



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που  
σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών  
ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά**

**Άννα Β. Γκίκα  
Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΟΥΝΙΟΣ 2019**

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

**Άννα Β. Γκίκα**  
Α.Μ.: 20160637

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:** **Μαρία Τζέτη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:** **Μαρία Τζέτη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής  
**Ιωάννα Traeger-Συνοδινού**, Καθηγήτρια Γενετικής  
**Ελένη Φρυσίρα**, Καθηγήτρια Κλινικής Γενετικής

Ιούνιος 2019

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Βασικές γνώσεις:** Ο συγγενής υποθυρεοειδισμός (ΣΥ) αποτελεί την πιο συχνή συγγενή ενδοκρινοπάθεια, με επιπολασμό **1:1500-3000 γεννήσεις** και μπορεί να οδηγήσει σε διανοητικές διαταραχές εάν δεν διαγνωστεί και αντιμετωπιστεί άμεσα.

Το Ελληνικό Πρόγραμμα Προληπτικού Ελέγχου Νεογνών (ΕΠΠΕΝ) για το ΣΥ ξεκίνησε το 1980 και διεξάγεται από το Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού (ΙΥΠ) που λαμβάνει και ελέγχει τις κάρτες Guthrie από όλα τα μαιευτήρια της Ελλάδας. Περισσότερα από **3.700.000 νεογνά** έχουν ελεγχθεί τα τελευταία 35 χρόνια. Το ΙΥΠ σε συνεργασία με το Τμήμα Ενδοκρινολογίας, Διαβήτη και Μεταβολισμού της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών είναι υπεύθυνοι για την έναρξη της θεραπείας υποκατάστασης καθώς και την μακροχρόνια κλινικοεργαστηριακή παρακολούθηση των ασθενών αυτών.

**Στόχος και υπόθεση:** Η διερεύνηση SNPs που βρίσκονται σε γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών με σκοπό τη συσχέτισή τους με ορισμένα κλινικά χαρακτηριστικά του ΣΥ, όπως η ανταπόκριση στη θεραπεία υποκατάστασης με L-T4.

**Ασθενείς:** Τα εργαστηριακά, κλινικά και υπερηχογραφικά δεδομένα καταγράφηκαν από τον ιατρικό φάκελο των παιδιών που διαγνώστηκαν με ΣΥ από το ΕΠΠΕΝ. **176** ασθενείς ΣΥ διαιρέθηκαν σε 4 υποομάδες σύμφωνα με τα κλινικά χαρακτηριστικά τους: **Δυσγενεσία ( N = 54)**, **Δυσορμονογένεση ( N = 91)**, η οποία υποδιαιρείται σε **ομάδα χαμηλής δόσης (<3 μ g / kg / d) ( N = 55)** και **υψηλής δόσης (> 3 μ g / kg / d) ( N = 36)** και **Παροδικός ΣΥ ( N = 30)**.

**Μέθοδος:** Η μέθοδος περιλαμβάνει: 1) απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα, 2) ενίσχυση περιοχής με PCR (255 bp, 190 bp, 265 bp για τους rs225014, rs939348 και rs1991517 αντίστοιχα) 3) πέψη με περιοριστικά ένζυμα ( AfaI , RspRSII και Baul για τους rs225014, rs939348 και rs1991517 αντίστοιχα) 4) ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Μελέτες βελτιστοποίησης διεξήχθησαν με σκοπό την επίτευξη της καλύτερης διάκρισης μεταξύ των τριών γονότυπων.

**Αποτελέσματα:** Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υποομάδων για τους τρεις γονότυπους. Συγκεκριμένα, η αναλογία του γονότυπου CC στον **THRa** στην ομάδα της Δυσγενεσίας (11,1%) ήταν διπλάσια από ότι στην ομάδα του Παροδικού ΣΥ (6,60%) και τετραπλάσια από αυτή της ομάδας της Δυσορμονογένεσης (3,20%). Η αναλογία του γονότυπου CG στον **TSHR** στην ομάδα της Δυσγενεσίας (14,80 %) ήταν διπλάσια συγκριτικά με αυτή του Παροδικού ΣΥ (6,60%) και της Δυσορμονογένεσης (6,70%), ενώ στο **DIO2** παρατηρήθηκαν μικρότερες διαφορές μεταξύ των ομάδων. Η FT4 και η δόση θυροξίνης βρέθηκε ότι συσχετίζονται με ορισμένους γονότυπους, αλλά η επίδραση ήταν διαφορετική μεταξύ των ομάδων. Ο rs225014 (DIO2) εμφανίζεται να έχει επίδραση στη δόση L-T4 και στα επίπεδα της FT4 στον Παροδικό ΣΥ, ενώ ο rs939348 (THRa ) φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της FT4 σε ασθενείς με δυσορμονογένεση. Κανένα από τα εξετασθέντα SNPs δεν συσχετίστηκε με άλλες κλινικές παραμέτρους.

**Συζήτηση:** Καταλήγοντας ο ΣΥ είναι μία πολυπαραγοντική και πολυγονιδιακή νόσος με πληθώρα χαρακτηριστικών και φαινοτύπων γεγονός που καθιστά πολύ δύσκολη την εύρεση γενετικών βιοδείκτων για την λήψη αποφάσεων και αυτό αποδεικνύεται και από τα αντιφατικά αποτελέσματα των μελετών που έχουν ήδη δημοσιευθεί. Η παρούσα μελέτη πρόκειται για την πρώτη μελέτη συσχέτισης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών με τη δόση σε παιδιά με ΣΥ και μάλιστα με γνωστή αιτιοπαθολογία της νόσου.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Μοριακή Γενετική

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** RFLPs, SNPs, συγγενής υποθυρεοειδισμός, μελέτη συσχέτισης, δόση υποκατάστασης L-T4

**ABSTRACT**

**Background knowledge:** Congenital hypothyroidism (CH) is the most frequently encountered Congenital Endocrinopathy, with prevalence **1:1500-3000 births**, and may lead to intellectual disability if not diagnosed and treated promptly. The Hellenic Newborn Screening Program was initiated in 1980 and is carried out by Institute of Child Health (ICH) that receives and tests the Guthrie cards from all the maternity hospitals in Greece. More than **3,700,000 neonates** have been screened over the last 35 years. ICH in collaboration with the Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism of the First Department of Pediatrics of the National and Kapodistrian University of Athens are responsible for the treatment initiation and the long-term clinical and hormonal follow-up of these patients.

**Objective and hypothesis:** To investigate if SNP's found in genes associated with Thyroid hormones metabolic pathways can be correlated with some clinical features of CH such as L-T4 replacement therapy response.

**Patients:** Laboratory, clinical and ultrasonographic data were recorded from the medical records of children diagnosed with CH by the Greek neonatal CH screening program. Patients were selected according to the following criteria: age (>3 years old), natural conception, gestational age (>37 weeks), treatment initiation (<180 days from birth), monocytic pregnancy, non- syndromic, non- low birth-weight with a variety in LT-4 substitution therapy. **176** CH patients were divided to 4 subgroups according to their clinical features: **Dysgenesis (N=54)**, **Dyshormonogenesis (N=91)**. Sub-divided to **Low dose (<3 µg/kg/d) (N=55)** and **High dose (>3 µg/kg/d) (N=36) groups and Transient (N=30)**.

**Method:** The method consists of: 1) DNA extraction from white blood cells 2) a PCR amplification (255 bp, 190 bp, 265 bp for rs225014, rs939348 and rs1991517) 3) restriction enzyme digestion (AfaI, RspRSII and BclI for rs225014, rs939348 and rs1991517 respectively) 4) gel electrophoresis.

Optimization studies were carried out in order to achieve the best discrimination between the three genotypes.

**Results:** No statistical significant difference found between subgroups for the three genotypes. Specifically THRa CC genotype proportion in Dysgenesis group (11,1%) was twice the Transient (6,60%) and four times more than Dyshormonogenesis group (3,20%). TSHR C/G allele genotype proportion in Dysgenesis group (14,80%) was twice the Transient (6,60%) and Dysormonogenesis (6,70%) group while in **DIO2** smaller differences observed between groups. FT4 and dose was found to correlate to some genotypes but the affect was different between the groups. rs225014 (DIO2) appears to have an effect on the L-T4 dose and FT4 levels on Transient CH while rs939348 (THRa) appears to effect FT4 levels on CH patients with dyshormonogenesis. None of the examined SNPs correlated with any other clinical parameters.

**Discussion:** CH is a multifactorial and polygenetic disease with a variety of features and phenotypes making very difficult to find genetic biomarkers for decision-making and this is also evidenced by the contradictory consequences of the already published studies. The present study is the first attempt to correlate specific polymorphisms with the dose in children with CH with a known pathoetiology of the disease.

**SUBJECT AREA:** Molecular Genetics

**KEYWORDS:** RFLPs, SNPs, congenital hypothyroidism, correlation study, L-T4 substitution dose

*Στην οικογένειά μου.*

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ / ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	14
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>15</b>
<b>1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ</b> .....	<b>16</b>
1.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ .....	16
1.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ.....	17
1.3 ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ.....	19
1.4 ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ.....	21
1.4.1 Δομή θυρεοειδικών ορμονών .....	21
1.4.2 Σύνθεση θυρεοειδικών ορμονών.....	21
1.4.3 Μηχανισμός έκκρισης θυρεοειδικών ορμονών.....	23
1.4.5 Μεταφορά θυρεοειδικών ορμονών.....	26
1.4.6 Μεταβολισμός θυρεοειδικών ορμονών .....	28
1.4.7 Δράσεις των θυρεοειδικών ορμονών .....	30
1.5 ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ.....	31
1.6 ΣΥΓΓΕΝΗΣ ΥΠΟΘΥΡΕΟΕΙΔΙΣΜΟΣ.....	33
1.6.1 Γενικά στοιχεία.....	33
1.6.2 Ιστορική αναδρομή .....	33
1.6.3 Συχνότητα ΣΥ .....	34
1.6.4 Αιτιολογία ΣΥ.....	34
1.6.5 Γενετική .....	37
1.6.7 Συμπτωματολογία .....	38
1.6.8 Διάγνωση συγγενούς υποθυρεοειδισμού .....	40
1.6.9 Θεραπεία συγγενούς υποθυρεοειδισμού .....	41
<b>2. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ</b> .....	<b>42</b>
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ .....	42
2.1.1 Ιστορική Αναδρομή στη Μοριακή Βιολογία – Μοριακή Γενετική .....	42
2.1.2 Μετάλλαξη - Πολυμορφισμός.....	43
2.1.3 Πρακτική αξία της μελέτης των γονιδιακών πολυμορφισμών .....	45
2.1.4 Νοσήματα που σχετίζονται με γονιδιακούς πολυμορφισμούς.....	45
2.1.5 Θεραπευτικές εφαρμογές.....	45

2.1.6	Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάδειξη SNPs .....	45
2.2	DIO2.....	46
2.2.1	Δομή γονιδίου .....	46
2.2.2	Γονιδιακή έκφραση .....	47
2.2.3	Αποϊωδινάσες ιωδοθυρονίνης.....	47
2.2.4	Αποϊωδινάση τύπου II (D2) .....	49
2.2.5	Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τον πολυμορφισμό rs225014.....	51
2.3	THRα.....	54
2.3.1	Δομή και λειτουργία TRα .....	54
2.3.2	Μεταγραφικός ρόλος του TRα.....	57
2.3.3	TRα και παθογένεση .....	59
2.3.4	Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τον πολυμορφισμό rs939348.....	59
2.4	TSHR .....	62
2.4.1	Δομή και λειτουργία του γονιδίου TSHR .....	62
2.4.2	Δομή και λειτουργία του TSHR.....	62
2.4.3	TSHR και παθογένεση .....	64
2.4.4	Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τον πολυμορφισμό rs1991517.....	67
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>		<b>70</b>
<b>3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>		<b>71</b>
3.1.	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ .....	71
3.2.	ΥΛΙΚΑ .....	71
3.3.	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	72
3.4.	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ .....	72
3.5.	ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ .....	72
3.6.	ΜΕΘΟΔΟΙ .....	73
3.6.1	Εμπλουτισμός προϋπάρχουσας βάσης δεδομένων .....	73
3.6.2	Δείγματα.....	74
3.6.3	Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα .....	75
3.6.4	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase chain reaction – PCR).....	76
3.6.5	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	77
3.6.6	Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες .....	77
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>		<b>78</b>
4.1	ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	78
4.2	IN SILICO ΑΝΑΛΥΣΗ .....	79

4.3	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ PCR .....	81
4.3.1	Επιλογή πολυμεράσης .....	81
4.3.2	Επίδραση ιόντων μαγνησίου .....	81
4.3.3	Επίδραση θερμοκρασίας υβριδοποίησης.....	82
4.3.4	Επίδραση συγκέντρωσης των εκκινητών στην αντίδραση .....	83
4.4	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΨΗΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ.....	83
4.4.1	Ποσότητα ενζύμου .....	83
4.4.2	Χρόνος αντίδρασης πέψης.....	84
4.5	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	84
4.5.1	Περιγραφική στατιστική των δεδομένων .....	84
4.5.2	Έλεγχοι υποθέσεων.....	85
4.5.3	Γραφήματα.....	88
4.6.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	89
<b>5.</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>103</b>
5.1	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	103
5.2	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	105
	<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ .....</b>	<b>106</b>
	<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....</b>	<b>107</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α - In Silico Ανάλυση.....</b>	<b>109</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β .....</b>	<b>121</b>
	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ .....</b>	<b>122</b>
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>125</b>



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Ανατομία και αγγείωση θυρεοειδούς αδένα .....	17
Εικόνα 2. Φωτομικρογραφία χαμηλής ισχύος θυρεοειδούς αδένα αρουραίου.....	18
Εικόνα 3. Κύτταρα C (παραθυλακικά) .....	18
Εικόνα 4. Εμβρυική ανάπτυξη και κάθοδος θυρεοειδούς .....	20
Εικόνα 5. Δομή των θυρεοειδικών ορμονών και σχετικών ενώσεων .....	21
Εικόνα 6. Σχηματισμός T <sub>4</sub> και T <sub>3</sub> μέσω της σύνδεσης DIT και MIT .....	22
Εικόνα 7. Επισκόπηση της διαδικασίας σύνθεσης θυρεοειδικών ορμονών στο θυλακιώδες κύτταρο. ....	23
Εικόνα 8. Άξονας υποθαλάμου - υπόφυσης - θυρεοειδούς .....	24
Εικόνα 9. Σχηματική δομή του TSHR.....	25
Εικόνα 10. Αποϊώδωση της T <sub>4</sub> σε μεταβολικά ενεργή T <sub>3</sub> ή σε μεταβολικά ανενεργή RT <sub>3</sub> .....	29
Εικόνα 11. Νεογνό με συγγενή υποθυρεοειδισμό.....	39
Εικόνα 12. Επιδράσεις νεογνικής ανεπάρκειας θυρεοειδικών ορμονών.....	40
Εικόνα 13. Η θέση του γονιδίου DIO2 στο χρωμόσωμα 14. ....	46
Εικόνα 14. Σχηματικό διάγραμμα της 5-πλευρικής περιοχής του γονιδίου DIO2...47	
Εικόνα 15. Αποϊώδωση της θυρεοειδικής ορμόνης.....	48
Εικόνα 16. Έκφραση της D2 στους ιστούς.....	50
Εικόνα 17. Συσχέτιση του rs225014 με διάφορες παθολογικές καταστάσεις .....	52
Εικόνα 18. Απεικόνιση της συχνότητας των αλληλίων και των γονοτύπων του rs225014 .....	52
Εικόνα 19. Η θέση του γονιδίου THRα στο χρωμόσωμα 17. ....	54
Εικόνα 20. Ιστοί στους οποίους εκφράζεται ο TRα (mRNA και πρωτεΐνη) .....	55
Εικόνα 21. Ιστοί στους οποίους εκφράζεται ο TRα (παρατηρείτε εύρος έκφρασης από υψηλό έως χαμηλό).....	55

Εικόνα 22. Ο μη δεσμευμένος υποδοχέας θυρεοειδικής ορμόνης δεσμεύεται στο DNA και καταστέλλει τη μεταγραφή. ....	56
Εικόνα 23. Λειτουργικές περιοχές του TRα .....	56
Εικόνα 24. Σχηματικό διάγραμμα της ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της ορμόνης του θυρεοειδούς σε ένα κύτταρο που εκφράζει τις D2 και D3 .....	57
Εικόνα 25. Πρότυπο γονιδιακής ρύθμισης από ορμόνες θυρεοειδούς.. ....	58
Εικόνα 26. Κρυσταλλική δομή της ορμονο-δεσμευτικής περιοχής του TRα (Hormone binding domain – HBD) με την δεσμευμένη θυρεοειδική ορμόνη .....	59
Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου THRα και η θέση του rs939348 σε αυτό .....	60
Εικόνα 28. Απεικόνιση της συχνότητας των αλληλίων και των γονοτύπων του rs939348 .....	60
Εικόνα 29. Η θέση του γινιδίου TSHR στο χρωμόσωμα 14. ....	62
Εικόνα 30. Ο υποδοχέας της TSH (TSHR). ....	63
Εικόνα 31. Σχηματική απεικόνιση γνωστών μεταλλάξεων του TSHR (είτε gain-of-function είτε loss-of-function).. ....	67
Εικόνα 32. Απεικόνιση της συχνότητας των αλληλίων και των γονοτύπων του rs1991517 .....	68
Εικόνα 33. Αρχή της μεθόδου RFLP-PCR.....	79
Εικόνα 34. Απεικόνιση των γονοτύπων για τους πολυμορφισμούς rs225014, rs939348 και rs1991517 μετά την πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες AfaI, RspRSII και Baul αντίστοιχα.....	80
Εικόνα 35. Επίδραση συγκέντρωσης ιόντων μαγνησίου στην αντίδραση.....	82
Εικόνα 36. Επίδραση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης στην αντίδραση .....	82
Εικόνα 37. Επίδραση συγκέντρωσης των εκκινητών στην αντίδραση .....	83
Εικόνα 38. Επίδραση ποσότητας περιοριστικού ενζύμου στην πλήρη πέψη ικανής ποσότητας PCR προϊόντος. ....	84
Εικόνα 39. Παρουσίαση ενός τυπικού θηκογράμματος, ενώ υποδεικνύονται και τα μεγέθη τα οποία μπορούν να εξαχθούν από αυτό. ....	88

Εικόνα 40. Διαγραμματική απεικόνιση με τη μορφή θηκογράμματος της σύγκρισης των κλινικο-εργαστηριακών αποτελεσμάτων ανά γονότυπο (για τους πολυμορφισμούς THRa (rs939348), DIO2 (rs225014) και TSHR (rs1991517)) και ανά Ομάδα (Δυσγενεσίας, Παροδικού και Δυσορμονογένεσης) με τη μορφή mean±SE (N, median). ..... 102

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Οι φυσιολογικές δράσεις των θυρεοειδικών ορμονών σε διάφορους ιστούς .....	31
Πίνακας 2. Κύριες αιτίες συγγενούς υποθυρεοειδισμού, συχνότητα εμφάνισης και διακυμάνσεις που προκαλούνται στις ορμόνες. ....	37
Πίνακας 3. Συνοπτική παρουσίαση των 13 γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την αιτιοπαθογένεια του ΣΥ καθώς και των πιο συχνών διαμαρτιών που μπορεί να συνυπάρχουν. ....	38
Πίνακας 4. Σημεία και Συμπτώματα σε νεογνά και βρέφη με συγγενή υποθυρεοειδισμό .....	39
Πίνακας 5. Αποϊωδινάσες Ιωδοθυρονίνης .....	49
Πίνακας 6. Ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	73
Πίνακας 7. Περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία	73
Πίνακας 8. Παρουσίαση των θραυσμάτων που δημιουργούνται μετά από την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα.....	80
Πίνακας 9. Περιγραφικά στατιστικά για τις τρεις κατηγορίες παιδιών με ΣΥ. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median). ....	90
Πίνακας 10. Περιγραφικά στατιστικά για τις υποομάδες υψηλής και χαμηλής δόσης παιδιών με δυσορμονογένεση. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).....	93
Πίνακας 11. Περιγραφικά στατιστικά για τις ομάδες Παροδικού και Δυσορμονογένεσης. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).....	94
Πίνακας 12. Περιγραφικά στατιστικά για τις ομάδες Παροδικού και Δυσορμονογένεσης με υψηλή δόση. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).....	95
Πίνακας 13. Περιγραφικά στατιστικά για τις ομάδες Δυσγενεσίας και Παροδικού ΣΥ. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).....	96

Πίνακας 14. Περιγραφικά στατιστικά για τις ομάδες Δυσγενεσία και Δυσορμονογένεσης. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).....	97
Πίνακας 15. Περιγραφικά στατιστικά για τις ομάδες Δυσγενεσία και Δυσορμονογένεσης με υψηλή δόση. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).....	98
Πίνακας 16. Περιγραφικά στατιστικά των κλινικο-εργαστηριακών παραμέτρων ανά γονότυπο ( για τους πολυμορφισμούς THRa (rs939348), DIO2 (rs225014) και TSHR (rs1991517)) και ανά Ομάδα .....	99

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ / ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση».

Χρησιμοποιήθηκε ο εργαστηριακός εξοπλισμός του τμήματος Γενετικής του ΙΥΠ, κλινικο-εργαστηριακά δεδομένων παιδιών με ΣΥ του τμήματος ΕΠΠΕΝ του ΙΥΠ όπως αυτά είναι καταγεγραμμένα στους ιατρικούς φακέλους των ασθενών. Για την χρήση των δεδομένων αυτών αλλά και τη λήψη DNA απαιτήθηκε η έγγραφη συγκατάθεση των γονέων των ασθενών. Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν στο ιατρείο του ΙΥΠ.

Καθώς ο κύκλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών ολοκληρώνεται με την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν σε αυτό. Αρχικά, την επιβλέπουσά μου στην παρούσα εργασία, Τζέτη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς και την Καθηγήτρια Γενετικής Traeger-Συνοδινού Ιωάννα και την Καθηγήτρια Κλινικής Γενετικής Φρυσίρα Ελένη για το ενδιαφέρον τους και συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους εισηγητές της παρούσας εργασίας, τη Χημικό Ηλιάδη Αλεξάνδρα, PhD, MSc και τον Βιοχημικό Πλατή Δημήτρη, PhD, MSc, που ήταν δίπλα μου σε όλη αυτή την απαιτητική διαδικασία και με καθοδήγησαν τόσο με τις γνώσεις τους όσο και με την εμπειρία τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τον κ. Βουτετάκη Αντώνη PhD, MD, επιστημονικό συνεργάτη του ΙΥΠ για την παραχώρηση των δειγμάτων και την επιστημονική καθοδήγηση.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του ΕΠΠΕΝ του ΙΥΠ Γκιργκινούδη Παναγιώτη, PhD, τόσο για την παραχώρηση του χώρου για την υλοποίηση της μελέτης αυτής αλλά ιδιαίτερα για την κατανόηση που μου έδειξε το χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε για την διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Γενετικής του ΙΥΠ για την παραχώρηση του εργαστηριακού εξοπλισμού για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, καθώς και τους συναδέλφους μου στο ΕΠΠΕΝ για την κατανόησή τους κατά την απαιτητική αυτή περίοδο για εμένα.

---

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

### 1.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένας του ανθρώπινου σώματος. Εντοπίζεται στην πρόσθια μοίρα του τραχήλου, βρίσκεται σε επαφή με την τραχεία κάτω από τους στερνοθυρεοειδείς και τους στερνοϋοειδείς μύες, στο επίπεδο των Α5 – Θ1 σπονδύλων (1). Είναι συμπαγής, μαλακός στη σύσταση με χροιά ερυθρόφαιη. Το βάρος του φυσιολογικά κυμαίνεται από 20 έως 40 γραμμάρια (2). Αποτελείται από τον δεξιό και τον αριστερό λοβό, οι οποίοι βρίσκονται μπροστά και προς το εξωτερικό τμήμα του λάρυγγα και της τραχείας. Οι δύο λοβοί συνενώνονται με τον ισθμό, που είναι σχετικά λεπτός. Σε ένα μικρό ποσοστό του πληθυσμού, περί τα 15%, εμφανίζεται ένας τρίτος λοβός που ονομάζεται πυραμοειδής και ο οποίος εκφύεται από τον ισθμό.

Ο θυρεοειδής αδένας παρουσιάζει πλούσια αγγείωση διαθέτοντας έναν από τους υψηλότερους ρυθμούς αιματικής ροής ανά γραμμάριο ιστού (**Εικόνα 1**).

#### Αρτηρίες θυρεοειδούς αδένα:

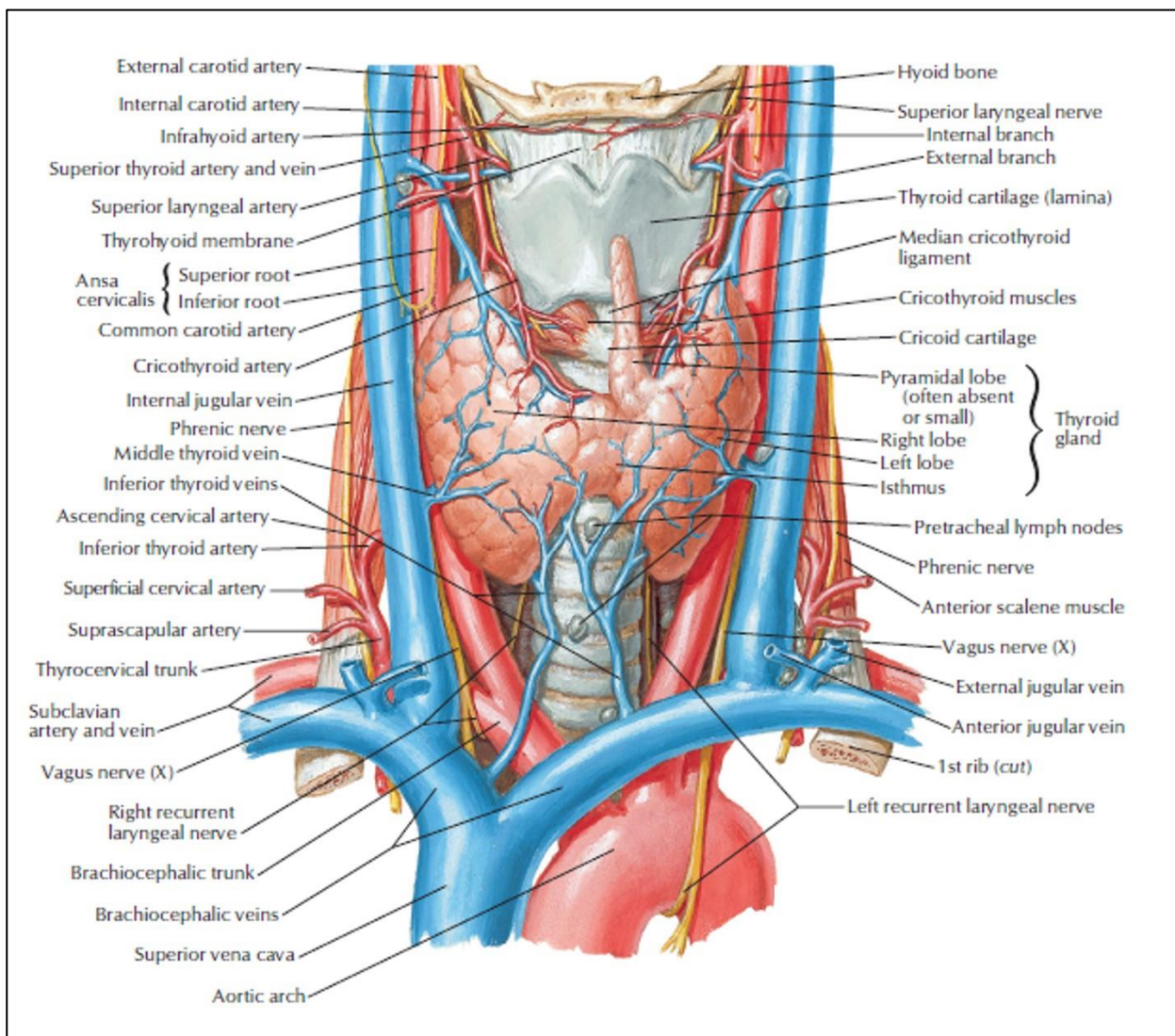
- Οι άνω θυρεοειδείς αρτηρίες (αρδεύουν κυρίως την πρόσθια και άνω επιφάνεια του αδένα),
- οι κάτω θυρεοειδείς αρτηρίες (διαιρούνται σε αρκετούς κλάδους, οι οποίοι αρδεύουν την πίσω και κάτω επιφάνεια του αδένα),
- η μέση θυρεοειδής αρτηρία (εμφανίζεται σε περίπου 10% του πληθυσμού, χορηγεί μικρούς κλάδους στην πρόσθια επιφάνεια της τραχείας, έπειτα διαιρείται και αρδεύει τον ισθμό του θυρεοειδή αδένα).

#### Φλέβες θυρεοειδούς αδένα:

- Οι άνω θυρεοειδείς φλέβες (παροχετεύουν τους άνω πόλους του αδένα, εκβάλλουν μέσα στις έσω σφαγίτιδες φλέβες),
- οι μέσες θυρεοειδείς φλέβες (παροχετεύουν τη μέση μοίρα των λοβών του αδένα, εκβάλλουν μέσα στις έσω σφαγίτιδες φλέβες),
- οι κάτω θυρεοειδείς φλέβες (παροχετεύουν τους κάτω πόλους του αδένα, εκβάλλουν μέσα στις βραχιονοκεφαλικές ή ανώνυμες φλέβες πίσω από την λαβή του στέρνου (1)).



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 1. Ανατομία και αγγείωση θυρεοειδούς αδένος (3)

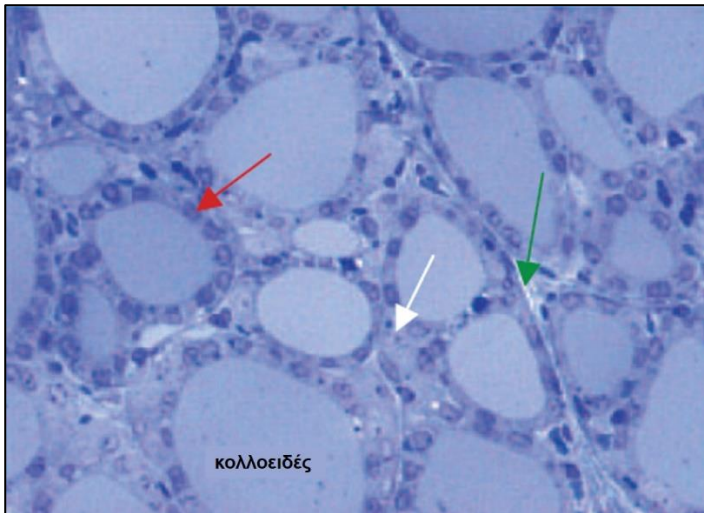
## 1.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΟΣ

Ο θυρεοειδής αδένος περιβάλλεται από μία ινώδη κάψα από την οποία ξεκινούν διαφραγμάτια, τα οποία χωρίζουν το παρέγχυμα σε λόβια (4). Μεταξύ των λοβίων παρεμβάλλονται αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και λεμφαγγεία. Κάθε λόβιο αποτελείται από πολυάριθμα θυλάκια, τα θυρεοειδικά θυλάκια, τα οποία είναι η δομική και λειτουργική μονάδα του αδένος. Τα θυλάκια βρίσκονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, ενώ χωρίζονται μόνο από αραιό δικτυωτό συνδετικό ιστό. Το κάθε θυλάκιο αποτελείται από μονόστιβο κυβοειδές επιθήλιο, που καλείται θυλακικό θυρεοειδικό επιθήλιο (5).

Τα θυλακικά ή θυρεοειδικά κύτταρα, τα οποία αποτελούν την πλειοψηφία των κυττάρων του θυλακίου, επενδύουν το τοίχωμα του θυλακίου και στηρίζονται στο βασικό υμένιο. Έχουν σφαιρικό πυρήνα στο κέντρο, στη βάση τους υπάρχει πλούσιο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ), ενώ στην κορυφή συσκευές Golgi, εκκριτικά κοκκία, φαγοσώματα, λυσοσώματα και μικρολάχνες. Τα επιθηλιακά, αυτά, κύτταρα περιβάλλουν έναν κεντρικό αυλό, ο οποίος περιέχει μια ζελατινώδη, οξύφιλη ουσία που καλείται κολλοειδές (Εικόνα 2). Το κολλοειδές είναι πλούσιο σε θυρεοσφαιρίνη, μια ιωδιούχο γλυκοπρωτεΐνη. Ο θυρεοειδής αδένος είναι ο

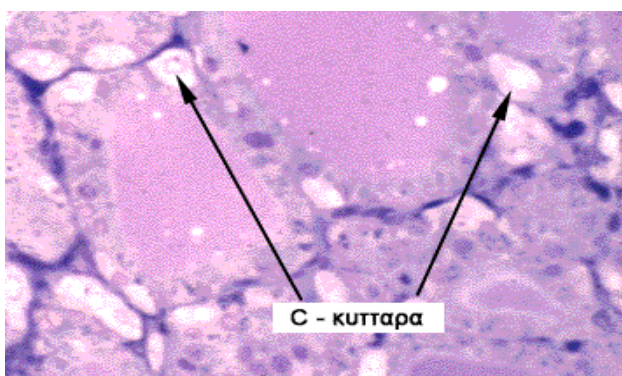
Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

μοναδικός αδένας στον οποίο γίνεται αποθήκευση εκκρίματος, συγκεκριμένα ιωδιωμένης θυρεοσφαιρίνης, στον εξωκυττάριο χώρο (στο κολλοειδές της κοιλότητας των θυλακίων (4).



**Εικόνα 2. Φωτομικρογραφία χαμηλής ισχύος θυρεοειδούς αδένα αρουραίου.** Τα θυλάκια θυρεοειδούς που φαίνονται σε διατομή γεμίζουν ομοιόμορφα το κολλοειδές με χρώση και αποτελούνται από ένα μόνο στρώμα επιθηλιακών κυττάρων (κόκκινο βέλος). Σημειώστε ότι τα θυλάκια δεν είναι ομοιόμορφα σε μέγεθος ή σχήμα. Το λευκό βέλος δείχνει ένα παραθυλακικό κύτταρο και το πράσινο βέλος δείχνει ένα διάφραγμα συνδετικού ιστού που χωρίζει δύο λοβία. (6)

Τα παραθυλακικά ή κύτταρα C, τα οποία αποτελούν περίπου το 10% των κυττάρων του θυλακίου, προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία, βρίσκονται μέσα από το βασικό υμένα του θυλακικού επιθηλίου ή σε ομάδες μεταξύ των θυλακίων, ενώ δεν επικοινωνούν με την κοιλότητα του θυλακίου. Συνήθως, είναι λίγο μεγαλύτερα από τα θυλακικά, ενώ έχουν λιγότερο ΑΕΔ, μεγάλες συσκευές Golgi και πολλά μικρά κοκκία που περιέχουν καλσιτονίνη. Η έκκριση καλσιτονίνης διεγείρεται όταν αυξηθεί το ασβέστιο στο αίμα και έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης των οστεοκλαστών (4, 5).



**Εικόνα 3. Κύτταρα C (παραθυλακικά) (7).**

Τα θυλάκια ποικίλλουν σε σχήμα και μέγεθος ανάλογα με την λειτουργικότητά τους. Όταν ο αδένας είναι ενεργός, τα θυλάκια είναι μικρά, τα θυλακικά κύτταρα έχουν σχήμα από χαμηλό κυβοειδές έως κυλινδρικό, ενώ παρατηρείται μικρή ποσότητα κολλοειδούς. Όταν ο αδένας είναι ανενεργός, τα θυλάκια είναι μεγάλα, τα θυλακικά κύτταρα έχουν μορφή πλακώδους επιθηλίου και το κολλοειδές είναι άφθονο (4, 5).

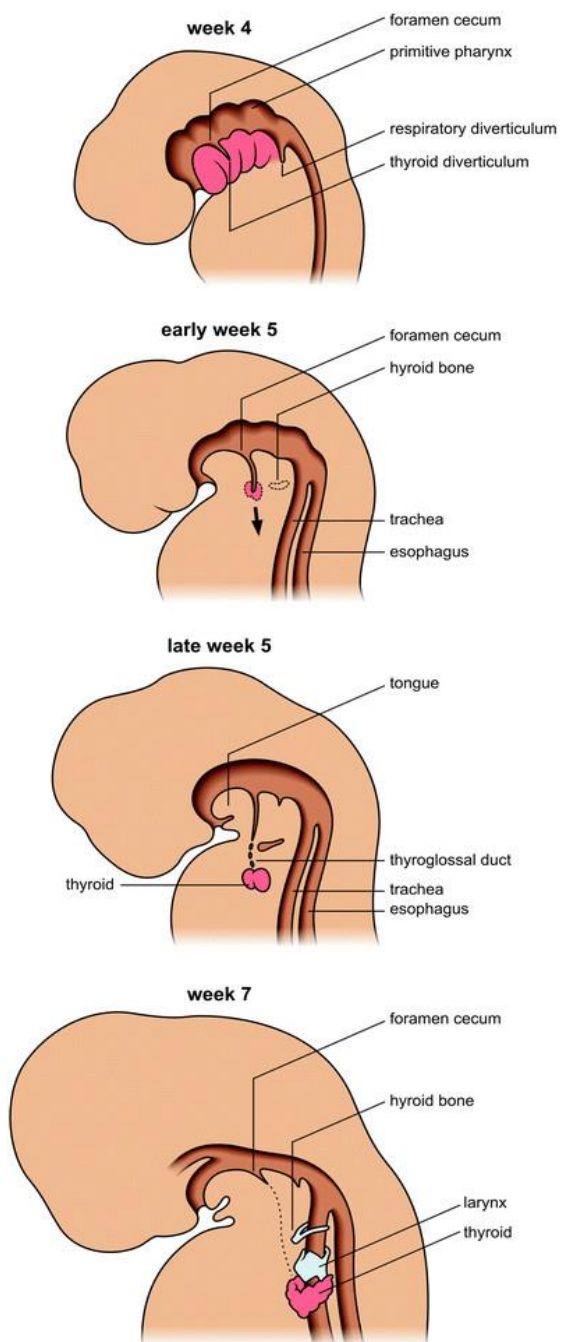
### 1.3 ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Ο θυρεοειδής αδένας είναι ο πρώτος ενδοκρινής αδένας που αρχίζει να αναπτύσσεται στο έμβρυο και η ανάπτυξή του εκτιμάται ότι ξεκινάει περίπου την 24<sup>η</sup> μέρα της κύησης. Η εμβρυολογική του προέλευση αφορά δύο διαφορετικούς εμβρυϊκούς ιστούς, τον αρχέγονο φάρυγγα και τη νευρική ακρολοφία. Ο αδένας αρχίζει να αναπτύσσεται ως μια πάχυνση στο σημείο όπου βρίσκεται το τυφλό τρήμα (foramen cecum) της γλώσσας, δηλαδή στην βάση του φάρυγγα, και προέρχεται από τον πολλαπλασιασμό ενδοδερμικών κυττάρων. Αυτή η πάχυνση αναπτύσσεται και σχηματίζει το θυρεοειδικό εκκόλπωμα (μια μέση φαρυγγική προσεκβολή) και το οποίο μεταναστεύει προς τα κάτω σχηματίζοντας τον θυρεογλωσσικό πόρο. Ο πόρος αυτός φυσιολογικά εξαφανίζεται μέχρι τη γέννηση, αλλιώς δημιουργεί παθολογικές καταστάσεις. Το θυρεοειδικό εκκόλπωμα που σχηματίστηκε φτάνει ως το βάθος του θυρεοειδούς χόνδρου όπου το μέγεθός του αυξάνεται και δημιουργεί τους λοβούς του θυρεοειδούς αδένα (8).

Πιο συγκεκριμένα:

- 24<sup>η</sup> μέρα: Σχηματίζεται το θυρεοειδικό εκκόλπωμα, το οποίο αρχίζει να κατεβαίνει και έτσι σχηματίζεται και ο θυρεογλωσσικός πόρος,
- 4<sup>η</sup> – 5<sup>η</sup> εβδομάδα: το θυρεοειδικό εκκόλπωμα επεκτείνεται και σχηματίζει τους λοβούς του αδένα, ενώ συγχρόνως ο θυρεογλωσσικός πόρος ατροφεί και 'κλείνει',
- 7<sup>η</sup> εβδομάδα: ολοκληρώνεται η κάθοδος του θυρεοειδούς, ο οποίος και λαμβάνει τη θέση του ακριβώς μπροστά από την τραχεία και κάτω από τον λάρυγγα,
- 9<sup>η</sup> εβδομάδα: τα θυρεοειδικά κύτταρα φτιάχνουν δίκτυο επιθηλιακών δοκίδων,
- 10<sup>η</sup> εβδομάδα: σχηματίζονται μικρές κυτταρικές ομάδες με ελεύθερο χώρο κεντρικά,
- 11<sup>η</sup> εβδομάδα: σχηματίζεται το κολλοειδές,
- 14<sup>η</sup> εβδομάδα: αυξάνεται το μέγεθος των θυλακίων,
- 16<sup>η</sup> εβδομάδα: ο θυρεοειδής είναι, πλέον, ικανός να παράγει θυρεοειδικές ορμόνες  
(**Εικόνα 4**) (9, 10).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



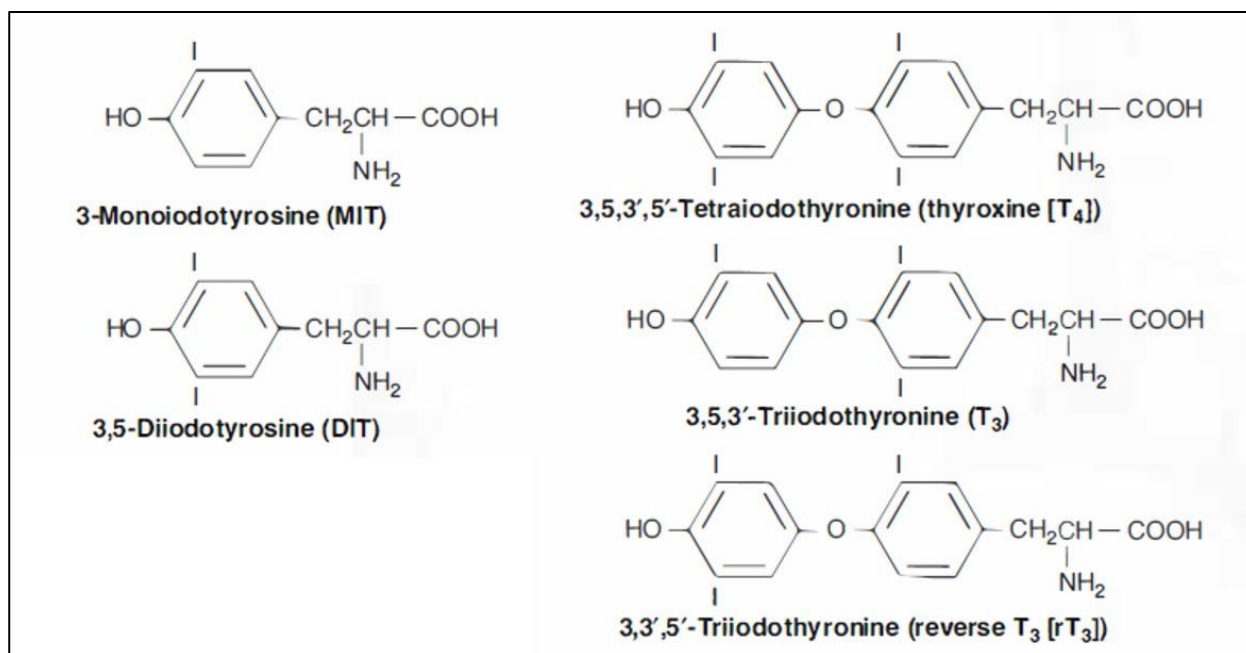
Εικόνα 4. Εμβρυική ανάπτυξη και κάθοδος θυρεοειδούς (foramen cecum: τυφλό τρήμα, primitive pharynx: αρχέγονος φάρυγγας, thyroid diverticulum: θυρεοειδικό εκκόλπωμα, thyroglossal duct: θυρεογλωσσικός πόρος) (11).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

## 1.4 ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΕΣ ΟΡΜΟΝΕΣ

### 1.4.1 Δομή θυρεοειδικών ορμονών

Οι θυρεοειδικές ορμόνες είναι δύο: η τετραϊώδοθυρονίνη ή θυροξίνη ( $T_4$ ) και η τριωδοθυρονίνη ( $T_3$ ). Περιέχουν το 59 - 65% του ιωδίου του οργανισμού. Προκύπτουν από την συνένωση μονοϊώδοτυροσινών ή διϊώδοτυροσινών με μια διαδικασία που θα αναλυθεί παρακάτω (12). Η μοριακή τους δομή παρουσιάζεται στην **Εικόνα 5**.



Εικόνα 5. Δομή των θυρεοειδικών ορμονών και σχετικών ενώσεων (12)

### 1.4.2 Σύνθεση θυρεοειδικών ορμονών

Στη σύνθεση των ορμονών του θυρεοειδούς συμμετέχουν δύο σημαντικές πρωτεΐνες: η θυρεοσφαιρίνη (TG) και η θυρεοειδική υπεροξειδάση (TPO).

Η TG είναι μια μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από 5.496 αμινοξέα και έχει MB ~660.000. Περιέχει περίπου 140 υπολείμματα τυροσίνης (12). Μόρια της TG πλούσια σε τυροσίνη παράγονται στο ΑΕΔ των θυρεοειδικών κυττάρων, στη συνέχεια οργανώνονται σε κυστίδια από τη συσκευή Golgi και εξέρχονται με εξωκυττάρωση στον αυλό του θυλακίου.

Η TPO είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη με MB ~102.000. Η TPO συμβάλλει στην οξείδωση των ιόντων του ιωδίου και ενσωματώνει το ιώδιο στα υπολείμματα τυροσίνης της θυρεοσφαιρίνης (12). Αν και η απορρόφηση ιωδίου μπορεί να γίνει και σε άλλους ιστούς, όπως στους σιελογόνους αδένες, στους μαζικούς αδένες και στον στόμαχο, η οξείδωση του ιωδίου μπορεί να γίνει μόνο στον θυρεοειδή λόγω της παρουσίας αυτής της πρωτεΐνης (13).

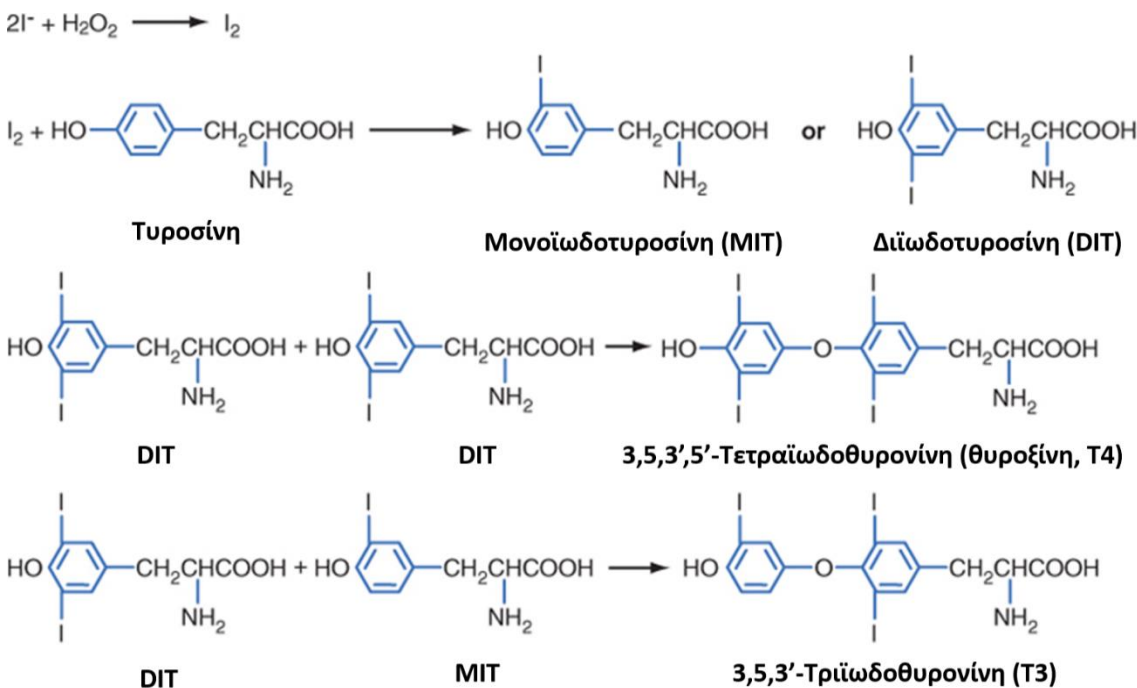
Η σύνθεση της  $T_4$  και της  $T_3$  από τον θυρεοειδή αδένα επιτελείται ως εξής:

- Το πρώτο και πολύ σημαντικό βήμα στη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών είναι η πρόσληψη και απορρόφηση ιωδίου από τις τροφές. Το ιώδιο που απορροφάται μεταφέρεται συνδεδεμένο κυρίως στην αλβουμίνη (λευκωματίνη) αλλά και σε άλλες πρωτεΐνες (14). Το  $I^-$  εισέρχεται στα θυλάκια μεταφερόμενο δια μέσου της βασικής μεμβράνης του θυρεοειδικού κυττάρου με τη βοήθεια μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης που

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

ονομάζεται συν - μεταφορέας  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (η διαδικασία καλείται παγίδευση ιωδίου). Το ένζυμο  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ΑΤΡάση διαμορφώνει την κλίση ιόντος και κατευθύνει, έτσι, την αντίδραση. Η θυρεοειδική παγίδευση του ιωδίου διεγείρεται σε μεγάλο βαθμό από την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH), για την οποία θα γίνει συζήτηση παρακάτω (12).

- Το ιώδιο ( $\text{I}^-$ ) εξέρχεται στον αυλό του θυλακίου μέσω ανιμεταφορέων  $\text{I}^-/\text{Cl}^-$ .
- Στην επιφάνεια επαφής κυττάρου - κολλοειδούς, το  $\text{I}^-$  οξειδώνεται με ταχύ ρυθμό από το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) με την καταλυτική επίδραση της TPO. Η οξείδωση του ιωδίου το μετατρέπει σε ένα δραστικό ενδιάμεσο, το οποίο ενσωματώνεται στον βενζολικό δακτύλιο των υπολειμμάτων της τυροσίνης της TG, παίρνοντας τη θέση του  $\text{H}^+$  (ιωδίωση μορίων τυροσίνης της TG).
- Ακολουθεί σύζευξη των υπολειμμάτων ιωδοτυροσίνης στη TG. Όταν δεσμεύεται ένα ιώδιο σχηματίζεται η μονοϊωδοτυροσίνη (Μονοϊωδοτυροσίνη - MIT). Όταν γίνεται σύνδεση δύο μορίων ιωδίου σχηματίζεται η διϊωδοτυροσίνη (Diiodotyrosine - DIT). Η διαδικασία ονομάζεται οργανοποίηση του ιωδίου. Οι θυρεοειδικές ορμόνες σχηματίζονται σε αυτό το στάδιο με την επίδραση της TPO, η οποία καταλύει τη δέσμευση δύο μορίων DIT, σχηματίζοντας την  $\text{T}_4$  ή τη σύνδεση ενός μορίου DIT σε ένα μόριο MIT, σχηματίζοντας την  $\text{T}_3$  (**Εικόνα 6**). Τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών παραμένουν συνδεδεμένα με τη TG.

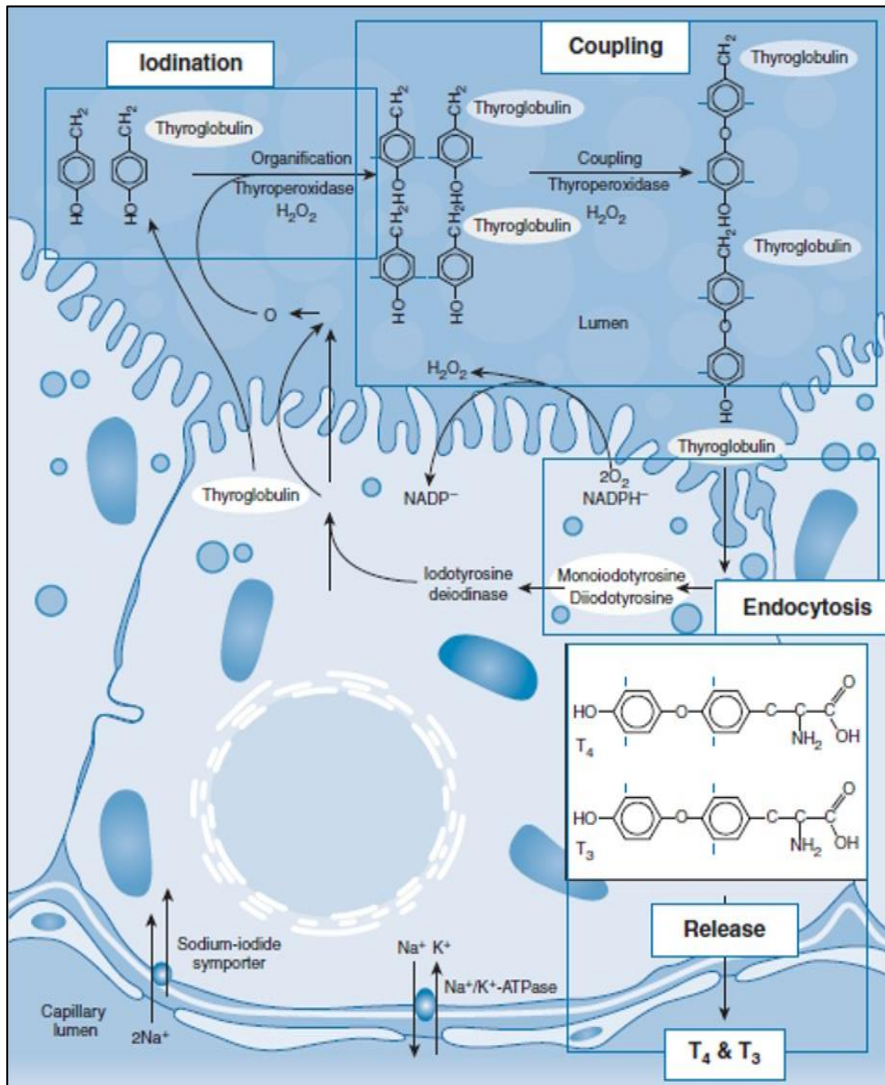


Εικόνα 6. Σχηματισμός  $\text{T}_4$  και  $\text{T}_3$  μέσω της σύνδεσης DIT και MIT (15).

- Η ώριμη TG, που περιέχει MIT, DIT,  $\text{T}_4$  και  $\text{T}_3$  (αναγράφονται κατά φθίνουσα σειρά συγκέντρωσης) εισέρχεται εντός των θυλακίων με ενδοκυττάρωση και μπορεί να αποθηκευτεί ως σταγονίδια κολλοειδούς έως ότου να εκκριθεί (16).
  - Τέλος, ακολουθεί η πρωτεόλυση του κολλοειδούς, η οποία διεγείρεται από την TSH. Πιο συγκεκριμένα, τα λυσοσώματα που βρίσκονται εντός του θυλακίου περιέχουν
- ‘Α. Γκίκα

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

λυσσοσωμιακά ένζυμα, τα οποία συντίθενται στο ΑΕΔ και συσκευάζονται από το σύμπλεγμα Golgi. Τα λυσοσώματα, αυτά, συγχωνεύονται με τα σταγονίδια κολλοειδούς και προκαλούν την υδρόλυση της θυρεοσφαιρίνης με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται  $T_4$ ,  $T_3$ , DIT, MIT, θραύσματα πεπτιδίων και αμινοξέα. Οι θυρεοειδικές ορμόνες  $T_3$ ,  $T_4$  απελευθερώνονται στην κυκλοφορία εξερχόμενες από την πλαγιοβασική μεμβράνη των θυλακικών κυττάρων, ενώ τα μόρια MIT και DIT αποϊωδιώνονται, επανέρχονται στον αυλό του θυλακίου όπου γίνεται η σύνθεσή τους και το  $I^-$  διαφυλάσσεται (**Εικόνα 7**). Η TSH είναι η ορμόνη που διεγείρει την έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών (12).



