

Presimptomatsko otkrivanje medularnog karcinoma štitnjače metodama rekombinacijske tehnologije DNA

Koraljka Gall-Trošelj

Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Stručni rad

UDK 616.44-006.6-07

Prispjelo: srpanj 1997.

Razlikovanje sporadičnog i nasljednog medularnog karcinoma štitnjače od velikog je kliničkog značenja kako zbog razlike u prognozi, tako i potrebe za presimptomatskom dijagnostikom i genskim savjetovanjem u potonjem slučaju. Nasljedne mutacije proto-onkogenog gena dovode do nastanka sindroma multiple endokrine neoplazije tipa 2. Somatske

točkaste mutacije ovog gena prisutne su u sporadičnim medularnim karcinomima štitnjače. Metode molekularne medicine omogućuju genetičke analize kojima se potvrđuje ili isključuje prisustvo nasljedne mutacije. Ujedno omogućuju i presimptomatsko otkrivanje bolesti u zdravih ljudi.

Ključne riječi: medularni karcinom štitnjače, analiza DNA, presimptomatska dijagnostika.

UVOD

Zloćudni tumori štitnjače zastupljeni su 1.5% u sveukupnoj incidenciji zloćudnih tumora u SAD. Medularni karcinom štitnjače, (MTC od engl. medullary thyroid carcinoma) porijeklom C stanica, dijagnosticira se samo u 5-10% slučajeva (16). Najčešće se javlja u sporadičnom obliku (80%), a rjeđe u sklopu tri različita sindroma koji se nasljeđuju autosomno dominantno (19):

1. Multipla endokrina neoplazija tip 2 A (MEN 2A od engl. multiple endocrine neoplasia type 2A); osim medularnog karcinoma štitnjače u ovom se sindromu javljaju feokromocitom (u 50% slučajeva) i hiperparatireoidizam (u 10-35% slučajeva) (10);

2. Multipla endokrina neoplazija tip 2 B koju, uz pojavu medularnog karcinoma štitnjače, karakterizira i pojava feokromocitoma, te mnogobrojne nepravilnosti u razvoju (ganglioneuromatoza probavnog sustava, atipičan oblik lica, marfanoidan izgled) (26);

3. Obiteljski medularni karcinom štitnjače (FMTC od engl. familial medullary thyroid carcinoma) koji je karakteriziran samo pojavom navedenog tumora koji se autosomno dominantno nasljeđuje unutar obitelji (6).

Sva tri entiteta su, zajedno s Hirschprungovom bolešću, objedinjena nazivom neurokristopatije. Njihov nastanak povezan je s poremećajima proliferacije, diferencijacije i migracije stanica neuralnog grebena koje nastaju kao posljedica promjene funkcije proto-onkogenog gena (22).

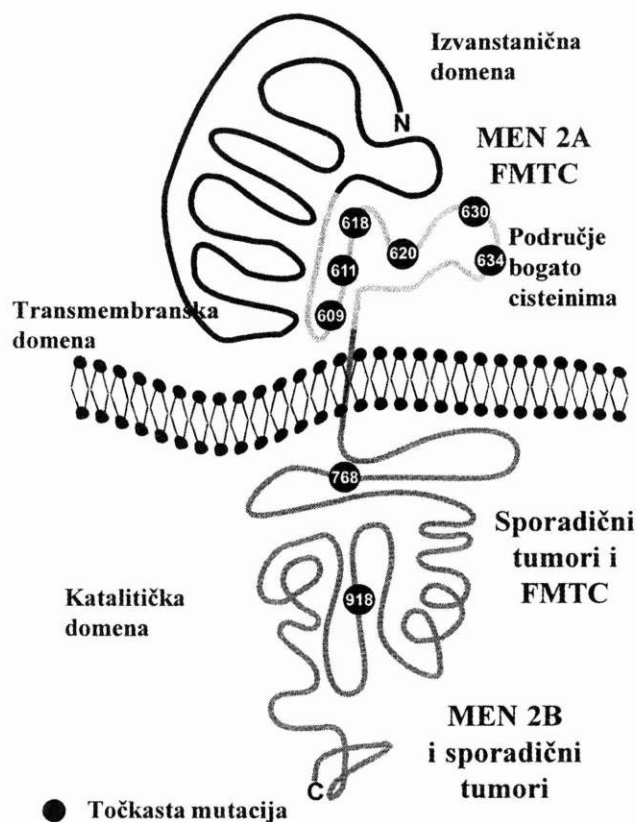
Proto-onkogen ret

Nalazi se na dugačkom kraku kromosoma 10 (10q11.2) i velik je 30 kb (11,15). Sastoji se od 20 eksona, a njegovim prepisivanjem nastaju dvije različito velike glasničke molekule RNA, zbog čega i proteinski produkt ovog gena može biti različito velik (1072 i/ili 1114 aminokiselina) (23, 24). Proteinski produkt proto-onkogenog gena je receptor s tirozin kinaznom aktivnošću, prikazan na slici 1.

