



T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**OTOİMMÜN OLMAYAN PRİMER KONJENİTAL
HİPOTİROİDİZMLİ TÜRK ÇOCUKLARINDA TSHR GENİ
İNAKTİVATÖR MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. ASLIHAN KİRAZ

KAYSERİ 2010



T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**OTOİMMÜN OLMAYAN PRİMER KONJENİTAL
HİPOTROİDİZMLİ TÜRK ÇOCUKLARINDA TSHR GENİ
İNAKTİVATÖR MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. ASLIHAN KİRAZ

DANIŞMAN
PROF. DR. YUSUF ÖZKUL

Bu tez, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSU-10-2904 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYSERİ 2010

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması süresince desteğini benden esirgemeyen danışmanım sayın

Prof. Dr. Yusuf Özkul'a,

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı başkanımız sayın **Prof. Dr. Munis**

Dündar'a,

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi **Yrd. Doç. Dr. Çetin Saatçi'ye**

Klinik verilerin sağlanmasında özveriyle çalışan sayın **Prof. Dr. Selim**

Kurtoğlu ve Dr. Leyla Akın'a

Hastalara ulaşmamda ve gerekli olan materyalin toplanmasında yardımcı

olan pediatri endokrin sekreteri **Ayşegül Kılıç'a**

Eğitim amaçlı laboratuvarlarını bana açan, bilgi ve tecrübelerinden

yararlandığım Birmingham Üniversitesi (School of Clinical and

Experimental Medicine within the: College of Medicine and Dental Sciences), Tıbbi ve Moleküler Genetik Departmanı Başkanı **Prof. Eamonn**

R. Maher ve **Doç. Dr. Hakan Cangül'e,**

Bölümümüzde maddi, manevi desteklerini benden esirgemeyen tüm **çalışma arkadaşlarıma,**

Her zaman yanımda olan canım **aileme,**

Ve tüm bu süreçte güç kaynağım, sevgili eşim **Fatih Kiraz** ile kızım **Ayşenaz'**ıma teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Primer konjenital hipotiroidizm (KH) kalıcı hipotiroidinin en sık karşılaşılan nedenidir ve tiroid bezi düzeyinde gözlenen anormallikler neticesinde oluşur. Prevelansı ırk ve etnik yapıya göre değişmekle birlikte dünya genelinde 3500-4000 canlı doğumda birdir. Ülkemizdeki insidansı daha yüksektir. Konjenital hipotiroidizmin çoğul etiyolojisi mevcuttur. Günümüzde çeşitli aday genlerin bu süreçte sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Primer KH'e neden olan genler başlıca iki ana grupta incelenebilir. Bunlar;

1-Tiroid disgenezisine neden olan genler

- Sendromik Olmayan KH'e neden olan genler (TSH reseptör -TSHR- geni)
- Sendromik KH'e neden olan genler (TITF1, TITF2, PAX8 ve Gsα genleri)

2-Dishormonogenezise neden olan genler

- Tiroid peroksidaz (TPO) geni
- Tiroglobulin (Tg) geni
- Sodyum-iyot simporter (NIS) geni
- Pendrin (PDS) geni
- Tiroid oksidaz 2 (THOX-2) geni

Tiroid stimüle edici hormon (TSH), belirli fizyolojik şartlar altında tiroid hormon sentezinin uyarılması, salınımı ve büyüme gibi tiroid bezinin işlevlerinin kontrolünde rol oynayan ana hormondur. TSH bu etkilerini tiroid foliküler hücrelerinin bazolateral zarında yerleşmiş olan G proteinine bağlı reseptör (GPCR) süper ailesinin bir üyesi olan TSH reseptörüne (TSHR) bağlanarak gerçekleştirir. TSHR'leri de tiroid bezi organogenezinin geç aşamalarında rol oynamaktadır. TSHR geninde saptanan mutasyonların tiroid bezi gelişiminde normal pozisyon ve yapıdan ciddi hipoplaziye kadar değişen derecelerde klinik etki gösterdiği saptanmıştır. Dolayısıyla TSHR genindeki mutasyonlar konjenital hipotiroidizm oluşumunda rol oynamaktadır.

Yapılan bu çalışmanın temel amacı; otoimmün olmayan primer konjenital hipotiroidizimli Türk çocuklarında TSHR geninde gözlenen inaktivatör mutasyonlar ve yeni mutasyonların belirlenmesidir.

Çalışma otoimmün olmayan primer konjenital hipotiroidizimli 56 hasta [subklinik hipotiroidili hastalar -n:16- ile tiroid bezi agenezik veya hipoplazik olan hastalar -n:40-] ve 75 sağlıklı çocuğun DNA örnekleri ile yapıldı. TSHR geninin 10. ekzon üç parça halinde direkt sekanslama metodu ile tarandı. Taranan 56 hastanın 3'ünde mutasyon saptandı. Bunlardan bir tanesi daha önce yerleşim olarak tanımlanmış ancak ifadelenen aminoasit dizisi farklı olan homozigot bir mutasyon iken (R531Q, Homozigot), diğerleri daha önceden tanımlanmış heterozigot mutasyonlardı (R450H, Heterozigot). Bunlardan başka 8 hastada daha önceden tanımlanmış D727E (GAC>GAG) heterozigot polimorfizmi, 1 hastada da A459A (GCG>GCA) heterozigot polimorfizmi saptandı.

Sonuç; TSHR geninin sadece 10. ekzonunun taranması, diğer ekzonların taranamaması nedeni ile gözlenen mutasyonlar beklenen mutasyonlardan daha az olabilir. Bundan dolayı da geniş ve kapsamlı projelerle desteklenmesi gerekmektedir. Bu sayede elde edilebilecek olan veriler, sonraki dönemlerde tedavi amacıyla hedefe yönelik moleküler temelli ilaçların da içinde yer aldığı yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine, bu protokollerin klinikte kullanımlarına ve olası muhtemel gen tedavisine ışık tutacaktır. İleriki nesillere verilebilecek doğum öncesi ve doğum sonrası genetik danışmanlıkta da bu veriler önem arz edecektir.

Anahtar Kelimeler: Konjenital hipotiroidizm, TSHR mutasyonu, sekans analizi

ABSTRACT

Primary congenital hypothyroidism (CH) is the most common cause of the permanent hypothyroidism. Prevalence varies by race and ethnic structure in the entire world with one in 3500-4000 live births. But the incidence is higher in our country. There are multiple etiology of congenital hypothyroidism, defects in several candidate genes currently thought to be responsible. In primary congenital hypothyroidism, the abnormality is observed in the level of thyroid gland.

Primary congenital hypothyroidism causing genes can be analysed in two main groups. These are;

- 1- The genes that are causing thyroid dysgenesis,
 - Non syndromic CH genes (TSHR)
 - Syndromic CH genes (TITF1, TITF2, PAX8 and Gs α)
- 2- The genes that are causing dyshormonogenesis
 - TPO gene

- Tg gene
- NIS gene
- Pendrin (PDS) gene
- THOX-2 gene

Under certain physiological conditions thyroid stimulating hormone plays a role in the control of main functions of the thyroid gland such as stimulation of the thyroid hormone synthesis, secretion and growth. TSH acts via a basolateral membrane receptor (TSHR) belonging to the large family of G-protein-coupled receptors (GPCRs). TSHR also play a role in later stages of the thyroid gland organogenesis. Depending upon the TSHR mutation types, the presentation of the disease may vary considerably, ranging from severe congenital hypothyroidism with hypoplasia to only mild elevations of TSH in the presence of normal positioned gland without signs and symptoms of hypothyroidism. The main purpose of this study is to determine the relationship between primary congenital hypothyroidism and inactivator TSHR mutations in Turkish children with the molecular techniques

We enrolled 56 patients with primary congenital hypothyroidism (subclinical hypothyroid: 16, Thyroid gland agenesis/ hypoplasia: 40) and 75 control cases. These subjects were tested for TSHR exon 10 mutations by PCR-based direct sequencing. We found 2 mutations and 2 polymorphisms. Observed mutations included one previously characterized mutation (R450H) and one uncharacterized mutation (R531Q). Observed polymorphisms included one previously characterized polymorphism(D727E, n: 8) and one uncharacterized polymorphism (A459A, n:1).

In conclusion to reveal the frequency and profile of the TSHR mutations in primary congenital hypothyroid Turkish children, our study must be supported by more extensive and comprehensive projects. In this way the data can be obtained for development of new treatment protocols with molecular based drugs and possible potential of gene therapy. Also these data will be important for prenatal and postnatal genetic counselling for future generations.

Key words: Congenital hypothyroidism, TSHR mutations, Direct sequencing.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
ÖZET	III
ABSTRACT.....	V
İÇİNDEKİLER	VII
KISALTMALAR VE SİMGELER	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XIII
RESİMLER LİSTESİ	XIV
TABLolar LİSTESİ.....	XV
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tiroid Bezi	5
2.2. Tiroid Embryolojisi	6
2.3 Tiroid Gelişiminin Moleküler Mekanizması	9
2.4 TSHR'nün Tiroid Bezi Gelişimindeki Rolü	12
2.5. Tiroid Fizyolojisi ve Tiroid Hormon Salgılanmasının Düzenlenmesi.....	13
2.6. TSH Reseptörü	21
2.6.1. TSHR geni ve yapısı.....	21
2.6.2. TSHR aktivasyonu	28
2.6.3. TSHR ve tiroidal hastalıklar	29
2.7. Konjenital Hipotiroidi	33
2.7.1.Hastalığın Tanımı ve Epidemiyolojisi	33
2.7.2. Etiyolojik Faktörler	33

2.7.3 Otoimmün Olmayan Primer Konjenital Hipotiroidiye Neden Olabilecek	
Genetik Faktörler	36
2.7.3.1.Tiroid Disgenezisi ve Sendromik Olmayan Konjenital Hipotiroidi	36
2.7.3.2.Tiroid Disgenezisi ve Sendromik Konjenital Hipotiroidi	38
2.7.3.3.Dishormonogenez ve Konjenital Hipotiroidi	41
2.7.3.4.İyodotironin Taşıyıcı Defekti ve Sendromik Konjenital Hipotiroidizm	44
2.8.TSH Direnci Tanısına Genel Bakış	44
2.9. Konjenital Hipotiroidizimli Çocuğa Yaklaşım ve Bazı Önemli Değerler	47
2.10. PZR ve DNA Dizi Analizi	50
3. GEREÇ ve YÖNTEM	53
3.1. Çalışma Grubu	53
3.2. Kullanılan Gereçler.....	54
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri	57
3.4. Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar	57
3.5. Kullanılan Ticari Kitler	59
3.6. Kullanılan Primerler	59
3.7. TSHR Geni Mutasyonlarının Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler	60
3.7.1. Periferel Kandan DNA İzolasyonu	60
3.7.2. DNA Dizi Analizi.....	61
4. BULGULAR	69
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR	95
EKLER	118

EK-1:Etik Kurul Onayı.....	119
EK-2:Tez onay belgesi	120
KABUL ONAY	121

KISALTMA ve SİMGELER

A	Alanin
AC	Akciğer
C hücreleri	Kalsitonin salgılayan hücreler
Ca	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CL	Hücre lizis solüsyonu
COS-7	Afrika Yeşil Maymun SV40 böbrek fibroblast hücre hattı
D	Aspartik asit
DAG	Diaçil gliserol
DEHAL1	İyodotirozin dehalojenaz 1
DIT	Diiyodotirozin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DUOX2	Dualoksidaz 2
E	Glutamik asit
E.	Embriyonik
ECD	Hücre dışı yapı/bölge
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EtOH	Etanol
FACS	Florasanla aktive edilen hücre ayırımı
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
fs	Frameshift, çerçeve kayması
FSH	Folikül uyarıcı hormon
FSHR	Folikül uyarıcı hormon reseptör
GH	Büyüme hormonu
GNAS1	Uyarıcı G protein alfa alt ünite geni
GOF	TSHR'ündeki aktivatör fonksiyon kazandıran mutasyonlar
GPCR	Glikoprotein bağlı reseptör
GPHR	Glikoprotein hormon reseptör
Gα	Uyarıcı G protein alfa alt ünitesi
GTP	Guanozin trifosfat

H	Histidin
H202	Hidrojen peroksit
HEK293T	İnsan embriyonik böbrek 293 hücreleri
HOXA3	Homeobox A3
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IP3	İnozitol 3 fosfat
Kb	Kilo baz
Kda	Kilo dalton
KH	Konjenital hipotiroidizm
LH	Luteotropik hormon
LHR	Luteotropik hormon reseptörü
LOF	TSHR'ündeki inaktivatör fonksiyon kaybettirici mutasyonlar
LRRs	Lösence zengin tekrar bölgeleri
MCT 8	İyodotironin taşıyıcı gen
MIT	Monoiodotirozin
NGF	Sinir Büyüme faktörü
NIS	Sodyum-iyot simporter
OİTH	Otoimmün tiroidal hastalıklar
PAX-8	Paired box homeodomain 8 geni
PCP 2	Purkinje hücre protein-2
PDS	Pendrin geni
PHP1a	Psödohipoparatiroidizm 1a
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
PPHP	Psödopsödohipoparatiroidizm
PTH	Parathormon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Q	Glutamin
R	Arjinin
RCL	Eritrosit lizis solüsyonu
RIA	Radyoimmunassay

RIU	Radyoiyot uptake
RNA	Ribonükleik asit
SBP	Sümfektan protein B
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SHH geni	Sonik hedgehog geni
T3	Triiyodotironin
T4	Tiroksin
TBE	Tris borik asit EDTA
TBG	Tiroksin Bağlayıcı Globulin
TBPA	Tiroksin Bağlayıcı Prealbumin
Tbx1	T box transkripsiyon faktör
Tg	Tiroglobulin
THOX-2	Tiroid oksidaz 2 geni
TM	Zar geçen
TMD	Zar geçen yapı/bölge
TPO	Tiroid peroksidaz
TRH	Tirotropin salęlayıcı hormon
TSH	Tiroid uyarıcı hormon, tirotropin
TSHR	Tirotropin reseptörü
TTF1 (TITF1, NKX2-1)	Tiroid transkripsiyon faktörü-1
TTF-2 (FOXE1, FKHL15)	Tiroid transkripsiyon faktörü-2
UCP	Eşleşmeyen protein
USG	Ultrasonografi
wt	Yabanıl tip
β-HCG	Koryoganodotropik hormon

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Birincil farinks tabanından (tepe) istmusa (taban) göç eden tiroid bezinin gelişim aşamaları. Birincil farinks tabanında yerleşen hücreler istmusa geldiğinde iki loblu yapı halini almıştır.	7
Şekil 2.	Yan ve orta tiroid primordiumlarının gelişim aşamalarında baş ve boyunun diğer yapıları ile ilişkisinin önden görünümü	8
Şekil 3.	Tiroid bezinin embriyolojik gelişim aşamaları	9
Şekil 4.	Tiroid foliküler hücrelerinin gelişiminin şematik basamakları ve etkili olduğu düşünülen genlerin eksprese olduğu dönemler.	13
Şekil 5.	Hipotalamus-hipofiz-tiroid eksenini ve tiroid foliküler hücrelerinde temel sinyal ileti yolları	15
Şekil 6.	Tiroid hormonlarının tiroid foliküler hücrelerinden sentez ve salınımı	17
Şekil 7.	Tiroid hormon sentez döngüsü	18
Şekil 8.	TSH reseptörünün ve kromozomal gen lokusunun şematik olarak sunumu	22
Şekil 9.	TSHR' ünün farklı bölümlerinin işlevsel özellikleri	23
Şekil 10.	TSHR yapısı.	26
Şekil 11.	TSHR' ünün etkisini kontrol eden yollar	29
Şekil 12.	TSHR mutasyon bağımsız hastalıklar	31
Şekil 13.	TSHR mutasyon bağımlı hastalıklar	32
Şekil 14.	Konjenital hipotiroidizmli çocukta izlenmesi öngörülen yaklaşım	48
Şekil 15.	Tespit edilen mutasyonların reseptör üzerinde şematik gösterimi	78

RESİMLER LİSTESİ

- Resim1** Ekzon 10_2 parçasında R531Q homozigot mutasyonu ve kontrol dizi ile karşılaştırması. 72
- Resim2** Ekzon 10_1 parçasında R450H heterozigot mutasyonu ve kontrol dizi ile karşılaştırması. 73
- Resim3** Ekzon 10_2 parçasında R531Q homozigot mutasyonunun olguda ve aile bireylerinde gösterilmesi, kontrol dizi ile karşılaştırması. 74
- Resim4** Ekzon 10_3 parçasında heterozigot D727E (C>G) polimorfizmi ve kontrol dizi ile karşılaştırması. 76
- Resim5** Ekzon 10_2 parçasında heterozigot A459A (G>A) polimorfizmi ve kontrol dizi ile karşılaştırması. 76

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.	Tiroid hacminin yaşa göre dağılımı	5
Tablo 2.	İnsan ve yeni doğmuş farede TTF'lerin homozigot - heterozigot inaktivasyonundan beklenen sonuçlar.	12
Tablo 3.	Tiroid dışı dokularda TSH reseptörünün dağılımı	27
Tablo 4.	Yenidoğanda tiroid hormon metabolizma bozuklukları ve moleküler anormallik	34
Tablo 5.	TSHR LOF mutasyonlarında tam ve kısmi TSH direncinin ayrıcı tanısında kullanılacak değerler.	45
Tablo 6.	Yaş ile serum T ₄ , TSH, TBG ve Tiroglobulin konsantrasyon değerleri	49
Tablo 7.	Yaş ile serum T ₃ , rT ₃ , sT ₄ ve sT ₃ konsantrasyon değerleri	49
Tablo 8.	Tiroid Hormonu Değerlendirmesinde Genel Yaklaşım	50
Tablo 9.	Ekzon 10'un her bir parçası için I.PZR Primer Sulandırılması	62
Tablo 10.	I.PZR Reaksiyon karışımının hazırlanması	62
Tablo 11.	TSHR ekzon 10_1 PZR programı	63
Tablo 12.	TSHR ekzon 10_2 ve ekzon 10_3 PZR programı	63
Tablo 13.	II. PZR F Primer Dilüsyonu (Sekans primeri hazırlanması)	65
Tablo 14.	II. PZR R Primer Dilüsyonu (Sekans primeri hazırlanması)	66
Tablo 15.	II. PZR Reaksiyon karışımının hazırlanması (Sekans Reaksiyon karışımının hazırlanması)	66
Tablo 16.	TSHR ekzon 10 II. PZR programı	67
Tablo 17.	Çalışma olgularının cinsiyet ve klinik dağılımları.	70
Tablo 18.	Genetik anormallik saptanan hastaların klinik ve genetik durumları	77
Tablo 19.	Otoimmün olmayan konjenital hipotiroidizmlili hastalarda TSHR geninde saptanan değişikliklerin detayları.	77
Tablo 20.	Monoallelilik ve biallelik TSHR mutasyon sıklığının farklı çalışma gruplarındaki dağılımı	82
Tablo 21.	TSHR'ünde tespit edilen fonksiyon kaybettiren mutasyonlar, mutasyonun özellikleri ve referans kaynakları.	85
Tablo 22.	TSH uyarısına tiroid cevabının derecesine göre TSH direnç sınıflaması	87

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Primer konjenital hipotiroidizm (KH) kalıcı hipotiroidinin en sık karşılaşılan nedenidir. Yenidoğan döneminde en sık karşılaşılan endokrinolojik sorundur. Prevalans ırk ve etnik yapıya göre değişmekle birlikte dünya genelinde 3500-4000 canlı doğumda birdir (1). Fakat ülkemizdeki insidansı daha yüksektir. 1991-1992 yıllarında yenidoğan döneminde yapılan bir çalışmada, KH insidansı 1/2736 olarak bulunmuştur. Kız erkek oranı 2/1'dir (2). Konjenital hipotiroidili çocuklarda hastalığın oluşumu nedene bağlı olarak değişik zamanlarda ortaya çıkabilir. Konjenital hipotiroidizmin çoğul etiyojisi mevcuttur. Günümüzde çeşitli aday gen bozukluklarının sorumlu olduğu düşünülmektedir (3). Konjenital hipotiroidizm genel olarak kendi içinde öncelikle primer hipotiroidizm, santral hipotiroidizm ve tiroid hormon direnci olarak üç grupta incelenebilir. Primer hipotiroidizm ve santral hipotiroidizmin ise kendi içinde kalıcı ve geçici hipotiroidizm olarak alt gruplara ayrılır. Kalıcı hipotiroidizm nedenleri olarak

tiroid disgenezisi, embriyogeneziste genetik defektler, TSH reseptör mutasyonu, dishormonogenezis, konjenital toksoplazmozis, hipotalamo-hipofizer hipotiroidizm ve tiroid hormon direnci sayılırken, geçici hipotiroidizm nedenleri ise iyot eksikliği, iyatrojenik, geçici dishormonogenezis (oksidasyon bozuklukları), konjenital nefrozis, idiopatik yüksek TSH (hipertirotropinemi) olarak gruplandırılabilir (4, 5, 6).

