

Три герминальные мутации в гене *RET* у членов одной семьи с синдромом множественных эндокринных неоплазий 2А типа

К.м.н., зав. отд. Н.В. СЕВЕРСКАЯ¹, д.м.н., акад. РАН В.Г. ПОЛЯКОВ^{2,3}, д.м.н., проф. Р.В. ШИШКОВ^{2,3}, д.м.н., вед.н.с. А.А. ИЛЬИН¹, к.м.н. Н.В. ИВАНОВА², А.И. ПАВЛОВСКАЯ², В.М. КОЗЛОВА^{2,4}, вед.н.с., к.б.н. Ф.А. АМОСЕНКО^{2,4}, Л.Н. ЛЮБЧЕНКО², д.м.н., ст.н.с. Т.П. КАЗУБСКАЯ², д.м.н., зав. отд. , проф. Н.А. КОШЕЧКИНА^{2,3}, зав. отд. Е.В. МИХАЙЛОВА², д.м.н., зав. лаб. И.И. МАТВЕЕВА², к.м.н. И.Н. СЕРЕБРЯКОВА², к.м.н., зав. отд. С.Н. МИХАЙЛОВА², к.м.н., ст.н.с. Н.Ю. КАЛИНЧЕНКО^{2,5}

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России, Обнинск, Россия; ²ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия; ³ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», Москва, Россия; ⁴ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия; ⁵ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия

Встречаемость одновременно нескольких герминальных мутаций в гене *RET* у больных с синдромом множественных эндокринных неоплазий 2А типа (МЭН 2А) крайне редка. При обследовании родственников больных с синдромом МЭН 2А обычно исследуют только один экзон, в котором ранее была выявлена характерная для данной семьи мутация. Однако вторая мутация может изменять фенотип пациентов с синдромом МЭН 2А, включая возраст клинического проявления медулярного рака щитовидной железы (МРШЖ) и пенетрантность феохромоцитомы. Приводится описание семьи с синдромом МЭН2А, у членов которой выявлены различные комбинации трех мутаций гена *RET* (*RET* кодон С634R, С634R+I852M, I852M+Y791F, Y791F). Минимальный срок манифестации МРШЖ отмечен при комбинации С634R+I852M (в 24 года). У больного с мутацией С634R, оперированного по поводу МРШЖ в 35 лет, на момент обследования в 49 лет имелись признаки персистенции заболевания. Носитель мутации Y791F в 28 лет клинически здоров. У ребенка с мутацией I852M+Y791F при профилактической тиреоидэктомии в 4 года выявлена С-клеточная гиперплазия. Клиническое значение сочетанных мутаций в данной семье не определено. Представлен краткий обзор литературы по множественным мутациям в гене *RET* у больных МРШЖ и синдромом МЭН 2А.

Ключевые слова: медулярный рак щитовидной железы (МРШЖ), синдром множественных эндокринных неоплазий типа 2А (МЭН 2А), герминальная *RET* мутация, множественные *RET* мутации, профилактическая тиреоидэктомия, кальцитонин, С634R, I852M, Y791F.

Three *RET* germ-line mutations in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A syndrome

N.V. SEVERSAKYA¹, V.G. POLYAKOV^{2,3}, R.V. SHISHKOV^{2,3}, A.A. IL'IN¹, N.V. IVANOVA², A.I. PAVLOVSKAYA², V.M. KOZLOVA^{2,4}, F.A. AMOSENKO^{2,4}, L.N. LYUBCHENKO², T.P. KAZUBSKAYA², N.A. KOSHECHKINA^{2,3}, E.V. MIKHAILOVA², I.I. MATVEEVA², I.N. SEREBRYAKOVA², S.N. MIKHAILOVA², N.YU. KALINCHENKO^{2,5}

¹A.Tsyb Medical Radiological Research Centre - branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russia 249036; ²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia; ³Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia; ⁴Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia; ⁵Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