Sastoji se od: a) velike izvanstanične domene koja pokazuje visok stupanj homologije s kadherinima; u ovoj domeni, kodiranoj eksonima 1-11, nalazi se šest molekula cisteina koje imaju ključnu ulogu u vezivanju liganda; b) dijela koji prolazi kroz staničnu membranu i c) unutarstanične tirozin kinazne domene (3). Ligand za ovaj receptor nazvan je GDNF (od engl. glial cell line derived neurotrophic factor) (25). U transgeničnih miševa, homozigota koji ne posjeduju ovaj gen (-/-), u crijevu se ne razvijaju neuroni zbog izostanka migracije stanica neuroektodermalnog grebena, a ne razvija se ni urinarni sustav (21).

Promjene proto-onkogenog gena u čovjeka

Točkaste mutacije proto-onkogenog gena nađene su u genomskoj DNA većine bolesnika oboljelih od sindroma MEN 2A, MEN 2B i FMTC. U sindromima MEN 2A i FMTC točkastom mutacijom u eksonima 10 i 11 mijenja se jedna od šest visoko konzerviranih molekula cisteina ("hot spot" mjesta) izvanstanične domene onkoproteina ret (kodoni 609, 611, 618, 620, 630 i 634); za ovu domenu veže



SLIKA 1.
Onkoprotein ret

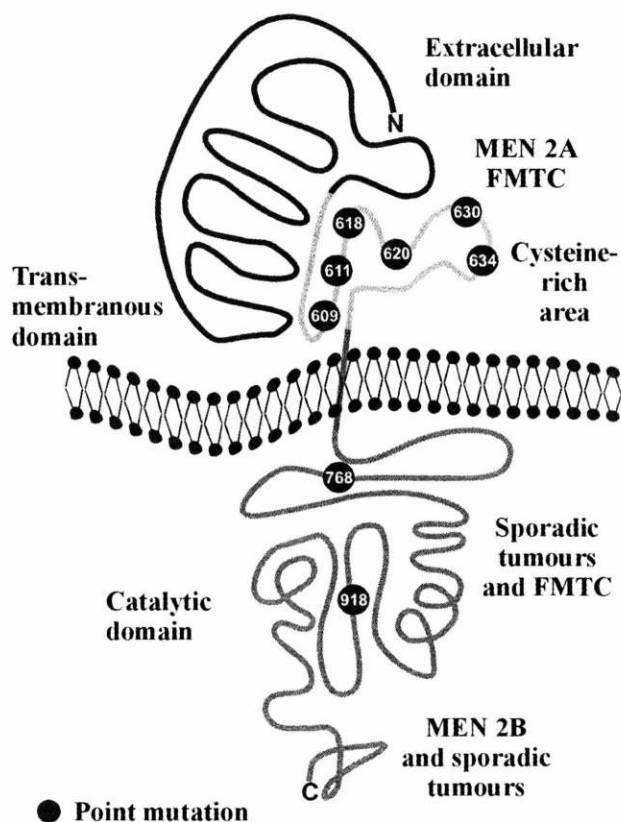


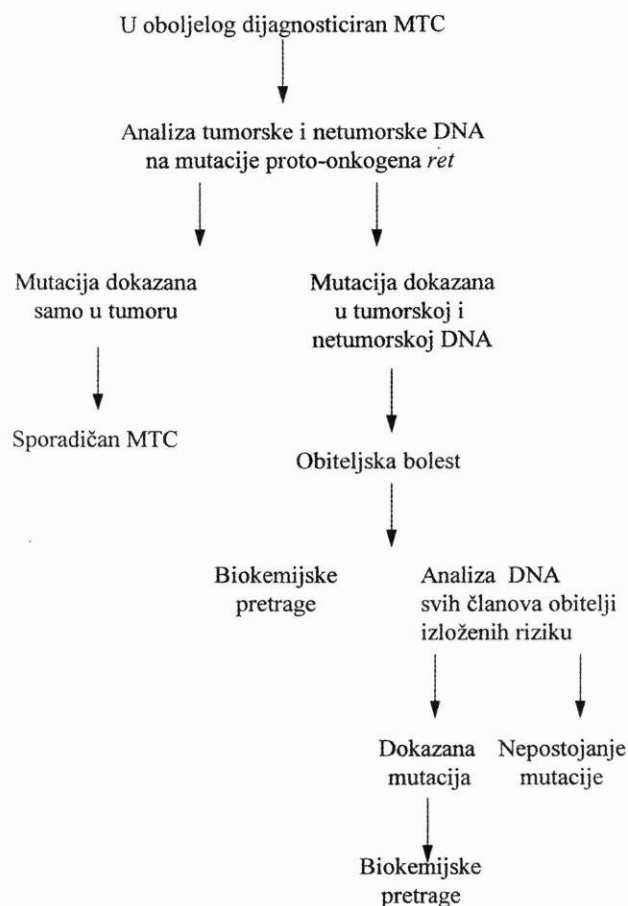
FIGURE 1.
Ret proto-oncogene

se ligand (4,12). Uočena je povezanost između promjene pojedinog kodona i kliničke slike u prije navedenim sindromima. Na primjer, točkasta mutacija cisteina na kodonu 634 nađena je u više od 85% ispitanika oboljelih od MEN 2A, dok je samo 12% mutacija bilo prisutno u kodonima 618 i 620. Pretpostavljamo da ovim slučajevima dolazi do dimerizacije receptora i stalnog prijenosa signala u stanicu, neovisno o ligandu (autoaktivacija receptora) (13). Nedavno su dokazane još dvije mutacije u obiteljima sa sindromom nasljednog medularnog karcinoma štitnjače: promjene kodona 768 i 804. Do sada su pokazane samo u jednoj studiji (1). U sindromu MEN 2B poznata je samo jedna mutacija proto-onkogene ret i to na kodonu 918 posljedica čega je zamjena metionina treoninom. Od 86 ispitanika oboljelih od sindroma MEN 2B, koji su bili ispitivani u četiri odvojene studije, samo četvoro nije imalo ovu mutaciju (2, 5, 9, 17). Većina autora smatra da je posljedica ove mutacije stalno aktivirana katalitička podjedinica enzima. Ove mutacije nasljeđuju se od roditelja i nalaze se u svim stanicama ispitanika. Iako je jedan alel mutiran, a drugi zdrav, krajnja posljedica je zloćudna preobrazba C-stanica štitnjače. Zbog toga je ret i svrstan u skupinu dominantnih onkogeni.