Tiroid stimüle edici hormon (TSH), belirli fizyolojik şartlar altında tiroid hormon sentezinin uyarılması, salınımı ve büyüme gibi tiroid bezinin işlevlerinin kontrolünde rol oynayan ana hormondur (6). TSH bu etkilerini tiroid foliküler hücrelerinin bazolateral zarında yerleşmiş olan G proteinine bağlı reseptör (GPCR) süper ailesinin bir üyesi olan TSH reseptörüne (TSHR) bağlanarak gerçekleştirir (7,8). TSH, TSHR üzerinden tiroid hücrelerinin büyüme, farklılaşma ve fonksiyonunda rol oynar. Dolayısıyla TSHR tiroid fizyolojisi ve hastalıklarında önemlidir. Tiroid dokusunda ligandın reseptöre bağlanması ile aktifleşen reseptör, G protein kompleksi ile etkileşir. Etkileşim sonrası aktive olan Gs proteini adenilat siklaz yolunu uyar ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyesinde artışla tiroid hormon sentezi, proliferasyon ve diferansiyasyonu sağlar. cAMP sırasıyla protein kinaz A (PKA) ve diğer sinyal ileti moleküllerini aktive eder. Bu iletim sürecinin sonunda tiroid spesifik genlerin mRNA transkripsiyonu aktive olur (9,10). Yüksek konsantrasyonlarda TSH uyarısı söz konusu olduğunda ise Gq- α üzerinden fosfolipaz C'yi aktifleyerek peroksidasyon ve iyodinasyonu sağlar (8, 9, 10, 11). TSHR'de gözlenen mutasyonlar tiroid bezi üzerindeki etkisine göre aktivatör ve inaktivatör mutasyonlar olarak iki grupta incelenebilir. Aktivatör mutasyonlar kendi içinde toksik adenomlarda gözlenen somatik mutasyonlar ve otoimmün olmayan ailesel hipertiroidizm ile sporadik konjenital hipertiroidizmde gözlenen germline mutasyonlar olarak ikiye ayrılır. Bunun

yanısına reseptörde meydana gelen inaktivatör mutasyonlar germline özellikte olup TSH hormonuna karşı değişen derecelerde direnç oluşturur. Bu durumda klinik; ötiroid hipertirotropinemiden, tiroid hipoplazisinin de gözlenebildiği ciddi hipotiroidizme kadar değişebilir. Burada gözlenen hipotiroidizm konjenital ve otoimmuniteden bağımsızdır (11, 12, 13). TSHR inaktivatör mutasyonları TSH direncini TSH-TSHR-cAMP kaskadı üzerinden gerçekleştirir (13).

Primer konjenital hipotiroidizimli vakaların %80'inde neden tiroid bezinin disgenezi ya da agenezisinden kaynaklanmaktadır. Bu durum ise tiroid bezinin gelişmesinden sorumlu transkripsiyon faktörlerinin genetik mutasyonlarından kaynaklanabilmektedir. TSHR'leri de tiroid bezi organogenezinin geç aşamalarında rol oynamaktadır. TSHR geninde saptanan mutasyonların tiroid bezi gelişiminde normal pozisyon ve yapıdan ciddi hipoplaziye kadar değişen derecelerde klinik etki gösterdiği saptanmıştır. Dolayısıyla TSHR genindeki mutasyonlar konjenital hipotiroidizm oluşumunda rol oynamaktadır (14).

Otoimmun olmayan subklinik hipotiroidizm TSH direncinin gözlendiği farklı bir klinik tablodur. Hastaların serum TSH değerleri normal üzerinde seyrederken tiroid hormon değerleri normaldir. Eş zamanlı olarak otoantikörler bulunmaz ve tiroid bezi kendi yerinde, normal boyutta ya da az gelişmiş olabilir. TSHR mutasyonları bu durumun gelişimi ile ilişkili olabilmektedir. TSH direnci sıklıkla mutasyonun homozigot ya da heterozigot olması ile bağlantılı olarak parsiyel (kısmi) veya komplet (tam) olarak tanımlanmaktadır (15).

TSHR geni üzerine çalışmalar sıklıkla ailelerde ya da bireylerde TSHR geni taraması ile yeni mutasyonların tespiti, bilinen mutasyonların belli hasta guruplarında aranması veya mutasyonun etkisinin cAMP üzerinden değerlendirildiği fonksiyonel

çalışmalar olarak yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda farklı populasyonlarda farklı mutasyonlar da tespit edilmiştir. Genin büyük bir yüzdesini ekzon 10'un oluşturması ve bilinen mutasyonların büyük bir çoğunluğunun ekzon 10'da bulunması nedeniyle çalışmalarda sıklıkla ekzon 10 göze çarpmaktadır. Bazı çalışma gruplarında ekzon 10'da yeni mutasyonlar da tespit edilmiştir. 2007 yılında Çin'de yapılan çalışmada üç heterozigot missense mutasyon ilk kez Çinli konjenital hipotiroidizmlilerde çocuklarda bulunmuştur (12). Narumi ve arkadaşları 2009 yılında kalıcı primer konjenital hipotiroidisi bulunan 102 hastada yapılan populasyon tabanlı genetik epidemiyolojik çalışmada daha önce tanımlanmış bir (p.450H), tanımlanmamış üç adet mutasyon tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda Japonlarda KH'li hastalarda TSHR mutasyonunun sık olduğuna ve sıklıkla (%70) sorumlu olarak gözlenen mutasyonun ise daha önceden farklı çalışmalarda tanımlanmış olan p.450H mutasyonu olduğu sonucuna varmışlardır (16).

Bu bağlamda Türk çocuklarında 10. ekzonda inaktivatör TSHR mutasyon insidansının tespit edilebilmesi, otoimmün olmayan primer konjenital hipotiroidizm ile inaktivatör TSHR mutasyonları arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi ve bu hastalığa yönelik mutasyon profilini araştırmak ve veri elde etmek için bu tez çalışması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tiroid Bezi

Doğumda ortalama 1,5 gr ağırlığında olan tiroid bezi 16 yaşına kadar büyüyerek erişkinde ortalama 15-20 gr'a ulaşır. İyot yetersizliği olan bölgelerde ve kadınlarda ağırlığı daha fazladır. Kadınlarda menstruasyon ve gebelik döneminde hacmi artar (17).

Tiroid bezi endokrin bezlerin en büyüğü olup, farinks, larinks, özefagus ve trakeanın ön-yan yüzeylerini sarar. İki lateral lob ve bunları birleştiren istmüsten oluşur. Her bir lob trakea yanlarında yer alır; üst kısımda tiroid kıkırdağı, yanda karotis kılıfı ve sternokleidomastoid kası, ön kısmında strep kaslar (sternotiroid ve sternohiyoid) bulunur (19). Toplumda % 80'inde koni şeklinde piramidal lob bulunur ve genellikle isthmus ve hiyoid kemik arasında yer alır (17).

Tablo 1: Tiroid hacminin yaşa göre dağılımı (18)

Erken Çocukluk ve Adölesan Dönemde Tiroid Hacminin Yaşa Göre Değişimi					
Ortalama Tiroid Bez Hacmi (ml)					
Yaş	Erkek	E+K	Kız	Erkek	Kız
1-3 yaş*		1.00			
5 yaş*		1.7			
6 yaş+	3.0		3.0	5.4	5.0
8 yaş+	4.0		4.0	6.1	6.9
10 yaş+	4.4		5.	7.8	9.2
12 yaş+	5.7		6.3	10.4	11.7
14 yaş+	7.2		7.6	13.0	14.6

*Chanonine JP, Toppet V, Lagasse R, et al (1991). Determination of thyroid volume by ultrasound from the neonatal period to late adolescence. Eur J Pediatr 150:395.

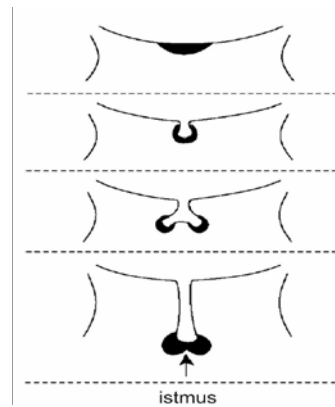
+Delange F, Becker G, Caron P, et al (1997). Thyroid volume and urinary iodine in European school children: standardization of values for assesment of iodine deficiency. Eur J Endocrinol 136:180.

2.2. Tiroid Embriyolojisi

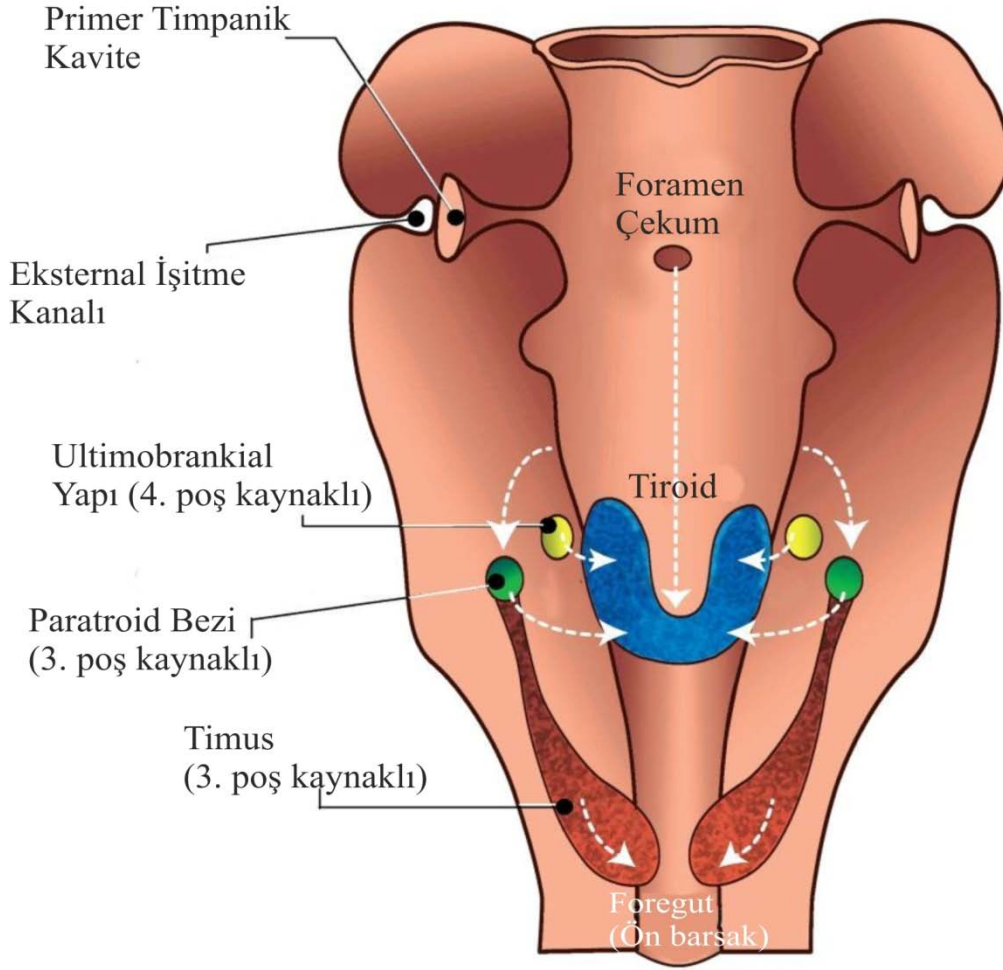
Tiroid bezi, birincil farinks zemininden gelişen ve T₄ üreten foliküler hücrelerin öncül yapısı olan median primordium ile parafoliküler kalsitonin (C) salgılayan hücrelerin oluşumunda görevli, dördüncü farengeal poşun birleşiminden oluşmaktadır.

Gelişimin 20-22. gününde farinks tabanında gözlenen median tiroid gözlenebilen ilk endokrin yapıdır. Başlangıçta dairesel kümelerden oluşan bu hücre grubu çoğalmaya devam ederken invajinasyona ve sonrasında boyun tabanına doğru kaudal göçe uğrar. Yapılan erken transplant deneylerinden tiroid bölgesini çevreleyen mezenşimal dokunun tiroid bezinin kendi yerine gitmesi üzerinde yönlendirici rol oynadığını göstermiştir (20). Yer değiştiren bu median primordium triglossal alanı oluşturan dejenere foliküler hücrelerin ardına yerleşirler (21). Embriyonik kalp ile sıkı ilişkisi

nedeni ile tiroid bezinin kendi yerine inişi sırasında embriyonik kalp tarafından itildiği gözlenmiştir. 24 ve 32. günlerde median primordium iki loblu yapı haline geçmiştir. Ancak esas yerine yerleşmesi 40-50. günlerde olmaktadır. Bu günlerde median ve lateral primordiumun birbirleri ile iletişimi sayesinde C hücrelerinin tiroid içine yerleşmesi sağlanır. Ellibirinci günde bez istmus ile bağlanan, iki lateral lobdan oluşan son şeklini alır (Şekil 1) (22). Lateral tiroidal primordium, nöral krest kaynaklı C hücrelerinin katkısı ile 4. farengeal poştaki endodermden gelişmektedir (23). Olgunlaşmış tiroid bezinde C hücreleri tek tek ya da gruplar halinde oluşur. Lateral lobların merkezlerinde daha yoğun bulunmalarına rağmen bezin tamamında rastlanabilir (24). Lateral submandibular yapılarında sadece tiroid folikülü bulunan hastalardan anlaşıldığı üzere lateral primordium tiroid foliküler hücrelerini oluşturma kapasitesine de sahiptir (25). Gestasyonun 11-12. haftalarında folikül oluşumu görülür ve iyot konsantrasyonu ile hormon sentezi başlar. Ayrıca bu dönemden birincil hipofiz hücrelerinde TSH izole edilir (26). Median ve lateral primordiumlarının gelişim ve yer değişimi diğer baş boyun yapıları ile ilişkileri de göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir (Şekil 2).

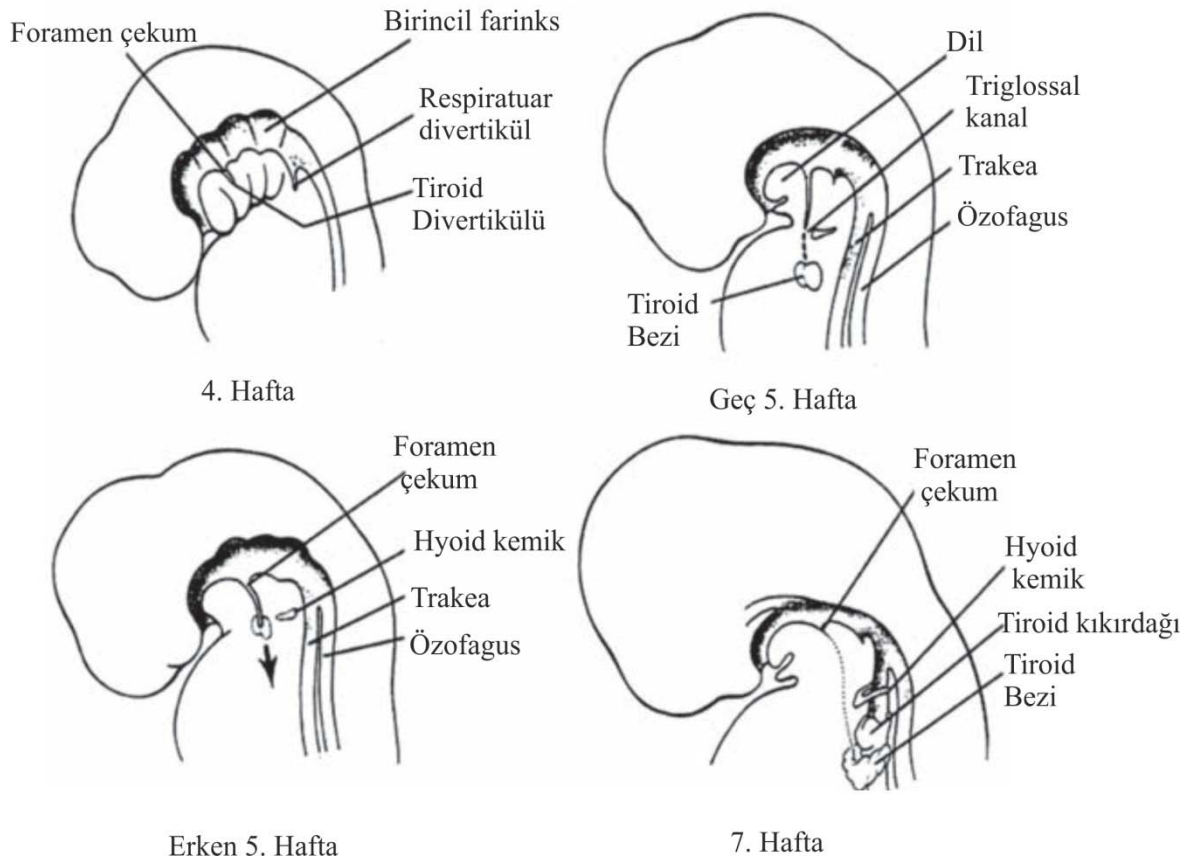


Şekil 1. Birincil farinks tabanından (tepe) istmusa (taban) göç eden tiroid bezinin gelişim aşamaları. Birincil farinks tabanında yerleşen hücreler istmusa geldiğinde iki loblu yapı haline almıştır (27).



Şekil 2. Yan ve orta tiroid primordiumlarının gelişim aşamalarında baş ve boyunun diğer yapıları ile ilişkisinin önden görünümü (27).

Birçok doku veya organ embriyolojik gelişmeler esnasında tiroid bezinden geçip aşağıya doğru indiklerinden mediasten, perikard, kalp veya diyafram gibi dış odaklara tiroid dokusu taşıyabilir. Bu ektopik tiroid dokularında nadiren kist veya tümörler gelişebilmektedir (Şekil 3) (28, 29).



Şekil 3. Tiroid bezinin embriyolojik gelişim aşamaları (30).

2.3 Tiroid Gelişiminin Moleküler Mekanizması

Tiroid bezinin oluşum ve boyundaki yerine yerleşim aşamalarında bir takım genetik faktörler koordine bir şekilde rol oynamaktadır. Bunlardan bazıları TTF1 (TTF1, NKX2-1), TTF2 (FOXO1, FOXL1) ve PAX8'dir. TTF1 ve PAX8 tiroid hücre öncüllerinin devamlılığında ve tiroid spesifik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. TTF2 hücresel migrasyonda önemlidir. HOXA3, FGF ailesinin bazı üyeleri (FGF10 gibi), kadherin, Tbx1 (T box transcription factor 1), SHH geni, Tg, TPO ve TSHR genleri de tiroid bezi üzerinde, değişik aşamalarda etkisi olduğu saptanan diğer genlerdir (31).

TTF1, TTF2 ve PAX 8'in eşzamanlı ekspresyonları farede embriyonik 8,5. günde (E8.5) tiroid foliküler hücrelerinin farklılaşmasının başlamasında en önemli faktördür (32). Bu eş zamanlı ekspresyon tiroidin gelişim sürecinde devam etmektedir (33,34). Bu faktörlerin etkisi knock-out fareler üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konulmaya çalışılmıştır. Tablo 2'de fare ve insanda bu knock-out yapılar karşılaştırılmıştır.

TTF1 Knock-out: TTF1 -/- hayvanlarda tiroid foliküler hücreleri ve C hücreleri tamamen eksiktir. İnsanlarda gözlenmeyen özelliği ise TTF1 in nöroektodermal yapılarda eksprese olması nedeni ile bu hayvanlarda ciddi önbeyin ve hipotalamus hasarları oluşturmasıdır. Üçüncü bir özelliği ise homozigot vakalarda neonatal ölüme neden olan AC hipoplazisi göstermesidir (35). TTF1 -/- embriyolarda E10.5 günde median tiroid primordiumu halen görülebilmektedir. Ancak olması gerekenden küçük ve halen farengial zeminle ilişkili haldedir. E13. günde apoptotik hücreler nedeni ile yok olmaktadır (36). Bundan anlaşıldığı üzere TTF1 tiroid primordiumunda erken dönemde gerekli değildir ancak tiroid foliküler hücre öncüllerinin çoğalma ve var oluşu için olmalıdır.

TTF +/- heterozigotlar başlangıçta normal olarak bildirilmiş. Ancak daha sonra yapılan araştırmalarda bu vakalarda zayıf koordinasyon, plazma TSH seviyesinde artış, normal plazma T₄ seviyesi gözlenmiştir. Bu durum primer hipotiroidizm ya da T₄'ün TSH'ya negatif feedback etkisinin eksikliği ile karakterize beyin hasarının neticesinde gözlenen hastalıkları andırmaktadır (37).

TTF2 Knock-out: TTF2 +/- heterozigot hayvanlar tamamen normaldir. TTF2 -/- homozigot hayvanlar ise ciddi tiroid dışı fenotipe sahiptir. (yarık damak, dudak, neonatal ölüm vs..) (38). Tiroidal fenotip ise oldukça değişkendir (39). E8.5. günde

median tiroid tomurcuğu oluşmasına rağmen E9.5. günde migrasyona başlayamaz. E11.5'de embriyoların %50 sinde primordiyum tamamen kaybolurken geri kalan %50'sinde ektopik tiroid oluşumuna yol açar. Bu nedenle TTF2'nin foliküler hücre öncüllerinin migrasyonunda rol oynadığı söylenebilir. TTF2-/- farelerde TTF1-/- farelerin aksine C hücre gelişimi normaldir.

PAX8 Knock-out: Diğer iki faktörün aksine PAX8-/- olgular kısıtlı fenotipe sahiptir. Tiroid foliküler hücreleri hiç bulunmazken, C hücreleri normaldir. Bundan başka beyin, böbrek gibi yapılarda herhangi bir hasar bulunmamaktadır. Bu durum PAX genlerinin diğer üyeleri ile desteklendiğini düşündürmektedir. TTF1-/- farelerdeki gibi medial tiroid divertikulumu E10.5-11.5'de mevcut olmasına rağmen ileri dönemlerde saptanamamaktadır (40). Bu nedenle PAX 8 in TTF1'e benzer özellikte olduğu söylenebilir. Örneğin TTF1'deki gibi tiroidin oluşumunun erken aşamalarında gerekmezken devamında kritik role sahiptir. Son zamanlarda TTF1 ile PAX8'in fizyolojik olarak Tg promotörü üzerine sinerjistik hareket ettiği ve tiroid farklılaşmasının kontrolünde rol oynadığı düşünülmektedir (41). PAX8-/- farelerin neonatal ölümleri ciddi hipotiroidizme bağlanmaktadır. Bu farelerin diğer organ ve sistemlerinde (kemik, dalak, barsak gibi) gelişme geriliği de gözlenmektedir (42). PAX8 +/- farelerde ise yabani tip olgulara göre plazma TSH'sı daha yüksek olmasına rağmen tiroid bezi histolojik olarak normaldir.

Tablo 2. İnsan ve yeni doğmuş farede TTF'lerin homozigot - heterozigot inaktivasyonundan beklenen sonuçlar (TTF: Tiroid transkripsiyon faktörleri, N: Normal) (27).

