مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۸۹/هفته سوم تیرماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۵

بررسی ژنتیکی ژن TTF2 در کودکان مبتلا به کم کاری مادرزادی تیرویید ناشی از دیس‌ژنزی غده‌ی تیرویید

دکتر فروزنده محجوبی[۱]، دکتر مهین هاشمی‌پور[۲]، دکتر رامین ایران‌پور[۳]، دکتر مسعود امینی[۴]، دکتر سیلوا هوسپیان[۵]

چکیده

مقدمه: فاکتور رونویسی تیرویید ۲ (Thyroid transcription factor 2 یا TTF2) که با نام FOXE1 نیز شناخته می‌شود، یکی از پروتئین‌های کاندیدی است که در نمو غده‌ی تیرویید نقش دارد. نقص در این ژن در تعدادی از بیماران مبتلا به کم کاری مادرزادی تیرویید ناشی از دیس‌ژنزی غده‌ی تیرویید (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 تیرویید 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 پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) و به روش تعیین توالی مستقیم بررسی شد. بررسی موتاسیون‌ها برای هر اگزون TTF2 با پرایمرهای مجاور تمام ناحیه‌ی کدکننده انجام گرفت.

یافته‌ها: هیچ موتاسیونی در ژن TTF2 مشاهده نگردید. بررسی‌ها وجود پلی‌مورفیسمی 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 پلی‌آلانین را در TTF2 در ایجاد استعداد ژنتیکی برای TD مطرح نماید.

واژگان کلیدی: کم کاری مادرزادی تیرویید، فاکتور رونویسی تیرویید ۲، دیس‌ژنزی غده‌ی تیرویید

مقدمه

کم کاری مادرزادی تیرویید (CH یا Congenital hypothyroidism) از شایع‌ترین اختلالات متابولیک و اندوکرین کودکان می‌باشد که به علت اختلال در تولید هورمون تیرویید یا اختلالات تکاملی غده‌ی تیرویید حاصل می‌شود. میزان بروز این بیماری در جوامع مختلف متفاوت است، ولی به طور متوسط ۱ مورد در هر ۴۰۰۰-۳۰۰۰ تولد گزارش می‌شود. عقب‌ماندگی ذهنی حاصل از این بیماری به دلیل نقش محوری هورمون تیرویید 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 تیرویید قرار گیرد (۲-۱).

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

[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
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مهین هاشمی‌پور Email: hashemipour@med.mui.ac.ir

(۱/۷۴۸) در کشور ایران نشان داده است (۴-۳). در ۸۵ درصد موارد، CH ناشی از تغییری در تکامل تیرویید است که دیس‌ژنزیس تیرویید (TD یا Thyroid dysgenesis)، خوانده می‌شود (۵). این ناهنجاری‌ها شامل آژنزی، همی‌آژنزی (فقدان کامل غده‌ی تیرویید یا Athyrosis و Hemithyroidoea)، بافت تیرویید نابجا (قرارگیری غده‌ی تیرویید در ناحیه‌ی Sublingual که تیرویید نابجا یا Thyroid ectopy خوانده می‌شود) و هیپوپلازی (غده‌ی تیرویید به شدت کوچک شده که باقی‌مانده‌ی بافت تیرویید در جایگاه طبیعی آن است) می‌باشد (۶-۵). امروزه کشف شده است که برخی از موارد دیس‌ژنزی نتیجه‌ی موتاسیون در سه فاکتور رونویسی (TTF1، TTF2 و PAX8) هستند (۷).

فاکتور رونویسی ۲ (TTF2 یا Thyroid transcription factor 2) که به نام FOXE1 (Forkhead box E1) نیز شناخته می‌شود، متعلق به خانوده‌ی ژنی Forkhead از فاکتورهای رونویسی هستند که نمو رویانی را تنظیم می‌کنند و نقشی حیاتی در تکامل تیرویید ایفا می‌کنند (۹-۸). خانواده‌ی ژنی مارپیچ/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 پایانه‌ای C (Unique C-terminal residues) است (۱۳-۱۱، ۹، ۵، ۳). این پروتئین دارای نقش ویژه‌ای در کنترل مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز فولیکولار تیرویید (Thyroid follicular cell precursors یا TFC) است (۱۴). احتمال دارد که TTF2 نقش یک سرکوب‌گر رونویسی اختصاصی پروموتور ژن TG و TPO را در مراحل ابتدایی نمو تیرویید را بر عهده داشته باشد (۱۶-۱۵). 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.

