

بررسی ژنتیکی ژن TTF2 در کودکان مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید ناشی از دیس ژنری غده تیروئید

دکتر فروزنده محجوبی^۱، دکتر مهین هاشمی پور^۲، دکتر رامین ایران پور^۳، دکتر مسعود امینی^۴،
دکتر سیلوا هوسپیان^۵

چکیده

مقدمه: فاکتور رونویسی تیروئید ۲ (Thyroid transcription factor 2 یا TTF2) که با نام FOXE1 نیز شناخته می‌شود، یکی از پروتئین‌های کاندیدی است که در نمو غده تیروئید نقش دارد. نقص در این ژن در تعدادی از بیماران مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید ناشی از دیس ژنری غده تیروئید (Thyroid dysgenesis یا TD)، گزارش شده است. هدف از این مطالعه، بررسی موتاسیون‌های ژن مذکور در این بیماران بود.

روش‌ها: در این مطالعه، تمام ناحیه‌ی کدکننده‌ی ژن TTF2 در ۵۰ کودک مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید ارجاع داده شده به مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، با روش تعیین توالی مستقیم مورد مطالعه قرار گرفت. موتاسیون‌ها در TTF2 پس از تکثیر ژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction یا PCR) و به روش تعیین توالی مستقیم بررسی شد. بررسی موتاسیون‌ها برای هر آگرون TTF2 با پرایمرهای مجاور تمام ناحیه‌ی کدکننده انجام گرفت.

یافته‌ها: هیچ موتاسیونی در ژن TTF2 مشاهده نگردید. بررسی‌ها وجود پلی مورفیسمی را در سروتونین 273 (TCC.TCT) در ۷۴ درصد بیماران نشان داد. به علاوه، طول تکرار آلانین در TTF2 در تعداد قابل توجهی از بیماران TD ما ۱۴ عدد بود.

نتیجه‌گیری: این نتایج می‌تواند ارتباط احتمالی طول توالی تکراری پلی آلانین را در TTF2 در ایجاد استعداد ژنتیکی برای TD مطرح نماید.

واژگان کلیدی: کم کاری مادرزادی تیروئید، فاکتور رونویسی تیروئید ۲، دیس ژنری غده تیروئید

مقدمه

می‌شود. 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 در همان روزهای اول زندگی داده شود و نوزاد تحت درمان جایگزین با هورمون تیروئید قرار گیرد (۱-۲).

نتایج حاصل از برنامه‌ی غربالگری نوزادان فراوانی بالای آن را در مراکز تهران (۱/۹۷۴) و اصفهان

کم کاری مادرزادی تیروئید (CH یا Congenital hypothyroidism) از شایع‌ترین اختلالات متابولیک و اندوکرین کودکان می‌باشد که به علت اختلال در تولید هورمون تیروئید یا اختلالات تکاملی غده تیروئید حاصل می‌شود. میزان بروز این بیماری در جوامع مختلف متفاوت است، ولی به طور متوسط ۱ مورد در هر ۳۰۰۰-۴۰۰۰ تولد گزارش

^۱ استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری تهران، تهران، ایران

^۲ استاد، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات رشد و نمو سلامت کودکان، گروه کودکان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ استادیار، فوق تخصص نوزادان، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات رشد و نمو سلامت کودکان، گروه کودکان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۴ استاد، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۵ پزشک عمومی، پژوهشگر، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات رشد و نمو کودکان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: hashemipour@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤؤل: دکتر مهین هاشمی پور

Thyroid follicular cell precursors (TFC یا TFC) است (۱۴). احتمال دارد که TTF2 نقش یک سرکوب‌گر رونویسی اختصاصی پروموتور ژن TG و TPO را در مراحل ابتدایی نمو تیروئید را بر عهده داشته باشد (۱۵-۱۶). نقش این ژن و موتاسیون‌های آن در بروز CH در جوامع مختلف بررسی و نتایج متفاوتی گزارش شده است (۲۰-۱۷).

به طور مسلم شناخت این موتاسیون‌ها در بیماران مبتلا در پیش‌گیری از بیماری و ارتقا برنامه‌ی غربالگری این بیماری به خصوص در جوامع با شیوع بالای بیماری نظیر ایران اهمیت بسیاری دارد. بنابراین با توجه به گزارش‌های مطرح شده در رابطه با نقش موتاسیون این ژن در ایجاد TD در مطالعه‌ی حاضر، بررسی حضور موتاسیون‌ها در ژن TTF2 در بیماران مبتلا به TD ایرانی مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها

۵۰ خانواده‌ی بیماران با تشخیص TD شامل ۴۸ خانواده دارای یک عضو مبتلا و ۲ خانواده دارای ۲ عضو مبتلا در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفتند. این خانواده‌ها در طی اجرای برنامه‌ی غربالگری نوزادان در مرکز غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در سال‌های ۸۴-۱۳۸۰ شناسایی شدند.

نمونه‌های خون از بیماران و اعضای خانواده‌ی آن‌ها در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شد. فرم رضایت‌نامه از والدین و یا قیم بیماران اخذ شد.

DNA ژنومی تمام افراد با استفاده از کیت QIAGEN (QIAamp blood kit) بر اساس دستورالعمل کیت استخراج شد. غلظت نهایی DNAهای اخذ شده ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر تنظیم شد.