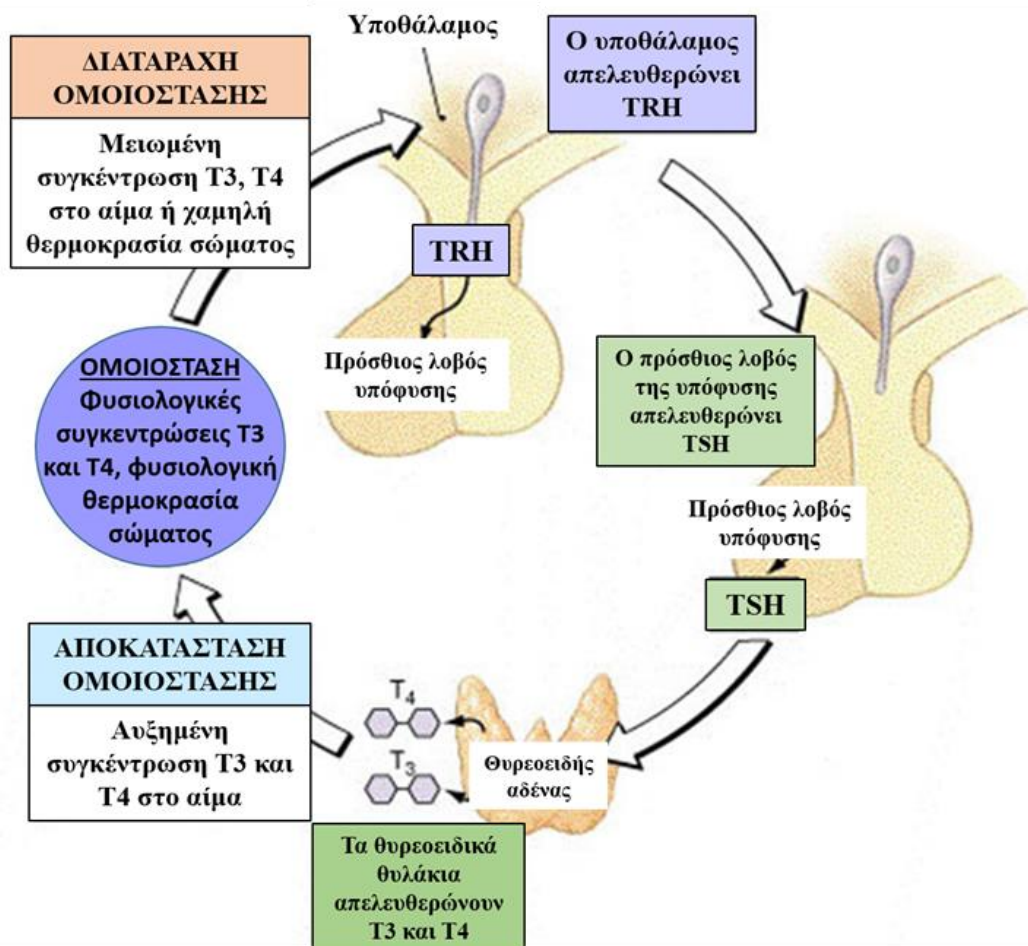
Εικόνα 7. Επισκόπηση της διαδικασίας σύνθεσης θυρεοειδικών ορμονών στο θυλακίωδες κύτταρο. (17)

### 1.4.3 Μηχανισμός έκκρισης θυρεοειδικών ορμονών Ρύθμιση άξονα υποθαλάμου - υπόφυσης - θυρεοειδούς

Ο θυρεοειδικός άξονας υπόκειται στον μηχανισμό της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης (**Εικόνα 8**). Η θυρεοεκλυτική ορμόνη (TRH), είναι μια ορμόνη που παράγεται στον υποθάλαμο και διεγείρει την παραγωγή της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH: θα αναλυθεί παρακάτω) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η TSH με τη σειρά της δρα στον θυρεοειδή αδένα, διεγείροντάς τον προς παραγωγή και έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών ( $T_3$  και  $T_4$ ). Οι τελευταίες δρουν ανασταλτικά προς την παραγωγή TRH και TSH. Σύμφωνα με τα παραπάνω, όταν τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο αίμα βρίσκονται σε

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

χαμηλά επίπεδα, διεγείρεται η παραγωγή της TRH και συνεπώς της TSH, με αποτέλεσμα αύξηση των θυρεοειδικών ορμονών στο αίμα. Αντιθέτως, σε αυξημένη παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών αναστέλλεται η παραγωγή της TRH από τον υποθάλαμο, γεγονός που αναστέλλει την παραγωγή της TSH από την υπόφυση και αυτό έχει ως συνέπεια μειωμένη παραγωγή θυρεοειδικών ορμονών. Ο μηχανισμός της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης είναι καθοριστικός στη διατήρηση των ορμονών του θυρεοειδούς εντός φυσιολογικών επιπέδων (14, 17).



Εικόνα 8. Άξονας υποθαλάμου - υπόφυσης - θυρεοειδούς (18) <http://thyroidanatomy.blogspot.gr>

### Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη ή θυρεοτροπίνη (TSH)

Η έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών, όπως αναφέρθηκε, διεγείρεται κυρίως από μία ορμόνη του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, την TSH. Η TSH είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με MB~28.000 και η σύνθεσή της γίνεται από τα θυρεοτρόπα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Αποτελείται από δύο υπομονάδες:

- Υπομονάδα α: είναι κοινή για την TSH και για τις γλυκοπρωτεΐνες της υπόφυσης: ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), καθώς και για την πλακουντιακή ορμόνη, χοριακή γοναδοτροπίνη (HCG). Η ανθρώπινη α υπομονάδα αποτελείται από μια αλληλουχία 92 αμινοξέων και διαθέτει δύο ολιγοσακχαριτιδικές αλυσίδες.



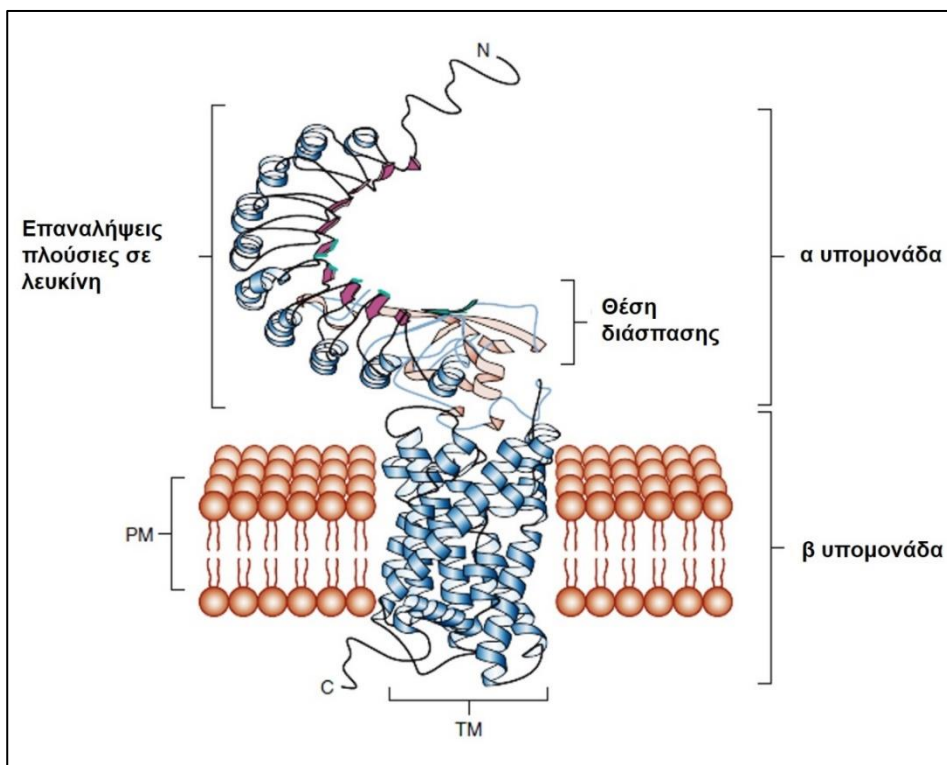
Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

- Υπομονάδα β: διαφέρει για κάθε γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη της υποφύσεως εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εξειδίκευση στη σύνδεσή της με άλλα μόρια αλλά και στη βιολογική της δράση. Η ανθρώπινη β υπομονάδα αποτελείται από μια αλληλουχία 112 αμινοξέων και διαθέτει μία ολιγοσακχαριτιδική αλυσίδα. Η γλυκοζυλίωση γίνεται στο ΑΕΔ και στο σύστημα Golgi των θυλακικών κυττάρων (12).

#### A. Δράση της TSH

Η TSH επιτυγχάνει τις λειτουργίες της μέσω της πρόσδεσής της σε έναν ειδικό υποδοχέα, τον υποδοχέα της TSH (TSH Receptor -TSHR) (**Εικόνα 9**), ο οποίος βρίσκεται στη μεμβράνη του θυρεοειδικού κυττάρου, αλλά και μέσω της ενεργοποίησης του συστήματος πρωτεΐνη G - αδενυλική κυκλάση - cAMP αλλά και του συστήματος της φωσφολιπάσης C (12). Ο TSHR είναι ένας επταδιαμεμβρανικός υποδοχέας, δηλαδή ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων που διαπερνούν επτά φορές τη μεμβράνη του κυττάρου και είναι συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη G. Ο TSHR ενώνεται με μια α υπομονάδα της G - πρωτεΐνης, ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση και αυτό οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή cAMP (14). Δομικά διαχωρίζεται σε δύο υπομονάδες:

- Υπομονάδα α: περιέχει 397 αμινοξέα και αποτελεί την εξωκυττάρια περιοχή δέσμευσης της TSH,
- Υπομονάδα β: αποτελεί το ενδομεμβρανικό και το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα (12).



**Εικόνα 9. Σχηματική δομή του TSHR.** Ο TSHR έχει επτά διαμεμβρανικές περιοχές, μία μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή και μία μικρή ενδοκυτταρική περιοχή. Ο υποδοχέας διασπάται, πιθανώς μετά την ενεργοποίηση, σε α και β υπομονάδες. Η α-υπομονάδα πιστεύεται ότι αποβάλλεται από την κυτταρική επιφάνεια. C: καρβοξυτελικό άκρο. N: αμινοτελικό άκρο. PM: πλασματοκυτταρική μεμβράνη. TM: διαμεμβρανική περιοχή (19).

## B. Δράσεις της TSH στα θυρεοειδικά κύτταρα

Η TSH επιτελεί πολλές δράσεις στα κύτταρα του θυρεοειδούς. Ως επί το πλείστον οι δράσεις της πραγματοποιούνται μέσω του συστήματος πρωτεΐνης G – αδενυλικής κυκλάσης – cAMP, αλλά υπάρχουν περιπτώσεις που συμμετέχει και το σύστημα φωσφατιδυλικής ινοσιτόλης (PIP<sub>2</sub>). Οι πιο σημαντικές δράσεις της TSH είναι οι εξής:

- Προκαλεί μεταβολές στη μορφολογία των θυρεοειδικών κυττάρων. Συγκεκριμένα σχηματίζονται ψευδοπόδια στην κορυφαία πλευρά του κυττάρου (η οποία έρχεται σε επαφή με το κολλοειδές) με συνέπεια να επιταχύνεται η πρόσληψη της ώριμης TG από το κύτταρο. Το κολλοειδές στον αυλό του θυλακίου μειώνεται, αφού σταγονίδια κολλοειδούς σχηματίζονται ενδοκυτταρικά, οδηγώντας στον σχηματισμό λυσοσωμάτων τα οποία θα προκαλέσουν την υδρόλυση της TG .
- Διεγείρει τον μεταβολισμό του ιωδίου σε όλες του τις φάσεις. Συγκεκριμένα, διεγείρει την αυξημένη πρόσληψη ιωδίου, τη μεταφορά του στην κυκλοφορία (προκαλείται με την αύξηση του cAMP), την αυξημένη ιωδίωση των υπολειμμάτων τυροσίνης της TG (διεγείρεται από την υδρόλυση της PIP<sub>2</sub> και από την αύξηση του ενδοκυττάρου Ca<sup>2+</sup>) αλλά και την αυξημένη έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών.
- Διεγείρει την κυτταρική αύξηση των θυρεοειδικών κυττάρων.
- Προκαλεί αύξηση του mRNA της TG και της TPO.
- Προκαλεί αυξημένη λυσοσωμιακή δραστηριότητα με αποτέλεσμα την αυξημένη έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub> από τα θυλάκια του αδένου.
- Διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης και αυξάνει την οξειδωσή της.
- Διεγείρει την κατανάλωση O<sub>2</sub> και την παραγωγή CO<sub>2</sub> (12).

### Άλλοι παράγοντες της σύνθεσης και έκκρισης των ορμονών

Τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών, πέρα από την TSH, επηρεάζουν και πολλοί αυξητικοί παράγοντες. Οι περισσότεροι από αυτούς παράγονται αποκλειστικά στον θυρεοειδή. Στους αυξητικούς παράγοντες περιλαμβάνονται οι εξής:

- Ινσουλινομόρφος αυξητικός παράγοντας I (IGF - I),
- επιδερμικός αυξητικός παράγοντας,
- τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας β (TGF - β),
- ενδοθηλίνες και
- διάφορες κυτοκίνες (12).

### 1.4.5 Μεταφορά θυρεοειδικών ορμονών

Οι θυρεοειδικές ορμόνες T<sub>4</sub> και T<sub>3</sub> φυσιολογικά βρίσκονται στο πλάσμα σε συγκεντρώσεις περίπου 5,00 - 12,50 μg/dL ή 60 - 150 nmol/L και περίπου 0,80 - 2,00 ng/mL ή 1 - 2,9 nmol/L αντίστοιχα και μεταφέρονται σε αυτό είτε συνδεδεμένες σε μεταφορικές πρωτεΐνες

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

του πλάσματος σε ποσοστό 99,96% για την T<sub>4</sub> και 99,60% για την T<sub>3</sub>, είτε «ελεύθερες» σε μικρότερο ποσοστό 0,04% για την T<sub>4</sub> και 0,4% για την T<sub>3</sub>. Οι τρεις κύριες πρωτεΐνες μεταφοράς των θυρεοειδικών ορμονών είναι οι εξής:

- Σφαιρίνη δέσμησης της θυροξίνης ή θυρεοδεσμευτική σφαιρίνη (Thyroxine-binding Globulin - TBG): Η συγκέντρωσή της στο πλάσμα φυσιολογικά είναι 15 - 30 μg/mL ή 280 - 560 nmol/L. Συντίθεται στο ήπαρ και αποτελείται από μια μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα 54 kDa, ενώ περιέχει και τέσσερις υδατανθρακικές αλυσίδες οι οποίες αντιστοιχούν στο 23% (~1/4) του συνολικού βάρους του μορίου της. Είναι η κύρια πρωτεΐνη με την οποία μεταφέρονται οι T<sub>4</sub> και T<sub>3</sub> στο πλάσμα, καθώς παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για αυτά τα μόρια. Πιο συγκεκριμένα, η TBG μεταφέρει, κάθε στιγμή, περίπου το 70% των θυρεοειδικών ορμονών που βρίσκονται στην κυκλοφορία. Κάθε μόριο της TBG έχει την ικανότητα να δεσμεύει μόνο ένα μόριο T<sub>4</sub> ή T<sub>3</sub> κάθε φορά. Μόνο το 1/3 της TBG είναι κορεσμένο σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub>. Όταν η TBG φτάσει σε πλήρη κορεσμό, μεταφέρει περίπου 20 μg/dL T<sub>4</sub> (12, 20).
- Δεσμευτική προ - αλβουμίνη δέσμησης της θυροξίνης ή τρανσθυρετίνη (Thyroid hormone binding by human serum prealbumin –TBPA ή Transthyretin): Η συγκέντρωσή της στο πλάσμα φυσιολογικά είναι 120 - 240 mg/dL ή 2250 - 4300 nmol/L. Είναι ένα σφαιρικό πολυπεπτίδιο 55 kDa, αποτελούμενο από τέσσερις όμοιες υπομονάδες. Κάθε μία υπομονάδα αποτελείται από 127 αμινοξέα. Η TBPA παρουσιάζει δέκα φορές υψηλότερη συγγένεια για την T<sub>4</sub> από ότι για την T<sub>3</sub>, με αποτέλεσμα να μεταφέρει κυρίως T<sub>4</sub> και συγκεκριμένα δεσμεύει περίπου το 10% της T<sub>4</sub> που βρίσκεται στην κυκλοφορία. Η TBPA αποτελεί μια πηγή άμεσα διαθέσιμης T<sub>4</sub>, καθώς η αποδέσμευση των θυρεοειδικών ορμονών από αυτήν γίνεται με ταχύτατο ρυθμό (12).
- Αλβουμίνη ή λευκωματίνη (ALB): Η συγκέντρωσή της στο πλάσμα φυσιολογικά είναι 3,5 - 5 g/dL, καθώς αποτελεί το 60% των πρωτεϊνών του πλάσματος στον άνθρωπο. Παράγεται στο ήπαρ και σχηματίζεται από μία μόνο πολυπεπτιδική αλυσίδα της τάξης των 65 kDa, ενώ δεν σχετίζεται με υδατάνθρακες. Η ALB διαθέτει μία θέση ισχυρής δέσμησης για την T<sub>4</sub> και την T<sub>3</sub> και αρκετές άλλες θέσεις οι οποίες, όμως, είναι λιγότερο ισχυρής δέσμησης. Μεταφέρει περίπου το 15% των θυρεοειδικών ορμονών που βρίσκονται στην κυκλοφορία μόνο και μόνο λόγω της υψηλής συγκέντρωσης της στο πλάσμα. Η ALB αποτελεί κύρια πηγή ελεύθερων ορμονών για τους ιστούς, διότι αποδεσμεύει ταχύτατα τις T<sub>4</sub> και T<sub>3</sub> (12).

Υπάρχουν διάφορες υποθέσεις για τον ρόλο που διαδραματίζουν οι μεταφορικές πρωτεΐνες των θυρεοειδικών ορμονών όπως:

- Αποθήκευση των θυρεοειδικών ορμονών ώστε να υπάρχει άμεση διάθεση «ελεύθερων» ορμονών
- Παροχή των θυρεοειδικών ορμονών σε όλους τους ιστούς, λόγω της συχνής εξάντλησης των αποθεμάτων των «ελεύθερων» ορμονών (λόγω μικρής αρχικής συγκέντρωσης)
- Προστασία των διαφόρων ιστών από την υπερβολική απελευθέρωση «ελεύθερων» ορμονών στην κυκλοφορία (12).

Φυσιολογικά, η συγκέντρωση της T<sub>4</sub> είναι 50 φορές πιο υψηλή από αυτήν της T<sub>3</sub>. Παρόλα αυτά, ο τρόπος που γίνεται η σύνδεση των ορμονών αυτών στις μεταφορικές πρωτεΐνες καθιστά τη συγκέντρωση της «ελεύθερης» T<sub>4</sub> (Free T<sub>4</sub> - FT<sub>4</sub>) να είναι μόνο 2 - 3 φορές υψηλότερη σε σχέση με αυτήν της «ελεύθερης» T<sub>3</sub> (Free T<sub>3</sub> - FT<sub>3</sub>).

Το άθροισμα της δεσμευμένης σε μεταφορική πρωτεΐνη  $T_4$  ή  $T_3$  και της  $FT_4$  ή  $FT_3$  αποτελεί τη συνολική ποσότητα της  $T_4$  ή της  $T_3$  αντίστοιχα στην κυκλοφορία. Βιολογικά ενεργές είναι μόνο οι «ελεύθερες»  $T_4$  και  $T_3$ . Σε ορισμένες καταστάσεις στις οποίες μπορεί να αυξηθούν τα επίπεδα των πρωτεϊνών που δεσμεύουν τις  $T_4$  και  $T_3$  (π.χ. σε λήψη οιστρογόνων), αρχικά θα αυξηθεί η ποσότητα της δεσμευμένης ορμόνης με άμεση συνέπεια τη μείωση της «ελεύθερης», ώστε να διατηρηθεί στο ίδιο επίπεδο η συνολική ποσότητα ορμόνης. Στη συνέχεια, όμως, θα ακολουθήσει αυξημένη έκκριση θυρεοειδικών ορμονών από τον θυρεοειδή (με την επίδραση της TSH), ώστε τα επίπεδα των «ελεύθερων» ορμονών να φτάσουν εκ νέου στα φυσιολογικά τους όρια. Στην ουσία, η απελευθέρωση της TSH ελέγχεται αποκλειστικά από τα επίπεδα των «ελεύθερων» ορμονών (μηχανισμός παλίνδρομης ρύθμισης), ώστε να τις διατηρεί σε σταθερά επίπεδα.

Το αντίθετο, δηλαδή η πτώση της συγκέντρωσης των μεταφορικών πρωτεϊνών θα προκαλούσε αρχική αύξηση στις «ελεύθερες» ορμόνες που, όμως, σύντομα θα επανερχόντουσαν στα φυσιολογικά τους επίπεδα μέσω παλίνδρομης ρύθμισης της TSH. Και στις δύο περιπτώσεις που αναφέρθηκαν, τελικά θα υπήρχε διαφοροποίηση στις συγκεντρώσεις μόνο των ολικών ορμονών, ενώ οι ελεύθερες ορμόνες θα διατηρούσαν φυσιολογικές τις συγκεντρώσεις τους (20).

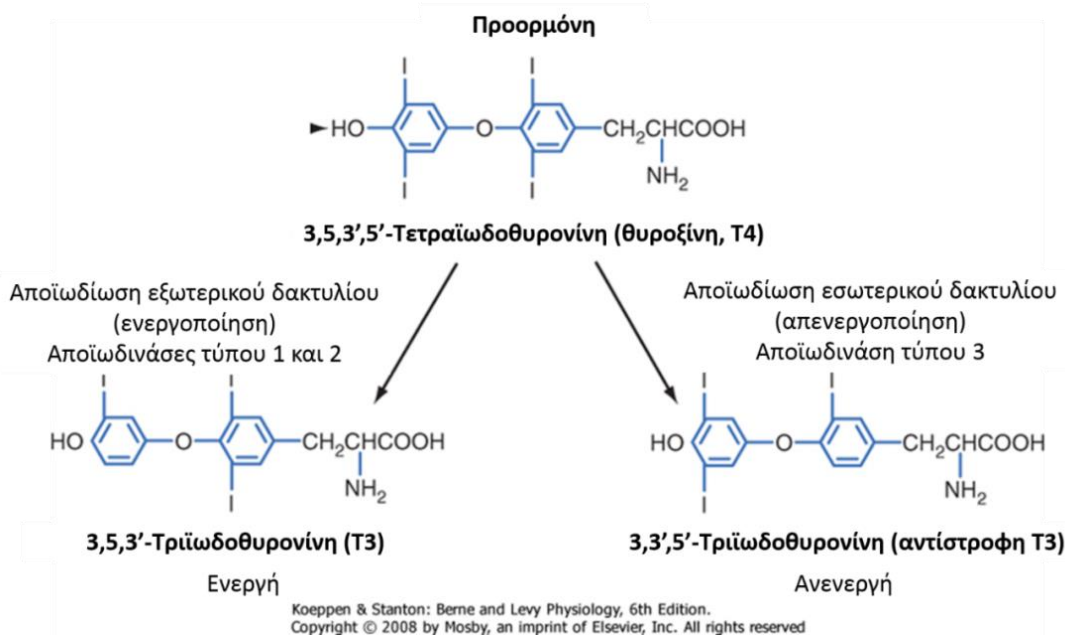
#### 1.4.6 Μεταβολισμός θυρεοειδικών ορμονών

Το υψηλό ποσοστό πρόσδεσης των θυρεοειδικών ορμονών στις μεταφορικές πρωτεΐνες (~99,7%) οδηγεί στο γεγονός ότι ελάχιστες ποσότητες  $T_4$  και  $T_3$  απεκκρίνονται από τους νεφρούς (αφού φυσιολογικά οι πρωτεΐνες δε μπορούν να περάσουν το αγγειώδες σπείραμα). Οι θυρεοειδικές ορμόνες αποδομούνται κυρίως με αποϊώδωση και μεταβολισμό τους στους διάφορους ιστούς ή με δέσμευση στο ήπαρ και απέκκρισή τους στη χολή.

Αν και η έκκριση της  $T_4$  από τα θυλακικά κύτταρα του θυρεοειδούς γίνεται σε μεγαλύτερη ποσότητα από ότι η έκκριση της  $T_3$ , ο περιφερικός μεταβολισμός της  $T_4$  έχει ως αποτέλεσμα το μεγαλύτερο ποσοστό της  $T_3$  στο πλάσμα να προέρχεται από την αποϊώδωση (αφαίρεση ατόμων ιωδίου) της  $T_4$  και όχι από την  $T_3$  που είχε αρχικά σχηματιστεί εντός των θυλακίων.

Τη βιολογική δραστικότητα των θυρεοειδικών ορμονών επηρεάζουν σε μέγιστο βαθμό οι θέσεις στις οποίες βρίσκονται τα άτομα ιωδίου. Με την αποϊώδωση του εξωτερικού δακτυλίου της  $T_4$  ( $5'$  - αποϊώδωση) παράγεται η  $T_3$  (3,5,3' - τριιωδοθυρονίνη), η οποία είναι βιολογικά τρεις έως οκτώ φορές ισχυρότερη από την  $T_4$ , ενώ με την αποϊώδωση του εσωτερικού δακτυλίου της  $T_4$  (5 - αποϊώδωση) παράγεται η ανάστροφη  $T_3$  (Reverse  $T_3$  -  $rT_3$ ) (3,3',5' - τριϊωδοθυρονίνη), η οποία είναι βιολογικά ανενεργή (**Εικόνα 10**). Στην ουσία, η μονο - αποϊώδωση του εξωτερικού δακτυλίου είναι μια διαδικασία «αναβάθμισης», αφού αυξάνεται η μεταβολική δραστικότητα του μορίου, ενώ η μονοαποϊώδωση του εσωτερικού δακτυλίου είναι μια διαδικασία «υποβάθμισης», αφού μειώνεται η μεταβολική δραστικότητα του μορίου. Αν συνεχιστεί η αποϊώδωση του μορίου, τότε αυτό γίνεται μεταβολικά αδρανές.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 10. Αποϊωδίωση της T<sub>4</sub> σε μεταβολικά ενεργή T<sub>3</sub> ή σε μεταβολικά ανενεργή rT<sub>3</sub> (15).

Τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις μονο - αποϊωδίωσης διαφέρουν αναλόγως του ιστού και είναι τα εξής:

- Τύπου I 5' – αποϊωδινάση (Deiodinase Type I – D1): βρίσκεται κυρίως στο ήπαρ και τους νεφρούς αλλά υπάρχει σε μικρές ποσότητες και στον θυρεοειδή αδένα, στους σκελετικούς μύες, στον καρδιακό μυ και σε άλλους ιστούς. Η βασική της λειτουργία είναι να μετατρέπει την T<sub>4</sub> στην μεταβολικά ισχυρότερη T<sub>3</sub> στο πλάσμα.
- Τύπου II 5' – αποϊωδινάση (Deiodinase Type II – D2): βρίσκεται κυρίως στον εγκέφαλο και την υπόφυση. Η βασική της δράση είναι να διατηρεί σταθερά τα ενδοκυττάρια επίπεδα της T<sub>3</sub> στο ΚΝΣ. Η αυξημένη συγκέντρωση της T<sub>4</sub> στο πλάσμα μειώνει το ένζυμο, προστατεύοντας τα εγκεφαλικά κύτταρα από τα αυξημένα επίπεδα της T<sub>3</sub>.
- Τύπου III αποϊωδινάση του τυροσινικού δακτυλίου ή 5 – αποϊωδινάση (Deiodinase Type III – D3): βρίσκεται κυρίως στον πλακούντα και στα νευρογλοιακά κύτταρα του ΚΝΣ. Η βασική της λειτουργία είναι να απενεργοποιεί τα μεταβολικά ενεργά μόρια. Συγκεκριμένα, μετατρέπει την T<sub>4</sub> σε rT<sub>3</sub> και την T<sub>3</sub> σε 3,3' - διϊωδοθυρονίνη (αδρανής) (21).

Με τη διαδικασία της αποϊωδίωσης μεταβολίζεται περίπου το 80% της T<sub>4</sub> σε T<sub>3</sub> (το 35%) και σε rT<sub>3</sub> (το 45%). Οι χρόνοι ημιζωής των ορμονών αυτών είναι:

- T<sub>4</sub>: t<sub>1/2</sub> ~ 7 ημέρες
- T<sub>3</sub>: t<sub>1/2</sub> ~ 1 ημέρα
- rT<sub>3</sub>: t<sub>1/2</sub> ~ 0,2 ημέρες

Η ταχύτερη κάθαρση των T<sub>3</sub> και rT<sub>3</sub> συμβαίνει λόγω της μειωμένης συγγένειάς τους με τις μεταφορικές πρωτεΐνες σε σχέση με αυτήν της T<sub>4</sub> (12).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

#### 1.4.7 Δράσεις των θυρεοειδικών ορμονών

##### Τρόπος δράσης θυρεοειδικών ορμονών

Οι θυρεοειδικές ορμόνες που βρίσκονται στην κυκλοφορία εισέρχονται εντός των κυττάρων - στόχων με παθητική διάχυση. Στη συνέχεια, δρουν κυρίως μέσω πυρηνικών υποδοχέων αν και μπορούν να δράσουν, επίσης, μέσω διέγερσης της πλασματικής μεμβράνης αλλά και διεγείροντας τις μιτοχονδριακές ενζυμικές αποκρίσεις. Οι θυρεοειδικές ορμόνες συνδέονται με υψηλή συγγένεια στους πυρηνικούς υποδοχείς, οι οποίοι ονομάζονται υποδοχείς θυρεοειδικών ορμονών (Thyroid Hormone Receptor - TR) και είναι οι εξής:

- TRα: βρίσκεται σε αφθονία στον εγκέφαλο, τους νεφρούς, τις γονάδες, τους μύες και την καρδιά,
- TRβ: παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στην υπόφυση και στο ήπαρ.

Η T<sub>3</sub> προσδένεται στους υποδοχείς της με περίπου 10 - 15 φορές υψηλότερη συγγένεια από ότι η T<sub>4</sub>, εξηγώντας την αυξημένη βιολογική της δραστικότητα. Οι θυρεοειδικές ορμόνες αφού συνδεθούν στους TR προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωσή τους, τροποποιώντας τις αλληλεπιδράσεις τους με μεταγραφικούς παράγοντες (12).

##### Φυσιολογικές δράσεις θυρεοειδικών ορμονών

Οι θυρεοειδικές ορμόνες ασκούν επιρροή σχεδόν σε όλα τα συστήματα του οργανισμού και μπορούν να δράσουν τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και ιστού.

Οι T<sub>4</sub> και T<sub>3</sub> επηρεάζουν το βασικό μεταβολισμό. Σε περίπτωση μειωμένης έκκρισης των ορμονών αυτών, ο βασικός μεταβολισμός μειώνεται, ενώ σε αντίθετη περίπτωση ο βασικός μεταβολισμός πυροδοτείται. Στο εσωτερικό των κυττάρων, οι θυρεοειδικές ορμόνες συνδεδεμένες στους υποδοχείς τους διεγείρουν τη παραγωγή πρωτεϊνών, ενζύμων αλλά και διαφόρων άλλων ορμονών (16). Προωθούν την κατανάλωση O<sub>2</sub> από τα μιτοχόνδρια, παράγοντας ενέργεια με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) ή με τη μορφή θερμότητας. Το ATP ενεργοποιεί την Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPάση της μεμβράνης. Αυξημένα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών οδηγούν σε αύξηση των λιπαρών οξέων στο πλάσμα, ενώ τα επίπεδα της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων είναι αντιστρόφως ανάλογα των επιπέδων της T<sub>4</sub> και της T<sub>3</sub> στο πλάσμα. Οι θυρεοειδικές ορμόνες, τέλος, επηρεάζουν το μεταβολισμό των υδαταθράκων, αυξάνοντας τη γλυκονεογένεση και τη γλυκογονόλυση προς παραγωγή γλυκόζης (17).

Οι θυρεοειδικές ορμόνες (T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub>) είναι ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική ανάπτυξη του ανθρώπου. Ειδικά στο έμβρυο, στο νεογνό και το βρέφος, οι θυρεοειδικές ορμόνες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ανεπάρκεια των ορμονών στην νεογνική ηλικία μπορεί να οδηγήσουν σε νοητική καθυστέρηση (κρετινισμός). Οι ορμόνες του θυρεοειδούς επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό και ένα πλήθος άλλων συστημάτων, παραδείγματα των οποίων αναφέρονται στον **Πίνακα 1**.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Πίνακας 1. Οι φυσιολογικές δράσεις των θυρεοειδικών ορμονών σε διάφορους ιστούς (22).

ΙΣΤΟΣ - ΣΤΟΧΟΣ	ΕΠΙΔΡΑΣΗ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ
Καρδιά	Χρονοτρόπος	Αύξηση του αριθμού και της συγγένειας σύνδεσης των β - αδρενεργικών υποδοχέων
	Ινοτρόπος	Ενίσχυση της απάντησης στις κυκλοφορούσες κατεχολαμίνες Αύξηση της αναλογίας της α - βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (με αυξημένη δραστηριότητα ΑΤΡάσης)
Λιπώδης ιστός	Καταβολική	Ενεργοποίηση της λιπόλυσης
Μύες	Καταβολική	Αυξημένη αποδόμηση πρωτεϊνών
Οστά	Μεταβολική και αναπτυξιακή	Προαγωγή της φυσιολογικής αύξησης και ωρίμανσης του σκελετού, επιτάχυνση του ρυθμού ανακύκλωσης των οστών
Νευρικό σύστημα	Αναπτυξιακή	Προαγωγή της φυσιολογικής ανάπτυξης του εγκεφάλου
Έντερο	Μεταβολική	Αύξηση του ρυθμού απορρόφησης των υδατανθράκων
Λιποπρωτεΐνες	Μεταβολική	Ενεργοποίηση του σχηματισμού των LDL - υποδοχέων
Άλλοι ιστοί	Θερμιδογόνος	Ενεργοποίηση της κατανάλωσης O <sub>2</sub> από μεταβολικά δραστικούς ιστούς (εξαιρέσεις: ο εγκέφαλος των ενηλίκων, οι όρχεις, η μήτρα, οι λεμφαδένες, ο σπλήνας, η πρόσθια υπόφυση)
		Αύξηση του μεταβολικού ρυθμού

### 1.5 ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Ο θυρεοειδής αδένας παρουσιάζει μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων που ταξινομικά χωρίζονται στις εξής:

- I. Κύστη του θυρεογλωσσικού πόρου (οφείλεται στην αδυναμία πλήρους υποστροφής του θυρεογλωσσικού πόρου, θεραπεία αποτελεί η χειρουργική εκτομή).
- II. Μη τοξική βρογχοκήλη (διόγκωση του θυρεοειδούς χωρίς λειτουργικές, φλεγμονώδεις ή νεοπλασματικές καταστάσεις).
- III. Υποθυρεοειδισμός (προκαλείται από ανεπάρκεια των θυρεοειδικών ορμονών).

#### a. Συγγενής:

Σε αναπτυσσόμενες χώρες οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά σε ιωδιοπενία. Σε ανεπτυγμένες χώρες:

- i. 90% των περιπτώσεων: διαταραχές στην εμβρυολογική ανάπτυξη θυρεοειδούς αδένα,
- ii. 10% των περιπτώσεων: διαταραχές στην σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

b. Πρωτοπαθής (98% των περιπτώσεων υποθυρεοειδισμού):

- i. Χρόνια θυρεοειδίτις - Hashimoto (αποτελεί αυτοάνοσο νόσημα με παρουσία αντισωμάτων στο αίμα έναντι θυρεοειδικών αντιγόνων καθώς και με ενεργοποιημένη την κυτταρική ανοσία στον αδένα).
  - ii. Θυρεοειδίτιδα Riedel (αγνώστου αιτιολογίας σπάνια πάθηση του θυρεοειδούς που χαρακτηρίζεται από πυκνή ίνωση, προοδευτικός σχηματισμός ανώδυνης βρογχοκήλης και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκύψει υποθυρεοειδισμός).
  - iii. Υποξία θυρεοειδίτιδα (οφείλεται σε φλεγμονή του θυρεοειδούς, είναι παροδική στο 90% των ασθενών, μπορεί να οδηγήσει και σε μόνιμο υποθυρεοειδισμό).
  - iv. Ιατρογενής (μετά θυρεοειδεκτομής ή καταστροφής του θυρεοειδούς με ραδιενεργό ιώδιο).
  - v. Φάρμακα (λόγω αυξημένης λήψης ορισμένων φαρμακευτικών σκευασμάτων, όπως το λίθιο, η αμιοδαρόνη και η λήψη μεγάλης ποσότητας ιωδίου).
  - vi. Έλλειψη του ιωδίου (αφορά κυρίως αναπτυσσόμενες χώρες).
- c. Δευτεροπαθής (οφείλεται κατά το πλείστον σε νόσο της υπόφυσης, ανεπάρκεια TSH).
- d. Τριτογενής (οφείλεται σε νόσο του υποθαλάμου, ανεπάρκεια TRH, η οποία μπορεί να οφείλεται σε σαρκοείδωση, όγκο στον υποθάλαμο, ακτινοβολήση κ.α.).
- e. Περιφερική αντίσταση στις θυρεοειδικές ορμόνες (σπανιότατη περίπτωση, οφείλεται σε γενετικές διαταραχές στους μεταφορείς και στους πυρηνικούς υποδοχείς των θυρεοειδικών ορμονών).

IV. Υπερθυρεοειδισμός (προκαλείται από περίσσεια των θυρεοειδικών ορμονών).

- a. Νόσος Graves (αποτελεί αυτοάνοσο νόσημα, εμφανίζει διάχυτη βρογχοκήλη και εξόφθαλμο).
- b. Τοξική πολυοζώδης βρογχοκήλη (πολλοί ασθενείς με μη τοξική πολυοζώδη βρογχοκήλη αναπτύσσουν τελικά τη τοξική μορφή, αντιμετωπίζεται με ραδιενεργό ιώδιο).
- c. Τοξικό αδένωμα (αποτελεί μονήρες υπερλειτουργικό θυλακιώδες νεόπλασμα σε έναν φυσιολογικό θυρεοειδή, μπορεί να εμφανίσει αυτονομία, αντιμετωπίζεται με ραδιενεργό ιώδιο ή με χειρουργική αφαίρεση).

V. Θυλακιώδες αδένωμα του θυρεοειδούς (καλόηθες νεόπλασμα).

VI. Καρκίνος του θυρεοειδούς

- a. Θηλώδες θυρεοειδικό καρκίνωμα (ο πιο συχνός καρκίνος του θυρεοειδούς, αντιπροσωπεύει περίπου το 70% των περιπτώσεων).



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

- b. Θυλακιώδες θυρεοειδικό καρκίνωμα (αντιπροσωπεύει περίπου το 15% των καρκίνων του θυρεοειδούς).
- c. Μυελοειδές θυρεοειδικό καρκίνωμα (αντιπροσωπεύει περίπου το 5% των καρκίνων του θυρεοειδούς, προέρχεται από τα παραθυλακικά ή κύτταρα C του θυρεοειδούς)
- d. Αναπλαστικό (αδιαφοροποίητο) θυρεοειδικό καρκίνωμα (αντιπροσωπεύει περίπου το 10% των καρκίνων του θυρεοειδούς, εξαιρετικά επιθετική και θανατηφόρα μορφή καρκίνου) (17, 22).

## 1.6 ΣΥΓΓΕΝΗΣ ΥΠΟΘΥΡΕΟΕΙΔΙΣΜΟΣ

### 1.6.1 Γενικά στοιχεία

Ως συγγενής υποθυρεοειδισμός (ΣΥ) ορίζεται η εκ γενετής ανεπάρκεια των θυρεοειδικών ορμονών. Η παθολογική αυτή κατάσταση, συνήθως, προκαλείται από κάποιο πρόβλημα στην ανάπτυξη του θυρεοειδούς αδένου (δυσγενεσία) ή λόγω κάποιας διαταραχής στη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών (δυσορμονογένεση), οπότε καλείται πρωτοπαθής Συγγενής Υποθυρεοειδισμός. Σπανιότερα (1:20.000 γεννήσεις) προκαλείται από ανεπάρκεια της TSH, οπότε καλείται δευτεροπαθής ή κεντρικός Συγγενής Υποθυρεοειδισμός. Τέλος, ακόμα σπανιότερα, υπάρχει περίπτωση να προέρχεται από ελαττώματα κατά τη μεταφορά, το μεταβολισμό ή και τη δράση των θυρεοειδικών ορμονών, οπότε καλείται περιφερικός υποθυρεοειδισμός.

Ο συγγενής υποθυρεοειδισμός ταξινομείται σε:

- Μόνιμος συγγενής υποθυρεοειδισμός: οπότε απαιτείται η εφ' όρου ζωής θεραπευτική αγωγή.
- Παροδικός συγγενής υποθυρεοειδισμός: οπότε η θυρεοειδική λειτουργία αποκαθίσταται κατά κύριο λόγο τους πρώτους μήνες ή τα πρώτα χρόνια της ζωής (23).

Ο ΣΥ αποτελεί το συχνότερο αίτιο ψυχοκινητικής καθυστέρησης, το οποίο μπορεί να προληφθεί με τη χορήγηση της κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής τις πρώτες ημέρες της ζωής (24).

### 1.6.2 Ιστορική αναδρομή

Ο ΣΥ, γνωστός και ως σποραδικός κρετινισμός, δε θα πρέπει να συγχέεται με τον ενδημικό κρετινισμό, ο οποίος οφείλεται στην ανεπαρκή πρόσληψη ιωδίου. Ωστόσο, πριν το 19<sup>ο</sup> αιώνα ο όρος όχι μόνο ήταν άγνωστος αλλά και η πάθηση θεωρούταν λανθασμένα αισθητική διαταραχή και όχι κλινική.

Η ιστορία των θυρεοειδικών νόσων ξεκινάει από πολύ παλιά, καθώς καταγραφές σε ιατρικά βιβλία Κινέζων, Αιγυπτίων και Ρωμαίων ήθελαν τη θεραπευτική αγωγή της βρογχοκήλης (διόγκωση του θυρεοειδούς) να γίνεται με φύκια πλούσια σε ιώδιο και πυρωμένους σπόγγους.

Το 1848 ο Ιταλός βασιλιάς της Σαρδηνίας πραγματοποίησε την πρώτη επιδημιολογική μελέτη για τη βρογχοκήλη και τον κρετινισμό στο Haute - Savoie λόγω των αυξημένων κρουσμάτων.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Ο ενδημικός κρετινισμός ήταν συνήθης γύρω από τις Άλπεις και σε περιοχές της Νότιας Ευρώπης. Ο Αλπικός κρετινισμός απασχόλησε πολλούς γιατρούς και ταξιδιώτες στην περιοχή, στα τέλη του 18<sup>ου</sup> και τις αρχές του 19<sup>ου</sup> αιώνα, οι οποίοι απέδιδαν τη νόσο στο στάσιμο αέρα και στο «κακό» νερό της περιοχής. Από την άλλη, στη Νότια Ευρώπη τα ποσοστά προσβολής διέφεραν σημαντικά ακόμη και μεταξύ κοντινών περιοχών. Η πλειοψηφία παρουσίαζε απλή βρογχοκήλη και ελαφρώς μειωμένο νοητικό και αναπτυξιακό επίπεδο. Τα κρούσματα σοβαρού κρετινισμού ήταν λίγα.

Στην Ελβετία όπου το έδαφος είναι πτωχό σε ιώδιο υπήρξαν πολλά περιστατικά κρετινισμού, λόγω έλλειψης ιωδίου, τα οποία αποδόθηκαν σε γενετικές παθήσεις. Η αλήθεια ήρθε στο φως στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, όταν διαπιστώθηκε η διαφορά μεταξύ γενετικά καθορισμένου συγγενή υποθυρεοειδισμού και υποθυρεοειδισμού λόγω ανεπάρκειας ιωδίου. Σήμερα, υπάρχουν περιοχές ανά τον κόσμο που ακόμη ενδημεί ο κρετινισμός λόγω ανεπάρκειας ιωδίου, όπως η Τουρκία, το Πακιστάν, το Αζερμπαϊτζάν, η Σαουδική Αραβία και χώρες της Νότιας Αφρικής (24).

### 1.6.3 Συχνότητα ΣΥ

Πριν την εμφάνιση των προγραμμάτων προληπτικού ελέγχου νεογνών η επίπτωση του ΣΥ, σύμφωνα με κλινικές μελέτες, ανερχόταν σε 1:7000 έως 1:10.000 νεογνά. Με την εμφάνιση των προγραμμάτων αυτών, η επίπτωση του Συγγενούς Υποθυρεοειδισμού εκτιμήθηκε ότι είχε εύρος 1:3000 έως 1:4000. Τα στοιχεία αυτά δηλώνουν ότι, πριν την εφαρμογή των προληπτικών ελέγχων, νεογνά με συγγενή υποθυρεοειδισμό παρέμεναν χωρίς κλινική διάγνωση (25).

Η συχνότητα του ΣΥ στην Ελλάδα είναι ~1:700 γεννήσεις, γεγονός το οποίο κατατάσσει την Ελλάδα ως τη χώρα με τη μεγαλύτερη συχνότητα ΣΥ παγκοσμίως (26).

Παρατηρείται διαφοροποίηση στην εμφάνιση του συγγενούς υποθυρεοειδισμού ανάλογα με τη φυλή και το φύλο. Αυξημένα ποσοστά εμφάνισης Συγγενούς Υποθυρεοειδισμού παρατηρούνται σε Ασιάτες, Ιθαγενείς Αμερικανούς και Ισπανόφωνους, ενώ ακολουθεί ο καυκάσιος πληθυσμός και, τέλος, ο Αφρο-/Αφροαμερικανός πληθυσμός. Επίσης, παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά εμφάνισης ΣΥ στις πολύδυμες κυήσεις συγκριτικά με τις μονήρεις, σε πρόωρα νεογνά συγκριτικά με τα τελειόμηνα, αλλά και σε νεογνά των οποίων οι μητέρες ήταν μεγαλύτερης ηλικίας συγκριτικά με εκείνα νεότερων γυναικών. Τέλος, νεογνά με σύνδρομο Down (Τρισωμία 21) έχουν 35 φορές υψηλότερο κίνδυνο να εμφανίσουν πρωτοπαθή ΣΥ σε σχέση με το γενικό πληθυσμό (24, 27).

### 1.6.4 Αιτιολογία ΣΥ

Ο ΣΥ ανάλογα με την έκβασή του μπορεί να είναι είτε μόνιμος είτε παροδικός. Ο Μόνιμος Συγγενής Υποθυρεοειδισμός (ΜΣΥ) μπορεί να οφείλεται σε πρωτογενείς ή δευτερογενείς αιτίες.

Συχνότερη αιτία του ΜΣΥ είναι η δυσγενεσία του θυρεοειδούς αδένου, η οποία προκαλείται από διαταραχές κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης του οργάνου. Η διαταραχή αυτή εμφανίζεται σε ποσοστό που αγγίζει το 85% των περιπτώσεων συγγενούς υποθυρεοειδισμού και λαμβάνει τις ακόλουθες μορφές:

- **Θυρεοειδική εκτοπία:** Διαταραχή στην οποία ο θυρεοειδής, κατά τη μεταφορά του από τη βάση της γλώσσας όπου και πρωτοεμφανίζεται, δεν έχει λάβει την τελική του θέση μπροστά από το λάρυγγα. Αντιπροσωπεύει τα 2/3 των περιπτώσεων και είναι δύο φορές συχνότερη στο γυναικείο φύλο.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

- **Θυρεοειδική αγενεσία:** Διαταραχή στην οποία υπάρχει πλήρης απουσία του θυρεοειδούς αδένου.
- **Θυρεοειδική ημι-αγενεσία:** Διαταραχή στην οποία υπάρχει απουσία ενός εκ των δύο λοβών του θυρεοειδούς αδένου.
- **Θυρεοειδική υποπλασία:** Διαταραχή στην οποία ο αδένου είναι μικρότερος του φυσιολογικού. Μαζί με την αγενεσία του θυρεοειδούς αντιπροσωπεύουν το 1/3 των περιπτώσεων.

Η δυσγενεσία του θυρεοειδούς σε γενικές γραμμές εμφανίζεται σποραδικά. Ωστόσο, περίπου 2% των περιπτώσεων είναι οικογενείς. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι το 7,9% των συγγενών πρώτου βαθμού νεογνών με ΣΥ παρουσίαζαν κάποια ανωμαλία στην ανάπτυξη του θυρεοειδούς αδένου.

Η δεύτερη συχνότερη αιτία του ΜΣΥ είναι η δυσορμονογένεση, δηλαδή η διαταραχή στην παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών, η οποία αντιπροσωπεύει περίπου το 15% των περιπτώσεων. Τα παιδιά που ταξινομούνται ως υποθυρεοειδικά, λόγω προβλημάτων στη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών, πρέπει να επανεξετάζονται σε μεγαλύτερη ηλικία για να επιβεβαιωθεί η νόσος, καθώς φαίνεται ότι ένα ποσοστό (ηπιότερων) περιπτώσεων επανακάμπτει (9, 28).

Μια σπάνια αιτία πρόκλησης του ΜΣΥ είναι ο κεντρικός ή δευτεροπαθής ΣΥ, ο οποίος είναι 10 φορές πιο σπάνιος από τον πρωτοπαθή ΣΥ, δηλαδή από τη δυσγενεσία του θυρεοειδούς και τη δυσορμονογένεση (29). Το όνομά του αποδίδεται στην αιτιολογία του, η οποία δεν εντοπίζεται σε κάποιο ελάττωμα του ίδιου του θυρεοειδούς αδένου, αλλά προέρχεται από κάποια άλλη διαταραχή που αφορά την TSH. Η συνηθέστερη αιτία είναι η γενικευμένη υπολειτουργία της υπόφυσης, η οποία δεν προκαλεί μόνο ελαττωμένη παραγωγή της TSH, αλλά και άλλων ορμονών που παράγονται από την υπόφυση, όπως της αυξητικής ορμόνης, της ACTH κ.λπ. (πολλαπλή υποφυσιακή ανεπάρκεια). Μια λιγότερο συχνή αιτία εμφάνισης του κεντρικού ΣΥ είναι η μεμονωμένη ανεπάρκεια της TSH, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε σε μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη β υπομονάδα της TSH, είτε μπορεί να προκληθεί από αντίσταση στη δράση της TRH, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της (9, 24, 27).

Μια εξίσου σπάνια αιτία εμφάνισης του ΜΣΥ αποτελεί ο περιφερικός υποθυρεοειδισμός. Καθώς η είσοδος των θυρεοειδικών ορμονών στα κύτταρα-στόχους επιτελείται με τη βοήθεια των μεταφορέων τους, μια μετάλλαξη για παράδειγμα στο γονίδιο MCT8 που κωδικοποιεί το μονοκαρβοξυλικό μεταφορέα 8, υπεύθυνο για τη μεταφορά των θυρεοειδικών ορμονών στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), προκαλεί συγγενή υποθυρεοειδισμό με νοητική υστέρηση και νευρολογικής φύσεως ανωμαλίες ανάμεσα στις οποίες συμπεριλαμβάνεται και η τετραπληγία. Από την άλλη, στο 90% των περιπτώσεων η περιφερική αντίσταση στη δράση των θυρεοειδικών ορμονών οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα TRβ. Οι μεταλλάξεις αυτές κληρονομούνται με επικρατή τρόπο, με αποτέλεσμα οι T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub> να μη μπορούν να συνδεθούν στους πυρηνικούς υποδοχείς των κυττάρων ώστε να δράσουν (24).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Ο Παροδικός ΣΥ στις μέρες μας εντοπίζεται στο γενικό πληθυσμό τρεις φορές συχνότερα από ότι στο παρελθόν. Είναι πιθανόν αυτό να οφείλεται στην ανίχνευση ηπιότερων μορφών της νόσου αλλά και στην αυξημένη επιβίωση των πρόωρων νεογνών. Οι συχνότερες αιτίες που προκαλούν Παροδικό ΣΥ είναι οι εξής (30):

- Ανεπάρκεια ιωδίου
- Ανωριμότητα του θυρεοειδούς ή ήπιες μορφές συγγενούς υποθυρεοειδισμού
- Μεταφορά μητρικών αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων: τα αντιθυρεοειδικά αντισώματα της μητέρας μπορούν να διαπεράσουν τον πλακούντα και να μπλοκάρουν τον υποδοχέα της TSH στο θυρεοειδή του εμβρύου. Η διάρκεια της κατάστασης αυτής είναι 9-12 μήνες έως ότου, δηλαδή, τα μητρικά αντισώματα εξαφανιστούν από τον οργανισμό του βρέφους.
- Έκθεση του εμβρύου σε αντιθυρεοειδικά φάρμακα: η λήψη αντιθυρεοειδικών φαρμάκων από τη μητέρα μπορεί να μειώσει τη σύνθεση θυρεοειδικών ορμονών από το νεογέννητο. Η αποκατάσταση επέρχεται σε λίγες εβδομάδες μετά τη γέννηση.
- Μητρική έκθεση σε ιώδιο: για παράδειγμα η αμιωδαρόνη (περιέχει ιώδιο) που χορηγείται σε έγκυο μπορεί να προκαλέσει ΣΥ στο νεογνό. Το θέμα επιλύεται στους πρώτους μήνες ζωής, αλλά μπορεί να προκαλέσει νευρολογικά συμπτώματα στο παιδί.
- Έκθεση του νεογνού σε ιώδιο: η έκθεση του νεογνού σε υψηλά ποσοστά ιωδίου μπορεί να προκαλέσει συγγενή υποθυρεοειδισμό, ιδίως αν πρόκειται για πρόωρο βρέφος.
- Αιμαγγειώματα ήπατος: υπάρχουν κληρονομικά αιμαγγειώματα που παράγουν σε μεγάλη ποσότητα D3, η οποία απενεργοποιεί τις θυρεοειδικές ορμόνες.
- Μεταλλάξεις σε γονίδια των οποίων η επίδραση είναι ιδιαίτερα έντονη κατά τους πρώτους μήνες της ζωής: Μεταλλάξεις στο DUOX2 και DUOX2A2 μπορεί να οδηγήσουν σε παροδικό συγγενή υποθυρεοειδισμό (24).
- Προωρότητα νεογνού (30).

Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι κυριότερες αιτίες Μόνιμου και Παροδικού ΣΥ, η συχνότητα με την οποία προσβάλλουν το γενικό πληθυσμό, καθώς και οι διακυμάνσεις που προκαλούνται στις θυρεοειδικές ορμόνες.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

*Πίνακας 2. Κύριες αιτίες συγγενούς υποθυρεοειδισμού, συχνότητα εμφάνισης και διακυμάνσεις που προκαλούνται στις ορμόνες (28).*

Αιτιολογία	Συχνότητα	TSH	FT <sub>4</sub>	Ολική T <sub>4</sub>
<b>ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΥΠΟΘΥΡΕΟΕΙΔΙΣΜΟΣ</b>	1:2.000 – 1:4.000	Αυξημένη	Μειωμένη	Μειωμένη
<i>Δυσγενεσία (εκτοπία, υποπλασία, αγενεσία)</i>	85% των περιπτώσεων			
<i>Δυσορμονογένεση</i>	15% των περιπτώσεων			
<b>ΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΥΠΟΘΥΡΕΟΕΙΔΙΣΜΟΣ</b>	1:50.000 – 1:100.000	Μειωμένη, «φυσιολογική»	Μειωμένη	Μειωμένη
<b>ΠΑΡΟΔΙΚΟΣ ΥΠΟΘΥΡΕΟΕΙΔΙΣΜΟΣ</b>		Αυξημένη αρχικά με μετέπειτα πτώση σε φυσιολογικά επίπεδα	Μειωμένη αρχικά με μετέπειτα άνοδο σε φυσιολογικά επίπεδα	Μειωμένη αρχικά με μετέπειτα άνοδο σε φυσιολογικά επίπεδα
<i>Ανεπάρκεια ιωδίου</i>	Αναπτυσσόμενες Χώρες			
<i>Περίσσεια ιωδίου</i>				
<i>Πλακουντιακή μεταφορά μητρικών αντισωμάτων</i> <i>Πρωωρότητα</i> <i>Ανωριμότητα, Ήπιος συγγενής υποθυρεοειδισμός</i>				

### 1.6.5 Γενετική

Η γενετική του ΣΥ παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον, επειδή το νόσημα δεν παρουσιάζει την κλασική Μενδελική κληρονομικότητα (31). Η ιδιαιτερότητα αυτή πιθανόν να οφείλεται, μεταξύ άλλων, στην πιθανή πολυγονιδιακή βάση του ΣΥ, στο ρόλο των Copy Number Variants (CNVs), σε υπομικροσκοπικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, σε πολυμορφισμούς γονιδίων, σε επαναλήψεις νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων, σε επιγενετικούς μηχανισμούς, στη μεταβλητή διεισδυτικότητα των σχετιζόμενων γενετικών αλλοιώσεων και τη συμβολή περιβαλλοντικών παραγόντων (9). Επιπρόσθετα, ο ΣΥ παρουσιάζει ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία παραμένουν έως σήμερα αδιευκρίνιστα: α) οι σοβαρές μορφές ΣΥ αφορούν κατά 70% κορίτσια, υπάρχει δηλαδή φυλετικός διμορφισμός, β) οι περιπτώσεις απουσίας του ενός λοβού (ημι-αγενεσία) αφορούν κατά 90% τον αριστερό λοβό (32) και γ) οι ασθενείς με ΣΥ παρουσιάζουν σε αυξημένο σχετικά ποσοστό άλλες διαμαρτίες, όπως μονήρη νεφρό, καρδιοπάθειες, υπερωιοσχιστία κ.ά. Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί ικανοποιητική πρόοδος στη συσχέτιση συγκεκριμένων γονιδίων με την αιτιοπαθογένεια του ΣΥ (9, 33, 34). Εντούτοις, παρά τη σχετική πρόοδο, το 90% των σοβαρών περιπτώσεων ΣΥ δεν έχει συσχετισθεί με συγκεκριμένο γενετικό αίτιο, συνεπώς το συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο παραμένει ιδιαίτερα ελκυστικό (**Πίνακας 3**)

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

**Πίνακας 3. Συνοπτική παρουσίαση των 13 γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την αιτιοπαθογένεια του ΣΥ καθώς και των πιο συχνών διαμαρτιών που μπορεί να συνυπάρχουν.**

	Γονίδιο	OMIM#	Χρωμόσωμα	Εξόνια	Διαμαρτίες
<b>Δυσγενεσία</b>	<b>PAX8</b>	218700	2	10	Διαμαρτίες ουροποιητικού (35)
	<b>NKX2-1</b>	610978	14	3	Brain, Lung, Thyroid Syndrome (36)
	<b>FOXE1</b>	241850	9	1	Bamforth-Lazarus Syndrome, λυκόστομα και διαταραχές των τριχών, ατρησία ρινικής χοάνης και δισχιδής επιγλωττίδα (37)
	<b>NKX2-5</b>	225250	5	2	Διαμαρτίες καρδιάς (38)
	<b>TSHR</b>	275200	14	10	
	<b>Borealin</b>	609977	1	11	
<b>Δυσορμονογένεση</b>	<b>NIS</b>	274400	19	15	
	<b>Pendren</b>	274600	7	21	Οικογενής κώφωση (39)
	<b>TPO</b>	274500	2	17	
	<b>DUOX2</b>	607200	15	34	
	<b>DUOXA 2</b>	274900	15	6	
	<b>Tg</b>	274700	8	48	
	<b>IYD</b>	274800	6	5	

### 1.6.7 Συμπτωματολογία

Τα περισσότερα νεογνά με σοβαρό συγγενή υποθυρεοειδισμό (>95%) είτε εμφανίζουν ήπια είτε δεν εμφανίζουν καθόλου συμπτώματα κατά τη γέννηση (28). Αυτό αποδίδεται στη διαπλακουντιακή μεταφορά ποσότητας θυρεοειδικών ορμονών από τη μητέρα στο έμβρυο ακόμη και κατά τα τελευταία στάδια της κύησης, όταν ο θυρεοειδής έχει πλήρως σχηματιστεί (40). Η μεταφορά αυτή προσφέρει προστασία, ιδίως στον εγκέφαλο το νεογνού. Καθώς οι ορμόνες μητρικής προέλευσης μεταβολίζονται και αποβάλλονται από τον οργανισμό, το νεογνό παρουσιάζει ένδεια θυρεοειδικών ορμονών εντός ολίγων ημερών από τη γέννηση και σταδιακά κάνουν την εμφάνισή τους τα πρώτα συμπτώματα του ΣΥ. Ένα από τα πρώτα συμπτώματα είναι ο παρατεταμένος νεογνικός ίκτερος, ενώ τα συχνότερα συμπτώματα είναι η υποτονία, η εύκολη κόπωση κατά τη σίτιση, η δυσκοιλιότητα, η ομφαλοκήλη, η μακρογλωσσία και το κρύο ή γεμάτο με στίγματα δέρμα (**Εικόνα 11, Πίνακας 4**). Τα συμπτώματα παρατηρούνται στις σοβαρές μορφές συγγενούς υποθυρεοειδισμού και προφανώς είναι ηπιότερα στον ήπιο ή στον μέτριου βαθμού ΣΥ.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 11.Νεογνό με συγγενή υποθυρεοειδισμό. Παρατηρείται: Α) Γενική εικόνα, Β) Ρυτίδωση μετώπου, μακρογλωσσία και στίγματα δέρματος, C) Ομφαλοκήλη (24)

Πίνακας 4. Σημεία και Συμπτώματα σε νεογνά και βρέφη με συγγενή υποθυρεοειδισμό (24, 28).

Παρατεταμένος ίκτερος
Δυσκολία στη σίτιση
Προτεταμένη κοιλιά και ομφαλοκήλη
Δέρμα κρύο ή με στίγματα
Μακρογλωσσία
Επίπεδη μύτη
Ψευδοϋπερτελορισμός στα μάτια
Πρησμένο πρόσωπο και γενικότερα οίδημα
Ψηλαφητή βρογχοκήλη
Υποτονία
Καθυστερημένα αντανακλαστικά
Υποθερμία
Βραδυκαρδία
Λήθαργος
Δυσκοιλιότητα
Μη φυσιολογικό κλάμα

Όταν υπάρχει νεογνική ανεπάρκεια θυρεοειδικών ορμονών διάφορες περιοχές του εγκεφάλου επηρεάζονται ανάλογα με τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή λόγω της διαφορετικής απαίτησής τους στις ορμόνες αυτές. Χαρακτηριστικά αναφέρονται:

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

- **Προγεννητική ανεπάρκεια:** Οπτικοχωρικά/Αισθητηριοκινητικά ελλείμματα (κατασκευή μοτίβων, διάκριση προσώπων)
- **Μεταγεννητική ανεπάρκεια:** Γλωσσικά/μνημονικά ελλείμματα

Η νεογνική ανεπάρκεια θυρεοειδικών ορμονών έχει επιδράσεις και στη φυσιολογία των ατόμων αυτών όπως μικρό ανάστημα και στάση (**Εικόνα 12**)



*Εικόνα 12. Επιδράσεις νεογνικής ανεπάρκειας θυρεοειδικών ορμονών.* Στα αριστερά διακρίνεται ένα ευθυρεοειδικό κορίτσι 6 χρονών με ύψος 105 cm (50<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση). Στα δεξιά κορίτσι 17 χρονών με ύψος 100 cm, διανοητική καθυστέρηση, μυξοίδημα και τιμή TSH 288 (φυσιολογικά όρια 0.3-5.5).

#### 1.6.8 Διάγνωση συγγενούς υποθυρεοειδισμού

Σε χώρες στις οποίες εφαρμόζονται νεογνικά προληπτικά προγράμματα για το συγγενή υποθυρεοειδισμό η νόσος ανιχνεύεται έγκαιρα. Παρόλα αυτά, οι χώρες αυτές καλύπτουν μόνο το 25% του πληθυσμού παγκοσμίως, με αποτέλεσμα στο 75% των νεογνών που γεννιούνται ετησίως η διάγνωση του συγγενούς υποθυρεοειδισμού να γίνεται καθυστερημένα, μετά την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων (24, 28).

Στη συντριπτική πλειονότητα των χωρών, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, στις οποίες διεξάγονται νεογνικά προληπτικά προγράμματα, αρχικά γίνεται έλεγχος των επιπέδων της TSH και, εφόσον ανιχνευτούν επίπεδα υψηλότερα του καθορισμένου ορίου, τότε ελέγχεται και η FT4.

Για την διάγνωση έχουν προταθεί διάφορα πρωτόκολλα.

- **Πρωτογενής έλεγχος της T4 και δευτερογενώς της TSH** εφόσον τα επίπεδα της T4 είναι κάτω από συγκεκριμένο όριο το οποίο έχει καθορισθεί και κάτω από ορισμένη εκατοστιαία θέση για το συγκεκριμένο πληθυσμό (π.χ. T4 <13g/dl ή <10%). Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τη διάγνωση του πρωτοπαθούς και του δευτεροπαθούς υποθυρεοειδισμού. Υπάρχουν όμως και κάποια μειονεκτήματα τα οποία είναι ότι υπάρχει μεγάλο εύρος στα φυσιολογικά όρια, τα επίπεδα της T4 είναι χαμηλά στα πρόωρα και άρρωστα νεογνά και σε περίπτωση ανεπάρκειας της TBG.



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

- **Πρωτογενής μέτρηση της TSH με ή χωρίς μέτρηση της T4 δευτερογενώς.** Αυτή η προσέγγιση είχε επιλεγεί αρχικά από τις Ευρωπαϊκές χώρες, και είναι χρήσιμη για ανίχνευση στις ιωδοπενικές περιοχές γιατί δίνει το μέσο όρο τιμών TSH για τον πληθυσμό. Άλλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι διαγιγνώσκει τον αντιρροπούμενο υποθυρεοειδισμό.
- **Ο συνδυασμός T4 και TSH αποτελεί την πιο ευαίσθητη μέθοδο** για τη διάγνωση τόσο του κεντρικού υποθυρεοειδισμού όσο και του αντιρροπούμενου πρωτοπαθούς υποθυρεοειδισμού, αλλά η ευαισθησία καθορίζεται από τα όρια που θα επιλεγούν.

Η καλύτερη χρονική στιγμή για να γίνει η λήψη του δείγματος είναι μεταξύ 3ης-5ης μέρας. Το όριο που χρησιμοποιείται στις περισσότερες χώρες είναι 20 mIU/ml.

Στην Ελλάδα μετριέται πρωτογενώς η **TSH** και εφόσον κριθεί αναγκαίο μετριέται και FT4 ενώ το ανιχνευτικό όριο είναι τα 7 mIU/ml (το χαμηλότερο στην Ευρώπη).

#### 1.6.9 Θεραπεία συγγενούς υποθυρεοειδισμού

Εφόσον με τον έλεγχο επιβεβαιωθεί ο ΣΥ, η θεραπεία υποκατάστασης που απαιτείται είναι απλή, χωρίς κάποιες παρενέργειες. Τέσσερα παρασκευάσματα χρησιμοποιούνται κλινικά:

- **Συνθετική λεβοθυροξίνη [L-T<sub>4</sub>]** είναι το προτιμώμενο παρασκεύασμα
- **Αποξηραμένος θυρεοειδής**, ενώ είναι οικονομική λύση δεν συνίσταται λόγω της αντιγονικότητας, αστάθειας και μεταβλητού περιεχομένου ορμονών.
- **Λιοθυρονίνη [T<sub>3</sub>]**, είναι 3-4 φορές πιο ενεργή ουσία από τη λεβοθυροξίνη, αλλά δεν συνίσταται λόγω υψηλού κόστους, μικρότερης ημίσειας ζωής και μεγαλύτερης πιθανότητας καρδιοτοξικότητας.
- **Liotrix**, ένας συνδυασμός συνθετικής T<sub>4</sub> και T<sub>3</sub>, έχει επίσης υψηλό κόστος και τα ίδια μειονεκτήματα με τη λιοθυρονίνη.

Παρόλο που η T<sub>3</sub> είναι βιολογικά πιο δραστικό μόριο από την T<sub>4</sub>, το μεγαλύτερο ποσοστό της προέρχεται από μονοαποϊώδωση της T<sub>4</sub>, συνεπώς η θεραπεία υποκατάστασης για το συγγενή υποθυρεοειδισμό γίνεται με T<sub>4</sub> (L-θυροξίνη - λεβοθυροξίνη). Η χορήγηση πρέπει να ξεκινάει το συντομότερο δυνατό μετά τη διάγνωση του συγγενούς υποθυρεοειδισμού. Τα νεογνά τα οποία κατά το νεογνικό προληπτικό έλεγχο εμφανίζουν τιμές TSH > 40 mIU/L πρέπει να ξεκινούν θεραπεία άμεσα, χωρίς αναμονή για τις επαναληπτικές εξετάσεις στον ορό. Συγκεκριμένα, γίνεται καθημερινή λήψη της ορμόνης θυροξίνης (T<sub>4</sub>, λεβοθυροξίνης/L - θυροξίνης) από το νεογνό με τη μορφή χαπιού. Η αρχική δόση στις περιπτώσεις σοβαρού συγγενούς υποθυρεοειδισμού είναι 10-15 mg/kg/ημέρα.

## 2. ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ

#### 2.1.1 Ιστορική Αναδρομή στη Μοριακή Βιολογία – Μοριακή Γενετική

Η Μοριακή Βιολογία και Μοριακή Γενετική είναι επιμέρους τμήματα της Βιολογίας που μελετούν σε μοριακό επίπεδο τη δομή και τη λειτουργία των ζωντανών οργανισμών, καθώς και τις σχέσεις τόσο μεταξύ τους και όσο με το περιβάλλον τους. Πρωτεργάτης της Μοριακής Βιολογίας θεωρείται ο Άγγλος φυσικός και αρχιτέκτονας Robert Hooke, ο οποίος το 1665 εισήγαγε τον όρο μικροσκοπική βιολογία ανακαλύπτοντας ότι οι οργανισμοί αποτελούνται από κύτταρα. Η μελέτη των κυττάρων επεκτάθηκε από τους Matthias Schleiden και Theodor Schwann κατά τη δεκαετία του 1830, συνεχίζοντας έτσι το έργο του Hooke (41-43).

Οι βασικοί κανόνες κληρονομικότητας ανακαλύφθηκαν το 1865 από τον Gregor Mendel ο οποίος διατύπωσε και τους νόμους που φέρουν το όνομά του μέχρι και σήμερα, για τον λόγο αυτό θεωρείται ο πατέρας της Γενετικής (44, 45).

Καθοριστικό ρόλο έπαιξε όμως και ο Ελβετός βιολόγος Johannes Friedrich Miescher καθώς ήταν ο πρώτος που απομόνωσε το νουκλεϊκό οξύ και το ονόμασε DNA το 1869 (46).

Ακολούθησε μία σειρά καταξιωμένων βιολόγων και άλλων επιστημόνων, οι οποίοι εργάστηκαν σκληρά στοιχειοθετώντας αυτό που σήμερα αποτελεί τον κλάδο της Μοριακής Βιολογίας. Κυριότεροι σταθμοί σε αυτή τη μακροχρόνια πορεία αποτέλεσαν η ανακάλυψη το 1901 από τον Emil Hermann Fischer ότι τα αμινοξέα ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας τις πρωτεΐνες με αμιδικούς δεσμούς τους οποίους ονόμασε πεπτιδικούς δεσμούς, για την οποία κέρδισε και βραβείο Nobel και η διπλή ελικοειδής δομή του DNA από τους James D. Watson και Francis H.C.Crick το 1952 (47, 48).

Το 1970 ο Crick ήταν ο πρώτος που διατύπωσε το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας το οποίο αναπαριστά τους πιθανούς τρόπους ροής μίας γενετικής πληροφορίας (49).

Η Μοριακή Γενετική αποτελεί μία νέα κατεύθυνση της Βιολογίας που συνενώνει τη Βιοχημεία, τη Βιοφυσική και τη Γενετική. Αποτελεί κλάδο της Βιολογίας που χρησιμοποιεί τις μεθόδους της Γενετικής και της Μοριακής Βιολογίας και μελετά τη δομή και τη λειτουργία των γονιδίων σε μοριακό επίπεδο. Μελετάται δηλαδή η κληρονομικότητα και οι φορείς της – τα γονίδια. Ως κληρονομικότητα ορίζεται η μεταβίβαση γνωρισμάτων, χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων από τους γονείς στους απογόνους τόσο στους ευκαρυωτικούς (άνθρωπος, ζώα, φυτά, μύκητες) όσο και στους προκαρυωτικούς (βακτήρια) οργανισμούς.

Αντικείμενο της Μοριακής Γενετικής είναι η μελέτη των μοριακών μηχανισμών της ροής (μετάβασης) και της έκφρασης της γενετικής πληροφορίας σε επίπεδο κυττάρου και οργανισμού. Βασικά επίπεδα ροής και έκφρασης της γενετικής πληροφορίας αποτελούν η αντιγραφή DNA, η μεταγραφή DNA σε RNA και η μετάφραση mRNA σε πρωτεΐνη. Επίσης βοηθά στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων συστημάτων ενός κυττάρου και των μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.

Η Μοριακή Γενετική Ανάλυση εφαρμόζεται για την ανίχνευση αλλαγών στο γενετικό υλικό, δηλαδή στα γονίδια ενός οργανισμού. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να αφορούν μεταλλάξεις, ελλείψεις ή/και διπλασιασμούς και προκαλούν τα κληρονομούμενα μονογονιδιακά γενετικά νοσήματα. Επίσης μελετά τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ των διαφόρων γονιδίων και τον τρόπο παρέμβασης των περιβαλλοντικών παραγόντων που συμβάλλουν στην εκδήλωση πολυπαραγοντικών ή πολυγονιδιακών νοσημάτων όπως η επιληψία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και άλλα (50, 51).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Σημαντική εφαρμογή της Μοριακής Γενετικής αποτελεί η προσυμπτωματική διάγνωση ανθρώπων που φέρουν γενετικές βλάβες ικανές να οδηγήσουν σε κλινικές εκδηλώσεις και σοβαρά νοσήματα καθώς και η πρόληψη της νόσου σε συγγενή άτομα. Επίσης με τη χρήση της Μοριακής Γενετικής μπορούν να προσδιοριστούν οι συγγενικές σχέσεις καθώς και να προληφθούν οι κυήσεις υψηλού κινδύνου.

Τέλος με τη βοήθεια της Γενετικής Μηχανικής και της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, που επιτρέπει την άμεση χειραγώγηση του γονιδιώματος ενός οργανισμού, ανοίγονται νέοι δρόμοι στην έρευνα παρέχοντας ποικίλες εφαρμογές τόσο σε διαγνωστικό όσο και σε θεραπευτικό επίπεδο (52).

### 2.1.2 Μετάλλαξη - Πολυμορφισμός

Στο DNA βρίσκεται κωδικοποιημένη με τη μορφή γονιδίων όλη η απαραίτητη πληροφορία για την ανάπτυξη και λειτουργία ενός οργανισμού και αποτελούν την κύρια λειτουργική μονάδα κληρονομικότητας. Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από περίπου 20,000 γονίδια σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα. Κάθε άτομο φέρει δύο αντίγραφα από το κάθε γονίδιο (αλληλόμορφα), ένα μητρικής και ένα πατρικής προέλευσης (53).

Τα αλληλόμορφα γονίδια βρίσκονται στην ίδια θέση των ομόλογων χρωμοσωμάτων και περιγράφουν το ίδιο γνώρισμα αλλά με διαφορετικό τρόπο. Το ζευγάρι των αλληλόμορφων συνιστά τον γονότυπο ενώ η έκφραση τους τον φαινότυπο για το εκάστοτε γνώρισμα. Συνήθως από τα δύο αλληλόμορφα, το ένα επικρατεί έναντι του άλλου και καθορίζει τον φαινότυπο. Αυτό το αλληλόμορφο ονομάζεται επικρατές και το άλλο υπολειπόμενο.

Αν συγκρίνει κανείς το γονιδίωμα δύο διαφορετικών ατόμων, θα παρατηρήσει διαφορές της τάξεως του 1% στην αλληλουχία DNA, εκ των οποίων το 0,02% είναι υπεύθυνες για την μοναδικότητα των φυσικών χαρακτηριστικών κάθε ατόμου και συμβάλλουν στην γενετική ποικιλομορφία (54).

Οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί είναι αλλαγές στην αλληλουχία του DNA εκ των οποίων το πιο σπάνιο αλληλόμορφο εμφανίζεται στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα μεγαλύτερη από 1%, ενώ οι ετεροζυγώτες που φέρουν το σπάνιο αλληλόμορφο έχουν συχνότητα >2% (55).

Υπάρχουν τέσσερις τύποι γονιδιακών πολυμορφισμών:

- i. Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single nucleotide polymorphisms-SNPs)  
Είναι σημειακές αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, όπου μια βάση υποκαθίσταται από μια άλλη. Πρόκειται για συνηθισμένες μεταλλάξεις που δημιουργούνται από αυθόρμητες μεταλλαγές κατά την αντιγραφή του DNA. Θεωρείται ότι συμβαίνουν σε κάθε 1000 ζεύγη βάσεων στο ανθρώπινο γονιδίωμα και ευθύνονται για το 90%-95% της ποικιλομορφίας του ανθρώπινου DNA. Υπολογίζεται πως υπάρχουν περίπου 10 εκατομμύρια SNPs στο σύνολο του ανθρώπινου γονιδιώματος. Χωρίζονται σε κωδικούς (cSNPs) και μη κωδικούς SNPs ανάλογα με το αν βρίσκονται σε κωδικές περιοχές ή όχι. Τα SNPs μπορούν να ευθύνονται για νοσήματα μέσω της επίδρασής τους σε συγκεκριμένο γονίδιο ή σε ρυθμιστική περιοχή πλησίον γονιδίου προκαλώντας διαταραχή στη λειτουργία του. Έχουν χρησιμοποιηθεί ως γενετικοί δείκτες σε πληθυσμούς προκειμένου να μελετηθεί η προδιάθεση σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου ασθενειών (55, 56).
- ii. Μικρής κλίμακας ενθέσεις/απαλοιφές  
Αυτός ο τύπος γονιδιακού πολυμορφισμού ονομάζεται INDELS (insertions/deletions) και χαρακτηρίζεται από ενθέσεις ή απαλοιφές βάσεων του DNA σε έναν οργανισμό. Τα INDELS μπορούν να εμφανίζονται σε περιοχές γονιδίων που κωδικοποιούν το

- προϊόν του γονιδίου (εξόνια), αποτελώντας σημαντικό παράγοντα για κληρονομικές παθήσεις στους ανθρώπους (57).
- iii. Πολυμορφικές επαναλαμβανόμενες ακολουθίες  
Παράδειγμα η αλληλουχία Alu που μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πολυμορφισμού. Αποτελείται από 300 ζεύγη βάσεων (base pairs ή bp) και επαναλαμβάνεται περίπου ένα εκατομμύριο φορές στο ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελώντας το 10% αυτού. Η ένθεση και η επανάληψη της αλληλουχίας Alu στο ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις και διαταραχές που σχετίζονται με την καρκινογένεση (58, 59).
- iv. Μικροδορυφορικές αλληλουχίες  
Πρόκειται για επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μήκους 2-6 bp (βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις, short tandem repeats - STRs) που επαναλαμβάνονται από λίγες έως εκατό φορές. Πολλές από αυτές τις αλληλουχίες είναι πολυμορφικές καθώς ποικίλλει ο αριθμός των επαναλήψεων. Με τις μικροδορυφορικές αλληλουχίες έχουν συσχετιστεί διάφορες παθήσεις όπως η μυοτονική δυστροφία και η νόσος Huntington (60, 61).

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί μπορούν να εδράζονται σε διάφορες περιοχές των γονιδίων όπως είναι οι υποκινητές, τα εξόνια, το εσόνια καθώς και οι 5' και 3' μη μεταφράσιμες περιοχές. Για αυτό, οι διαφοροποιήσεις στην γονιδιακή έκφραση ποικίλλει ανάλογα με την τοποθεσία των πολυμορφισμών. Ειδικότερα:

- Οι SNPs που εδράζονται σε περιοχές υποκινητών επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση τροποποιώντας την ενεργότητα των υποκινητών, την σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων, τη μεθυλίωση του DNA και την αρχιτεκτονική των ιστόνων
- Οι SNPs που εδράζονται σε περιοχές εξονίων κατηγοριοποιούνται σε μη συνώνυμους και συνώνυμους ανάλογα με το αν οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέος στην κωδικοποιημένη πρωτεΐνη. Επηρεάζουν την μεταβολή του ποσοστού της γονιδιακής μετάφρασης και των αλλαγών στη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών και των mRNAs με τελικό αποτέλεσμα την καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής και μετάφρασης.
- Οι SNPs σε περιοχές ιντρονίων κυρίως προκαλούν παραλλαγές ματίσματος κατά την μεταγραφή και προωθούν ή διαταράσσουν τη σύνδεση και τη λειτουργία των μακρών μη-κωδικοποιούντων για πρωτεΐνη μορίων RNA (lncRNAs), τροποποιώντας έτσι την γονιδιακή αποτύπωση, τη γονιδιακή έκφραση καθώς τη δομή της χρωματίνης.
- Τα 5' και 3' αμετάφραστα άκρα (5'- and 3'- untranslated regions – UTR) των mRNAs είναι κρίσιμα επειδή ελέγχουν τη μετάφραση. Το 5'-UTR ρυθμίζει την έναρξη της μετάφρασης, ενώ το 3'-UTR καθορίζει τη σταθερότητα του mRNA. Η ειδική ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA αποτελεί ουσιαστικό μέρος της γονιδιακής έκφρασης και μπορεί να εξαρτάται από παραλλαγές στην αλληλουχία των 5' και 3'UTRs. Οι παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου είναι αρκετά αποδιοργανωτικές καθώς μεταβάλλουν τη δευτερογενή δομή καθώς και τις αλληλουχίες στόχους εντός των UTRs στο mRNA. Επομένως, οι SNPs στο 5'-UTR επηρεάζουν τη μετάφραση των γονιδίων, ενώ οι SNPs στο 3'-UTR επηρεάζουν τη σταθερότητα των mRNA καθώς και τη σύνδεση τους με τα microRNAs.
- Οι SNPs σε περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες ρυθμίζουν τα γονίδια-στόχους μέσω αλληλεπιδράσεων χρωματίνης μακράς περιοχής. Οι περισσότερες από αυτές τις αλληλεπιδράσεις εντοπίζονται σε θέσεις με ενεργές τροποποιήσεις ιστόνων και θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων. (62, 63)

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

### 2.1.3 Πρακτική αξία της μελέτης των γονιδιακών πολυμορφισμών

Οι πολυμορφισμοί έχουν μεγάλη πρακτική σημασία στην ιατρική γενετική, αν και πολλοί από αυτούς δεν επηρεάζουν άμεσα την υγεία ή την ανάπτυξη ενός οργανισμού, παρόλα αυτά έχουν αποδειχθεί σημαντικοί για την ανθρώπινη υγεία. Ένας ή περισσότεροι SNPs μπορεί να καθορίζουν μία σειρά από χαρακτηριστικά όπως τον βαθμό απόκρισης σε φαρμακευτική αγωγή, τις πιθανότητες εκδήλωσης συγκεκριμένων ασθενειών, την ευαισθησία απέναντι σε εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως είναι οι τοξίνες) και την επιρρόπεια σε λοιμώξεις. Έτσι ο έλεγχος πολυμορφισμών που μπορεί να ευθύνονται για προδιάθεση σε συγκεκριμένα νοσήματα όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος, η στεφανιαία νόσος κ.ά. χρησιμεύει στην αναγνώριση των ατόμων υψηλού κινδύνου για τα νοσήματα αυτά. Έχουν επίσης εφαρμογή στην προγεννητική διάγνωση γενετικών νοσημάτων, στην εξέταση ταυτοποίησης γονικής συγγένειας, στην ιατροδικαστική, ακόμα και στον προσδιορισμό

### 2.1.4 Νοσήματα που σχετίζονται με γονιδιακούς πολυμορφισμούς

Η πλειοψηφία των γονιδιακών πολυμορφισμών δεν επηρεάζει άμεσα την ανθρώπινη υγεία, ορισμένοι όμως από αυτούς είναι κλινικά σημαντικοί καθώς μπορεί να επηρεάζουν την προδιάθεση σε συγκεκριμένες παθήσεις και την απόκριση σε φάρμακα. Μελέτες σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες συσχετίζουν την παρουσία πολυμορφισμών με προδιάθεση στην εμφάνιση πολυπαραγοντικών νοσημάτων, όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, η οστεοπόρωση, νευρολογικά νοσήματα, αιμοσφαιρινοπάθειες, η θρόμβωση, οι λοιμώξεις, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και συγκεκριμένοι τύποι καρκίνου (64).

### 2.1.5 Θεραπευτικές εφαρμογές

Σήμερα, η μελέτη των γονιδιακών πολυμορφισμών που σχετίζονται με συγκεκριμένα νοσήματα περνά από το πειραματικό στάδιο στην κλινική πράξη και σε θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Η φαρμακογενετική / φαρμακογονιδιωματική με τις σύγχρονες τεχνικές του γενετικού ελέγχου προσπαθεί να προσδιορίσει την επίδραση των γενετικών παραγόντων στην αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής θεραπείας και την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών. Η «εξατομικευμένη θεραπεία» λαμβάνει υπόψιν το γενετικό προφίλ ενός ατόμου, για την καλύτερη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών, αλλά και τη μείωση σημαντικών δαπανών από τα συστήματα υγείας (65).

Επίσης, η μελέτη των γονιδιακών πολυμορφισμών μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη πρόληψη ασθενειών με γενετική προδιάθεση. Ο προγεννητικός έλεγχος, η εισαγωγή προγραμμάτων επιτήρησης ατόμων που φέρουν την υπεύθυνη μετάλλαξη, ακόμη και προφυλακτικές παρεμβάσεις σε κληρονομικούς καρκίνους έχουν υιοθετηθεί στα πλαίσια της πρόληψης.

### 2.1.6 Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάδειξη SNPs

- Real time PCR

Οφείλει το ονομά της στη δυνατότητα να παρακολουθεί κανείς την αύξηση του DNA καθώς αυτό πολλαπλασιάζεται. Βασίζεται στην απελευθέρωση σήματος φθορισμού ταυτόχρονα με την ενίσχυση του DNA σε ποσότητα ανάλογη προς την έκταση της ενίσχυσης (66).

- PCR-RFLPs: Restriction Fragment Length Polymorphism

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Επιτρέπει την ανάδειξη μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών. Η τεχνική αυτή βασίζεται στον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου με PCR και στη συνέχεια στην πέψη του DNA στόχου με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού. Τα ένζυμα περιορισμού, αναγνωρίζουν συγκεκριμένη αλληλουχία DNA. Το χαρακτηριστικό αυτό δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης των διαφορετικών αλληλομόρφων ενός γονιδίου. Έτσι όταν εξετάζεται ένας γονιδιακός πολυμορφισμός που περιέχει την αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού, τότε το τμήμα DNA που περιέχει αυτήν την αλληλουχία θα κοπεί σε μικρότερα κομμάτια, ενώ το άλλο αλληλόμορφο του πολυμορφισμού θα διατηρήσει το αρχικό του μέγεθος. Τα δείγματα του DNA που υφίστανται πέψη αναλύονται βάσει του μοριακού τους μεγέθους σε πηκτή αναρόζης με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης (67).

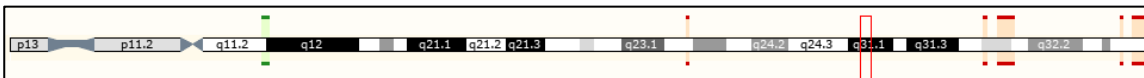
- Allele-specific PCR (AS-PCR) γνωστή και ως Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

Επιτρέπει την ανίχνευση γνωστών μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών. Βασίζεται στη χρήση primers ή probes που αναγνωρίζουν επιλεκτικά το ένα ή το άλλο αλληλόμορφο. Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι η προέκταση του 3'-άκρου του εκκινήτη με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης δεν είναι εφικτή όταν το ολιγονουκλεοτίδιο που χρησιμοποιείται δεν υβριδοποιείται απόλυτα με το πρωτότυπο DNA (68, 69).

## 2.2 DIO2

### 2.2.1 Δομή γονιδίου

Η αποϊωδινάση τύπου II (D2) εκφράζεται από το γονίδιο DIO2 που εδράζεται στο μακρύ βραχίονα (q) του 14ου χρωμοσώματος και συγκεκριμένα στην κυτταρογενετική ζώνη 14q31.3 (**Εικόνα 13**). Το γονίδιο DIO2 (Gene ID: 1734) αποτελείται από 2 εξόνια τα οποία διαχωρίζονται από ένα μεγάλο εσόνιο και έχει συνολικό μέγεθος 15 kb (70).

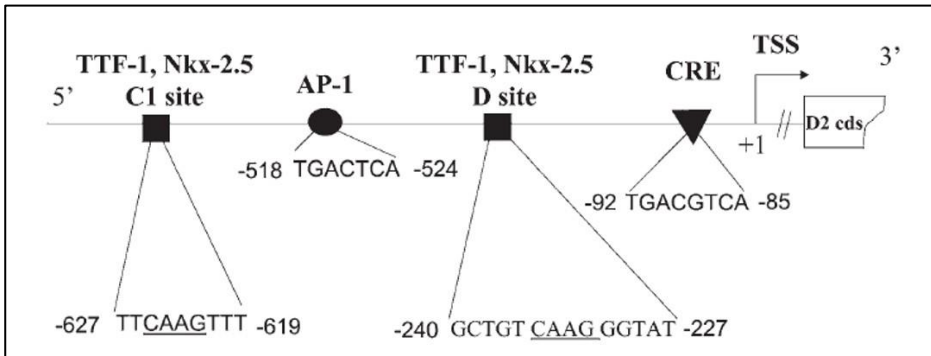


**Εικόνα 13. Η θέση του γονιδίου DIO2 στο χρωμόσωμα 14.** Εδράζεται στην κυτταρογενετική ζώνη 14q31.3 στις μοριακές θέσεις (GRCh38): 14:80,197,527-80,387,757.

[https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000211448;r=14:80197527-80387757](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000211448;r=14:80197527-80387757)

Η δομή του DIO2 έχει μελετηθεί αρκετά με αποτέλεσμα να έχει ταυτοποιηθεί μια παραλλαγή στη θέση ματίσματος του DIO2 όπου χρησιμοποιούνται εκτός από τα 2 εξόνια και ιντρονικές αλληλουχίες. Στην 5-prime UTR περιοχή του γονιδίου υπάρχει μια αλληλουχία γνωστή ως CRE (cAMP Response Elements) στην οποία προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες, σαν διμερή (όμο- ή έτεροδιμερή), της οικογένειας CREB/CREM/ATF (**Εικόνα 14**). Η ενεργοποίηση των μεταγραφικών αυτών παραγόντων εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις του cAMP. Ενώ έχει μια ακόμη θέση αναγνώρισης για το μεταγραφικό παράγοντα AP1 (Activator Protein 1), και αρκετές αλληλουχίες TATA ή τύπου TATA καθώς και 3 θέσεις έναρξης μεταγραφής (70-73). Εντός της 3-prime UTR περιοχής περιέχεται ακολουθία σεληνοκυστεΐνης (SECIS) η οποία υπαγορεύει την ενσωμάτωση της σεληνοκυστεΐνης (74).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 14. Σχηματικό διάγραμμα της 5-πλευρικής περιοχής του γονιδίου DIO2. Υποδεικνύονται οι λειτουργικά χαρακτηρισμένες θέσεις (75).

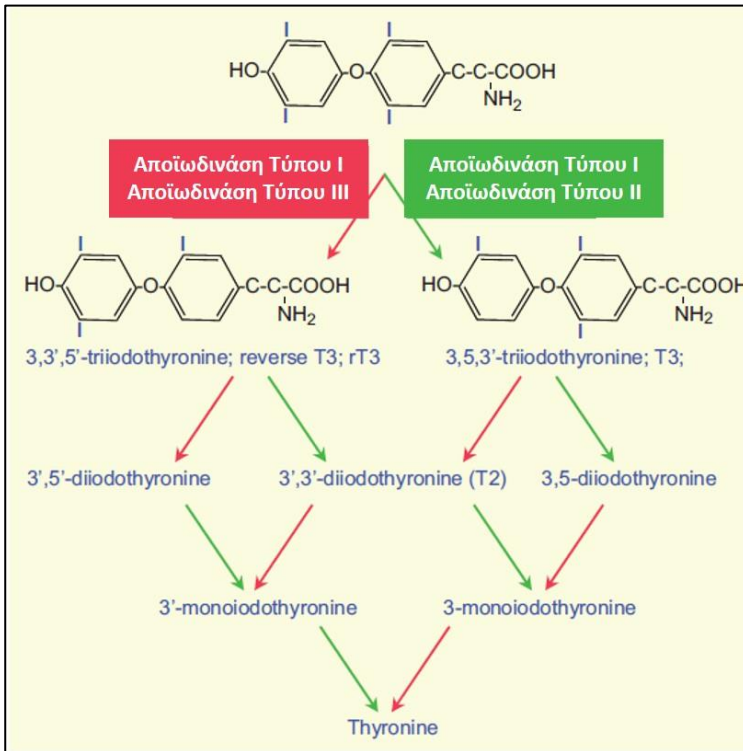
### 2.2.2 Γονιδιακή έκφραση

Το DIO2 κωδικοποιεί την αποϊωδινάση τύπου II (D2), ένα ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια των αποϊωδινάσων της ιωδοθυρονίνης. Η οικογένεια των αποϊωδινάσων της ιωδοθυρονίνης (iodothyronine deiodinase) αποτελείται από τρία ισoenζυμα: τους τύπους I (D1), II (D2) και III (D3), τα οποία είναι μοριακού βάρους 29-33 kDa και που μοιράζονται ομόλογη ακολουθία και καταλυτικές ιδιότητες. Η D2 είναι ένα ένζυμο μεγέθους 273 αμινοξέων, το οποίο διαθέτει ένα ενεργό κέντρο στη θέση 133 (76).

### 2.2.3 Αποϊωδινάσες ιωδοθυρονίνης

Η μονοαποϊωδινίωση είναι η κύρια οδός του μεταβολισμού της θυρεοειδικής ορμόνης στους ανθρώπους. Η δράση των θυρεοειδικών ορμονών ξεκινά με την ενεργοποίηση της T4 προ-ορμόνης σε T3. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 15**, η διαδοχική απομάκρυνση των ατόμων ιωδίου μπορεί να οδηγήσει είτε σε ενεργοποίηση υποστρώματος είτε σε αδρανοποίηση. Η προορμόνη T4 περιέχει τέσσερα άτομα ιωδίου, δύο στον "εξωτερικό" φαινολικό δακτύλιο και δύο στον "εσωτερικό" δακτύλιο τυροσίνης. Η απομάκρυνση ενός μόνο ατόμου ιωδίου από τον εξωτερικό δακτύλιο της θυροξίνης την μετατρέπει στην πιο ισχυρή βιολογικά T3. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από τις D1 και D2. Αντιστρόφως, η αποϊωδίωση του εσωτερικού δακτυλίου μετατρέπει τις T4 και T3 σε ανενεργούς μεταβολίτες, rT3 και T2 αντίστοιχα. Ενώ η D1 μπορεί επίσης να καταλύσει την αποϊωδινίωση της T3 σε ανενεργή T2, εκτός της εμβρυϊκής ανάπτυξης (όπου η θειούχα θυρεοειδική ορμόνη διευκολύνει την επαγόμενη από D1 αποϊωδίωση εσωτερικού δακτυλίου), το D3 είναι το κύριο απενεργοποιητικό ένζυμο.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 15. Αποϊώδωση της θυρεοειδικής ορμόνης. Η αποϊώδωση του εξωτερικού δακτυλίου, καταλυόμενη από τις D1 και D2, ενεργοποιεί την προορμόνη T4 σε T3. Η αποϊώδωση του εσωτερικού δακτυλίου, καταλύεται κυρίως από τη D3, απενεργοποιεί τις T4 και T3 (6).

Η αποϊώδωση του εξωτερικού δακτυλίου είναι υπεύθυνη για την πλειοψηφία της παραγωγής T3 στα ευθυρεοειδικά άτομα, γεγονός που εξηγεί την παρατήρηση ότι η επαρκής μονοθεραπεία λεβοθυροξίνης (L-T4) παράγει φυσιολογικές συγκεντρώσεις T3 στον ορό σε ασθενείς με υποθυρεοειδισμό. Αν και μια μικρή ποσότητα ενεργοποίησης της T4 συμβαίνει στον ίδιο τον θυρεοειδή αδένα, η συντριπτική πλειοψηφία της μετατροπής της T4 σε T3 λαμβάνει χώρα στους περιφερειακούς ιστούς και καταλύεται από τη D1 και τη D2. Ενώ στην ευθυρεοειδική κατάσταση, η αποϊώδωση του εσωτερικού δακτυλίου με τη μεσολάβηση D3 είναι υπεύθυνη για την αδρανοποίηση του 80% της ημερήσιας παραγωγής θυρεοειδικών ορμονών (77).

Κάθε μια από τις τρεις αποϊωδινάσες (D1, D2 και D3) κωδικοποιείται από ένα ξεχωριστό γονίδιο (DIO1 στο χρωμόσωμα 1p32.3, DIO2 στο χρωμόσωμα 14q31.3 και DIO3 στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 14q32.31 αντίστοιχα), και ενώ υπάρχει μια σημαντική ομολογία ως προς την αλληλουχία και φέρουν και οι τρεις την σπάνια αμινοξική σεληνοκυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο, κάθε μια έχει ένα μοναδικό ανατομικό και αναπτυξιακό μοτίβο κατανομής καθώς και διακριτές ενζυματικές ιδιότητες (Πίνακας 5). Δρώντας συνεργιστικά, αυτά τα χαρακτηριστικά επιτρέπουν στις αποϊωδινάσες να διαμορφώνουν τη σηματοδότηση της θυρεοειδικής ορμόνης με συγκεκριμένο χρονικό και ανατομικό τρόπο, μεταβάλλοντας τόσο τη συστηματική όσο και την τοπική διαθεσιμότητα της T3. Αυτή η ικανότητα της αποϊώδωσης να μεταβάλλει την τοπική θυρεοειδική κατάσταση είναι σημαντική για τη ρύθμιση της δράσης της θυρεοειδικής ορμόνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (78).

Πιο πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η τοπική διαφοροποίηση της κατάστασης του θυρεοειδούς με αποϊώδωση είναι εξίσου σημαντική για την ανάπτυξη των θηλαστικών ειδών, καθώς και για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μεταβολισμό σε τραυματισμένους ιστούς όπως το ισχαιμικό μυοκάρδιο και ορισμένους καρκίνους (79-82).



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Πίνακας 5. Αποϊωδινάσες Ιωδοθυρονίνης

	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>
<b>Ενζυμική δράση</b>	Αποϊωδίωση εξωτερικού και εσωτερικού δακτυλίου	Αποϊωδίωση εξωτερικού δακτυλίου	Αποϊωδίωση εσωτερικού δακτυλίου
<b>Ιστοί που εκφράζεται</b>	Ήπαρ, νεφρός, θυρεοειδής αδένας	Κεντρικό νευρικό σύστημα, υπόφυση, φαιός λιπώδης ιστός, καρδιακός και σκελετικός μυς	Μήτρα, πλακούντας, κεντρικό νευρικό σύστημα, δέρμα
<b>Υποστρώματα</b>	rT3, T4, T3S, T4S	T4, rT3	T3, T4
<b>Θετικοί ρυθμιστές</b>	Θυρεοειδικές ορμόνες	Έκθεση στο κρύο, χολικά οξέα, cAMP, αποουβικουτινοποίηση	Θυρεοειδικές ορμόνες, αγγειογενετικοί παράγοντες, οικογένεια TGF - β, υποξία, πρωτεΐνες Hedgehog
<b>Αρνητικοί ρυθμιστές</b>	Κυτοκίνες, ασθένεια/νηστεία	Θυρεοειδικές ορμόνες, πρωτεΐνες Sonic hedgehog	Γλυκοκορτικοειδή

Έτσι, ο μεταβολισμός της ορμόνης του θυρεοειδή είναι εξαρτημένος από τις συνδυασμένες δράσεις των τριών αποϊωδιονάσων και ρυθμίζεται κυρίως μέσω της σταθερότητας της DIO2 σε ανταπόκριση στις μεταβολές της προσφοράς ιωδίου, της έκθεσης στο κρύο και σε αλλαγές στην λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα. Και οι τρεις αποϊωδιονάσες εκφράζονται σε ένα αριθμό των εμβρυϊκών και ενήλικων ιστών. Τα πρότυπα της ιστικής και αναπτυξιακής έκφρασης τους δείχνει ότι οι αποϊωδιονάσες μπορεί να ελέγχουν τη συγκέντρωση των ενεργών ορμονών του θυρεοειδούς σε συγκεκριμένους ιστούς ή τύπους κυττάρων σε ορισμένα στάδια της ανάπτυξης. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι εμφανίζονται σημαντικές είδο- ή φύλο- εξαρτώμενες διαφορές στις αποϊωδιονάσες χωρίς ωστόσο να έχουν δοθεί πειστικές εξηγήσεις για τις διαφορές αυτές (83).

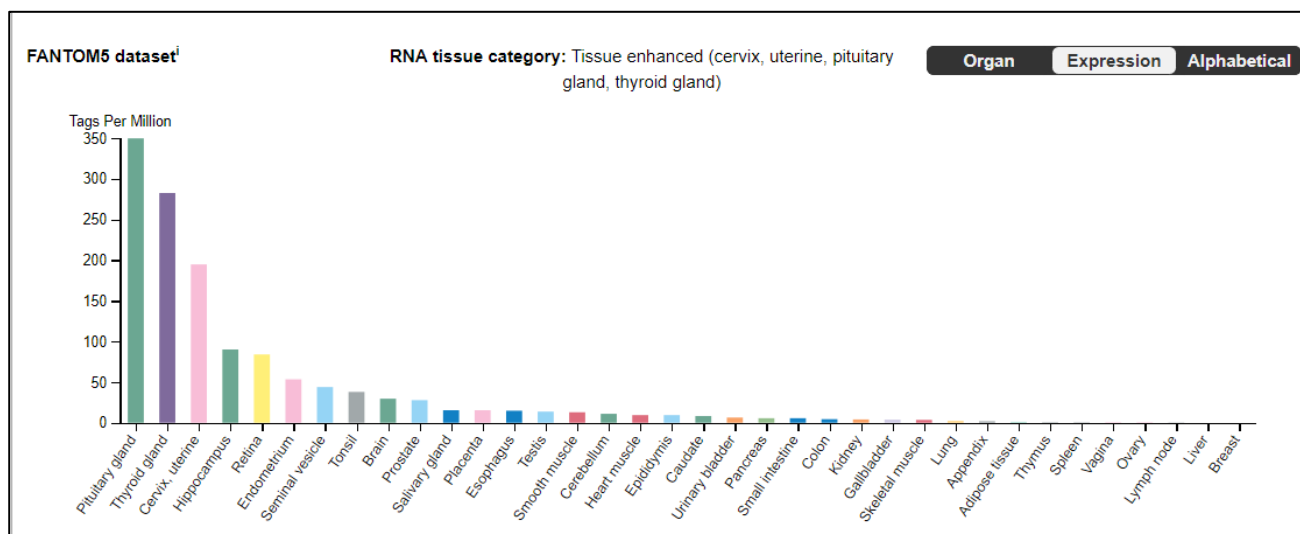
#### 2.2.4 Αποϊωδινάση τύπου II (D2)

Η D2 καταλύει την αποϊωδίωση του εξωτερικού δακτυλίου του T4 σε T3 και είναι η κύρια πηγή παραγωγής T3 στον ορό στην ευθυρεοειδική κατάσταση. Σε σύγκριση με την D1 (την άλλη αποϊωδινάση με δράση ενεργοποίησης), η D2 έχει υψηλότερη συγγένεια για την T4 (με μια χαμηλή νανομοριακή σταθερά Michaelis) και η ενζυμική δραστηριότητα της δεν είναι ευαίσθητη σε αναστολή από την προπυλοθειουρακίλη (84).

Στον άνθρωπο, η D2 εκφράζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τον θυρεοειδή αδένα, τον πλακούντα καθώς και τα καρδιακά και σκελετικά μυοκύτταρα (Εικόνα 2.4). Εκτός από τον μείζονα ρόλο της στην παροχή κυκλοφορούντος T3, η D2 είναι ένας ισχυρός μηχανισμός για την αύξηση της τοπικής συγκέντρωσης της T3 σε κρίσιμες περιοχές όπως η υπόφυση

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

(όπου απαιτείται T3 παραγόμενη από την D2 για τη ρύθμιση της ανάδρασης της έκκρισης TSH) και ο καφέ λιπώδης ιστός (όπου η T3 παραγόμενη από την D2 απαιτείται για την προώθηση της αποσύνδεσης και της προσαρμοστικής θερμογένεσης) (79, 85-87).



Εικόνα 16. Έκφραση της D2 στους ιστούς

[https://www.proteinatlas.org/ENSG00000211448-DIO2/tissue#gene\\_information](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000211448-DIO2/tissue#gene_information)

Η D2 έχει σύντομο χρόνο ημιζωής ο οποίος μπορεί να σταθεροποιηθεί ανάλογα με το αν το φυσικό του υπόστρωμα, δηλαδή η T4, είναι διαθέσιμο. Παρουσία της T4, η D2 αδρανοποιείται με χρόνο ημιζωής περίπου 20 λεπτών, ενώ απουσία της T4 ο χρόνος ημίσειας ζωής της παρατείνεται σε ώρες. Το γεγονός αυτό παρέχει ένα μηχανισμό μέσω του οποίου η παραγωγή της T3, της βιολογικά δραστικής ορμόνης του θυρεοειδούς, μπορεί να ρυθμιστεί σύμφωνα με τη διαθεσιμότητα της T4. Για παράδειγμα, η συσσώρευση D2 στα κύτταρα αυξάνει τη κλασματική μετατροπή της T4 σε T3 όταν τα επίπεδα T4 στον ορό είναι χαμηλά, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της έλλειψης ιωδίου ή του υποθυρεοειδισμού. Αντιθέτως, τα επίπεδα T4 στον ορό είναι σχετικά υψηλά σε ασθενείς που βρίσκονται υπό θεραπεία υποκατάστασης με λεβοθυροξίνη και συνεπώς η κλασματική μετατροπή του T4 σε T3 μειώνεται.

Η ουβικουτινίωση της D2 είναι ο μοριακός μηχανισμός που αποτελεί τη βάση αυτών των μεταβολών στο χρόνο ημίσειας ζωής της D2, δηλαδή η ομοιοπολική προσκόλληση πολλαπλών μορίων ουβικουΐνης στη D2, η οποία αδρανοποιεί το ένζυμο αλλά και το οδηγεί στην αποικοδόμηση στα πρωτεασώματα. Η ουβικουτινίωση θεωρείται ότι απενεργοποιεί τη D2 διακόπτοντας τη διαμόρφωση του διμερούς D2: D2, που είναι απαραίτητο για την ενζυμική δραστηριότητα. Ένας μοναδικός βρόγχος 18 αμινοξέων προσδίδει εγγενή μεταβολική αστάθεια στη D2, διευκολύνοντας την πρόσδεση σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διαδικασία ουβικουτινίωσης.

Τα ένζυμα ενεργοποίησης της ουβικουΐνης UBC6 και UBC7 είναι απαραίτητα στην διαδικασία ουβικουτινίωσης της D2, καθώς και δύο λιγάσες ουβικουΐνης, η επαγωγίμη από hedgehog WSB-1 και η TEB4, μια λιγάση που εμπλέκεται στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η ουβικουΐνη D2 (UbD2) δεν απορροφάται αμέσως από τα πρωτεασώματα. Αντ' αυτού, η UbD2 μπορεί να επανενεργοποιηθεί με από-ουβικουτινίωση. Οι άλλες δύο αποϊωδινάσες, D1 και D3, δεν είναι γνωστό ότι αποικοδομούνται με τη μεσολάβηση της ουβικουΐνης ή ότι υποβάλλονται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Η ουβικουτινίωση της D2 συμβαίνει μέσω των K48 συνδεδεμένων αλυσίδων ουβικουΐνης και την έκθεση στο φυσικό της υπόστρωμα, T4, επιταχύνοντας τον σχηματισμό της UbD2. Η UbD2 απορροφάται από πρωτεασώματα που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Η μετατόπιση D2 στο κυτταρόπλασμα συμβαίνει μέσω αλληλεπίδρασης με το σύμπλεγμα ρ97-ATPάσης. Η μετατόπιση της D2 περιλαμβάνει επίσης και την από-ουβικουτινίωση από το ρ97-σχετιζόμενο με DUB Ataxin-3. Μόλις φθάσει στο κυτταρόπλασμα, η D2 μεταφέρεται στα πρωτεάσωματα όπως αποδεικνύεται από την συν-κατακρήμιση με την υπομονάδα S5a του 19S πρωτεασώματος και τον αυξημένο συν-εντοπισμό με το 20S πρωτεάσωμα

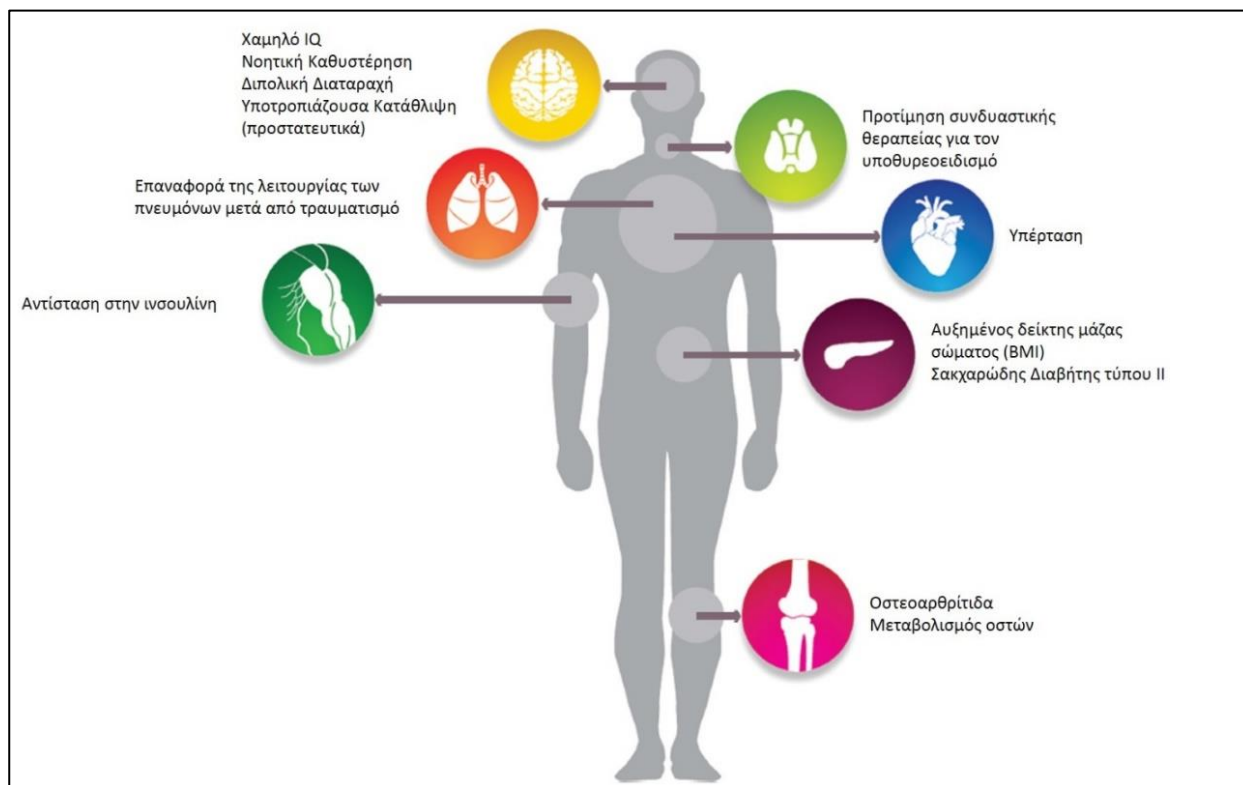
Η ουβικουτινίωση της D2 μπορεί να εμφανιστεί με διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με το κύτταρο στο οποίο εκφράζεται η D2. Σε αντίθεση με το υπόλοιπο σώμα, η D2 στον υποθάλαμο υπόκειται σε ελάχιστη ουβικουτινίωση (ή σε αρκετή απο-ουβικουτινίωση) διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο τη μετατροπή της T4 σε T3 παρά την αλληλεπίδραση με την T4. Ως αποτέλεσμα, η έκκριση της TRH και TSH είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην T4 που βρίσκεται στον ορό. Ακόμη, αυτό εξηγεί γιατί η TSH ορού έχει κανονικοποιηθεί σε πολλούς ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία υποκατάστασης με λεβοθυροξίνη, ακόμη και αν τα επίπεδα T3 στον ορό παραμένουν κάτω από το φυσιολογικό εύρος (88).