موتاسیون‌ها در TTF2 پس از تکثیر ژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) و به روش تعیین توالی مستقیم بررسی شد. بررسی موتاسیون‌ها برای هر اگزون 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.

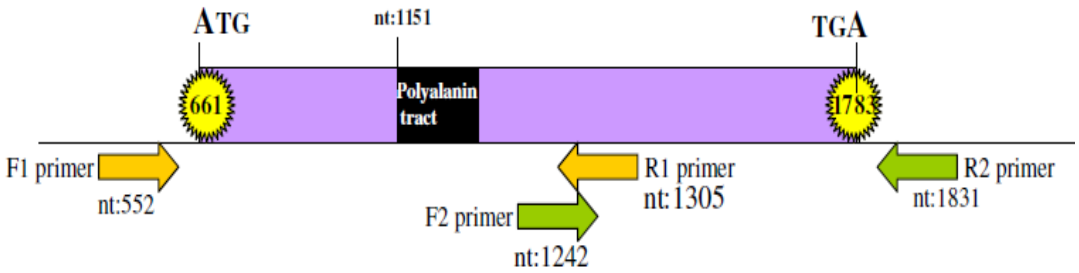
واکنش‌های PCR برای هر دو قطعه در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۴ میلی‌مول در لیتر از هر پرایمر، ۰/۲ میلی‌مول در لیتر از هر dNTP، ۰/۶۲۵ واحد آنزیم Taq polymerase(Sinagen, Iran)، ۵ میلی‌مول $MgCl_2$ و 1 x PCR buffer (سیناژن، ایران)، ۲۰۰ نانوگرم DNA ژنومی تهیه شد. 1 x Q solution (QIAGEN) برای تسهیل تکثیر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

واکنش PCR در ۳۰ چرخه شامل ۱ دقیقه ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه ۶۸ درجه و ۱ دقیقه ۷۲ درجه و در ادامه یک مرحله‌ی ۱۰ دقیقه‌ای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه Techne termal 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 ۱۱۵۰-۱۱۹۷ است.

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



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´-ctgagctctccgcagaagg-3´ and R1: 5´ -cgcggggtagtagactggag-3´ for amplifying the first segment with 754bp (nucleotides552-1305, GenBank accession number NC_000009.11).
F2: 5´-cgccgtctatgcaggctac-3´ and R2:5´ -gaacgtgtgaacagccgatg-3´ for amplifying the last segment with 590bp (nucleotides1242-1831, GenBank accession number NC_000009.11).

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

یافته‌ها

افراد مورد مطالعه شامل ۱۳ بیمار مبتلا به CH دارای تیرویید نابجا و ۳۷ بیمار فاقد تیرویید بودند. یافته‌های بالینی بیماران در جدول ۱ ارئه گردیده است.

نوزادان فاقد تیرویید TSH بالاتری در مقایسه با موارد تیرویید نابجا داشتند (۱۱۶/۳-۱۰۹/۶۴ در مقابل ۱۰۸/۱۰-۶۲/۹۲ میلی‌واحد در لیتر با $P < ۰/۰۰۱$). میانگین T4 در نوزادان دارای تیرویید نابجا و فاقد تیرویید به ترتیب ۶/۳۶-۵/۵۷ و ۵/۰۴-۳/۰۰ میکروگرم در دسی‌لیتر بود. دو بیمار فاقد تیرویید از ناشنوایی رنج می‌بردند. بیماران به دلیل درمان زودهنگام پس ازتولد، از عوارض بالینی ناشی از هیپوتیرویدیسم شامل تأخیر در رشد و عقب‌ماندگی ذهنی مصون ماندند.