در کشور ایران نشان داده است (۳-۴). در ۸۵ درصد موارد، CH ناشی از تغییری در تکامل تیروئید است که دیس ژنزیس تیروئید (TD یا Thyroid dysgenesis)، خوانده می‌شود (۵). این ناهنجاری‌ها شامل آژنزی، همی آژنزی (فقدان کامل غده تیروئید یا Athyrosis و Hemithyroidoea)، بافت تیروئید نابجا (قرارگیری غده تیروئید در ناحیه‌ی Sublingual که تیروئید نابجا یا Thyroid ectopy خوانده می‌شود) و هیپوپلازی (غده تیروئید به شدت کوچک شده که باقی مانده‌ی بافت تیروئید در جایگاه طبیعی آن است) می‌باشد (۶-۵). امروزه کشف شده است که برخی از موارد دیس ژنزی نتیجه‌ی موتاسیون در سه فاکتور رونویسی (TTF1، TTF2 و PAX8) هستند (۷).

فاکتور رونویسی ۲ (TTF2 یا Forkhead box E1) که به نام FOXE1 (Forkhead box E1) نیز شناخته می‌شود، متعلق به خانواده‌ی ژنی Forkhead از فاکتورهای رونویسی هستند که نمو رویانی را تنظیم می‌کنند و نقفشی حیاتی در تکامل تیروئید ایفا می‌کنند (۸-۹). خانواده‌ی ژنی ماریپچ/چنگال سری (Helix/forkhead) با یک موتیف ۱۰۰ اسیدآمینهای متصل‌شونده به نام دومین چنگال سری (Forkhead domain) شناخته می‌شود (۱۰). TTF2 یک ژن فاقد اینترون، حاوی توالی‌های تکراری پلی‌آلانین ۱۱ تا ۱۹ آلانینی و ۲ سیگنال موضعی هسته‌ای (2 putative nuclear localization signals) در مجاورت دومین چنگال سری و ریشه‌ی منحصر به فرد پایانه‌ی C (Unique C-terminal residues) است (۱۳-۱۱، ۹، ۵، ۳). این پروتئین دارای نقش ویژه‌ای در کنترل مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز فولیکولار تیروئید

درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه ۶۸ درجه و ۱ دقیقه ۷۲ درجه و در ادامه یک مرحله‌ی ۱۰ دقیقه‌ای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه Techne thermal cycler (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) انجام گرفت.

برای تعیین توالی مستقیم DNA، محصولات PCR با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) تخلیص شد. زنجیره‌ی پیش‌رو و پس‌روی محصولات توسط MWG Biotech AG, MWG Biotech AG توالی‌یابی شد.

توالی نوکلئوتیدی با شماره‌ی دسترسی NC_000009 در بانک ژن (GenBank accession number) برای FOXE1 جایی بر می‌گردد که A از ATG، کدون متیونین آغازی در جایگاه ۶۶۱ آغاز شود. توالی تکراری پلی‌آلانین شامل ۱۶ تکرار در فاصله‌ی نوکلئوتید ۱۱۹۷-۱۱۵۰ است.

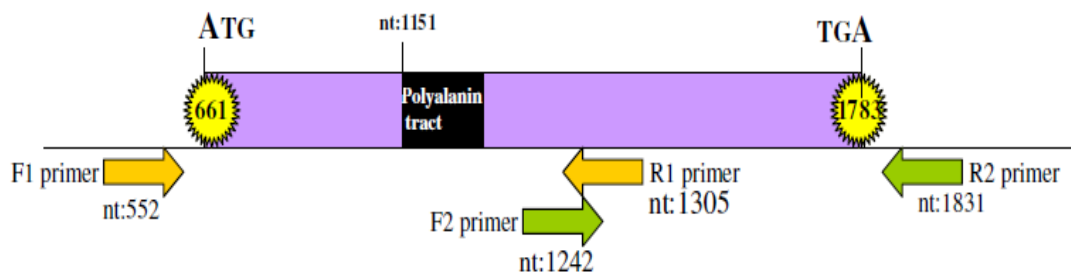
توالی نوکلئوتیدی با استفاده از ابزار BLAST 2 SEQUENCES در آدرس اینترنتی <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>

موتاسیون‌ها در TTF2 پس از تکثیر ژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction یا PCR) و به روش تعیین توالی مستقیم بررسی شد. بررسی موتاسیون‌ها برای هر آگزون TTF2 با پرایمرهای مجاور تمام ناحیه‌ی کدکننده انجام گرفت.

دو جفت پرایمر تولیدکننده‌ی قطعات هم‌پوشان برای تکثیر تمام ناحیه‌ی کدکننده‌ی ژن TTF2 به کار گرفته شد (شکل ۱). این پرایمرها با نرم‌افزار GeneRunner (نسخه‌ی ۳/۰۱) (Copyright © hastings softwar Inc.) مورد تأیید قرار گرفت (۱۸). توالی پرایمرها و طول محصول مورد انتظار در ادامه ذکر شده است.

واکنش‌های PCR برای هر دو قطعه در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۴ میلی‌مول در لیتر از هر پرایمر، ۰/۲ میلی‌مول در لیتر از هر dNTP، ۰/۶۲۵ واحد آنزیم Taq polymerase (Sinagen, Iran)، ۵ میلی‌مول $MgCl_2$ و 1 x PCR buffer (سیناژن، ایران)، ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومی تهیه شد. 1 x Q solution (QIAGEN) برای تسهیل تکثیر نواحی GC rich، نیز اضافه گردید.