#### 2.2.5 Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τον πολυμορφισμό rs225014

Λόγω της σημαντικότητας του ρόλου της D2 στον μεταβολισμό της T4, αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν μελετηθεί με σκοπό να υπάρξει συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών και παθολογικών καταστάσεων. Οι παθολογικές καταστάσεις με τις οποίες έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν τους εκάστοτε πολυμορφισμούς σχετίζονται με τους ιστούς στους οποίους και εκφράζεται η D2, μερικές από αυτές είναι η νόσος Graves, η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, θηλακιώδη αδενώματα, σχιζοφρένεια.

Ένας από τους πολυμορφισμούς του DIO2 που έχει μελετηθεί περισσότερο από τους υπόλοιπους με σκοπό τη συσχέτισή του με διάφορες παθολογικές καταστάσεις είναι ο rs225014 (**Εικόνα 17**). Ο πολυμορφισμός αυτός (Thr92Ala) αφορά την αντικατάσταση του αμινοξέος θρεονίνης από το αμινοξύ αλανίνη, όταν το πιο κοινό αλληλόμορφο T αντικαθίσταται από το λιγότερο κοινό αλληλόμορφο C στο κωδικόνιο 92 του εξονίου 2 (**Εικόνα 18**) (89-94).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 17. Συσχέτιση του rs225014 με διάφορες παθολογικές καταστάσεις <http://doi.org/10.17925/USE.2015.11.02.92>

Population	Allele: frequency (count)	Genotype: frequency (count)
ALL	T: 0.542 (2714) C: 0.458 (2294)	T T: 0.302 (756) C C: 0.218 (546) C T: 0.480 (1202)
AFR	T: 0.537 (710) C: 0.463 (612)	T T: 0.277 (183) C C: 0.203 (134) C T: 0.520 (344)
ACB	T: 0.536 (103) C: 0.464 (89)	T T: 0.271 (26) C C: 0.198 (19) C T: 0.531 (51)
ASW	T: 0.492 (60) C: 0.508 (82)	T T: 0.213 (13) C C: 0.230 (14) C T: 0.557 (34)
ESN	T: 0.586 (116) C: 0.414 (82)	T T: 0.354 (35) C C: 0.182 (18) C T: 0.465 (46)
GWD	T: 0.553 (125) C: 0.447 (101)	T T: 0.301 (34) C C: 0.195 (22) C T: 0.504 (57)
LWK	T: 0.455 (90) C: 0.545 (108)	T T: 0.212 (21) C C: 0.303 (30) C T: 0.485 (48)
MSL	T: 0.547 (93) C: 0.453 (77)	T T: 0.271 (23) C C: 0.176 (15) C T: 0.553 (47)
YRI	T: 0.569 (123) C: 0.431 (93)	T T: 0.287 (31) C C: 0.148 (16) C T: 0.565 (61)
AMR	T: 0.486 (337) C: 0.514 (357)	T T: 0.219 (76) C C: 0.248 (86) C T: 0.533 (185)
CLM	T: 0.479 (90) C: 0.521 (98)	T T: 0.191 (18) C C: 0.234 (22) C T: 0.574 (54)
MXL	T: 0.461 (59) C: 0.539 (69)	T T: 0.234 (15) C C: 0.312 (20) C T: 0.453 (29)
PEL	T: 0.406 (69) C: 0.594 (101)	T T: 0.106 (9) C C: 0.294 (25) C T: 0.600 (51)
PUR	T: 0.572 (119) C: 0.428 (89)	T T: 0.327 (34) C C: 0.183 (19) C T: 0.490 (51)
EAS	T: 0.560 (564) C: 0.440 (444)	T T: 0.327 (165) C C: 0.208 (105) C T: 0.464 (234)
CDX	T: 0.640 (119) C: 0.360 (67)	T T: 0.398 (37) C C: 0.118 (11) C T: 0.484 (45)
CHB	T: 0.524 (108) C: 0.476 (98)	T T: 0.291 (30) C C: 0.243 (25) C T: 0.466 (48)
CHS	T: 0.581 (122) C: 0.419 (88)	T T: 0.343 (36) C C: 0.181 (19) C T: 0.476 (50)
JPT	T: 0.577 (120) C: 0.423 (88)	T T: 0.356 (37) C C: 0.202 (21) C T: 0.442 (46)
KHV	T: 0.480 (95) C: 0.520 (103)	T T: 0.253 (25) C C: 0.293 (29) C T: 0.455 (45)
EUR	T: 0.655 (659) C: 0.345 (347)	T T: 0.451 (227) C C: 0.141 (71) C T: 0.408 (205)
CEU	T: 0.616 (122) C: 0.384 (76)	T T: 0.394 (39) C C: 0.162 (16) C T: 0.444 (44)
FIN	T: 0.763 (151) C: 0.237 (47)	T T: 0.616 (61) C C: 0.091 (9) C T: 0.293 (29)
GBR	T: 0.659 (120) C: 0.341 (62)	T T: 0.473 (43) C C: 0.154 (14) C T: 0.374 (34)
IBS	T: 0.603 (129) C: 0.397 (85)	T T: 0.393 (42) C C: 0.187 (20) C T: 0.421 (45)
TSI	T: 0.640 (137) C: 0.360 (77)	T T: 0.393 (42) C C: 0.112 (12) C T: 0.495 (53)
SAS	T: 0.454 (444) C: 0.546 (534)	T T: 0.215 (105) C C: 0.307 (150) C T: 0.479 (234)
BEB	T: 0.471 (81) C: 0.529 (91)	T T: 0.198 (17) C C: 0.256 (22) C T: 0.547 (47)
GIH	T: 0.519 (107) C: 0.481 (99)	T T: 0.291 (30) C C: 0.252 (26) C T: 0.456 (47)
ITU	T: 0.392 (80) C: 0.608 (124)	T T: 0.157 (16) C C: 0.373 (38) C T: 0.471 (48)
PJL	T: 0.443 (85) C: 0.557 (107)	T T: 0.219 (21) C C: 0.333 (32) C T: 0.448 (43)
STU	T: 0.446 (91) C: 0.554 (113)	T T: 0.206 (21) C C: 0.314 (32) C T: 0.480 (49)

Εικόνα 18. Απεικόνιση της συχνότητας των αλληλίων και των γονοτύπων του rs225014 [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=14:80202737-80203737;v=rs225014;vdb=variation;vf=156520552#1000genomesprojectphase3\\_anchor](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=14:80202737-80203737;v=rs225014;vdb=variation;vf=156520552#1000genomesprojectphase3_anchor)

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Στη συνέχεια παρατίθενται διάφορες μελέτες που έχουν διενεργηθεί τα τελευταία χρόνια προσπαθώντας να συσχετίσουν τον rs225014 με διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Το 2002 γίνεται η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά στον rs225014 από τους Mentuccia *et al* (95). Η έρευνα αυτή αφορά τη συσχέτιση παραλλαγών του DIO2 με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τα αποτελέσματά της φέρεται να υποστηρίζουν αυτήν την υπόθεση.

Στη συνέχεια αρκετές έρευνες έγιναν γύρω από την προσπάθεια συσχέτισης του rs225014 με την αντίσταση στην ινσουλίνη αλλά και τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2). Στη μελέτη των Canani *et al* (96) υπάρχει συσχέτιση με την αντίσταση στην ινσουλίνη σε πληθυσμό ασθενών με ΣΔ2. Σε άτομα με τον γονότυπο C / C, η δραστηριότητα της D2 στον θυρεοειδή και τους σκελετικούς μυς είναι μειωμένοι περίπου κατά το ήμισυ συγκριτικά με αυτή που εμφανίζουν άτομα με γονότυπους T / C ή T / T, υποδηλώνοντας ότι η μειωμένη παραγωγή T3 που προέρχεται από την D2 μπορεί να εμπλέκεται στη εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη. Οι Dora *et al* (97) φαίνεται να συσχετίζουν την παρουσία 2 C αλληλίων με αυξημένο κίνδυνο για ΣΔ2 στον γενικό πληθυσμό. Στη συνέχεια θεωρήθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί πως δρα ο rs225014 σε αλληλεπίδραση με έναν άλλο πολυμορφισμό, τον rs1801282 του γονιδίου PPAR $\gamma$ 2 που σχετίζεται με τον ΣΔ2 και το μεταβολικό σύνδρομο. Οι Estivalet *et al* (98) θεωρούν ότι οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί αλληλεπιδρούν ως προς την μεταβολή της αντίστασης στην ινσουλίνη σε ασθενείς με ΣΔ2 που ανήκουν στη λευκή φυλή, ενώ ο συνδυασμός του ελάσσονος αλληλίου στον εκάστοτε πολυμορφισμό ανέδειξε το πιο έντονο φαινότυπο ως προς την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Σε προσπάθεια συσχέτισης της ψυχοκινητικής καθυστέρησης με πολυμορφισμούς του γονιδίου του DIO2, οι Guo *et al* (90) δεν κατάφεραν να συσχετίσουν τον rs225014 με νοητική καθυστέρηση όπως επίσης και οι Zevenbergen *et al* (99) δεν συσχέτισαν τον rs225014 νοητική υστέρηση παρά μόνο με ελαφρώς χαμηλότερα επίπεδα της TSH, γεγονός που είχε αναφερθεί και στο παρελθόν. Ενώ, φαίνεται ότι δεν σχετίζεται με τα επίπεδα της FT4 ή τον λόγο της T3 προς T4. Ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται να μην επηρεάζει τις εμφανείς αλλαγές στα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στον ορό, ενώ λειτουργικές μελέτες δεν έχουν αναδείξει διαφορές στην λειτουργικότητα της D2.

Ενώ οι McAninch *et al* (100) προσπάθησαν να συσχετίσουν τον rs225014 με τη νόσο Alzheimer (Alzheimer Disease – AD) σε Αфро-αμερικανούς και Ευρωπαίο-αμερικανούς. Ο πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν καλά χαρακτηρισμένος και ο αριθμός των ατόμων ήταν μεγάλος. Η μελέτη ανέδειξε συσχέτιση του rs225014 με την AD μόνο στον Αфро-αμερικανικό πληθυσμό.

Ένα ακόμη πεδίο στο οποίο επικεντρώθηκαν αρκετές μελέτες αφορά την πιθανή επίδραση του rs225014 στον μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών και στην ανταπόκριση ασθενών με υποθυρεοειδισμό στην θεραπεία υποκατάσταση με L-T4. Σε μελέτη των Peeters *et al* (101) δεν φαίνεται να επηρεάζονται τα επίπεδα της TSH ή της T3 στο πλάσμα. Σε μια άλλη μελέτη οι Panicker *et al* (91) συσχετίζουν τον rs225014 με την ψυχολογική ευημερία των ασθενών και πιθανώς καλύτερη ανταπόκριση σε συνδυαστική θεραπεία με L-T4 και T3 έναντι της μονοθεραπείας με L-T4. Μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί από τους Torlontano *et al* (102) χρησιμοποιεί ως πληθυσμό αναφοράς άτομα που έχουν υποβληθεί σε θυρεοειδεκτομή. Τα άτομα φαίνεται ότι όταν φέρουν τον γονότυπο C/C απαιτείται υψηλότερη δόση L-T4 για την επίτευξη επιπέδων-στόχου για την TSH, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο μειωμένη ανατροφοδότηση της υπόφυσης λόγω μη φυσιολογικής υποθαλαμικής / υποφυσιακής λειτουργίας της D2. Στην συγκεκριμένη μελέτη, σημειώνεται ακόμη ότι αν και η υποομάδα αυτή λάμβανε υψηλότερη μέση δόση, εμφάνιζε μόνο ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα FT4 στον ορό συγκριτικά με τη υποομάδα που έφερε έστω και μια φορά το μείζον αλληλόμορφο T. Συμπερασματικά η συγκεκριμένη μελέτη υποδεικνύει ξεκάθαρα τη

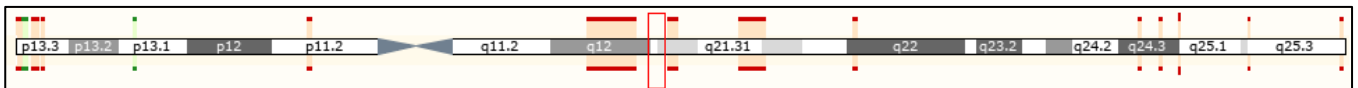
Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

συσχέτιση του rs225014 με την προβλεπτική του ικανότητα για μεγαλύτερη πρόσληψη L-T4 από ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε θυρεοειδεκτομή. Τέλος, μια ακόμη μελέτη που υποστηρίζει ότι ο rs225014 μπορεί να έχει ρυθμιστικό ρόλο στην δράση των θυρεοειδικών ορμονών καθώς και κλινικής σημασίας επιρροές μόνο όμως σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο πρωτοπαθής υποθυρεοειδισμός όπου οι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί είναι ανεπαρκείς, διενεργήθηκε από τους Butler *et al* (103).

Οι Castagna *et al* (104) προσπάθησαν να συσχετίσουν τον rs225014 με το γεγονός ότι ασθενείς με απουσία θυρεοειδούς, οι οποίοι λαμβάνουν θεραπεία υποκατάστασης με L-T4, εμφανίζουν συμπτώματα υποθυρεοειδισμού. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς βασίζονται για τα ενδοκυττάρια επίπεδα της T3 αλλά και για την T3 που κυκλοφορεί αποκλειστικά στον μεταβολισμό της T4 από την D2. Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν από άτομα που υποβλήθηκαν σε πλήρη θυρεοειδεκτομή. Άτομα που έφεραν το C αλληλίο μετεγχειρητικά εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερη FT3, και συγκεκριμένα η παρουσία του C αλληλίου σε ομοζυγωτία συσχετίστηκε σχεδόν στο 60% με μειωμένη FT3 μετεγχειρητικά ενώ σε ετεροζυγωτία σχεδόν στο 40%. Για να αποκλειστεί η πιθανότητα η μειωμένη FT3 να οφείλεται σε χαμηλά επίπεδα FT4, αναφέρεται ότι η FT4 μετεγχειρητικά ήταν αυξημένη σε όλους τους γονοτύπους. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή φαίνεται να συσχετίζει την παρουσία έστω και ενός C αλληλίου με μειωμένη FT3 και προτείνει ίσως σε αυτήν την περίπτωση να χρησιμοποιείται διπλό σχήμα θεραπείας με L-T4 και T3.

## 2.3 THRa

Το γονίδιο του υποδοχέα α της θυρεοειδικής ορμόνης (Thyroid hormone receptor α –THRa) εδράζεται στο μακρύ βραχίονα (q) του 17ου χρωμοσώματος και συγκεκριμένα στην κυτταρογεννητική ζώνη 17q21.1 (**Εικόνα 19**). Το γονίδιο THRa (Gene ID: 7067) αποτελείται από 9 εξόνια τα οποία διαχωρίζονται από 8 σχετικά μικρά εσόνια και το μέγεθός του είναι περίπου 30 kb.

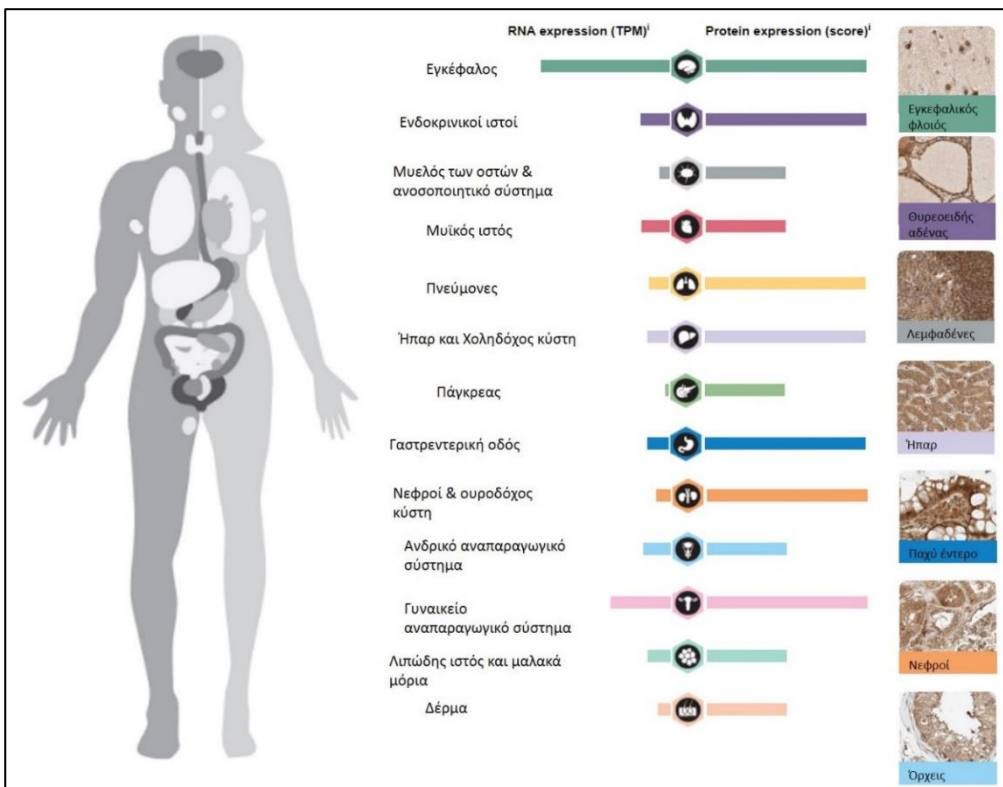


Εικόνα 19. Η θέση του γονιδίου THRa στο χρωμόσωμα 17. Εδράζεται στην κυτταρογεννητική ζώνη 17q21.1 στις μοριακές θέσεις (GRCh38): 40,062,899-40,092,627 [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000126351;r=17:40062899-40092627;t=ENST00000450525](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000126351;r=17:40062899-40092627;t=ENST00000450525)

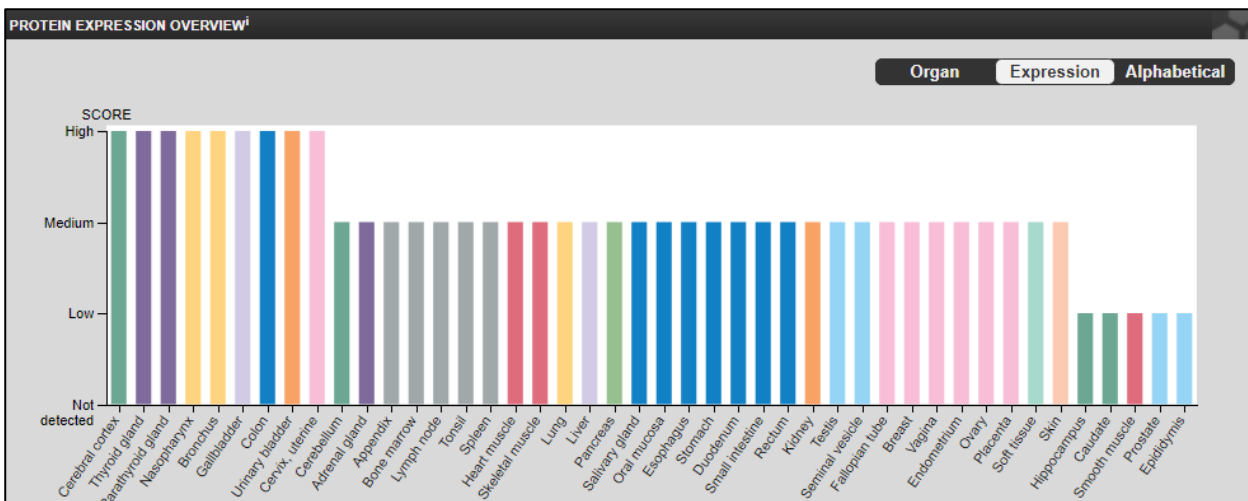
### 2.3.1 Δομή και λειτουργία TRa

Το γονίδιο THRa κωδικοποιεί τον πυρηνικό υποδοχέα της θυρεοειδικής ορμόνης (Thyroid hormone Receptor α – TRa) με κύριο μόριο πρόσδεσης την T3 (παρουσιάζει 10-15 φορές μεγαλύτερη συγγένεια από την T4). Υπάρχουν δύο πυρηνικοί υποδοχείς για την θυρεοειδική ορμόνη, ο TRa και ο TRβ, ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο THRβ που εδράζεται στο χρωμόσωμα 3p24.2. Τόσο ο TRa όσο και ο TRβ εκφράζονται σε πληθώρα ιστών, αλλά τα επίπεδα έκφρασης τους διαφέρουν μεταξύ των ιστών (**Εικόνα 20**) και (**Εικόνα 21**) (14, 105).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 20. Ιστοί στους οποίους εκφράζεται ο TRα (mRNA και πρωτεΐνη)  
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000126351-THRA/tissue>



Εικόνα 21. Ιστοί στους οποίους εκφράζεται ο TRα (παρατηρείτε εύρος έκφρασης από υψηλό έως χαμηλό)

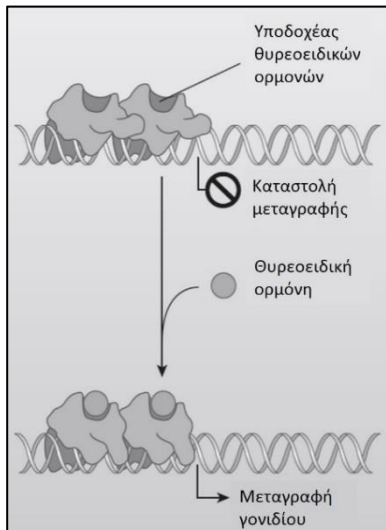
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000126351-THRA/tissue>

Ο TRα1 αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ανάπτυξης στους περιφερικούς ιστούς κατά τις πρώτες εβδομάδες της νεογνικής ζωής. Οι 3 αυτές εβδομάδες χαρακτηρίζονται από απότομη αύξηση στη συγκέντρωση της T3 στον ορό και παρουσιάζουν αναλογίες με την αμφίβια μεταμόρφωση. Σε αυτό το σημείο, η T3 ελέγχει την αναδιαμόρφωση του εντέρου, την ανάπτυξη της παραγκεφαλίδας, την σπληνική ερυθροποίηση και την οστική ανάπτυξη,

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

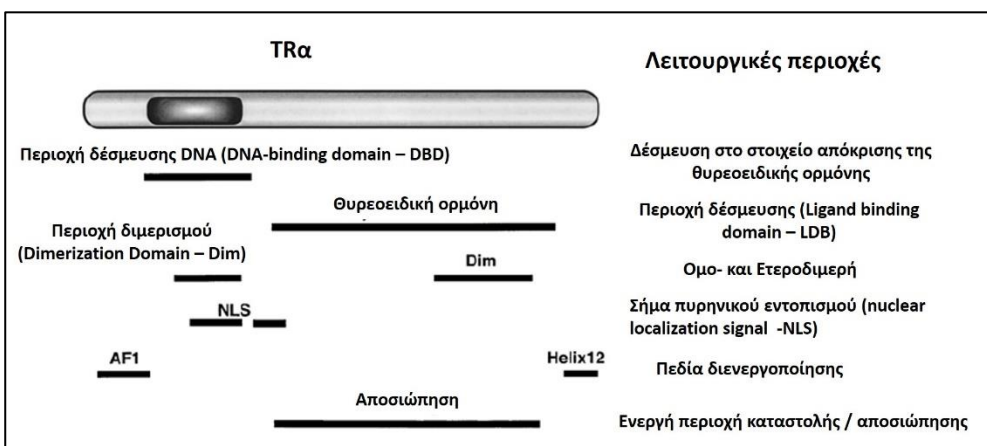
Λειτουργίες που επάγονται μέσω ενεργοποίησης του TRα. Ο TRα επίσης κατέχει μείζονα ρόλο στην καρδιακή λειτουργία και τη θερμογένεση (106, 107).

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν δύο θέσεις πρόσδεσης. Μία θέση για την ορμόνη, η σύνδεση της ρυθμίζει την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση του υποδοχέα, και μία θέση πρόσδεσης για το DNA. Ο σχηματισμός συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα και η σύνδεση με το DNA οδηγούν σε ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής του εκάστοτε γονιδίου (**Εικόνα 22**) (17).



**Εικόνα 22. Ο μη δεσμευμένος υποδοχέας θυρεοειδικής ορμόνης δεσμεύεται στο DNA και καταστέλλει τη μεταγραφή.** Η δέσμευση της θυρεοειδικής ορμόνης στον υποδοχέα επιτρέπει την πραγματοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου. Ως εκ τούτου, ο υποδοχέας της θυρεοειδικής ορμόνης, δρα ως καταστολέας απουσία της ορμόνης, ενώ με τη σύνδεση ορμονών σε αυτόν επιτρέπεται η μεταγραφή γονιδίων επαγόμενων από τη θυρεοειδική ορμόνη (17).

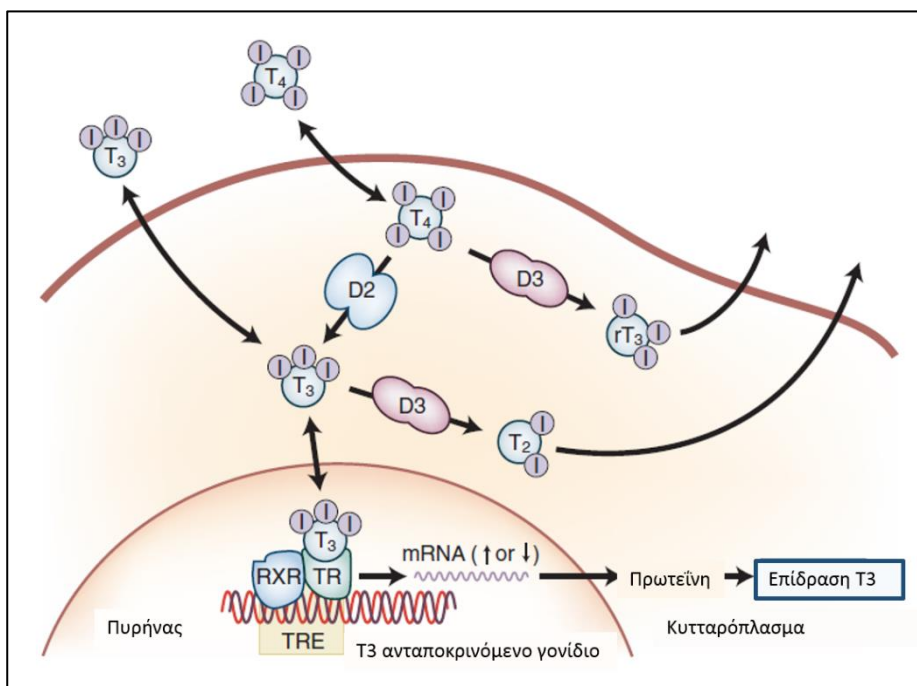
Ο TRα διαθέτει μια κεντρική περιοχή δέσμευσης του DNA, όπου συνδέεται με ειδικές αλληλουχίες DNA που βρίσκονται στο γονίδιο και ονομάζονται στοιχεία απόκρισης θυρεοειδούς (thyroid response elements – TREs). Συνήθως, δεσμεύει το DNA ως ετεροδιμερές με τον υποδοχέα ρετινοειδούς X (retinoid X receptor – RXR) (**Εικόνα 23** και **Εικόνα 24**). Στην πραγματικότητα κωδικοποιούνται δύο ισομορφές του υποδοχέα, ο TRα1 και TRα2, αλλά μόνο ο TRα1 διαθέτει τα TREs και DBD, τα οποία τον καθιστούν λειτουργικό (14, 19, 21).



**Εικόνα 23.Λειτουργικές περιοχές του TRα (108).**



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 24. Σχηματικό διάγραμμα της ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της ορμόνης του θυρεοειδούς σε ένα κύτταρο που εκφράζει τις D2 και D3. Η τριϊωδοθυρονίνη (T3) που εισέρχεται στο κύτταρο είτε αποϊωδιώνεται σε 3,3'-διϊωδοθυρονίνη (T2), είτε εισέρχεται στον πυρήνα και συνδέεται με τον TRα. Μια άλλη πηγή T3 είναι εκείνη που παράγεται από την εξωτερική αποϊωδίωση της T4 εντός του κυττάρου. Η αλληλεπίδραση της T3 με τον TRα που δεσμεύεται ως ετεροδιμερές με τον RXR στα TRE επάγει ή καταστέλλει την μεταγραφή του συγκεκριμένου γονιδίου (19).

### 2.3.2 Μεταγραφικός ρόλος του TRα

Υπάρχουν πολλαπλά επίπεδα για το πώς η δραστηριότητα των TRs μπορεί να ρυθμιστεί σε ένα κύτταρο. Οι TRs έχουν το ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της καταστολής της γονιδιακής έκφρασης (δραστική γονιδιακή καταστολή) απουσία της T3. Η προσθήκη της T3 καθιστά τον υποδοχέα από έναν «σιγαστήρα» γονιδίων σε έναν «ενεργοποιητή» γονιδίων. Έτσι, η ορμόνη δρα ως ένας «μοριακός διακόπτης» που ελέγχει την καταστολή και την ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου. Και οι τρεις μεταγραφικές λειτουργίες, η αποσιώπηση, η δέσμευση της θυρεοειδικής ορμόνης και η ενεργοποίηση του γονιδίου εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα (109).

Η έλλειψη ικανότητας δέσμευσης ορμόνης με επακόλουθη έλλειψη ενεργοποίησης του γονιδίου στόχου οδηγεί σε βλάβες στα σπονδυλωτά. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η γενική περιγραφή της γονιδιακής ρύθμισης που μεσολαβείται από τον TR ρυθμίζεται επίσης από τον τύπο της αλληλουχίας που συνδέεται ο TR. Ανάλογα με τις θέσεις πρόσδεσης του, οι TRs είναι επίσης σε θέση να καταστείλουν την δραστηριότητα του εκκινητή ακόμη και παρουσία της T3, υποδηλώνοντας ότι οι λειτουργικές ιδιότητες του TR διαμορφώνονται από τον τρόπο αλληλεπίδρασης συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με την DBD. Αυτά τα στοιχεία DNA είναι τα αποκαλούμενα αρνητικά στοιχεία απόκρισης της ορμόνης θυρεοειδούς (negative thyroid hormone response elements - nTREs). Μέσω της δέσμευσης σε αυτά τα στοιχεία, ο TR δεν καταστέλλει πλέον αυτά τα γονίδια-στόχους απουσία θυρεοειδικής ορμόνης. Οι μηχανισμοί αυτού του αντίθετου αποτελέσματος της ορμόνης στο TR βρίσκονται πιθανώς στη φύση του TRE. Θεωρείται ότι η αλληλουχία DNA επάγει μια

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

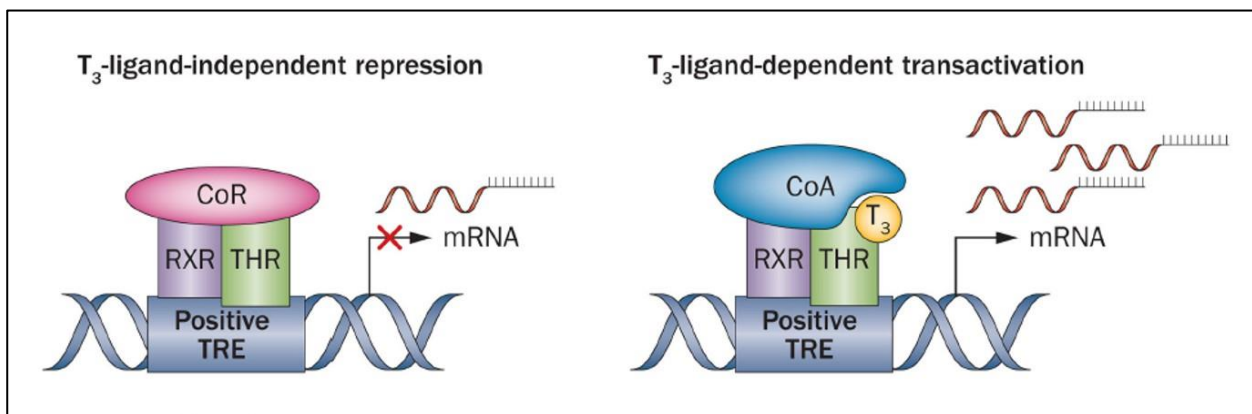
συγκεκριμένη διαμόρφωση υποδοχέα, η οποία οδηγεί στη δέσμευση των αποακετυλασών ιστόνης ακόμη και παρουσία συνδέτη (110).

Επίσης υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί με τους οποίους οι TRs ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων. Η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης γονιδίου που προκαλείται από τα πρωτοογκογονίδια JUN-FOS είναι ένα παράδειγμα με το οποίο ο ορμονικά δεσμευμένος TR είναι ικανός να καταστέλλει γονίδια που ενεργοποιούνται από αυτό το ετεροδιμερές του μεταγραφικού παράγοντα με την πρωτεΐνη ενεργοποίησης 1 (activator protein 1 - AP1). Αυτή η αναστολή δεν συνεπάγεται την δέσμευση του DNA από τον TR (111).

Έτσι, οι TRs ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση με διάφορους μηχανισμούς, αφενός ως παράγοντες μεταγραφής που συνδέονται με το DNA, και αφετέρου μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης με πρωτεΐνη χωρίς άμεση δέσμευση στο DNA.

Τόσο η γονιδιακή αποσιώπηση των γονιδίων-στόχων από συνδεδεμένο με DNA-TR σε απουσία συνδέτη όσο και η γονιδιακή ενεργοποίηση παρουσία θυρεοειδικής ορμόνης περιλαμβάνει τους λεγόμενους συμπαραγόντες. Η αποσιώπηση διαμεσολαβείται από τη δέσμευση σε βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες στον υποκινητή καθώς και από την στρατολόγηση της δράσης της αποακετυλάσης ιστονών μέσω δέσμευσης από συν-καταστολείς. Ακόμη θεωρείται ότι η αποακετυλίωση νουκλεοσωμάτων οδηγεί σε μια πιο συμπαγή δομή της χρωματίνης, η οποία εμφανίζει χαμηλότερη προσβασιμότητα για μεταγραφικούς ενεργοποιητές και βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Η τροποποίηση και αναδιαμόρφωση της χρωματίνης περιλαμβάνει μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που περιέχουν συν-καταστολείς και συν-ενεργοποιητές μαζί με ενζυματικές δραστηριότητες για την τροποποίηση των ιστονών (112, 113).

Η σύνδεση της θυρεοειδικής ορμόνης με την περιοχή δέσμευσης συνδέτη (ligand-binding domain - LBD) του TR οδηγεί σε μεταβολές της διαμόρφωσης στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα. Ακολούθως, οι συν-καταστολείς διαχωρίζονται από τον υποδοχέα και οι συν-ενεργοποιητές είναι ικανοί να δεσμεύονται με το καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα με έναν ορμονοεξαρτώμενο τρόπο (**Εικόνα 25**) (114).



**Εικόνα 25. Πρότυπο γονιδιακής ρύθμισης από ορμόνες θυρεοειδούς.** Απουσία της T<sub>3</sub>, ένας συν-καταστολέας συνδέεται με το ετεροδιμερές RXR-THR στο θετικό TRE, καταστέλλοντας έτσι ενεργά την έκφραση γονιδίου στόχου. Όταν η T<sub>3</sub> συνδέεται με το διμερές του THR, ο συν-καταστολέας απελευθερώνεται και προσδένονται συν-ενεργοποιητές, οδηγώντας έτσι σε ενεργοποίηση της γονιδιακής μεταγραφής (115).

Τόσο οι συγκρίσεις μεταξύ της κρυσταλλικής δομής και της μοντελοποίησης με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών των συνδεδεμένων με ορμόνες TRs (**Εικόνα 26**) και την στενά σχετιζόμενη αλλά μη δεσμευμένο RXR υποδεικνύουν ότι η κύρια μεταβολή της διαμόρφωσης του υποδοχέα που είναι υπεύθυνη για τον επαγωγή από τη σύνδεσή του με

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

την θυρεοειδική ορμόνη είναι η έλικα 12. Αυτή η έλικα έχει σημαντικό βιολογικό ρόλο για τη λειτουργία του TR. Κατά τη δέσμευση ορμονών, η έλικα 12 είναι απαραίτητη για την ενίσχυση της αποσιώπησης και την ενεργοποίηση των γονιδίων προκαλώντας τη αποδέσμευση των συν-καταστολέων από τον υποδοχέα και επιτρέποντας τη σύνδεση των συν-ενεργοποιητών (116-118).



*Εικόνα 26. Κρυσταλλική δομή της ορμονο-δεσμευτικής περιοχής του TRα (Hormone binding domain – HBD) με την δεσμευμένη θυρεοειδική ορμόνη. Η κρυσταλλική δομή του συνδεόμενης HBD του TRα παρουσιάζει κατά κύριο λόγο μια α-ελικοειδή δομή με τον θύλακα να συνδέεται την θυρεοειδική ορμόνη. Τα μόνο δύο β-φύλλα υποδεικνύονται ως βέλη (108).*

### 2.3.3 TRα και παθογένεση

Βιβλιογραφικά έχουν καταγραφεί διάφορες καταστάσεις με τις οποίες έχει συσχετιστεί ο TRα με παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες μάλιστα έχουν και ένα γενετικό υπόβαθρο. Μερικές από αυτές είναι:

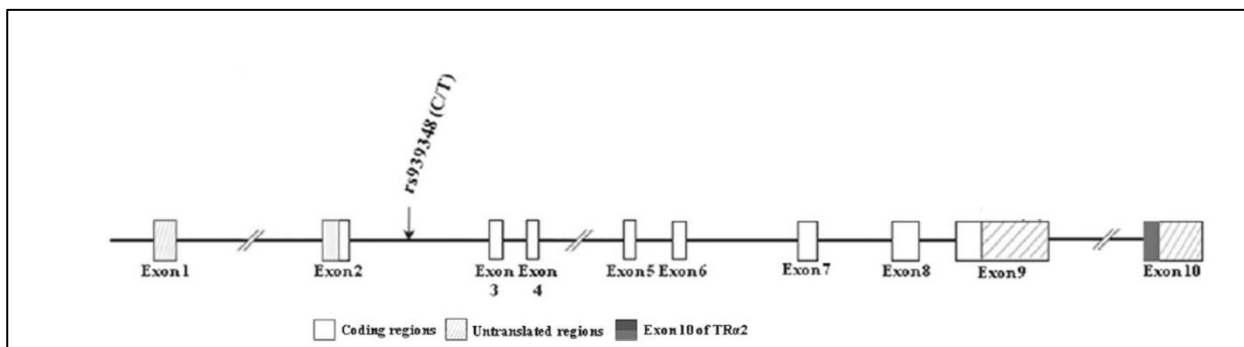
- Συγγενής Υποθυρεοειδισμός χωρίς βρογχοκήλη(119-121)  
Έχουν περιγραφεί τα παρακάτω περιστατικά:
  - ασθενής φέρει de novo μετάλλαξη στο γονίδιο του THRα (Glu403Ter – rs137853162) που οδηγεί στην παραγωγή μιας μεταλλαγμένης πρωτεΐνης (θεωρείται ότι υπάρχει πρόωρος τερματισμός με απώλεια της α-έλικας στο καρβοξυτελικό άκρο) η οποία αναστέλλει τη δράση του υποδοχέα με επικρατή-αρνητικό τρόπο
  - οικογενείς καταστάσεις όπου υπάρχει σε ετεροζυγωτία ένθεση 1bp στο γονίδιο του THRα (1-bp INS, 1190T – rs137853163)
  - ασθενείς να φέρουν σε ετερόζυγη κατάσταση 2 παρανοηματικές μεταλλάξεις (Glu403Lys – rs876657395 και Pro398Arg – rs876657396) και μια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη (Cys392Ter – rs876657394)
- Μη λειτουργικά αδενώματα της υποφύσεως (σωματικές μεταλλάξεις)(122)  
Έχουν περιγραφεί οι παρακάτω μεταλλάξεις:
  - Παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις Ser45Ile και Lys370Asn
  - Παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη Ser377Leu
- Θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένα (σωματικές μεταλλάξεις)(123)
  - TRs που έχουν υποστεί μετάλλαξη φέρεται να σχετίζονται με την ογκογένεση θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς αδένα

### 2.3.4 Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τον πολυμορφισμό rs939348

Ο TRα είναι ένας σημαντικός πυρηνικός υποδοχέας, ο οποίος εκφράζεται σε αρκετούς ιστούς και διαθέτει έντονη μεταγραφική δράση. Συνεπώς κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί κατά

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

πόσο μπορεί να υπάρξει συσχέτισμός ανάμεσα σε διάφορους πολυμορφισμούς που έχουν περιγραφεί στο γονίδιο *THRα* και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο rs939348, ένας ιντρονικός πολυμορφισμός που βρίσκεται στο εσόνιο 2 μεταξύ των εξονίων 2-3 (Εικόνα 27), (Εικόνα 28).



Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου *THRα* και η θέση του rs939348 σε αυτό (124).

Population	Allele: frequency (count)	Genotype: frequency (count)
ALL	T: 0.357 (1789) C: 0.643 (3219)	T T: 0.151 (379) C C: 0.437 (1094) C T: 0.412 (1031)
AFR	T: 0.287 (380) C: 0.713 (942)	T T: 0.079 (52) C C: 0.504 (333) C T: 0.418 (276)
ACB	T: 0.250 (48) C: 0.750 (144)	T T: 0.083 (8) C C: 0.583 (56) C T: 0.333 (32)
ASW	T: 0.254 (31) C: 0.746 (91)	T T: 0.033 (2) C C: 0.525 (32) C T: 0.443 (27)
ESN	T: 0.242 (48) C: 0.758 (150)	T T: 0.071 (7) C C: 0.586 (58) C T: 0.343 (34)
GWD	T: 0.376 (85) C: 0.624 (141)	T T: 0.097 (11) C C: 0.345 (39) C T: 0.558 (63)
LWK	T: 0.298 (59) C: 0.702 (139)	T T: 0.111 (11) C C: 0.515 (51) C T: 0.374 (37)
MSL	T: 0.312 (53) C: 0.688 (117)	T T: 0.094 (8) C C: 0.471 (40) C T: 0.435 (37)
YRI	T: 0.259 (56) C: 0.741 (160)	T T: 0.046 (5) C C: 0.528 (57) C T: 0.426 (46)
AMR	T: 0.297 (206) C: 0.703 (488)	T T: 0.110 (38) C C: 0.516 (179) C T: 0.375 (130)
CLM	T: 0.351 (66) C: 0.649 (122)	T T: 0.170 (16) C C: 0.468 (44) C T: 0.362 (34)
MXL	T: 0.312 (40) C: 0.688 (88)	T T: 0.109 (7) C C: 0.484 (31) C T: 0.406 (26)
PEL	T: 0.318 (54) C: 0.682 (116)	T T: 0.118 (10) C C: 0.482 (41) C T: 0.400 (34)
PUR	T: 0.221 (46) C: 0.779 (162)	T T: 0.048 (5) C C: 0.606 (63) C T: 0.346 (36)
EAS	T: 0.596 (601) C: 0.404 (407)	T T: 0.363 (183) C C: 0.171 (86) C T: 0.466 (235)
CDX	T: 0.602 (112) C: 0.398 (74)	T T: 0.366 (34) C C: 0.161 (15) C T: 0.473 (44)
CHB	T: 0.524 (108) C: 0.476 (98)	T T: 0.243 (25) C C: 0.194 (20) C T: 0.563 (58)
CHS	T: 0.676 (142) C: 0.324 (68)	T T: 0.495 (52) C C: 0.143 (15) C T: 0.362 (38)
JPT	T: 0.572 (119) C: 0.428 (89)	T T: 0.356 (37) C C: 0.212 (22) C T: 0.433 (45)
KHV	T: 0.606 (120) C: 0.394 (78)	T T: 0.354 (35) C C: 0.141 (14) C T: 0.505 (50)
EUR	T: 0.282 (284) C: 0.718 (722)	T T: 0.101 (51) C C: 0.537 (270) C T: 0.362 (182)
CEU	T: 0.293 (58) C: 0.707 (140)	T T: 0.141 (14) C C: 0.556 (55) C T: 0.303 (30)
FIN	T: 0.338 (67) C: 0.662 (131)	T T: 0.121 (12) C C: 0.444 (44) C T: 0.434 (43)
GBR	T: 0.291 (53) C: 0.709 (129)	T T: 0.132 (12) C C: 0.549 (50) C T: 0.319 (29)
IBS	T: 0.243 (52) C: 0.757 (162)	T T: 0.065 (7) C C: 0.579 (62) C T: 0.355 (38)
TSI	T: 0.252 (54) C: 0.748 (160)	T T: 0.056 (6) C C: 0.551 (59) C T: 0.393 (42)
SAS	T: 0.325 (318) C: 0.675 (660)	T T: 0.112 (55) C C: 0.462 (226) C T: 0.425 (208)
BEB	T: 0.297 (51) C: 0.703 (121)	T T: 0.116 (10) C C: 0.523 (45) C T: 0.360 (31)
GIH	T: 0.306 (63) C: 0.694 (143)	T T: 0.087 (9) C C: 0.476 (49) C T: 0.437 (45)
ITU	T: 0.358 (73) C: 0.642 (131)	T T: 0.137 (14) C C: 0.422 (43) C T: 0.441 (45)
PJL	T: 0.297 (57) C: 0.703 (135)	T T: 0.104 (10) C C: 0.510 (49) C T: 0.385 (37)
STU	T: 0.363 (74) C: 0.637 (130)	T T: 0.118 (12) C C: 0.392 (40) C T: 0.490 (50)

Εικόνα 28. Απεικόνιση της συχνότητας των αλληλίων και των γονοτύπων του rs939348 [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=17:40075100-40076100;v=rs939348;vdb=variation;vf=362556111#1000genomesprojectphase3\\_anchor](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=17:40075100-40076100;v=rs939348;vdb=variation;vf=362556111#1000genomesprojectphase3_anchor)

Ένα πεδίο στο οποίο γίνονται προσπάθειες για την ταυτοποίηση γενετικών αιτιών, αφορά τις κερκαδικές διαταραχές των καταθλιπτικών και διπολικών ασθενών. Στο πεδίο αυτό προσπαθούν να συμβάλλουν με τη μελέτη τους οι Křírke *et al* (125), όπου μελέτησαν το γενετικό προφίλ ασθενών με διπολική διαταραχή και μονοπολική κατάθλιψη. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής φαίνεται να συσχετίζουν τον rs939348 με την διπολική διαταραχή.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Επίσης η νόσος Alzheimer αποτελεί μια νευροεκφυλιστική νόσο, που γενετικά χαρακτηρίζεται ως ετερογενής και πολύπλοκη. Η συσχέτιση της με γενετικούς παράγοντες τείνει να είναι επιτακτική καθώς αποτελεί την πιο συχνή μορφή άνοιας και παράλληλα το προσδόκιμο ζωής ολοένα και αυξάνεται, συνεπώς τα άτομα που θα νοσούν θα είναι περισσότερα. Οι μελέτες που πραγματοποιούνται δεν εστιάζονται σε γονίδια που σχετίζονται αμιγώς με νευρολογικές διαδικασίες, αρκεί να εμπλέκονται με κάποιο τρόπο στα μονοπάτια αυτά. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι οι θυρεοειδικές ορμόνες και οι TRs που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου κατά την εμβρυική και νεογνική ηλικία. Έτσι, οι Corneveaux *et al* (126) προσπάθησαν να αναδείξουν γενετικούς προδιαθεσιακούς παράγοντες υψηλού κινδύνου. Ανάμεσα στους πολυμορφισμούς που δείχνουν σημαντική συσχέτιση βρίσκεται και ο rs939348. Ενώ σε μελέτη των Goumidi *et al* (127) φαίνεται ότι ο rs939348 δεν συσχετίζεται με την νόσο Alzheimer, παρόλα αυτά όταν το αλληλόμορφο T είναι σε ομοζυγωτία υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης της νόσου έναντι του αλληλομόρφου C.

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αποτελεί τον πιο συχνό καρκίνο στο ενδοκρινικό σύστημα με ποσοστό σχεδόν 90%, ενώ με τη σειρά του το διαφοροποιημένο καρκίνωμα του θυρεοειδούς (θηλώδες και θηλακιώδες καρκίνωμα) αντιπροσωπεύει σχεδόν το 90% των καρκίνων του θυρεοειδούς αδένα. Ακόμη, θεωρείται πως ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένα παρουσιάζει υψηλότερη γενετική προδιάθεση συγκριτικά με τους υπόλοιπους τύπους καρκίνου. Γι' αυτόν τον λόγο οι Pastor *et al* (128) προσπάθησαν να συσχετίσουν πολυμορφισμούς σε γονίδια που σχετίζονται με τη θυρεοειδική λειτουργία και την προδιάθεση για καρκίνο του θυρεοειδούς. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι ο rs939348 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για τον καρκίνο του θυρεοειδούς.

Οι Goumidi *et al* (129) ορμώμενοι από την ήδη υπάρχουσα γνώση ότι ο υποθυρεοειδισμός σχετίζεται με τις καρδιαγγειακές νόσους, προσπάθησαν να εμπλουτίσουν αυτή τη γνώση βρίσκοντας συσχέτιση ανάμεσα στον TRα και την αρτηριακή υπέρταση, και συγκεκριμένα πως μπορεί να την επηρεάζει. Τελικά κατάφεραν να συσχετίσουν το έλασσον αλληλόμορφο του rs939348 τόσο με αύξηση της συστολικής πίεσης όσο και της διαστολικής, καθιστώντας το έτσι ικανό να μπορεί να συσχετιστεί με 25% μεγαλύτερο ρίσκο για υπέρταση.

Ενώ αντίστοιχα ο υποθυρεοειδισμός αποτελεί μια από τις πιο συχνές ενδοκρινείς διαταραχές με θεραπεία επιλογής την L-T4. Πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση της θεραπείας με σκοπό την επίτευξη των βέλτιστων αποτελεσμάτων, όπως η ηλικία, το φύλο, άλλα συνοδά νοσήματα, η συμμόρφωση του ασθενούς καθώς και το γενετικό του προφίλ. Οι Al-Azzam *et al* (130) μελέτησαν τον rs939348 και βρήκαν συσχέτιση τόσο με τη δοσολογία της L-T4, όσο και με την κεντρική παχυσαρκία. Οι ασθενείς που φέρουν δύο T αλληλόμορφα φαίνεται όσον αφορά την δοσολογία της L-T4 να απαιτείται μεγαλύτερη δόση L-T4 για να υπάρχει σωστή ρύθμιση, ενώ ως προς την κεντρική παχυσαρκία, υπάρχουν αυξημένα ποσοστά κεντρικής παχυσαρκίας και μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη μεταβολικού συνδρόμου.

Τέλος, οι Satwika *et al* (131) βασισμένοι σε προηγούμενες μελέτες προσπάθησαν να συσχετίσουν το λιπιδαιμικό προφίλ ασθενών με υποθυρεοειδισμό με τον rs939348. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι το T αλληλόμορφο, είτε εμφανίζεται μια είτε δυο φορές, σχετίζεται με αυξημένα τριγλυκερίδια (Triglycerides – Tg) και μειωμένα επίπεδα της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης της χοληστερόλης (High density lipoprotein – HDL). Η συγκεκριμένη μελέτη κατέληξε ότι το T αλληλόμορφο σχετίζεται με την ανάπτυξη δυσλιπιδαιμίας σε υποθυρεοειδικούς ασθενείς, ενώ το C αλληλόμορφο ενδέχεται να έχει προστατευτικό ρόλο.

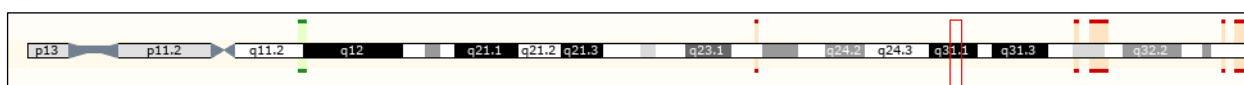
Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

## 2.4 TSHR

### 2.4.1 Δομή και λειτουργία του γονιδίου TSHR

Το γονίδιο του υποδοχέα της TSH (TSH receptor – TSHR) εδράζεται στο μακρύ βραχίονα (q) του 14ου χρωμοσώματος και συγκεκριμένα στην κυτταρογεννετική ζώνη 14q31.1 (**Εικόνα 29**). Το γονίδιο TSHR (Gene ID: 7253) αποτελείται από 10 εξόνια που εμφανίζουν μια ενδιαφέρουσα συσχέτιση με τη δομή της πρωτεΐνης, το μέγεθός του είναι περίπου 60 kb και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Μεγάλη αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή δέσμησης προσδέτη
- Επτα-ελικοειδή περιοχή
- Καρβοξυτελική ενδοκυττάρια περιοχή (132-135) .



Εικόνα 29. Η θέση του γονιδίου TSHR στο χρωμόσωμα 14. Εδράζεται στην κυτταρογεννετική ζώνη 14q31.1 στις μοριακές θέσεις (GRCh38): 80,954,989-81,146,302

[https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;q=ENSG00000165409;r=14:80954989-81146302](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;q=ENSG00000165409;r=14:80954989-81146302)

Τα πρώτα 9 εξόνια κωδικοποιούν την εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, που αντιστοιχούν σε επαναλαμβανόμενα μοτίβα πλούσια σε λευκίνη, ενώ η διαμεμβρανική και η ενδοκυττάρια περιοχή κωδικοποιείται από ένα μεγάλο εξόνιο, το εξόνιο 10. Ο TSHR αποτελείται από 744 αμινοξέα, εκ των οποίων τα 398 αποτελούν την αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή που απαρτίζεται από οκτώ επαναλαμβανόμενα μοτίβα πλούσια σε λευκίνη (132, 133, 136, 137).