TİROİD					
Mutant		T ₄ Üteren Hücreler		C Hücreleri	Tiroid Dışı Fenotip
TTF 1	+/-	Fare	Normal bez ve T ₄ ancak TSH yüksek	+?	Koordinasyon zayıf
	-/-	Fare	Yok	-	Beyin defektleri, AC agenezisi
	+/-	İnsan	Bez boyutu değişken, subnormal fonksiyon	+?	Kreatetoz, RDS
	-/-	İnsan	<-----	Lethal Fenotip	----->
TTF 2	+/-	Fare	<-----	Fenotipik etki yok	----->
	-/-	Fare	Ektopi/Athyreosis	+	Yarık damak-dudak
	+/-	İnsan	<-----Fenotipik etki yok	-----	Tek taraflı koanal atrezi
	-/-	İnsan	Yok	+?	Yarık damak, bifid epiglottis, saç anomalileri
PAX8	+/-	Fare	Bezin şekli N, fonksiyonu değişken	+?	-
	-/-	Fare	Yok	+	-
	+/-	İnsan	Orthotopik hipoplazi, fonksiyonu değişken	+?	-
	-/-	İnsan	<-----	Fenotip bilinmiyor	----->

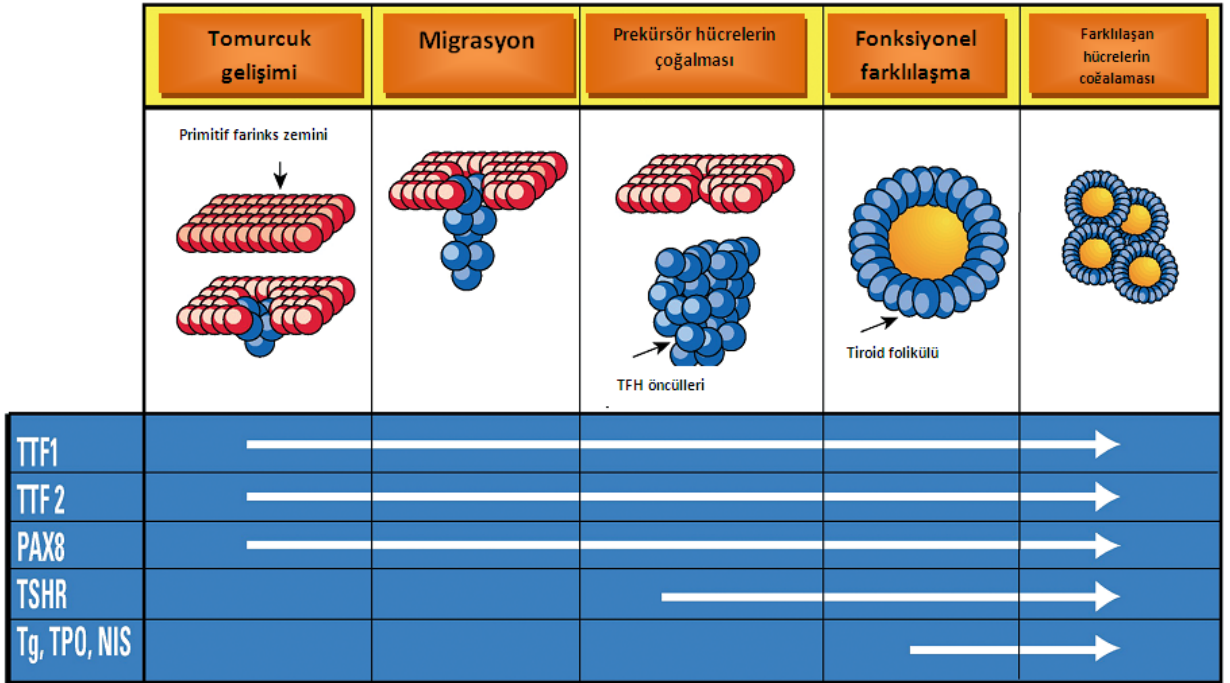
Diğer İlişkili Genler:

Tiroid foliküler hücrelerinin farklılaşmasının ilk aşamasında TTF1, TTF2 ve PAX8'in homozigot delesyonuna rağmen normal olması, tiroid foliküler hücrelerinde etkisi olması muhtemel başka genlerin varlığını da akla getirmektedir.

2.4 Tiroid Bezi Gelişiminde TSHR'nün Rolü

TSH'nin etkisini kendi reseptörü olan TSHR'ü üzerinden göstermesi farklılaşmış tiroid foliküler hücrelerinin proliferasyon ve devamlılığı için önemlidir. Tiroid primordiyumundaki migrasyonda rol oynamamaktadır. Bu nedenle TSHR'ü tiroid hipoplazisinde rol oynarken, hatta bazen bu hipoplazi nükleer görüntüleme atreozise kadar değişen görünüm verebilir, tiroidal ektopide role sahip değildir. Yapılan

iki güncel çalışmada TSH ve reseptörünün fare tiroid bezi gelişimi üzerindeki etkisi yeniden incelenmiştir. TSHR'de doğal olarak oluşturulan homozigot missense mutasyon taşıyan farelerde tiroid boyutu E17'ye kadar normal olmasına rağmen doğumdan iki ay sonra azalmıştır (43). Ayrıca postnatal bir ay civarı tiroid bezinin relatif ağırlığı TSHR knock-out farelerde yabancı tiptekinin %50'si kadardır (44). Her iki çalışmada ayrıca TSHR'nün NIS ve TPO ekspresyonu için gerekli olduğunu ayrıca ikinci aydan sonra Tg ile bağlantılı olmadığını göstermiştir.



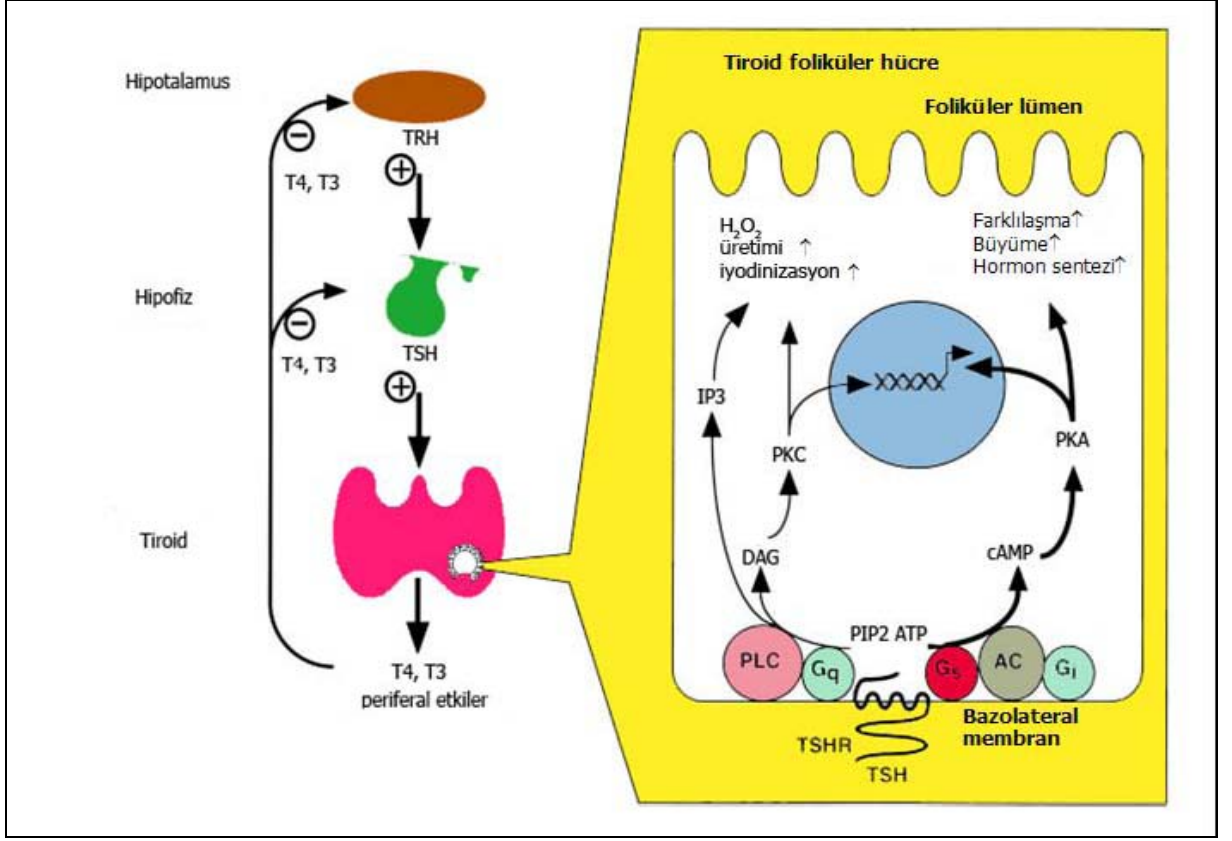
Şekil 4. Tiroid foliküler hücrelerinin gelişiminin şematik basamakları ve etkili olduğu düşünülen genlerin eksprese olduğu dönemler (27, 45).

2.5. Tiroid Fizyolojisi ve Tiroid Hormon Salgılanmasının Düzenlenmesi

Tiroid insan organizmasında metabolizma hızı üzerinde büyük etkisi olan Tiroksin (T₄) ve triiodotironin'in (T₃) yanı sıra kalsiyum metabolizması için önemli olan kalsitonin hormonunu da salgılar (46). Tiroid bezinin kontrolü normal fizyolojik

koşullarda hipotalamus-hipofiz ekseninde sağlanır. Hipotalamustan salgılanan tripeptid TRH (TSH salgılayıcı hormon) hipofiz bezini uyararak bir hipofiz glikoprotein hormonu olan TSH hormonunun üretilmesini ve salgılanmasını sağlar (47). Proflutamil-histidil-prolin amid yapısında olan TRH tripeptidi hipofizin median eminensindeki sinir uçlarından salgılanarak, hipotalamik-hipofizer portal ven sistemi içinde hipofiz ön lobuna ulaşır. Hipofiz ön lobu hücrelerini doğrudan uyararak TSH yapımını artırır. Hipotalamustan hipofize gelen portal sistem tamamen bloke edildiğinde hipofizin TSH salgısı çok azalır fakat 0'a düşmez. Hipotalamus, somatostatin salgısıyla hipofiz ön lobunun TSH sekresyonunu inhibe edebilir. Fakat somatostatin'in tüm tiroid kontrol sistemindeki rolü bilinmemektedir. Vücut sıvılarında tiroid hormon düzeyindeki artış hipofiz ön lobundan TSH salgılanmasını azaltır. Tiroid hormonu sekresyonu normalin 1.75 katı olduğu zaman TSH salgılanması genellikle 0'a iner (48).

TSH reseptörü luteotropik hormon (LH), folikül uyarıcı hormon (FSH) ve koryogonodotropik hormon (β -hCG) reseptörü ile beraber rodopsin ve drener jik reseptör alt ailesinin bir üyesidir. Tiroid bezinin büyüme ve işlevlerinden sorumludur (7). TSH, TSH reseptörüne bağlanır. Bu eşleşme membranda adenil siklazı aktive ederek hücrede cAMP oluşumunu sağlar. cAMP, siklik AMP'ye bağımlı protein kinazları aktive ederek proteinlerin fosforilasyonunu sağlar. Böylece tiroid hücrelerinin tüm enzim sistemlerini uyarır ve ikincil iletici olarak görev yapar (28, 46, 49). Bu sayede tiroid foliküler hücrelerinin büyüme ve işlevlerinin uyarılmasını, tiroid bezi hormonlarının -tiroksin (T_4) ve triiyodotirozin (T_3)- sentezini ve tiroid bezinden salgılanmalarını düzenler (Şekil 5).

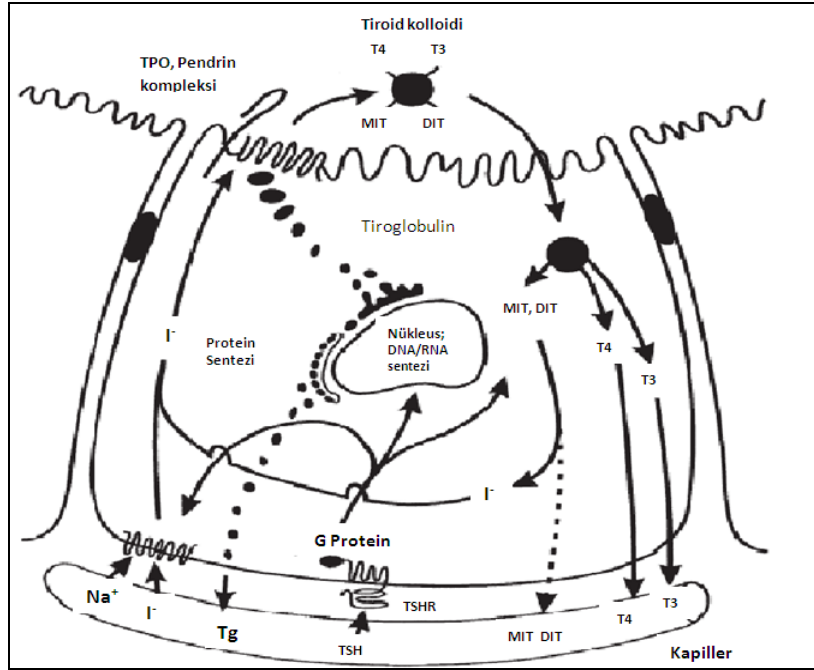


Şekil 5. Hipotalamus-hipofiz-tiroid eksenini ve tiroid foliküler hücrelerde temel sinyal ileti yollarını (11). **TRH-** TSH salgılayıcı hormon; **TSH-** Tiroid stimule edici hormon; **T4-** tetrayodotirozin; **T3-** triyodotirozin; **TSHR-** TSH reseptörü; **Gs/q/i-** G proteinleri; **AC-** Adenilat-siklaz; **PKA-** Protein kinaz A; **PLC-** Fosfolipaz C; **DAG-** diasilgliserol; **PKC-** Protein kinaz C; **IP3-**İnositol-3- fosfat.

Tiroid bezi, başlıca maddesi molekülünde tiroid hormonlarını tutan glikoprotein yapı tiroglobulinden oluşan, kolloid denilen maddenin bulunduğu çok sayıda kapalı folliküllerden oluşur (28, 48).

Gastrointestinal yoldan diyetle alınan iyot tiroid hormonlarının yapımında önemli bir faktördür. Alınan miktarı da su ve topraktaki iyot oranına bağlıdır. Normal T₄ yapımı için haftada 1 mg iyota ihtiyaç vardır (48). Gastrointestinal yolla alınan iyot iyodür halinde hücre dışı mesafeye geçer. Bunun 1/5'i seçici olarak tiroid bezi tarafından tutulurken geri kalan kısmı idrarla atılır. Tiroid hücrelerinin bazal membranı iyodürü hücre içine taşıyan özel bir yeteneğe sahiptir (iyot tutulması) (48). Ayrıca

‘İyodür pompası’ denen ve enerji isteyen aktif bir mekanizmayla da taşınır. En önemli taşıma yolu bu iyodür pompasıdır. Tiroid hücrelerinin endoplazmik retikulum ve golgi yapılarında tiroglobulin yapılır. Her tiroglobulin molekülü 140 tirozin aminoasiti içerir. Bu aminoasitler, tiroid hormonlarını oluşturmak üzere iyotla birleşen başlıca substratlardır. İyodür iyonlarının **oksidasyonu** tiroid hormonlarının sentezinde ilk önemli aşamadır. İyodun oksidasyonu follikül hücre mikrozomlarında bulunan peroksidaz ile sağlanır. Bu işlem sonucunda elementel iyot oluşur. Diğer önemli aşama **organifikasyon** aşamasıdır. Bu aşamada tiroglobulin TSH etkisi ile elementel iyotla birleşmektedir. Elementel iyot tiroglobulin molekülüne bağlanır ve monoiodotirozini (MIT) oluşturur. Sonra bir iyot daha bağlanır ve diiodotirozin (DIT) oluşur (Şekil 6). Organifikasyon çok yavaş seyreder, ancak tiroid hücreleri içinde bulunan iyodinaz enzimi bağlanma işleminin kısa sürede tamamlanmasını sağlar. İki molekül DIT’ın tiroglobuline bağlı şekilde çiftleşmesi tiroksini (T_4), monoiodotirozinin DIT ile birleşmesi ise triiodotirozini (T_3) meydana getirir. T_3 periferik dokuda T_4 ’ün 5 numaralı C atomundaki iyodun deiodinizasyonu ile de oluşur. Meydana gelen T_3 ve T_4 tiroglobulinde depolanır ve vücudun 1-3 aylık hormon gereksimini karşılamaya yeterlidir. Tiroid bezinden salgılanan hormonların yaklaşık 9/10’u T_4 ; 1/10’u da T_3 ’tür. Dokulara günde ortalama 90 mikrogram T_4 , 40 mikrogramda T_3 sunulur. T_3 ve T_4 ’ün tiroglobulinden ayrılması, proteaz enzimleri sayesinde oluşur. Tiroglobulinin hidrolizi ile ortaya çıkan iyotlanmış tirozinler, mikrozomlar içinde bulunan iodotirozin dehalogenaz enzimi ile iyotundan ayrılır. Bu iyodürlerin bir kısmı tekrar organik bağlanmaya girerken geri kalan kısmı da bezden kaybedilir. Buna iyodür akması denir (48).

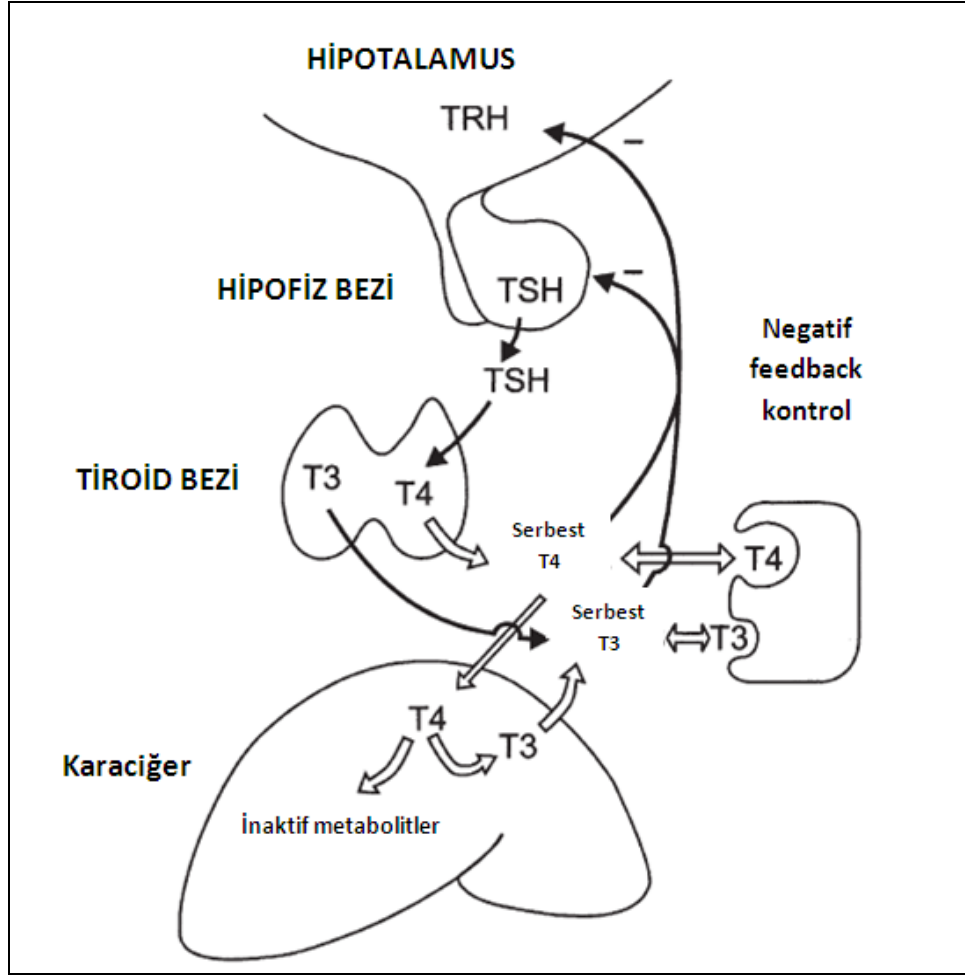


Şekil 6. Tiroid hormonlarının tiroid foliküler hücrelerinden sentez ve salınımı (18).

Tiroid hormonları kanda üç çeşit proteinle taşınır:

- 1- **Tiroksin Bağlayıcı Globulin (TBG)**, kanda dolaşan tiroksinin %60'ını bağlar.
- 2- **Tiroksin Bağlayıcı Prealbumin (TBPA)**, kanda dolaşan tiroksinin %30'unu bağlar.
- 3- **Tiroksin bağlayıcı albümin**, tiroksinin %10'unu bağlar.

T_3 'ün TBG'ye bağlanma gücü T_4 'ten daha zayıftır. Böylece T_3 dokulara T_4 'ten daha önce ulaşır, daha hızlı etki gösterir ve T_4 'e göre 3-4 kat daha aktiftir. T_3 'ün yarı ömrü 2-3 gün T_4 'ün yarı ömrü ise 6-11 gündür. Hücre içinde aktif olan T_3 'tür. T_3 ve T_4 karaciğerlerde glukoronik asit ile konjuge olur ve safrayla atılırlar (Şekil 7) (50).



Şekil 7. Tiroid hormon sentez döngüsü (18).

