

بررسی جهش R434X ژن Dual oxidase 2 (DUOX2) در بیماران مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید دائمی و گذرا

امید خوشنود^۱، محمد حسن تاج‌الدینی^۲، دکتر مهین هاشمی‌پور^۳، دکتر منصور صالحی^۴، دکتر آوات فیضی^۵، دکتر شقایق حق‌جوی جوانمرد^۶، دکتر رویا کلیشادی^۳، دکتر سیلوا هوسپیان^۷، دکتر مسعود امینی^۸

چکیده

مقدمه: با توجه به اهمیت بالای کم کاری مادرزادی تیروئید در جامعه‌ی ما و نقش اساسی ژنتیک در ایجاد این اختلالات و وجود ژن‌های متعدد مؤثر در بروز کم کاری مادرزادی گذرای تیروئید با اتیولوژی دیس‌هورمونوزن، بر آن شدیم یکی از جهش‌های مهم ژن پر اهمیت DUOX2 (Dual oxidase 2) را مورد بررسی قرار دهیم. وجود جهش R434X در این ژن به دلیل اثرات فنوتیپی بارزی که در بیماران مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید دارد بسیار با اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی این جهش در افراد مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید در شهر اصفهان بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، کودکان مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید با اتیولوژی دیس‌هورمونوزن طی طرح غربالگری انتخاب شدند و نمونه‌ی خون وریدی آن‌ها به منظور بررسی جهش R434X ژن DUOX2 با استفاده از تکنیک Realtime HRM PCR با پرایمرهای اختصاصی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه به ترتیب ۲۵ و ۳۳ کودک مبتلا به کم کاری مادرزادی گذرا و دائمی تیروئید با اتیولوژی دیس‌هورمونوزن و ۳۰ کودک به عنوان گروه شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند. در بررسی مولکولی بیماران از لحاظ دارا بودن جهش R434X موردی از جهش گزارش نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش به نظر می‌رسد مطالعات دیگری با استفاده از روش‌های بررسی ژنی در حجم بالاتر و به منظور شناسایی جهش‌های بومی این ژن و نیز بررسی جهش‌های سایر ژن‌های دخیل در اتیولوژی کم کاری مادرزادی گذرا و دیس‌هورمونوزن تیروئید شامل ژن‌های کانال غشایی سدیم یو، تیروگلوبولین و پندرین ضروری باشد، تا بتوان بدین طریق به اساس ژنتیکی این بیماری شایع در منطقه پی برد.

واژگان کلیدی: کم کاری مادرزادی تیروئید، ژن Dual oxidase 2 (DUOX2)، دائمی، گذرا

مقدمه

برابر ۱ در ۳۰۰۰ تا ۱ در ۴۰۰۰ تولد دارد (۱). عقب

ماندگی ذهنی حاصل از این بیماری به دلیل نقش

محوری هورمون تیروئید در رشد و نمو مغز می‌باشد

و فقط زمانی قابل پیشگیری است که تشخیص بیماری

کم کاری مادرزادی تیروئید یکی از اختلالات

متابولیک و آندوکراین شایع و از علل قابل پیشگیری

عقب ماندگی ذهنی می‌باشد که به طور کلی شیوعی

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

^۱ دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ استاد، مرکز تحقیقات رشد و نمو کودکان و گروه کودکان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۴ دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۵ استادیار، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۶ دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۷ پزشک عمومی و پژوهشگر، مرکز تحقیقات رشد و نمو کودکان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۸ استاد، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: tajaddini@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤؤل: محمد حسن تاج‌الدینی

در همان روزهای اول زندگی داده شود و نوزاد تحت درمان جایگزین با هورمون تیروئید قرار گیرد (۱).