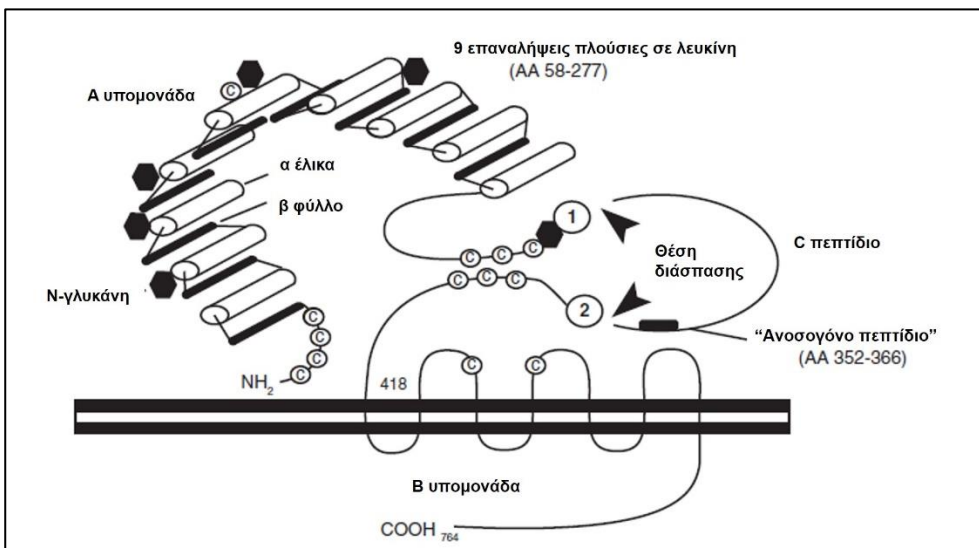
Αυτό το εύρημα υπενθυμίζει το γεγονός ότι πολλά γονίδια υποδοχέων συζευγμένα με πρωτεΐνη G (G protein–coupled receptor genes – GPCR) δεν περιέχουν εσόνια. Ένα πιθανό εξελικτικό σενάριο προκύπτει από αυτόν τον τρόπο οργάνωσης γονιδίων: τα γονίδια υποδοχέων ορμόνης γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως θα είχαν εξελιχθεί από τη συμπύκνωση ενός κλασικού GPCR με ένα μωσαϊκό γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη πλούσια σε επαναλήψεις λευκίνης. Ο τριπλασιασμός αυτού του προγονικού γονιδίου και η μεταγενέστερη απόκλιση οδήγησε στους υποδοχείς για LH / CG, FSH και TSH. Η ύπαρξη 10 εξονίων στα γονίδια υποδοχέων των TSH και FSH (σε αντίθεση με τον υποδοχέα LH / CG που κωδικοποιείται από 11 εξόνια) υποδηλώνει την ακόλουθη φυλογενία: ένας προγονικός υποδοχέας ορμόνης γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως διπλασιάζεται στην περίπτωση του LH υποδοχέα και ο προγονικός υποδοχέας των TSH και FSH έχασε ένα εσόνιο. Ο τελευταίος μελλοντικά θα διπλασιαστεί αποδίδοντα με αυτόν τον τρόπο τους υποδοχείς των TSH και FSH (133).

### 2.4.2 Δομή και λειτουργία του TSHR

Ο TSHR, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ανήκει στην οικογένεια των GPCRs υποδοχέων οι οποίοι μοιράζονται επτά διαμεμβρανικά τμήματα συνδεδεμένα με τρεις εξωκυτταρικούς και τρεις ενδοκυτταρικούς βρόχους, ενώ διαθέτουν μια μακριά αμινοτελική περιοχή που εμπλέκεται στην αναγνώριση και δέσμηση του προσδέτη (132).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Ο TSHR, όμως, διαφέρει από τους υπόλοιπους GPCRs καθώς υπάρχουν δύο εξίσου δραστικές μορφές του (138, 139). Αυτές είναι η μορφή μονής αλυσίδας και η μορφή των δύο υπομονάδων του TSHR (**Εικόνα 30**). Η μορφή μονής αλυσίδας του TSHR αποτελείται από τρεις συνεχόμενες υπομονάδες: την υπομονάδα A, το πεπτιδίο C και την υπομονάδα B. Η υπομονάδα A αρχίζει στο αμινοτελικό άκρο της εξωκυτταρικής περιοχής και περιέχει το μεγαλύτερο μέρος της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα. Το πεπτιδίο C είναι συνδεδεμένο με το καρβοξυτελικό άκρο της υπομονάδας A και συνεχίζει την εξωκυτταρική περιοχή. Το πεπτιδίο C περιέχει μια αλληλουχία 50 αμινοξέων που βρίσκεται μόνο στους υποδοχείς της TSH. Η υπομονάδα B συνδέεται με το καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου C και περιέχει την διαμεμβρανική περιοχή και το καρβοξυτελικό άκρο του κυτταροπλασματικού τμήματος του TSHR (139-141). Η μορφή των δύο υπομονάδων του υποδοχέα στερείται του πεπτιδίου C, το οποίο διασπάται από την πρωτεΐνη κατά την ενδοκυτταρική επεξεργασία και αποτελείται από τις υπομονάδες A και B που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (142-145). Τέλος επισημαίνεται ότι και οι δύο μορφές υποδοχέων ενεργοποιούνται εξίσου από την TSH επειδή το πεπτιδίο C και οι κοντινές περιοχές των υπομονάδων A και B συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος (146, 147).



**Εικόνα 30. Ο υποδοχέας της TSH (TSHR).** Υπάρχουν δύο μορφές TSHR. Η μορφή μονής αλυσίδας, που αποτελείται από μια υπομονάδα A, το πεπτιδίο C και την υπομονάδα B. Η μετα-μεταφραστική διάσπαση του πεπτιδίου C από τη μορφή μονής αλυσίδας έχει σαν αποτέλεσμα τη μορφή δύο υπομονάδων. Αυτή η μορφή αποτελείται από την υπομονάδα A συνδεδεμένη στην υπομονάδα B με δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των C-τερματικών υπολειμμάτων κυστεΐνης της υπομονάδας A και των αμινοτελικών υπολειμμάτων κυστεΐνης της υπομονάδας B (139).

Ο υποκινητής του γονιδίου TSHR έχει αλληλουχηθεί αναδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο τα εξής χαρακτηριστικά: είναι πλούσιο σε GC και απουσιάζει η αλληλουχία TATA box (αλληλουχία που συνήθως βρίσκεται στον υποκινητή και υποδεικνύει την έναρξη της μεταγραφής) (132, 133).

Παρόμοια με άλλους GPCR, ο TSHR μοιράζεται έναν κοινό τρόπο ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, διεγείροντας την ανταλλαγή GDP για GTP στην υπομονάδα Gα και στην φωσφοϊνοσιπόλη (IP) μέσω της σύζευξης Gq. Η δέσμευση της TSH στον TSHR στη

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

πλαγιοβασική μεμβράνη των θυλακικών κυττάρων του θυρεοειδούς οδηγεί σε διέγερση των οδών δευτερογενούς αγγελιοφόρου που περιλαμβάνουν αυτές τις δύο κύριες οδούς:

- Gs / cAMP, η οποία μεσολαβεί στην έκκριση ορμονών, στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση κυττάρων θυρεοειδούς και στην πρόσληψη ιωδίου,
- IP / Ca<sup>+2</sup>, που ρυθμίζει τη σύνθεση της ορμόνης του θυρεοειδούς διεγείροντας την οργανοποίηση του ιωδίου.

Οι μεταλλάξεις στον TSHR έχουν ως αποτέλεσμα είτε κέρδος είτε απώλεια της λειτουργίας του υποδοχέα (148-150).

### 2.4.3 TSHR και παθολόγηση

Μόλις ολοκληρώθηκε η περιγραφή της δομής και λειτουργικότητας τόσο του γονιδίου, όσο και της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης του TSHR, ήταν εφικτή η μελέτη για γενετικές παραλλαγές (μεταλλάξεις ή πολυμορφισμούς) και η πιθανή συσχέτισή τους με παθολογικές καταστάσεις.

#### ❖ Υπερλειτουργικό θυρεοειδικό αδένωμα και τοξική πολυοζώδης βρογχοκήλη

Οι Parma *et al* (151) ταυτοποίησαν σωματικές μεταλλάξεις στο καρβοξυτελικό τμήμα του τρίτου ενδοκυτταρικού βρόγχου του TSHR, οι οποίες ήταν εντοπισμένες στον ιστό του όγκου και περιλάμβαναν δύο διαφορετικές παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (Asp619Gly σε δύο περιπτώσεις και Ala623Ile σε μία). Τελικά κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι GPCR υποδοχείς είναι επιρρεπείς σε ιδιόσυστατη ενεργοποίηση με αυθόρμητες σωματικές μεταλλάξεις και μπορεί συνεπώς να συμπεριφέρονται ως πρωτοογκογονίδια.

Οι Fuhrer *et al* (152) εξέτασαν μια σειρά από τοξικά οζίδια του θυρεοειδούς (Toxic thyroid nodules - TTNs) για μεταλλάξεις στα εξόνια 9 και 10 του γονιδίου TSHR. Εντοπίστηκαν σωματικές μεταλλάξεις σε 15 από τα 31 περιστατικά TTNs (48%). Οι μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στον τρίτο ενδοκυτταρικό βρόγχο (Asp619Gly, Ala623Val και μια διαγραφή 27 bp με αποτέλεσμα την απαλοιφή 9 αμινοξέων στα κωδικόνια 613 έως 621), το έκτο διαμεμβρανικό τμήμα (Phe631Leu, Thr632Ile και Asp633Glu), τον δεύτερο εξωκυτταρικό βρόγχο (Ile568Thr) και τον τρίτο εξωκυτταρικό βρόγχο (Val656Phe). Μία μετάλλαξη, Ser281Asn, βρέθηκε στο τμήμα της εξωκυτταρικής περιοχής που κωδικοποιείται από το εξόνιο 9. Οι παραπάνω μεταλλάξεις είχαν ως αποτέλεσμα ιδιόσυστατη δραστηριότητα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι ιδιόσυστατες ενεργοποιήσεις μεταλλάξεων TSHR εμφανίζονται στο 48% των περιπτώσεων TTNs, που αντιπροσωπεύουν τον πιο συχνό μοριακό μηχανισμό που είναι γνωστό ότι προκαλεί TTNs.

Οι Tonacchera *et al* (153) εστίασαν την μελέτη τους στην αναζήτηση μεταλλάξεων του TSHR με ενεργοποιητική δράση, στην τοξική ή λειτουργικά αυτόνομη πολυοζώδη βρογχοκήλη που εμφανίστηκαν ως υπερλειτουργική στον σπινθηρογράφημα του θυρεοειδούς αδένου αλλά δεν υπήρχε σαφής αντιστοίχιση με συγκεκριμένα οζίδια στην αντικειμενική ή υπερηχογραφική εξέταση. Μεταλλάξεις εντοπίστηκαν σε 14 από τις 20 περιοχές υπερλειτουργίας, ενώ σε μη λειτουργικά οζίδια ή περιοχές που περιέχονται στον ίδιο αδένου δεν εντοπίστηκε μετάλλαξη. Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση των μεταλλάξεων TSHR είναι παρούσα στην πλειονότητα των περιπτώσεων μη αδενωματωδών υπερλειτουργικών οζιδίων που εντοπίζονται σε ολόκληρο τον αδένου ασθενών με τοξική ή λειτουργικά αυτόνομη πολυοζώδη βρογχοκήλη.



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

❖ Μη-αυτοάνοσος υπερθυρεοειδισμός

Οι Duprez *et al* (154) ανέδειξαν ετερόζυγες βλαστικές (germline) μεταλλάξεις στο γονίδιο TSHR σε ασθενείς με κληρονομούμενο μη-αυτοάνοσο υπερθυρεοειδισμό. Τα *in vitro* λειτουργικά χαρακτηριστικά αυτών των μεταλλάξεων (Val509Ala και Cys672Tyr) ήταν παρόμοια με εκείνα που έχουν ήδη περιγραφεί προηγουμένως για αυτόνομα λειτουργικά αδενώματα του θυρεοειδούς, εξηγώντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη θυρεοειδικής υπερπλασίας και υπερθυρεοειδισμού στους πάσχοντες ασθενείς (155).

❖ Μη-αυτοάνοση συγγενής αντίσταση θυρεοτροπίνης

Οι Alberti *et al* (156) αλληλούχισαν ολόκληρο το γονίδιο του TSHR σε 10 μη σχετιζόμενους ασθενείς με ήπια (6,6-14,9 mIU / L) έως μέτρια (24-46 mIU / L) αύξηση της TSH ορού, που συνοδεύεται από φυσιολογική συγκέντρωση fT3 και fT4, που συνάδει με τη διάγνωση της αντίστασης στην θυρεοτροπίνη. Ο όγκος του θυρεοειδούς αδένου ήταν φυσιολογικός σε όλους τους ασθενείς, εκτός από δύο που παρουσίαζαν μέτρια υποπλασία. Ακόμη, αποκλείστηκε αυτοάνοση ασθένεια του θυρεοειδούς αδένου σε όλους τους ασθενείς βάσει κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων. Οκτώ ασθενείς είχαν τουλάχιστον 1 συγγενή πρώτου βαθμού που έφερε την ίδια βιοχημική εικόνα. Μεταλλάξεις TSHR ανιχνεύθηκαν σε 4 από 10 περιπτώσεις με ανάλυση DNA περιφερικού αίματος (Pro162Ala, Cys600Arg, Leu467Pro, Cys41Ser και delAC655). Το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν ήταν ότι η μερική αντίσταση στη δράση της TSH είναι ένα συχνό εύρημα μεταξύ των ασθενών με ήπια υπερθυροτροπιναιμία μη αυτοάνοσης προέλευσης και ότι οι ετεροζυγωτικές γενετικές μεταλλάξεις του TSHR μπορεί να συσχετιστούν με τιμές TSH ορού που κυμαίνονται πάνω από το ανώτερο φυσιολογικό όριο.

❖ Νόσος Graves

Ως προς τη νόσο Graves και τη συσχέτισή της με παραλλαγές στο γονίδιο του TSHR, υπάρχει ασυμφωνία στη βιβλιογραφία. Οι Heldin *et al* (157) και Bahn *et al* (158) παρουσίασαν συσχέτιση ανάμεσα στην νόσο Graves και την Graves οφθαλμοπάθεια και των παραλλαγών Asp36His και Pro52Thr. Ενώ, οι Simanainen *et al* (159) χαρακτήρισαν τις παραπάνω παραλλαγές ως πολυμορφικές με συχνότητα 5% και 7,3% αντίστοιχα. Ομοίως, σε μελέτη που διεξήγαγαν οι Kotsa *et al* (160) σε 180 ασθενείς με νόσο Graves, δεν μπορούσαν να συσχετίσουν τον πολυμορφισμό Pro52Thr με την νόσο Graves, καθώς οι ασθενείς έφεραν τον πολυμορφικό αλληλόμορφο σε ποσοστό 8,3% έναντι 7,3% των μαρτύρων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, κρίθηκε απαραίτητη η ταξινόμηση ως προς τη λειτουργικότητα των μεταλλάξεων που έχουν αναφερθεί σε:

i. Gain-of-function μεταλλάξεις στο TSHR

Οι βλαστικές (germline) μεταλλάξεις gain-of-function καταλήγουν σε μη αυτοάνοσο υπερθυρεοειδισμό, ενώ οι σωματικές μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τον TSHR καταλήγουν σε τοξικά θυρεοειδικά οζίδια. Ο υπερθυρεοειδισμός που προκαλείται από τις βλαστικές μεταλλάξεις στον TSHR παρουσιάζει αυτοσωματική επικρατική κληρονομικότητα. Οι μεταλλάξεις εντοπίζονται κυρίως στο εξόνιο 10, το οποίο κωδικοποιεί τη διαμεμβρανική περιοχή και την ενδοκυτταρική ουρά που ενεργοποιούν τον TSHR. Ο φαινότυπος αυτών των ασθενών χαρακτηρίζεται από υπερθυρεοειδισμό με την παρουσία γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης αλλά από

την απουσία οφθαλμοπάθειας και από έλλειψη θυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων καθώς και από λεμφοκυτταρική διήθηση στην ιστολογία του θυρεοειδούς (155).

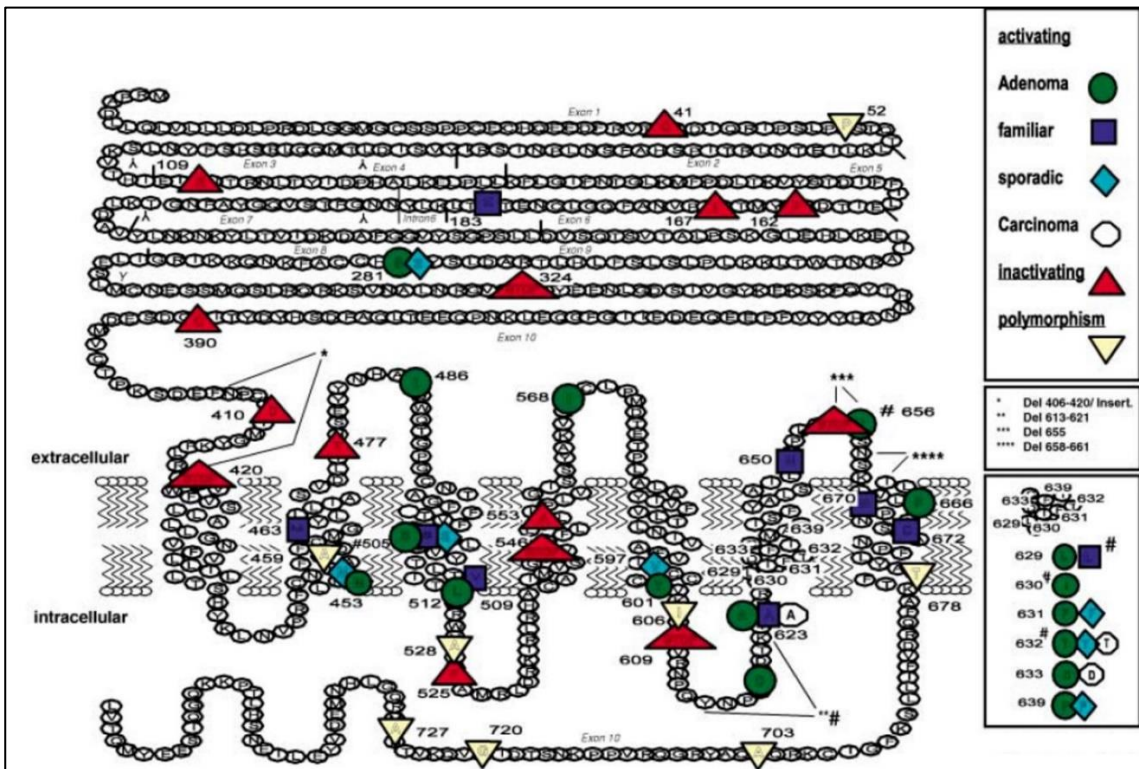
Το κλινικό φάσμα των φαινοτύπων ποικίλει και η εμφάνισή τους μπορεί να προκύψει οποιαδήποτε χρονική στιγμή από τη γέννηση έως την ενηλικίωση. Η παρουσία υπερθυρεοειδισμού, συγγενούς ή μη, πολυοζώδους βρογχοκήλης και θυλακιοειδούς καρκίνου έχουν αναφερθεί στην ίδια οικογένεια (161). Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί περισσότερες από 55 βλαστικές μεταλλάξεις gain-of-function, περίπου 14 από αυτές είναι σποραδικές, ενώ οι υπόλοιπες με οικογενή εμφάνιση. Ο υπερθυρεοειδισμός στα προσβεβλημένα άτομα είναι συχνά ανθεκτικός στη συμβατική θεραπεία που χρησιμοποιείται στη νόσο Graves και απαιτείται ακτινοθεραπεία ή ολική θυρεοειδεκτομή (162-166).

Αυτόνομα καλοήγη και κακοήγη τοξικά θυρεοειδικά οζίδια έχουν αποδειχθεί ότι προκύπτουν από μια ποικιλία σωματικών μεταλλάξεων που οδηγούν σε ιδιόσυστατη ενεργοποίηση του TSHR και επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη λειτουργία των κυττάρων. Οι σωματικές μεταλλάξεις του TSHR εμφανίζονται συνήθως στις διαμεμβρανικές και εξωκυττάριας περιοχές, αλλά τα θερμά σημεία (hot spot) είναι η έκτη διαμεμβρανική περιοχή και η Τρίτη ενδοκυτταρική περιοχή, όπου ο υποδοχέας αλληλοεπιδρά με τις πρωτεΐνες G. Το τοξικό αδένωμα που οφείλεται σε μεταλλάξεις ενεργοποίησης του TSHR μπορεί να εμφανιστεί στην βρεφική ηλικία ή ακόμη και ενδομήτρια. Τέλος, έχουν αναφερθεί περίπου 25 διαφορετικές σωματικές μεταλλάξεις ενεργοποίησης TSHR που εκδηλώνονται με τοξικό αδένωμα, πολυοζώδους βρογχοκήλης και τοξικού θυρεοειδικού καρκινώματος (163, 165, 167, 168).

## ii. Loss-of-function μεταλλάξεις στο TSHR

Περίπου 50 διαφορετικές μεταλλάξεις loss-of-function έχουν περιγραφεί στο TSHR. Τα προσβεβλημένα άτομα είναι ομόζυγα ή ετερόζυγα. Ο βαθμός απώλειας της ευαισθησίας στην TSH εξαρτάται από τον τύπο και τη θέση της μετάλλαξης στον TSHR. Η πιο σοβαρή απώλεια λειτουργίας του TSHR εκδηλώνεται ως ΣΥ, ενώ οι ήπιες μεταλλάξεις εμφανίζονται με ευθυρεοειδική υπερθυροτροπιναιμία ή υποκλινικό υποθυρεοειδισμό. Όταν και τα δύο αλληλόμορφα φέρουν μεταλλαγμένους υποδοχείς με πλήρη έλλειψη λειτουργίας, το αποτέλεσμα είναι σοβαρός υποθυρεοειδισμός, που συνήθως εμφανίζεται κατά τη γέννηση, ενώ οι φορείς μιας μετάλλαξης σε ένα αλληλόμορφο εμφανίζονται με αντισταθμισμένη υπερθυροτροπίνη. Ο θυρεοειδής αδένας είναι υποπλαστικός ή αόρατος σε scan με χρήση <sup>99m</sup>Tc. Ωστόσο, στον υπερηχογραφική απεικόνιση, ο αδένας φαίνεται να βρίσκεται σε νομότοπη θέση και συνήθως με μικρό μέγεθος. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου TSHR κατανέμονται σε όλο τον υποδοχέα. Οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται στην περιοχή σύνδεσης οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα δέσμευσης ή μειωμένη μεμβρανική έκφραση του υποδοχέα. Η τρίτη εξωκυτταρική και η έβδομη ενδοκυτταρική περιοχή του TSHR αποτελούν τα θερμά σημεία (hot spot) για gain-of-function μεταλλάξεις, αλλά έχουν εντοπιστεί και ορισμένες μεταλλάξεις loss-of-function σε αυτήν την περιοχή (**Εικόνα 31**) (156, 169, 170).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 31. Σχηματική απεικόνιση γνωστών μεταλλάξεων του TSHR (είτε gain-of-function είτε loss-of-function). Κόκκινα τρίγωνα: loss-of-function μεταλλάξεις, Κίτρινα τρίγωνα: πολυμορφισμοί, \*, \*\*\*, deletions οι οποίες απενεργοποιούν τον υποδοχέα, προκύπτουν από την εισαγωγή ενός κωδικόνιου λήξης, \*\*, \*\*\*\* deletions που επάγουν την ιδιόσυστατη δραστηριότητα του TSHR (150).

#### 2.4.4 Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τον πολυμορφισμό rs1991517

Ένας από τους πολυμορφισμούς του TSHR που παρουσιάζουν έντονη βιβλιογραφική αναφορά είναι ο rs1991517. Ο rs1991517 (Asp727Glu) αφορά την αντικατάσταση του ασπαρτικού οξέος από το γλουταμινικό οξύ στη θέση 727 και εντοπίζεται στο εξόνιο 10 του γονιδίου TSHR (Εικόνα 32).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Population	Allele: frequency (count)	Genotype: frequency (count)
ALL	G: 0.103 (517) C: 0.897 (4491)	G G: 0.011 (27) C C: 0.804 (2014) C G: 0.185 (463)
AFR	G: 0.057 (76) C: 0.943 (1246)	G G: 0.002 (1) C C: 0.887 (586) C G: 0.112 (74)
ACB	G: 0.062 (12) C: 0.938 (180)	C C: 0.875 (84) C G: 0.125 (12)
ASW	G: 0.090 (11) C: 0.910 (111)	C C: 0.820 (50) C G: 0.180 (11)
ESN	G: 0.066 (13) C: 0.934 (185)	C C: 0.869 (86) C G: 0.131 (13)
GWD	G: 0.040 (9) C: 0.960 (217)	C C: 0.920 (104) C G: 0.080 (9)
LWK	G: 0.056 (11) C: 0.944 (187)	G G: 0.010 (1) C C: 0.899 (89) C G: 0.091 (9)
MSL	G: 0.035 (6) C: 0.965 (164)	C C: 0.929 (79) C G: 0.071 (6)
YRI	G: 0.065 (14) C: 0.935 (202)	C C: 0.870 (94) C G: 0.130 (14)
AMR	G: 0.137 (95) C: 0.863 (599)	G G: 0.017 (6) C C: 0.744 (258) C G: 0.239 (83)
CLM	G: 0.122 (23) C: 0.878 (165)	C C: 0.755 (71) C G: 0.245 (23)
MXL	G: 0.109 (14) C: 0.891 (114)	C C: 0.781 (50) C G: 0.219 (14)
PEL	G: 0.218 (37) C: 0.782 (133)	G G: 0.047 (4) C C: 0.612 (52) C G: 0.341 (29)
PUR	G: 0.101 (21) C: 0.899 (187)	G G: 0.019 (2) C C: 0.817 (85) C G: 0.163 (17)
EAS	G: 0.153 (154) C: 0.847 (854)	G G: 0.026 (13) C C: 0.720 (363) C G: 0.254 (128)
CDX	G: 0.140 (26) C: 0.860 (160)	G G: 0.022 (2) C C: 0.742 (69) C G: 0.237 (22)
CHB	G: 0.180 (37) C: 0.820 (169)	G G: 0.039 (4) C C: 0.680 (70) C G: 0.282 (29)
CHS	G: 0.171 (36) C: 0.829 (174)	G G: 0.019 (2) C C: 0.676 (71) C G: 0.305 (32)
JPT	G: 0.125 (26) C: 0.875 (182)	G G: 0.029 (3) C C: 0.779 (81) C G: 0.192 (20)
KHV	G: 0.146 (29) C: 0.854 (169)	G G: 0.020 (2) C C: 0.727 (72) C G: 0.253 (25)
EUR	G: 0.104 (105) C: 0.896 (901)	G G: 0.010 (5) C C: 0.801 (403) C G: 0.189 (95)
CEU	G: 0.091 (18) C: 0.909 (180)	C C: 0.818 (81) C G: 0.182 (18)
FIN	G: 0.172 (34) C: 0.828 (164)	G G: 0.040 (4) C C: 0.697 (69) C G: 0.263 (26)
GBR	G: 0.099 (18) C: 0.901 (164)	G G: 0.011 (1) C C: 0.813 (74) C G: 0.176 (16)
IBS	G: 0.089 (19) C: 0.911 (195)	C C: 0.822 (88) C G: 0.178 (19)
TSI	G: 0.075 (16) C: 0.925 (198)	C C: 0.850 (91) C G: 0.150 (16)
SAS	G: 0.089 (87) C: 0.911 (891)	G G: 0.004 (2) C C: 0.826 (404) C G: 0.170 (83)
BEB	G: 0.110 (19) C: 0.890 (153)	G G: 0.012 (1) C C: 0.791 (68) C G: 0.198 (17)
GIH	G: 0.058 (12) C: 0.942 (194)	C C: 0.883 (91) C G: 0.117 (12)
ITU	G: 0.103 (21) C: 0.897 (183)	G G: 0.010 (1) C C: 0.804 (82) C G: 0.186 (19)
PJL	G: 0.083 (16) C: 0.917 (176)	C C: 0.833 (80) C G: 0.167 (16)
STU	G: 0.093 (19) C: 0.907 (185)	C C: 0.814 (83) C G: 0.186 (19)

Εικόνα 32. Απεικόνιση της συχνότητας των αλληλίων και των γονοτύπων του rs1991517

[https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=14:81143739-81144739;v=rs1991517;vdb=variation;vf=156561454#1000genomesprojectphase3\\_anchor](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=14:81143739-81144739;v=rs1991517;vdb=variation;vf=156561454#1000genomesprojectphase3_anchor)

Οι Gabriel *et al* (171) προσπαθώντας να συσχετίσουν την τοξική πολυοζώδη βρογχοκήλη (Toxic multinodular goiter – TMNG) με γενετικές παραλλαγές στον TSHR, εντόπισαν τον rs1991517 σε ετεροζυγωτία. Ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται να συσχετίζεται με την TMNG καθώς βρέθηκε σε μεγάλο ποσοστό στους ασθενείς, χωρίς όμως να καθίσταται υπεύθυνος για την ανάπτυξη της νόσου, αφού βρέθηκε σε υψηλό ποσοστό και στους μάρτυρες. Ο rs1991517 μελετήθηκε ως προδιαθεσιακός παράγοντας και από τους Tug *et al* (172), καταλήγοντας και αυτοί στο συμπέρασμα ότι λόγω του υψηλού ποσοστού που ανιχνεύεται και στον πληθυσμό των μαρτύρων δεν μπορεί να συσχετιστεί με την παθογένεση της TMNG.

Οι Sriprapradang *et al* (173) μελετώντας την αντίσταση στην TSH και μεταλλάξεις που υπάρχουν στο γονίδιο του TSHR, προσπαθούν να αποδείξουν πιθανή κοινή προέλευση των μεταλλάξεων αυτών. Στα δείγματα που μελέτησαν βρέθηκε και ο rs1991517, ενώ δεν κατάφεραν να αποδείξουν το επιθυμητό αποτέλεσμα λόγω μικρού αριθμού δειγμάτων.

Οι Sigurdson *et al* (174) προσπάθησαν να αναδείξουν γενετικούς παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Ο rs1991517 συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης θυρεοειδούς. Ενώ, αργότερα οι Graves *et al* (175) κατά τη μελέτη του καρκινώματος των κυττάρων Merkel (Merkel cell carcinoma - MCC), ενός σπάνιου νευροενδοκρινικού καρκινώματος με ελάχιστη κατανόηση ως προς τη μοριακή του αιτιολογία, ο rs1991517 αναδείχθηκε με υψηλή αλληλική συχνότητα και θεωρήθηκε ότι μπορεί να συσχετιστεί με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Σε μετα-ανάλυση των Xiong *et al* (176) με σκοπό τη γενετική συσχέτιση με τη νόσο Graves, ο rs1991517 αποκλείστηκε λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισης στον φυσιολογικό πληθυσμό.

Οι Alves *et al* (177) βασιζόμενοι στο γεγονός ότι οι loss-of-function μεταλλάξεις του TSHR σχετίζονται με την εμφάνιση ΣΥ, μελέτησαν το συγκεκριμένο γονίδιο με σκοπό να επιβεβαιώσουν συσχέτιση αυτή. Ο rs1991517 αν και βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό ασθενών, δεν καταφέρει να συσχετιστεί με την παθογένεση της νόσου.

Σε μελέτη των Singh *et al* (178) με σκοπό τη συσχέτιση του rs1991517 με τον υποθυρεοειδισμό στον πληθυσμό της κεντρικής Ινδίας, ο πολυμορφισμός αυτός αναδείχθηκε σε μεγάλο ποσοστό. Καθώς όμως υπήρχε αντίστοιχα μεγάλο ποσοστό και στον πληθυσμό των μαρτύρων, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι πιθανόν ο rs1991517 δεν σχετίζεται με την ανάπτυξη δομικών δυσλειτουργιών και υποθυρεοειδισμού.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

---

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### **3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ**

1. Αναλυτικός ζυγός, Adam Equipment ADP-1200
2. Ψηφιακός ζυγός ακριβείας, Precisa 40SM-200A (Precisa Balances)
3. Φυγόκεντρος, Heraeus Multifuge 3SR+ (Thermo Scientific)
4. Μικροφυγόκεντρος, Centrifuge 5424 (Eppendorf)
5. Block heater (Stuart Scientific)
6. Συσκευή ανάδευσης, Vortex
7. Πεχάμετρο με μικροηλεκτρόδιο συνδυασμού υάλου καλομέλανος (Hanna Instruments)
8. Πιπέττες ακριβείας, Sartorius
9. Επωαστήρας, Heraeus Function Line (Thermo Scientific)
10. Θερμικός κυκλοποιητής, PTC-100 (MJ Research)
11. Θερμαντική εστία με μαγνητικό αναδευτήρα (Stuart Scientific)
12. Συσκευή ηλεκτροφόρησης, PerfectBlue Horizontale Midigelsysteme (Peqlab)
13. Τράπεζα υπεριώδους φωτός UV, InGenius LHR (Syngene)
14. Ψηφιακή κάμερα Canon PowerShot G10 (συνοδευόμενη από το λογισμικό πρόγραμμα RemoteCapture DC)

#### **3.2. ΥΛΙΚΑ**

15. Μικροπλακίδια PCR (96-well), Corning Inc. (Thermo Scientific)
16. Ρύγχη πιπετών
17. Σωληνάρια PCR 200  $\mu$ L, BRAND (Sigma Aldrich)
18. Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1,5 mL
19. Σωληνάρια τύπου Falcon 15 και 50 mL

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

### 3.3. ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. EDTA p.a. , Serva
2. Kapa Taq ReadyMix PCR Kit, Kapabiosystems
3. GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega
4. QiaAmp DNA blood mini kit, Qiagen
5. Αγαρόζη μοριακού βαθμού καθαρότητας, Nippon Genetics
6. Αιθανόλη, p.a, Merck
7. Βρωμιούχο αιθίδιο, EtBr p.a, Sigma
8. Γλυκερόλη, Sigma
9. Δεξτράνη, Sigma
10. Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Promega
11. Δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο, SDS, Serva
12. Μοριακός δείκτης DNA, FastGene 50bp DNA Ladder, Nippon Genetics
13. Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές (**Πίνακας 6**), Eurofins Genetics
14. Περιοριστικά ένζυμα (**Πίνακας 7**), Takara και ThermoScientific
15. Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο (Tris), p.a, Merck
16. Υδροξείδιο του Νατρίου, p.a., Merck
17. Υδροχλωρικό οξύ, Sigma
18. Χλωριούχο Κάλιο, Merck
19. Χλωριούχο Μαγνήσιο, Merck
20. Χλωριούχο Νάτριο, Merck
21. Βορικό οξύ, Sigma

### 3.4. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1. **Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5x (pH 8,0):** Tris 54 g/l , Boric Acid 27.5 g/l, EDTA 0.5 M
2. **Διάλυμα δεξτράνης:** Δεξτράνη 20 g/l και NaCl 9 g/L
3. **Διάλυμα χλωριούχου νατρίου 6 M**
4. **Διάλυμα λύσης κυττάρων:** Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 0,4 M

### 3.5. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Πίνακας 6. Ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Ολιγονουκλεοτίδιο	Όνομασία	Αλληλουχία (5'→3')	Μέγεθος (bp)
<b>Εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου DIO2 (95)</b>			
5'	DIO2T92A FW	CTCAGGGCTGGCAAAGTCAAG	21
3'	DIO2T92A RV	CCACACTCTATTAGAGCCAATT G	23
<b>Εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου THRa (130)</b>			
5'	THRaintron FD	CCTGTGTCTCCCAGCTTAGG	20
3'	THRaintron RV	CCACCAGACTCACAGCCTCT	20
<b>Εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου TSHR (179)</b>			
5'	TSHRD727E FW	CCATTCCTCTATGCTATTTTCAC	23
3'	TSHRD727E RV	CCGTTTGCATATACTCTTCTG	21

Πίνακας 7. Περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Όνομασία	Αλληλουχία αναγνώρισης	Εταιρία
<b>DIO2</b>		
<b>Afa I (Rsa I)</b>	5' GT ↓ AC 3' 3' CA ↑ TG 5'	Takara
<b>THRa</b>		
<b>RspRS II (Mse I)</b>	5' T ↓ TAA 3' 3' AAT ↑ T 5'	Takara
<b>TSHR</b>		
<b>Bau I (BssS I)</b>	5' C ↓ ACGAG 3' 3' GTGCT ↑ C 5'	ThermoScientific

### 3.6. ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.6.1 Εμπλουτισμός προϋπάρχουσας βάσης δεδομένων

Η παρούσα ερευνητική πρόταση βασίζεται στην ύπαρξη μακροχρόνιων δεδομένων (ορμονολογικών, κλινικών και απεικονιστικών) των ασθενών από το πρόγραμμα παρακολούθησης ΣΥ από το ΙΥΠ σε συνεργασία με την Α' Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Χρησιμοποιήθηκε προϋπάρχουσα βάση δεδομένων (εργαστηριακών, κλινικών και απεικονιστικών δεδομένων μακροχρόνιας παρακολούθησης ασθενών). Στη βάση υπήρχαν

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

καταγεγραμμένα μετά τη διεξοδική μελέτη των ιατρικών φακέλων των ασθενών με ΣΥ τα εξής στοιχεία: ονοματεπώνυμο, φύλο, ημερομηνία γέννησης, τόπος καταγωγής γονέων, φυσική ή τεχνητή γονιμοποίηση, εβδομάδες κύησης, αριθμός εμβρύων κύησης, βάρος γέννησης, τηλέφωνο επικοινωνίας, ηλικία που πραγματοποιήθηκε ο τελευταίος υπέρηχος, αξιολόγηση υπέρηχου, ημερομηνία ανάλυσης της κάρτας Gurthie, αποτελέσματα ανάλυσης της κάρτας Guthrie σε mU/L, ηλικία έναρξης αγωγής υποκατάστασης σε μέρες, TSH και FT4 κατά την έναρξη της θεραπείας, δόση κατά την έναρξη της θεραπείας, δόση πρώτου έτους, δόση τρίτου έτους, προσπάθεια διακοπής της θεραπείας ή προσπάθεια μείωσης της δόσης, ηλικία προσπάθειας διακοπής ή μείωσης αγωγής με λεβοθυροξίνη (LT4), αριθμός πασχόντων αδελφών, άλλες ασθένειες από τις οποίες πάσχει ο ασθενής κλπ. Για όσα παιδιά ο ιατρικός φάκελος δεν περιείχε μακροχρόνια στοιχεία παρακολούθησης (ή δεν είχαν ποτέ εξεταστεί από το ΙΥΠ) τα στοιχεία που έλλειπαν συμπληρώθηκαν με τηλεφωνικές συνεντεύξεις.

Συνολικά μελετήθηκαν **2605 φάκελοι ασθενών** για τους οποίους υπήρχαν μακροχρόνια στοιχεία. Στην καταγραφή προστίθενται και τα νέα περιστατικά τα οποία διαγιγνώσκονται (~200 νέα περιστατικά με ΣΥ/έτος).

Αναθεωρήθηκαν οι ιατρικοί φάκελοι των ασθενών από τους οποίους είχε απομονωθεί γενετικό υλικό (~**1300**) και επικαιροποιήθηκαν με στοιχεία που έλλειπαν ενώ η βάση εμπλουτίστηκε με επιπλέον πληροφορίες όπως ο Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI) κατά το 3<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> έτος.

### 3.6.2 Δείγματα

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από προϋπάρχουσα **βάση γενετικού υλικού** (Τράπεζα DNA) παιδιών τα οποία έχουν ενταχθεί στο πρόγραμμα ΣΥ του ΙΥΠ. Μέχρι στιγμής έχει απομονωθεί DNA από ~**1300 ασθενείς**. Στην Τράπεζα DNA προστίθενται συνεχώς δείγματα από τα νέα περιστατικά τα οποία διαγιγνώσκονται (~200 νέα περιστατικά με ΣΥ/έτος).

Η συλλογή των δειγμάτων DNA πραγματοποιήθηκε χωρίς επιπλέον αιμοληψία από περιφερικό αίμα (περίπου 2,5 mL) που λήφθηκε κατά την τακτική παρακολούθηση των θυρεοειδικών ορμονών του ασθενούς. Για την ένταξη στο πρόγραμμα απαιτείται η έγγραφη συγκατάθεση των γονέων ή των ίδιων των ασθενών μετά την ενηλικίωσή τους (**Παράρτημα Β**). Η μελέτη και η έγγραφη συγκατάθεση έχει εγκριθεί από την επιτροπή Βιοηθικής του ΙΥΠ. Η αιμοληψία λαμβάνει χώρα στο ΙΥΠ και προηγείται επεξήγηση της ερευνητικής προσπάθειας και η απαραίτητη έγγραφη συγκατάθεση.

Σε γενετικές μελέτες επιζητείται ο σχηματισμός ομάδων οι οποίες να περιλαμβάνουν το μέγιστο δυνατό αριθμό των κατάλληλων δειγμάτων. Η δημιουργία ομάδων ασθενών οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες ανεύρεσης γενετικού αιτίου για τον ΣΥ με βάση κοινά χαρακτηριστικά (πχ δυσγενεσία, οικογενείς περιπτώσεις, καταγωγή από περιοχή με πολύ αυξημένη συχνότητα περιστατικών με ΣΥ κλπ) επιτεύχθηκε με τη χρήση της βάσης δεδομένων.

Τα κριτήρια εισαγωγής ήταν τα ακόλουθα

1. **Ηλικία μεγαλύτερη των 3 ετών.** Καθώς θέλαμε να μελετήσουμε την επίδραση των πολυμορφισμών στη δόση υποκατάστασης και σαν αυξημένη δόση θεωρείται δόση LT4 > 3μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα στα 3 έτη.
2. **Η σύλληψη να έχει γίνει φυσιολογικά.** Αποκλειστήκαν παιδιά IVF.
3. **Να είναι τελειόμηνα.** Αποκλείστηκαν παιδιά που γεννήθηκαν <37 εβδομάδων.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

4. **Να είναι μονόδυμες κυήσεις.**

5. Να μην είναι ολιγοβαρή.

6. Η έναρξη αγωγής να έχει γίνει μέχρι την ηλικία των 6 μηνών. Μετά από αυτή την ηλικία δεν θεωρείται ΣΥ.

7. Να μην πάσχει από κάποιο σύνδρομο.

8. Επιλέχθηκαν ασθενείς με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχει εύρος τιμών στη Δόση των 3 ετών.

Με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων και των κριτηρίων εισαγωγής δημιουργήθηκαν τέσσερις Ομάδες μελέτης δειγμάτων προς ανάλυση.

1. **Δυσγενεσία:** ασθενείς που έχουν **απλασία, δυσπλασία, ημι-αγενεσία ή εκτοπία** του θυρεοειδή αδένος σύμφωνα με απεικονιστικά δεδομένα ( υπερηχογράφημα ή σπινθηρογράφημα).
2. **Παροδικός ΣΥ:** ασθενείς που επιτυχώς διέκοψαν την θεραπεία υποκατάστασης. Πρόκειται για περιπτώσεις ήπιου ΣΥ.
3. **Δυσορμονογένεση:** ασθενείς που ο ΣΥ οφείλεται σε διαταραχές κατά τη διαδικασία παραγωγής των θυρεοειδικών ορμονών. Οι ασθενείς αυτοί χωρίστηκαν σε δύο επιμέρους ομάδες μελέτης
  1. **Ασθενείς με χαμηλή δόση (<3 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα)**
  2. **Ασθενείς με υψηλή δόση (>3 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα)**

### 3.6.3 Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα

Για την ενίσχυση, μέσω αντίδρασης PCR, τμημάτων των γονιδίων DIO2, THRa και TSHR χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από ολικό αίμα. Τα δείγματα ολικού αίματος διατέθηκαν από το τμήμα “Εθνικού Προγράμματος Προληπτικού Ελέγχου Νεογνών” του “Ινστιτούτου Υγείας του Παιδιού”. Τα πρωτόκολλα απομόνωσης που ακολουθήθηκαν περιγράφονται παρακάτω:

Δείγματα ολικού αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια των 2,5 mL που περιείχαν EDTA. Η απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους, με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου QiaAmp DNA blood mini kit (Qiagen) καθώς και με μια τροποποιημένη μέθοδο απομόνωση «χλωριούχου νατρίου».

Στην δεύτερη περίπτωση, αναμειγνύονται ~ 2,5 ml ολικού αίματος και ίσος όγκος διαλύματος δεξτράνης. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να γίνει ομογενές και αφήνεται σε ηρεμία. Μετά το πέρας της μίας ώρας, συλλέγεται η υπερκείμενη κιτρινωπή στοιβάδα, μεταφέρετε σε σωληνάριο τύπου erpendorf και φυγοκεντρείται (13.000 rpm ή 15.142 x g) για 15 min. Το στερεό υπόλειμμα ανασυστήνεται σε 400 μL διαλύματος λύσης κυττάρων και αφού προσθέτονται 25 μL διαλύματος SDS 10%, το δείγμα επωάζεται στους 55°C για 10 min, υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια προσθέτονται 150 μL NaCl 6 M και αναδεύεται έντονα για 15 min. Με φυγοκέντριση (13.000 rpm) για 5 min παραλαμβάνεται το υπερκείμενο απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Με την προσθήκη 1 mL παγωμένου διαλύματος απόλυτης αιθανόλης κατακρημνίζεται το DNA. Ακολουθεί φυγοκέντριση (13.000 rpm) για 2 min, έκπλυση του DNA με 1 mL παγωμένης αιθανόλης 70% και φυγοκέντριση (13.000 rpm) για 2 min. Η αιθανόλη απομακρύνεται και το ίζημα ξηραίνεται στον αέρα. Η

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

επαναδιαλυτοποίηση του DNA πραγματοποιείται σε 150 µL H<sub>2</sub>O με επώαση για 15 min στους 65°C.

Σε βρέφη όπου δεν είναι δυνατή η λήψη μεγάλης ποσότητας περιφερικού αίματος η απομόνωση πραγματοποιείται με το εμπορικά διαθέσιμο kit της Qiagen (QIAamp DNA Blood Mini Kit). Παραλαμβάνονται τελικά 150 µL DNA συγκέντρωσης περίπου 40 ng/µL.

Το γενωμικό DNA χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση PCR για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων DIO2, THRa και TSHR.

### 3.6.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase chain reaction – PCR)

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR για την ενίσχυση τμημάτων διαφόρων γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

#### *i. Ενίσχυση περιοχής του γονιδίου DIO2*

Η ενίσχυση περιοχής του γονιδίου DIO2 που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό **c. 429T>C**

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit της Karabiosystems Kara Taq ReadyMix PCR Kit. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 µL που περιείχε 25 µL του master mix (τελικές συγκεντρώσεις, ενζύμου Kara Taq DNA Polymerase 1 U/reaction, 1x ρυθμιστικού διαλύματος PCR Kara Taq Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> και 0,2 mM dNTP's), 0,25 µM καθένα από τους εκκινήτες DIO2T92A FW και DIO2T92A RV και 2 µL γενωμικού DNA (50-100 ng). Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR ήταν το εξής: 95 °C/ 5 min (στάδιο 1), 95 °C/ 30 sec (στάδιο 2), 53 °C/ 30 sec (στάδιο 3), 72°C/ 1 min (στάδιο 4). Τα στάδια 2 έως 4 επαναλήφθηκαν 35 φορές και η αντίδραση ολοκληρώθηκε με τελική επέκταση στους 72°C για 1 min.

#### *ii. Ενίσχυση περιοχής του γονιδίου THRa*

Η ενίσχυση περιοχής του γονιδίου THRa που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό **c.53+1059T>C**.

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit της Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 µL που περιείχε GoTaq DNA πολυμεράση 1,25 U/reaction, 1x ρυθμιστικού διαλύματος PCR Green GoTaq Flexi Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> και 0,2 mM dNTP's, 0,25 µM καθένα από τους εκκινήτες THRaintron FD και THRaintron RV και 1,5 µL γενωμικού DNA (50-100 ng). Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR ήταν το εξής: 95 °C/ 2 min (στάδιο 1), 95 °C/ 30 sec (στάδιο 2), 61 °C/ 30 sec (στάδιο 3), 72°C/ 1 min (στάδιο 4). Τα στάδια 2 έως 4 επαναλήφθηκαν 30 φορές και η αντίδραση ολοκληρώθηκε με τελική επέκταση στους 72°C για 5 min.

#### *iii. Ενίσχυση περιοχής του γονιδίου TSHR*

Η ενίσχυση περιοχής του γονιδίου TSHR που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό **c.2337G>C**.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 µL που περιείχε GoTaq DNA πολυμεράση 1,25 U/reaction, 1x ρυθμιστικού διαλύματος PCR Green GoTaq Flexi Buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub> και 0,2 mM dNTP's, 0,25 µM καθένα από τους εκκινήτες THRaintron FD και THRaintron RV και 1,5 µL γενωμικού DNA (50-100 ng). Το πρόγραμμα της αντίδρασης PCR

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

ήταν το εξής: 95 °C/ 2 min (στάδιο 1), 95 °C/ 30 sec (στάδιο 2), 53 °C/ 30 sec (στάδιο 3), 72°C/ 1 min (στάδιο 4). Τα στάδια 2 έως 4 επαναλήφθηκαν 35 φορές και η αντίδραση ολοκληρώθηκε με τελική επέκταση στους 72°C για 5 min.

### 3.6.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Οι ηλεκτροφορήσεις DNA των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκαν σε πηκτές αγαρόζης 1,5% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1×, που περιείχε 0,5 µg/mL EtBr, ενώ των προϊόντων που προέκυψαν μετά την πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε πηκτές αγαρόζης 2% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1×, που περιείχε 0,5 µg/mL EtBr. Τα δείγματα αναμείχθηκαν με 10x Loading Buffer σε αναλογία 1:1 και τοποθετήθηκαν στα πηγάδια της πηκτής. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή τάση 140 V για 45 min. Η παρατήρηση των ζωνών του DNA έγινε σε τράπεζα υπεριώδους φωτός (312 nm). Τα πηκτώματα φωτογραφηθήκαν με ψηφιακή κάμερα. Με τη βοήθεια του δείκτη μοριακών βαρών DNA προσδιορίστηκε το μέγεθος των προϊόντων.

### 3.6.6 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Η ανίχνευση των υπό μελέτη πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών.

Τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

#### *i. Ανίχνευση του πολυμορφισμού c. 429T>C του γονιδίου DIO2*

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση Afa I. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 µL που περιείχε Afa I 1 U/reaction, 1x T Buffer, 0,01% BSA, 10 µL PCR προϊόντος. Το πρόγραμμα της αντίδρασης πέψης ήταν το εξής: 37 °C για 1 hr και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση του ενζύμου με 3 µL 10x Loading Buffer.

#### *ii. Ανίχνευση του πολυμορφισμού c. 53+1059T>C του γονιδίου THRa*

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση RspRS II. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 µL που περιείχε RspRS II 1 U/reaction, 1x T Buffer, 0,01% BSA, 10 µL PCR προϊόντος. Το πρόγραμμα της αντίδρασης πέψης ήταν το εξής: 60 °C για 1 hr και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση του ενζύμου με 3 µL 10x Loading Buffer.

#### *iii. Ανίχνευση του πολυμορφισμού c. 2337 G>C του γονιδίου TSHR*

Το προϊόν της PCR υποβλήθηκε σε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση Bau I. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 µL που περιείχε Bau I 0,5 U/reaction, 1x Buffer Tango, 10 µL PCR προϊόντος. Το πρόγραμμα της αντίδρασης πέψης ήταν το εξής: 37 °C για 16 hrs και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση στους 65 °C για 20 min.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για την ανάλυση των εξεταζόμενων πολυμορφισμών rs1991517 (Asp727Glu), rs225014 (Thr 92Ala) και rs939348 (intronic variant) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ενώ είχε προηγηθεί η ενίσχυση τμημάτων που περιείχαν τις θέσεις των προαναφερόμενων πολυμορφισμών με PCR.

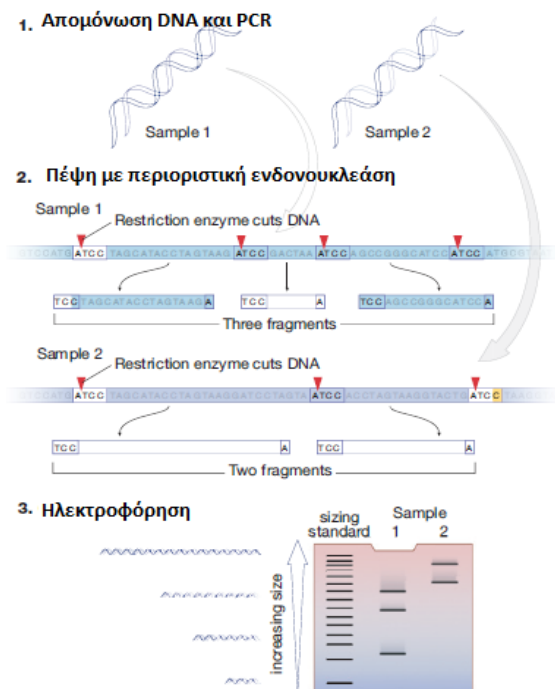
Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης που έχουν τη δυνατότητα να διασπούν το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, αφού αναγνωρίσουν μικρού μεγέθους χαρακτηριστικές αλληλουχίες. Για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως «μοριακά ψαλίδια». Η φυσιολογική λειτουργία τους είναι η προστασία των βακτηρίων από παθογόνους οργανισμούς, κυρίως βακτηριοφάγους, αφού διασπούν τις αλληλουχίες DNA του «εισβολέα».

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη γονοτύπηση συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων σε μια αλληλουχία DNA με την προϋπόθεση το πολυμορφικό νουκλεοτίδιο να οδηγεί είτε στη δημιουργία μιας νέας είτε στην κατάργηση μιας προϋπάρχουσας θέσης αναγνώρισης κάποιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Η μέθοδος απαιτεί την ενίσχυση του υπό μελέτη τμήματος του DNA με PCR και στη συνέχεια την επώαση του προϊόντος της αντίδρασης σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας με την περιοριστική ενδονουκλεάση. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης και αναγνώριση των χαρακτηριστικών θραυσμάτων του.

Συνοπτικά η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής βήματα (**Εικόνα 33**):

1. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα
2. Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου που περιλαμβάνει τον υπο εξέταση πολυμορφισμό με PCR
3. Πέψη του προϊόντος PCR με περιοριστική ενδονουκλεάση
4. Ηλεκτροφόρηση για αναγνώριση και των θραυσμάτων της πέψης

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 33. Αρχή της μεθόδου RFLP-PCR (<https://www.nlm.nih.gov/visibleproofs/education/dna/rflp.pdf>)

## 4.2 IN SILICO ANALYSE

Η αντίδραση PCR αποτελεί συνήθως το πρώτο βήμα των περισσότερων μεθόδων ανίχνευσης πολυμορφισμών καθώς ενισχύονται συγκεκριμένα τμήματα των υπό μελέτη γονιδίων.

Συγκεκριμένα για την ενίσχυση:

- Τμήματος 265 bp στο εξόνιο 10 του γονιδίου TSHR που περιλαμβάνει το πολυμορφισμό rs1991517, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές TSHRD727EFW και TSHRD727ERV (Bayram *et al*, 2013).
- Τμήματος 255 bp στο εξόνιο 2 του γονιδίου DIO2 που περιλαμβάνει το πολυμορφισμό rs225014, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές DIO2T92A FW και DIO2T92A RV (Mentuccia *et al*, 2002).
- Τμήματος 190 bp στο ιντρόνιο 2-3 του γονιδίου THRa που περιλαμβάνει το πολυμορφισμό rs939348, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές THRaintron FD και THRaintron RV (Al-Azzam *et al*, 2014).

οι οποίοι ελέγχθηκαν *in silico* με τη βοήθεια του προγράμματος: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Χρησιμοποιώντας την εφαρμογή του <http://insilico.ehu.es/restriction/> αναζητήθηκε περιοριστικό ένζυμο για τον διαχωρισμό των δύο αλληλόμορφων κάθε πολυμορφισμού ενώ στη συνέχεια ελέγχθηκαν τα θραύσματα που δημιουργούνται σε κάθε περίπτωση. Συγκεκριμένα:

- για τον rs1991517 επιλέχθηκε το περιοριστικό ένζυμο BvuI.
- για τον rs225014 επιλέχθηκε το περιοριστικό ένζυμο AfaI.
- για τον rs939348 επιλέχθηκε το περιοριστικό ένζυμο RspRS II (Mse I).