Iako postoji nekoliko studija o mutacijama proto-onkogene ret u sporadičnim medularnim karcinomima, rezultati su zbunjujući. Čini se da je mutacija karakteristična za sindrom MEN 2B prisutna u 30% ovih tumora (5, 7). Upravo spoznaje o postojanju točkastih mutacija u ovom genu omogućuju nam razlikovanje sporadičnih i nasljednih medularnih karcinoma štitnjače.

METODE

Lančana reakcija polimeraze (PCR od engl. polymerase chain reaction) je enzimska metoda kojom je u uvjetima in vitro omogućeno umnažanje željenog odsječka gena u vrlo velikom broju kopija (14). Analizu je moguće učiniti s ukupnom DNA ispitanika izdvojenom iz vrlo malog broja stanica. Za analizu tumorske DNA koristimo 5µm tanak rez tkiva fiksiranog formalinom i uklopljenog u parafin na kojem smo prethodno učinili mikrodisekciju (8). Netumorska DNA ispitanika najčešće se izdvaja iz stanica periferne krvi (18). Nakon provjere uspješnosti umnažanja reakcije PCR horizontalnom elektroforezom u gelu agaroze, dobivene odsječke proto-onkogene ret (veličine 130-250 pb) možemo analizirati sljedećim metodama:



SLIKA 2.

Redosljed genetičkih analiza u oboljelog od medularnog karcinoma štitnjače

1. SSCP (single stranded conformational polymorphism);
2. HDGE (heteroduplex gel electrophoresis);
3. RFLP (restriction fragment length polymorphism);
4. sekvencioniranje umnoženog odsječka (28).

U našem Zavodu koristimo metodu RFLP koja se zasniva na spoznaji da će određena mutacija u umnoženom odsječku stvarati novo, odnosno uklanjati postojeće restrikcijsko mjesto. To u konačnici dovodi do stvaranja restrikcijskih ulomaka različite duljine, ovisno o tome da li je tražena mutacija prisutna ili ne. Nakon završene restrikcije, uzorak se nanosi na 60 cm dugačak gel poliakrilamida i, po završenoj okomitoj elektroforezi, boji srebrom. Veličina odsječaka očitava se uz pomoć odsječaka DNA poznatih veličina (DNA standardi).