جدول ۱. یافته‌های بالینی بیماران مبتلا به کم‌کاری مادرزادی تیرویید دارای تیرویید نابجا و آژنزی غده‌ی تیرویید

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

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

شماره	سن (روز)	جنس	TSH (میلی‌واحد در لیتر)	T4 (میکروگرم در دسی‌لیتر)	سونوگرافی	اسکن تیرویید	علایم بالینی
P17	-	دختر	۱۰۳/۵	-	بدون تیرویید واضح	-	-
P18	۱۳	پسر	۳۴۲	۱/۴	بدون تیرویید واضح	ندارد	شنوایی طبیعی، زردی شدید
P19	۴	پسر	۴۰۰	۲/۴	بدون تیرویید واضح	آژنزی	شنوایی طبیعی، هیپوتونی، فونتانل خلفی بزرگ‌تر از ۵ میلی‌متر
P20	۱۵	پسر	۲۳۲	۰/۶	بدون تیرویید واضح	آژنزی	شنوایی طبیعی، یرقان، سرفه، خس خس سینه
P21	۱۷	پسر	۱۹۰	۰/۷	بدون تیرویید واضح	آژنزی	یبوست، لتارژی، هیپوتونی، پوست خشک، گریه‌ی خشن شنوایی طبیعی، صحبت نمی‌کرد، یرقان طولانی، فونتال بزرگ
P22	-	دختر	۱۰۶/۵	۲/۵	ندارد	آژنزی	-
P23	۱۲	پسر	۱۱۸	-	تیرویید بسیار کوچک	آژنزی	-
P24	۲۶	دختر	۲۶۵	۰/۱	آژنزی	آژنزی	لتارژی، فتق نافی، یرقان طولانی، پوست خشک، هیپو بیلی‌روبینی، شنوایی طبیعی
P25	۷	دختر	۲۰۰	۳	بدون تیرویید 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، فونتال بزرگ
P30	۱۰	دختر	۴۸/۴	۹/۵	بدون تیرویید واضح	آژنزی	شنوایی طبیعی، یرقان طولانی، لتارزی
P31	۴	پسر	۷۲/۶	۹/۳	تیرویید بسیار کوچک	ندارد	طولانی شدن یرقان
P32	۱۵	دختر	۷۱	۶	بدون تیرویید واضح	اکتوپیک	شنوایی طبیعی، لتارژی، هیپوتونی، فونتال بزرگ
P33	۱۵	پسر	۱۳۳	½	تیرویید کوچک	آژنزی	هیپوتونی، یرقان، لتارژی، شنوایی طبیعی
P34	۶	دختر	۱۱۹	-	بدون تیرویید واضح	-	شنوایی طبیعی، یرقان، هیپوتونی
P35	۴	دختر	۱۴۰	۱۳/۷	بدون تیرویید واضح	آژنزی	شنوایی طبیعی، لتارژی، هیپوتونی فونتال بزرگ، پوست چروکیده
P36	۱۵	پسر	۹۶/۱	۵/۹	بدون تیرویید واضح	اکتوپیک	فونتال بزرگ، لتارژی، یرقان طولانی

www.mui.ac.ir

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

شماره	سن (روز)	جنس	TSH (میلی‌واحد در لیتر)	T4 (میکروگرم در دسی‌لیتر)	سونوگرافی	اسکن تیرویید	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	تیرویید کوچک	ندارد	یرقان طولانی، رنگ پریده، پوست چروک
P42	۱۷	پسر	۳۸	۰/۳	تیرویید کوچک	آژنزی	یرقان، حاملگی بیش از ۴۲ هفته
P43	۶	دختر	۳۷/۸	-	طبیعی	آژنزی	شنوایی طبیعی
P44	۷	پسر	۵۶	۱۰/۵	تیرویید بسیار کوچک	آژنزی	پوست خشک
P45	۱۳	دختر	۴۷/۸	۱/۵	بدون تیرویید واضح	آژنزی	یبوست، فتق ناف
P46	۶	پسر	۵۲	۱۳/۵	تیرویید کوچک	آژنزی	لتارژی، گریه‌ی خشن
P47	۵	دختر	۵۸	۲/۱	بدون تیرویید 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.