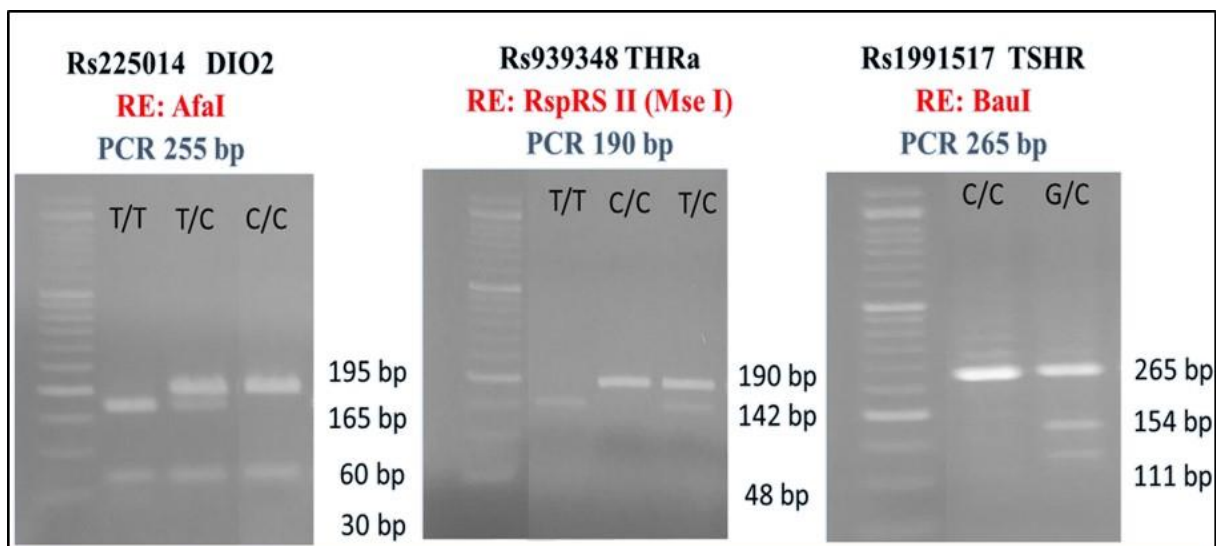
Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Τα θραύσματα που δημιουργούνται σε κάθε περίπτωση παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8** ενώ στην **Εικόνα 34** φαίνονται οι γονότυποι στον κάθε πολυμορφισμό μετά την πέψη με την αντίστοιχη περιοριστική ενδονουκλεάση .

Τα αποτελέσματα της in Silico ανάλυσης παρατίθενται στο **Παράρτημα Α**.

*Πίνακας 8.* Παρουσίαση των θραυσμάτων που δημιουργούνται μετά από την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα.

<b>rs1991517</b>	<b>PCR product</b>	265 bp
	c.[=];[=]	154 bp + 111 bp
	c.[2337 G>C];[=]	154 bp + 111 bp + 265 bp
	c.[2337 G>C];[2337 G>C ]	265 bp
<b>rs225014</b>	<b>PCR product</b>	255 bp
	c.[=];[=]	165 bp + 30 bp + 60 bp
	c.[429T>C];[=]	165 bp + 30 bp + 60 bp +195 bp
	c.[429T>C];[ 429T>C]	195 bp + 60 bp
<b>rs939348</b>	<b>PCR product</b>	190 bp
	c.[=];[=]	48 bp + 142 bp
	c.[544+1059 T>C];[=]	48 bp + 142 bp +190 bp
	c.[544+1059 T>C];[544+1059 T>C]	190 bp



*Εικόνα 34.* Απεικόνιση των γονοτύπων για τους πολυμορφισμούς rs225014, rs939348 και rs1991517 μετά την πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες AfaI, RspRSII και Baul αντίστοιχα.



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

#### 4.3 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ PCR

Η αντίδραση PCR για τον κάθε πολυμορφισμό βελτιστοποιήθηκε προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη οπτική διάκριση μεταξύ των τριών γονοτύπων (φυσιολογικού, ετεροζυγώτη και ομοζυγώτη). Για την καλύτερη διάκριση των διαφορετικών γονοτύπων που θα προκύψουν μετά από πέψη με περιοριστικό ένζυμο, είναι σημαντικό να επιλεχθούν συνθήκες που θα ευνοούν το σχηματισμό τέτοιου PCR προϊόντος που ακόμα και μετά την πέψη, όπου και θα προκύψουν μικρότερα τμήματα, η γονοτύπιση να είναι εφικτή.

Μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης PCR περιλαμβάνονται η φύση της θερμοσταθερής πολυμεράσης, το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή, η θερμοκρασία υβριδοποίησης και η ποσότητα του μαγνησίου. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν μελέτες επίδρασης των παραπάνω παραγόντων με σκοπό την επίτευξη της μέγιστης δυνατής απόδοσης των προϊόντων καθώς και την ελάττωση του χρόνου αλλά και του κόστους της αντίδρασης για κάθε πολυμορφισμό ξεχωριστά.

##### 4.3.1 Επιλογή πολυμεράσης

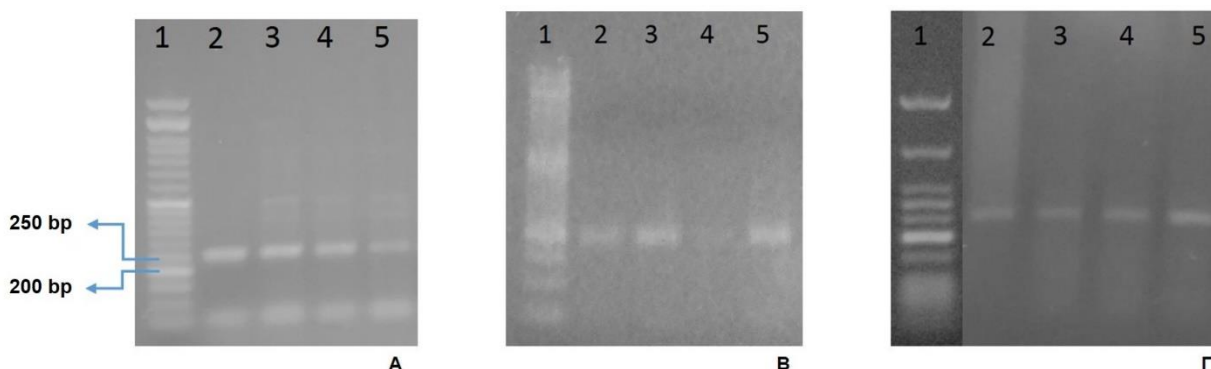
Εξετάστηκαν οι θερμοσταθερές DNA πολυμεράσες η Kara Taq ReadyMix PCR Kit (Karabiosystems) και η GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), με σκοπό την επιλογή της καταλληλότερης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δείγμα στο οποίο είχε πραγματοποιηθεί απομόνωση DNA με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου QiaAmp DNA blood mini kit (Qiagen). Σε καμία από τις δύο πολυμεράσες που δοκιμάστηκαν δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός μη ειδικού προϊόντος. Μεταξύ αυτών για τους rs1991517 και rs225014 επιλέχθηκε η Kara Taq ReadyMix πολυμεράση.

Στην περίπτωση του rs939348, με την Kara Taq ReadyMix PCR Kit δεν παρατηρήθηκε PCR προϊόν οπότε και επιλέχθηκε η GoTaq Flexi DNA Polymerase.

##### 4.3.2 Επίδραση ιόντων μαγνησίου

Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  δρουν ως μεταλλικός συμπαραγόντας της πολυμεράσης, σταθεροποιώντας το σύμπλεγμα αντιγραφής της με το εκμαγείο στόχο. Έχουν μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στην απόδοση της αντίδρασης. Επιπρόσθετα, τα  $Mg^{2+}$  επηρεάζουν ακόμη και τη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ολιγονουκλεοτιδίου με το DNA σταθεροποιώντας τις αλληλεπιδράσεις τους. Η ενδεικνυόμενη συγκέντρωση  $Mg^{2+}$  τόσο για τη καλή λειτουργία της Kara Taq ReadyMix PCR Kit όσο και της GoTaq Flexi DNA Polymerase πολυμεράσης είναι 1,5 mM (όσο περιέχεται στο ρυθμιστικό της διάλυμα). Για τη μελέτη βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης  $Mg^{2+}$  δείγμα υποβλήθηκε σε αντίδραση PCR παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης ιόντων μαγνησίου στην περιοχή 1,5-3 mM. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της μελέτης για τον rs225014 και τον rs939348 (**Εικόνα 35 A και B** αντιστοιχα), με αύξηση της συγκέντρωσης  $Mg^{2+}$  η απόδοση της PCR μειώνεται, ενώ για τον rs1991517 (**Εικόνα 35 Γ**), δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες μεταβολές στην απόδοση της PCR. Ως βέλτιστη για τους rs1991517 και rs225014 επιλέχθηκε η συγκέντρωση  $Mg^{2+}$  1,5 mM.

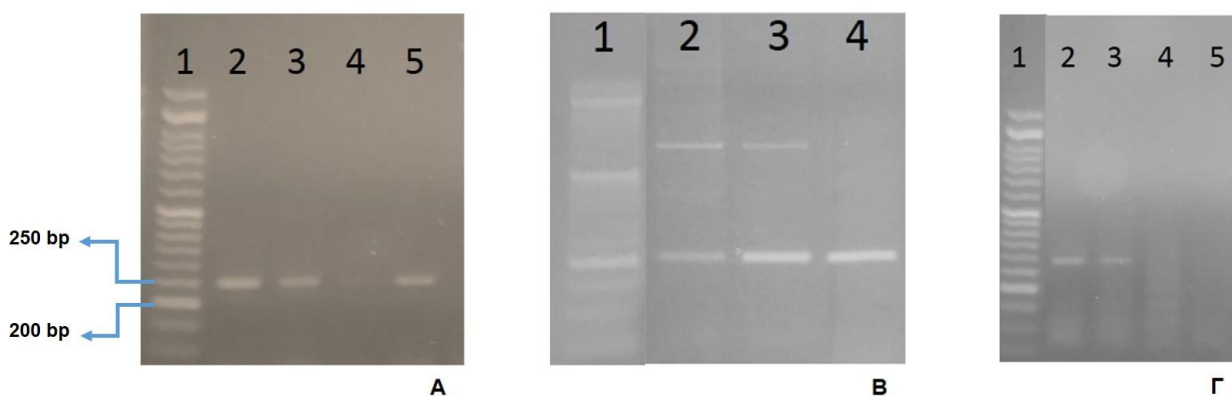
Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 35. Επίδραση συγκέντρωσης ιόντων μαγνησίου στην αντίδραση (A) για τον πολυμορφισμό **rs225014**. Διάδρομοι: (1) Δείκτης μοριακών βαρών FastGene 50bp DNA Ladder, (2,3,4,5) δείγμα με  $[Mg^{2+}] = 1,5$  mM, 2 mM, 2,5 mM και 3 mM αντίστοιχα, (B) για τον πολυμορφισμό **rs939348**. Διάδρομοι: (1) Δείκτης μοριακών βαρών FastGene 50bp DNA Ladder, (2,3,4,5) δείγμα με  $[Mg^{2+}] = 1,5$  mM, 2 mM, 2,5 mM και 3 mM αντίστοιχα και (Γ) για τον πολυμορφισμό **rs1991517**. Διάδρομοι: (1) Δείκτης μοριακών βαρών FastGene 50bp DNA Ladder, (2,3,4,5) δείγμα με  $[Mg^{2+}] = 1,5$  mM, 2 mM, 2,5 mM και 3 mM αντίστοιχα

#### 4.3.3 Επίδραση θερμοκρασίας υβριδοποίησης

Με τον όρο θερμοκρασία υβριδοποίησης περιγράφεται η θερμοκρασία στην οποία το 50% του ολιγονουκλεοτιδίου θα έχει υβριδοποιηθεί στη συμπληρωματική αλυσίδα. Αποτελεί μέτρο της σταθερότητας του διμερούς. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης επηρεάζεται από τη συγκέντρωση αλάτων, τη συγκέντρωση του DNA, την παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων και κυρίως από την αλληλουχία και το μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου. Η μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας υβριδοποίησης στην αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε στην περιοχή θερμοκρασιών 53 έως 62 °C. Για τους rs225014 και rs1991517 (Εικόνα 36 A και Γ αντίστοιχα) παρατηρείται ότι η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και επομένως ως βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης επιλέχθηκαν οι 53 °C. Αντίθετα για τον rs939348 (Εικόνα 36 B) η απόδοση αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας και ως βέλτιστη επιλέχθηκαν οι 61 °C.

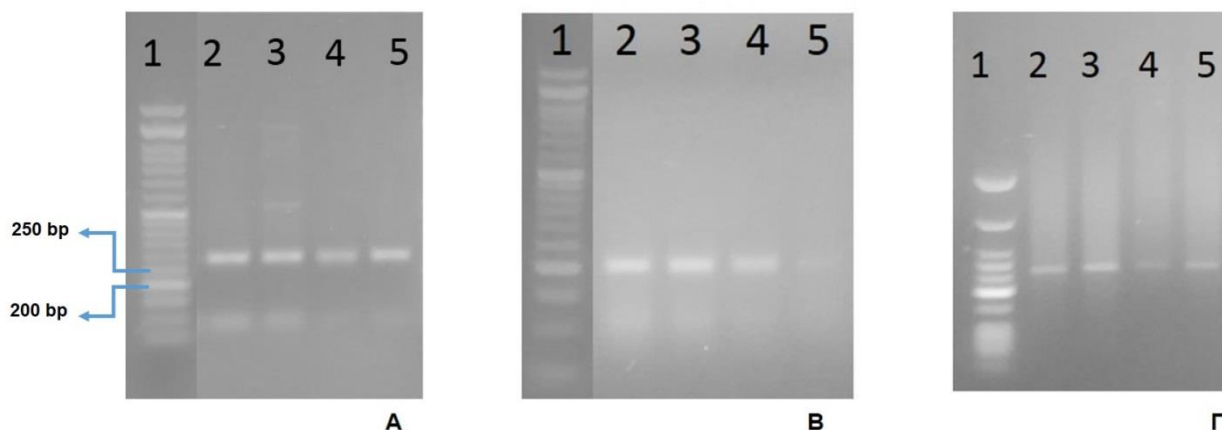


Εικόνα 36. Επίδραση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης στην αντίδραση (A) για πολυμορφισμό τον **rs225014**. Διάδρομοι: (1) Δείκτης μοριακών βαρών, (2,3,4,5) δείγμα στους 53 °C, 57 °C, 60 °C και 62 °C αντίστοιχα, (B) για πολυμορφισμό **rs939348**. Διάδρομοι: (1) Δείκτης μοριακών βαρών, (2,3,4) δείγμα στους 53 °C, 58 °C και 61 °C αντίστοιχα και (Γ) για πολυμορφισμό **rs1991517**. Διάδρομοι: (1) Δείκτης μοριακών βαρών FastGene 50bp DNA Ladder, (2,3,4,5) δείγμα στους 53 °C, 57 °C, 60 °C και 62 °C αντίστοιχα

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

#### 4.3.4 Επίδραση συγκέντρωσης των εκκινητών στην αντίδραση

Με σκοπό την επίτευξη μεγαλύτερης ευαισθησίας της απόδοσης της αντίδρασης καθώς και την αποφυγή σχηματισμού παραπροϊόντων λόγω της περίσσειας των εκκινητών, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των εκκινητών για κάθε αντίδραση PCR. Για τη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκκινητών στην περιοχή 0,15 - 0,5  $\mu\text{M}$ . Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στο **Εικόνα 37**. Δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες μεταβολές ως προς την απόδοση της αντίδρασης στην περιοχή 0,25 - 0,5  $\mu\text{M}$  οπότε και επιλέχθηκε ως βέλτιστη συγκέντρωση των εκκινητών αυτή των 0,25  $\mu\text{M}$ .



**Εικόνα 37. Επίδραση συγκέντρωσης των εκκινητών στην αντίδραση (Α) για τον πολυμορφισμό rs225014. Διάδρομοι: (1) Δείκτης μοριακών βαρών FastGene 50bp DNA Ladder, (2,3,4,5) δείγμα με συγκέντρωση εκκινητών 0,5  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$  και 0,15  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα (Β) για τον πολυμορφισμό rs939348. Διάδρομοι: (1) Δείκτης μοριακών βαρών FastGene 50bp DNA Ladder, (2,3,4,5) δείγμα με συγκέντρωση εκκινητών 0,5  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$  και 0,15  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα (Γ) για τον πολυμορφισμό rs1991517. Διάδρομοι: (1) Δείκτης μοριακών βαρών FastGene 50bp DNA Ladder, (2,3,4,5) δείγμα με συγκέντρωση εκκινητών 0,5  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$  και 0,15  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα**

#### 4.4 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΨΗΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ

Η πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση απαιτεί απλώς την επώαση του DNA με το ένζυμο σε κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης που εξαρτώνται από τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Οι ποσότητες του DNA, στην δική μας περίπτωση του PCR προϊόντος, η συγκέντρωση του ενζύμου, η θερμοκρασία και ο χρόνος της αντίδρασης αποτελούν παράγοντες προς μελέτη με σκοπό να επιτευχθεί η μέγιστη διάκριση μεταξύ των γονοτύπων.

Η θερμοκρασία επώασης δίνεται από τον κατασκευαστή οπότε δεν πραγματοποιήθηκαν μελέτες.

##### 4.4.1 Ποσότητα ενζύμου

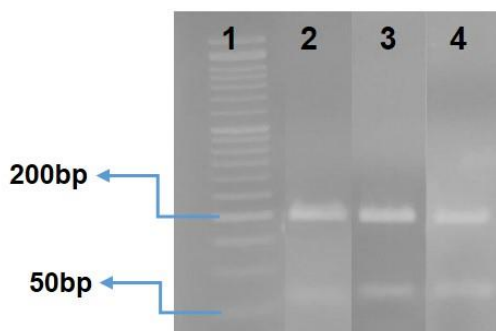
Μια μονάδα (U, unit) περιοριστικής ενδονουκλεάσης είναι η ποσότητα εκείνη του ενζύμου που οδηγεί σε πλήρη πέψη 1  $\mu\text{g}$  καθαρού DNA σε συγκεκριμένο χρόνο που καθορίζεται από τον κατασκευαστή κάτω από τις συνιστώμενες συνθήκες επώασης. Για μείωση του κόστους της μεθόδου μελετήθηκε η ελαχίστη δυνατή ποσότητα που απαιτείται για την πλήρη πέψη ικανής ποσότητας PCR προϊόντος για την αξιόπιστη γονοτύπωση των δειγμάτων.

Δείγμα ομόζυγου στον κάθε πολυμορφισμό υποβλήθηκε σε πέψη με 10, 5, 1 U ενζύμου. Από τα αποτελέσματα της μελέτης (**Εικόνα 38**) προέκυψε ότι δεν υπήρχε διαφορά στη

‘Α. Γκίκα

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

γονοτύπιση. Επομένως επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί 1 U για τους rs225014 και rs939348 και 0,5 U για τον rs1991517 σε κάθε αντίδραση πέψης. Στις περιπτώσεις ετεροζυγωτίας η γονοτύπιση επαναλήφθηκε με μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου.



Εικόνα 38. Επίδραση ποσότητας περιοριστικού ενζύμου στην πλήρη πέψη ικανής ποσότητας PCR προϊόντος. Ενδεικτικά απεικονίζονται τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης για τον rs225014. Διάδρομοι: (1) Δείκτης μοριακών βαρών FastGene 50bp DNA Ladder, (2,3,4) δείγμα μετά από πέψη με 10, 5 και 1 U περιοριστικού ενζύμου αντίστοιχα.

#### 4.4.2 Χρόνος αντίδρασης πέψης

Ο βέλτιστος χρόνος πέψης διαφέρει από ένζυμο σε ένζυμο, για αυτόν τον λόγο κάθε κατασκευαστής προτείνει τη βέλτιστη θερμοκρασία και το βέλτιστο χρόνο για το εκάστοτε ένζυμο. Πραγματοποιήθηκε σε δείγμα ετεροζυγώτη μελέτη επίδρασης του χρόνου αντίδρασης από 1 έως 16 ώρες. Τα αποτελέσματα δεν διέφεραν επομένως επιλέχθηκε η 1 h για τους rs225014 και rs939348 και η 16 h για τον rs1991517. Στην περίπτωση του rs1991517 επιλέχθηκε η επώαση διάρκειας 16 h, γιατί με αυτό τον τρόπο μειώνονταν οι απαιτήσεις σε ένζυμο.

### 4.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

#### 4.5.1 Περιγραφική στατιστική των δεδομένων

Για κάθε κατηγορία συνεχών μεταβλητών (ηλικία, εβδομάδες κύησης, βάρος γέννησης, TSH κάρτας Guthrie, TSH και FT4 πριν την έναρξη θεραπείας, δόση στον 1 και στον 3 χρόνο ζωής και BMI στον 3 και στον 5 χρόνο ζωής) υπολογίστηκαν μέτρα θέσης και διασποράς. Συγκεκριμένα υπολογίστηκαν:

**Μέτρα θέσης** (αριθμητικά μεγέθη που δείχνουν τη θέση του «κέντρου» των παρατηρήσεων)

- **Μέση τιμή (mean) ( $\bar{x}$ ):** ορίζεται ως το άθροισμα των παρατηρήσεων δια του πλήθους των παρατηρήσεων. Υπολογίζεται με τον τύπο:  $\sum_{i=1}^n \frac{x_i v_i}{v_i}$
- **Διάμεσος (median) ( $\delta$ ):** ενός δείγματος  $n$  παρατηρήσεων οι οποίες έχουν διαταχθεί σε αύξουσα σειρά ορίζεται ως η μεσαία παρατήρηση, όταν το  $n$  είναι περιττός αριθμός, ή ο μέσος όρος (ημιάθροισμα) των δύο μεσαίων παρατηρήσεων όταν το  $n$  είναι άρτιος αριθμός.

**Μέτρα διασποράς** (αριθμητικά μεγέθη που δείχνουν πως κατανέμονται οι τιμές του δείγματος γύρω από τις «κεντρικές τιμές»)

- **Τυπικό σφάλμα (Standard Error=SE):** Μέτρο της ενδεχόμενης απόστασης της μέσης τιμής του δείγματος από την αντίστοιχη πραγματική.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

#### 4.5.2 Έλεγχοι υποθέσεων

##### 4.5.2.1 Εισαγωγή στον έλεγχο υποθέσεων

Είναι γνωστό ότι η επιστημονική έρευνα βασίζεται στη σχεδίαση πειραμάτων βάσει κάποιας θεωρίας (στατιστική υπόθεση, hypothesis) η οποία μπορεί να επαληθευτεί ή να απορριφθεί μέσω της συλλογής και ανάλυσης πληροφοριών και μετρήσεων. Ο έλεγχος υποθέσεων (hypothesis testing) αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της επαγωγικής στατιστικής και ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τον ερευνητή, καθώς του επιτρέπει να ελέγξει την εγκυρότητα της θεωρίας του. Η επιβεβαίωση ή απόρριψη των αρχικών υποθέσεων μπορεί να οδηγήσει τελικά στην εξαγωγή χρήσιμων και γενικεύσιμων συμπερασμάτων.

Ουσιαστικά μία υπόθεση αποτελεί την πρόβλεψη του ερευνητή για την επίδραση της αλλαγής της ανεξάρτητης μεταβλητής στην εξαρτημένη με κάποιο βαθμό βεβαιότητας.

Η λογική του ελέγχου υποθέσεων μπορεί να συνοψιστεί στα εξής τέσσερα βήματα:

##### 1<sup>ο</sup> βήμα: Διατύπωση υποθέσεων

Διατυπώνουμε τη μηδενική υπόθεση ( $H_0$ ) η οποία προβλέπει ότι η αλλαγή της ανεξάρτητης μεταβλητής (μεταβλητή που ελέγχω) δεν έχει επίδραση στην εξαρτημένη μεταβλητή (μεταβλητή που παρατηρώ). Διατυπώνεται ακόμη μία υπόθεση, η εναλλακτική υπόθεση  $H_1$ , ακριβώς αντίθετη από τη μηδενική υπόθεση που δηλώνει ότι η αλλαγή της ανεξάρτητης μεταβλητής έχει επίδραση στην εξαρτημένη μεταβλητή.

##### 2<sup>ο</sup> βήμα: Διαμόρφωση των κριτηρίων για τη λήψη μιας απόφασης

Για να αξιολογηθεί η αξιοπιστία της μηδενικής υπόθεσης συλλέγονται δεδομένα από δείγματα. Με τη βοήθεια στατιστικών δεικτών εξάγονται συμπεράσματα για την τιμή μιας παραμέτρου. Για να εξαλειφθούν τα σφάλματα δειγματοληψίας θεσπίζονται κριτήρια με τα οποία καθορίζεται ο βαθμός βεβαιότητας ώστε να δικαιολογείται η απόφαση να απορριφθεί η μηδενική υπόθεση. Η πιθανότητα αυτή ονομάζεται επίπεδο σημαντικότητας ή επίπεδο  $\alpha$  (level of significance or alpha level), και καθορίζεται πριν διεξαχθεί ο στατιστικός έλεγχος. Συνήθη επίπεδα σημαντικότητας είναι τα: 0,01 έως και 0,001.

##### 3<sup>ο</sup> βήμα: Συλλογή δεδομένων από δείγματα

Είναι εξαιρετικά σημαντικό να επιλεγεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα, ώστε η μέθοδος να παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα. Επίσης, η συλλογή των δεδομένων από το δείγμα γίνεται αφού διαμορφωθούν τα κριτήρια για τη λήψη μιας απόφασης. Τέλος, πραγματοποιείται ο υπολογισμός των κατάλληλων περιγραφικών στατιστικών δεικτών.

##### 4<sup>ο</sup> βήμα: Διεξαγωγή έρευνας

Στο τελευταίο βήμα της μεθόδου ελέγχου υποθέσεων, ο ερευνητής μελετά την εγκυρότητα της μηδενικής υπόθεσης με τη βοήθεια στατιστικών δεικτών, ώστε να αποφασίσει είτε να απορρίψει τη μηδενική υπόθεση (reject the null hypothesis), είτε οδηγείται στην απόφαση ότι απέτυχε να απορρίψει τη μηδενική υπόθεση (fail to reject the null hypothesis).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

#### 4.5.2.2 Στατιστικά κριτήρια

Τα στατιστικά κριτήρια τα οποία μπορούμε να αξιοποιήσουμε στην έρευνα διακρίνονται σε παραμετρικά και μη παραμετρικά.

Τα παραμετρικά κριτήρια είναι πολύ ισχυρά, όμως απαιτούν την ικανοποίηση συγκεκριμένων προϋποθέσεων είτε αναφορικά με συγκεκριμένες παραμέτρους του πληθυσμού είτε αναφορικά με τη μορφή της κατανομής τους. Χρησιμοποιούνται στην ανάλυση ποσοτικών δεδομένων, ενώ οι βασικές προϋποθέσεις που πρέπει να ικανοποιούνται είναι:

- μέτρηση σε κλίμακα ίσων διαστημάτων τουλάχιστον,
- το δείγμα να προέρχεται από πληθυσμό που σχηματίζει κανονική κατανομή και
- οι ομάδες που συμμετέχουν στην έρευνα να έχουν ίσες διακυμάνσεις.

Τα μη παραμετρικά κριτήρια δεν επικεντρώνονται στον έλεγχο υποθέσεων αναφορικά με συγκεκριμένες παραμέτρους του πληθυσμού, ούτε προϋποθέτουν την κανονική κατανομή των τιμών τους. Αντίθετα, επικεντρώνονται στον έλεγχο υποθέσεων αναφορικά με το σχήμα των κατανομών ή των δεικτών κεντρικής τάσης τους. Οι μη - παραμετρικοί έλεγχοι (non - parametric tests) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην περίπτωση που τα δεδομένα είναι ποιοτικά ή εφόσον δεν ικανοποιούνται οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή των παραμετρικών κριτηρίων. Συνήθως, για κάθε παραμετρικό κριτήριο που δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπάρχει ένα αντίστοιχο μη - παραμετρικό που μπορεί να το αντικαταστήσει.

**Τα πλεονεκτήματα των μη - παραμετρικών ελέγχων είναι τα εξής:**

- Δεν απαιτούν κανονικότητα στις κατανομές των μεταβλητών,
- μπορούν να εφαρμοστούν όταν τα δείγματα είναι μικρά,
- δεν απαιτούνται εκτιμήσεις των παραμέτρων των κατανομών,
- εφαρμόζονται στις περιπτώσεις που δεν μπορούν να εφαρμοστούν έλεγχοι της Παραμετρικής Στατιστικής.

**Προϋποθέσεις για την εφαρμογή των μη - παραμετρικών ελέγχων είναι οι εξής:**

- Τα δείγματα να είναι τυχαία,
- οι παρατηρήσεις να είναι ανεξάρτητες,
- η κλίμακα μέτρησης της μεταβλητής να είναι τουλάχιστον διάταξης (ordinal) και
- οι κατανομές να είναι συμμετρικές μέσα σε κάθε ομάδα - δείγμα.

Παρόλο που οι μη - παραμετρικοί έλεγχοι έχουν ευρεία εφαρμογή, στις περιπτώσεις που ένας παραμετρικός έλεγχος μπορεί να αξιοποιηθεί προτιμάται από τον αντίστοιχο μη - παραμετρικό διότι δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

#### 4.5.2.3 Μη παραμετρικοί έλεγχοι υποθέσεων

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι έλεγχοι υποθέσεων με τους οποίους συγκρίναμε τα κατηγοριοποιημένα δεδομένα οι οποίοι παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

#### 4.5.2.3.1 Κατανομή $\chi^2$

Το στατιστικό κριτήριο  $\chi^2$  (Chi - Square test) είναι ίσως το πιο δημοφιλές μη - παραμετρικό κριτήριο και χρησιμοποιείται στην περίπτωση που τα δεδομένα της έρευνας είναι κατηγορικά.

Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο ερευνητής έχει στη διάθεση του ένα δείγμα ποιοτικών δεδομένων οργανωμένο σε ονομαστικές κατηγορίες και ο στόχος είναι να χρησιμοποιηθούν τα δεδομένα αυτά ώστε να προσδιοριστεί η αναλογία (ή το ποσοστό) του πληθυσμού που ανήκει στην κάθε κατηγορία. Ουσιαστικά εξετάζει τη σχέση μεταξύ των κατηγοριών στις στήλες και τις γραμμές ενός πίνακα, στον οποίο τα δεδομένα έχουν τη μορφή συχνοτήτων.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου διατυπώνεται μια μηδενική υπόθεση, που είτε δηλώνει ότι δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη προτίμηση στις διαθέσιμες ονομαστικές κατηγορίες (no - preference null - hypothesis), είτε δηλώνει ότι τα ποσοστά που προτιμώνται από τα υποκείμενα δε διαφέρουν από τα ποσοστά άλλων πληθυσμών οι οποίοι αποτελούν το σημείο αναφοράς (no difference from a comparison population). Και στις δύο περιπτώσεις, αυτό που προσδιορίζει η μηδενική υπόθεση είναι ο αναμενόμενος αριθμός (expected frequency – fe) των υποκειμένων που ανήκει σε κάθε ονομαστική κατηγορία.

Ο στατιστικός δείκτης ελέγχου που χρησιμοποιείται για αυτή την αξιολόγηση είναι το  $\chi^2$ . Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης καταλληλότητας, δηλαδή ως δείκτης για να ερμηνεύσει τη συχνότητα κατηγοριών που προέρχονται από ένα μόνο δείγμα. Το κριτήριο  $\chi^2$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί, επίσης, ως στατιστικό κριτήριο για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας μεταξύ δύο ποιοτικών μεταβλητών.

Ο συγκεκριμένος έλεγχος χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση κατηγορικών μεταβλητών όπως είναι το φύλο και τα αποτελέσματα του γονοτυπικού ελέγχου.

#### 4.5.2.3.2 Ανάλυση Διακύμανσης (One Way ANOVA)

Η Ανάλυση Διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA) είναι μέθοδος στατιστικού ελέγχου υποθέσεων που αναφέρονται σε περισσότερους από δύο πληθυσμούς. Ουσιαστικά πρόκειται για μια **γενίκευση του T-test** που εφαρμόζεται σε δύο πληθυσμούς. Θεωρητικά, θα μπορούσαν να εφαρμοστούν πολλαπλοί ανεξάρτητοι έλεγχοι, αλλά η συγκεκριμένη μεθοδολογία δεν ενδείκνυται καθότι με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η πιθανότητα να οδηγηθούμε σε σφάλμα τύπου I. Συνεπώς, η **ANOVA** είναι η κατάλληλη μεθοδολογία διότι, πρόκειται για συντομότερη διαδικασία ανάλυσης ενώ έχει και ακρίβεια διάγνωσης

Οι προϋποθέσεις που πρέπει να ισχύουν για να χρησιμοποιηθεί η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα είναι:

- τα δείγματα είναι αντιπροσωπευτικά και οι τιμές που τα απαρτίζουν οφείλονται σε ανεξάρτητες παρατηρήσεις,
- η κατανομή των τιμών των δειγμάτων είναι κανονική και
- οι πληθυσμοί από τους οποίους έχουν επιλεγεί τα δείγματα έχουν την ίδια διακύμανση

#### 4.5.2.3.3 Έλεγχος Kruskal - Wallis

Όταν υπάρχουν μόνο δύο ομάδες η ερμηνεία μιας στατιστικά σημαντικής διαφοράς είναι προφανής. Στις περιπτώσεις που υπάρχουν άνω των δύο ομάδων η απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης ( $H_0$ ) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των ομάδων και πρέπει να διερευνηθεί ποιες είναι οι

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

ομάδες που έχουν διαφορετικούς μέσους, δηλαδή ελέγχονται ανά δύο κάποιιοι από τους μέσους (πολλαπλές συγκρίσεις). Ο έλεγχος Kruskal - Wallis αποτελεί τη μη - παραμετρική εκδοχή της one - way ANOVA και εφαρμόζεται για τη σύγκριση τριών ή περισσότερων πληθυσμών. Εφαρμόζεται σε πλήρως τυχαιοποιημένα δεδομένα χωρίς να απαιτείται κανονική κατανομή.

Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο υποθέσεις:

- $H_0$ : Τα  $k$  δείγματα προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό,
- $H_1$ : Τουλάχιστον ένα από τα δείγματα προέρχεται από διαφορετικό πληθυσμό σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha$ .

Εφόσον η μηδενική υπόθεση απορριφθεί, αυτό συνεπάγεται ότι τουλάχιστον δύο πληθυσμοί διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς τη διάμεση τιμή τους.

#### 4.5.2.3.4 Mann - Whitney U - test

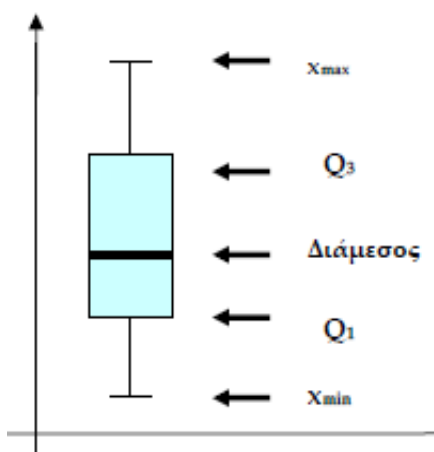
Το Mann - Whitney U - test αποτελεί τη μη παραμετρική εκδοχή του independent sample t - test. χρησιμοποιείται σε δείγματα με μη - κανονική κατανομή. Επιτελεί έλεγχο της ισότητας των δύο μέσων τιμών μεταξύ ανεξάρτητων δειγμάτων και γενικότερα αναλύει διαφορές μεταξύ δύο ομάδων όταν οι προϋποθέσεις για το t - test δεν ικανοποιούνται.

### 4.5.3 Γραφήματα

Παρακάτω περιγράφονται το είδος των γραφημάτων που θα χρησιμοποιηθούν για να απεικονίσουμε τα στατιστικά αποτελέσματα της μελέτης.

#### 4.5.3.1 Θηκογράμματα

Τα θηκογράμματα αποτελούν γραφικές παραστάσεις στις οποίες αναπαριστάται η κατανομή των δεδομένων. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται η διάμεσος, τα τεταρτημόρια καθώς και η μέγιστη και ελάχιστη τιμή του δείγματος. Αποτελούν σημαντικά γραφήματα στην απεικόνιση δεδομένων καθώς παρέχουν πληθώρα πληροφοριών. Στην **Εικόνα 39** απεικονίζεται ένα τυπικό θηκόγραμμα (180, 181).



Εικόνα 39. Παρουσίαση ενός τυπικού θηκογράμματος, ενώ υποδεικνύονται και τα μεγέθη τα οποία μπορούν να εξαχθούν από αυτό.



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

#### 4.5.3.2 Ιστογράμματα

Το ιστόγραμμα παρουσιάζει μία κατανομή συχνοτήτων για διακριτά ή συνεχή δεδομένα. Ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει τα αληθινά όρια των διαφόρων διαστημάτων. Τα αληθινά όρια ενός διαστήματος είναι τα σημεία που το διαχωρίζουν από τα διαστήματα αμφοτέρων πλευρών και ο κάθετος άξονας παρουσιάζει είτε τη συχνότητα είτε τη σχετική συχνότητα των παρατηρήσεων εντός κάθε διαστήματος.

#### 4.6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

Συνολικά μελετήθηκαν **N = 175 δείγματα** παιδιών με ΣΥ και για τους τρεις πολυμορφισμούς. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε τρεις διακριτές κατηγορίες:

- **Παιδιά με ΣΥ λόγω δυσγενεσίας (N=54).** Στην κατηγορία αυτή εμπίπτουν παιδιά με ημιαγενεσία, εκτοπία ή αγενεσία του θυρεοειδούς αδένα όπως αυτή έχει πιστοποιηθεί με απεικονιστικά δεδομένα (υπέρηχο θυρεοειδούς ή σπινθηρογράφημα). Πρόκειται για παιδιά που λαμβάνουν υψηλές δόσεις υποκατάστασης.
- **Παιδιά με ΣΥ λόγω δυσορμονογένεσης (N=91).** Η δυσορμονογένεση αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιτία ΣΥ μετά τη δυσγενεσία. Στην κατηγορία αυτή επιλέχθηκαν τόσο παιδιά με υψηλές (>3 μg/kg/d) (**N=36**) όσο και χαμηλές (<3 μg/kg/d) (**N=55**) τιμές δόσης υποκατάστασης.
- **Παιδιά με παροδικό ΣΥ (N=30).** Δηλαδή διακόψαν τη θεραπεία μετά το 3 έτος ζωής. Πρόκειται για παιδιά τα οποία ο θυρεοειδής δεν είχε ανατομικό πρόβλημα και μπόρεσαν να διακόψουν τη θεραπεία. Πρόκειται στην ουσία για ήπια περιστατικά ΣΥ με μικρές σχετικές δόσεις.

Τα περιγραφικά στατιστικά για τις τρεις κατηγορίες παιδιών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9** Για την σύγκριση των μέσων κάθε μεταβλητής χρησιμοποιείται One-way ANOVA.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

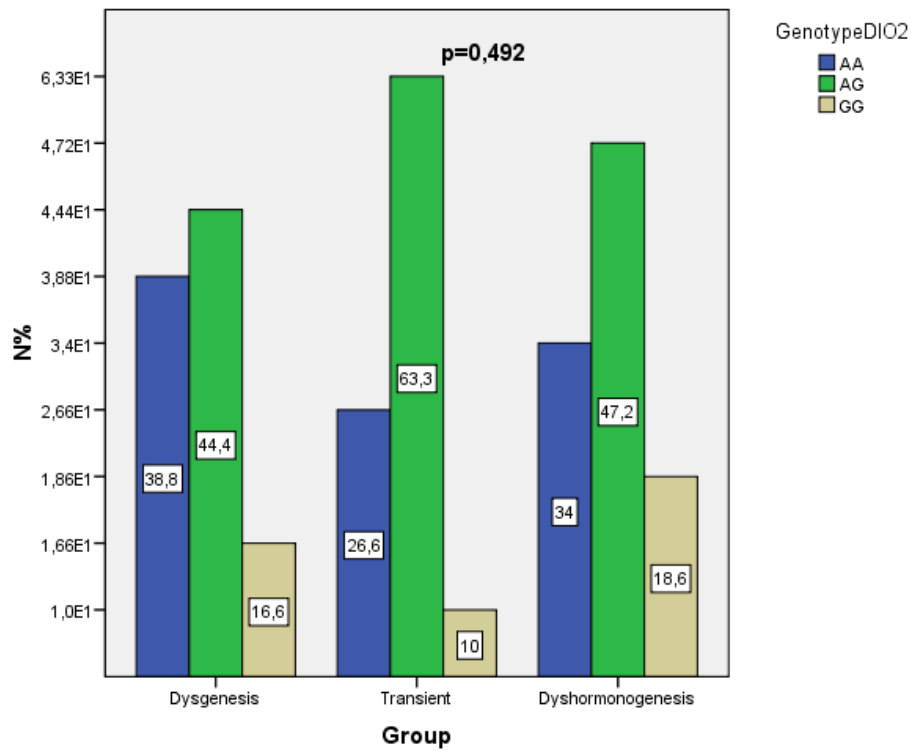
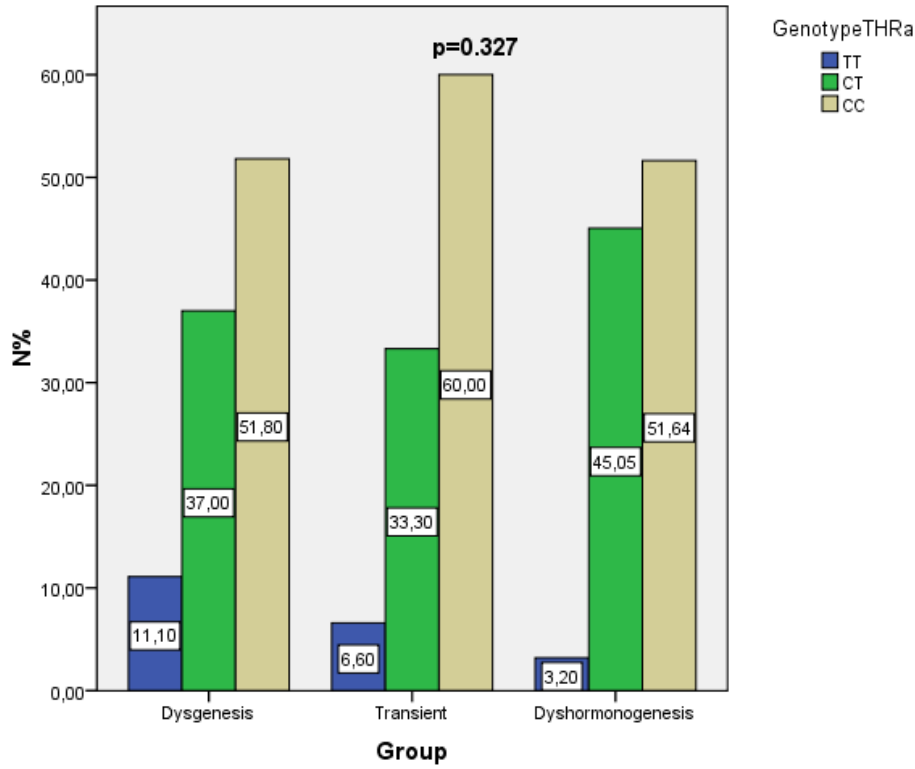
**Πίνακας 9. Περιγραφικά στατιστικά για τις τρεις κατηγορίες παιδιών με ΣΥ. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).**

		<b>Δυσγενεσία N=54</b>	<b>Διακοπή N=30</b>	<b>Δυσορμονογένεση N=91</b>	<b>p value</b>
	<b>Age</b>	12,70±0,59(54,13,25)	9,88±0,41(30,9,55)	11,22±0,34(91,11,4)	<b>0,002</b>
	<b>Sex</b>	M=19 F=35	M=17 F=13	M=57 F=34	<b>0,0054</b>
	<b>Weeks</b>	39,13±0,15(52,39,05)	38,67±0,19(30,38,40)	38,87±0,11(91,39,00)	0,154
	<b>Birthweight</b>	3313,98±53,86(54,3290)	3257,50±69,25(30,3240,00)	3282,64±35,72(91,3210,00)	0,778
	<b>Guthrie</b>	133,88±18,91(53,107,00)	8,17±2,68(30,4,78)	13,47±1,54(89,9,00)	<b>0,00</b>
	<b>TSHstart</b>	426,20±44,64(54,396,90)	9,68±1,12(30,8,03)	17,14±2,16(91,10,60)	<b>0,00</b>
	<b>FT4start</b>	5,47±0,53(53,4,70)	11,54±0,44(28,11,85)	12,20±0,17(89,12,20)	<b>0,00</b>
	<b>Dose1year</b>	4,53±0,19(54,4,22)	2,16±0,13(28,2,08)	2,97±0,11(91,2,86)	<b>0,00</b>
	<b>Dose3years</b>	3,84±0,13(54,3,71)	1,39±0,13(30,15,70)	2,65±0,09(91,2,70)	<b>0,00</b>
	<b>BMI3years</b>	16,90±0,30(46,16,57)	16,23±0,33(27,15,70)	16,08±0,13(89,15,94)	<b>0,02</b>
	<b>BMI5years</b>	17,06±0,37(44,16,55)	16,77±0,40(23,16,46)	16,17±0,17(83,15,99)	<b>0,04</b>
<b>THRa</b>	<b>TT</b>	6(11,1%)	2(6,6%)	3(3,2%)	0,327
	<b>CT</b>	20(37,0%)	10(33,3%)	41(45,05%)	
	<b>CC</b>	28(51,8%)	18(60%)	47(51,64%)	
	<b>C</b>	76(70,3%)	46(60%)	135(74,1%)	
	<b>T</b>	32(29,7%)	14(40%)	47(25,9%)	
<b>DIO</b>	<b>AA</b>	21(38,8%)	8(26,6%)	31(34%)	0,492
	<b>AG</b>	24(44,4%)	19(63,3%)	43(47,2%)	
	<b>GG</b>	9(16,6%)	3(10%)	17(18,6%)	
	<b>A</b>	66(61,1%)	35(58,3%)	105(57,7%)	
	<b>G</b>	42(38,9%)	25(41,7%)	77(42,3%)	
<b>TSHR</b>	<b>GG</b>	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0,22
	<b>CG</b>	8(14,8%)	2(6,7%)	6(6,6%)	
	<b>CC</b>	46(85,2%)	28(93,3%)	85(93,4%)	
	<b>G</b>	8(7,4%)	2(3,3%)	6(3,3%)	
	<b>C</b>	100(92,6%)	58(96,7%)	176(96,7%)	

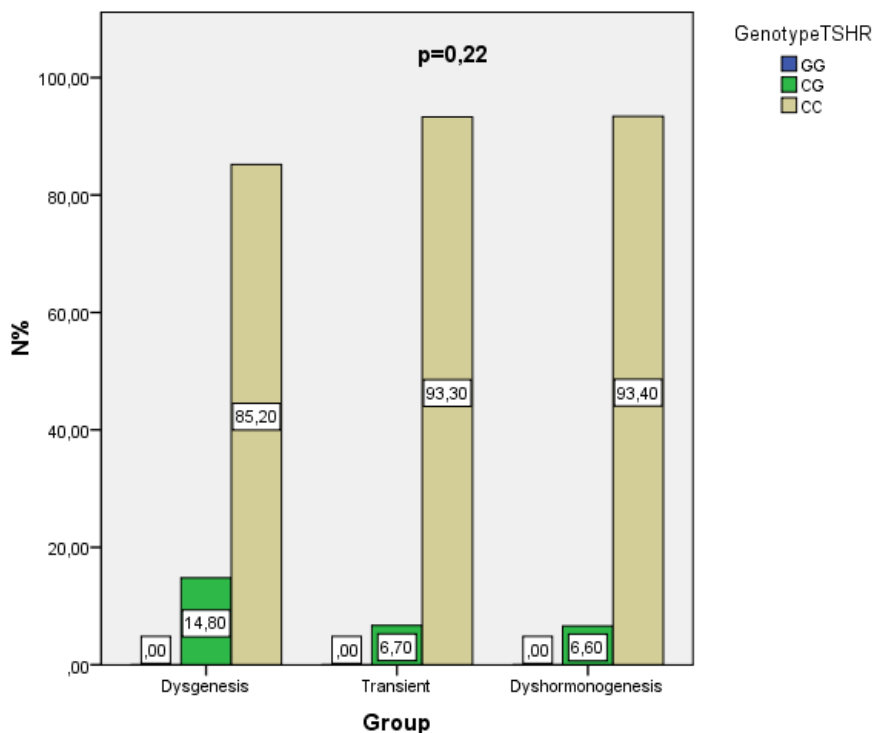
Από τον έλεγχο προκύπτει ότι οι τρεις κατηγορίες διαφέρουν σε όλες τις παραμέτρους, όπως αναμενόταν εκτός από το βάρος γέννησης και τις εβδομάδες κύησης που αποτελούσαν κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη.

Στο **Γράφημα 1** παρουσιάζονται με τη μορφή ραβδογράμματος τα ποσοστά των γονοτύπων των τριών πολυμορφισμών για τις τρεις ομάδες.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Γράφημα 1. Τα ποσοστά των γονοτύπων των τριών πολυμορφισμών παρουσιάζονται με τη μορφή ραβδογράμματος. Α. THRa rs939348 Β. DIO2 rs225014 Γ. TSHR rs1991517. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε με  $\chi^2$  ανάλυση.

Παρόλο που δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά των γονοτύπων των πολυμορφισμών μεταξύ των τριών ομάδων τα ποσοστά διαφέρουν αρκετά. Συγκεκριμένα:

- Για τον THRa (rs939348) στην ομάδα της Δυσγενεσίας το ποσοστό του TT είναι σχεδόν διπλάσιο από το αντίστοιχο της ομάδας με τον παροδικό και τριπλάσιο από αυτό της ομάδας της Δυσορμονογένεσης. Σε επίπεδο αλληλόμορφων το ποσοστό των T αλληλίων στην ομάδα του Παροδικού ΣΥ είναι σχεδόν διπλάσιο των άλλων δύο ομάδων.
- Για τον DIO2 (rs225014) δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ούτε όσο αφορά τους γονότυπους ούτε σε επίπεδο αλληλόμορφων.
- Για τον TSHR (rs1991517) στην ομάδα της Δυσγενεσίας το ποσοστό του CG είναι διπλάσιο από το αντίστοιχο των άλλων δύο ομάδων. Σε επίπεδο αλληλομόρφων στην ομάδα της Δυσγενεσίας το ποσοστό του G αλληλίου ήταν σχεδόν διπλάσιο των άλλων δύο ομάδων.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ διάφορων ομαδοποιήσεων στα δείγματα με σκοπό να δούμε αν μπορούν να αναδειχθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους γονότυπους και στα αλληλία μεταξύ των ομαδοποιήσεων αυτών.

Αρχικά τα παιδιά που ανήκουν στην ομάδα Δυσαρμονογένεσης χωρίστηκαν σε δύο επιμέρους ομάδες μελέτης

α. Ασθενείς με χαμηλή δόση (<3 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα)

β. Ασθενείς με υψηλή δόση (>3 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα)

τα αποτελέσματα της σύγκρισης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 10**.

*Πίνακας 10. Περιγραφικά στατιστικά για τις υποομάδες υψηλής και χαμηλής δόσης παιδιών με δυσορμονογένεση. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).*

		Low Dose (N=55)	High Dose (N=36)	p value
	Age	10,49±0,38 (55, 10,60)	12,35±0,60(36, 12,35)	0,070
	Sex	M=30 F=25	M=27 F=9	0,030
	Weeks	38,70±0,14(55,38,50)	39,13±0,19(36,39,25)	0,066
	Birthweight	3257,09±45,30(55, 3200,00)	3321,7±2,90(36,11,20)	0,380
	Guthrie	10,06±1,55(54, 8,00)	18,73±2,9(35,11,20)	0,005
	TSHstart	13,65±2,67 (55,10,18)	22,46±3,47(36,14,90)	0,045
	FT4start	12,10±0,20(54, 12,25)	12,34±0,30(35,12,10)	0,502
	Dose1year	2,54±0,10 (55,2,53)	3,63±0,18(36,3,31)	0,000
	Dose3years	2,13±0,08(55,2,08)	3,45±0,08(36,3,31)	0,000
	BMI3years	16,11±0,19(55,15,83)	16,04±0,18(34, 16,20)	0,797
	BMI5years	16,05±0,19(51, 16,09)	16,3±0,30(32,15,98)	0,371
THRa	TT	1 (1,8%)	2 (5,6%)	0,619
	CT	25 (45,5%)	16 (44,4%)	
	CC	29 (52,7%)	18 (50%)	
	T	27 (24,6%)	20 (27,8%)	0,626
	C	83 (75,4%)	52 (72,2%)	
DIO	AA	20(36,45)	11(30,6%)	0,735
	AG	26(47,2%)	17 (47,2%)	
	GG	9 (16,4%)	8 (22,2%)	
	A	66 (60%)	39 (54,1%)	0,436
	G	44 (40%)	33 (45,9%)	
TSHR	GG	0 (0%)	0 (0%)	0,588
	CG	3 (5,45)	3(8,3%)	
	CC	52( 94,5%)	33 (91,7%)	
	G	3 (2,7%)	3 (4,2%)	0,594
	C	107 (97,3%)	69 (95,8%)	

Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στους γονότυπους ή τα αλληλία των τριών υπο μελέτη πολυμορφισμών.

Συγκρίθηκαν επίσης η ομάδα με παροδικό ΣΥ που θεωρούνται σαν θετική έκβαση καθώς τα παιδιά αυτά κατάφεραν να διακόψουν τη θεραπεία με τα παιδιά με δυσορμονογένεση που θεωρούμε ότι είχαν αρνητική έκβαση της θεραπείας τους και τα παιδιά με δυσορμονογένεση τα οποία λαμβάνουν υψηλή δόση. Να σημειωθεί ότι υψηλή δόση θεωρείται δόση >3 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα στα 3 έτη ζωής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους **Πίνακες 11 και 12**.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Πίνακας 11. Περιγραφικά στατιστικά για τις ομάδες Παροδικού και Δυσορμονογένεσης. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).

		Positive outcome (N=30)	Negative outcome(N=91)	p value
	Age	9,88±0,41 (30, 9,55)	11,22±0,34 (91, 11,40)	,024
	Sex	M=17 F=13	M=57 F=34	0,604
	Weeks	38,67 ± 0,19 (30, 38,40)	38,87±0,11 (91, 39,00)	,317
	Birthweight	3257,50±69,25 (30, 3240,0)	3282,64±35,72 (91, 3210,00)	,719
	Guthrie	8,17 ± 2,68 (30, 4,78)	13,47± 1,54 (89, 9,00)	,000
	TSHstart	9,68 ± 1,12 (30, 8,03)	17,14 ± 2,16(91, 10,60)	,000
	FT4start	11,54 ± 0,44 (28, 11,85)	12,20 ± 0,17 (89,12,20)	,063
	Dose1year	2,16 ± 0,13 (28, 2,08)	2,97 ± 0,11 (91, 2,86)	,000
	Dose3years	1,39 ± 0,13 (30, 1,20)	2,65 ± 0,09 (91, 2,70)	,000
	BMI3years	16,23 ± 0,33 (27, 15,70)	16,08 ± 0,13 (89, 15,94)	,969
	BMI5years	16,77 ± 0,40 (23, 16,46)	16,17 ± 0,17 (83, 15,99)	,209
THRa	TT	2 (6,7%)	3 ( 3,3%)	0,438
	CT	10 (33,3%)	41 (45%)	
	CC	18 (60%)	47 (51,7%)	
	C	46 (76,7%)	135 (74,2%)	0,699
	T	14 (23,3%)	47 (25,8%)	
DIO	AA	8 (26,7%)	31 (34,1%)	0,279
	AG	19 (63,3%)	43 (47,3%)	
	GG	3(10%)	17(18,7%)	
	A	35 (58,3%)	105 (57,7%)	0,93
	G	25 (41,7%)	77 (42,3%)	
TSHR	GG	0 (0%)	0 (0%)	0,988
	CG	2 (6,7%)	6 (6,6%)	
	CC	28 (93,3%)	85 (93,4%)	
	G	2(2,3%)	6 (3,3%)	0,989
	C	58 (96,7%)	176 (96,7%)	

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

**Πίνακας 12. Περιγραφικά στατιστικά για τις ομάδες Παροδικού και Δυσορμονογένεσης με υψηλή δόση. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).**

		<b>Positive outcome (N=30)</b>	<b>negative outcome (&gt;3) (N=55)</b>	<b>p value</b>
	<b>Age</b>	9,88±0,41 (30, 9,55)	10,49±0,38 (55, 10,60)	,276
	<b>Sex</b>	M=17 F=13	M=30 F=25	0,851
	<b>Weeks</b>	38,67 ± 0,19 (30, 38,40)	38,70±0,14(55,38,50)	,745
	<b>Birthweight</b>	3257,50±69,25 (30, 3240,0)	3257,09±45,30(55, 3200,00)	,985
	<b>Guthrie</b>	8,17 ± 2,68 (30, 4,78)	10,06±1,55(54, 8,00)	,007
	<b>TSHstart</b>	9,68 ± 1,12 (30, 8,03)	13,65±2,67 (55,10,18)	,001
	<b>FT4start</b>	11,54 ± 0,44 (28, 11,85)	12,10±0,20(54, 12,25)	,080
	<b>Dose1year</b>	2,16 ± 0,13 (28, 2,08)	2,54±0,10 (55,2,53)	,011
	<b>Dose3years</b>	1,39 ± 0,13 (30, 1,20)	2,13±0,08(55,2,08)	,000
	<b>BMI3years</b>	16,23 ± 0,33 (27, 15,70)	16,11±0,19(55,15,83)	,925
	<b>BMI5years</b>	16,77 ± 0,40 (23, 16,46)	16,05±0,19(51, 16,09)	,161
<b>THRa</b>	<b>TT</b>	2 (6,7%)	1 (1,8%)	0,337
	<b>CT</b>	10 (33,3%)	25 (45,5%)	
	<b>CC</b>	18 (60%)	29( 52,7%)	
	<b>C</b>	46 (76,7%)	83 (75,4%)	0,859
	<b>T</b>	14 (23,3%)	27 (24,6%)	
<b>DIO</b>	<b>AA</b>	8 (26,7%)	20(36,45)	0,357
	<b>AG</b>	19 (63,3%)	26(47,2%)	
	<b>GG</b>	3(10%)	9 (16,4%)	
	<b>A</b>	35 (58,3%)	66 (60%)	0,832
	<b>G</b>	25 (41,7%)	44 (40%)	
<b>TSHR</b>	<b>GG</b>	0 (0%)	0 (0%)	0,82
	<b>CG</b>	2 (6,7%)	3 (5,45)	
	<b>CC</b>	28 (93,3%)	52( 94,5%)	
	<b>G</b>	2(2,3%)	3 (2,7%)	0,823
	<b>C</b>	58 (96,7%)	107 (97,3%)	

Επίσης συγκρίθηκαν η ομάδα των παιδιών με δυσγενεσία με την ομάδα των παιδιών με Παροδικό ΣΥ, με δυσορμονογένεση και τα παιδιά με δυσορμονογένεση που λαμβάνουν υψηλή δόση. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης παρουσιάζονται στους **Πίνακες 13, 14 και 15.**

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Πίνακας 13. Περιγραφικά στατιστικά για τις ομάδες Δυσγενεσίας και Παροδικού ΣΥ. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).