کم کاری مادرزادی تیروئید به طور کلی به دو دسته دائمی و گذرا تقسیم می‌شود. کم کاری مادرزادی تیروئید دائمی منتج از عوامل اولیه، ثانویه و جانبی است (۲). عوامل اولیه شامل نقص در تولید هورمون‌های تیروئید (دیس‌هورمونوزن) یا نقص در تکامل غده‌ی تیروئید (دیسژنزی) می‌باشد (۳-۴). دیسژنزی به سه دسته‌ی اصلی اکتوپی، آتریویز و هیپوپلازی تقسیم می‌شود (۴-۶). ۸۵ درصد از موارد کم کاری مادرزادی تیروئید دائمی به علت دیسژنزی و ۱۰ تا ۱۵ این موارد به علت دیس‌هورمونوزن رخ می‌دهد (۴-۶). بیشتر موارد دیسژنزی تک گیر و بیشتر موارد دیس‌هورمونوزن به صورت اتوزومی مغلوب به ارث می‌رسند (۴-۶). عوامل ثانویه نتیجه‌ای از نقص در غده‌ی هیپوفیز، نقص در تولید هورمون محرک تیروئید (Thyroid stimulating hormone یا TSH) و یا نقص در تولید هورمون آزادکننده‌ی تیروتروپین (Thyrotropin-releasing hormone یا TRH) و در نهایت عوامل جانبی شامل اختلال در عبور هورمون‌های تیروئید، متابولیسم یا مقاومت به عملکرد هورمون‌های تیروئیدی هستند (۴-۶).

بر اساس مطالعات ژنتیکی انجام شده، تاکنون جهش‌های غیر فعال‌کننده‌ی متعددی در ژن‌های کدکننده‌ی فاکتورهای رونویسی مختلف شامل TTF1 (Thyroid transcription factor)، TTF2، NKX2.1، NKX2.5 و PAX8 و نیز TSH و گیرنده‌ی آن که گاه در ارگانوژن و یا مهاجرت سلول‌های تیروئید نقش کلیدی دارند، در کم کاری مادرزادی تیروئید با اتیلوژی دیسژنزی تیروئید گزارش شده‌اند. از طرفی

دیگر، جهش در ژن‌های مرتبط با مسیر سنتز هورمون‌های تیروئید نظیر انتقال‌دهنده‌ی ید (NIS یا Sodium iodide symporter)، تیروگلوبولین (TG یا Thyroglobulin)، تیروئید پراکسیداز (TPO یا Thyroid peroxidase)، تیروئید پراکسیداز ۲ (Dual oxidase 2 یا DUOX2) و Pendrin و Pendred syndrome (یا PDS) موجب بروز طیف متفاوتی از کم کاری مادرزادی تیروئید دائمی با اتیلوژی دیس‌هورمونوزن همراه یا بدون گواتر می‌گردد (۷-۱۴).

ژن Dual Oxidase 2 (GenBank Accession no. NT_010194) که تحت عنوان ژن DUOX2 نیز شناخته شده است در موقعیت کروموزومی 15q15.3، ناحیه‌ای به طول ۲۱/۵ کیلوالتون را پوشش می‌دهد (۱۵) که شامل ۳۳ اگزون است و پروتئینی به طول ۱۵۵۱ اسید آمینه را کد می‌کند. این ژن به عنوان سیستم تولیدکننده‌ی H_2O_2 در طی روند تولید هورمون تیروئید شناخته شده است (۱۶-۱۷). بر اساس مطالعات انجام شده در این زمینه نقص در سیستم تولیدکننده‌ی H_2O_2 باعث بروز کم کاری مادرزادی تیروئید می‌شود (۱۸-۱۹). بدین ترتیب نقص در ژن DUOX2 باعث عدم تولید H_2O_2 می‌شود. بنابراین این پروتئین و فعالیت ژن مربوط برای سنتز هورمون تیروئید ضروری می‌باشد، چرا که تیروئید پراکسیداز (TPO) برای فعالیت خود به عنوان کاتالیزور در سنتز هورمون به H_2O_2 نیاز دارد.