100 ml plazmada yaklaşık 4-11 mikrogram T_4 , 0.1-0.2 mikrogram T_3 bulunur. T_4 'ün ancak %0.5'i serbest halde bulunur; dolayısı ile plazmadaki serbest T_3 miktarı, serbest T_4 'ten çok fazladır (51). Tiroid hormonlarının plazmada serbest halde bulunanları vücut üzerinde etkilidir. Tiroid bezi hormonları (T_3 , T_4) farklılaşma, büyüme ve metabolizma üzerinde çoklu etkiye sahiptirler. Genellikle bu hormonların birincil işlevleri çekirdek reseptörleri vasıtasıyla protein yapımını düzenlemek ve zar yapısında yer alan enzimleri aktive ederek mitokondrilerde oksitlenme hızını arttırmaktır (11,52). Bununla beraber tiroid hormonlarının zar Na^+ , K^+ ve ATPaz

aktivitelerini arttırarak oksijen tüketiminin uyarılması ve hücre içerisinde glikoz / aminoasit taşımalarının hızlanması gibi genomik olmayan işlevleri de tanımlanmıştır (53,54). MSS'nin gelişmesi için T_4 gereklidir. T_4 , vücudun insüline karşı hassasiyetini azaltır ve insülin yıkımını da hızlandırır (51).

Tiroid Hormonunun Etkileri

Tiroid hormonunun etkileri aşağıdaki şekilde sıralanabilir (18).

✚ Santral sinir sistemi gelişimine etkileri

➤ Genel

Hücre göçü ve nöronal hücre olgunlaşması

Myelogenezde artış

➤ T_3 tarafından düzenlenen gen ürünleri

Myelin kökenli protein

Sinir büyüme faktörleri ve reseptörleri

Nörotropin 3

Nöral hücre adhezyon molekülleri

Serebellar PCP 2

➤ Prostaglandin D2 sentaz

✚ Büyüme ve gelişme üzerine etkileri

➤ Büyüme hormonu sentez ve salınımını artırması

➤ Büyüme hormonu salgısı etkisinde insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) sentez ve salınımının düzenlenmesi

- Büyüme faktörü üretiminin uyarılması

Epidermal büyüme faktörü (EGF)

Sinir büyüme faktörü (NGF)

Eritropoietin

- Kemik metabolizma ve büyümesi üzerine etkisi

IGF-I'e kıkırdak cevabı

Osteoblastik ve osteoklastik etki

Termojenik etki

- Mitokondrial enzim sentezinin uyarılması
- Kahverengi yağ dokusu ve kasta UCP-1 ve UCP-3 uyarılması
- Membran Na/K ATP'azın uyarılması

Metabolik etki

- Hepatik protein

Hepatik lipojenik enzim indüksiyonu

Hepatik glutamin sentaz ve α -amino levulinik asit sentazın uyarılması

Prolaktin uyarısı ile laktalbümin sentezinin artırılması

GH uyarısı ile β_2 öglobulin sentezinin artırılması

- Plazma zarı etkisi

Glikoz transportunun uyarılması

Adrenerjik reseptör bağlanmasının uyarılması

Tiroid bezinde hormon sentezi ve salgılanması, pek çok hormondan farklı olarak, çevresel uyarılara bağlı, hızlı bir şekilde ve yüksek konsantrasyonlarda yapılıp, folikül lümeninde büyük miktarlarda depo edilerek bekletilebilir. Tiroid bezinden salgılandıklarında çoğunlukla plazma proteinlerine bağlı, aktivitesi düşük prohormon durumundadır. Aktif hormon formu, periferik dokularda özgün reseptörlere bağlanma ile gerçekleşir (52).

T₃ ve T₄ün hücre içinde bağlantı yeri DNA, muhtemelen de mitokondrial DNA'dır. Bu hormonların etkisi ile mitokondrilerin hem sayısı hem de kristaller artar. Bu yüzden de tiroid hormonlarının etkisi ile pek çok dokunun metabolik aktivitesi artmaktadır (55, 56). Protein sentezinin artması, ilk dönemde translasyon sisteminin uyarılmasından dolayı ribozomlar tarafından protein oluşumunun artırılmasından, günler sonra oluşan ikinci dönemde ise yeni genler tarafından RNA sentezinin artması, yani transkripsiyon sisteminin uyarılmasından dolayıdır (48).

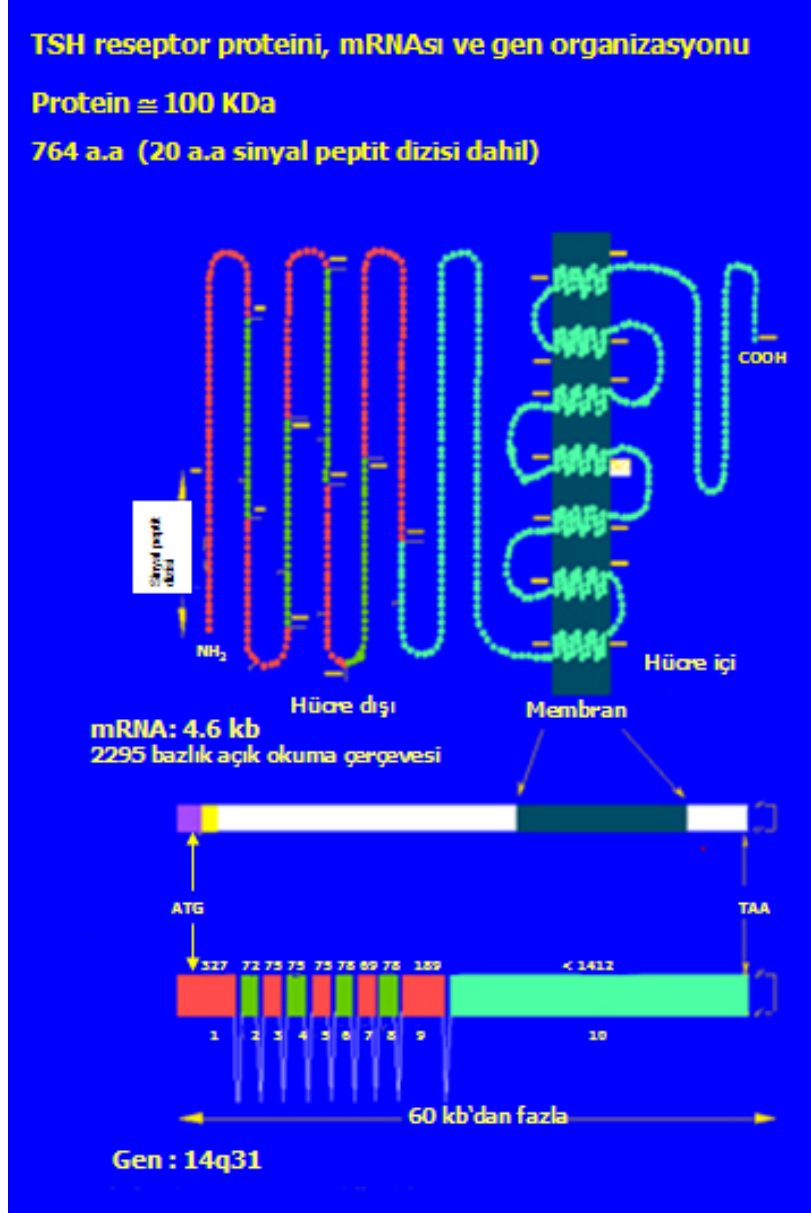
2.6. TSH Reseptörü

2.6.1. TSHR Geni ve Yapısı

İnsan TSHR geni kromozom 14q31'de yerleşmiştir (57). TSH reseptörü, G proteini ile ilişki kuran, klasik zar geçen yedi bölgeye sahip reseptör süper ailesinin (GPCRs; Glikoprotein bağlı reseptör) bir üyesidir. TSHR'ü LHR ve FSHR ile birlikte GPCRs'nin glikoprotein hormon reseptör (GPHR) 1 alt ailesine mensuptur (7, 58, 59,60). Zar geçen bölgelerde bu üç glikoprotein hormon reseptörü yüksek benzerlik (\cong %70) gösterirler. TSHR'ü ailenin diğer üyelerinden farklı olarak, tiroid bezinin embriyonik gelişim, büyüme ve fonksiyonunda önemli bir role sahiptir (7, 11).

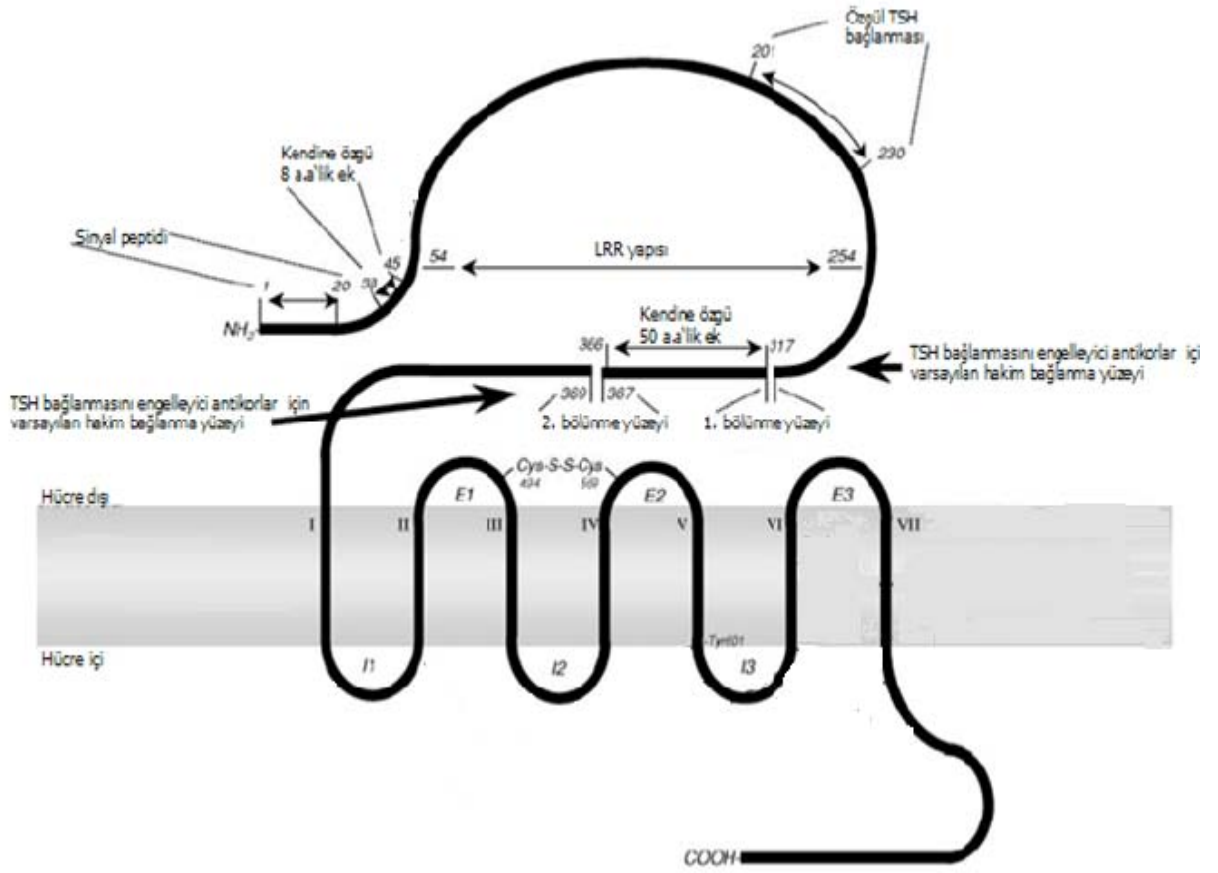
TSH reseptörü hücre dışı 350-400 aminoasitlik büyük bir bölüme sahiptir. Hormon bağlanmasında ve aktivasyonunda sorumlu olan kısmın hücre dışı yerleşen bu bölge olduğu düşünülmektedir (61). Reseptörün hücre dışı bölgeleri FSH reseptörü ve LH/CG reseptörü ile sırasıyla %39'luk ve %45'lik benzerlik göstermektedir (57, 62). 1989 ve 1998 yılları arasında çeşitli türlerin (insan, sıçan, fare, sığır, koyun, kedi) TSHR geni klonlanarak genel özellikleri ortaya çıkarılmıştır. Türler arasında yapılan karşılaştırmalarda TSHR geninde %90'dan fazla bir oranda benzerlik olduğu saptanmıştır (11).

14. kromozomun uzun kolu üzerinde yer alan insan TSHR geninin uzunluğu 60 kb'dan fazladır. TSHR'nün hücre dışı yerleşen bölgesini ilk 9 ekzon ve 10. ekzon kodlarken; reseptörün zar geçen bölgeleri ve hücre içi karboksiterminal kısmını tamamen 10. ekzon kodlamaktadır (57). Genin yapısı 2295 nükleotidden meydana gelmektedir ve 764 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Bunun ilk 21 aminoasitlik bölümü sinyal peptid kısmı oluştururken, 394 aa'lik bölümü glikozile edilmiş hücre dışı parçası, 349 aa'lik bölümünü ise 7TMD (zar geçen bölge) ve sitoplazmik kuyruğu oluşturmaktadır (63).



Şekil 8. TSH reseptörünün ve kromozomal gen lokusunun şematik olarak sunumu. TSHR geninde ekzonların uzunlukları daha önceki çalışmalarda bildirildiği üzere yazılmıştır. Ekzonlar numaralandırılmış ve intronlar V şeklinde şematize edilmiştir. TSHR geni herhangi bir skala ile ilişkilendirilmemiştir (64, 65).

LHR ve FSHR ile karşılaştırıldığında TSHR'ü farklı olarak hücre dışı bölgede 8 ve 50 aminoasitlik iki adet kısa ek bölgeye sahiptir. 8 aa'lık olan kısım TSH bağlanmasında rol oynarken 50 aa'lık ek kısmın fonksiyonu henüz tam aydınlatılamamıştır (66).

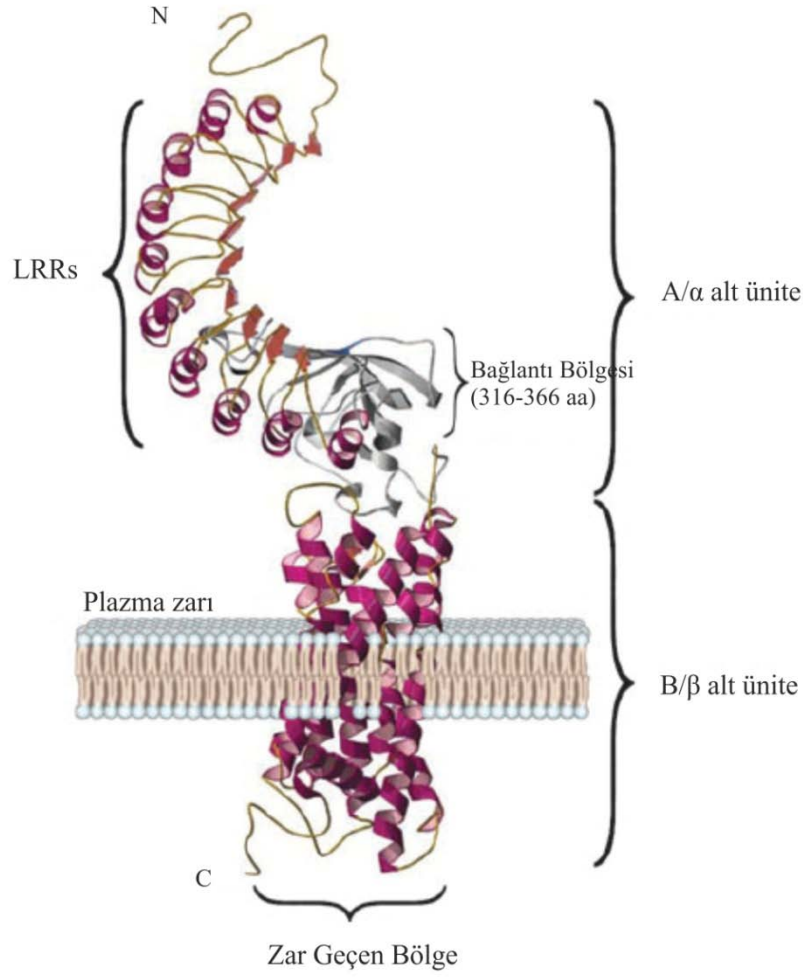


Şekil 9. TSHR' ünün farklı bölümlerinin işlevsel özellikleri (67). Büyük hücre dışı bölge GPCR'lerin en belirgin karakteridir. LHR ve FSHR ile karşılaştırıldığında TSHR' ünün hücre dışı bölgesinde yer alan 8 ve 50 aminoasitlik ekler reseptöre özgüdür. TSHR' ünün A ve B alt birimine bölünmesi C peptidinin serbest kalmasıyla neticelenir. Muhtemelen bölünme hücre dışı bölgede yer alan 1. bölünme yüzeyinin üst kısmında başlar ve bunu B alt biriminin yıkımı izler. Protein omurgada bir bölünme olmasına karşın TSHR' ünün hücre dışı bölümü karboksi terminal bölümle disülfid bağları vasıtasıyla bağlı kalır. Zar geçen bölgeler roman rakamları ile ifade edilmiştir. I1-3; Hücre içi kıvrımlar. E1-3; hücre dışı kıvrımlar. LRR; lösünce zengin tekrarlar.

Olgun TSHR yapısı $A\alpha$ ve $B\beta$ olmak üzere 2 farklı alt ünitelerden oluşmaktadır. A alt grubunu hücre dışı yerleşen bölüm oluştururken B alt grubunu membranöz ve hücre içi yerleşen kısım oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar TSH reseptörünün A alt ünitesinin glikozillenmiş yapıya sahip olduğunu, B alt birimine LHR ve FSHR 'de gözlenmeyen 50 aa'lık bağlantı bölgesi ve disülfid bağlarıyla bağlandığını göstermektedir. Moleküler klonlama yöntemleri ile bu iki alt ünitenin de tek bir gen

tarafından kodlandığı otaya konulmuştur. Bununla beraber TSH bağlanması ve sinyal iletisi esnasında iki alt birime ayrılmanın TSH hormonunun işlevi açısından herhangi bir önemi olmadığı ve yapısal, ligandan bağımsız aktivite ile de ilişkisi bulunmadığı tespit edilmiştir (68, 69).

TSHR'nün hücre dışı yerleşen bölümü lösince zengin tekrar bölgeleri (LRRs) içermektedir. Bu bölgeler β zincirlerle sağlanmıştır (70). Üç boyutlu modeldeki bu LRRs bölgeleri hormon bağlanmasında ve bağlantının spesifitesinde rol oynamakta ve β zincirler sayesinde reseptörün klasik at nalı görüntüsünü meydana getirmektedir. LRR bölge sınırında bulunan sisteince zengin bölgeler (sistein zengin kutu 1-3) moleküller arası disülfid bağlarını kurarak molekülün üç boyutlu yapısının oluşmasını ve reseptörün klasik iki alt üniteli yapısının devamlılığını sağlamaktadır (şekil 10)(66).



Şekil 10. TSHR yapısı. 7 zar geçen bölge ve hücre içi sitoplazmik kuyruğu temsil eden kısım B/β alt üniteyi oluşturmaktadır. 50 aa uzunluğundaki (316-366 aa) **cleaved** bölge gri olarak gösterilmiştir. Herbiri 20-24 aa'den oluşan 9 adet LRRs bölgeleri zar dışında yerleşen A/α alt üniteyi temsil etmektedir. LRRs bölgeleri karakteristik atnalı yapıyı oluşturmaktadır (68).

LRRs bölgeleri arasında dışa doğru lösin yapıda olmayan bölgenin de (8 aa'lık olan kısım) hormon etkileşimi ve bağlantının spesifitesinde rol oynadığı bilinmektedir. Yine bu üç boyutlu yapıda reseptörün LRR bölgeleri ile zar geçen bölgelerini birbirine bağlayan kısım menteşe bölgesi olarak tanımlanmaktadır. Bu menteşe bölgesinin baz dizisi her üç GPHR'ünde de farklılık göstermektedir ve kristal yapının detayları konusunda yeterli bilgi mevcut değildir. Yapılan son çalışmalar menteşe bölgesinin reseptörün sadece yapısal değil fonksiyonel işlevinde de rol oynadığını göstermiştir (70, 71, 72, 73, 74).

Ayrıca yapılan çalışmalarda TSHR geninin promotör bölgesinde korunmuş TATA / CAAT kutucuğuna sahip olmadığı ve üç transkripsiyon başlangıç bölgesi içerdiği gösterilmiştir (64). Tiroid foliküler hücrelerinde TSHR geninin ekspresyonu esnasında promotör bölgede demetilasyon olaylarının görüldüğü saptanmıştır (75).

TSHR ekspresyonunun tiroid foliküler hücrelerinin yanı sıra tiroidal olmayan dokularda da bulunduğu tespit edilmiştir. Olgun mRNA ve protein analizlerinde bu dokulardaki ekspresyon miktarının tiroidal dokuya göre 50-100 kat daha az olduğu gösterilmiştir. Bu durum TSH ya da TSH benzeri moleküllerin hastalıklarında tiroid dışı kliniğin açıklanmasında yardımcı olmuştur (9).

TSH reseptörünün tiroid dışı ekspresyonunun gözlemlendiği yapılar fibroblast hücreleri, beyaz ve kahverengi adipositler, kardiyak miyositler ve böbrek hücreleri olarak sıralanabilir (63).

Tablo 3. Tiroid dışı dokularda TSH reseptörünün dağılımı (63).