واکنش PCR در ۳۰ چرخه شامل ۱ دقیقه ۹۴



شکل ۱. نمایش شماتیک ژن TTF-2. خط نشان‌دهنده‌ی ناحیه‌ی غیر کدکننده و قسمت برجسته نشان‌دهنده‌ی ناحیه‌ی کدکننده است. قسمت برجسته پر رنگ قطعه‌ی پلی‌آلانین است. ناحیه‌ی کدکننده با دو ست پرایمر که قطعات هم‌پوشان را تولید می‌کنند، تکثیر می‌شود.

F1: 5'-ctgagctctccgagaagg-3' and **R1:** 5'-cgcggttagtagactggag-3' for amplifying the first segment with 754bp (nucleotides 552-1305, GenBank accession number NC_000009.11).

F2: 5'-cgccgtctatgcaggctac-3' and **R2:** 5'-gaacgtgtgaacagccgatg-3' for amplifying the last segment with 590bp (nucleotides 1242-1831, GenBank accession number NC_000009.11).

مورد بررسی قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی مورد بررسی قرار گرفت. عنوان توالی استاندارد مدنظر قرار گرفت. GenBank accession number (NC_000009) به

موارد تیروئید نابجا داشتند (۱۱۶/۳-۱۰۹/۶۴) در مقابل ۱۰۸/۱۰-۶۲/۹۲ میلی واحد در لیتر با $P < 0.001$. میانگین T4 در نوزادان دارای تیروئید نابجا و فاقد تیروئید به ترتیب ۶/۳۶-۵/۵۷ و ۵/۰۴-۳/۰۰ میکروگرم در دسی لیتر بود. دو بیمار فاقد تیروئید از ناشنوایی رنج می‌بردند. بیماران به دلیل درمان زودهنگام پس از تولد، از عوارض بالینی ناشی از هیپوتیروئیدیسم شامل تأخیر در رشد و عقب ماندگی ذهنی مصون ماندند.

یافته‌ها

افراد مورد مطالعه شامل ۱۳ بیمار مبتلا به CH دارای تیروئید نابجا و ۳۷ بیمار فاقد تیروئید بودند. یافته‌های بالینی بیماران در جدول ۱ ارائه گردیده است. نوزادان فاقد تیروئید TSH بالاتری در مقایسه با

جدول ۱. یافته‌های بالینی بیماران مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید دارای تیروئید نابجا و آژنزی غده‌ی تیروئید

شماره	سن (روز)	جنس	TSH (میلی واحد در لیتر)	T4 (میکروگرم در دسی لیتر)	سونوگرافی	اسکن تیروئید	علائم بالینی
P1	۷	پسر	۴۰/۹	۳/۲	بدون تیروئید واضح	اکتوپیک	شنوایی طبیعی، اکوکاردیوگرافی طبیعی
P2	۸	پسر	۱۳۶	۱۲/۵	بدون تیروئید واضح	اکتوپیک	شنوایی طبیعی، یرقان نوزادی، بیوست، زبان بزرگ، یرقان،
P3	۵	پسر	۲۲۴	۱/۳	بدون تیروئید واضح	اکتوپیک	هیپوتونی، پوست خشک، فونتانل خلفی بزرگ تر از ۵ میلی متر
P4	-	دختر	۱۰۰	۳/۸	-	آژنزی	-
P5	۷	دختر	۶۵/۵	-	ندارد	اکتوپیک	یرقان فیزیولوژیک طول کشیده
P6	۱۰	دختر	۴۹۲	۰/۶	بدون تیروئید واضح	آژنزی	لتارژی، فتق نافی، یرقان طول کشیده
P7	۱۴	پسر	۸۵	۳/۲	بدون تیروئید واضح	اکتوپیک	شنوایی طبیعی، یرقان
P8	۵	دختر	۹۸/۸	۸/۲	بدون تیروئید واضح	آژنزی	شنوایی طبیعی، لتارژی، پوست سرد
P9	۱۴	پسر	۱۰۸	۳	بدون تیروئید واضح	اکتوپیک	یرقان طول کشیده
P10	۱۱	دختر	۹۸/۸	۱/۶	بدون تیروئید واضح	آژنزی	شنوایی طبیعی، بیوست، یرقان، فونتانل خلفی بزرگ تر از ۵ میلی متر
P11	۶	پسر	۳/۷	-	تیروئید بسیار کوچک	آژنزی	-
P12	۴	پسر	۵۱/۲	۱/۶	بدون تیروئید واضح	آژنزی	شنوایی متوسط دو گوش، شکاف کام
P13	-	دختر	۸۱	-	ندارد	آژنزی	-
P14	۹	دختر	۸۰/۱	۷/۵	بدون تیروئید واضح	آژنزی	فونتانل خلفی بزرگ تر از ۵ میلی متر، شنوایی طبیعی
P15	۷	دختر	۱۲۵	۹/۶	بدون تیروئید واضح	اکتوپیک	-
P16	۴	پسر	۶۴/۳	۳/۲	بدون تیروئید واضح	آژنزی	یرقان فیزیولوژیک طول کشیده شنوایی طبیعی