مطالعات انجام شده در این زمینه گویای آن است که نقص یا جهش‌های هتروژن ژن DUOX2 باعث نقص نسبی در ارگانوفیکاسیون ید می‌شود و منجر به بروز نوع خفیف کم کاری مادرزادی گذرای تیروئید می‌گردد. در حالی که جهش‌های هورمون ژن DUOX2 باعث نقص

به کم کاری مادرزادی تیروئید که تحت درمان و پیگیری در مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم اصفهان بودند و پس از طی دوران سه ساله‌ی ابتدایی درمان تحت بررسی قرار گرفتند و تشخیص کم کاری مادرزادی گذرا یا دائمی تیروئید با اتیولوژی دیس‌هورمونوزن برای آن‌ها گذاشته شد (۲۳)، مورد مطالعه قرار گرفتند. یک گروه از کودکان با نتایج غربالگری طبیعی نیز به عنوان گروه شاهد فراخوان شدند.

در طرح غربالگری کم کاری مادرزادی تیروئید پس از سه سال درمان و پیگیری، توصیه می‌شود درمان کودک مبتلا به مدت ۶-۴ هفته قطع گردد و سپس آزمایشات TSH، T4 (Thyroxine) و سونوگرافی و یا اسکن تیروئید درخواست شود. بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی و بررسی‌های رادیولوژیک موارد هیپوتیروئیدی دائمی و گذرا مشخص می‌گردند. در صورت آزمایش غیر طبیعی و سونوگرافی یا اسکن طبیعی تشخیص دیس‌هورمونوزن و در صورت آزمایش طبیعی و سونوگرافی یا اسکن طبیعی تشخیص کم کاری مادرزادی تیروئید گذرا داده می‌شود.

این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق و معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأیید و تصویب گردید. پس از انتخاب افراد مورد مطالعه و فراخوان آن‌ها به مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، والدین کودکان مورد مطالعه در مورد مراحل مطالعه و اهداف آن و اهمیت طرح توجیه شدند، رضایت کتبی جهت مشارکت در طرح از آن‌ها کسب شد.

در طی این طرح کودکان مورد مطالعه توسط پزشک عمومی همکار طرح معاینه شدند و پس از گرفتن شرح حال دقیق و تکمیل پرسشنامه‌ای شامل

کامل در ارگانیکاسیون ید می‌گردد و منجر به بروز نوع شدید و دائمی کم کاری مادرزادی تیروئید می‌شود (۲۰). با این وجود یافته‌های برخی مطالعات که به تازگی انجام شده است وجود جهش‌های هوموزن ژن DUOX2 را در کم کاری مادرزادی گذرای تیروئید نیز گزارش نموده‌اند (۲۱). بر اساس این مطالعات این جهش‌ها در موارد خانوادگی نیز گزارش شده‌اند (۲۰).

جهش R434X یکی از جهش‌هایی است که همراه با نقص در آلی‌سازی ید می‌باشد. این جهش Nonsense است که باعث تولید یک پروتئین ناقص قبل از اولین دامین ترانس‌ممبران (Transmembrane domain) می‌شود و به لحاظ فنوتیپی مشابه نقص تیروپروکسیداز می‌باشد (۲۰).

با در نظر گرفتن شیوع بالای کم کاری مادرزادی تیروئید در جامعه، متفاوت بودن اتیولوژی بیماری در مقایسه با سایر جوامع و نیز درصد بالای ازدواج‌های فامیلی در جامعه‌ی ما (۲۳-۲۲) و نیز با توجه به نقش ژن DUOX2 در بروز کم کاری مادرزادی گذرای تیروئید و کم کاری مادرزادی دائمی تیروئید با اتیولوژی دیس‌هورمونوزن و در ادامه‌ی مطالعه‌ی پیشین مجری این طرح (۲۴)، هدف از این مطالعه، بررسی جهش R434X ژن DUOX2 در بیماران مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید دائمی با اتیولوژی دیس‌هورمونوزن و گذرا، در شهر اصفهان بود تا شاید با تعیین اساس مولکولی این بیماری دستیابی به پاتوفیزیولوژی بیماری هموارتر گردد.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، بر اساس نتایج مربوط به غربالگری نوزادان از سال ۱۳۸۱ تاکنون، بیماران مبتلا