Doku	Eksprese edilen genler	mRNA ^A	Protein ^B
Lenfositler	TSHR	+	+
Timus	TSHR, NIS, TPO, Tg	+	+
Hipofiz	TSHR	+	+
Testis	TSHR	+	+
Böbrek	TSHR, Tg	+	RE
Beyin	TSHR	+	+
Adoposit hücreler ve fibroblastlar	TSHR	+	+
Kemik	TSHR	+	+

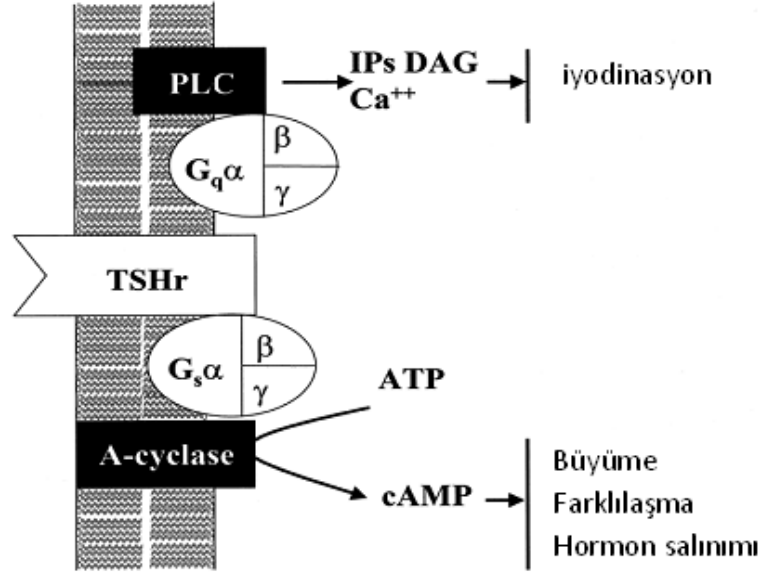
^A RT-PZR veya in situ hibridizasyon ile tanımlanmıştır. ^B İmmun-histokimsiyal yöntemler veya radyoligand bağlanma deneyleri kullanılarak tanımlanmıştır. RE, rapor edilmemiş; TSHR, TSH reseptörü; NIS, sodyum-iyodin simporter geni; TPO, Tiroid peroksidaz; Tg, tiroglobulin

İnsanlarda yapılan çalışmalar yenidoğan preadiposit hücrelerinin TSH'ya karşı duyarlı olduklarını, retroorbital preadiposit fibroblastların uygun kültür şartlarında TSH reseptörü taşıyan adiposit hücrelerine farklılaşabileceğini göstermiştir (11, 68). Lenfositlerde yapılan çalışmalarda ise lenfosit hücre yüzeyindeki TSHR ekspresyonunun hücrelerin olası parakrin veya otokrin kontrolünü sağlayabileceği ifade edilmektedir (7). Bununla beraber son yıllarda yapılan çalışmalarda barsak dokusunda intestinal mukozada tanımlanmış bir TRH-TSH ağı varlığı tanımlanmış ve barsak hücrelerince üretilen TSH hormonunun, TSHR aracılı bir mekanizmayla epitel hücreler arası lenfositlerin de işlevlerini düzenleyebileceği ifade edilmiştir (76). Bunun yanında inaktivatör TSHR mutasyonu taşıyan farelerin bozulmuş gastrointestinal bağışıklık belirtileri gösterdikleri bildirilmiştir (76, 77). Ayrıca, TSHR knock-out farelerde yapılan çalışmalarda, TSH'nın osteoblast ve osteoklast oluşumunda negatif bir düzenleyici etkiye sahip olabileceği gösterilmektedir (7). Adipositlerde düşük düzeyde TSHR varlığı da TSH'nın lipolitik etkisini açıklamaktadır (78, 79).

2.6.2.TSHR Aktivasyonu

TSH hormonu etkisini TSHR'üne bağlanarak G proteinleri aracılığı ile göstermektedir. TSH varlığında TSHR'ü başlıca G_saktivasyonu ve hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) oluşumu ile etki sağlanmaktadır. Ancak yüksek dozda TSH varlığında reseptör G_q ile eşleşerek fosfolipaz C bağımlı yolağı uyarır ve diaçil gliserol (DAG) ile inozitol 3 fosfat (IP3) oluşturarak etki eder. Fosfolipaz C yolağının uyarılması için gereken TSH konsantrasyonu cAMP yolağının uyarılması için gerekenden 5-10 kat daha fazladır. Buna dayanarak TSH'nın tiroiddeki başlıca etkisini cAMP yolağı üzerinden yürüttüğü kabul edilmektedir (80).

cAMP yolağının tirositlerin fonksiyon (tiroid hormon salınımı) farklılaşma ve büyümesi üzerinde pozitif uyarıcı rol oynadığını, fosfolipaz C yolağının ise başlıca iyodinasyonun kontrolü ve hidrojen peroksit (H_2O_2) sentezi üzerinde rol oynadığı gösterilmiştir (81).



Şekil 11. TSHR'ün etkisini kontrol eden yollar (80).

Yapılan işlevsel çalışmalar TSHR'ün ligand bağlanması olmadan ikincil haberci üretimini uyararak, diğer G protein bağımlı reseptörleri etkilemeden belli düzeyde spontan aktiviteye sahip olduğunu da göstermiştir (82, 83).

2.6.3. TSHR ve Tiroidal Hastalıklar

TSHR'ü mutasyon bağımlı ya da mutasyondan bağımsız olarak birçok hastalık etiolojisinde rol oynamaktadır. Bunlar Grave's hastalığından toksik adenomlara kadar değişen geniş bir grubu kapsamaktadır. GPCR ailesinin diğer üyelerinde olduğu gibi TSHR'ün de aktivatör ve inaktivatör mutasyonları tanımlanmıştır. Aktive edici mutasyonlar otozomal dominant geçiş gösteren, hiperfonksiyone tiroid adenomlarında olduğu gibi somatik (82, 84) ya da otoimmün olmayan ailesel hipertiroidizm ve

sporadik konjenital hipertiroidizm hastalarında olduğu gibi germline kalıtmalı (85, 86) olabilmektedir (11). TSHR'ündeki inaktivatör fonksiyon kaybettirici mutasyonlar (LOF) değişen derecelerde TSH direncine neden olmaktadır ve otozomal resesif kalıtım paterni sergilemektedir (87). Şekil 12 ve 13'te bu hastalıklara kısaca değinilmiştir.

Graves Hastalığı

- Otoimmün hastalık
- TSHR'ünü uyarıcı antikorlar var
- Göz bulguları mevcut
- Poligenik ya da multifaktöryel etyoloji
- Uyarıcı antikorların transplental geçişi ile geçici konjenital hipertiroidizme neden olabilir.



Otoimmün Hipotiroidizm

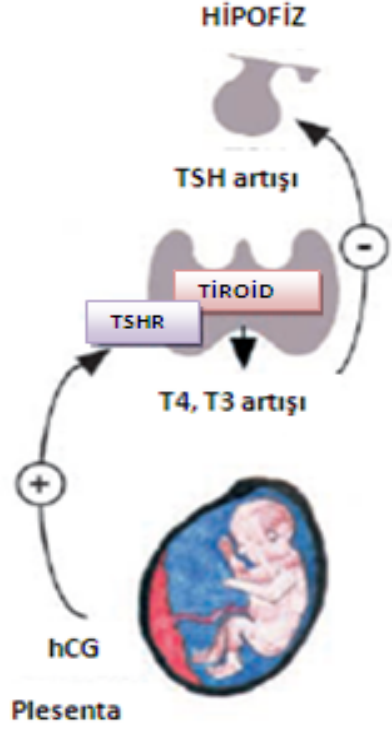
- Otoimmün hastalıktır
- TSHR'ünü bloke edici antikorlar bulunur
- Poligenik ya da multifaktöryel etyoloji
- Bloke edici antikorların transplental geçişi ile geçici konjenital hipotiroidizme neden olabilir.



Hcg'nin Uyardığı Hipertiroidizm

Gestasyonel Hipertiroidizm

- hCG'nin TSHR ile çapraz reaksiyona girmesi
- Hiperemesis Gravidarum ile de ilişkili olduğu düşünülüyor



Trofoblastik tümörler

- Hidatiform mol
- Koryokarsinom

Şekil 12. TSHR mutasyon bağımsız hastalıklar (11).

Aktive Edici Mutasyonlar

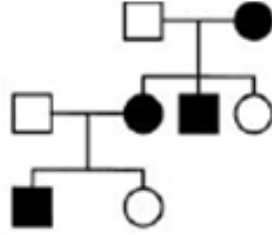
Toksik adenomlarda ve ötroid guatrlarda otonomisiteye neden olan somatik mutasyonlar



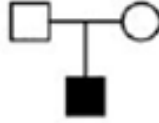
Ailesel Non-otoimmün Hipertiroidizm

Germline mutasyon

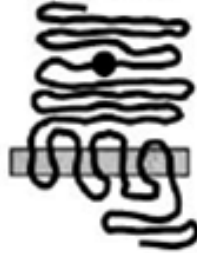
Otozomal dominant kalıtım



Sporadik Non-otoimmün Konjenital Hipertiroidizm, De novo germline



Ailesel Gestasyonel Hipertiroidizm ve hCG'ye artmış hassasiyet



İnaktive Edici Mutasyonlar

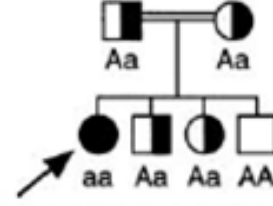
-Ötroid Hipertirotropinemi; (Kompanse hipotiroidizm)

Parsiyel inaktivatör mutasyon ile oluşur.

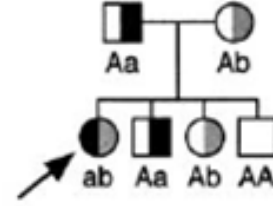
-Ciddi Hipotiroidizm; Her iki allelde de inaktivasyon söz konusu olduğunda kullanılır.

-Otozomal resesif;

a- Defektif allelde homozigot



b- Defektif allelde birleşik heterozigot



Şekil 13. TSHR mutasyon bağımlı hastalıklar (11).

2.7. Konjenital Hipotiroidi

2.7.1.Hastalığın Tanımı ve Epidemiyolojisi

Konjenital hipotiroidizm (KH) tedavi edilebilir mental retardasyona neden olan en yaygın metabolik hastalıktır. Büyüme, gelişme ve metabolik düzenin sağlanabilmesi için normal tiroid fonksiyonu zaruridir. Bu normal fonksiyon için normal gelişmiş tiroidal doku, tiroid hormon sentez sisteminin düzgün çalışması ve yeterli iyot alımı gereklidir. İyot alımının yeterli olduğu bölgelerde kalıcı konjenital hipotiroidizm 1/3000-4000 sıklığında gözlenmektedir (88).

3.7.2 Etiyolojik Faktörler

Konjenital hipotiroidizmin etiyojisinde farklı mekanizmalar rol oynamaktadır. KH vakalarının %10'una 'dishormonogenez' olarak adlandırılan tiroid hormon sentez basamaklarında gözlenen bozukluk neden olmaktadır. %85'lik kısmını tiroid disgenezisi olarak nitelendirilen bir grup heterojen tiroid gelişim anomalileri oluşturmaktadır. Bu anomaliler içinde tiroid (hemi)agenezisi, ektopik tiroid dokusu, triglossal kanal kisti ve tiroid hipoplazisi sayılabilmektedir (89, 90). Tiroid disgenezisi vakalarının büyük bir çoğunluğu sporadik olmasına rağmen %2'lik bir kısmında genetik etiyojiyi destekleyen ailesel olgular dikkat çekmektedir (30).

Santral (sekonder) hipotiroidizm olarak da adlandırılan hipofizer ya da hiptolamik kaynaklı nedenlerde tirotropin (TSH) veya tirotropin salgılayıcı hormon (TRH) salınımında yetersizlik oluşturarak KH etiyojisinde rol almaktadır. Geriye kalan yaklaşık %5'lik bir kısımdan da transplental yol ile çocuğa geçen maternal antikorlar sorumlu tutulmaktadır (88).Yenidoğanda gözlenen tiroid hormonu metabolizma bozuklukları aşağıdaki tabloda genel olarak belirtilmiştir.

Tablo 4. Yenidoğanda tiroid hormon metabolizma bozuklukları ve moleküler anomaliler (18).

Yenidoğanda Tiroid Hormonu Metabolizma Bozuklukları										
Klinik Özellikler										
Anormallik	Prevelans	Kalıtım	KH	Guatr	T,	TSH	Tg	RAIU	Diğer	Moleküler anormallik
Ailesel TSH eksikliği	Nadir	OR	Var	Yok	↓	↓	↓	↓	TSH/TRH'ya cevap yok.	TSHβ gen mutasyonu
Pitüitüer defektif hipopitüitarizm,	Belirsiz	OR	Var	Yok	↓	Niveya ↓	↓	↓	GH/Pr eksikliği	Pitüitüer mutasyonu
TSH Dirancı	Nadir	OR	Var	Yok	↓	↑	↓	N	TSH'ya RAIU, Tg, T ₄ cevabı yok.	TSHR gen mutasyonu
iyot transport defektleri	Nadir	OR	Var	Var	↓	↑	↑	↓	Salgın ve gastrik dokularda iyot konsantrasyon defektleri. Hipotiroidi iyot Rx'e bağlı.	Defekt tanımlı değil.
Organifikasyon defektleri	1/40000 YD	OR	Var	Var	↓	↑	↑	↑	Pozitif periklorat discharge test	TPO veya THOX mutasyonu
Pendersendromu	1/50000 çocuk	OR	Değişken	Var	N/↑	↑	↑	↑	Sağırık, Pozitif periklorat discharge	Pendirin mutasyonu
Tiroglobulin defektleri	1/40000 çocuk	OR	Var	Var	↓	↑	↑	↑	TSH'ya Tg cevabı yok. Genelde Tg düşük.	Tg gen mutasyonu (Eksik/defektif Tg).
iyodotirozin Defektleri	Nadir	OR	Var	Var	↓	↑	↑	↑	RAIU ↑, Serum MID, DIT ↑.Ekskresyon sağları ama deiyodinasyon bozuk.	DEHAL1 mutasyonu.
Tiroid hormon direnci	1/100000 YD	OD/Sporedik	Değişken	Var	↑	N,↑	↑	↑	Yaygın direnci: TSH N ↑; Periferik direnci: TSH ↑; Hipofiz direnci: TSH ↑ (Hasta hipertiroid)	Tiroid nükleer reseptör gen mutasyonu (TRβ; TRα2)
Tiroid hormon transporter defektleri	Nadir	Xbağlımlı	SSS hasan	Yok	↓	N,↑	N	N	Artmış T ₄ ;psikomotor; retardasyon	Monokarboksilat transporter MCT8 gen mutasyonu
iyodotirozin deiyodinaz eksikliği	Nadir	OR	Yok	Yok	↑	↑	N-↑	N-↑	Azalmış T ₄ ve artmış rT ₃	SECISBP2 gen mutasyonu
OD hipertiroidizm	Nadir	OD	Hiper değil	Var	↑	↓	↑	↑	Tiroid otoimmünitesi yok	Aktivatör TSHR gen mutasyonu.

(OR= Otozomal resesif, OD= Otozomal dominant, Tg= serum tiroglobulin, RAIU=Tiroid radyoaktif iyot alımı, SSS= Santral sinir sistemi)

Daha önce tiroid embriyolojisinde belirtildiği üzere tiroid bezi memelilerde gelişim basamaklarında ortaya çıkan ilk salgı dokusudur. Tiroid bezi, tiroid foliküler hücrelerini oluşturan endodermal orijinli tiroid divertikulumu ile kalsitonin salgılayan parafoliküler C hücrelerine dönüşen nöroektodermal orijinli ultimobrankial cisimlerden oluşan iki farklı embriyolojik yapının birleşmesi neticesinde ortaya çıkar. Gestasyonun 16-17. günlerinde görünür hale gelir. İyot tutmaya ve tiroid hormonu sentezlemeye gestasyonun 10-12. haftalarında başlar. Bu döneme kadar anneye ait hormonların plenta yolu ile fetuse geçişi fetal gelişimde önemlidir (91).

Günümüzde tiroid hormonlarının kranial sinir sistemi gelişimi için gerekliliği açıkça ortaya konulmuştur ve tiroksin hormon yerine koyma metodu ile KH tedavisi mümkün kılınmıştır (92). Bu amaçla erken tanı ve tedavi için tarama programları yapılmaya başlanmıştır. Yenidoğan hipotiroidizminin taraması dünyada ilk kez 1974 yılında Kanada'da başlamıştır. KH gelişen infantlarda tarama metodları ile tanının erken konulması ve tiroksin replasmanı sayesinde ortaya çıkabilecek zekâ geriliği ve infertilitenin önüne geçilmiştir. Ayrıca bu yerine koyma tedavisi ile çocukların büyüme-gelişmelerinde ciddi bir düzelme, IQ'larında belirgin bir artış sağlanmıştır (93).

KH vakalarının çoğu sporadik olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak dishormonogenetik vakaların bazen resesif kalıtıldığı, son çalışmalarda da tiroid disgenesisi vakalarının %2'inde ailesel geçiş olduğu saptanmıştır (30). İngilterede KH'li hastalarda yapılan bir başka çalışmada tiroid kaynaklı olmayan konjenital anomali sıklığı %7 olarak belirtilirken, kromozomal anomalilerle olan birlikteliği %1,5 olarak tespit edilmiştir (94, 95).

2.7.3 Otoimmün Olmayan Primer Konjenital Hipotiroidiye Neden

Olabilecek Genetik Faktörler

Otoimmün olmayan primer KH'e neden olan genler başlıca iki ana grupta incelenebilmektedir. Bunlar;

1-Tiroid disgenezisine neden olan genler

- Sendromik olmayan KH'e neden olan genler (TSHR geni)
- Sendromik KH'e neden olan genler (TITF1, TITF2, PAX8 ve Gsα genleri)

2-Dishormonogenezise neden olan genler

- Tiroid peroksidaz (TPO) geni
- Tiroglobulin (Tg) geni
- Sodyum-iyot simporter (NIS) geni
- Pendrin (PDS) geni
- Tiroid oksidaz 2 (THOX-2) geni

Yapılan son çalışmalarda ciddi nörolojik bozukluklarla seyreden KH hastalarında iyodotironin taşıyıcı geni (MCT8) denilen üçüncü bir grup gen daha tanımlanmaktadır (91).

2.7.3.1.Tiroid Disgenezisi ve Sendromik Olmayan Konjenital Hipotiroidi

TSH reseptör (TSHR) gen ekspresyonunun başangıcı bezin göç aşamasını tamamlayıp farklılaşma aşamasının başladığı dönemde olduğu için TSH sinyal yolağında

olan anormallikler yetersiz tiroid bez gelişimine neden olmaktadır. Bu durumda bez normal yerinde ancak gelişimi bozuk olacaktır (91).

Fare modellerinin aksine insanda sağlam bir TSH-TSHR sinyal yolağının varlığı tiroid bezinin normal yerinde ve tam farklılaşması için şarttır (96). TSHR genindeki homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyonların TSH direncine yol açtığı ilk kez 1995 yılında tanımlanmıştır (97). Daha sonra farklı ailelerde değişen derecelerde TSH direnci ve azalmış TSH duyarlılığının gözleendiği farklı fonksiyon kaybettiren mutasyonlar (LOF) tanımlanmıştır. Bu ailelerin bir kısmında bezin normal ya da hipoplastik olduğu, kompanze TSH direnci gösteren ötiroid hipertirotropinemili olgular tanımlanmıştır (97, 98, 99, 100, 101). İki ailede ise bezin yerleşiminin normal olduğu, TSH düzeyinde ciddi artış ile düşük normal ya da hafif düşük tiroid hormon değerlerinin gözleendiği hafif veya orta düzeyde hipotiroidizm gözlenmiştir (102, 103). Diğer taraftan ise tiroid bezinin hipoplastik veya atrezik olduğu ciddi hipotiroidizimli olgularda yayınlanmıştır (87, 104, 105, 106). Bunlara dayanarak insanda TSHR geni inaktivatör mutasyon kliniği üç fenotipik tablo ile ilişkilendirilmiştir (91).

- 1- TSH'ya direncin tamamen desteklendiği → Tam kompanze TSH direnci
- 2- TSH'ya direncin daha az desteklendiği → Kısmi kompanze TSH direnci
- 3- TSH'ya direncin desteklenemediği → Ciddi TSH direnci.

TSHR geninde heterozigot LOF germline mutasyonun gözleendiği, TSH düzeyinde hafif artış gözlenen olgular da yayınlanmıştır (87, 97, 99, 107). Yapılan ultrasonografik (USG) taramalarında bunların biri haricinde (hipoplazik tiroid) diğerlerinin hepsinde bez normal yerinde ve ötopik bulunmuştur (87). Bunlardaki klinik fenotip homozigot ya da birleşik heterozigot TSHR gen mutasyonunun gözleendiği

kompanse TSH dirençli hastalardan ayırlanamamaktadır. Bu nedenle otozomal dominant geçişin gözlemlendiği non-otoimmün subklinik hipotiroidizmlilerde, TSHR geninde olması muhtemel heterozigot mutasyonlar da her zaman göz önünde bulundurulmalıdır.

2.7.3.2. Tiroid Disjenezi ve Sendromik Konjenital Hipotiroidi

Yapılan çalışmalar tiroid bezinin embriyonik gelişimi sırasında bazı transkripsiyon faktörlerinin rol oynadığını göstermiştir. Tiroid bezinde bu transkripsiyon faktörlerinin ana hedefi TPO ve Tg genleridir. İnsan konjenital hipotiroidizm hastalarında çalışılan bu transkripsiyon faktörleri TTF1, TTF2 ve PAX8 dir. Farede yapılan deneylerde TTF1, TTF2 ve PAX8 geninin ekspresyonu gestasyonun 9.5'uncu gününde, tiroid göçünün başladığı ilk evrelerde başlamaktadır. İlerleyen dönemlerde embriyonik gelişim üzerine etki etmektedir. Tiroid bezindeki farklılaşma ise gestasyonun 14.5'uncu gününde TSHR, TPO ve Tg genlerinin ekspresyonu ile başlamaktadır (91).

TTF1

NKX-2.1 olarak da bilinir. NK-2 gen ailesine bağlı bir transkripsiyon faktörüdür. Kromozom 14q13'de yerleşmiştir. 42kDA ağırlığında protein kodlayan 3 ekzondan oluşmaktadır (108).

