медулярному раку щитовидной железы. При исследовании экзона 15 гена *RET* методом MLPA в контрольной выборке (200 аллелей) замена p.R886Q не обнаружена.

Обсуждение

Наследственная форма МКЩЖ в составе синдромов МЭН 2А, МЭН 2Б, а также как самостоятельное заболевание (семейный медулярный рак щитовидной железы) вызывается хорошо охарактеризованными активирующими мутациями протоонкогена *RET*, в основном миссенс-мутациями. Полный список герминальных *RET*-мутаций, известных сегодня, можно найти на сайте www.arup.utah.edu/database/MEN2/MEN2_welcome.php [5]. В экзоне 15 обнаружено 11 мутаций, патогенными из которых являются только 4. Остальные имеют неустановленное для заболевания значение. Степень патогенности выявленного нами редкого варианта p.Arg886Gln в протоонкогене *RET* также неизвестна. Данные, полученные с помощью различных компьютерных программ, предсказывающих патогенность миссенс-варианта p.Arg886Gln (Mutation Taster, Polyphen 2, SIFT, UMD-Predictor, Provean), оказались противоречивыми. На патогенность выявленного варианта четко указывают только три программы: Mutation Taster, Polyphen 2 и UMD-Predictor. Тем не менее, вряд ли он является нейтральным, поскольку локализован в каталитическом коре тирозинкиназного домена, в непосредственной близости к высококонсервативной области между тирозинкиназными субдоменами VI и VII, которые определяют субстратную специфичность и взаимодействие АТФ с субстрат-связывающим карманом. Кроме того, в кодоне 886 гена *RET* известна еще одна миссенс-мутация: p.R886W, патогенность которой доказана *in vitro* [6]. И, наконец, очень низкая аллельная частота встречаемости в популяции может свидетельствовать в пользу ее патогенности. В базе данных по экзомному и геномному секвенированию GNOMAD частота редкого аллеля A в Европе составляет 0,00002373 (3 на 126398 хромосом), а в Африке на порядок больше — 0,0002503 (6 на 23974 хромосом). Частота аллеля A по данным других баз составляет 0,00008 (GO-ESP) и 0,0001 (TORMED). На основании этих данных мы предполагаем, что выявили этиологическую мутацию.

Список литературы

1. Roman SA, Lin R, Sosa JA Prognosis of medullary thyroid carcinoma: demographic, clinical and pathologic predictors of survival in 1252 cases. *Cancer*. 2006 107(9):2134-2142.
2. Kouvaraki MA, Shapiro SE, Perrier ND et al. RET proto-oncogene, a review and up-date of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid*. 2005 15(6): 531-544.
3. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *YAMA*. 1996 276(19): 1575-1579.
4. De Groot JW, Links TP, Plukker JT et al. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr. Rev.* 2006 27(5): 535-560.
5. Margraf RL, Crockett DK, Krautscheid PM et al. Multiple endocrine neoplasia type 2 RET protooncogene database: repository of MEN 2-associated RET sequence variation and reference for genotype/phenotype correlations. *Hum. Mutat.* 2009 30: 548-556.
6. Prazeres H, Couto JP, Rodrigues et al. In vitro transforming potential, Intracellular signaling properties, and sensitivity to a kinase inhibitor (sorafenib) of RET protooncogene variants Glu511Lys, Ser649Leu, and Arg886Trp. *Endocrine-Related Cancer*. 2011 18:401-412. Doi: 10.1530/ERC -10-0258.