تعیین شد و جهش R434X بررسی شد. اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های آماری χ^2 ، Phi، Lambda، Cramer و ضریب همبستگی Pearson مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

در این مطالعه به ترتیب ۲۵ و ۳۳ کودک مبتلا به کم کاری مادرزادی گذرا و دائمی تیروئید با اتیولوژی دیس‌هورمونوزنز و ۳۰ کودک به عنوان گروه شاهد با استفاده از روش Real time PCR-HRM مورد مطالعه قرار گرفتند. اطلاعات دموگرافیک افراد مورد مطالعه در سه گروه در جدول ۱ ارائه گردیده است. در بررسی مولکولی بیماران از لحاظ دارا بودن جهش R434X هیچ موردی از جهش یافت نشد.

اطلاعات دموگرافیک و نیز اطلاعات مربوط به یافته‌های غربالگری شامل مقادیر TSH و T4 اولیه (غربالگری) و مقادیر TSH و T4 پس از قطع درمان در سه سالگی تکمیل شد. سپس از کودکان مورد بررسی نمونه‌ی خون وریدی کویبتال (۴ سی‌سی نمونه‌ی خون در لوله‌ی EDTA و ۴ سی‌سی نمونه‌ی خون در لوله‌ی هپارین) جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه ژنتیک ارسال گردید.

در آزمایشگاه ژنتیک برای بررسی مولکولی، DNA نمونه‌های دریافت شده با استفاده از کیت QIAmp blood mini kit (Qiagen germany) DNA استخراج شد. سپس بانک DNA بیماران تهیه گردید و با استفاده از تکنیک Real time PCR-HRM (Real-time Polymerase chain reaction-High-resolution melt) با پرایمرهای اختصاصی توالی‌ها

جدول ۱. اطلاعات دموگرافیک و شاخص‌های تیروئید در کودکان مبتلا به کم کاری مادرزادی گذرا و دائمی تیروئید با اتیولوژی دیس‌هورمونوزنز و گروه شاهد

کودکان سالم	کم کاری مادرزادی دائمی	کم کاری مادرزادی گذرا	
۶۹/۳ ± ۲۷/۲	۶۴/۶ ± ۲۳/۷	۶۸/۲ ± ۲۵/۵	سن (ماه)*
۱۹/۱۱	۱۵/۱۸	۱۸/۷	جنس (پسر/دختر)**
۳۹	۶۲	۶۹	سابقه‌ی ازدواج فامیلی***
			TSH (میلی‌واحد در لیتر)*
۴/۵ ± ۲/۷	۴۷/۳ ± ۴۶/۱	۲۵/۵ ± ۱۹/۷	اولیه
	۳۶/۵ ± ۳۰/۷	۳/۹ ± ۲/۰	پس از قطع درمان
			T4 (میکروگرم در دسی‌لیتر)*
۱۱/۶ ± ۳/۹	۶/۲ ± ۳/۵	۵/۷ ± ۳/۵	اولیه
	۷/۱ ± ۲/۹	۸/۱ ± ۱/۹	پس از قطع درمان

TSH: Thyroid stimulating hormone
T4: Thyroxine

*: انحراف معیار ± میانگین

** : تعداد/تعداد

*** : درصد

بحث

در این مطالعه، همگام با سایر مطالعات انجام شده در طی غربالگری کم کاری مادرزاد تیروئید در اصفهان و به منظور بررسی علل ژنتیکی این بیماری شایع در اصفهان جهش R434X ژن DUOX2 در بیماران مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید دایمی با اتیولوژی دیس هومونوزنز و گذرا بررسی شد. بر اساس نتایج حاصل در هیچ کدام از بیماران جهش ژن مذکور مشاهده نگردید.