Hayvan deneylerinde heterozigot mutantlarda ötiroidik fenotipe rağmen motor koordinasyon becerilerinde azalma göze çarpmaktadır (109). Homozigot mutantlarda ise akciğer dokusu, tiroid bezi, hipofiz bezin bir kısmı ve önbeyin gelişimi defektiftir ve ölü doğmaktadırlar (110). TTF1'in Tg, TPO, tiroid foliküler hücrelerindeki TSHR geni ve epitelyal akciğer hücrelerindeki sürfektan protein B (SBP) genlerinin ekspresyonlarını düzenlediği bilinmektedir (111, 112, 113). TTF1 mutasyonunun

akciğer gelişimi ile olan ilişkisi TTF1 mutasyonu olan bir vakada kompanze KH bulunan ancak bronşial morfolojisi tam olmasına rağmen respiratuar distress gelişen bir olguda tanımlanmıştır (114, 115).

TTF1 mutantlarda gözlenebilecek diğer klinik bulgular hipotoni, dirençli ataksi, dizartri, baş küçüklüğü, koreatetoz, yağın gelişimsel gerilik olarak sıralanabilir. Bu bilgiler TTF1'in beyin gelişimi üzerindeki rolüne dikkat çekmektedir (115, 116).

TTF2

FKHL15, FOXE1 olarak adlandırılır. 9q22'de yerleşen gen, tek ekzondan oluşmaktadır (117).

Hayvan deneylerinde heterozigot knock-out fareler ötiroidik ve normal iken homozigot null olanlarda yarı damak ve tiroid disgenezisi gözlenmiştir (Tiroid agenezisi, ektopik sublingual bez). Ayrıca yenidoğan dönemde de ölümcüldür (39).

Homozigot missense A65V mutasyonu taşıyan 2 olguda homozigot farelere benzer şekilde yarı damak ve tiroid agenezisinin eşlik ettiği KH saptanmıştır. Ancak bu olgularda ek olarak diken saç, bilateral koanal atrezi ve hipoplastik bifid epiglottis de gözlenmiştir. Mutant olan bu TTF2 proteininin DNA bağlanmasında ve transkripsiyonel fonksiyonda bozukluğa neden olduğu düşünülmektedir (118).

PAX 8

2q12-q14'de yerleşen, 11 ekzondan oluşan bir gendir. 9 üyeli 'Paired box homeodomain' ailesinin üyesidir (119). Yapılan çalışmalar tiroid hücre farklılaşmasının başlangıcında ve devamlılığında (proliferasyonu) önemli rol oynadığını göstermiştir (120). Hayvan deneylerinde heterozigot mutantlarda tiroid bezinde klinik oluşmazken; insanda değişen derecelerde KH kliniği saptanmıştır (tiroid bezi hipoplazik bazen

ektopik, bir vakada doğumda tiroid bezi normal ancak ilerleyen dönemlerde bez hipoplazik duruma geçmekte). Bu olguların bir kısmı otozomal dominant geçiş gösterirken bir kısmı ise sporadik olarak bildirilmiştir (121, 122).

PAX8, TPO ekspresyonunda da etkili olması nedeni ile PAX8 mutasyonlarında kısmi organizasyon bozukluğunda gözlenebilmektedir (120). Hiperkalsiüri ile ilişkili tek taraflı böbrek gelişim anomalili olgular da bildirilmiştir (116, 122).

Bu nedenle PAX8 mutasyonu nedenli KH vakaları sendromik ya da sendromik olmayan KH olabilmektedir. PAX8'in TPO, Tg ve NIS ekspresyonları üzerindeki aktive edici rolü TTF1 ile aynı yönde etki göstermektedir (123, 124).

GNAS1

Uyarıcı G protein alfa alt ünite geni (GNAS1) kromozom 2q13'de yerleşmiştir. Gs α 'yı kodlar. 13'ün üzerinde ekzonu vardır. Gs α intrinsik GTP'ase aktivitesine sahiptir (125). G proteinleri hücre dışı yerleşen reseptörleri ile sinyal iletimini düzenler. TSH, TRH, PTH ve LH, G proteinleri üzerinden iyon kanalları, adenil siklaz ve fosfolipaz C gibi ikincil iletim sistemi ile hücre içi etki göstermektedir (126).

GNAS1'in heterozigot inaktivatör mutasyonu Albright'ın kalıtsal osteodistrofisi ile sonuçlanır. Otozomal dominant olan bu bozukluk kısa yapı, kısa 4. ve 5. metakarp ve metatarslar, obezite, cilt altı kemikleşme, intrakranial kalsifikasyon ve değişen derecelerde zekâ geriliği ile karakterizedir. İmprinting mekanizmasının gözlenebildiği bu gende imprintingın anne geçişi söz konusu olduğunda klinik Psödohipoparatiroidizm 1a (PHP1a) fenotipinde olurken, baba geçişli imprintingde Pseudopseudohipoparatiroidizm (PPHP) kliniği gözlenmektedir (127). PPH1a'da PTH, TSH hormonlarına son organ direnci, serumda düşük Ca, yüksek fosfat, PTH, TSH

gözlenirken PPHP hastalarında biyokimyasal profili normal olan Albright'ın kalıtsal osteodistrofisi gözlenmektedir. TSH direnci hafiftir, sıklıkla ciddi hipotiroidizme neden olmaz. TSH direnci ise yaş ile artış göstermektedir (128).

2.7.3.3.Dishormonogenez ve Konjenital Hipotiroidi

Normal gelişimini tamamlamış bir hipotalamik-hipofiz-tiroid yolağında ürün tiroid hormonlarıdır. Tiroid foliküler hücreleri bazolateral zarda bulunan sodyum iyot simporterı sayesinde iyotu aktif bir mekanizma ile tiroid bezine alır ve yoğunlaştırır. (Fig 3) Hidrojen peroksitle oksitlendikten sonra tiroglobulinin tirozin rezidülerine bağlanarak iyodotirozini oluşturur (İyot organifikasyonu). Bu iyodotirozin rezidülerinin bir kısmı hormonal olarak aktif değildir (Monoiyodotirozin, diiyodotirozin) ve birbirleri ile eşleşerek aktif iyodotironinleri oluştururlar (T_4 , T_3). TPO oksidasyon, organifikasyon ve eşleşme reaksiyonlarını katalizler. Bu basamakların herhangi birinde oluşan bozukluk KH ve guatra neden olur (129). Nadir birkaç vakanın dışında bu basamaklardan sorumlu genler otozomal resesif kalıtıma uyar.

TPO

İyot oksidasyonu, organifikasyonu ve iyodotirozin eşleşmesinden sorumludur. Tiroid foliküler hücrelerinin apikal zarında yerleşir. Kromozomal olarak 2p25'de yerleşen insan TPO geni DNA'sı yaklaşık 150kb'dir (79). Dishormonogenezin en sık nedeni TPO eksikliğidir. TPO gen bozukluğu tam iyot organifikasyon eksikliğinin gözlemlendiği KH vakalarında bildirilmiştir (91).

Tiroglobulin

Tiroid bezinde sentezlenen, 330000 Da ağırlığında alt ünüteleri olan homodimerik bir yapıdır. Tg geni 300000bp uzunluğunda, 42 ekzona sahip ve 8q24'de

yerleşmiştir (130). Tg gen mutasyonu ile serum Tg yoğunluğunun düşük olduğu orta veya ciddi KH tablosu ortaya çıkmaktadır. Etkilenen olguların serumlarında anormal düzeyde iyodoproteinler bulunur (özellikle iyodine albümin). Bu iyodopeptidler idrarla atılır. İnaktif T₄ ve T₃ oluşumu söz konusudur. Tg sentezinin bozuk olduğu konjenital guatrli olgular bildirilmiştir (91).

NIS (Na-I Simporter)

12 zar geçen yapıya sahip 65 kDA olan iç zar proteinidir (131). Normal ve neoplastik tiroid dokularının yanı sıra tükrük bezinde, mide mukozasında, meme, kolon, plentada ve koroid pleksusundada ekspresyonu bulunmaktadır. NIS geni 19. Kromozomun p kolunda lokalize, 15 ekzon, 643 aa'den oluşan bir yapıdır (132). Kalıtsal iyot taşıma bozukluğu klinikte guatröz hipotiroidizm ve tiroid bezinde radyoiyot alımının olmaması ile karakterizedir. LOF mutasyonlarının otozomal resesif geçtiği 1997 yılında gösterilmiştir. Hipotiroidizmin derecesi değişkendir (tam kompanzasyondan ciddi hipotiroidizime kadar) ancak guatr her zaman mevcuttur. Diyetle iyotu yüksek miktarda alanların kliniği az alanlara göre daha hafiftir. Bu nedenle tedavide tiroid hormonu verilmesi yerine iyot desteği tercih edilmektedir (91).

PDS

21 ekzondan oluşan, 7. Kromozomun q kolunda yerleşmiş, tiroid bezi ve kohleada eksprese olan bir gen dir (133). 780aa büyüklüğünde, 86 kDA'luk, klor-iyot taşınmasında görevli pendrin proteinini kodlar (134). Pendrin bazolateral yerleşen NIS'in aksine apikal zar da yerleşmiştir. Hipoteze göre pendrin tiroitin apikal zarından aldığı iyotu kolloid lümene aktarır. Pendered sendromunda bu basamak bozulur, iyot

tirosit tarafından normal olarak alınır ancak koloide etkin bir şekilde aktarılamaz, tiroglobuline bağlanamaz (91).

Pendred Sendromu: İlk kez 1896 yılında Vaughn Pendred tarafından tanımlanan sendrom sensorinöral işitme kaybı ve guatr ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. İnsidansı 7.5-10/100000'dir. Sendromik işitme kaybının en sık nedenidir (135). Tiroid bezi anomalileri sıklıkla multinodüler veya diffüz guatr olarak gözlenmektedir ve hayatın ikinci on yılına kadar ortaya çıkmamaktadır. Guatra rağmen hastalar ötiroidiktir. Nadiren KH ortaya çıkar (136). TSH düzeyi sınırdan yüksektir. Aile içi fenotipik farklılık gözlenmektedir. Perklorat yükleme testi sıklıkla pozitif ancak negatif olması tanıyı dışlamaz (135, 137).

NADPH Oksidaz

THOX1 ve THOX2 genleri ile kodlanır. Tirositlerin apikal zarında yerleşmiştir. Tiroiddeki H_2O_2 'devamlılığından sorumludur (138). Her iki gen de büyük çoğunlukla tirositte eksprese olur. H_2O_2 eksikliğinde iyot düzeyi normal olmasına rağmen TPO fonksiyon göremez. THOX1 ve THOX2 genleri 75 kb'lık bir alanda yan yana yerleşiktir. Sıra ile 35 ve 34 ekzondan oluşurlar. THOX'un tiroid bezinde Ca^{+2} /NADPH bağımlı H_2O_2 üretimine katkısı henüz tam aydınlatılamamıştır. THOX2'de yakın zamanda tanımlanan heterozigot trunkasyon mutasyonu hafif, geçici KH ve kısmi iyot organifikasyon bozukluğu ile karakterize olurken homozigot mutasyonunda ciddi KH ve tam iyot organifikasyon bozukluğu ile karakterizedir. Ancak hastalarda guatr bulunmaz (91).

2.7.3.4. İyodotironin Taşıyıcı Defekti ve Sendromik Konjenital

Hipotiroidizm

Hipofizden salınan TSH hormonu etkisi ile tiroid bezi tiroid hormonlarını üretir. Sentezlenen başlıca hormon T_4 'tür ve T_4 de prohormon olarak üretilir. Bu da 5' monoiodinizasyonla biyolojik olarak daha aktif olan T_3 'e dönüştürülür. Negatif kontrol etki ile T_3 TSH salınımını bloke eder. Tiroid hormonları etkilerini çekirdek reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Bunun için de zar yapısı geçip çekirdek reseptörlerine ulaşmalıdır. Yapılan çalışmalarda hücre zarında tiroid hormonlarının zar yapıdan geçişini sağlayan bir takım tiroid hormon taşıyıcıları tanımlanmıştır. MCT8 geni ile kodlanan ve 5 ekzondan oluşan bu gen Xq13.2'de yerleşmektedir (139). Ciddi nörolojik bozuklukların eşlik ettiği sendromik konjenital hipotiroidizm tablosu ile karakterizedir. Klinikte konjenital hipotiroidizm bulgularının yenidoğan döneminde gözlenmediği, erken infantil dönemde santral hipotoni, periferik hipertoni, distoni, rotatuar nistagmus, diskonjuge göz hareketleri, beslenme bozukluğu, kusma, aspirasyon, irritabilite ve spastik quadriplejinin eşlik ettiği motor ve mental gelişim geriliği olan erkek olgular tariflenmiştir. MCT8 gen ekspresyonu beyin, tiroid, hipofiz ve plesentada da dâhil birçok dokuda bulunmaktadır. MCT8 mutasyonunu taşıyan dişi olgularda tiroid fenotipi daha hafiftir ve nörolojik bulgular gözlenmemektedir. Bu yönü ile X'e bağımlı konjenital hipotiroidizimin hedef dokuda gözlendiği ilk hastalıktır (140).

2.8. TSH Direnci Tanısına Genel Bakış

Tam veya kısmi TSH direncinin tanısında kullanılan biyokimyasal ve klinik özellikler tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5. TSHR LOF mutasyonlarında tam ve kısmi TSH direncinin ayırıcı tanısında kullanılabilen değerler(66).

Özellik	Tam Direnç	Kısmi Direnç
Yenidoğan konjenital hipotiroidi taraması	Pozitif	TSH bağımlı değişken derecelerde pozitif, T ₄ bağımlı negatif
Hipotiroidizmin derecesi	Ağır hipotiroidi	Hafif hipotiroidi ya da ötiroidi (Sabit veya ilerleyen yıllarda hipotiroidi gelişmeye meyilli)
İlişkili anomali	Yok	Yok
Tiroid sintigrafisinde radyoaktif alım	Yok	Var
Tiroid USG	Aşırı / derin hipotiroidi	Normal /hipoekojenik özellikte hipoplazi
Serum Tg	Ölçülebilir	Ölçülebilir
Tiroid otoimmünitesi	Yok	Yok
Dolaşan TSH biyoaktivitesi	Normal	Normal
Paratiroid fonksiyonu	Normal	Normal

Herhangi bir hasta doğumda normal pozisyonunda ve ağır tiroid bezi hipoplazisi ile birlikte ciddi hipotiroidi kliniği gösteriyorsa bu hastada tam TSH direncinden şüphelenilmelidir. Bu nedenle diğer tiroid disgenezi formlarında -agenezi(?) ve ektopik tiroid dokusu- bu tanıdan uzaklaşılmalıdır. Tam TSH direnci olması halinde hastanın radyoaktif iyot tutulumu gözlenmezken serumda Tg değerleri ölçülebilir değerde mevcuttur. Tiroid sintigrafisinde bariz agenezinin gözlendiği olgularda tiroid USG'sinde bez görülebiliyorsa NIS defekti düşünülebilir. NKX2.1 mutasyonu olan hastalarda koreatetoz gibi nörolojik bozukluklar ve akciğer anomalileri beklenmektedir. PAX8 mutasyonu varlığında böbrek anomalileri gözlenmektedir. NKX2.1 ve PAX8 mutasyonları moleküler genetik analizler ile dışlanabilir. Tam TSH direncinde

homozigot çekinik kalıtım beklenmektedir ancak hafif biyokimyasal ve klinik özelliklerin gözlemlendiği heterozigot akrabalarda unutulmamalıdır.

Kısmi TSH direncinin gözlemlendiği tablo tam dirence göre daha karmaşıktır. Orta düzey dirençte serum TSH değerleri tam dirençte olduğu gibi yüksek olabilir. Ancak buradaki yükseklik yüksek TSH değerleri ile tiroisit direncinin kırılabilmesi ve büyüme ile fonksiyonun devamının sağlanabilmesi ile ilgilidir (66) .

Kısmi TSH direnci gözlenen hafif/orta düzey KH hastaları dishormonogenetik anomalilerden de ayırt edilmelidir. Bu radyoizot alımı (NIS defektinde alım belirgin bir şekilde bozuktur) ya da perklorat boşalma testi (DUOX2 gibi mutasyonlarda iyodun organifikasyonu bozuktur ve boşalma testi pozitifdir) ile yapılabilir.

Kısmi TSH dirençli hastalarda gözlenen tiroid fonksiyon test değerleri toplumda sık olmasına rağmen bu olguların çok azı TSHR geni mutasyonunu taşımaktadır. Bu nedenle tanıda otoimmün tiroidal hastalıklar (OİTH), TSH molekül ve aktivite bozuklukları ve daha önce belirttiğimiz tiroid transkripsiyon faktörlerinde olduğu gibi primer konjenital hipotiroidi nedenleri ayrılmalıdır. Ergen ve erişkin yaş grubunda TSH yüksekliğinin en sık nedeni olan OİTH tanısı klinik hikâye, anti-tiroid antikorları ölçümü (yenidoğanda anti-TSHR antikorları dâhil) ve tiroid USG'sine dayanmaktadır. Anti-tiroid antikorların varlığı ve/veya USG'de tipik heterojen hipoekoik görünüm OİTH'larını destekleyicidir. OİTH'nı destekleyen diğer bir veri ise hastalığın ileri yaşlarda subklinik formdan ciddi forma dönüşmesi olarak belirtilebilir. Monoallelik TSHR mutasyonu taşıyan hastalarda TSH düzeyleri normalin üst sınırı civarında bir değerde değişkenlik gösterebilmektedir ancak infantil dönem, gebelik ve östrojen uygulaması gibi tiroidal aktivitenin arttığı durumlarda yükselmesi beklenmektedir.

Yine TSH düzeyinin yükseldiği santral hipotiroidi vakaları da mevcuttur. Bu durum hipotalamik (tersiyer) hipotiroidizm hastalarında gözlemlenen bir klinik tablodur. Bunda yüksek konsantrasyonda immunoreaktif ancak biyolojik aktivitesi azalmış TSH söz konusudur. Tüm bunların dışında TSH direnci çoklu hormon direnç sendromlarında bir parçası olabilmektedir (PHP1A ve 1B). Bunlar Gsα gen mutasyonları sonucu gözlenmektedir. Yüksek paratiroid hormon değerlerine bağlı hipokalsemi ve hiperfosfatemi varlığı ve diğer hormon dirençlerine bağlı klinik özelliklerin değerlendirilmesi ile tanılabilmektedir (66) .

2.9.Konjenital Hipotiroidizmli Çocuğa Yaklaşım ve Bazı Önemli Değerler

Tarama testinin doğumdan sonraki ilk 2 ila 5 gün içerisinde yapılması önemlidir. Yenidoğan hipotiroidi taramasının ana hedefi eksik olan tiroid hormonunun yerine konması ve olası zekâ özürünün ortaya çıkmadan önlenmesidir. Beyin korteksinde kullanılan T₃'ün %70 'inin kaynağı bölgesel T₄ monodeiyodinasyonu ile olmaktadır (141) Bu nedenle tedavide preperat olarak T₄ tercih edilmektedir. Tarama testi sonrasında izlenebilecek tanısal yaklaşım şekil 14'te, yaş ile serum T₄, TSH, TBG ve tiroglobulin konsantrasyon değerleri tablo 6'da; yaş ile serum T₃, rT₃, sT₄ ve sT₃ konsantrasyon değerleri tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 6. Yaş ile serum T₄, TSH, TBG ve Tiroglobulin konsantrasyon değerleri (18).

Yaş ile serum T₄, TSH, TBG ve Tiroglobulin konsantrasyon değerleri				
	TSH§ (µU/mL)	T₄† (µg/dL)	TBG† (mg/dl)	TG† (ng/mL)
Kord kanı	1-20	6.6-15.0	0.8-5.2	15-101
1-7 gün	1-39	11-22	0.8-5.2	1-110
1-4 hafta	0.5-6.5	8.2-17	0.6-5.0	11-92
1-12 ay	0.5-6.5	5.9-16	1.6-3.6	12-113
1-5 yaş	0.6-6.3	7.3-15	1.4-2.8	5-72
6-10 yaş	0.6-6.3	6.4-13	1.4-2.8	3-40
11-15 yaş	0.6-6.3	5.5-12	1.4-2.8	3-40
16-20 yaş	0.5-6.0	4.2-12	1.4-2.8	2-36
21-50 yaş	0.5-6.0	4.3-12	1.2-2.6	2-35

§: Ortalama ve 2SD aralığı. †: Ortalama ve %95 aralığı

Tablo 7. Yaş ile serum T₃, rT₃, sT₄ ve sT₃ konsantrasyon değerleri (18).

Yaş ile serum T₃, rT₃, sT₄ ve sT₃ konsantrasyon değerleri				
	T₃* (ng/dl)	rT₃* (ng/dl)	sT₄** (ng/dl)	sT₃** (pg/mL)
Kord kanı	14-86	100-501	1.2-2.2	-
4-7 gün	36-316	34-258	2.2-5.3	1.3-6.1
1-4 hafta	105-345	26-290	0.9-2.3	2.2-8.0
1-12 ay	105-245	11-129	0.8-2.1	2.5-7.0
1-5 yaş	105-269	15-71	0.8-2.0	2.8-5.2
6-10 yaş	94-241	17-79	0.8-2.0	2.8-5.2
11-15 yaş	83-213	19-88	0.8-2.0	2.9-5.6
16-20 yaş	80-210	25-80	0.8-2.0	2.4-5.0
21-50 yaş	70-204	30-80	0.9-2.5	2.1-4.4

*: Geometrik orta ve değer. **: Tracer dializ ile 2 SD değer.

Tablo 8. Tiroid Hormonu Değerlendirmesinde Genel Yaklaşım (142)

Tiroid Hormonu Değerlendirmesinde Genel Yaklaşım			
sT₄ düzeyi	Serum TSH referans değeri (0,45-4,5 µu/ml)	Artmış serum TSH (>4,5µu/ml)	Azalmış serum TSH (<4,5µu/ml)
Normal	Normal/Hasta ötiroid sendromu	Sublinik Hipotiroidizm	Sublinik Hipertiroidizm
Artmış	Erken tiroidit	Hipertiroidizm (TSH üreten hipofiz adenomu)	Hipertiroidizm (iyatrojenik, Grave's hastalığı, toksik nodül)
Azalmış	Geç tiroidit	Hipotiroidizm (primer tiroidal yetmezlik)	Hipotiroidizm (primer hipofizer yetmezlik)

TSH= Tiroid stimüle edici hormon; sT₄= Serbest tiroksin

Tiroid hormon değerlerinin ölçülmesi ile klinik tanıya genel bir bakışla tablo 8'de değinilmiştir. Buna göre sT₄ düzeyi hastaların hipo-, hiper- ayırımında önem taşımaktadır. sT₄ düzeyinin TSH değeriyle desteklenmesi de hastalığın olası etiyolojik faktörü konusunda bilgi verici olmaktadır.