Multiple mutations in *RET* proto-oncogene are not common findings in patients with multiple endocrine neoplasia type 2A syndrome (MEN2A). Screening for *RET* mutation in MEN2A family members is usually limited by the known affected exon. However the second unrevealed mutation in *RET* proto-oncogene can coexist and modify the phenotype of MEN2 patients, including age of onset of medullary thyroid carcinoma, penetrance of pheochromocytoma etc. We here describe a family with MEN 2A syndrome with combination of three different germ-line *RET* mutations in its members (*RET* codon C634R, C634R+I852M, I852M+Y791F, Y791F). The earliest onset of medullary thyroid carcinoma was in a patient harboring the C634R+I852M double mutation at age 24 years. A 49-y.o. patient with C634R mutation has persistent medullary thyroid carcinoma after thyroidectomy at 35 years old. A carrier of Y791F mutation had no clinical evidence of disease at age of 28 years. In a child with compound I852M+Y791F mutation preventive thyroidectomy revealed C-cell hyperplasia at age of 4 years. The clinical significance of double *RET* mutation in the described family is not clear. Literature data of multiple germ-line *RET* mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 2A syndrome are presented.

Keywords: medullary thyroid carcinoma, multiple endocrine neoplasia type 2A syndrome, germ-line *RET* mutation, multiple mutations, preventive thyroidectomy, calcitonin, C634R, I852M, Y791F.

doi: 10.14341/probl20166262-?

Список сокращений

МРШЖ — медулярный рак щитовидной железы
МЭН2А — синдром множественных эндокринных неоплазий 2А типа
МЭН2Б — синдром множественных эндокринных неоплазий 2Б типа

КТ — кальцитонин
УЗИ — ультразвуковое исследование
СКГ — С-клеточная гиперплазия
АКТГ — адренокортикотропный гормон

Медулярный рак щитовидной железы (МРЩЖ) происходит из С-клеток и на его долю приходится 5–10% всех случаев рака ЩЖ. Одной из особенностей МРЩЖ является высокая частота (до 25%) наследуемых форм [1]. Причиной развития наследственного МРЩЖ является герминальная мутация в онкогене *RET*, активация которого приводит к пролиферации и опухолевой трансформации клеток [2]. На сегодняшний день в литературе описано более 100 мутаций гена *RET*, локализованных в экзонах 5, 8, 10, 11, 13–16. Большинство из них представлены точковыми миссенс-мутациями, реже — короткими делециями, дупликациями, инсерциями [3, 4]. Локализация мутации и тип замены аминокислоты влияют на клинические проявления МРЩЖ, включая возраст манифестации и агрессивность течения [3, 5]. При ряде мутаций, затрагивающих 10 и 11, реже 5, 8, 13 и 14 экзоны, МРЩЖ сочетается с феохромоцитомой и гиперпаратиреозом (синдром множественных эндокринной неоплазии типа 2А, МЭН2А). При наличии мутации в 16 экзоне, а иногда в 15 и 14 экзонах, развивается синдром МЭН2Б, включающий, помимо МРЩЖ, феохромоцитому, ганглионейроматоз слизистой ЖКТ, губ и языка, а также специфические изменения внешности (марфаноподобный хабитус) [3, 5].

Двойные мутации гена *RET*, затрагивающие различные экзоны, встречаются крайне редко [6, 7]. Приводим описание семьи с тремя герминальными мутациями у ее членов.

Описание семьи

В клинику обратились родители 4-летнего мальчика для генетического консультирования. Из анамнеза известно, что мама ребенка в 24 года оперирована по поводу МРЩЖ и двусторонней феохромоцитомы. При проведении секвенирования гена *RET* у нее были выявлены две мутации в экзоне 11 (С634R) и экзоне 14 (I852M). У деда по материнской линии с синдромом МЭН 2А (оперирован по поводу МРЩЖ и двусторонней феохромоцитомы соответственно в 35 и 45 лет), выявлена мутация С634R (рисунк). У бабушки по материнской линии исследование не проводилось. Таким образом, мутация I852M была унаследована матерью пробанда или от своей матери (бабушки пробанда), или возникла *de novo*.