		<b>Δυσγενεσία N=54</b>	<b>Διακοπή N=30</b>	<b>p value</b>
	<b>Age</b>	12,70±0,59(54,13,25)	9,88±0,41(30,9,55)	,024
	<b>Sex</b>	M=19 F=35	M=17 F=13	
	<b>Weeks</b>	39,13±0,15(52,39,05)	38,67±0,19(30,38,40)	,317
	<b>Birthweight</b>	3313,98±53,86(54,3290)	3257,50±69,25(30,3240,00)	,719
	<b>Guthrie</b>	133,88±18,91(53,107,00)	8,17±2,68(30,4,78)	,000
	<b>TSHstart</b>	426,20±44,64(54,396,90)	9,68±1,12(30,8,03)	,000
	<b>FT4start</b>	5,47±0,53(53,4,70)	11,54±0,44(28,11,85)	,063
	<b>Dose1year</b>	4,53±0,19(54,4,22)	2,16±0,13(28,2,08)	,000
	<b>Dose3years</b>	3,84±0,13(54,3,71)	1,39±0,13(30,15,70)	,000
	<b>BMI3years</b>	16,90±0,30(46,16,57)	16,23±0,33(27,15,70)	,969
	<b>BMI5years</b>	17,06±0,37(44,16,55)	16,77±0,40(23,16,46)	,209
<b>THRa</b>	<b>TT</b>	6(11,1%)	2(6,6%)	0,701
	<b>CT</b>	20(37,0%)	10(33,3%)	
	<b>CC</b>	28(51,8%)	18(60%)	
	<b>C</b>	76(70,3%)	46(76,7%)	0,380
	<b>T</b>	32(29,7%)	14(23,3%)	
<b>DIO</b>	<b>AA</b>	21(38,8%)	8(26,6%)	0,249
	<b>AG</b>	24(44,4%)	19(63,3%)	
	<b>GG</b>	9(16,6%)	3(10%)	
	<b>A</b>	66(61,1%)	35(58,3%)	0,724
	<b>G</b>	42(38,9%)	25(41,7%)	
<b>TSHR</b>	<b>GG</b>	0(0%)	0(0%)	0,269
	<b>CG</b>	8(14,8%)	2(6,7%)	
	<b>CC</b>	46(85,2%)	28(93,3%)	
	<b>G</b>	8(7,4%)	2(2,3%)	0,373
	<b>C</b>	100(92,6%)	58(96,7%)	



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Πίνακας 14. Περιγραφικά στατιστικά για τις ομάδες Δυσγενεσία και Δυσορμονογένεσης. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).

		<b>Δυσγενεσία N=54</b>	<b>Δυσορμονογένεση N=91</b>	<b>p value</b>
	<b>Age</b>	12,70±0,59(54,13,25)	11,22±0,34(91,11,4)	,028
	<b>Sex</b>	M=19 F=35	M=57 F=34	0,0014
	<b>Weeks</b>	39,13±0,15(52,39,05)	38,87±0,11(91,39,00)	,138
	<b>Birthweight</b>	3313,98±53,86(54,3290)	3282,64±35,72(91,3210,00)	,640
	<b>Guthrie</b>	133,88±18,91(53,107,00)	13,47±1,54(89,9,00)	,000
	<b>TSHstart</b>	426,20±44,64(54,396,90)	17,14±2,16(91,10,60)	,000
	<b>FT4start</b>	5,47±0,53(53,4,70)	12,20±0,17(89,12,20)	,000
	<b>Dose1year</b>	4,53±0,19(54,4,22)	2,97±0,11(91,2,86)	,000
	<b>Dose3years</b>	3,84±0,13(54,3,71)	2,65±0,09(91,2,70)	,000
	<b>BMI3years</b>	16,90±0,30(46,16,57)	16,08±0,13(89,15,94)	,024
	<b>BMI5years</b>	17,06±0,37(44,16,55)	16,17±0,17(83,15,99)	,047
<b>THRa</b>	<b>TT</b>	6(11,1%)	3(3,2%)	0,145
	<b>CT</b>	20(37,0%)	41(45,05%)	
	<b>CC</b>	28(51,8%)	47(51,64%)	
<b>DIO</b>	<b>AA</b>	21(38,8%)	31(34%)	0,837
	<b>AG</b>	24(44,4%)	43(47,2%)	
	<b>GG</b>	9(16,6%)	17(47,25%)	
<b>TSHR</b>	<b>GG</b>	0(0%)	0(0%)	0,105
	<b>CG</b>	8(14,8%)	6(6,6%)	
	<b>CC</b>	46(85,2%)	85(93,4%)	

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Πίνακας 15. Περιγραφικά στατιστικά για τις ομάδες Δυσγενεσία και High Dose με υψηλή δόση. Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή mean±SE (N, median).

		Δυσγενεσία N=54	High Dose (N=36)	p value
	Age	12,70±0,59(54,13,25)	12,35±0,60(36,12,35)	,633
	Sex	M=19 F=35	M=27 F=9	0,0002
	Weeks	39,13±0,15(52,39,05)	39,13±0,19(36,39,25)	,935
	Birthweight	3313,98±53,86(54,3290)	3321,7±2,90(36,11,20)	,863
	Guthrie	133,88±18,91(53,107,00)	18,73±2,9(35,11,20)	,000
	TSHstart	426,20±44,64(54,396,90)	22,46±3,47(36,14,90)	,000
	FT4start	5,47±0,53(53,4,70)	12,34±0,30(35,12,10)	,000
	Dose1year	4,53±0,19(54,4,22)	3,63±0,18(36,3,31)	,001
	Dose3years	3,84±0,13(54,3,71)	3,45±0,08(36,3,31)	,007
	BMI3years	16,90±0,30(46,16,57)	16,04±0,18(34,16,20)	,057
	BMI5years	17,06±0,37(44,16,55)	16,3±0,30(32,15,98)	,203
THRa	TT	6(11,1%)	2(5,6%)	0,588
	CT	20(37,0%)	16(44,4%)	
	CC	28(51,8%)	18(50%)	
	T	32(29,7%)	20(27,8%)	
	C	77(70,3%)	52(72,2%)	
DIO	AA	21(38,8%)	11(30,6%)	0,666
	AG	24(44,4%)	17(47,2%)	
	GG	9(16,6%)	8(22,2%)	
	A	66(61,1%)	39(54,2%)	
	G	42(38,9%)	33(45,8%)	
TSHR	GG	0(0%)	0(0%)	0,357
	CG	8(14,8%)	3(8,3%)	
	CC	46(85,2%)	33(91,7%)	
	C	8(7,4%)	3(4,2%)	
	G	100(92,6%)	69(95,8%)	

Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά σε καμία από τις συγκρίσεις των υποομάδων στους γονότυπους ή τα αλληλία των τριών υπό μελέτη πολυμορφισμών, παρά το γεγονός πως οι ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους στις περισσότερες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους.

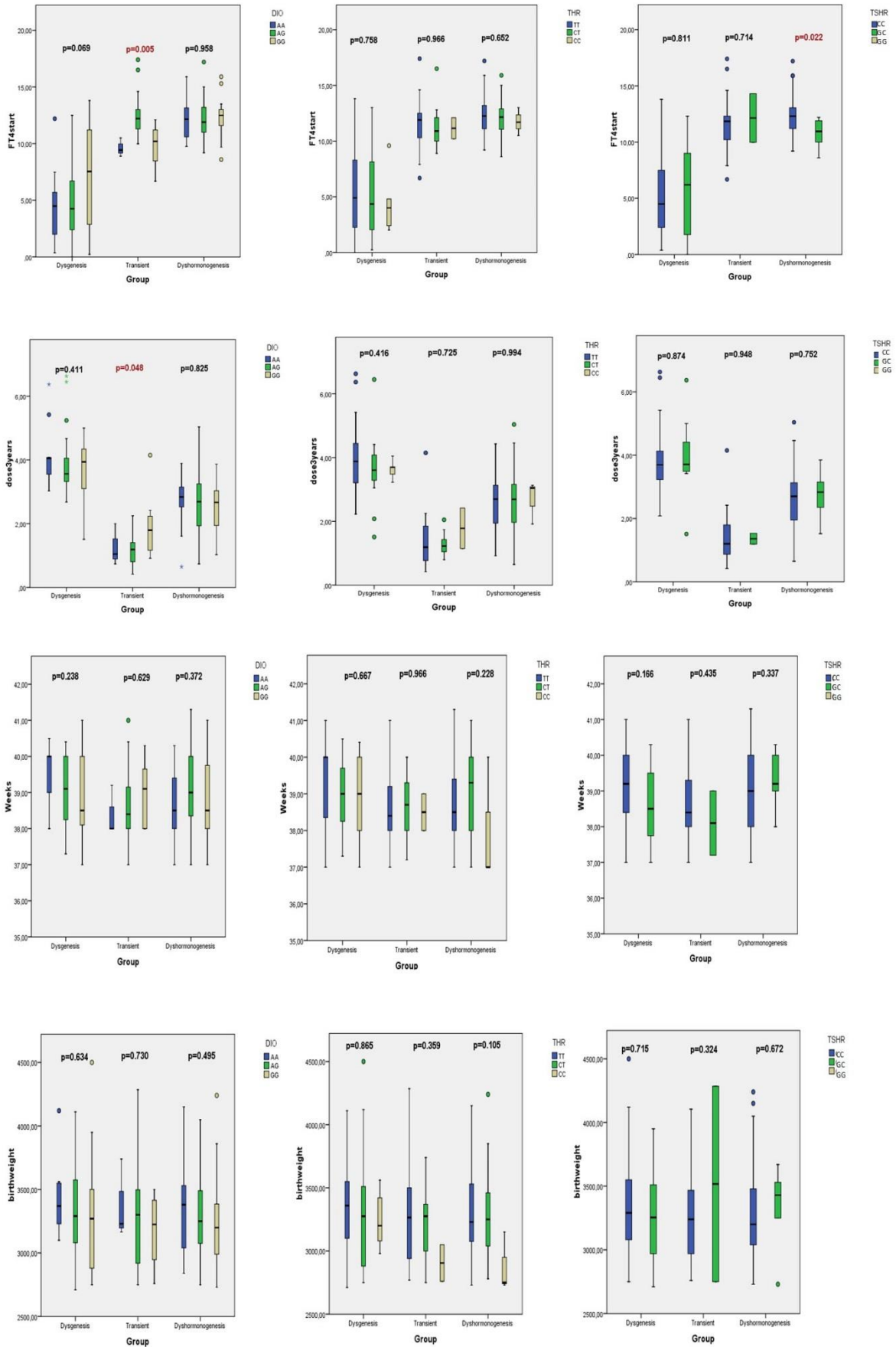
Προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση του κάθε γονότυπου στα κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά πραγματοποιήθηκε σύγκριση των παραμέτρων αυτών για κάθε γονότυπο για τις τρεις υπο- μελέτη ομάδες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 16. Ενώ διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στην Εικόνα 40.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

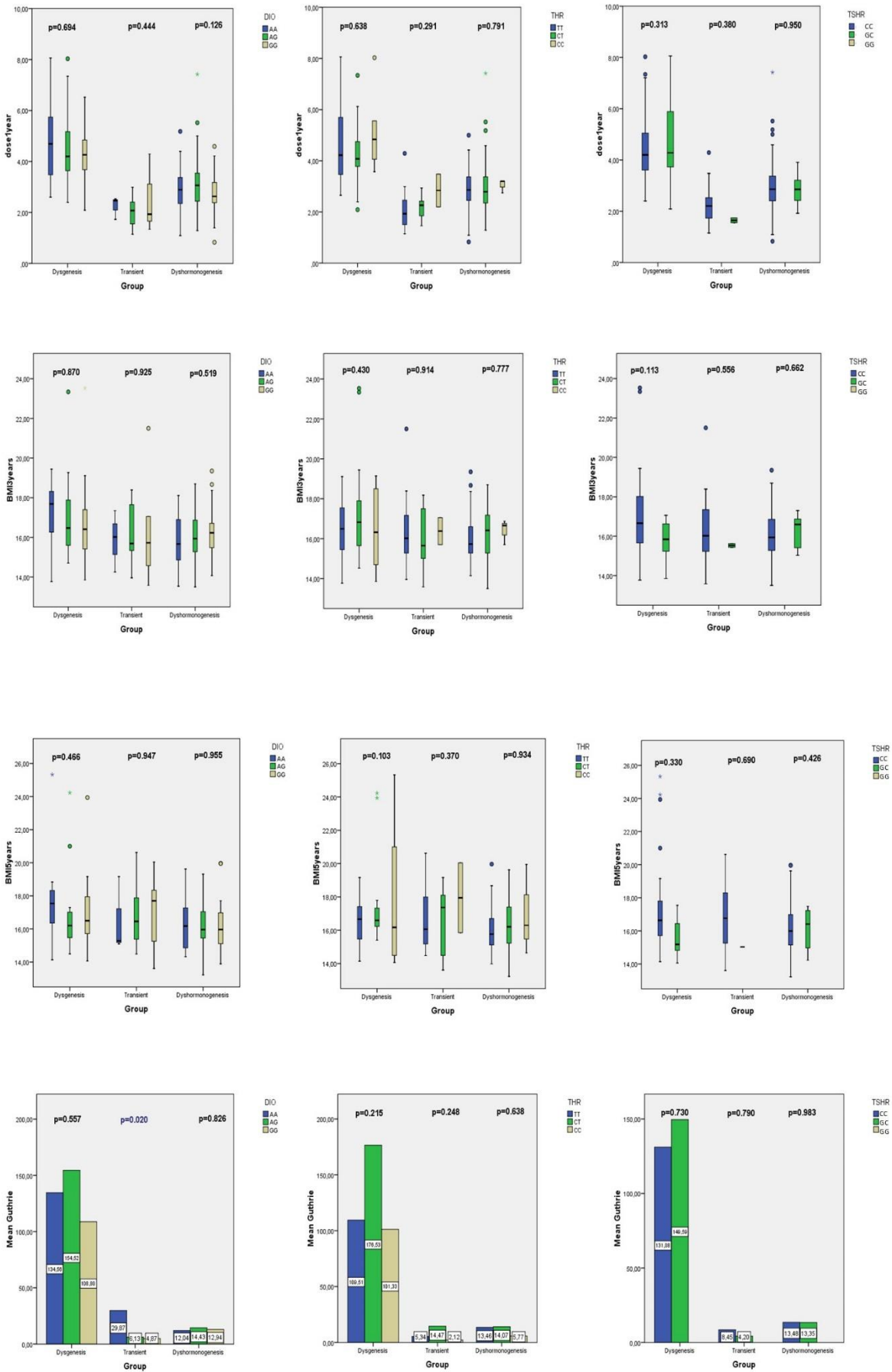
Αυσορμονογένεση												
DIO N=91				TSHR N=91				THRa N=91				
	AA Mean (SD) N=31	AG Mean (SD) N=43	GG Mean (SD) N=17	P-VALUE	CG Mean (SD) N=6	CC Mean (SD) N=85	P-VALUE	TT Mean (SD) N=3	CT Mean (SD) N=41	CC Mean (SD) N=47	P-VALUE	
Age	10,5(3,3)	11,5(3,3)	11,9(3,2)	,394	13,0(3,7)	11,1(3,2)	,172	11,2(1,3)	11,6(3,5)	10,9(3,2)	,641	
Weeks	38,73(1,1)	39,04(1,0)	38,70(1,1)	,372	39,3(0,8)	38,8(1,1)	,337	38,0(1,7)	39,0(1,1)	38,8(1,0)	,228	
Birthweight	3231,1(363,7)	3292,8(310,4)	3350,9(376,6)	,495	3340,0(329,6)	3278,6(343,0)	,672	2876,7(236,9)	3284,4(321,7)	3307,0(351,2)	,105	
Guthrie	12,9(15,6)	14,4(15,0)	12,0(11,6)	,826	13,4(13,6)	13,5(14,7)	,983	5,8(2,1)	14,1(13,2)	13,5(16,0)	,638	
TSHstart	18,1(27,3)	15,7(13,4)	19,2(22,3)	,799	14,8(12,5)	17,3(21,1)	,780	11,8(1,4)	15,7(13,0)	18,8(26,0)	,708	
FT4start	12,26(1,45)	12,15(1,62)	12,18(1,88)	,958	<b>10,8(1,4)*</b>	<b>12,3(1,6)*</b>	<b>,022</b>	11,7(1,3)	12,1(1,5)	12,3(1,7)	,652	
Dose1year	2,70(0,84)	3,18(1,11)	2,93(1,01)	,136	2,9(0,7)	3,0(1,0)	,791	3,1(0,3)	3,0(1,2)	2,9(0,9)	,950	
Dose3years	2,58(0,73)	2,67(0,96)	2,73(0,83)	,825	2,8(0,8)	2,6(0,9)	,762	2,7(0,7)	2,7(0,9)	2,6(0,8)	,994	
BMI3years	16,26(1,22)	16,05(1,29)	15,83(1,28)	,519	16,3(0,9)	16,1(1,3)	,662	16,4(0,6)	16,2(1,4)	16,0(1,2)	,777	
BMI5years	16,13(1,50)	16,16(1,52)	16,27(1,57)	,955	16,1(1,4)	16,2(1,5)	,934	17,0(2,7)	16,3(1,6)	16,0(1,3)	,426	
Δυσγενεσία												
DIO N=54				TSHR N=54				THRa N=54				
	AA Mean (SD) N=21	AG Mean (SD) N=24	GG Mean (SD) N=9	P-VALUE	CG Mean (SD) N=8	CC Mean (SD) N=46	P-VALUE	TT Mean (SD) N=6	CT Mean (SD) N=20	CC Mean (SD) N=28	P-VALUE	
Age	12,4(3,9)	12,6(4,3)	13,5(5,7)	,834	13,1(5,1)	12,6(4,3)	,760	<b>16,4(2,1)</b>	<b>11,3(4,1)</b>	<b>12,9(4,4)</b>	<b>,034</b>	
Weeks	38,9(1,2)	39,1(1,0)	39,6(0,8)	,238	38,6(1,2)	39,2(1,0)	,166	38,9(1,3)	39,0(0,9)	39,3(1,1)	,667	
Birthweight	3261(450,3)	3323,8(379,8)	3411,7(312,5)	,634	3266,3(401,0)	3322,3(398,8)	,715	3240,0(217,3)	3306,0(495,5)	3335,5(352,5)	,865	
Guthrie	108,8(147,2)	154,5(144,0)	134,6(96,6)	,557	149,6(214,3)	131,1(122,7)	,730	101,3(33,5)	176,5(205,7)	109,5(67,2)	,215	
TSHstart	375,6(400,4)	482,7(279,2)	393,7(265,0)	,531	383,2(370,0)	433,7(324,1)	,692	572,0(309,1)	410,9(364,6)	405,9(307,7)	,521	
FT4start	7,0(4,6)	4,5(2,9)	4,6(3,7)	,069	5,8(4,5)	5,4(3,8)	,811	4,5(2,8)	5,5(4,2)	5,7(4,0)	,798	
Dose1year	4,4(1,1)	4,5(1,4)	4,9(1,9)	,694	4,7(1,8)	4,5(1,3)	,638	5,1(1,6)	4,2(1,2)	4,6(1,4)	,313	
Dose3years	3,7(0,9)	3,9(1,0)	4,2(1,1)	,874	3,9(1,4)	3,8(0,9)	,874	3,6(0,3)	3,7(1,0)	4,0(1,0)	,416	
BMI3years	16,7(2,1)	17,0(2,1)	17,2(1,9)	,870	15,8(1,1)	17,1(2,1)	,113	16,5(2,1)	17,4(2,6)	16,6(1,4)	,430	
BMI5years	17,1(2,2)	16,7(2,2)	18,1(3,6)	,466	15,5(1,3)	17,3(2,5)	,103	17,9(4,4)	17,5(2,7)	16,5(1,4)	,330	
Διακρίση												
DIO N=30				TSHR N=30				THRa N=30				
	AA Mean (SD) N=8	AG Mean (SD) N=19	GG Mean (SD) N=3	P-VALUE	CG Mean (SD) N=2	CC Mean (SD) N=28	P-VALUE	TT Mean (SD) N=2	CT Mean (SD) N=10	CC Mean (SD) N=18	P-VALUE	
Age	10,5(3,1)	9,3(1,5)	11,6(3,4)	,187	8,7(0,4)	10,0(2,3)	,456	11,3(1,6)	9,6(2,7)	9,9(2,1)	,643	
Weeks	39,0(0,9)	38,6(1,2)	38,4(0,7)	,629	38,1(1,3)	38,7(1,1)	,435	38,5(0,7)	38,7(1,0)	38,7(1,2)	,966	
Birthweight	3179(273,5)	3270,3(431,6)	3378,3(314,9)	,730	3517,5(1085,4)	3238,9(324,8)	,324	2905,0(205,1)	3233,0(305,8)	3310,3(418,9)	,359	
Guthrie	<b>4,9(3,1)</b>	<b>6,1(3,8)</b>	<b>29,9(46,6)</b>	<b>,020</b>	4,2(1,0)	8,5(15,2)	,700	2,1(0,2)	14,5(24,5)	5,3(3,7)	,248	
TSHstart	10,7(8,4)	8,3(2,9)	15,6(12,1)	,143	7,7(0,7)	9,8(6,3)	,637	8,8(1,9)	9,8(7,0)	9,7(6,1)	,978	
FT4start	<b>9,8(2,0)</b>	<b>12,5(2,0)</b>	<b>9,6(0,8)</b>	<b>,005</b>	12,1(3,1)	11,5(2,4)	,714	11,2(1,3)	11,5(2,3)	11,6(2,6)	,966	
Dose1year	2,4(1,1)	2,0(0,5)	2,2(0,4)	,444	1,6(0,1)	2,2(0,7)	,291	2,8(0,9)	2,1(0,5)	2,1(0,8)	,360	
Dose3years	<b>1,9(1,0)</b>	<b>1,2(0,5)</b>	<b>1,3(0,7)</b>	<b>,048</b>	1,4(0,2)	1,4(0,8)	,948	1,8(0,9)	1,3(0,4)	1,4(0,9)	,725	
BMI3years	16,4(2,8)	16,2(1,4)	15,9(1,6)	,925	15,5(0,1)	16,3(1,8)	,566	16,4(1,0)	16,0(1,6)	16,3(1,9)	,914	
BMI5years	17,0(2,6)	16,8(1,8)	16,5(2,3)	,947	15,0	16,9(1,9)	,370	17,9(3,0)	16,7(2,2)	16,7(1,8)	,690	

**Πίνακας 16.** Περιγραφικά στατιστικά των κλινικο-εργαστηριακών παραμέτρων ανά γονότυπο ( για τους πολυμορφισμούς THRa (rs939348), DIO2 (rs225014) και TSHR (rs1991517)) και ανά Ομάδα (Δυσγενεσίας, Παροδικού και Αυσορμονογένεσης) με τη μορφή mean±SE (N, median). Με κόκκινο σημειώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05). Με μπλε επισημαίνονται οι έλεγχοι οι οποίοι αν και ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με ANOVA το Levene homogeneity test of Variance δείχνει ότι δεν υπάρχει ίδια διακύμανση για κάποιες παραμέτρους και για το λόγο αυτό διεξάγονται το Robust Tests of Equality of Means (Welch και Brown-Forsythe) το οποίο απορρίπτει την ANOVA και η διαφορά δεν θα πρέπει να θεωρείται στατιστικά σημαντική.

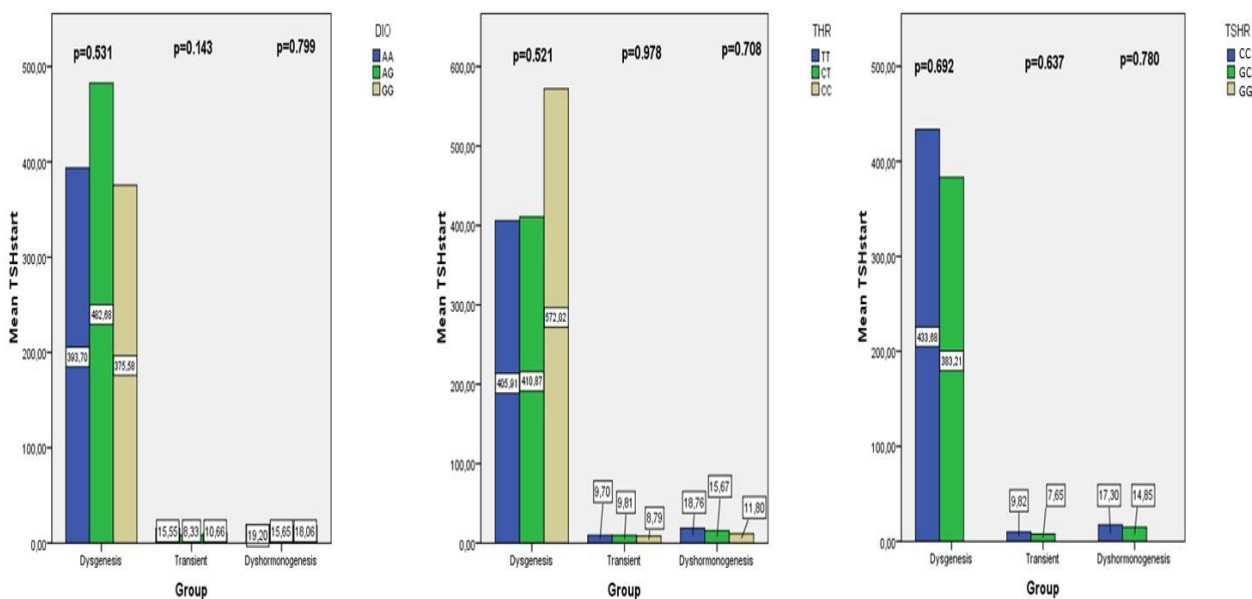
Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Εικόνα 40. Διαγραμματική απεικόνιση με τη μορφή θηκογράμματος της σύγκρισης των κλινικο-εργαστηριακών αποτελεσμάτων ανά γονότυπο ( για τους πολυμορφισμούς THRα (rs939348), DIO2 (rs225014) και TSHR (rs1991517)) και ανά Ομάδα (Δυσγενεσίας, Παροδικού και Δυσορμονογένεσης) με τη μορφή mean±SE (N, median). Με κόκκινο σημειώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05). Με μπλε επισημαίνονται οι έλεγχοι οι οποίοι αν και ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με ANOVA το Levene homogeneity test of Variance δείχνει ότι δεν υπάρχει ίδια διακύμανση για κάποιες παραμέτρους και για το λόγο αυτό διεξάγονται το Robust Tests of Equality of Means (Welch και Brown-Forsythe) το οποίο απορρίπτει την ANOVA και η διαφορά δεν θα πρέπει να θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Από την ανάλυση προκύπτει ότι ο πολυμορφισμός rs225014 (DIO2) φαίνεται να συσχετίζεται με τη δόση υποκατάστασης με L-T4 στον 3<sup>ο</sup> χρόνο ζωής στους ασθενείς με Παροδικό ΣΥ, συγκεκριμένα ασθενείς με AA ( minor Allele) γονότυπο εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές δόσης. Στην ίδια ομάδα ο rs225014 συσχετίζεται με την FT4 πριν την έναρξη της θεραπείας με τους ασθενείς με γονότυπο AA ( minor Allele) να εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές.

Ο πολυμορφισμός rs1991517 (TSHR) συσχετίζεται με τα επίπεδα της FT4 πριν την έναρξη της θεραπείας στους ασθενείς με Δυσορμονογένεση. Συγκεκριμένα οι ασθενείς με γονότυπο CG να εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές.

Συσχέτιση του γονοτύπου rs225014 (DIO2) και της TSH από την Guthrie αναδείχθηκε στην ομάδα με Παροδικό ΣΥ με ANOVA αλλά το Levene homogeneity test of Variance δείχνει ότι δεν υπάρχει ίδια διακύμανση για κάποιες παραμέτρους και για το λόγο αυτό διεξάγονται το Robust Tests of Equality of Means (Welch και Brown-Forsythe) το οποίο απορρίπτει την ANOVA και η διαφορά δεν θα πρέπει να θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Δεν βρέθηκε καμία άλλη συσχέτιση των εξεταζόμενων γονοτύπων με κάποια άλλη κλινικο-εργαστηριακή παράμετρο.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν τρεις μέθοδοι γονοτύπησης RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) των πολυμορφισμών rs225014 (Thr92Ala), rs939348 (intronic variant) και rs1991517 (Glu727Asp) ενώ είχε προηγηθεί η ενίσχυση τμημάτων που περιείχαν τις θέσεις των προαναφερόμενων πολυμορφισμών με PCR. Αναλύσεις των πολυμορφισμών αυτών με RFLP αναφέρονται στην βιβλιογραφία και είναι αυτές οι οποίες χρησιμοποιούνται για την γονοτύπηση των πολυμορφισμών αυτών καθώς επιτρέπουν την ταχεία ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων με χαμηλό κόστος (95, 130, 179). Οι εκκινητές και για τους τρεις πολυμορφισμούς χρησιμοποιήθηκαν όπως αναφέρονταν χωρίς περεταίρω τροποποίηση αφού πρώτα ελέγχσαν *In Silico*. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που επιλέχθηκαν είναι οι εξής:

- ο για τον rs939348 το RspRS II ισοσχιστομερές του MseI (130),
- ο για τον rs1991517 το BvuI και όχι ο BstFNI διότι όπως προέκυψε από την *In Silico* μελέτη ο προτεινόμενος από τον Bayram *et al* (179) δεν έκοβε στην συγκεκριμένη περιοχή οπότε υποθέτουμε ότι πρόκειται για λάθος του συγγραφέα,
- ο για τον rs225014 επιλέχτηκε ο AfaI καθώς ο προτεινόμενος BsgI δεν υπήρχε διαθέσιμος στην ελληνική αγορά (95).

Προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη οπτική διάκριση μεταξύ των τριών γονοτύπων (φυσιολογικού, ετεροζυγώτη και ομοζυγώτη), τη μείωση του χρόνου ανάλυσης αλλά και του κόστους της ανάλυσης, η PCR και η αντίδραση πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα βελτιστοποιήθηκαν.

Τα παιδιά επιλέχθηκαν από προϋπάρχουσα βάση γενομικού υλικού με κριτήρια εισόδου τέτοια ώστε να εξασφαλίζεται η ομοιογένεια των πληθυσμών και να υπάρχει εύρος τιμών στη Δόση των 3 ετών.

Συνολικά γονοτυπήθηκαν **N = 175 δείγματα** παιδιών με ΣΥ και για τους τρεις πολυμορφισμούς. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε τρεις διακριτές κατηγορίες:

- **Παιδιά με ΣΥ λόγω δυσγενεσίας (N=54).**
- **Παιδιά με ΣΥ λόγω δυσορμονογένεσης (N=91).** Στην κατηγορία αυτή επιλέχθηκαν τόσο παιδιά με υψηλές (>3 μg/kg/d) (**N=36**) όσο και χαμηλές (<3 μg/kg/d) (**N=55**) τιμές δόσης υποκατάστασης.
- **Παιδιά με παροδικό ΣΥ (N=30).** Δηλαδή διέκοψαν τη θεραπεία μετά το 3 έτος ζωής.

Η παράλληλη δημιουργία βάσης δεδομένων με κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών επέτρεψε την στατιστική ανάλυση μεταξύ των γονοτύπων και των κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων όπως είναι το βάρος και οι εβδομάδες κύησης, η τιμή της TSH σε Guthrie, της TSH και της FT4 πριν την έναρξη θεραπείας, δόση L-T4 και BMI στο 1<sup>ο</sup> και στα 3<sup>ο</sup> έτος.

Η σύγκριση των γονοτύπων των τριών πολυμορφισμών και για τις τρεις ομάδες δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές παρόλο που το ποσοστό του CG γονότυπου για τον **TSHR** στην ομάδα Δυσγενεσίας (14,80%) ήταν διπλάσιο από το αντίστοιχο ποσοστό της ομάδας Παροδικού ΣΥ (6,60%) και της Δυσορμονογένεσης (6,70%). Τα ποσοστά του CC γονότυπου **THRa για την ομάδα της Δυσγενεσίας** (11,1%) ήταν διπλάσιο από το αντίστοιχο

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

ποσοστό της ομάδας Παροδικού ΣΥ (6,60%) και τετραπλάσιο της Δυσορμονογένεσης (3,20%). Τα ποσοστά των αλληλομόρφων για τον **DIO2 δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων.**

Δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διάφορα μεταξύ της σύγκρισης των ποσοστών εμφάνισης των γονοτύπων ή των αλληλομόρφων σε επιμέρους συγκρίσεις παρά το γεγονός ότι οι ομάδες διέφεραν στατιστικά σημαντικά στις περισσότερες κλινικο-εργαστηριακές παραμέτρους. Συγκεκριμένα συγκρίθηκαν ασθενείς:

1. με χαμηλή δόση (<3 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα) με ασθενείς με υψηλή δόση (>3 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα) από την Ομάδα της Δυσορμονογένεσης ,
2. η ομάδα με παροδικό ΣΥ που θεωρούνται σαν θετική έκβαση καθώς τα παιδιά αυτά κατάφεραν να διακόψουν τη θεραπεία με τα παιδιά με δυσορμονογένεση που θεωρούμε ότι είχαν αρνητική έκβαση της θεραπείας τους και τα παιδιά με δυσορμονογένεση τα οποία λαμβάνουν υψηλή δόση,
3. η ομάδα των παιδιών με δυσγενεσία με την ομάδα των παιδιών με Παροδικό ΣΥ, με δυσορμονογένεση και τα παιδιά με δυσορμονογένεση που λαμβάνουν υψηλή δόση.

Γεγονός που υποδηλώνει πως η ύπαρξη ή όχι κάποιου πολυμορφισμού δεν θα μπορούσε να χρησιμεύσει σαν βιοδείκτης για την κατηγοριοποίηση των περιπτώσεων ΣΥ ή να βοηθήσει στη λήψη κάποιας απόφασης.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση του κάθε γονότυπου στα κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά πραγματοποιήθηκε σύγκριση των παραμέτρων αυτών για κάθε γονότυπο για τις τρεις υπό μελέτη ομάδες.

Από την ανάλυση προκύπτει ότι ο πολυμορφισμός rs225014 (DIO2) φαίνεται να συσχετίζεται με τη δόση υποκατάστασης με L-T4 στον 3<sup>ο</sup> χρόνο ζωής στους ασθενείς με Παροδικό ΣΥ, συγκεκριμένα ασθενείς με AA ( minor Allele) γονότυπο εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές δόσης. Στην ίδια ομάδα ο rs225014 συσχετίζεται με την FT4 πριν την έναρξη της θεραπείας με τους ασθενείς με γονότυπο AA ( minor Allele) να εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές.

Ο πολυμορφισμός rs1991517 (TSHR) συσχετίζεται με τα επίπεδα της FT4 πριν την έναρξη της θεραπείας στους ασθενείς με Δυσορμονογένεση. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με γονότυπο CG εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές.

Συσχέτιση του γονοτύπου rs225014 (DIO2) και της TSH από την Guthrie αναδείχθηκε στην ομάδα με Παροδικό ΣΥ με ANOVA αλλά το Levene homogeneity test of Variance δείχνει ότι δεν υπάρχει ίδια διακύμανση για κάποιες παραμέτρους και για το λόγο αυτό διεξάγονται το Robust Tests of Equality of Means (Welch και Brown-Forsythe) το οποίο απορρίπτει την ANOVA και η διαφορά δεν θα πρέπει να θεωρείται στατιστικά σημαντική.

Δεν βρέθηκε καμία άλλη συσχέτιση των εξεταζόμενων γονοτύπων με κάποια άλλη κλινικοεργαστηριακή παράμετρο.

Επίσης θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν βρέθηκε κανένας ομόζυγος GG για τον rs1991517.



## 5.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην μελέτη αυτή υποθέσαμε πως μπορεί να υπάρχει συσχέτιση πολυμορφισμών στα γονίδια DIO2, TSHR και THRa με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως η δόση υποκατάστασης με LT-4. Ο ρόλος των γονιδίων αυτών στο μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών είναι πολύ καλά μελετημένος (84, 109, 136), ενώ πολλές μελέτες συσχετίζουν τα γονίδια αυτά με γνωστές παθήσεις του θυρεοειδούς αδένος (182-185).

Ο Al-Azzam *et al* (130) ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά για τον rs939348 (THRa) με την δόση L-T4 και τον BMI. Συγκεκριμένα οι φορείς του C αλληλίου απαιτούν μικρότερη δόση υποκατάστασης και εμφανίζουν υψηλότερο BMI κάτι το οποίο δεν προκύπτει στην παρούσα μελέτη.

Η Heemestra *et al* (186) δεν βρήκε συσχέτιση μεταξύ της δόσης και του rs225014 (DIO2). Σε παρόμοιο αποτέλεσμα κατέληξαν και οι μελέτες των Panicker *et al* (91) και τον Al-Azzam *et al* (89). Όμως ο Torlontano *et al* (102) ότι οι ασθενείς που φέρουν το γονότυπο CC της rs225014 απαιτούν μεγαλύτερες δόσεις (περίπου 20%) υποκατάστασης προκειμένου να επιτύχουν καλύτερα επίπεδα της TSH. Αντίθετα ο Arici *et al* (187) βρήκε συσχέτιση αλλά μεγαλύτερη δόση και υψηλότερες τιμές TSH απαιτούσαν οι ασθενείς με το γονότυπο TT.

Στην παρούσα μελέτη προκύπτει ότι ο πολυμορφισμός rs225014 (DIO2) φαίνεται να συσχετίζεται με τη δόση υποκατάστασης με L-T4 στον 3<sup>ο</sup> χρόνο ζωής στους ασθενείς με Παροδικό ΣΥ, συγκεκριμένα ασθενείς με AA (minor Allele) γονότυπο εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές δόσης και χαμηλότερες τιμές FT4 πριν την έναρξη θεραπείας. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Arici *et al* (187). Όμως τα αποτελέσματα δεν επαληθεύτηκαν στις υπόλοιπες ομάδες μελέτης.

Στην μελέτη του Peeters *et al* (101) και του van der Deure *et al* (188) δεν βρέθηκε συσχέτιση του. Ο Arici *et al* (187) δεν βρήκε συσχέτιση του rs1991517 με τη δόση LT4, ενώ στη μελέτη του Arici *et al*. παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα TSH για τους φορείς του γονότυπου CC χωρίς όμως και πάλι αυτά να είναι στατιστικά σημαντικά. Στην παρούσα μελέτη φαίνεται πως οι ασθενείς με γονότυπο CG εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές της FT4 πριν την έναρξη της θεραπείας από τους ασθενείς με Δυσορμονογένεση χωρίς και πάλι αυτό να επαληθεύεται στις άλλες ομάδες. Θα πρέπει να σημειωθεί πως στην ομάδα με δυσγενεσία είναι αναμενόμενο να μην υπάρχει επίδραση καθώς απουσιάζει ο αδένος στον οποίο και εκφράζεται ο υποδοχέας.

Καταλήγοντας ο ΣΥ είναι μία πολυπαραγοντική και πολυγονιδιακή νόσος με πληθώρα χαρακτηριστικών και φαινοτύπων που έχει σαν αποτέλεσμα οι διάφοροι γονότυποι των προαναφερόμενων πολυμορφισμών να επηρεάζουν διαφορετικά την κάθε υποομάδα. Το γεγονός αυτό καθιστά πολύ δύσκολη την εύρεση γενετικών δεικτών που θα μπορούσαν να δράσουν σαν βιοδείκτες για την λήψη αποφάσεων και αυτό αποδεικνύεται και από τα αντιφατικά αποτελέσματα των μελετών που έχουν ήδη δημοσιευθεί.

Η παρούσα μελέτη πρόκειται για την πρώτη μελέτη συσχέτισης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών με τη δόση σε παιδιά με ΣΥ και μάλιστα με γνωστή αιτιοπαθολογία της νόσου.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
Foramen Cecum	Τυφλό Τρήμα
Primitive Pharynx	Αρχέγονος Φάρυγγας
Thyroid Diverticulum	Θυρεοειδικό Εκκόλπωμα
Thyroglossal Duct	Θυρεογλωσσικός Πόρος
Insulin Like Growth Factor	Ινσουλινόμορφος Αυξητικός Παράγοντας Ι
Copy Number Variants	Ποικιλομορφίες Αριθμού Αντιγράφων
Single Nucleotide Polymorphism	Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί
Long noncoding RNAs	Μακρά μη-κωδικοποιούντων για πρωτεΐνη μόρια RNA
5'- , 3'- untranslated regions	5' , 3' αμετάφραστα άκρα
Selenocysteine Insertion Sequence	Αλληλουχία Ενσωμάτωσης Σελενοκυστεΐνης
Ubiquitin	Ουβικουΐτίνης
Thyroid Response Elements	Στοιχεία Απόκρισης Θυρεοειδούς
Retinoid X Receptor	Υποδοχέας Ρετινοειδούς Χ
DNA-binding domain	Περιοχή Δέσμευσης DNA
Ligand-Binding Domain	Περιοχή Δέσμευσης Συνδέτη
G Protein–Coupled Receptor Genes	Γονίδια Υποδοχέων Συζευγμένα Με Πρωτεΐνη G
Toxic Thyroid Nodules	Τοξικά Οζίδια του Θυρεοειδούς
Gain-of-function	Κέρδος λειτουργίας
Loss-of-function	Απώλεια λειτουργίας
Hot spot	Θερμά σημεία
Toxic Multinodular Goiter	Τοξική Πολυοζώδης Βρογχοκήλη
Merkel Cell Carcinoma	Καρκίνωμα Κυττάρων Merkel
Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

T <sub>4</sub>	Τετραϊωδοθυρονίνη ή Θυροξίνη
T <sub>3</sub>	Τριϊωδοθυρονίνη
MIT	Μonoϊωδοτυροσίνη
DIT	Διϊωδοτυροσίνη
TG	Θυρεοσφαιρίνη
TPO	Θυρεοειδική Υπεροξειδάση
TSH	Θυρεοειδοτρόπος Ορμόνη
TRH	Θυρεοεκλυτική Ορμόνη
FSH	Ωοθυλακιοτρόπος Ορμόνη
LH	Ωχρινοτρόπος Ορμόνη
HCG	Χοριακή Γοναδοτροπίνη
TSHR	Υποδοχέας της TSH
cAMP	Κυκλική Μονοφωσφορική Αδενοσίνη
PIP <sub>2</sub>	Σύστημα Φωσφατιδυλικής Ινοσιτόλης
IGF-I	Ινσουλινομορφος Αυξητικός Παράγοντας I
TGF-β	Τροποποιητικός Αυξητικός Παράγοντας Β
TBG	Θυρεοδεσμευτική Σφαιρίνη
TBPA	Δεσμευτική προ - αλβουμίνη της Θυροξίνης
ALB	Αλβουμίνη
FT <sub>4</sub>	«ελεύθερη» T <sub>4</sub>
FT <sub>3</sub>	«ελεύθερη» T <sub>3</sub>
rT3	Ανάστροφη T3
D1	Αποϊωδινάση Τύπου I
D2	Αποϊωδινάση Τύπου II
D3	Αποϊωδινάση Τύπου III
TRα	Υποδοχέας α Θυρεοειδικών Ορμονών
TRβ	Υποδοχέας β Θυρεοειδικών Ορμονών
ATP	Adenosine Triphosphate
CNV	Copy Number Variants
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
INDELS	Insertions / Deletions
lncRNAs	Long noncoding RNAs
5', 3'- UTR	5', 3'- Untranslated regions
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphism
AS-PCR	Allele-specific PCR
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
CRE	cAMP Response Elements
AP1	Activator Protein 1
SECIS	Selenocysteine Insertion Sequence
TREs	Thyroid Response Elements
RXR	Retinoid X Receptor
DBD	DNA-binding domain
LBD	Ligand-Binding Domain
GPCR	G protein-coupled receptor genes
TTNs	Toxic Thyroid Nodules
TMNG	Toxic multinodular goiter
MCC	Merkel cell carcinoma
PCR	Polymerase Chain Reaction

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

ΑΕΔ	Αδρό Ενδοπλασματικό Δίκτυο
ΣΥ	Συγγενής Υποθυρεοειδισμός
ΜΣΥ	Μόνιμος Συγγενής Υποθυρεοειδισμός
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Έλεγχος της καταλληλότητας και των συνθηκών του προτεινόμενου ζεύγους εκκινήτων με τη χρήση του <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>:

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCAGGGCTGGCAAAGTCAAG	21	61.49	57.14	4.00	0.00
Reverse primer	CCACACTCTATTAGAGCCAATTG	23	57.00	43.48	9.00	6.00

**Products on target templates**  
 >NC\_000014.9 Homo sapiens chromosome 14, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 255  
 Features associated with this product:  
[type II iodothyronine deiodinase isoform a](#)  
[type II iodothyronine deiodinase isoform a](#)

Forward primer 1 CTCAGGGCTGGCAAAGTCAAG 21  
 Template 80203148 ..... 80203168

Reverse primer 1 CCACACTCTATTAGAGCCAATTG 23  
 Template 80203402 ..... 80203380

product length = 796  
 Features flanking this product:  
[1654345 bp at 5' side: RNA-binding protein Nova-1 isoform 3](#)  
[514704 bp at 3' side: forkhead box protein G1](#)

Reverse primer 1 CCACACTCTATTAGAGCCAATTG 23  
 Template 28252575 ..C.....C...TA.....T 28252553

Reverse primer 1 CCACACTCTATTAGAGCCAATTG 23  
 Template 28251780 ..C.....C...TA.....T 28251802

>NC\_000020.11 Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 1568  
 Features associated with this product:  
[bcl-2-like protein 1 isoform X1](#)

## 1Γ. Αναζήτηση περιοριστικού ενζύμου για τον rs1991517

Αναζήτηση περιοριστικού ενζύμου για τον διαχωρισμό των δύο αλληλόμορφων με τη χρήση του <http://insilico.ehu.es/restriction/>:

<b>Normal (T)</b>
AGTGTGGTGCATGTCTCCAGTACAGAAGGAGGTGACAACAG
<b>Mutant (C)</b>
AGTGTGGTGCATGTCTCCAGTGCAGAAGGAGGTGACAACAG

[Restriction Home](#)

### Restriction enzyme digest of DNA: differences between two sequences

[Tidy Up Sequences](#)

DNA rs225014 (C at position 26)  Endonucleases cleaving only this sequence  
 TTGCCACTGT TGTCACTCC TTCTGACTG GAGACATGCA CCACACTGGA

DNA rs225014 (T at position 26)  Endonucleases cleaving only this sequence  
 TTGCCACTGT TGTCACTCC TTCTGACTG GAGACATGCA CCACACTGGA

Do not align  Align sequences (beta) and show best results

[Get list of restriction enzymes](#)

Minimum recognition size for each restriction enzyme 4

Type of restriction enzyme All

Commercial source All

Only restriction enzymes with known bases (no N,R,Y...)

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Προτείνονται περιοριστικά ένζυμα που τέμνουν το φυσιολογικό ή το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο:

**Sequence 1.** rs225014 (C at position 26)  
 0 TTGCCACTGT TGTCACTCC TTCTGCACTG GAGACATGCA CCACACTGGA  
 100

**Sequence 2.** rs225014 (T at position 26)  
 0 TTGCCACTGT TGTCACTCC TTCTGACTG GAGACATGCA CCACACTGGA  
 100

**Alignment**

```

0 TTGCCACTGT TGTCACTCC TTCTGCACTG GAGACATGCA CCACACTGGA A
  |||
TTGCCACTGT TGTCACTCC TTCTGACTG GAGACATGCA CCACACTGGA A
  
```

100

Restriction enzyme	Cleaves Seq 1 at	Cleaves Seq 2 at
<input checked="" type="radio"/> AfaI,RsaI GT^AC		26
<input checked="" type="radio"/> BsgI GTGCAGNNNNNNNNNNNNNNN'_NN'	28	
<input checked="" type="radio"/> BtsIMutI CAGTG'_NN'	9 30 48	9 48
<input checked="" type="radio"/> Csp6I,CviOI,RsaNI		25

### 1Δ. Εύρεση θραυσμάτων που δημιουργούνται

Εισάγεται η αλληλουχία του PCR προϊόντος για να ελεγχθούν τα τμήματα που δημιουργούνται:

**Restriction enzyme digest of DNA**  
 with commercially available restriction enzymes  
 Beta version: correct behaviour in being checked

Paste the sequence in the textbox as [plain text](#), [fasta](#) or [upload sequence](#).

```

CCACACTCTA TTAGAGCCAA TTGTAACAT TTAATGTGAA TTCAAGTGGC AATGTGTTTA 60
ATGTGATATT CTCACCTTCT TCTTCTCTT CTTTTTTTTT TTTTTTACCG TCAGGTGAAA 120
TTGGGTGAGG ATGCCCCCAA TTCAGTGTG GTGCATGTCT CCAGTACAGA AGGAGGTGAC 180
AACAGTGGCA ATGGTACCCA G6AGAAGATA GCTG6GGGAG CCACATGCCA CCTTCTTGAC 240
TTTGCCAGCC CTGAGCGCCC ACTAGTGGTC AACTTTGGCT CAGCCACT
  
```

[Tidy Up](#) [Reverse](#) [Complement](#)

Get list of restriction enzymes  
 Display of Results:  Table  Tabulated text  
 Show sequence(s) on top

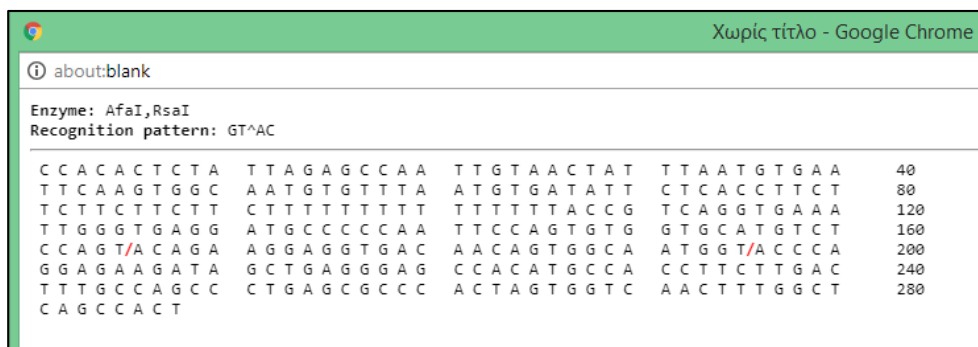
Settings: Default [Change](#)  
 Select specific endonucleases: [Select](#)

**Selected endonuclease(s): AfaI RsaI**

Restriction enzyme	Cuts	Positions
<a href="#">AfaI,RsaI</a> GT^AC	2	<a href="#">165</a> <a href="#">195</a>
<a href="#">AfaI,RsaI</a> GT^AC	2	<a href="#">165</a> <a href="#">195</a>

This tool was described by San Millán *et al*, 2013 (DOI: [10.1186/1756-0500-6-513](https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-513)).

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά



Το περιοριστικό ένζυμο που επιλέγεται για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού rs225014 είναι το AfaI. Το περιοριστικό αυτό ένζυμο τέμνει σε δυο σημεία το PCR προϊόν. Τα θραύσματα που δημιουργούνται σε κάθε περίπτωση είναι:

Συγκεντρωτικά	
<b>PCR product</b>	255 bp
c.[=];[=]	165 bp + 30 bp + 60 bp
c.[429T>C];[=]	165 bp + 30 bp + 60 bp +195 bp
c.[429T>C];[ 429T>C]	195 bp + 60 bp

```

CCACACTCTA TTAGAGCCAA TTGTA ACTAT TTAATGTGAATTC AAGT
GGC AATGTGT TTA ATGTGATATT CTCACCTTCTTCTTCTTCTT CTII
TTTTTT TTTTTT ACCG TCAGGTGAAAT TGGGTGAGG ATGCCCCCAA
TTC CAGTGTG GTGCATGTCTCCAGT
(165 bp)

A CAGA AGGAGGTGAC AACAGTGGCA ATGGT
(30 bp)

ACC CAGGAGAAGATA GCTGAGGGAG CCACATGCCA CCTTCTTIGAC
TTTGGCCAGCC CTGAG
(60 bp)

```



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

## 2. rs939348

### 2A. Γενικές πληροφορίες

<b>Αλλαγή</b>	c.544+1059 T>C
<b>Human genome</b>	GRCh38
<b>Gene</b>	THRA
<b>Coordinates</b>	Chr. 17: 40,062,899-40,092,627
<b>Transcript</b>	THRA-203 ENST00000450525.6
<b>Αλλαγή σε επίπεδο πρωτεΐνης</b>	intronic

### 2B. Αλληλουχία τμήματος προς ενίσχυση και έλεγχος καταλληλότητας του προτεινόμενου ζεύγους εκκινήτων

Ο πολυμορφισμός rs939348 εντοπίζεται στο ιντρόνιο 2-3 το γονιδίου THRA με κίτρινο επισημαίνονται οι θέσεις των εκκινήτων και με κόκκινο η θέση του πολυμορφισμού:

#### Intron 2-3:

40075442

```
ggaactcacagctgggcagggcatggggtagctccccctccccaaagcctcaccacaggaaggact
ctgaggacgatctggcctgtcgctgtgtggctgtcacttgcagcc cctgtgtctcccagcttaggc
ttctgtgggtctggaagagtctgtgc ttaatgtttgagaaaggcaggaatgccagttcccagctct
cctaagactgcaaccctccccatcaccttcccctccccatgtctatgcgccacctgtggcta
tctctaggactacactc agaggctgtgagctctgggtg gtaactgctgaagccgctagctcaactggg
gcctaggtgggctgagttcccctgcacca
```

40075801

Έλεγχος της καταλληλότητας και των συνθηκών του προτεινόμενου ζεύγους εκκινήτων με τη χρήση του <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>:

Detailed primer reports						
Primer pair 1						
	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTGTGTCTCCCAGCTTAGG	20	59.46	60.00	4.00	2.00
Reverse primer	CCACCAGACTCACAGCCTCT	20	61.19	60.00	3.00	3.00
Products on target templates						
>NC_000017.11 Homo sapiens chromosome 17, GRCh38, p12 Primary Assembly						
product length = 190						
Features associated with this product:						
<a href="#">thyroid hormone receptor alpha isoform 2</a>						
<a href="#">thyroid hormone receptor alpha isoform 2</a>						
Forward primer	1 CCTGTGTCTCCCAGCTTAGG	20				
Template	40075553	.....	40075572			
Reverse primer	1 CCACCAGACTCACAGCCTCT	20				
Template	40075742	.....	40075723			
product length = 2588						
Features associated with this product:						
<a href="#">rabankyrin-5 isoform 4</a>						
<a href="#">rabankyrin-5 isoform 1</a>						

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

## 2Γ. Αναζήτηση περιοριστικού ενζύμου για τον rs1991517

Αναζήτηση περιοριστικού ενζύμου για τον διαχωρισμό των δύο αλληλόμορφων με τη χρήση του <http://insilico.ehu.es/restriction/>:

<b>Normal (T)</b>
agagtctgtgcttaatgttggag
<b>Mutant (C)</b>
agagtctgtgcctaattggtggag

[Restriction Home](#)

### Restriction enzyme digest of DNA: differences between two sequences

[Tidy Up Sequences](#)

DNA Normal (T)  Endonucleases cleaving only this sequence  
 AGAGTCTGTG CTTAATGTTT GGAG

DNA Mutant (C)  Endonucleases cleaving only this sequence  
 AGAGTCTGTG CCTAATGTTT GGAG

Do not align  Align sequences (beta) and show best results

Minimum recognition size for each restriction enzyme 4

Type of restriction enzyme All

Commercial source All

Only restriction enzymes with known bases (no N,R,Y...)