2.10. PZR ve DNA Dizi Analizi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 1985'te Kary Mullis ve arkadaşları tarafından geliştirilen, canlı dokunun dışında bir ortamda belirli bir DNA bölgesinin çoğaltılmasına imkan sağlayan bir yöntemdir.

Kısaca özetlenecek olursa PZR yöntemi bir gen ya da DNA bölgesinin, bu hedef bölgenin uç kısımlarına bağlanan ve hedef diziye komplementer oligonükleotid primerler kullanılarak ardışık bir dizi replikasyonla (siklus, döngü) çoğaltılması işlemidir. PZR'ın gerçekleşebilmesi için ortamda amplifiye olacak çift iplikli DNA ya da komplementer DNA (cDNA) fragmenti, iki adet tek sarmallı oligonükleotid, bir

protein bileşeni olan DNA polimeraz enzimi, uygun deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP), bir tampon ve tuz solüsyonlarının bulunması gerekmektedir (143, 144).

Reaksiyondaki her döngü üç ana basamaktan oluşmaktadır. Bunlar;

1- Denatürasyon (Ayrılma):

Hedef DNA'nın ısı ile birbirinden ayrılması (yaklaşık $\approx 94^{\circ}\text{C}$).

2- Annealing (Yapışma):

17-35 nükleotidden oluşan özgül sentetik oligonükleotid primerlerin hedef bölgeye bağlanması;

3- Extansion (Sentez):

Termostabil bir DNA polimeraz (Taq DNA polimeraz) tarafından hedef bölgeye bağlanan primerlere uygun nükleotidlerin takılması. (sentez $\approx 72^{\circ}\text{C}$) (145).

Bu üç basamağın bitiminde bir döngü tamamlanır. Bir döngü yaklaşık olarak 3-5 dakika sürer ve tipik bir PZR reaksiyonu için ortalama 20-40 defa tekrarlanır. 30 döngü sonunda milyonlarca kopya üretilmiş olur. PZR'da bir döngü sonunda oluşan ürün miktarı bir önceki döngüde oluşan ürün miktarının iki katıdır. Döngü sayısı 'n' olarak kabul edilirse '2ⁿ' çoğaltılmış DNA miktarını verir (144).

DNA dizi analizi DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi ile Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği Sanger-dideksinükleotid metodu olmak üzere iki klasik DNA dizi analizi yöntemi vardır. Her iki yöntemde de DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezi olmak üzere üç ana aşama bulunmaktadır. Kullanım kolaylığı ve hassasiyeti açısından tercih edilen metod

Sanger'in enzimatik yöntemidir. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli dizilerden kırılmasına dayanırken ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleşmektedir. Her iki yöntemde de dizisi saptanacak DNA'ya her baz için bir adet olmak üzere dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır. Bu dört reaksiyonun ürünleri bir nükleotid uzunluğu kadar farklı olan bir dizi DNA parçacıklarıdır. Jelde dört reaksiyonun ürünleri dört ayrı kuyucukta yan yana elektroforez ile ayrıştırılmaktadır ve jeldeki bantlardan DNA parçacığının dizisi okunabilmektedir (146, 147).

Günümüzde DNA bölgelerinin dizi analizi için klasik yöntemler olarak bilinen enzimatik ve kimyasal yöntemlerin dışında otomatik sistemler de kullanılmaktadır. Bu amaçla fotokrom işaretli bazlar kullanılarak reaksiyon karışımı amplifikasyon sonrası kapiller jele yüklenir ve bazlar bir floresans dedektör vasıtasıyla saptanır. Kullanılan bilgisayar programları ile elde edilen veriler renkli kromotogram dosyalarına çevirilerek her bir baz özgül bir renk eğrisi ile gösterilir (C, Mavi; T, kırmızı; A, yeşil; G ise siyah ile gösterilmektedir) (147).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmaya Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Endokrinoloji Departmanında takip edilmekte olan 30'u erkek 26'sı kız toplam 56 infant ve çocuktan oluşan otoimmün olmayan kalıcı primer konjenital hipotiroidili hastalar dâhil edildi. Hasta grubu subklinik hipotiroidili hastalar (n:16) ile tiroid bezi agenezik veya hipoplazik hastalardan (n:40) oluşmaktaydı. Hastaların dosya bilgileri retrospektif olarak değerlendirildi. Hastaların doğum yerleri ve yaşadıkları şehirler kaydedildi. Dosyada kayıtlı bilgilerden cinsiyet, tanı yaşı, klinik bulgular, laboratuvar incelemeleri (T₃, T₄, TSH, Tg, idrarda iyot), tiroid ultrasonografisi, tiroid sintigrafisi, kemik yaşı, ailede aynı hastalık olup olmadığı, yapıldı ise TRH testlerinin sonuçları elde edildi. Çalışma öncesi hastalar bilgilendirildi ve çalışmaya katılmak üzere onayları alındı. Hastalara ait periferik kan örnekleri toplandı. Hastaların yaşları 0-14 yaş aralığında değişmekteydi. Yapılan fizik muayenede hastaların guatrı bulunmamaktaydı. İncelemelerde hastaların tanı anında ya da tedavi öncesi değerleri temel alındı. Tüm

hastalarda tiroid morfolojisi ultrasonografik olarak incelendi, gerekli görülen hastalara sintigrafi ya da TRH testi uygulandı. Tiroid bezi normal yerinde ve otoimmün markerları negatifti. Çalışmada otoimmün olmayan subklinik hipotiroidi tanılı hastalar, farklı şikâyetlerle yapılan tetkikler sırasında tesadüfen tanı alan ve takip edilmekte olan hastalardı. Bu hastalarda TSH serum değeri normalin üst sınırı üzerinde, sT₃ ve sT₄ değerleri en az iki ölçümde normal sınırlarda idi.

Kalıcı primer konjenital hipotiroidizm hastaları aşağıdaki kriterler esas alınarak yapıldı.

1. Tedavisiz dönemde serum TSH düzeyi 4,5 µU/ml üstünde olması
2. Radyolojik olarak tiroid agenezisi ya da hipoplazisinin bulunması

Geçici hipotiroidi hastaları, santral hipotiroidi hastaları, sendromik hastalar, kromozomal anomalisi bulunan hastalar ve ektopik tiroid bezi bulunan hastalar çalışmaya alınmadı. Kontrol grubu olarak 75 sağlıklı çocuğun DNA örnekleri incelendi.

Araştırma Kayseri 1 No'lu etik kurulu komitesince 2009/130 karar numarası ile kabul edilmiş ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TSU-10-2904 nolu proje ile desteklenmiştir.

3.2. Kullanılan Gereçler

Agaroz Jel Elektroforez Güç Kaynağı	:Scotlab
Agaroz Jel Tankı ve Düzeneği (midi)	:Scotlab
Buzdolabı	:Arçelik,
	Lec
Derin Dondurucu -20 °C	:Arçelik

Derin Dondurucu -80 °C	:Sanyo
Etüv	:Nüve FN500
Hassas Terazi	:DENVER INSTRUMENT (mxx-212)
	Libror AEG-220
Kırık Buz Makinesi	:Scotsman
Manyetik Karıştırıcı	:Janke-Kunkel
Mikrodalga	:PROline,
	Arçelik
Mini santrifüj	:Thermo SCIENTIFIC (HERAUS PICO 17 Centrifuge)
Manyetik karıştırıcı	:MS2 Minishaker (IKA)
Pipet (Çok dağıtmalı)	:Eppendorf (Multipette ^R pro)
Pipet (Çok kanallı)	:Thermo Lab Systems (Finnpipette, 0.5-10 µl)
Mikropipetler	:Gilson, Pipetmann
PZR Cihazı	:BIO-RAD (Tetrad 2, Peltier Thermal Cycler)
Sekans cihazı	:Otomatik DNA Dizi Analizi Cihazı, AB (Applied Biosystem) 3730
Soğutmalı santrifüj	:UNIVERSAL 32R (Hettich, Zentrifugen) Sigma
UV görüntüleme sistemi	:UVP BIO DOC-it TM System

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri

Agaroz

Amonyum klorür

Amonyum asetat

Borik asit

DNA boyut belirleyicisi

EDTA

Eppendorf tüpler

Etidyum bromid

Etanol

İzopropanol

Polipropilen Plate

Potasyum bikarbonat

Sodyum dodesil sülfat (SDS)

Steril falkon tüpleri

Tris

3.4. Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar

DNA izolasyonunda kullanılanlar

- **Eritrosit lizis solüsyonu (RCL):** Tam kan içinde mevcut bulunan kırmızı kan hücrelerini patlatmak amacıyla kullanılır. İçeriğindeki;

✚ 155mM Amonyum klorid

✚ 10 mM Potasyum bikarbonat

✚ 1mM EDTA (Stok 500 mM)

500 ml solusyon için;

4,1 gr Amonyum klorid + 0,5 gr Potasyum bikarbonat + 1ml EDTA

500 ml dH₂O içinde çözülür.

- **Hücre lizis solüsyonu (CL):** Tam kan içinde mevcut bulunan kırmızı kan hücreleri dışındaki hücreleri patlatmak amacıyla kullanılır. İçeriğindeki;

✚ 25mM EDTA

✚ %2 SDS

500 ml solusyon için;

25ml EDTA + 10gr SDS dH₂O ile 500 ml'ye tamamlanır.

- **Protein çöktürme solüsyonu (~10 M):** Proteinlerin çöktürme işlemi için kullanılır.

77,1 gr Amonyum asetat tartılır ve dH₂O ile 100 ml'ye tamamen olarak çözülür.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılanlar;

- **10XTBE (Konsantre stok solüsyon-1Lt) Hazırlanması**

108 gr Tris baz

55 gr Borik Asit

7,31 gr EDTA (pH 8.0)

Çözelti 1Lt'ye kadar dH₂O ile tamamlandı. Kullanılacağı zaman stok 1/10 distile su ile sulandırıldı.

- **Etidyum Bromid Hazırlanması**

0,2 gr Etidyum Bromid hassas terazide tartılarak distile su ile 20 ml'ye tamamlandı.

- **%1'lik Agaroz Jel Hazırlanması**

1 gr agaroz tartılır. 1xTBE ile 100ml'ye tamamlanır.

1.2 dakika mikrodalga fırında kaynatılır.

Soğutulduktan sonra 3 µl Etidyum Bromid eklenir ve karıştırılır.

Taraklar yerleştirildikten sonra kalıba dökülür.

Dizileme metodunda kullanılanlar;

- **0.125 Molar EDTA Hazırlanması**

0.5 Molarlık stok solüsyon ¼ oranında dH₂O ile sulandırılarak hazırlandı.

- **%70 EtOH Hazırlanması**

İhtiyaç duyuldukça taze olarak 7 ml saf etanolün üzerine 3ml dH₂O eklenerek hazırlandı.

3.5. Kullanılan Ticari Kitler

BiomixRed (BIOLINE)

DNA dizileme kiti 3.1 (Big Dye TM Terminator) ABI PE

- BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems)
- BigDye Terminator 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems)
- HiDi™ Formamide (Applied Biosystems)

Microclean (Web SCIENTIFIC)

3.6. Kullanılan Primerler (SIGMA)

TSHR ekzon 10 uzun bir parça olması nedeni ile birbirleri üzerine çakışan üç farklı parçaya bölünerek 3 çift primer şeklinde çalışıldı. Kullanılan primer dizileri aşağıda gösterilmiştir.

TSHRx10_1F: 5'CAG TCA TGA GCC ACT GCG

TSHRx10_1R: 5'CTA CAG AGG CGA TGA GGA GC

TSHRx10_2F: 5'CCT GCT TAT TCT CCT CAC CAG

TSHRx10_2R: 5'TCA ACA CAG CCA TCC TCT TG

TSHRx10_3F: 5'CCT TCG TCA TCG TCT GCT G

TSHRx10_3R: 5'GGG GTG TCA TGG GAT TGG

I. ve II. PZR basamaklarında aynı primer dizileri kullanıldı. Ancak stok primerler 100 µMolar konsantrasyonunda olup I. PZR’de 10 µMolar, II. PZR’de 2 µMolar konsantrasyonlarında kullanıldı.

3.7. TSHR Geni Mutasyonlarının Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Yapılan bu çalışmada kandan DNA izolasyonları, E.R.Ü.T.F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda, TSHR geninin 10. ekzon mutasyon taraması İngiltere Birmingham Üniversitesi Medikal ve Moleküler Genetik Araştırma Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

3.7.1. Periferal Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyon basamakları;

1. 2-3 cc kan etiketlenmiş falkon tüplerine alınır.
2. Üzerine kanın 4 katı kadar RCL eklenir. Sık sık alt üst edilerek +4 °C ‘de 20 dk beklenir.
3. 2500 RPM’de 12 dk santrifüj edilir.
4. Süpernatant atılır, dipte kalan kısım vortekslenir.
5. Koyulan kan kadar CL eklenir ve tekrar vortekslenir.
6. 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakılarak homojenize olması beklenir.

-
7. Homojenize olduysa vortekslenir. Üzerine kanın 1//3’ü kadar protein çöktürme solüsyonu olan amonyum asetat eklenir. Tekrar vortekslenir.

8. 4000 RPM'de 18 dk santrifüj edilir.
9. Santrifüjden sonra süpernatant kısımları önceden hazırlanan ve içinde 8 cc izopropanol bulunan falkon tüplerine aktarılır. Yavaşça alt üst edilerek DNA'nın oluşup oluşmadığına bakılır. Etiketler yeni tüplere yapıştırılır.
10. 4000 RPM'de 8 dk santrifüj edilir.
11. Santrifüjden sonra süpernatant atılır, dipte kalan kısım (DNA) üzerine 1 ml %70'lik etanol eklenir.
12. Birkaç dakika bekledikten sonra (istenirse 4000 RPM'de santrifüjlenip) DNA'yı kaldırmamaya özen göstererek üst kısım atılır.
13. DNA kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra üzerine 100-200µl dH₂O eklenir.

3.7.2. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analiz basamakları;

- **I.PZR**

PZR yöntemi ile TSHR mutasyonlarının arandığı gen bölgelerinin çoğaltılması amaçlandı. TSHR ekzon 10 bölgesini içine alan kısım 3 parça halinde PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Bunun için PZR reaksiyon karışımları hazırlandı.

I.PZR Primer Dilüsyonu:

Primerler her bir parça için ayrı ayrı sulandırıldı.

Tablo 9. Ekzon 10'un her bir parçası için I.PZR primer dilüsyonu

TSHRx10_1 primeri	TSHRx10_2 primeri	TSHRx10_3 primeri
10 µl primer F	10 µl primer F	10 µl primer F
10 µl primer R	10 µl primer R	10 µl primer R
80 µl dH ₂ O	80 µl dH ₂ O	80 µl dH ₂ O
Σ100 µl I.PZR Primeri	Σ100 µl I.PZR Primeri	Σ100 µl I.PZR Primeri

Primerler sulandırıldıktan sonra 1.5ml'lik apendorflara 1. PZR reaksiyon karışımı hazırlandı. Çalışılacak hasta başına hazırlanan miktarlar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

I.PZR Reaksiyon karışımı

Tablo 10. I.PZR Reaksiyon karışımının hazırlanması

	I. PZR içeriği (Bir reaksiyonluk miktar)	
Reaksiyon karışımı solusyonu (24 µl)	10.5 µl	dH ₂ O
	12.5 µl	BiomixRed
	1 µl	Primer
	1 µl	DNA
Toplam Hacim	Σ 25µl	Reaksiyon

1.5ml'lik apendorf içine toplamda 'n x 24µl' olarak reaksiyon karışımı hazırlanıp daha sonra PZR çalışma platelerinde kuyucuklara dağıtıldı (Primerler çalışılan parçaya göre seçilerek eklendi). Reaksiyon karışımı üzerine hasta DNA'ları

eklendi ve PZR son hacmi 25 µl olarak ayarlandı. Plate üzeri jelatin bantla kapatıldıktan sonra 4000 RPM de hızlı santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası plate Biorad PZR cihazına uygun programda yerleştirildi. TSH reseptörü ekzon 10_2 ve ekzon 10_3 taraması için aynı PZR döngü programı kullanılırken ekzon 10_1’de farklı döngü programı kullanıldı. Çalışılan parçalara göre kullanılan programlar aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 11. TSHR ekzon 10_1 PZR programı

TSHR ekzon 10_1			
94 °C	3 dakika	ön denatürasyon	
94 °C	1 dakika	denatürasyon	29 döngü
64 °C	1 dakika	eşleşme	
72 °C	1 dakika	sentez	
72 °C	5 dakika	final uzaması	

Tablo 12. TSHR ekzon 10_2 ve ekzon 10_3 PZR programı

TSHR ekzon 10_2 ve TSHR ekzon 10_3			
94 °C	3 dakika	ön denatürasyon	
94 °C	1 dakika	denatürasyon	29 döngü
60 °C	1 dakika	eşleşme	
72 °C	1 dakika	sentez	
72 °C	5 dakika	final uzaması	

- **Agaroz Jel Elektforezi**

DNA parçalarının ayrılması, tanımlanması ve saflaştırılması için standard bir metod olarak agaroz jel elektforezi kullanılmaktadır. Agaroz jel elektforezi ile yaklaşık 60 - 0.1 kb uzunluğunda DNA parçaları ayrılabilir. Jeldeki DNA bantları jelin bir floresans boya olan etidyum bromür ile boyanması ve jelin mor ötesi

ışık altında incelenmesi ile saptanabilir. Çoğunlukla jel elektroforezinde bilinen büyüklükteki bir belirteç DNA kullanılarak moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA'ların boyları kolayca saptanabilir (148).

Yapılan bu çalışmada PZR ile çoğaltılan hedef DNA bölgesinin çoğaltılmasının doğru gerçekleşip gerçekleşmediği ve kalitesinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Elde edilen ürünlerin boylarını tanımlayabilmek için %1' lik jel kullanıldı.

Jelin üzerine 1-2 mm geçecek şekilde 1x TBE tampon çözeltisi ilave edildi. PZR ürününün agaroz jele yüklenmesi sırasında jelin ilk ve son kuyucuğuna ürünün bant boyutunu gözlemek amacıyla DNA boyut belirleyicisi yüklendi. %1'lik agaroz jelde, 120V/64 mA'de PZR ürünleri yatay elektroforezde yaklaşık otuzbeş dakika koşturulduktan sonra güç kaynağı kapatıldı. Jel UV ışını altında incelendikten sonra fotoğrafı çekildi. Çoğaltmayı istediğimiz TSHR geninin ekzon 10_1, ekzon 10_2 ve ekzon_3 bölgesine ait PZR ürünleri görüldü. Ürünler ortalama 600 baz çifti uzunluğunda idi.

- **PZR Ürünlerinin Saflaştırılması**

Dizi analizi reaksiyonu öncesinde PZR karışımındaki kimyasal artefaktların (primer, dNTP gibi) ortamdan uzaklaştırılması için PZR ürünleri saflaştırıldı. Saflaştırma (temizleme) aşamasında 'microclean' olarak adlandırılan saflaştırma kiti kullanıldı. F ve R çalışma örnekleri ayrı ayrı hazırlanarak ayrı ayrı işleme tabi tutuldu.

Saflaştırma işleminde yeni bir plate içinde 2.5 µl I. PZR ürünü, 2.4 µl microclean renk sarıya dönene kadar karıştırıldı. 5 dakika bekletildikten sonra 20 °C'de 4000 RPM'de 40 dakika santrifüj edildi. Santrifüj biter bitmez sarsmadan alınarak

jelâtin bant açıldı. Kurutma kağıdına ters çevrilip sarıldıktan sonra 500 RPM impuls verilerek santrifüj edildi (Dipteki pelletin kalkmamasına özen gösterildi). Santrifüjden sonra kurutma kâğıdından alınıp üzerine 5 µl dH₂O eklendi ve sekans PZR hazırlığı için beklemeğe bırakıldı.

- **II.PZR (Sekans PZR'si - DNA dizi analizi için PZR)**

II. PZR Primer Dilüsyonu:

Primer dizisi I. PZR'da kullanılan primer dizisi ile aynı idi. Ancak primer konsantrasyonu 2 µmolar olarak kullanıldı. Primerler her bir parça için ayrı ayrı sulandırıldı. Ayrıca F ve R primerler de I. PZR'den farklı olarak ayrı ayrı hazırlandı.

Tablo 13. II. PZR F Primer Dilüsyonu (Sekans primeri hazırlanması)

TSHRx10_1 F primeri	TSHRx10_2 F primeri	TSHRx10_3 F primeri
2 µl primer F	2 µl primer F	2 µl primer F
98 µl dH ₂ O	98 µl dH ₂ O	98 µl dH ₂ O
Σ100 µl II. PZR F Primeri	Σ100 µl II. PZR F Primeri	Σ100 µl II. PZR F Primeri

Tablo 14. II. PZR R Primer Dilüsyonu (Sekans primeri hazırlanması)

TSHRx10_1 R primeri	TSHRx10_2 R primeri	TSHRx10_3 R primeri
2 µl primer R	2 µl primer R	2 µl primer R
98 µl dH ₂ O	98 µl dH ₂ O	98 µl dH ₂ O
Σ100 µl II. PZR R Primeri	Σ100 µl II. PZR R Primeri	Σ100 µl II. PZR R Primeri

II. PZR Reaksiyon karışımı

II. PZR Reaksiyon karışımı 96'lık platelerde çalışıldı. F ve R çalışmak için saflaştırma aşamasında ayrı ayrı iki 2 adet plate hazırlanmıştı. Çalışma bu plate'ler üzerinden devam etti. Reaksiyon başına kullanılan maddeler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 15. II. PZR Reaksiyon karışımının hazırlanması (Sekans Reaksiyon karışımının hazırlanması)

	II. PZR içeriği (Bir reaksiyonluk miktar)	
x (n) olacak şekilde appendorf tüp içerisinde hazırlandı. Hazırlanan bu içerik	0.5 µl	dH ₂ O
	0.5 µl	BigDye Terminator
	2 µl	BigDye Terminator 5X Sequencing Buffer
daha önceden temizlenmiş ve üzerine 5 µl dH ₂ O eklenmiş plate kuyucuklarına 3 µl olarak paylaştırıldı.	5 µl	Temizlenmiş PZR ürünü
Son olarak da çalışılan her bir plate'in primerleri ayrı ayrı eklendi.	2 µl	'F' plateine F primeri 'R' plateine R primeri
Toplam Hacim	Σ 10µl	Reaksiyon

Bu işlemler ekzon 10_1, ekzon 10_2, ekzon 10_3 parçaları için ayrı ayrı uygulandı.