При генетическом исследовании ребенка выявлены две герминальные мутации в экзоне 13 (Y791F) и экзоне 14 (I852M). Так как у матери мутация Y791F отсутствовала, генетическое исследование предложено отцу ребенка. При секвенировании гена *RET* у отца обнаружена герминальная мутация в экзоне 13 (Y791F). Таким образом, ребенок унаследовал одну

мутацию (I852M) от матери, а другую (Y791F) от отца (см. рисунок).

Клиническое обследование ребенка 4 лет выявило повышение уровня кальцитонина (КТ) в сыворотке крови — 14 пг/мл (норма до 10 пг/мл). Учитывая наличие двух активирующих мутаций в гене *RET*, рекомендации Американской тиреоидологической ассоциации (АТА) и Российской ассоциации эндокринологов [4, 7], а также желание родителей мальчика, было решено провести профилактическую тиреоидэктомию до 5-летнего возраста. В возрасте 4 года 3 мес ребенку выполнена профилактическая тиреоидэктомия в хирургическом отделении №1 (опухолей головы и шеи) НИИ ДОГ РОНЦ им. Н.Н. Блохина. При гистологическом исследовании удаленного препарата выявлены множественные очаги С-клеточной гиперплазии.

Клиническое обследование отца в возрасте 28 лет не выявило признаков заболевания (КТ 4,3 пг/

Сведения об авторах:

**Северская Наталья Викторовна* — к.м.н., зав. отд. «ин витро» радионуклидной диагностики, врач эндокринолог МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиала ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Калужская область, Обнинск, Россия, 249036, e-mail: severskn@mrrc.obninsk.ru

Поляков Владимир Георгиевич — д.м.н., акад. РАН, зам. дир. и зав. хирургическим отд. №1 (опухолей головы и шеи) НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина, зав. каф. детской онкологии ГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава России;

Шишков Руслан Владимирович — д.м.н., проф. каф. детской онкологии ГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава России, врач хирургического отд. №1 (опухолей головы и шеи) НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Ильин Алексей Амурович — д.м.н., вед.н.с. отд. радиохирургического лечения закрытыми радионуклидами МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиала ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России;

Иванова Наталья Владимировна — к.м.н., врач НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»;

Михайлова Елена Владимировна — к.м.н., зав. рентгенодиагностическим отделением НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»;

Кошечкина Наталья Анатольевна — д.м.н., вед.н.с. рентгенодиагностического отделения НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», проф. каф. детской онкологии «РМАПО» Минздрава России;

Матвеева Ирина Ивановна — д.м.н., зав. группы детской гемоцитологии клинко-диагностической лаборатории централизованного клинко-лабораторного отдела НИИ КО ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»;

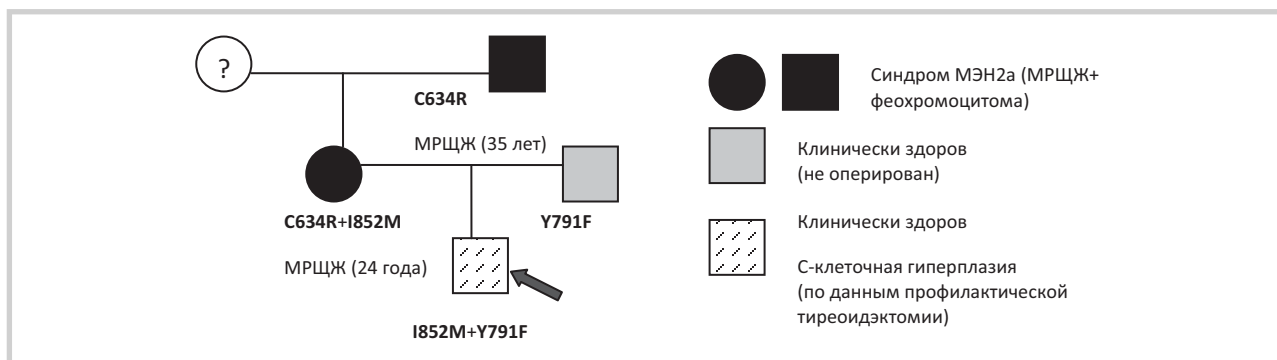
Серебрякова Ирина Николаевна — к.м.н., врач клин. лаб. диагностики группы детской гемоцитологии клинко-диагностической лаборатории централизованного клинко-лабораторного отдела НИИ КО ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»;