ژن DUOX2 به عنوان سیستم تولیدکننده H_2O_2 طی روند تولید هورمون تیروئید شناخته شده است (۱۷-۱۶). بر اساس مطالعات انجام شده در این زمینه، نقص در سیستم تولیدکننده H_2O_2 باعث عدم تولید آن و نقص در آلی سازی ید و در نهایت اختلال در سنتز هورمون تیروئید و بروز کم کاری مادرزادی تیروئید می گردد.

مطالعات انجام شده در کودکان مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید و نیز بر روی حیوانات، نقش اساسی ژن DUOX2 را در سنتز هورمون تیروئید نشان داده اند (۲۵). حاصل این مطالعات که در طی غربالگری کم کاری مادرزادی تیروئید در نقاط مختلف جهان انجام شده است، شناسایی ۲۳ جهش در ژن مذکور می باشد. این جهش ها شامل ۱۱ موتاسیون شبه پراکسیدازی خارج سلولی (Extracellular peroxidase-like domain)، ۱۱ جهش در حلقه ی اول بلند (First long intracellular loop) و یک جهش در حلقه ی دوم داخل سلولی می باشد (۲۶). مطالعات موجود در اصفهان از ابتدای طرح غربالگری کم کاری مادرزادی تیروئید گویای شیوع بالای کم کاری مادرزادی تیروئید دایمی با اتیولوژی دیس هومونوزنز و کم کاری مادرزادی گذرای تیروئید

بوده است (۲۲). با توجه به این که در افراد دارای نقص در سیستم تولیدکننده H_2O_2 به دنبال جهش های ژن DUOX2 و به دلیل نقش محوری H_2O_2 ، هورمون های تیروئید حتی در صورت عدم کمبود ید سنتز نمی شوند. درصد بالایی از بیماران مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید در اصفهان مبتلا به دیس هومونوزنز غده هستند. در این مطالعه سعی شد یکی دیگر از جهش های ژن مذکور در بیماران ساکن اصفهان بررسی شود. در مطالعه ی پیشین ما در گروه مورد مطالعه ی ما نقش سه جهش Q36H، D506N و R376W بررسی گردید و هیچ جهشی گزارش نشد (۲۴). در این مطالعه نیز در ادامه ی مطالعه ی مذکور جهش R434X ژن DUOX2 مورد مطالعه قرار گرفت. این جهش یکی از جهش های شناخته شده ی هموزیگوت خارج سلولی می باشد.

در بررسی متون، اولین جهش ژن مذکور توسط Moreno و همکاران در آمستردام گزارش شده است (۲۰) و پس از آن جهش مذکور در بیماران مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید بررسی نشده است و یا هیچ موردی گزارش نشده است. در مطالعه ی Moreno و همکاران بر روی ۴ بیمار مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید، یک نفر مبتلا به کم کاری مادرزادی دایمی و فاقد توانایی آلی سازی ید به طور کامل بود. مطالعه ی ژنتیکی صورت گرفته روی این بیمار وجود جهش هموزیگوت R434X را ثابت نمود (۲۰). جهش R434X یک جهش Nonsense است که باعث تولید یک پروتئین ناقص قبل از اولین دمین ترانس ممبران می شود و همراه با نقص در آلی سازی ید می باشد.

در این مطالعه هیچ موردی از جهش های فوق در دو گروه از کودکان مبتلا به کم کاری مادرزادی گذرا

مطالعات احتمال دارد که جهش در ناحیه‌ی ایترونی و تنظیمی ژن مذکور وجود داشته باشد (۲۸) که نیازمند بررسی است.

با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش به نظر می‌رسد، بهتر است مطالعات دیگری با استفاده از روش‌های بررسی ژنی در حجم نمونه‌ی بالاتر و به منظور شناسایی جهش‌های بومی این ژن انجام شود.