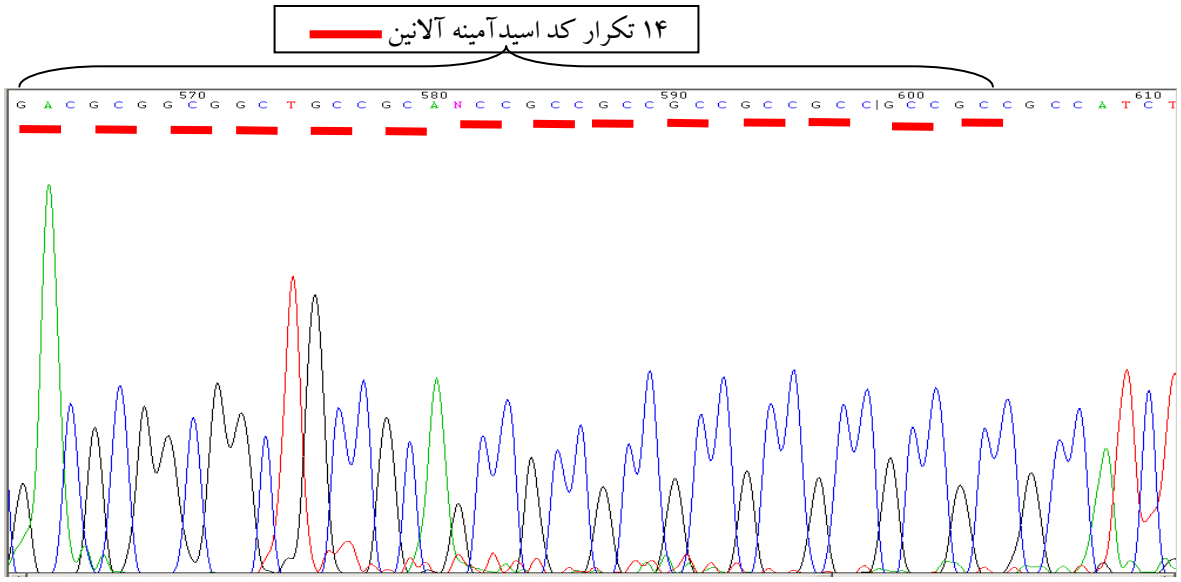
بحث

دیس‌ژنزی تیرویید مهم‌ترین عامل ایجاد کم کاری مادرزادی تیرویید است. مطالعات مولکولی نشان داده‌اند که ۳ ژن کدکننده‌ی فاکتورهای رونویسی (TTF1، TTF2 و PAX8) در نمو غده‌ی تیرویید 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 کم کاری مادرزادی تیرویید در ایران به علت شیوع بالای ازدواج‌های فامیلی حاصل دیس‌هورمونوژنز غده‌ی تیرویید می‌باشد ولی بر اساس مطالعه‌ای در اصفهان در ۴۲/۲ درصد از مبتلایان به CH اتیولوژی بیماری دیس‌ژنزی تیرویید بود (۲۱).

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

مطالعات مختلفی به بررسی موتاسیون‌های این ژن در کودکان مبتلا به کم کاری مادرزادی تیرویید 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 اسیدآمینه آلانین (توالی ژنتیکی کد کننده اسید امینه آلانین (GCG، GCA، GCC و GCT)

GENE ID: 2304 FOXE1 | forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2)
Query 508
CCGCCGCAAGCGCTTCAAGCGCTCGGACCTCTCCACCTACCCGGCTTACATGCACGACGC 567
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 654
CCGCCGCAAGCGCTTCAAGCGCTCGGACCTCTCCACCTACCCGGCTTACATGCACGACGC 713
Query 568
GGCGGCTgccgcanccgccgccgccgccgccgccgccgccATCTTNCCATNCGTGGTGNC 627
||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||| || |||| |
Sbjct 714
GGCGGCTGCCGCAGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCATCTTCCCAGGCGCGGTGCC773