جدول ۱. یافته‌های بالینی بیماران مبتلا به کم کاری مادرزادی تیروئید دارای تیروئید نابجا و آژنزی غده تیروئید (ادامه)

شماره سن (روز)	جنس	TSH (میلی واحد در لیتر)	T4 (میکروگرم در دسی لیتر)	سونوگرافی	اسکن تیروئید	علائم بالینی
P17 -	دختر	۱۰۳/۵	-	بدون تیروئید واضح	-	-
P18 ۱۳	پسر	۳۴۲	۱/۴	بدون تیروئید واضح	ندارد	شنوایی طبیعی، زردی شدید
P19 ۴	پسر	۴۰۰	۲/۴	بدون تیروئید واضح	آژنزی	شنوایی طبیعی، هیپوتونی، فونتانل خلفی بزرگ تر از ۵ میلی متر
P20 ۱۵	پسر	۲۳۲	۰/۶	بدون تیروئید واضح	آژنزی	شنوایی طبیعی، یرقان، سرفه، خس خس سینه
P21 ۱۷	پسر	۱۹۰	۰/۷	بدون تیروئید واضح	آژنزی	یبوست، لتارژی، هیپوتونی، پوست خشک، گریه‌ی خشن شنوایی طبیعی، صحبت نمی‌کرد، یرقان طولانی، فونتانل بزرگ
P22 -	دختر	۱۰۶/۵	۲/۵	ندارد	آژنزی	-
P23 ۱۲	پسر	۱۱۸	-	تیروئید بسیار کوچک	آژنزی	-
P24 ۲۶	دختر	۲۶۵	۰/۱	آژنزی	آژنزی	لتارژی، فتق نافی، یرقان طولانی، پوست خشک، هیپوبیلی روبینی، شنوایی طبیعی
P25 ۷	دختر	۲۰۰	۳	بدون تیروئید واضح	آژنزی	یرقان نوزادی
P26 -	دختر	۱۰۰ <	۱/۳	-	آژنزی	-
P27 -	دختر	۱۷۲	۳/۴	-	اکتوپیک	-
P28 -	پسر	۲۰۶	۱	اکتوپیک	آژنزی	-
P29 ۳	پسر	۱۸۵	۰/۷	طبیعی	آژنزی	شنوایی طبیعی، لتارژی، فتق نافی، یرقان طولانی، پوست خشک، پوست چروکیده، فونتانل بزرگ
P30 ۱۰	دختر	۴۸/۴	۹/۵	بدون تیروئید واضح	آژنزی	شنوایی طبیعی، یرقان طولانی، لتارژی
P31 ۴	پسر	۷۲/۶	۹/۳	تیروئید بسیار کوچک	ندارد	طولانی شدن یرقان
P32 ۱۵	دختر	۷۱	۶	بدون تیروئید واضح	اکتوپیک	شنوایی طبیعی، لتارژی، هیپوتونی، فونتانل بزرگ
P33 ۱۵	پسر	۱۳۳	۱/۲	تیروئید کوچک	آژنزی	هیپوتونی، یرقان، لتارژی، شنوایی طبیعی
P34 ۶	دختر	۱۱۹	-	بدون تیروئید واضح	-	شنوایی طبیعی، یرقان، هیپوتونی
P35 ۴	دختر	۱۴۰	۱۳/۷	بدون تیروئید واضح	آژنزی	شنوایی طبیعی، لتارژی، هیپوتونی فونتانل بزرگ، پوست چروکیده
P36 ۱۵	پسر	۹۶/۱	۵/۹	بدون تیروئید واضح	اکتوپیک	فونتانل بزرگ، لتارژی، یرقان طولانی

جدول ۱. یافته‌های بالینی بیماران مبتلا به کم‌کاری مادرزادی تیروئید دارای تیروئید نابجا و آژنزی غده تیروئید (ادامه)

شماره	سن (روز)	جنس	TSH (میلی‌واحد در لیتر)	T4 (میکروگرم در دسی‌لیتر)	سونوگرافی	اسکن تیروئید	علایم بالینی
P37	۶	دختر	۴۷/۵	۱/۳	طبیعی	آژنزی	شنوایی طبیعی
P38	۸	پسر	۳۴/۹	۱۱	طبیعی	آژنزی	یرقان طولانی، پوست خشک
P39	۱۱	پسر	۶۴/۷	۸/۹	طبیعی	آژنزی	فتق ناف
P40	-	دختر	۳۹	-	-	آژنزی	-
P41	۱۳	دختر	۴۹/۸	۹/۳	تیروئید کوچک	ندارد	یرقان طولانی، رنگ پریده، پوست چروک
P42	۱۷	پسر	۳۸	۰/۳	تیروئید کوچک	آژنزی	یرقان، حاملگی بیش از ۴۲ هفته
P43	۶	دختر	۳۷/۸	-	طبیعی	آژنزی	شنوایی طبیعی
P44	۷	پسر	۵۶	۱۰/۵	تیروئید بسیار کوچک	آژنزی	پوست خشک
P45	۱۳	دختر	۴۷/۸	۱/۵	بدون تیروئید واضح	آژنزی	یبوست، فتق ناف
P46	۶	پسر	۵۲	۱۳/۵	تیروئید کوچک	آژنزی	لنارژی، گریه‌ی خشن
P47	۵	دختر	۵۸	۲/۱	بدون تیروئید واضح	اکتوپیک	فونتال بزرگ

تمام بیماران TD این مجموعه برای موتاسیون‌های ژن TTF-2 مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین توالی مستقیم ناحیه‌ی کدکننده‌ی TTF-2 موتاسیونی را نشان نداد. یک پلی‌مورفیسم خاموش در سروتونین ۲۷۳ (TCC.TCT) در ۷۴ درصد بیماران غیرخویشاوند مشاهده شد (شکل ۲). نکته‌ی قابل توجه این بود که طول توالی تکراری آلانین در TTF2 در تمام بیماران TD ما، ۱۴ بود.