Михайлова Светлана Николаевна — зав. поликлиническим отд. НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»;

Калинченко Наталья Юрьевна — к.м.н., ст.н.с. ФГБУ «Эндокринологический научный центр», врач детский эндокринолог НИИ ДОГ ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»;

Казубская Татьяна Павловна — ст.н.с., д.м.н. ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»;

Амосенко Фаина Аркадьевна — вед.н.с., к.б.н. ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Минздрава России



Родословная семьи с тремя герминальными мутациями в гене *RET*.

МРЩЖ — медулярный рак щитовидной железы; ФХ — феохромоцитома; СКГ — С-клеточная гиперплазия.

мл, данные УЗИ шеи, брюшной полости и забрюшинного пространства — без патологии).

Обследование матери (с мутациями C634R+I852M) в возрасте 28 лет не выявило признаков рецидива МРЩЖ (КТ 5,2 пг/мл), что указывает на своевременность проведенного хирургического лечения (в 24 года). При обследовании деда по материнской линии (мутация C634R) в 49 лет выявлены признаки персистенции МРЩЖ (КТ 180,4 пг/мл), что свидетельствует о запоздалом лечении и его неадекватности.

Обсуждение

Герминальные мутации в гене *RET*, ответственные за развитие наследуемых форм МРЩЖ, встречаются у 20–25% больных МРЩЖ [1]. Крайне редко у пациента обнаруживают одновременно две и более мутации [6, 8–13]. У членов описанной семьи выявлено три мутации. Две из них (C634R и I852M) по материнской и одна (Y791F) — по отцовской линии.

К счастью, ребенок не унаследовал от матери наиболее патогенную мутацию C634R, ответственную за развитие синдрома МЭН2А с ранней манифестацией МРЩЖ, ранним метастазированием МРЩЖ и высокой пенетрантностью феохромоцитомы.

Мутация Y791F в экзоне 13 гена *RET* относится к типу АТА-А, которая приводит к наименее агрессивному МРЩЖ с низкой пенетрантностью, и в редких случаях — к синдрому МЭН 2А [4,7]. Хотя многие исследователи считают, что замену Y791F следует рассматривать как полиморфизм [14, 15], в последних рекомендациях NCCN, АТА, Американской ассоциации эндокринологов, а также Российской ассоциации эндокринологов (2015) роль Y791F не пересмотрена, и данную замену относят к мутации уровня АТА-А (АТА-MOD по классификации АТА, 2015), при которой рекомендовано проводить профилактическую тиреоидэктомию до 5 лет.

Мутация I852M в рекомендациях АТА, а, следовательно, и всех ссылающихся на нее региональных рекомендациях, в том числе Российских, не упоминается. Впервые она была выявлена в 2001 г. у 20-летней больной МРЩЖ [16]. Однако, учитывая отсутствие МРЩЖ у ее 65-летней матери — носительницы аналогичной мутации, авторы предположили отсутствие связи данной мутации с синдромом МЭН 2 или очень низкую пенетрантность МРЩЖ [16]. Позднее было рекомендовано отнести вариант I852M к мутации, соответствующей уровню АТА-А и проводить профилактическую тиреоидэктомию до 10-летнего возраста с возможным увеличением этого срока, исходя из результатов определения уровня ТКТ и УЗИ шеи [17].