امینو اسید را کد می‌کند. پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه‌ی مربوط به این ژن نقش کلیدی مهمی در امبریوژنزیس دارند و موتاسیون‌های آن منجر به اختلالات مادرزادی متعددی می‌گردد. موتاسیون هموژن این ژن باعث بروز موارد شدید کم کاری تیروییید 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 ارژینین با سیستئین در کدون ۱۰۲ (R102C) (۱۹) می‌باشند. موتاسیون‌های A65V و S57N در بیماران مبتلا به CH با آژنزی کامل غده به همراه اختلالات تکاملی دیگر نظیر شکاف کام، موهای مجعد و آترزی کونکال گزارش شده است در حالی که موتاسیون R102C در مبتلایان به CH شدید با ناهنجاری‌های خارج غده‌ای تیروییید که دارای غده‌ی تیروییید 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 قلوی غیرهمسان دارای شکاف کام، موهای مجعد و گوش‌های برگشته غیر جفت جایگزینی اسید آمینه‌ی تریپتوفان با آرژنین 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

تیروییدد 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 نوکلوئتید 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 سروتونین 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.

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. بحث های 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 پروتئین هایی 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

CH نشان داده شد که موتاسیون این ژن در مبتلایان به CH بسیار نادر می‌باشد و طول زنجیره‌ی پلی‌آلانین می‌تواند در اتیولوژی CH نقش داشته باشد (۲۰).

با توجه به موارد فوق و نیز یافته‌های ما که نشان دهنده‌ی وجود تکرار ۱۴تایی در قطعه‌ی پلی‌آلانین در تمام بیماران TD بود، پیشنهاد می‌شود در ادامه‌ی این مطالعه نقش طول زنجیره‌ی آلانین در TTF2 در ایجاد استعداد ژنتیکی ابتلا به CH و اتیولوژی‌های مختلف آن مورد بررسی قرار گیرد. نتایج به دست آمده در این تحقیق باید در جمعیت سالم ایرانی و هم‌قوم با بیماران نیز مطالعه شود تا نقش واقعی تکرارهای ۱۴ پلی‌آلانین 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 ژن‌های دخیل در نمو تیروییدی 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 می‌باشد. همچنین این مشاهدات می‌تواند نقش تغییرات اپی‌ژنتیکی در ایجاد TD را نشان دهد که مطالعات Tonacchera و همکاران (۳۲) نیز آن را تأیید می‌کند.

تشکر و قدردانی

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

References

1. Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. Orphanet J Rare Dis 2010; 5: 17.
2. Gruters A, Krude H. Update on the management of congenital hypothyroidism. Horm Res 2007; 68 (Suppl 5): 107-11.
3. Hashemipour M, Amini M, Iranpour R, Sadri GH, Javaheri N, Haghighi 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.
4. Ordookhani 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.
5. LaFranchi S. Congenital hypothyroidism: etiologies, diagnosis, and management. Thyroid 1999; 9(7): 735-40.
6. Park SM, Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. J Med Genet 2005; 42(5): 379-89.
7. 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.
8. De FM, Di LR. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. Endocr Rev 2004; 25(5): 722-46.
9. Gruters A, Krude H, Biebermann H. Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism. Eur J Endocrinol 2004; 151 (Suppl 3): U39-U44.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Macchia PE, Mattei MG, Lapi P, Fenzi G, Di LR. Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human

www.mui.ac.ir

thyroid transcription factor 2 gene (TITF2). Biochimie 1999; 81(5): 433-40.

14. Trueba SS, Auge J, Mattei G, Etchevers H, Martinovic J, Czernichow P, et al. PAX8, TITF1, 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.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 30, No 189, 3rd week, July 2012 Received: 16.10.2011 Accepted: 4.5.2012

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

Frouzande Mahjoubi PhD[1], Mahin Hashemipour MD[2], Ramin Iranpour MD[3], Massoud Amini MD[4], Silva Hovsepian MD[5]

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