REZULTATI I RASPRAVA

U sporadičnom tumoru mutacija će biti prisutna samo u zloćudno preobraženom tkivu štitnjače. U pripadajućem,

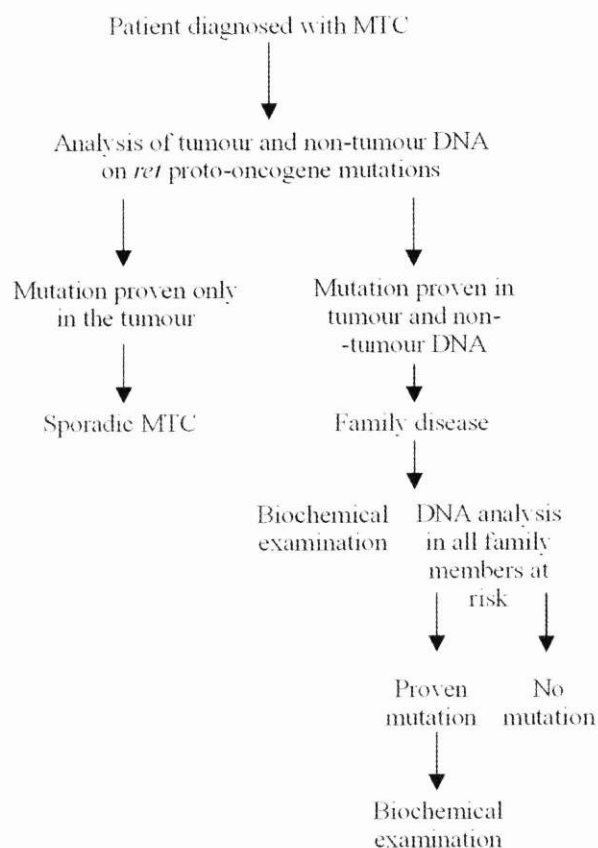


FIGURE 2.

Sequence of genetic analyses in a patient with medullary thyroid carcinoma

netumorskom tkivu mutacija se ne može dokazati. Naprotiv, u slučaju nasljednog MTC, mutaciju proto-onkogene *ret* dokazat ćemo kako u tumorskom, tako i u netumorskom tkivu oboljelog. Zašto je ovo važno?

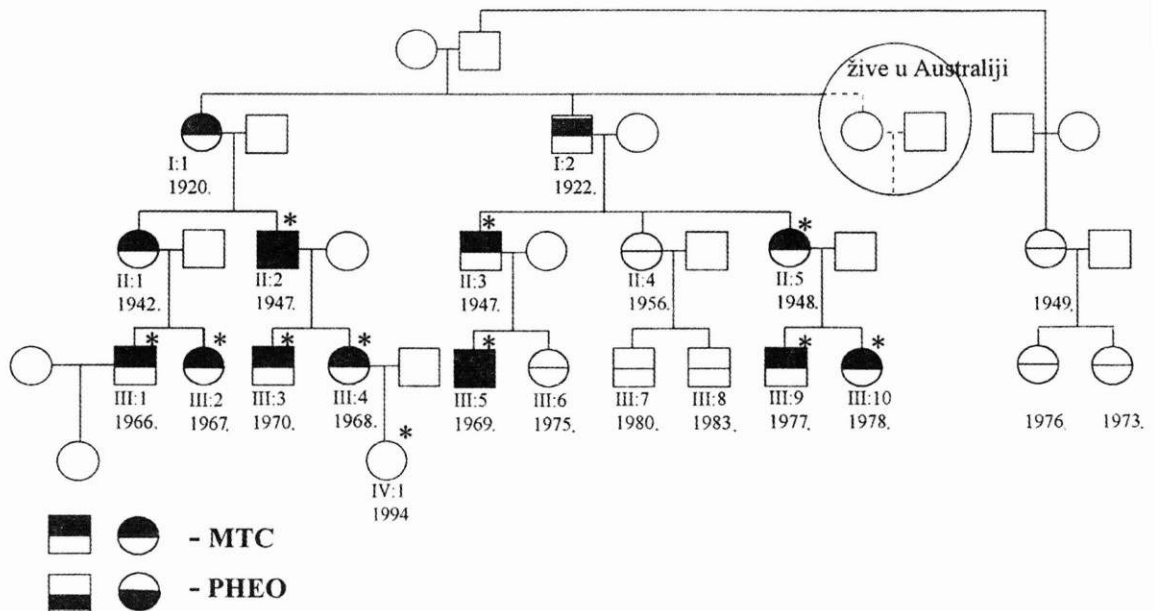
U približno 7% oboljelih od (naizgled) sporadičnog MTC postoji nasljedna, de novo mutacija koja se s 50% vjerojatnosti prenosi na potomstvo (27). Presimptomatsko otkrivanje promijenjenog gena u potomaka, kako bi se pravovremeno moglo intervenirati, moguće je samo ako je prije navedenim metodama u oboljelog dokazana nasljedna mutacija. Zbog toga je svakom oboljelom od MTC potrebno učiniti analizu proto-onkogene *ret* prema postojećem algoritmu (slika 2) (7).