Встречаемость двух мутаций в гене *RET* довольно редка. Большая часть из них локализуется в одном аллеле, часть — в разных (см. таблицу). Вторая мутация может быть получена от второго родителя (разные *RET* мутации у членов одной семьи) или возникать *de novo*. Немногочисленные сообщения о двойных мутациях противоречивы в отношении потенцирующего влияния второй мутации на клинические проявления, в том числе на возраст манифестации наследственного МРЩЖ и синдрома МЭН2А [8, 9, 11–13]. В ряде работ [6, 9, 13, 18–23] сообщается о более агрессивном течении МРЩЖ, более высокой пенетрантности феохромоцитомы, появлении ганглионейроматоза, характерного для синдрома МЭН2Б, эктопической продукции АКТГ опухолью (МРЩЖ или феохромоцитомой) у больных с множественными *RET* мутациями. Поэтому, хотя в данном случае роль каждой мутации в отдельности позволяла придерживаться тактики активного наблюдения, наличие одновременно двух мутаций послужило аргументом в пользу профилактической тиреоидэктомии. При гистологическом исследовании удаленной щитовидной железы выявлены множественные фокусы С-клеточной гиперплазии, что свидетельствует о высокой вероятности развития МРЩЖ, причем в более молодом возрасте.

Множественные мутации гена *RET* у больных медулярным раком щитовидной железы/синдромом МЭН2

Мутация <i>RET</i>	Экзон	Уровень риска МРЩЖ (АТА)	Фенотип	Источник
C618Y+R844Q	10/14	В/А*	АКТГ-секретирующий МРЩЖ	[22]
C620F+Y791F <i>cis</i>	10/13	В/А	МЭН 2А	[24]
D631Y+S819I+ E843D	11/14	В/А/?	МЭН 2А	[25]
E632V+L633R+ del 634-636 <i>cis</i>	11	?	МЭН 2А	[26]
C634W+R635G	11	С/?	МЭН 2А	[27]
C634R+A640G <i>cis</i>		С/?	МЭН 2А	[11]
C634R+A640G+ M700L	11	С/?	МЭН 2А	[8]
C634S+A641S <i>cis</i>	11	С/?	МЭН 2А	[28]
C634R+V648I <i>trans</i>	11	С/?	МЭН 2А, АКТГ- секретирующая феохромоцитома	[23]
C634W+S649L <i>trans</i>	11	С/А	МЭН 2А	[29]
C634Y+Y791F <i>cis</i>	11/13	С/А	МЭН 2А	[14,15,30]
C634Y+V292M/ R67H/R982C <i>trans</i>	11/5/2/ 18	С/?	МЭН 2А	[18]
V804L+V648I	14/11	А/?	МЭН 2А	[6]
V804L+ S649L <i>cis</i>	14/11	А/А	МРЩЖ	[29]
V804M+V778I <i>cis</i>	14/13	В**	МРЩЖ+утолщение нервов роговицы	[31]
V804M+Q781R <i>cis</i>	14	А/?	МРЩЖ+ нейролеммомы губ и языка	[21]
V804M+E805K <i>cis</i>	14	Д**	МЭН 2Б	[9]
V804M+Y806C <i>cis</i>	14	Д**	МЭН 2Б	[20,32]
V804M+R844L <i>cis</i>	14	А/А	МРЩЖ	[33]
V804M+S904C <i>cis</i>	14/15	Д**	МРЩЖ+ нейролеммомы губ и языка	[19]
V804M гомозигот	14	А/А	МРЩЖ	[34]
V804L гомозигот	14	А/А	МЭН 2А	[34]
M918T+ Y791F	16	Д/А	МЭН 2Б	[24]

Примечание.* Здесь и далее через дробь указывается уровень риска МРЩЖ (по классификации АТА) для каждой отдельно взятой мутации; ** — риск МРЩЖ для двух мутаций одновременно (по классификации АТА); ? — риск развития МРЩЖ для второй (или третьей) мутации не определен.

Заключение

При обследовании больных МРЩЖ на предмет наличия герминальной *RET* мутации необходимо иметь в виду возможность нескольких мутаций, локализующихся в разных экзонах, наследуемых как от одного, так и от обоих родителей, а также возникающих *de novo*. С развитием полноэкзомного секвенирования частота выявления случаев с множе-

ственными мутациями, вероятно, будет возрастать. Наличие нескольких мутаций может изменять клиническое течение МРЩЖ.