Προτείνονται περιοριστικά ένζυμα που τέμνουν το φυσιολογικό ή το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο:

### Restriction enzyme digest of DNA: find different restriction patterns for two sequences

**Sequence 1. Normal (T)**  
 0 AGAGTCTGTG CTTAATGTTT GGAG  
 100

**Sequence 2. Mutant (C)**  
 0 AGAGTCTGTG CCTAATGTTT GGAG  
 100

**Alignment**

```

0 AGAGTCTGTG CTTAATGTTT GGAGG
  |||
AGAGTCTGTG CCTAATGTTT GGAGG
  
```

100

Restriction enzyme	Cleaves Seq 1 at	Cleaves Seq 2 at
<input checked="" type="radio"/> MseI,SaqAI,TruII,Tru9I TTA_A	12	

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

## 2Δ. Εύρεση θραυσμάτων που δημιουργούνται

Εισάγεται όλη η αλληλουχία του PCR προϊόντος για να ελεγχθούν τα τμήματα που δημιουργούνται:

### Restriction enzyme digest of DNA

with commercially available restriction enzymes  
Beta version: correct behaviour in being checked

Paste the sequence in the textbox as [plain text](#), [fasta](#) or [upload sequence](#).

```

CCTGTGTCTC CCAGCTTAGG CTTCTGTGGG TCTGGAAGAG TCTGTGCTTA ATGTTTGGAG 60
AAAGGCAGGA ATGCCAGTTC CCAGTCTCCT AAGACTGCAA CCCCTCCCCC ATCACCTTCC 120
CCTCCCCCAT GTCTATGCGC CACCTTGTGG CTATCTCTAG GACTACACTC AGAGGCTGTG 180
AGTCTGGTGG
            
```

[Tidy Up](#) [Reverse](#) [Complement](#)

Get list of restriction enzymes

Display of Results:  Table  Tabulated text

Show sequence(s) on top

Settings: Default [Change](#)

Select specific endonucleases: [Select](#)

Restriction enzyme	Cuts	Positions
<a href="#">AccB7I-BasI-PfiMI-Yan9II</a>	1	146
CCAN_NNN^NTGG		
<a href="#">AdeI-DraIII</a>	1	146
<a href="#">HpyCH4V</a>	1	92
TG^CA		
<a href="#">MseI-TruI,Tru9I</a>	1	48
T^TA_A		
<a href="#">MslI-RseI-SmiMI</a>	1	132
CAYNN^NNRTG		
<a href="#">SefI</a>	3	16 112 145
_ASST^		

Χωρίς τίτλο - Google Chrome

about:blank

Enzyme: MseI,TruI,Tru9I  
Recognition pattern: T^TA\_A

```

C C T G T G T C T C C C A G C T T A G G C T T C T G T G G G T C T G G A A G A G 40
T C T G T G C T T A A T G T T T G G A G A A A G G C A G G A A T G C C A G T T C 80
C C A G T C T C C T A A G A C T G C A A C C C C T C C C C A T C A C C T T C C 120
C C T C C C C A T G T C A T G C G C C A C C T T G T G C T A T C T C T A G 160
G A C T A C A C T C A G A G G C T G T G A G T C T G G T G G
            
```

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Το περιοριστικό ένζυμο που επιλέγεται για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού rs939348 είναι το RspRS II (Mse I). Το περιοριστικό αυτό ένζυμο τέμνει σε ένα σημείο το PCR προϊόν.

Τα θραύσματα που δημιουργούνται σε κάθε περίπτωση είναι:

Συγκεντρωτικά	
<b>PCR product</b>	190 bp
c.[=];[=]	48 bp + 142 bp
c.[544+1059 T>C];[=]	165 bp + 30 bp +190 bp
c.[544+1059 T>C];[544+1059 T>C]	190 bp

```

CCTGTGTCTC CCAGCTTAGG CTICTGTGGG TCTGGAAGAG TCTGT
GC T
(48 bp)

TA ATGTTTGGAG AAAGGCAGGA ATGCCAGTTC CCAGTCTCCT AAG
ACTGCAA CCCCTCCCCC ATCACCTTCC CCTCCCCCAT GTCTATGC
GC CACCTTGTGG CTATCTCTAG GACTACACTC AGAGGCTGTG AGT
CTGGTGG
(142 bp)

```

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

### 3. rs1991517

#### 3Α. Γενικές πληροφορίες

Αλλαγή	c. 2337 G>C
Human genome	GRCh38
Gene	TSHR
Coordinates	Chr 14: 80,955,525-81,146,302
Transcript	TSHR-201 ENST00000298171.6
Αλλαγή σε επίπεδο πρωτεΐνης	Asp727Glu

#### 3Β. Αλληλουχία τμήματος προς ενίσχυση και έλεγχος καταλληλότητας του προτεινόμενου ζεύγους εκκινήτων

Ο πολυμορφισμός rs1991517 εντοπίζεται στο εξόνιο 10 το γονιδίου TSHR με κίτρινο επισημαίνονται οι θέσεις των εκκινήτων και με κόκκινο η θέση του πολυμορφισμού:

Exon-10	ENSE00001328054	81,142,940	81,146,302
81144020	CACTGTTAGCAACTCCAAAATCTTGCTGGTACTCTTCTATCCACTTAACTCCTGTGCCAA		81144079
81144080	CCATTCCTCTATGCTATTTTCACCAAGGCCTTCCAGAGGGATGTGTTCATCCTACTCAG		81144139
81144140	CAAGTTTGGCATCTGTAAACGCCAGGCTCAGGCATACCGGGGGCAGAGGGTTCCTCCAAA		81144199
81144200	GAACAGCACTGATATTGAGGTTCAAAAGGTTACCCACGAGATGAGGCAGGGTCTCCACAA		81144259
81144260	CATGGAAGATGTCTATGAACTGATTGAAAACCTCCATCTAACCCCAAAGAAGCAAGGCCA		81144319
81144320	AATCTCAGAAGAGTATATGCAAACGGTTTGTAA		

Έλεγχος της καταλληλότητας και των συνθηκών του προτεινόμενου ζεύγους εκκινήτων με τη χρήση του <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>:

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCATTCCTCTATGCTATTTTCAC	23	55.18	39.13	3.00	0.00
Reverse primer	CCGTTTGCATATACTCTCTG	21	54.50	42.86	4.00	1.00
Products on target templates						
>NC_000014.9 Homo sapiens chromosome 14, GRCh38.p7 Primary Assembly						
product length = 265						
Features associated with this product:						
<a href="#">thyrotropin receptor isoform XI</a>						
<a href="#">thyrotropin receptor isoform 1 precursor</a>						
Forward primer	1 CCATTCCTCTATGCTATTTTCAC 23					
Template	81144081 .....	81144103				
Reverse primer	1 CCGTTTGCATATACTCTCTG 21					
Template	81144345 .....	81144325				
>NC_000004.12 Homo sapiens chromosome 4, GRCh38.p7 Primary Assembly						
product length = 859						
Features flanking this product:						
<a href="#">30211 bp at 5' side: ras-related protein Rab-28 isoform X4</a>						
<a href="#">26774 bp at 3' side: homeobox protein Nkx-3.2</a>						
Forward primer	1 CCATTCCTCTATGCTATTTTCAC 23					
Template	13514360 .....	13514382				
Reverse primer	1 CCGTTTGCATATACTCTCTG 21					
Template	13515218 AT..A.....G.....T	13515198				
>NC_000011.10 Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p7 Primary Assembly						
product length = 886						

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

### 3Γ. Αναζήτηση περιοριστικού ενζύμου για τον rs1991517

Αναζήτηση περιοριστικού ενζύμου για τον διαχωρισμό των δύο αλληλόμορφων με τη χρήση του <http://insilico.ehu.es/restriction/>:

<b>Normal (G)</b>
AAAAGGTTACCCACGAGATGAGGCAGG
<b>Mutant (C)</b>
AAAAGGTTACCCACGACATGAGGCAGG

[Restriction Home](#)

### Restriction enzyme digest of DNA: differences between two sequences

[Tidy Up Sequences](#)

DNA (Normal (G))  Endonucleases cleaving only this sequence  
 AAAAGGTTAC CCACGAGATG AGGCAGG

DNA (Mutant (C))  Endonucleases cleaving only this sequence  
 AAAAGGTTAC CCACGACATG AGGCAGG

Do not align  Align sequences (beta) and show best results

[Get list of restriction enzymes](#)

Minimum recognition size for each restriction enzyme 4 ▾

Type of restriction enzyme All ▾

Commercial source All ▾

Only restriction enzymes with known bases (no N,R,Y...)

DNA sequences might be pasted as shown or just as a one line string (number, spaces and line feeds will be ignored)

Upload a reference SNP ID from NCBI (p.e.: rs1000000):  Go

Προτείνονται περιοριστικά ένζυμα που τέμνουν το φυσιολογικό ή το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο:

Sequence 1. Normal (G)  
 @ AAAAGGTTAC CCACGAGATG AGGCAGG  
 100

Sequence 2. Mutant (C)  
 @ AAAAGGTTAC CCACGACATG AGGCAGG  
 100

Alignment

```

@ AAAAGGTTAC CCACGAGATG AGGCAGG
||||||| ||||| || |||||
AAAAGGTTAC CCACGACATG AGGCAGG
  
```

100

Restriction enzyme	Cleaves Seq 1 at	Cleaves Seq 2 at
<input checked="" type="radio"/> BpuI C'ACGA_G	12	
<input checked="" type="radio"/> BssSI,Bst2BI C'ACGA_G or C'TCGT_G	12	
<input checked="" type="radio"/> CviAII,FaeI,Hin1II,Hsp92II,NlaIII _CATG'		20
<input checked="" type="radio"/> FaeI YA'TR		18
<input checked="" type="radio"/> FatI 'CATG_		16

Click  for vendors  
[Citing this tool](#)

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

### 3Δ. Εύρεση θραυσμάτων που δημιουργούνται

Εισάγεται η αλληλουχία του PCR προϊόντος για να ελεγχθούν τα τμήματα που δημιουργούνται:

#### Restriction enzyme digest of DNA

with commercially available restriction enzymes  
Beta version: correct behaviour in being checked

Paste the sequence in the textbox as **plain text**, [fasta](#) or [upload sequence](#).

CCATTCCTCT ATGCTATTTT CACCAAGGCC TTCCAGAGGG ATGTGTTTCT CCTACTCAGC 60  
 AAGTTTGGCA TCTGTAAACG CCAGGCTCAG GCATACCGGG GGCAGAGGGT TCCTCCAAAG 120  
 AACAGCACTG ATATTCAAGT TCAAAAGGTT ACCCAGGAGA TGAGGCAGGG TCTCCACAAC 180  
 ATGGAAGATG TCTATGAAC TATTGAAAAC TCCCATCTAA CCCCAAAGAA GCAAGGCCAA 240  
 ATCTCAGAAG AGTATATGCA AACGG

[Tidy Up](#) [Reverse](#) [Complement](#)

Get list of restriction enzymes

Display of Results:  Table  Tabulated text

Show sequence(s) on top

Settings: Default [Change](#)

Select specific endonucleases: [Select](#)

Restriction enzyme	Cuts	Positions
<a href="#">AatI</a> , <a href="#">Eco147I</a> , <a href="#">PceI</a> , <a href="#">SseBI</a> , <a href="#">StuI</a> AGG^CCT	1	28
<a href="#">AccB7I</a> , <a href="#">BsaI</a> , <a href="#">PfiMI</a> , <a href="#">Van91I</a> CCAN_NNN^NTGG	1	180
<a href="#">AfiI</a> , <a href="#">Bse4I</a> , <a href="#">BseLI</a> , <a href="#">BsiYI</a> , <a href="#">BsiI</a> CCNN_NNN^NNGG	3	25 87 180
<a href="#">AjiI</a> , <a href="#">EcoRII</a> , <a href="#">Psp6I</a> , <a href="#">PspGI</a> ^CCHGG_	1	80
<a href="#">AsuC2I</a> , <a href="#">BcnI</a> , <a href="#">BpuMI</a> , <a href="#">NciI</a> CC^S_GG	1	97
<a href="#">BauI</a> C^ACGA_G^	1	154

Χωρίς τίτλο - Google Chrome

about:blank

Enzyme: **BauI**  
Recognition pattern: C^ACGA\_G^

C C A T T C C T C T	A T G C T A T T T T	C A C C A A G G C C	T T C C A G A G G G	40
A T G T G T T C A T	C C T A C T C A G C	A A G T T T G G C A	T C T G T A A A C G	80
C C A G G C T C A G	G C A T A C C G G G	G G C A G A G G G T	T C C T C C A A A G	120
A A C A G C A C T G	A T A T T C A G G T	T C A A A A G G T T	A C C C / A C G A G A	160
T G A G G C A G G G	T C T C C A C A A C	A T G G A A G A T G	T C T A T G A A C T	200
G A T T G A A A A C	T C C C A T C T A A	C C C C A A A G A A	G C A A G G C C A A	240
A T C T C A G A A G	A G T A T A T G C A	A A C G G		

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

Το περιοριστικό ένζυμο που επιλέγεται για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού rs1991517 είναι το BvuI. Το περιοριστικό αυτό ένζυμο τέμνει σε δυο σημεία το PCR προϊόν. Τα θραύσματα που δημιουργούνται σε κάθε περίπτωση είναι:

Συγκεντρωτικά	
<b>PCR product</b>	265 bp
c.[=];[=]	154 bp + 11 bp
c.[2337 G>C];[=]	154 bp + 11 bp + 265 bp
c.[2337 G>C];[2337 G>C ]	265 bp

```

CCATTCCTCT ATGCTATTTT CACCAAGGCC TTCAGAGGG
ATGTGTTCAT CCTACTCAGC AAGTITGGCA TCTGTAAACG
CCAGGCTCAG GCATACCGGG GGCAGAGGGT TCCTCCAAAG
AACAGCACTG ATATTCAGGT TCAAAGGTT ACCC
(154 bp)

ACGA GA TGAGGCAGGG TCTCCACAAC ATGGAAGATG TCTAT
GAACT GATTGAAAAC TCCCATCTAA CCCCAAAGAA GCAAGG
CCAA ATCTCAGAAG AGTATATGCA AACGG
(111 bp)

```



Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Έγγραφο συναίνεση που απαιτούνταν για τη συλλογή των δειγμάτων DNA ασθενών που παρακολουθούνται από το ΙΥΠ, με σκοπό τη δημιουργία Τράπεζας Δειγμάτων DNA των ασθενών με ΣΥ. Η παρούσα έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Βιοηθικής.

Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού  
Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία»  
Παλαδιαμαντοπούλου και Θηβών 1  
11527 Αθήνα

Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών  
Νοσοκομείο Παίδων "Η Αγία Σοφία"  
Θηβών και Λεβαδιάς  
11527 Αθήνα

Κωδικός Ερευνητικού Πρωτοκόλου: E.2.25

### Έγγραφο Συναίνεση Ασθενών

Α/Α:

Ημερομηνία:

Τηλ. Επικοινωνίας:

Όνοματεπώνυμο ασθενή/ ασθενών:

Ο/Η υπογεγραμμένος/η .....

έλαβα γνώση της αναγκαιότητας αναζήτησης διαταραχών του DNA στον εαυτό μου ή/και στο παιδί μου, που πιθανώς σχετίζονται με την πάθησή του. Δέχομαι να πραγματοποιηθεί απομόνωση του γενωμικού DNA από ολικό αίμα χωρίς δική μου οικονομική επιβάρυνση με στόχο την αναζήτηση του γενετικού αιτίου της πάθησης. Η αναζήτηση αυτή ενδεχομένως θα βοηθήσει στην γενετική συμβουλευτική.

Το οποιοδήποτε σχετικό αποτέλεσμα επιθυμώ να μου γνωστοποιηθεί. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιστημονική εργασία ανωνύμως αλλά δεν επιτρέπεται να γνωστοποιηθεί σε οποιονδήποτε άλλο χωρίς την έγκριση τη δική μου ή του πάσχοντος. Τα στοιχεία θα καταγράφονται κωδικοποιημένα και θα ληφθεί μέριμνα για την διατήρηση της ανωνυμίας και του απορρήτου καθ' όλη την διάρκεια της επεξεργασίας, ανακοίνωσης και δημοσίευσης των αποτελεσμάτων.

Όνοματεπώνυμο ασθενή ή κηδεμόνα

Όνοματεπώνυμο ερευνητή

Υπογραφή

Υπογραφή

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρουσιάστηκαν στο 3rd Symposium in Clinical Genetics & Genomics που πραγματοποιήθηκε στην Αθήνα, από 31 Μαΐου ως 1 Ιουνίου 2019 (Αναρτημένη Ανακοίνωση)

Organised by:  
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ  
HELLENIC SOCIETY OF MEDICAL GENETICS

National and Kapodistrian  
University of Athens  
UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE  
DEPARTMENT OF MEDICAL GENETICS

Medical Genetics Department  
Choremio Research Laboratory

Erasmus+

“Shaping the future  
of Clinical Genetics  
through  
Innovative  
Technologies”

 **3<sup>rd</sup>**  
**SYMPOSIUM**  
in Clinical Genetics  
& Genomics  
with international participation

19th Educational Seminar in Genetics

**31 May & 1 June 2019**  
Aegli Zappiou | Athens



## Study of the associations between polymorphisms in genes related to the Thyroid hormone metabolic pathways and clinical outcome in hypothyroid children

Gkika A<sup>1</sup>, Platis D<sup>1</sup>, Girginoudis P<sup>1</sup>, Voutetakis A<sup>1,2</sup>, Iliadi A<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Newborn Screening, Institute of Child Health, <sup>2</sup> Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, <sup>1st</sup> Department of Pediatrics, "Aghia Sophia" Children's Hospital, Athens University School of Medicine



**Background knowledge:** Congenital hypothyroidism (CH) is the most frequently encountered Congenital Endocrinopathy, with prevalence 1:1500-3000 births, and may lead to mental subnormality if not diagnosed and treated promptly.

Implementation of neonatal screening programs for Congenital Hypothyroidism (CH) has reduced related nosologies and has eradicated CH-associated mental impairment.

The Hellenic Newborn Screening Program was initiated in 1980 and is carried out by Institute of Child Health (ICH) that receives and tests the Guthrie cards from all the maternity hospitals in Greece. More than 3,700,000 neonates have been screened over the last 35 years.

ICH in collaboration with the Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism of the First Department of Pediatrics of the National and Kapodistrian University of Athens are responsible for the treatment initiation and the long-term clinical and hormonal follow-up of these patients.

**Objective and hypothesis:** To investigate if SNP's found in genes associated with Thyroid hormones metabolic pathways can be correlated with some clinical features of CH such as L-T4 replacement therapy response.

**Patients:** Laboratory, clinical and ultrasonographic data were recorded from the medical records of children diagnosed with CH by the Greek neonatal CH screening program.

**Patients were selected according to the following criteria:** age (>3 years old), natural conception, gestational age (>37 weeks), treatment initiation (<180 days from birth), monocytic pregnancy, non- syndromic, non- low birth-weight with a variety in LT-4 substitution therapy.

**175 CH patients were divided to 4 subgroups according to their clinical features:**

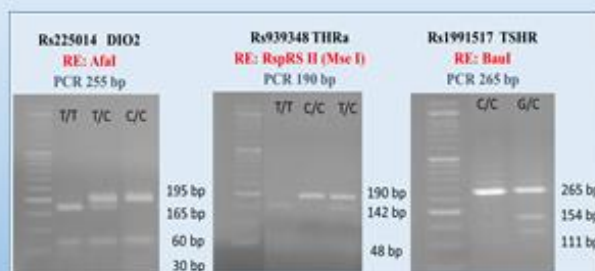
- ▶ **Dysgenesis (N=54):** absent, underdeveloped or ectopic thyroid gland.
- ▶ **Dyshormonogenesis (N=91)** defects in proteins involved in all steps of TH biosynthesis. Sub-divided to Low dose (<3 µg/kg/d) (N=55) and High dose (>3 µg/kg/d) (N=36)
- ▶ **Transient (N=30):** patients who stop their treatment after the age of 3

**Method:** The method consists of four steps:

- genomic isolation from blood sample
- a PCR amplification
- restriction enzyme digestion and
- gel electrophoresis (RE-PCR).

Optimization studies were carried out in PCR and Digestion assay in order to achieve the best discrimination between the three genotypes (homozygous normal, homozygous mutant and heterozygous).

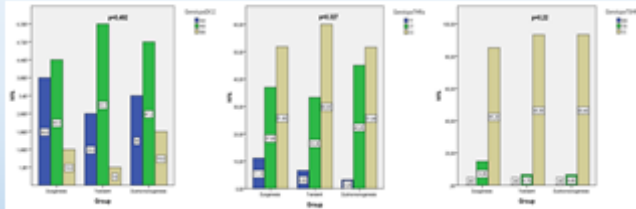
**Statistical analysis** was performed using SPSS (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Version 17.0). All comparisons between the subgroups were performed using ANOVA while categorical data were analyzed with the use of the  $\chi^2$  and Fisher exact test as appropriate. p values <0,05 were considered statistically significant.



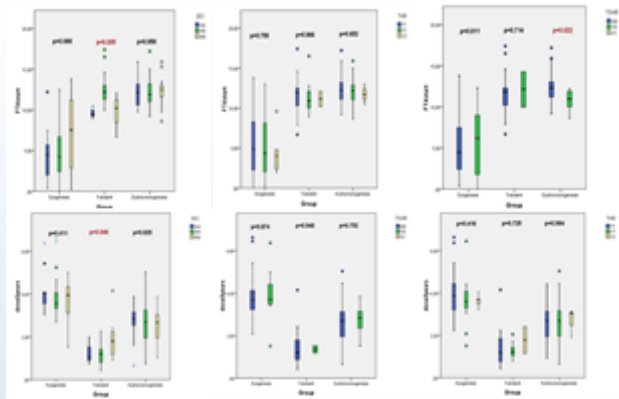
Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

**Results:** No statistical significant difference found between subgroups for the three genotypes.

- ▶ **THRA:** CC genotype proportion in Dysgenesis group was twice the Transient and four times more than Dyshomogenogenesis group.
- ▶ **TSHR:** C/G allele genotype proportion in Dysgenesis group was twice the Transient and Dysomogenogenesis group.
- ▶ **DIO2:** smaller differences observed between groups



Birth-weight, gestational age, TSH and FT4 before LT-4 substitution, Guthrie TSH, dose at 1 and 3 years and BMI at 3 and 5 years of different genotypes compared between groups. FT4 and dose was found to correlate to some genotypes but the affect was different between the groups.



**Discussion:** rs225014 (DIO2) appears to have an effect on the L-T4 dose on CH patients with Transient CH and FT4 levels on while rs1991517 (TSHR) appears to effect FT4 levels on CH patients with dyshomogenogenesis. None of the examined SNPs correlated with any other clinical parameters.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Moore KD, Agur A. ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ. 2nd ed ed. ΚΥΠΡΟΣ: Π.Χ.ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ; 2013.
2. Καμμάς Α. Μαθήματα Ανατομικής. 2nd ed ed: ΒΗΤΑ; 2010.
3. Netter FH. Atlas of Human Anatomy. Saint Louis: Elsevier Health Sciences; 2015.
4. Mescher A. Junqueira's Βασική Ιστολογία. Κύπρος Π.Χ.ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ; 2015.
5. Kierszenbaum A, Tres L. Ιστολογία με Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας. Κύπρος: Π.Χ.ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ; 2013.
6. Goodman HM. Basic medical endocrinology. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2009.
7. <http://www.thyro.gr/tieinaiothyro.html>.
8. Sperling M. Pediatric endocrinology. 2014.
9. Szinnai G. Clinical genetics of congenital hypothyroidism. Endocrine development. 2014;26:60-78.
10. Jameson JL, DeGroot LJ, De Kretser DM, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, et al. Endocrinology : adult & pediatric. Vol. 1 Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2016.
11. <https://www.researchgate.net/>. [
12. Gardner. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology (9th ed.): McGraw-Hill; 2011.
13. Marshall W BS. Κλινική Χημεία. 3rd ed. Κύπρος: Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ; 2011.
14. Jameson JL. Harrison's endocrinology 2017.
15. [www.inkling.com](http://www.inkling.com).
16. Mulrone S, Myers A. Βασικές Αρχές Φυσιολογίας Του Ανθρώπου: Π.Χ.ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ; 2010.
17. Molina PE. Endocrine physiology 2018.
18. <http://thyroidanatomy.blogspot.gr>. [
19. Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg H. Williams Textbook of Endocrinology : Expert Consult. London: Elsevier Health Sciences; 2011.
20. Marshall W, Bangert S. Κλινική Χημεία. 3rd ed. ed. Κύπρος: Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ; 2011.
21. Brent GA. Thyroid function testing. [Place of publication not identified]: Springer; 2012.
22. Χανιώτης Φ, Χανιώτης Δ. Φυσιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας ed 2009.
23. Βενετίκου Μ, Ιατράκης Γ. Εγχειρίδιο Παθολογίας. 1st ed. ed. Αθήνα: Εκδόσεις Ζεβελεκάκη; 2015.
24. Rastogi MV, LaFranchi SH. Congenital hypothyroidism. Orphanet journal of rare diseases. 2010;5:17.
25. Alm J, Hagenfeldt L, Larsson A, Lundberg K. Incidence of congenital hypothyroidism: retrospective study of neonatal laboratory screening versus clinical symptoms as indicators leading to diagnosis. British medical journal (Clinical research ed). 1984;289(6453):1171-5.
26. Ford G, LaFranchi SH. Screening for congenital hypothyroidism: a worldwide view of strategies. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2014;28(2):175-87.
27. Roberts HE, Moore CA, Fernhoff PM, Brown AL, Khoury MJ. Population study of congenital hypothyroidism and associated birth defects, Atlanta, 1979-1992. American journal of medical genetics. 1997;71(1):29-32.
28. Maciel LMZ, Kimura ET, Nogueira CR, Mazeto GMFS, Magalhães PKR, Nascimento ML, et al. Hipotireoidismo congênito: recomendações do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. 2013;57:184-92.

29. Persani L. Clinical review: Central hypothyroidism: pathogenic, diagnostic, and therapeutic challenges. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):3068-78.
30. Brown RS. Congenital Hypothyroidism. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
31. Petryk A, Graf D, Marcucio R. Holoprosencephaly: signaling interactions between the brain and the face, the environment and the genes, and the phenotypic variability in animal models and humans. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology.* 2015;4(1):17-32.
32. Shabana W, Delange F, Freson M, Osteaux M, De Schepper J. Prevalence of thyroid hemiagenesis: ultrasound screening in normal children. *European journal of pediatrics.* 2000;159(6):456-8.
33. Polak M, Sura-Trueba S, Chauty A, Szinnai G, Carre A, Castanet M. Molecular mechanisms of thyroid dysgenesis. *Hormone research.* 2004;62 Suppl 3:14-21.
34. Leger J, Olivieri A, Donaldson M, Torresani T, Krude H, van Vliet G, et al. European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2014;99(2):363-84.
35. Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, et al. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nature genetics.* 1998;19(1):83-6.
36. Krude H, Schutz B, Biebermann H, von Moers A, Schnabel D, Neitzel H, et al. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *The Journal of clinical investigation.* 2002;109(4):475-80.
37. 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. *Nature genetics.* 1998;19(4):399-401.
38. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L, Salvatore D, et al. Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2006;91(4):1428-33.
39. Ladsous M, Vlaeminck-Guillem V, Dumur V, Vincent C, Dubrulle F, Dhaenens CM, et al. Analysis of the thyroid phenotype in 42 patients with Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of the vestibular aqueduct. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2014;24(4):639-48.
40. Vulsma T, Gons MH, de Vijlder JJ. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *The New England journal of medicine.* 1989;321(1):13-6.
41. Gest H. The remarkable vision of Robert Hooke (1635-1703): first observer of the microbial world. *Perspectives in biology and medicine.* 2005;48(2):266-72.
42. Gest H. Homage to Robert Hooke (1635-1703): new insights from the recently discovered Hooke Folio. *Perspectives in biology and medicine.* 2009;52(3):392-9.
43. Ribatti D. An historical note on the cell theory. *Experimental cell research.* 2018;364(1):1-4.
44. van Dijk PJ, Ellis TH. The Full Breadth of Mendel's Genetics. *Genetics.* 2016;204(4):1327-36.
45. Weiling F. Historical study: Johann Gregor Mendel 1822-1884. *American journal of medical genetics.* 1991;40(1):1-25; discussion 6.
46. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental biology.* 2005;278(2):274-88.

47. Franzen R, Tois J. Purine and sugar chemistry on solid phase--100 years after the Emil Fischer's Chemistry Nobel Prize 1902. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2003;6(5):433-44.
48. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953;171(4356):737-8.
49. Lanier KA, Petrov AS, Williams LD. The Central Symbiosis of Molecular Biology: Molecules in Mutualism. *Journal of molecular evolution*. 2017;85(1-2):8-13.
50. Cheng KF, Lee JY. Assessing the joint effect of population stratification and sample selection in studies of gene-gene (environment) interactions. *BMC genetics*. 2012;13:5.
51. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
52. Liu H, Guo G. Opportunities and challenges of big data for the social sciences: The case of genomic data. *Social science research*. 2016;59:13-22.
53. Salzberg SL. Open questions: How many genes do we have? *BMC biology*. 2018;16(1):94.
54. Ellegren H, Galtier N. Determinants of genetic diversity. *Nature reviews Genetics*. 2016;17(7):422-33.
55. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC medical genomics*. 2015;8:37.
56. Chanock S. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Disease markers*. 2001;17(2):89-98.
57. Mullaney JM, Mills RE, Pittard WS, Devine SE. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Human molecular genetics*. 2010;19(R2):R131-6.
58. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(5):370-9.
59. Zhang W, Edwards A, Fan W, Deininger P, Zhang K. Alu distribution and mutation types of cancer genes. *BMC genomics*. 2011;12:157.
60. Lee JE, Cooper TA. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochemical Society transactions*. 2009;37(Pt 6):1281-6.
61. Payseur BA, Jing P, Haasl RJ. A genomic portrait of human microsatellite variation. *Molecular biology and evolution*. 2011;28(1):303-12.
62. Rueff J, Gaspar J, Kranendonk M. DNA polymorphisms as modulators of genotoxicity and cancer. *Biological chemistry*. 2002;383(6):923-32.
63. Deng N, Zhou H, Fan H, Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*. 2017;8(66):110635-49.
64. Sripichai O, Fucharoen S. Genetic polymorphisms and implications for human diseases. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2007;90(2):394-8.
65. Tomalik-Scharte D, Lazar A, Fuhr U, Kirchheiner J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *The pharmacogenomics journal*. 2008;8(1):4-15.
66. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*. 2006;27(2-3):95-125.
67. Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature protocols*. 2007;2(11):2857-64.
68. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic acids research*. 1989;17(7):2503-16.
69. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Current protocols in human genetics*. 2001;Chapter 9:Unit 9.8.

70. Celi FS, Canettieri G, Yarnall DP, Burns DK, Andreoli M, Shuldiner AR, et al. Genomic characterization of the coding region of the human type II 5'-deiodinase gene. *Molecular and cellular endocrinology*. 1998;141(1-2):49-52.
71. Bartha T, Kim SW, Salvatore D, Gereben B, Tu HM, Harney JW, et al. Characterization of the 5'-Flanking and 5'-Untranslated Regions of the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Responsive Human Type 2 Iodothyronine Deiodinase Gene1. *Endocrinology*. 2000;141(1):229-37.
72. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Current opinion in cell biology*. 1997;9(2):240-6.
73. Sanyal S, Sandstrom DJ, Hoeffler CA, Ramaswami M. AP-1 functions upstream of CREB to control synaptic plasticity in *Drosophila*. *Nature*. 2002;416(6883):870-4.
74. Buettner C, Harney JW, Larsen PR. The 3'-untranslated region of human type 2 iodothyronine deiodinase mRNA contains a functional selenocysteine insertion sequence element. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(50):33374-8.
75. Gereben B, Salvatore D. Pretranslational regulation of type 2 deiodinase. *Thyroid*. 2005;15(8):855-64.
76. Consortium TU. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*. 2018;47(D1):D506-D15.
77. Huang SA. Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in humans. *Thyroid*. 2005;15(8):875-81.
78. Brown DD. The role of deiodinases in amphibian metamorphosis. *Thyroid*. 2005;15(8):815-21.
79. Dentice M, Bandyopadhyay A, Gereben B, Callebaut I, Christoffolete MA, Kim BW, et al. The Hedgehog-inducible ubiquitin ligase subunit WSB-1 modulates thyroid hormone activation and PTHrP secretion in the developing growth plate. *Nature cell biology*. 2005;7(7):698-705.
80. Hernandez A, Martinez ME, Fiering S, Galton VA, St Germain D. Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(2):476-84.
81. Simonides WS, Mulcahey MA, Redout EM, Muller A, Zuidwijk MJ, Visser TJ, et al. Hypoxia-inducible factor induces local thyroid hormone inactivation during hypoxic-ischemic disease in rats. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(3):975-83.
82. Dentice M, Luongo C, Huang S, Ambrosio R, Elefante A, Mirebeau-Prunier D, et al. Sonic hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(36):14466-71.
83. Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(15):2457-78.
84. Curcio C, Baqui MM, Salvatore D, Rihn BH, Mohr S, Harney JW, et al. The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelioma cell line. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(32):30183-7.
85. Silva JE, Larsen PR. Pituitary nuclear 3,5,3'-triiodothyronine and thyrotropin secretion: an explanation for the effect of thyroxine. *Science (New York, NY)*. 1977;198(4317):617-20.
86. Bianco AC, Silva JE. Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. *The American journal of physiology*. 1988;255(4 Pt 1):E496-503.
87. de Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, et al. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(9):1379-85.



88. Werneck de Castro JP, Fonseca TL, Ueta CB, McAninch EA, Abdalla S, Wittmann G, et al. Differences in hypothalamic type 2 deiodinase ubiquitination explain localized sensitivity to thyroxine. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(2):769-81.
89. Al-azzam SI, Alkhateeb AM, Al-Azzeh O, Alzoubi KH, Khabour OF. The role of type II deiodinase polymorphisms in clinical management of hypothyroid patients treated with levothyroxine. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2013;121(5):300-5.
90. Guo TW, Zhang FC, Yang MS, Gao XC, Bian L, Duan SW, et al. Positive association of the DIO2 (deiodinase type 2) gene with mental retardation in the iodine-deficient areas of China. *J Med Genet*. 2004;41(8):585-90.
91. Panicker V, Saravanan P, Vaidya B, Evans J, Hattersley AT, Frayling TM, et al. Common variation in the DIO2 gene predicts baseline psychological well-being and response to combination thyroxine plus triiodothyronine therapy in hypothyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1623-9.
92. Grineva E, Babenko A, Vahrameeva N, Bogdanova M, Kostareva A, Popcova D, et al. Type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism impact on clinical course and myocardial remodeling in patients with Graves' disease. *Cell Cycle*. 2009;8(16):2565-9.
93. Gumieniak O, Perlstein TS, Williams JS, Hopkins PN, Brown NJ, Raby BA, et al. Ala92 type 2 deiodinase allele increases risk for the development of hypertension. *Hypertension*. 2007;49(3):461-6.
94. Medici M, Chaker L, Peeters RP. A Step Forward in Understanding the Relevance of Genetic Variation in Type 2 Deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(5):1775-8.
95. Mentuccia D, Proietti-Pannunzi L, Tanner K, Bacci V, Pollin TI, Poehlman ET, et al. Association between a novel variant of the human type 2 deiodinase gene Thr92Ala and insulin resistance: evidence of interaction with the Trp64Arg variant of the beta-3-adrenergic receptor. *Diabetes*. 2002;51(3):880-3.
96. Canani LH, Capp C, Dora JM, Meyer EL, Wagner MS, Harney JW, et al. The type 2 deiodinase A/G (Thr92Ala) polymorphism is associated with decreased enzyme velocity and increased insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(6):3472-8.
97. Dora JM, Machado WE, Rheinheimer J, Crispim D, Maia AL. Association of the type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism with type 2 diabetes: case-control study and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(3):427-34.
98. Estivalet AA, Leiria LB, Dora JM, Rheinheimer J, Boucas AP, Maia AL, et al. D2 Thr92Ala and PPARgamma2 Pro12Ala polymorphisms interact in the modulation of insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(4):825-32.
99. Zevenbergen C, Klootwijk W, Peeters RP, Medici M, de Rijke YB, Huisman SA, et al. Functional analysis of novel genetic variation in the thyroid hormone activating type 2 deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):E2429-36.
100. McAninch EA, Rajan KB, Evans DA, Jo S, Chaker L, Peeters RP, et al. A Common DIO2 Polymorphism and Alzheimer Disease Dementia in African and European Americans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(5):1818-26.
101. Peeters RP, van Toor H, Klootwijk W, de Rijke YB, Kuiper GG, Uitterlinden AG, et al. Polymorphisms in thyroid hormone pathway genes are associated with plasma TSH and iodothyronine levels in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(6):2880-8.
102. Torlontano M, Durante C, Torrente I, Crocetti U, Augello G, Ronga G, et al. Type 2 deiodinase polymorphism (threonine 92 alanine) predicts L-thyroxine dose to achieve target thyrotropin levels in thyroidectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(3):910-3.
103. Butler PW, Smith SM, Linderman JD, Brychta RJ, Alberobello AT, Dubaz OM, et al. The Thr92Ala 5' type 2 deiodinase gene polymorphism is associated with a delayed

triiodothyronine secretion in response to the thyrotropin-releasing hormone-stimulation test: a pharmacogenomic study. *Thyroid*. 2010;20(12):1407-12.

104. Castagna MG, Dentice M, Cantara S, Ambrosio R, Maino F, Porcelli T, et al. DIO2 Thr92Ala Reduces Deiodinase-2 Activity and Serum-T3 Levels in Thyroid-Deficient Patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(5):1623-30.

105. Flamant F, Baxter JD, Forrest D, Refetoff S, Samuels H, Scanlan TS, et al. International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. *Pharmacological reviews*. 2006;58(4):705-11.

106. Vattai A, Ziegelmuller B, Kost B, Kuhn C, Hofmann S, Bayer B, et al. The expression of thyroid hormone receptors (THR) is regulated by the progesterone receptor system in first trimester placental tissue and in BeWo cells in vitro. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2015;195:31-9.

107. Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular and cellular endocrinology*. 2003;213(1):1-11.

108. Baniahmad A. *Thyroid hormone receptors : methods and protocols*. 2002.

109. Baniahmad A, Kohne AC, Renkawitz R. A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *The EMBO journal*. 1992;11(3):1015-23.

110. Sasaki S, Lesoon-Wood LA, Dey A, Kuwata T, Weintraub BD, Humphrey G, et al. Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *The EMBO journal*. 1999;18(19):5389-98.

111. Lopez G, Schaufele F, Webb P, Holloway JM, Baxter JD, Kushner PJ. Positive and negative modulation of Jun action by thyroid hormone receptor at a unique AP1 site. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(5):3042-9.

112. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current opinion in genetics & development*. 1999;9(2):140-7.

113. Burke LJ, Baniahmad A. Co-repressors 2000. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000;14(13):1876-88.

114. Leng X, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ. Ligand-dependent conformational changes in thyroid hormone and retinoic acid receptors are potentially enhanced by heterodimerization with retinoic X receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1993;46(6):643-61.

115. Ortiga-Carvalho TM, Sidhaye AR, Wondisford FE. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(10):582-91.

116. Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*. 1995;378(6558):690-7.

117. Egea PF, Klaholz BP, Moras D. Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS letters*. 2000;476(1-2):62-7.

118. Baniahmad A, Leng X, Burris TP, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(1):76-86.

119. Bochukova E, Schoenmakers N, Agostini M, Schoenmakers E, Rajanayagam O, Keogh JM, et al. A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene. *The New England journal of medicine*. 2012;366(3):243-9.

120. van Mullem A, van Heerebeek R, Chrysis D, Visser E, Medici M, Andrikoula M, et al. Clinical phenotype and mutant TRalpha1. *The New England journal of medicine*. 2012;366(15):1451-3.

121. Tytki-Szymanska A, Acuna-Hidalgo R, Krajewska-Walasek M, Lecka-Ambroziak A, Steehouwer M, Gilissen C, et al. Thyroid hormone resistance syndrome due to mutations in the thyroid hormone receptor alpha gene (THRA). *J Med Genet.* 2015;52(5):312-6.
122. McCabe CJ, Gittoes NJ, Sheppard MC, Franklyn JA. Thyroid receptor alpha1 and alpha2 mutations in nonfunctioning pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(2):649-53.
123. Puzianowska-Kuznicka M, Krystyniak A, Madej A, Cheng SY, Nauman J. Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):1120-8.
124. Rebai M, Kallel I, Rebai A. Genetic features of thyroid hormone receptors. *Journal of genetics.* 2012;91(3):367-74.
125. Kripke DF, Nievergelt CM, Joo E, Shekhtman T, Kelsoe JR. Circadian polymorphisms associated with affective disorders. *Journal of circadian rhythms.* 2009;7:2.
126. Corneveaux JJ, Myers AJ, Allen AN, Pruzin JJ, Ramirez M, Engel A, et al. Association of CR1, CLU and PICALM with Alzheimer's disease in a cohort of clinically characterized and neuropathologically verified individuals. *Human molecular genetics.* 2010;19(16):3295-301.
127. Goumidi L, Flamant F, Lendon C, Galimberti D, Pasquier F, Scarpini E, et al. Study of thyroid hormone receptor alpha gene polymorphisms on Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging.* 2011;32(4):624-30.
128. Pastor S, Akdi A, Gonzalez ER, Castell J, Biarnes J, Marcos R, et al. Common genetic variants in pituitary-thyroid axis genes and the risk of differentiated thyroid cancer. *Endocrine connections.* 2012;1(2):68-77.
129. Goumidi L, Gauthier K, Legry V, Mayi TH, Houzet A, Cottel D, et al. Association between a thyroid hormone receptor-alpha gene polymorphism and blood pressure but not with coronary heart disease risk. *American journal of hypertension.* 2011;24(9):1027-34.
130. Al-Azzam SI, Alzoubi KH, Khabour O, Al-Azzeh O. The associations of polymorphisms of TSH receptor and thyroid hormone receptor genes with L-thyroxine treatment in hypothyroid patients. *Hormones (Athens, Greece).* 2014;13(3):389-97.
131. Satwika Sinha KK. Single Nucleotide Polymorphism of Thyroid Hormone Receptor a Gene can be a Risk of Atherogenic Dyslipidemia. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2018;12(9):BC01-BC4.
132. Libert F, Lefort A, Gerard C, Parmentier M, Perret J, Ludgate M, et al. Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for binding of autoantibodies. *Biochemical and biophysical research communications.* 1989;165(3):1250-5.
133. Gross B, Misrahi M, Sar S, Milgrom E. Composite structure of the human thyrotropin receptor gene. *Biochemical and biophysical research communications.* 1991;177(2):679-87.
134. Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P, Rapoport B. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochemical and biophysical research communications.* 1989;165(3):1184-90.
135. Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Sar S, Guiochon-Mantel A, Milgrom E. Cloning, sequencing and expression of human TSH receptor. *Biochemical and biophysical research communications.* 1990;166(1):394-403.
136. Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiological reviews.* 2002;82(2):473-502.
137. Van Durme J, Horn F, Costagliola S, Vriend G, Vassart G. GRIS: glycoprotein-hormone receptor information system. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md).* 2006;20(9):2247-55.

138. Russo D, Chazenbalk GD, Nagayama Y, Wadsworth HL, Seto P, Rapoport B. A new structural model for the thyrotropin (TSH) receptor, as determined by covalent cross-linking of TSH to the recombinant receptor in intact cells: evidence for a single polypeptide chain. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md). 1991;5(11):1607-12.
139. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev.* 1998;19(6):673-716.
140. Chazenbalk GD, Tanaka K, McLachlan SM, Rapoport B. On the functional importance of thyrotropin receptor intramolecular cleavage. *Endocrinology.* 1999;140(10):4516-20.
141. Tanaka K, Chazenbalk GD, McLachlan SM, Rapoport B. Thyrotropin receptor cleavage at site 1 involves two discontinuous segments at each end of the unique 50-amino acid insertion. *The Journal of biological chemistry.* 1999;274(4):2093-6.
142. Kajita Y, Rickards CR, Buckland PR, Howells RD, Rees Smith B. Analysis of thyrotropin receptors by photoaffinity labelling. Orientation of receptor subunits in the cell membrane. *The Biochemical journal.* 1985;227(2):413-20.
143. Loosfelt H, Pichon C, Jolivet A, Misrahi M, Caillou B, Jamous M, et al. Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1992;89(9):3765-9.
144. Misrahi M, Ghinea N, Sar S, Saunier B, Jolivet A, Loosfelt H, et al. Processing of the precursors of the human thyroid-stimulating hormone receptor in various eukaryotic cells (human thyrocytes, transfected L cells and baculovirus-infected insect cells). *European journal of biochemistry.* 1994;222(2):711-9.
145. Tanaka K, Chazenbalk GD, McLachlan SM, Rapoport B. Subunit structure of thyrotropin receptors expressed on the cell surface. *The Journal of biological chemistry.* 1999;274(48):33979-84.
146. Nagayama Y, Wadsworth HL, Chazenbalk GD, Russo D, Seto P, Rapoport B. Thyrotropin-luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor extracellular domain chimeras as probes for thyrotropin receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991;88(3):902-5.
147. Nagayama Y, Rapoport B. Role of the carboxyl-terminal half of the extracellular domain of the human thyrotropin receptor in signal transduction. *Endocrinology.* 1992;131(2):548-52.
148. Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiological reviews.* 1992;72(3):667-97.
149. Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev.* 1992;13(3):596-611.
150. Wonerow P, Neumann S, Gudermann T, Paschke R. Thyrotropin receptor mutations as a tool to understand thyrotropin receptor action. *Journal of molecular medicine* (Berlin, Germany). 2001;79(12):707-21.
151. Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature.* 1993;365(6447):649-51.
152. Führer D, Holzapfel HP, Wonerow P, Scherbaum WA, Paschke R. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene and not in the Gs alpha protein gene in 31 toxic thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1997;82(11):3885-91.
153. Tonacchera M, Agretti P, Chiovato L, Rosellini V, Ceccarini G, Perri A, et al. Activating thyrotropin receptor mutations are present in nonadenomatous hyperfunctioning nodules of toxic or autonomous multinodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(6):2270-4.

154. Duprez L, Parma J, Van Sande J, Allgeier A, Leclere J, Schwartz C, et al. Germline mutations in the thyrotropin receptor gene cause non-autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism. *Nat Genet.* 1994;7(3):396-401.
155. Van Sande J, Parma J, Tonacchera M, Swillens S, Dumont J, Vassart G. Somatic and germline mutations of the TSH receptor gene in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(9):2577-85.
156. Alberti L, Proverbio MC, Costagliola S, Romoli R, Boldrighini B, Vigone MC, et al. Germline mutations of TSH receptor gene as cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2549-55.
157. Heldin NE, Gustavsson B, Westermark K, Westermark B. A somatic point mutation in a putative ligand binding domain of the TSH receptor in a patient with autoimmune hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73(6):1374-6.
158. Bahn RS, Dutton CM, Heufelder AE, Sarkar G. A genomic point mutation in the extracellular domain of the thyrotropin receptor in patients with Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(2):256-60.
159. Simanainen J, Kinch A, Westermark K, Winsa B, Bengtsson M, Schuppert F, et al. Analysis of mutations in exon 1 of the human thyrotropin receptor gene: high frequency of the D36H and P52T polymorphic variants. *Thyroid.* 1999;9(1):7-11.
160. Kotsa KD, Watson PF, Weetman AP. No association between a thyrotropin receptor gene polymorphism and Graves' disease in the female population. *Thyroid.* 1997;7(1):31-3.
161. Karges B, Krause G, Homoki J, Debatin KM, de Roux N, Karges W. TSH receptor mutation V509A causes familial hyperthyroidism by release of interhelical constraints between transmembrane helices TMH3 and TMH5. *The Journal of endocrinology.* 2005;186(2):377-85.
162. Akcurin S, Turkkahraman D, Tysoe C, Ellard S, De Leener A, Vassart G, et al. A family with a novel TSH receptor activating germline mutation (p.Ala485Val). *European journal of pediatrics.* 2008;167(11):1231-7.
163. Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R. Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *The Journal of clinical investigation.* 2005;115(8):1972-83.
164. Farid NR, Kascur V, Balazs C. The human thyrotropin receptor is highly mutable: a review of gain-of-function mutations. *Eur J Endocrinol.* 2000;143(1):25-30.
165. Fuhrer D, Wonerow P, Willgerodt H, Paschke R. Identification of a new thyrotropin receptor germline mutation (Leu629Phe) in a family with neonatal onset of autosomal dominant nonautoimmune hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4234-8.
166. Holzapfel HP, Wonerow P, von Petrykowski W, Henschen M, Scherbaum WA, Paschke R. Sporadic congenital hyperthyroidism due to a spontaneous germline mutation in the thyrotropin receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(11):3879-84.
167. Kohn B, Grasberger H, Lam LL, Ferrara AM, Refetoff S. A somatic gain-of-function mutation in the thyrotropin receptor gene producing a toxic adenoma in an infant. *Thyroid.* 2009;19(2):187-91.
168. Kopp P, Muirhead S, Jourdain N, Gu WX, Jameson JL, Rodd C. Congenital hyperthyroidism caused by a solitary toxic adenoma harboring a novel somatic mutation (serine281-->isoleucine) in the extracellular domain of the thyrotropin receptor. *The Journal of clinical investigation.* 1997;100(6):1634-9.
169. Grasberger H, Van Sande J, Hag-Dahood Mahameed A, Tenenbaum-Rakover Y, Refetoff S. A familial thyrotropin (TSH) receptor mutation provides in vivo evidence that the inositol phosphates/Ca<sup>2+</sup> cascade mediates TSH action on thyroid hormone synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(7):2816-20.

170. Tiosano D, Pannain S, Vassart G, Parma J, Gershoni-Baruch R, Mandel H, et al. The hypothyroidism in an inbred kindred with congenital thyroid hormone and glucocorticoid deficiency is due to a mutation producing a truncated thyrotropin receptor. *Thyroid*. 1999;9(9):887-94.
171. Gabriel EM, Bergert ER, Grant CS, van Heerden JA, Thompson GB, Morris JC. Germline polymorphism of codon 727 of human thyroid-stimulating hormone receptor is associated with toxic multinodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(9):3328-35.
172. Tug E, Sengul N, Aydin H, Yilmaz E. The Impact of the D727E Polymorphism has no Significant Role in Multi Nodular Goiter. *Balkan journal of medical genetics : BJMG*. 2012;15(2):67-72.
173. Sriprapradang C, German A, Dumitrescu AM, Refetoff S. Consecutive mutational events in a TSHR allele of Arab families with resistance to thyroid stimulating hormone. *Thyroid*. 2012;22(3):252-7.
174. Sigurdson AJ, Land CE, Bhatti P, Pineda M, Brenner A, Carr Z, et al. Thyroid nodules, polymorphic variants in DNA repair and RET-related genes, and interaction with ionizing radiation exposure from nuclear tests in Kazakhstan. *Radiation research*. 2009;171(1):77-88.
175. Graves CA, Jones A, Reynolds J, Stuart J, Pirisi L, Botrous P, et al. Neuroendocrine Merkel cell carcinoma is associated with mutations in key DNA repair, epigenetic and apoptosis pathways: a case-based study using targeted massively parallel sequencing. *Neuroendocrinology*. 2015;101(2):112-9.
176. Xiong H, Wu M, Yi H, Wang X, Wang Q, Nadirshina S, et al. Genetic associations of the thyroid stimulating hormone receptor gene with Graves diseases and Graves ophthalmopathy: A meta-analysis. *Sci Rep*. 2016;6:30356.
177. Alves EA, Cruz CM, Pimentel CP, Ribeiro RC, Santos AK, Caldato MC, et al. High frequency of D727E polymorphisms in exon 10 of the TSHR gene in Brazilian patients with congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2010;23(12):1321-8.
178. Singh N, Singh U, Saxena A, Gupta P. An association study of genetic polymorphism of TSHR D727E with hypothyroidism: A study from central India 2017. 2455-6548 p.
179. Bayram B, Sonmez R, Bozari S, Onlu H, Turkoglu Z, Mutlu FS. The association between development and progression of multinodular goiter and thyroid-stimulating hormone receptor gene D727E and P52T polymorphisms. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013;17(2):109-14.
180. Pagano ΜαΓμσεΟΔ. Αρχές της Βιοστατιστικής: Εκδόσεις Έλλην; 2002.
181. Δ. Τριχόπουλος ΑΤκΚΚ. Βιοστατιστική: Επιστημονικές εκδόσεις Μαρίας Παρισιάνου 2002.
182. Louwerens M, Appelhof BC, Verloop H, Medici M, Peeters RP, Visser TJ, et al. Fatigue and fatigue-related symptoms in patients treated for different causes of hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2012;167(6):809-15.
183. Arnaud-Lopez L, Usala G, Ceresini G, Mitchell BD, Pilia MG, Piras MG, et al. Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *American journal of human genetics*. 2008;82(6):1270-80.
184. Dechairo BM, Zabaneh D, Collins J, Brand O, Dawson GJ, Green AP, et al. Association of the TSHR gene with Graves' disease: the first disease specific locus. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(11):1223-30.
185. Cerbone M, Agretti P, De Marco G, Improda N, Pignata C, Santamaria F, et al. Non-autoimmune subclinical hypothyroidism due to a mutation in TSH receptor: report on two brothers. *Italian journal of pediatrics*. 2013;39:5.

Μελέτη συσχέτισης μεταξύ πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια των θυρεοειδικών ορμονών και την κλινική έκβαση σε υποθυρεοειδικά παιδιά

186. Heemstra KA, Hoftijzer HC, van der Deure WM, Peeters RP, Fliers E, Appelhof BC, et al. Thr92Ala polymorphism in the type 2 deiodinase is not associated with T4 dose in athyroid patients or patients with Hashimoto thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(2):279-83.

187. Arici M, Oztas E, Yanar F, Aksakal N, Ozcinar B, Ozhan G. Association between genetic polymorphism and levothyroxine bioavailability in hypothyroid patients. *Endocr J*. 2018;65(3):317-23.

188. van der Deure WM, Uitterlinden AG, Hofman A, Rivadeneira F, Pols HA, Peeters RP, et al. Effects of serum TSH and FT4 levels and the TSHR-Asp727Glu polymorphism on bone: the Rotterdam Study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68(2):175-81.