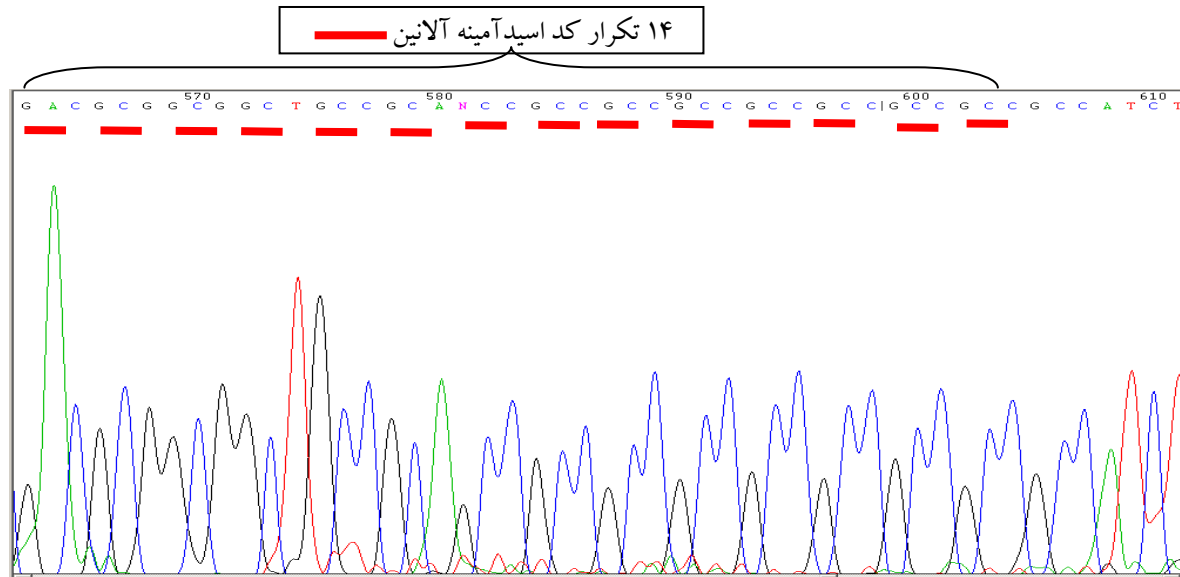
بحث

دیسژنزی تیروئید مهم‌ترین عامل ایجاد کم‌کاری مادرزادی تیروئید است. مطالعات مولکولی نشان داده‌اند که ۳ ژن کدکننده‌ی فاکتورهای رونویسی (TTF1، TTF2 و PAX8) در نمو غده تیروئید نقش دارند و در موارد اندکی از مبتلایان TD نقص این ژن‌ها گزارش شده است (۷).

با وجود آن که مطالعات موجود در زمینه‌ی اتیولوژی این بیماری شایع در کشور گویای آن است که اکثر موارد کم‌کاری مادرزادی تیروئید در ایران به علت شیوع بالای ازدواج‌های فامیلی حاصل دیس‌هورمونوزن غده تیروئید می‌باشد ولی بر اساس مطالعه‌ی در اصفهان در ۴۲/۲ درصد از مبتلایان به CH اتیولوژی بیماری دیسژنزی تیروئید بود (۲۱).

در این مطالعه، ما ژن TTF2 را برای تعیین عوامل ژنتیکی در بیماران مبتلا به کم‌کاری مادرزادی تیروئید ناشی از TD اصفهانی، ایرانی، بر اساس فنوتیپ دیسژنزی مورد بررسی قرار دادیم و هیچ‌گونه موتاسیونی در بیماران مذکور مشاهده نگردید.

مطالعات مختلفی به بررسی موتاسیون‌های این ژن در کودکان مبتلا به کم‌کاری مادرزادی تیروئید پرداخته‌اند و نتایج مختلفی نیز گزارش شده است. ژن TTF2 بر روی کروموزوم ۹ قرار گرفته است و ۳۷۶



شکل ۲. تصویر نتایج تعیین توالی در بیمار با توالی تکراری ۱۴ تایی مربوط به اسید آمینه آلانین (توالی ژنتیکی کد کننده اسید آمینه آلانین (GCT و GCC, GCA, GCG))

GENE ID: 2304 FOXE1 | forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)

Query 508

CCGCCGCAAGCGCTTCAAGCGCTCGGACCTCTCCACCTACCCGGCTTACATGCACGACGC 567

|||||

Sbjct 654

CCGCCGCAAGCGCTTCAAGCGCTCGGACCTCTCCACCTACCCGGCTTACATGCACGACGC 713

Query 568

GGCGGCTgccgcancgccgccgccgccgccgccATCTTNCATNCGTGGTGNC 627

|||||

Sbjct 714

GGCGGCTGCCGACCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCATCTTCCCAGGCGCGGTGCC773

گزارش شده است در حالی که موتاسیون R102C در مبتلایان به CH شدید با ناهنجاری‌های خارج غده‌ای تیروئید که دارای غده‌ی تیروئید طبیعی بودند گزارش شده است.