علاوه بر این، بررسی جهش‌های سایر ژن‌های دخیل در ایتولوژی کم کاری مادرزادی گذرا و دیس‌هورمونوزن تیروئید شامل ژن‌های کانال غشایی سدیم ید، تیروگلوبولین و پندریل ضروری می‌باشد تا بتوان بدین طریق به اساس ژنتیکی این بیماری شایع در منطقه پی برد.

و دایمی تیروئید با ایتولوژی دیس‌هورمونوزن گزارش نگردید. علت این یافته‌ها را می‌توان به چند دلیل توضیح داد. به نظر می‌رسد یک دلیل، تفاوت‌های نژادی افراد مورد مطالعه باشد که در مطالعات پیشین نیز به آن اشاره شده است (۲۷). از عوامل دیگر می‌توان به کوچک بودن جامعه‌ی مورد مطالعه اشاره کرد. به علاوه احتمال دارد که جهش در سایر نقاط ژن و دیگر ژن‌های دخیل در کم کاری مادرزادی گذرا و دیس‌هورمونوزن تیروئید، در بروز بیماری در جمعیت مورد مطالعه‌ی ما نقش داشته باشند که نیازمند بررسی‌های بیشتری است.

در این تحقیق جهش ژنی در نواحی اگزونی ژن DUOX2 بررسی گردید. در حالی که بر اساس برخی

References

- Klett M. Epidemiology of congenital hypothyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997; 105(Suppl 4): 19-23.
- Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 17.
- Foley TJ. Congenital hypothyroidism. In: Braverman L, Utiger R, editors. *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. 7th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1996. p. 988-94.
- Toublanc JE. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world. *Horm Res* 1992; 38(5-6): 230-5.
- Park SM, Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* 2005; 42(5): 379-89.
- Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, et al. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* 1998; 19(4): 399-401.
- Congdon T, Nguyen LQ, Nogueira CR, Habiby RL, Medeiros-Neto G, Kopp P. A novel mutation (Q40P) in PAX8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(8): 3962-7.
- Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, et al. Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(1): 234-8.
- Meeus L, Gilbert B, Rydlewski C, Parma J, Roussie AL, Abramowicz M, et al. Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(9): 4285-91.
- Pohlentz J, Dumitrescu A, Aumann U, Koch G, Melchior R, Prawitt D, et al. Congenital secondary hypothyroidism caused by exon skipping due to a homozygous donor splice site mutation in the TSHbeta-subunit gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(1): 336-9.
- Borck G, Topaloglu AK, Korsch E, Martine U, Wildhardt G, Onenli-Mungan N, et al. Four new cases of congenital secondary hypothyroidism due to a splice site mutation in the thyrotropin-beta gene: phenotypic variability and founder effect. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(8): 4136-41.
- Abramowicz MJ, Duprez L, Parma J, Vassart G, Heinrichs C. Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland. *J Clin Invest* 1997; 99(12): 3018-24.