Финансирование работы. Работа проведена при финансовой поддержке ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина.

Конфликт интересов отсутствует. Медицинские данные пациентов публикуются с их письменного согласия.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Marsh DJ, Mulligan LM, Eng C. RET proto-oncogene mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and medullary thyroid carcinoma. *Horm Res.* 1997;47(4-6):168-178.
- 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(6428):458-460.
doi: 10.1038/363458a0
- Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5658-5671.
doi: 10.1210/jcem.86.12.8070
- Kloos RT, Eng C, Evans DB, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid.* 2009;19(6):565-612.
doi: 10.1089/thy.2008.0403
- 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. *Jama.* 1996;276(19):1575-1579.
- Verrienti A, Carbone A, Bellitti P, et al. A novel double mutation VAL648ILE and VAL804LEU of RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2. *Endocr Pract.* 2015.
doi: 10.4158/ep15838.or
- Wells SA, Jr., Asa SL, Dralle H, et al. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2015;25(6):567-610.
doi: 10.1089/thy.2014.0335
- Conzo G, Circelli L, Pasquali D, et al. Lessons to be learned from the clinical management of a MEN 2A patient bearing a novel

- 634/640/700 mutation of the RET proto-oncogene. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(6):934-936.
doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.04412.x
9. Cranston AN, Carniti C, Oakhill K, et al. RET is constitutively activated by novel tandem mutations that alter the active site resulting in multiple endocrine neoplasia type 2B. *Cancer Res*. 2006;66(20):10179-10187.
doi: 10.1158/0008-5472.can-06-0884
10. Iwashita T, Murakami H, Kurokawa K, et al. A two-hit model for development of multiple endocrine neoplasia type 2B by RET mutations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;268(3):804-808.
doi: 10.1006/bbrc.2000.2227
11. Tessitore A, Sinisi AA, Pasquali D, et al. A novel case of multiple endocrine neoplasia type 2A associated with two de novo mutations of the RET protooncogene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3522-3527.
doi: 10.1210/jcem.84.10.6056
12. Toledo RA, Wagner SM, Coutinho FL, et al. High penetrance of pheochromocytoma associated with the novel C634Y/Y791F double germline mutation in the RET protooncogene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(3):1318-1327.
doi: 10.1210/jc.2009-1355
13. Valente FO, Dias da Silva MR, Camacho CP, et al. Comprehensive analysis of RET gene should be performed in patients with multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2) syndrome and no apparent genotype-phenotype correlation: an appraisal of p.Y791F and p.C634Y RET mutations in five unrelated Brazilian families. *J Endocrinol Invest*. 2013;36(11):975-981.
doi: 10.3275/8997
14. Toledo RA, Hatakana R, Lourenco DMJr, et al. Comprehensive assessment of the disputed RET Y791F variant shows no association with medullary thyroid carcinoma susceptibility. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(1):65-76.
doi: 10.1530/erc-14-0491
15. Erlic Z, Hoffmann MM, Sullivan M, et al. Pathogenicity of DNA variants and double mutations in multiple endocrine neoplasia type 2 and von Hippel-Lindau syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(1):308-313.
doi: 10.1210/jc.2009-1728
16. Demeester R, Parma J, Cochaux P, et al. A rare variant, I852M, of the RET proto-oncogene in a patient with medullary thyroid carcinoma at age 20 years. *Hum Mutat*. 2001;17(4):354.
doi: 10.1002/humu.42
17. Machens A, Spitschak A, Lorenz K, et al. Germline RET sequence variation I852M and occult medullary thyroid cancer: harmless polymorphism or causative mutation? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75(6):801-805.
doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04158.x