پس از شناسایی موتاسیون‌های مذکور مطالعات متعددی در این زمینه در کودکان مبتلا به CH انجام گرفت. Huebner و همکاران در دو فرد دو قلبی غیرهمسان دارای شکاف کام، موهای مجعد و گوش‌های برگشته غیر جفت جایگزینی اسید آمینه‌ی تریپتوفان با آرژینین در جایگاه ۹۷ (W97R) را در این ژن به طور هموزیگوس گزارش کردند (۱۲).

در مطالعه‌ای در چک در بررسی ژنتیکی ۱۷۰ بیمار مبتلا به CH ناشی از دیسژنزی غده و کم کاری

امینو اسید را کد می‌کند. پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه‌ی مربوط به این ژن نقش کلیدی مهمی در امبریونیزاسیون دارند و موتاسیون‌های آن منجر به اختلالات مادرزادی متعددی می‌گردد. موتاسیون هموزن این ژن باعث بروز موارد شدید کم کاری تیروئید می‌گردد (۲۳-۲۲) و تاکنون ۳ موتاسیون مرتبط با این بیماری شناخته شده است که شامل جابجایی آلانین با والین در کدون ۶۵ (A65 V) (۱۷)، جابجایی سرین با اسپارژین در کدون ۵۷ (S57N) (۱۸) و جابجایی آرژینین با سیستئین در کدون ۱۰۲ (R102C) (۱۹) می‌باشند. موتاسیون‌های A65V و S57N در بیماران مبتلا به CH با آرژنزی کامل غده به همراه اختلالات تکاملی دیگر نظیر شکاف کام، موهای مجعد و آترزی کونکال

نکته‌ی قابل توجه آن است که پلی‌مورفیسم Polya از ۱۱ تا ۱۶ اسید آمینه متغیر است و ۱۴ اسید آمینه در بیماران TD شایع‌ترین آلل می‌باشد؛ در حالی که تکرار اسید آمینه ۱۹-۱۲ برای ناتوانی تخمدان نابالغ ذکر شده است (۲۲، ۱۱).

افزایش تکرار آلانین اولین بار در مکانیسم ایجاد سندرم سین‌پلی‌داکتیلی (Synpolydactyly syndrome یا SDP) شناسایی شد. از آن پس در چند بیماری دیگر مربوط به ناهنجاری‌های مادرزادی و یا عقب‌ماندگی ذهنی نیز مشاهده شده است. بحث‌های فراوانی تاکنون در مورد تأثیر مستقیم این افزایش تکرار آلانین در از دست دادن عملکرد به عنوان عامل بیماری‌زا انجام گرفته است. اندازه‌ی افزایش تکرار آلانین در فنوتیپ این گونه بیماری‌ها مؤثر است. در پروتئین‌هایی نظیر TTF-2 و HASH-1 (Human achaete-scute homolog-1) این افزایش تکرار می‌تواند باعث تغییر در فعالیت کمپلکس رونویسی گردد (۲۸).

Carre و همکاران نشان دادند که وجود ۱۶ آلانین هم در حالت هموزیگوت (ژنوتیپ ۱۶/۱۶) و هم در حالت هتروزیگوت (ژنوتیپ ۱۴/۱۶) به طور معنی‌داری در مقایسه با ژنوتیپ ۱۴/۱۴ مانع ایجاد TD می‌شود. آن‌ها نشان دادند که طول زنجیره‌ی آلانین در TTF2، می‌تواند استعداد ژنتیکی برای ابتلا به TD را تغییر دهد (۲۹).

در مطالعه‌ای که به تازگی انجام شده است، نقش طول زنجیره‌ی پلی‌آلانین در بیماری CH ناشی از دیسژنزی غده بررسی گردید. بر اساس یافته‌های این مطالعه موارد بیشتر یا مساوی ۱۶ آلانین در موارد فامیلی بیماری دیده می‌شوند (۳۰).

همچنین در مطالعه‌ای در ایتالیا بر روی ۵۷ بیمار

تیروئید غیر گواتری، موردی از موتاسیون ژن TTF2 گزارش نشد و به این نتیجه رسیدند که شاید موتاسیون‌های ژنی غیر کلاسیک و یا سایر ژن‌های ناشناخته در بروز بیماری نقش دارند (۲۴). در مطالعه‌ی دیگری در ژاپن در بررسی ۱۰۲ کودک مبتلا نیز موارد موتاسیون ژن TTF2 بسیار نادر بود (۲۵).

در مطالعه‌ی مشابهی در مالزی در بررسی موتاسیون ژن TTF2 در ۳۴ کودک مبتلا به CH بدون رابطه‌ی خویشاوندی، هیچ موتاسیونی گزارش نشد و فقط در یک بیمار جابجایی نوکلوتید $A > G$ در موقعیت ۳۹۴ ژن مذکور گزارش شد که آن هم به نظر می‌رسید نقشی در بروز بیماری نداشته باشد (۲۶).