13. Tonacchera M, Agretti P, Pinchera A, Rosellini V, Perri A, Collecchi P, et al. Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin (TSH) and absent circulating thyroglobulin: evidence for a new inactivating mutation of the TSH receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(3): 1001-8.
14. Fujiwara H. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻-symporter. *Nat Genet* 1997; 17(1): 122.
15. de Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 2000; 275(30): 23227-33.
16. Niepomniszcze H, Targovnik HM, Gluzman BE, Curutchet P. Abnormal H₂O₂ supply in the thyroid of a patient with goiter and iodine organification defect. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65(2): 344-8.
17. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem* 1999; 274(52): 37265-9.
18. Kusakabe T. Deficient cytochrome b5 reductase activity in nontoxic goiter with iodide organification defect. *Metabolism* 1975; 24(10): 1103-13.
19. Figueiredo MD, Cardoso LC, Ferreira AC, Campos DV, da Cruz DM, Corbo R, et al. Goiter and hypothyroidism in two siblings due to impaired Ca²⁺/NAD(P)H-dependent H₂O₂-generating activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(10): 4843-8.
20. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, et al. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 2002; 347(2): 95-102.
21. Maruo Y, Takahashi H, Soeda I, Nishikura N, Matsui K, Ota Y, et al. Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(11): 4261-7.
22. Hashemipour M, Hovsepian S, Kelishadi R, Iranpour R, Hadian R, Haghighi S, et al. Permanent and transient congenital hypothyroidism in Isfahan-Iran. *J Med Screen* 2009; 16(1): 11-6.
23. Hashemipour M, Amini M, Talaie M, Kelishadi R, Hovespian S, Iranpour R, et al. Parental consanguinity among parents of neonates with congenital hypothyroidism in Isfahan. *East Mediterr Health J* 2007; 13(3): 567-74.
24. Rostampour N, Tajaddini M, Hashemipour M, Salehi M, Feizi A, Haghighi Javanmard Sh. The mutation of dual oxidase 2 (DUOX2) gene among patients with permanent and transient congenital hypothyroidism. *J Isfahan Med Sch* 2011; 29(139): 588-95.
25. Johnson KR, Marden CC, Ward-Bailey P, Gagnon LH, Bronson RT, Donahue LR. Congenital hypothyroidism, dwarfism, and hearing impairment caused by a missense mutation in the mouse dual oxidase 2 gene, Duox2. *Mol Endocrinol* 2007; 21(7): 1593-602.
26. Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis. *Curr Opin Pediatr* 2011; 23(4): 421-8.
27. Tonacchera M, de Marco G, Agretti P, Montanelli L, Di CC, Freitas Ferreira AC, et al. Identification and functional studies of two new dual-oxidase 2 (DUOX2) mutations in a child with congenital hypothyroidism and a eutopic normal-size thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(11): 4309-14.
28. Niu DM, Hwang B, Chu YK, Liao CJ, Wang PL, Lin CY. High prevalence of a novel mutation (2268 insT) of the thyroid peroxidase gene in Taiwanese patients with total iodide organification defect, and evidence for a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(9): 4208-12.

R434X Mutation in Dual Oxidase 2 Gene among Patients with Permanent and Transient Congenital Hypothyroidism

Omid Khoshnoud¹, Mohammad Hassan Tajaddini², Mahin Hashemipour MD³, Mansour Salehi PhD⁴, Awat Feizi PhD⁵, Shaghayegh Haghjooy Javanmard MD, PhD⁶, Roya Kelishadi MD³, Silva Hovsepian MD⁷, Masoud Amini MD⁸

Abstract

Background: The prevalence of congenital hypothyroidism (CH) is high in Isfahan (Iran). Considering the high rate of parental consanguinity and the role of dual oxidase 2 (DUOX2) gene in transient and permanent CH due to thyroid dysmorphogenesis, the aim of this research was to investigate the R434X mutation in DUOX2 gene in patients with transient and permanent CH due to dysmorphogenesis.

Methods: In this descriptive prospective study, patients diagnosed with transient and permanent CH due to dysmorphogenesis (n = 25 and 33, respectively) during CH screening program were selected. Moreover, 30 children were included as the control group. Venous blood samples were obtained to determine the frequency of R434X mutation in DUOX2 gene using real time polymerase chain reaction based on high-resolution melting analysis by specific primers and sequencing method.

Findings: We did not find any case of the mentioned R434X mutation in DUOX2 gene.

Conclusion: Further studies using other methods and on other gene mutations such as pendrin, sodium iodide symporter (NIS) and thyroglobulin are required for more accurate results.

Keywords: Congenital hypothyroidism, Dual oxidase 2 gene, Permanent, Transient

* This paper is derived from a medical doctorate thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

¹ Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

² MSc Student, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy AND Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Professor, Child Growth and Development Research Center AND Department of Pediatrics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁶ Associate Professor, Department of Physiology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁷ Researcher, Child Growth and Development Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁸ Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine AND Endocrine and Metabolism Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mohammad Hassan Tajaddini, Email: tajaddini@pharm.mui.ac.ir