S druge strane, dijete oboljelog roditelja koji ima nasljednu mutaciju može (opet s 50% vjerojatnosti) od roditelja naslijediti zdravi alel. I ovdje je važno učiniti analizu DNA dobivenu iz stanica pune krvi djeteta kako bismo isključili nastanak obiteljske bolesti. Primjer je prikazan na slici 3.

U velikoj obitelji s osječkog područja analiza je učinjena u svih članova obitelji obilježenih zvjezdicom. U četvr-

SLIKA 3.
Rodoslovno stablo obitelji sa sindromom MEN 2A
FIGURE 3.
Genealogic tree of a family with MEN 2A syndrome

· žive u Australiji
/ living in Australia



toj generaciji (IV-1) djevojčica rođena 1994. godine od bolesne je majke naslijedila zdravi alel i smatramo da je u nje vjerojatnost obolijevanja od MTC jednaka onoj u općoj populaciji. U ispitanice nije potrebno ponavljati biokemijske pretrage, a ujedno izbjegavamo i testiranje njezinih potomaka.

U svibnju 1997. godine pokazano je da točkasta mutacija proto-onkogenog gena *ret* dovodi do nastanka papilarnog karcinoma bubrega koji se također može pojavljivati u nasljednom obliku (20). Prije navedenim algoritmom moguće je i u ovom slučaju presimptomatski otkrivati ugrožene članove obitelji.

ZAKLJUČAK

Ukratko je iznesen pristup koji koristimo u presimptomatskoj dijagnostici medularnog karcinoma štitnjače. Primjena metoda molekularne biologije i medicine dovela je do neočekivanog proboja u istraživanju raka, osobito nasljednog. Upoznavanjem novih gena i njihove uloge postaju nam jasniji mehanizmi nastanka zloćudne preobrazbe. Očekujemo da će u skoroj budućnosti presimptomatska dijagnostika nasljednog raka metodama molekularne medicine biti izbor svakog liječnika i (budućeg) bolesnika.

Zahvala

Zahvaljujem prof. dr. Z. Kusiću i dr. J. Smoji, koji su pomogli da rezultati istraživačkog rada zažive u kliničkoj praksi. Posebno zahvaljujem prof. dr. K. Paveliću i dr. J. Pavelić na pomoći i ukazanom povjerenju.

LITERATURA

- Bolino A, Schuffenecker I, Luo Y, Seri M, Silengo M, Tocco T, Chabrier G, Houdent C, Murat A, Schlumberger M, Tournaire J, Lenoir GM, Romeo G. Ret mutations in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene* 1995; 10: 2415-19.
- Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, Wells SA Jr, Goodfellow PJ, Donis-Keller H. Single missense mutation in the tyrosine catalytic domain of the ret proto-oncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1577-83.
- Ceccherini I, Boccardi R, Luo Y, Pasini B, Hofstra R, Takahashi M, Romeo G. Exon structure and flanking intronic sequences of the human *ret* proto-oncogene. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 196: 1288-95.
- Donis-Keller H, Dou S, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P, Wells SA Jr. Mutations in the *ret* proto-oncogene is associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 851-56.
- Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Nagai MA, Healey CS, Ponder MA, Gardner M, Scheumann GFW, Jackson CE, Tuncliffe A, Ponder BAJ. Point mutation within tyrosine kinase domain of the *ret* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumors. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 237-41.
- Farndon JR, Leight GS, Dilley WG, Baylin SB, Smallridge RC, Harrison TS, Wells SA Jr. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg* 1986; 73: 278-81.
- Forster-Gibson CJ, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1969-74.
- Gall K, Pavelić J, Jadro-Šantel D, Poljak M, Pavelić K. DNA amplification by polymerase chain reaction from brain tissues embedded in paraffin. *Int J Exp Path* 1993; 74: 333-7.
- Hofstra RMW, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, Pasini B, Hoppner JWM, Ploos van Amstel HK, Romeo G, Lips CJM, Buys CHCM. A mutation in the *ret*

- protooncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994; 367: 375-6.
10. Howe J, Norton J, Wells S. Prevalence of pheochromocytoma and hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2A: results of long-term follow-up. *Surgery* 1993; 114: 1070-7.
 11. Lairmore TC, Howe JR, Korte JA, Dilley WG, Aine L, Aine E, Wells SA Jr, Donis-Keller H. Familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2B map to the same region of chromosome 10 as multiple endocrine neoplasia type 2A. *Genomics* 1991; 9: 181-92.
 12. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, Ponder MA, Telenius H, Tunnacliffe A, Ponder BAJ. Germ-line mutations of the ret proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363: 458-60.
 13. Mulligan LM, Eng C, Healey CD, Clayton D, Kwok JBJ, Gardner E, Ponder MA, Frilling A, Jackson CE, Lehnert H, Neumann HPH, Thibodeau SN, Ponder BAJ. Specific mutations of the ret are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nature Genet* 1994; 6: 70-4.
 14. Mullis K, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.
 15. Norum RA, Lafreniere RG, O'Neal LW, Nikolai RF, Delaney JP, Sisson JC, Sobol H, Lenoir GM, Ponder BAJ, Willard HF, Jackson CE. Linkage of multiple endocrine neoplasia type 2B gene (MEN 2B) to chromosome 10 markers linked to MEN 2A. *Genomics* 1990; 8: 313-7.
 16. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 1996; 46: 5-27.
 17. Rossel M, Schuffenecker I, Schlumberger M, Bonnardel C, Modigliani E, Gardet P, Navarro J, Luo Y, Romeo G, Lenoir G, Billaud M. Detection of a germline mutation at codon 918 of the ret proto-oncogene in French MEN 2B families. *Hum Genet* 1995; 95: 403-6.
 18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2. izdanje. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
 19. Schimke RN. Genetic aspects of multiple endocrine neoplasia. *Ann Rev Med* 1984; 35: 25-31.
 20. Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang ZP, Lubensky I, Dean M, Allikmes R, Chidambaram A et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature Genet* 1997; 16: 68-73.
 21. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Constantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor ret. *Nature* 1994; 367: 380-83.
 22. Smith DP, Eng C, Ponder BAJ. Mutations of the ret proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes and Hirschprung disease. *J Cell Sci* 1994; 18(Suppl): 43-9.
 23. Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a receptor tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 1988; 3: 571-78.
 24. Takahashi M, Buma Y, Hiai H. Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal. *Oncogene* 1989; 4: 805-6.
 25. Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, Kilkenny C, Salazar-Grueso E, Pachnis V, Arumae U, Sariola H, Saarma M, Ibanez CF. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 1997; 381: 785-9.
 26. Vasen H, van der Feltz M, Raue F. The natural course of multiple endocrine neoplasia type II b. A study of 18 cases. *Arch Intern Med* 1992; 152: 1250-2.
 27. Wohllk N, Cote GJ, Bugalho MMJ, Ordonez N, Evans DB, Goepfert H, Khorana S, Schultz P, Richards CS, Gagel RF. Relevance of ret proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3740-5.
 28. Wohllk N, Cote GJ, Evans DB, Goepfert H, Ordonez NG, Gagel RF. Application of genetic screening information to management of medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2. *Endocrin Metab Clin North Amer* 1996; 25: 1-25.

Abstract

PRE-SYMPTOMATIC DIAGNOSTICS OF MEDULLARY THYROID CARCINOMA USING r-DNA METHODS

Koraljka Gall-Trošelj

Institute Ruđer Bošković, Zagreb

The distinction of sporadic from inherited medullary thyroid carcinomas (MTCs) is of clinical importance because of the differences in prognosis and the need for family screening

for genetic counselling required in the latter. Germline mutations in the ret proto-oncogene are associated with multiple endocrine neoplasia type 2. Somatic point mutations in the same gene are identified in a subset of sporadically occurring MTCs. The methods of molecular medicine are suitable to distinguish heritable from non-heritable MTCs and identify asymptomatic individuals at risk.

Key words: medullary thyroid carcinoma, DNA analysis, pre-symptomatic diagnostics