در این مطالعه، در تعیین توالی مستقیم تمام ناحیه‌ی ژنومی ژن TTF-2 تنها یک تغییر توالی به دلیل یک موتاسیون خاموش در سرروتونین 273 (TCC.TCT) مشاهده گردید. این پلی‌مورفیسم پیش از این توسط Macchia و همکاران گزارش شده بود (۱۳). این پلی‌مورفیسم در ۷۴ درصد بیماران TD ایرانی شناسایی شد.

بر اساس یافته‌های این مطالعه، طول تکرار آلانین در TTF2 در تعداد قابل توجهی از بیماران TD ما ۱۴ عدد بود.

در خصوص طول زنجیره‌ی آلانین و ارتباط آن با بروز CH مطالعات مختلفی انجام گرفته است. بر اساس این مطالعات تغییر در تعداد توالی تکراری سه نوکلئوتیدی کد کننده‌ی قطعه Polya در برخی پروتئین‌ها مانند TTF2 می‌تواند یکی از عوامل ایجاد کننده‌ی برخی بیماری‌ها باشد (۲۷). این نشان می‌دهد که ناهنجاری در Polya می‌تواند منجر به اختلال در آغاز نمو و باعث ایجاد بدریختی و ناهنجاری شود.

در نمو تیروئید را نشان داد. به علاوه احتمال این که استعداد ژنتیکی ابتلا به TD فاقد الگوی وراثتی مندلی باشد، همچنان که Castanet و همکاران (۱۸، ۷) و Deladoey و همکاران (۳۱) به آن اشاره کردند، نیز می باشد. همچنین این مشاهدات می تواند نقش تغییرات اپی ژنتیکی در ایجاد TD را نشان دهد که مطالعات Tonacchera و همکاران (۳۲) نیز آن را تأیید می کند.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری تهران، انجام گرفت. نویسندگان مراتب قدردانی را از خانم اکبری اعلام می دارند.

CH نشان داده شد که موتاسیون این ژن در مبتلایان به CH بسیار نادر می باشد و طول زنجیره پلی آلانین می تواند در اتیولوژی CH نقش داشته باشد (۲۰).

با توجه به موارد فوق و نیز یافته های ما که نشان دهنده وجود تکرار ۱۴ تایی در قطعه پلی آلانین در تمام بیماران TD بود، پیشنهاد می شود در ادامه این مطالعه نقش طول زنجیره پلی آلانین در TTF2 در ایجاد استعداد ژنتیکی ابتلا به CH و اتیولوژی های مختلف آن مورد بررسی قرار گیرد. نتایج به دست آمده در این تحقیق باید در جمعیت سالم ایرانی و هم قوم با بیماران نیز مطالعه شود تا نقش واقعی تکرارهای ۱۴ پلی آلانین در این بیماری ثابت و یا رد شود.

به طور خلاصه، ما موتاسیونی در ژن TTF2 بیماران CH مبتلا به TD در این مطالعه نیافتیم. این مطالعه اهمیت و ضرورت بررسی دیگر ژن های دخیل

References

- Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 17.
- Gruters A, Krude H. Update on the management of congenital hypothyroidism. *Horm Res* 2007; 68 (Suppl 5): 107-11.
- Hashemipour M, Amini M, Iranpour R, Sadri GH, Javaheri N, Haghghi S, et al. Prevalence of congenital hypothyroidism in Isfahan, Iran: results of a survey on 20,000 neonates. *Horm Res* 2004; 62(2): 79-83.
- Ordoorkhani A, Mirmiran P, Hajipour R, Hedayati M, Azizi F. Screening for congenital hypothyroidism in the Islamic Republic of Iran: strategies, obstacles and future perspectives. *East Mediterr Health J* 2002; 8(4-5): 480-9.
- LaFranchi S. Congenital hypothyroidism: etiologies, diagnosis, and management. *Thyroid* 1999; 9(7): 735-40.
- Park SM, Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* 2005; 42(5): 379-89.
- Castanet M, Sura-Trueba S, Chauty A, Carre A, de RN, Heath S, et al. Linkage and mutational analysis of familial thyroid dysgenesis demonstrate genetic heterogeneity implicating novel genes. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(2): 232-9.
- De FM, Di LR. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* 2004; 25(5): 722-46.
- Gruters A, Krude H, Biebermann H. Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2004; 151 (Suppl 3): U39-U44.
- Chadwick BP, Obermayr F, Frischauf AM. FKHL15, a new human member of the forkhead gene family located on chromosome 9q22. *Genomics* 1997; 41(3): 390-6.
- Hishinuma A, Ohyama Y, Kuribayashi T, Nagakubo N, Namatame T, Shibayama K, et al. Polymorphism of the polyalanine tract of thyroid transcription factor-2 gene in patients with thyroid dysgenesis. *Eur J Endocrinol* 2001; 145(4): 385-9.
- Huebner A, Thorwarth A, Biebermann H, Birke I, Renault N, Aust D, et al. Congenital hypothyroidism due to thyroid agenesis and cleft palate resulting from a novel homozygous mutation in FOXE1 (TTF2). *Horm Res* 2004; 62(2): 1-215.
- Macchia PE, Mattei MG, Lapi P, Fenzi G, Di LR. Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human