18. Qi XP, Chen XL, Ma JM, et al. RET proto-oncogene genetic screening of families with multiple endocrine neoplasia type 2 optimizes diagnostic and clinical management in China. *Thyroid*. 2012;22(12):1257-1265.
doi: 10.1089/thy.2012.0134
19. Menko FH, van der Luijt RB, de Valk IA, et al. Atypical MEN type 2B associated with two germline RET mutations on the same allele not involving codon 918. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):393-397.
doi: 10.1210/jcem.87.1.8136
20. Miyauchi A, Futami H, Hai N, et al. Two germline missense mutations at codons 804 and 806 of the RET proto-oncogene in the same allele in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *Jpn J Cancer Res*. 1999;90(1):1-5.
21. Nakao KT, Usui T, Ikeda M, et al. Novel tandem germline RET proto-oncogene mutations in a patient with multiple endocrine neoplasia type 2B: report of a case and a literature review of tandem RET mutations with in silico analysis. *Head Neck*. 2013;35(12):E363-E368.
doi: 10.1002/hed.23241
22. Ares J, Diaz-Naya L, Martin-Nieto A, Perterra J. MEN 2A with double mutation in RET gene: Ectopic ACTH production in medullary thyroid carcinoma. *Med Clin (Barc)*. 2015.
doi: 10.1016/j.medcli.2015.11.004
23. Nunes AB, Ezabella MC, Pereira AC, et al. A novel Val648Ile substitution in RET protooncogene observed in a Cys634Arg multiple endocrine neoplasia type 2A kindred presenting with an adrenocorticotropin-producing pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(12):5658-5661.
doi: 10.1210/jc.2002-020345
24. Dvorakova S, Vaclavikova E, Ryska A, et al. Double germline mutations in the RET Proto-oncogene in MEN 2A and MEN 2B kindreds. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2006;114(4):192-196.
doi: 10.1055/s-2006-924071
25. Koch CA, Huang SC, Vortmeyer AO, et al. A patient with MEN 2 and multiple mutations of RET in the germline. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108(8):493.
26. Severskaia NV, Saenko VA, Il'in AA, et al. RET and GFRA1 germline polymorphisms in medullary thyroid cancer patients. *Mol Biol (Mosk)*. 2006;40(3):425-435.
27. Lips CJ, Landsvater RM, Hoppener JW, et al. Clinical screening as compared with DNA analysis in families with multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med*. 1994;331(13):828-835.
doi: 10.1056/nejm199409293311302
28. Poturnajova M, Altanerova V, Kostalova L, et al. Novel germline mutation in the transmembrane region of RET gene close to Cys634Ser mutation associated with MEN 2A syndrome. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(4):287-295.
doi: 10.1007/s00109-004-0604-6
29. Colombo-Benkmann M, Li Z, Riemann B, et al. Characterization of the RET protooncogene transmembrane domain mutation S649L associated with nonaggressive medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2008;158(6):811-816.
doi: 10.1530/eje-07-0817
30. Cerutti JM, Maciel RM. An unusual genotype-phenotype correlation in MEN 2 patients: should screening for RET double germline mutations be performed to avoid misleading diagnosis and treatment? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(4):591-592.
doi: 10.1111/cen.12155
31. Kasprzak L, Nolet S, Gaboury L, et al. Familial medullary thyroid carcinoma and prominent corneal nerves associated with the germline V804M and V778I mutations on the same allele of RET. *J Med Genet*. 2001;38(11):784-787.
PMC1734769
32. Kihara M, Miyauchi A, Yoshida H, et al. Tandem germline RET mutations in a family pathogenetic for multiple endocrine neoplasia 2B, confirmed by a natural experiment. *Eur Thyroid J*. 2014;3(4):272-277.
doi: 10.1159/000369134
33. Bartsch DK, Hasse C, Schug C, et al. A RET double mutation in the germline of a kindred with FMTC. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108(2):128-132.
doi: 10.1055/s-2000-5806
34. Lesueur F, Cebrian A, Cranston A, et al. Germline homozygous mutations at codon 804 in the RET protooncogene in medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia type 2A patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(6):3454-3457.
doi: 10.1210/jc.2004-1622