- thyroid transcription factor 2 gene (TTF2). *Biochimie* 1999; 81(5): 433-40.
14. Trueba SS, Auge J, Mattei G, Etchevers H, Martinovic J, Czernichow P, et al. PAX8, TTF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(1): 455-62.
 15. Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, Di LR. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J* 1989; 8(9): 2537-42.
 16. Perrone L, Pasca di MM, Zannini M, Di LR. The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding independent transcriptional repressor. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275(1): 203-8.
 17. 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.
 18. Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Leger J, Lyonnet S, et al. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* 2002; 11(17): 2051-9.
 19. Baris I, Arisoy AE, Smith A, Agostini M, Mitchell CS, Park SM, et al. A novel missense mutation in human TTF-2 (FKHL15) gene associated with congenital hypothyroidism but not athyreosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(10): 4183-7.
 20. Santarpia L, Valenzise M, Di PG, Arrigo T, San MG, Ciccio MP, et al. TTF-2/FOXE1 gene polymorphisms in Sicilian patients with permanent primary congenital hypothyroidism. *J Endocrinol Invest* 2007; 30(1): 13-9.
 21. 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.
 22. Watkins WJ, Harris SE, Craven MJ, Vincent AL, Winship IM, Gersak K, et al. An investigation into FOXE1 polyalanine tract length in premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 2006; 12(3): 145-9.
 23. Lehmann OJ, Ebenezer ND, Jordan T, Fox M, Ocaka L, Payne A, et al. Chromosomal duplication involving the forkhead transcription factor gene FOXC1 causes iris hypoplasia and glaucoma. *Am J Hum Genet* 2000; 67(5): 1129-35.
 24. Al TE, Biebermann H, Limanova Z, Hnikova O, Zikmund J, Dame C, et al. Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2007; 156(5): 521-9.
 25. Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T. Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(4): 1981-5.
 26. Kang IN, Musa M, Harun F, Junit SM. Characterization of mutations in the FOXE1 gene in a cohort of unrelated Malaysian patients with congenital hypothyroidism and thyroid dysgenesis. *Biochem Genet* 2010; 48(1-2): 141-51.
 27. Brown LY, Brown SA. Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. *Trends Genet* 2004; 20(1): 51-8.
 28. Amiel J, Trochet D, Clement-Ziza M, Munnich A, Lyonnet S. Polyalanine expansions in human. *Hum Mol Genet* 2004; 13(Spec No 2): R235-R243.
 29. Carre A, Castanet M, Sura-Trueba S, Szinnai G, Van VG, Trochet D, et al. Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis. *Hum Genet* 2007; 122(5): 467-76.
 30. Szczepanek E, Ruchala M, Szaflarski W, Budny B, Kilinska L, Jaroniec M, et al. FOXE1 polyalanine tract length polymorphism in patients with thyroid hemiagenesis and subjects with normal thyroid. *Horm Res Paediatr* 2011; 75(5): 329-34.
 31. Deladoey J, Vassart G, Van VG. Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis. *Endocr Dev* 2007; 10: 29-42.
 32. Tonacchera M, Banco M, Lapi P, Di CC, Perri A, Montanelli L, et al. Genetic analysis of TTF-2 gene in children with congenital hypothyroidism and cleft palate, congenital hypothyroidism, or isolated cleft palate. *Thyroid* 2004; 14(8): 584-8.

TTF2 Gene Mutation in Neonates with Congenital Hypothyroidism Caused by Thyroid Dysgenesis

Frouzande Mahjoubi PhD¹, Mahin Hashemipour MD², Ramin Iranpour MD³,
Massoud Amini MD⁴, Silva Hovsepian MD⁵

Abstract

Background: Thyroid transcription factor 2 (TTF2) or forkhead box E1 (FOXE1) is a polyalanine domain protein with an important role in the morphogenesis and development of thyroid gland. Mutations of TTF2 gene have been identified in neonates with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. In this study, the mutations of TTF2 gene were studied among these patients.

Methods: In this study, the entire TTF2 gene of 50 neonates with congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis who referred to Isfahan Endocrine and Metabolism Research Center (Isfahan, Iran) was studied by direct DNA sequencing. The mutations were assessed after amplification of TTF2 gene by polymerase chain reaction (PCR) method. Mutations of each exon of TTF2 gene were evaluated by the adjacent primers of the whole encoding region.

Findings: We did not find any mutation in TTF2 gene. There was a serotonin polymorphism among 74% of studied patients. The length of TTF2 polyalanine tract was 14 amino acids in most patients.

Conclusion: The findings of this study indicated the possible correlation between TTF2 polyalanine tract length polymorphism and genetic susceptibility to thyroid dysgenesis among patients with congenital hypothyroidism.

Keywords: Congenital hypothyroidism, Thyroid transcription factor 2, Thyroid dysgenesis

¹ Assistant Professor, Department of Cytogenetics, Iran Blood Transfusion Organization Research Center (IBTO), Tehran, Iran

² Professor, Endocrine and Metabolism Research Center, Child Growth and Development Research Center, Department of Pediatric Endocrinology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Assistant Professor of Neonatology, Endocrine and Metabolism Research Center, Child Growth and Development Research Center, Department of Pediatrics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁴ Professor, Department of Endocrinology, School of Medicine, Endocrine and Metabolism Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁵ Research Assistant, Endocrine and Metabolism Research Center, Child Growth and Development Research Center, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Mahin Hashemipour MD, Email: hashemipour@med.mui.ac.ir