PZR son hacmi 10 µl olarak ayarlandıktan sonra plate üzeri jela tin bantla kapatılarak 4000 RPM’de hızlı santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası plate BIO-RAD PZR cihazına uygun programda yerleştirildi. TSH reseptörü ekzon 10_1, ekzon 10_2 ve ekzon 10_3 taraması için aynı PZR döngü programı kullanıldı. Çalışmada kullanılan program aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 16. TSHR ekzon 10 II. PZR programı.

TSHR ekzon 10	Sekans	PZR Programı	
96 °C	30 saniye	ön denatürasyon	
96 °C	30 saniye	denatürasyon	29 döngü
50 °C	15 saniye	eşleşme	
60 °C	4 dakika	sentez	
		son	

- **Etanol ile Cöktürme**

Sekans PZR’sinden sonra alınan ürünlere bu aşamada aşağıdaki işlemler sırası ile uygulandı.

I. Tüm kuyucuklara ayrı ayrı 2 µl, 0.125 M EDTA eklendi.

4000 RPM’de hızlı santrifüj uygulandı.

II. Tüm kuyucuklara ayrı ayrı 30 µl saf EtOH eklendi.

2000 RPM’de 20 dakika santrifüj edildikten sonra sarsmadan kurutma kağıdına ters çevrildi. 500 RPM impuls verilerek saf EtOH uzaklaştırıldı.

III. Tüm kuyucuklara ayrı ayrı 90 µl her seferinde yeni olarak hazırlanmış %70’lik EtOH eklendi.

2000 RPM'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra sarsmadan kurutma kağıdına ters çevrildi. 500 RPM impuls verilerek %70'lik EtOH uzaklaştırıldı. Kalan EtOH'un da uzaklaşması için ~5-10 dakika beklendi.

IV. Tüm kuyucuklara ayrı ayrı 10µl, HI-DI Formamide eklendi.

4000 RPM'de hızlı santrifüj uygulandı.

V. Denaturasyon programında (96 °C'de 5 dakika) PZR uygulandı.

VI. Program biter bitmez cihazdan alınarak buz içerisine gömüldü. Buz içinde yaklaşık 5-15 dakika beklendikten sonra alüminyum folyoya sarılarak cihaza yüklenmek üzere hazırlandı.

VII. Elde edilen ürünler alüminyum folyo paketinden çıkarılarak otomatik DNA dizi analizi cihazı, AB (Applied Biosystem) 3730 cihazına yüklendi.

- **Sonuçların Analiz Edilmesi**

Cihazdan alınan veriler doğrultusunda TSHR geni ekzon 10 dizisinin tamamı NCBI referans dizileri ile karşılaştırılmak suretiyle analiz edildi.

4. BULGULAR

Yapılan araştırmada tedavi 6ncesi, ilk tanı değerleri 6lçüt alınmıştır. Subklinik hipotiroidi hastaları yapılan takipler neticesinde geçici hipotiroidizm tanısı dışlanan hastalardan oluşturulmuştur. Retrospektif olarak incelenen, otoimmün olmayan primer konjenital hipotiroidizm tanısı almış 56 olgunun cinsiyet ve klinik 6zellikleri tablo 17’de g6sterilmiştir.

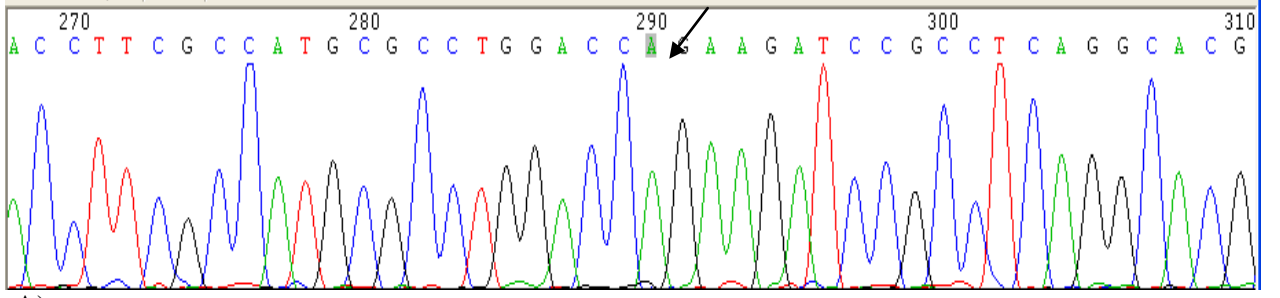
Tablo 17. Çalışma olgularının cinsiyet ve klinik dağılımları.

	n	%
Cinsiyet		
Erkek	30	53,5
Kız	26	46,5
Klinik		
Subklinik hipotiroidi	16	28,5
Tiroid hipoplazisi	25	44,5
Tiroid agenezisi	15	27
Sınıflamada referans biyokimyasal değerler: (*) TSH 0.45- 4.5 µU/ml.; (+) T 4 5.1-14.1 µg/dl; (+) fT 4 0.93-1.70 ng/dl; (+) TG 6.44-82.8 ng/ml olarak alındı.		
(*)Surks MI, Ortiz E, Daniels GH, Sawin CT, Col NF, Cobin RH, et al. Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. JAMA 2004;291:228-38.		
(+Tuncbilek E, Koc I: Consanguineous marriage in Turkey and its impact on fertility and mortality. Ann Hum Genet 1994; 58: 321–329.		

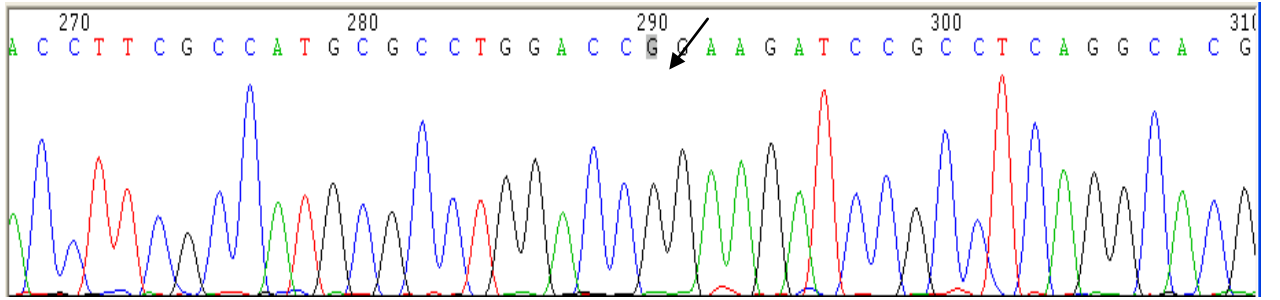
Çalışmaya alınan hasta (n:56) ve kontrol grubuna (n:75) ait periferik venöz kanlarından elde edilen DNA'ların saflık ve konsantrasyonu spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler ile belirlenmiştir. Elde edilen DNA'ların saflık oranları genel olarak 1.8-2.4 aralığında, DNA'ların konsantrasyonu ise ortalama 75-500 ng/µl aralığında tesbit edildi.

56 hastaya ait DNA örneklerinde TSHR geninin 10. ekzonu 3 parçada yapılan PZR sonrası doğrudan dizi analizi ile incelendi. Mutasyon içeren örneklerde mutasyonların kesin konumları bilgisayar ortamında alınan veriler ile gösterildi. Dizi analizi yapılan 56 hastanın 3 tanesinde mutasyon saptandı. Bunlardan 1 tanesi daha önce pozisyonel olarak tanımlanmış ancak ifadelenen aminoasit dizisi farklı olan homozigot bir mutasyon iken (Ekzon 10_2 parçasında R531Q, Homozigot) (Resim 1)

diğer 2'si daha önceden tanımlanmış heterozigot mutasyonlardı (Ekzon 10_1 parçasında R450H, Heterozigot) (Resim 2). Ortak gözlenen iki mutasyon anne babası akraba olmayan, iki kardeşten elde edilen mutasyonlardı. Homozigot form olarak bulunan yeni mutasyon ise anne babası akraba olan bir hastaya ait mutasyondur (Ekzon 10_2 parçasında R531Q, Homozigot). Bu bireye ait aile hikâyesi alındı ve diğer aile fertlerinin kan örneklerinde de R531Q mutasyonu tarandı. Bu hastanın anne, baba ve kardeşinden yapılan analiz sonucunda mutasyon bu bireylerde de heterozigot formda saptandı (Resim 3). Bunlardan başka 8 hastada daha önceden tanımlanmış ekzon 10_3 parçasında yerleşen D727E (GAC>GAG) heterozigot polimorfizmi (resim 4), bir hastada da ekzon 10_2' de yerleşen A459A (GCG>GCA) heterozigot polimorfizmi saptandı (resim 5). Daha önce ekzon 10_1'de R450H, heterozigot mutasyonu saptanan kardeşlerde eş zamanlı olarak ekzon 10_3 parçasında yerleşen D727E (GAC>GAG) heterozigot polimorfizmi de tesbit edildi.



A)



B)

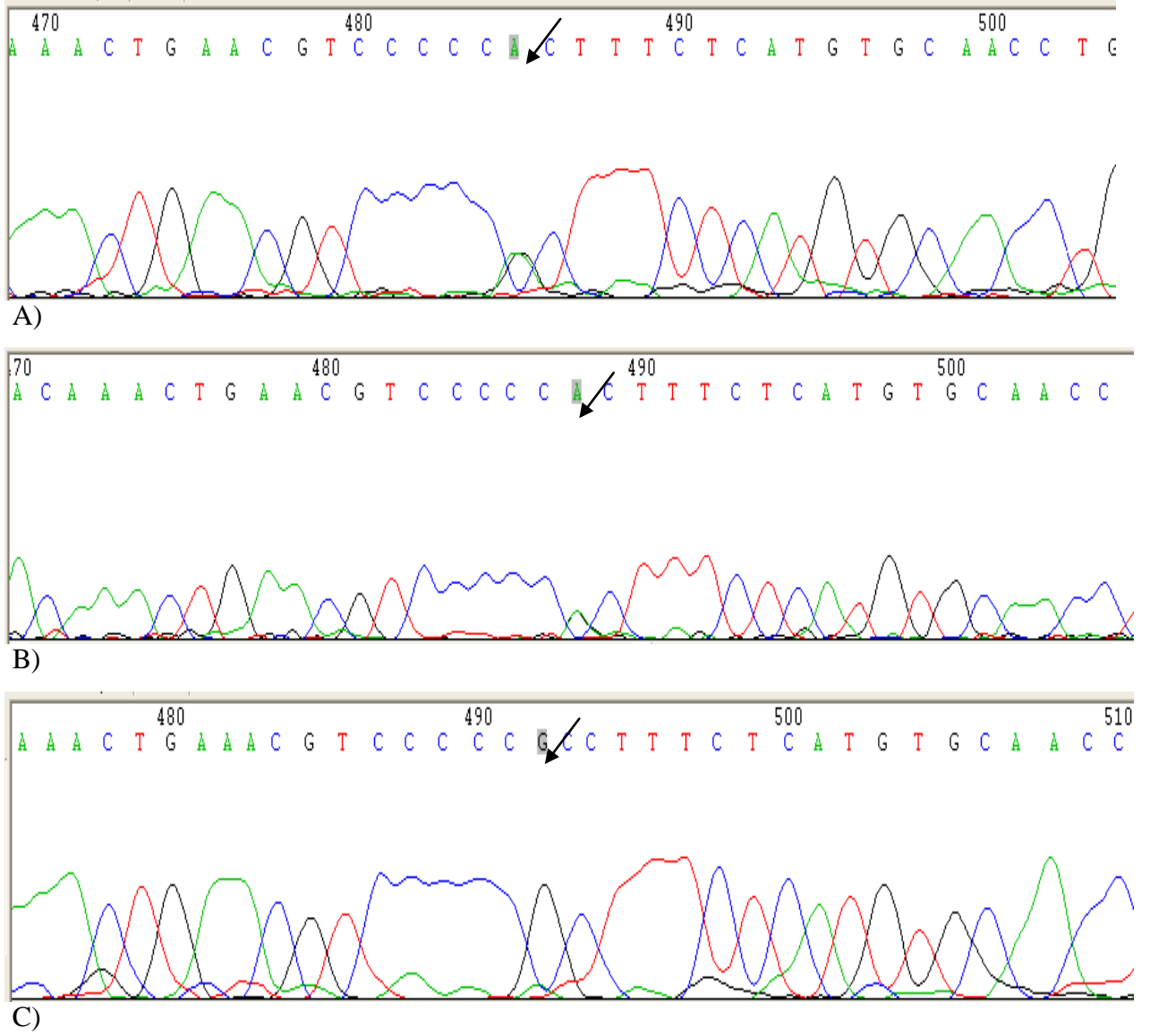
Resim 1: TSHR gen mutasyonu

Ekzon 10_2 parçasında R531Q homozigot mutasyonu ve kontrol dizi ile karşılaştırması.

(c.1592 CCG>CAG)

A) Mutant dizi

B) Kontrol dizi



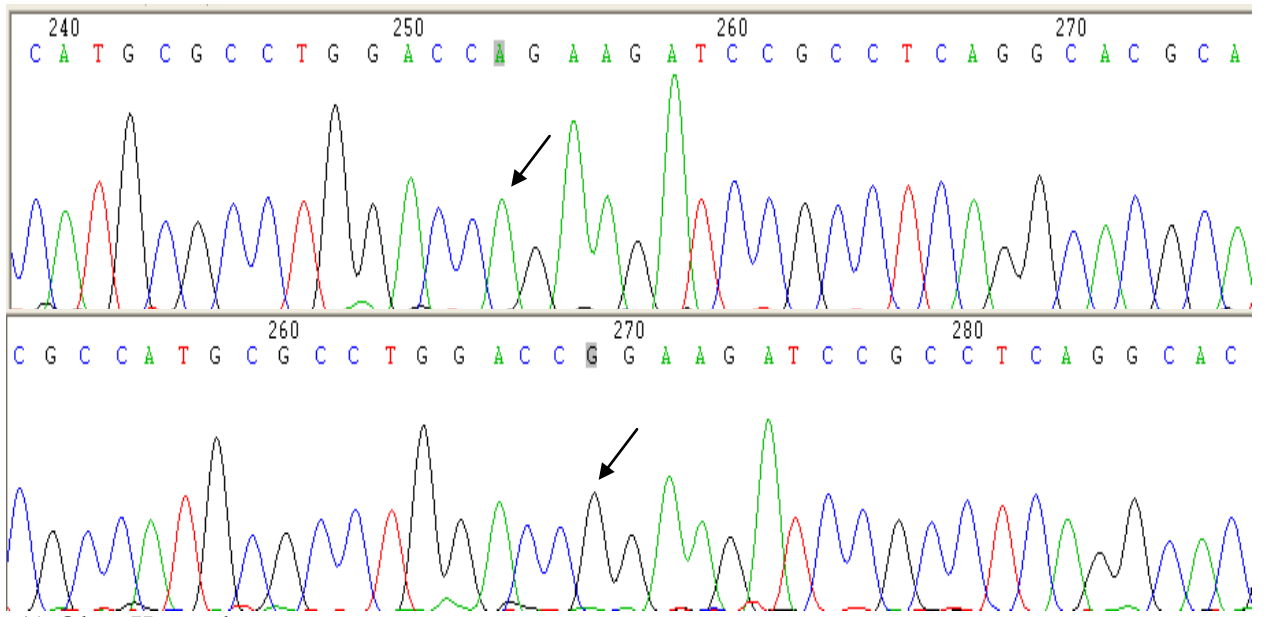
Resim 2: TSHR gen mutasyonu

Ekzon 10_1 parçasında R450H heterozigot mutasyonu ve kontrol dizi ile karşılaştırması. (c.1349 CGC>CAC)

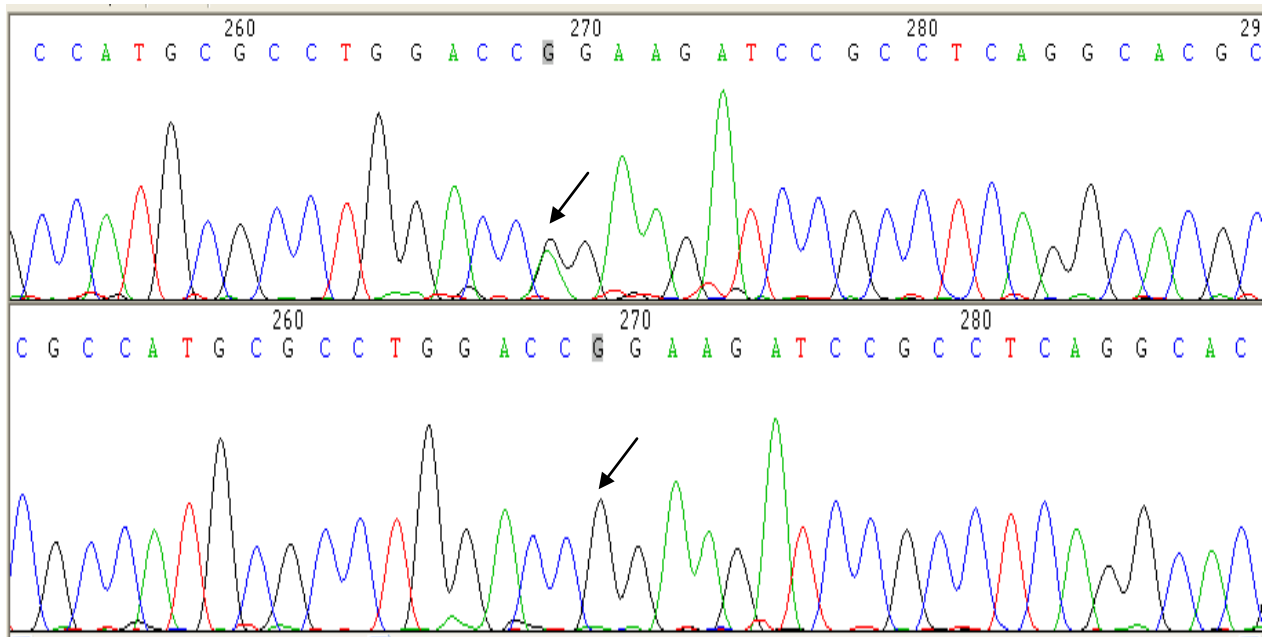
A) Mutant dizi (Kardeş Olgu 1)

B) Mutant dizi (Kardeş Olgu 2)

C) Kontrol dizi

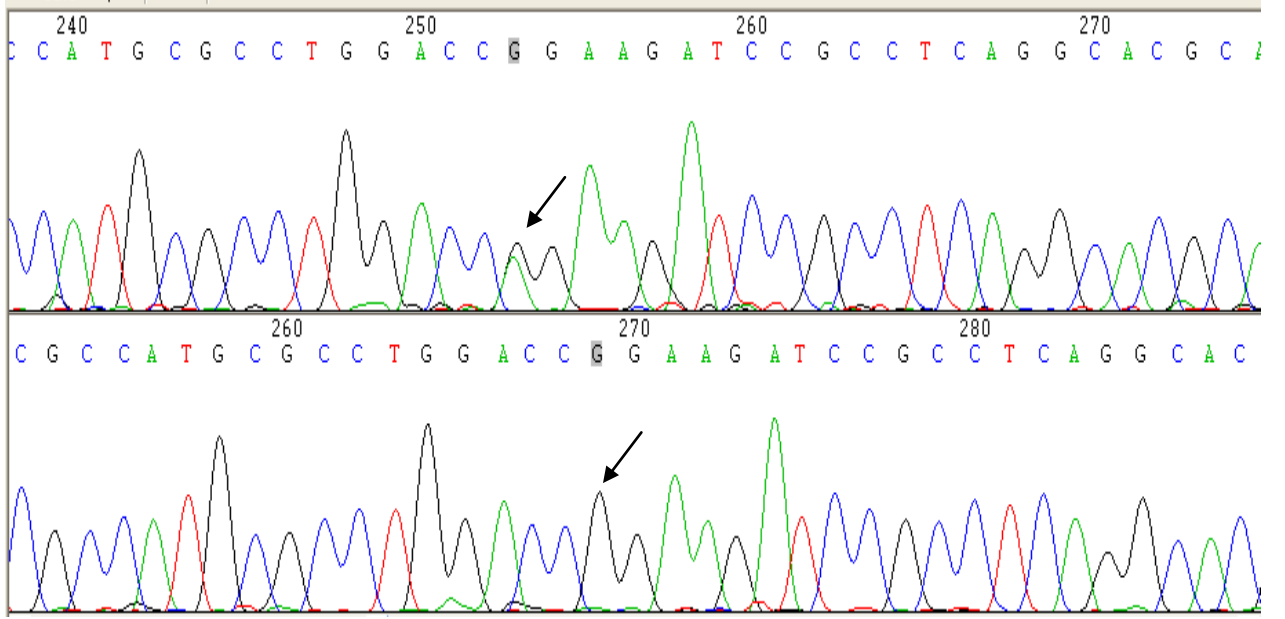


A) Olgu-Kontrol

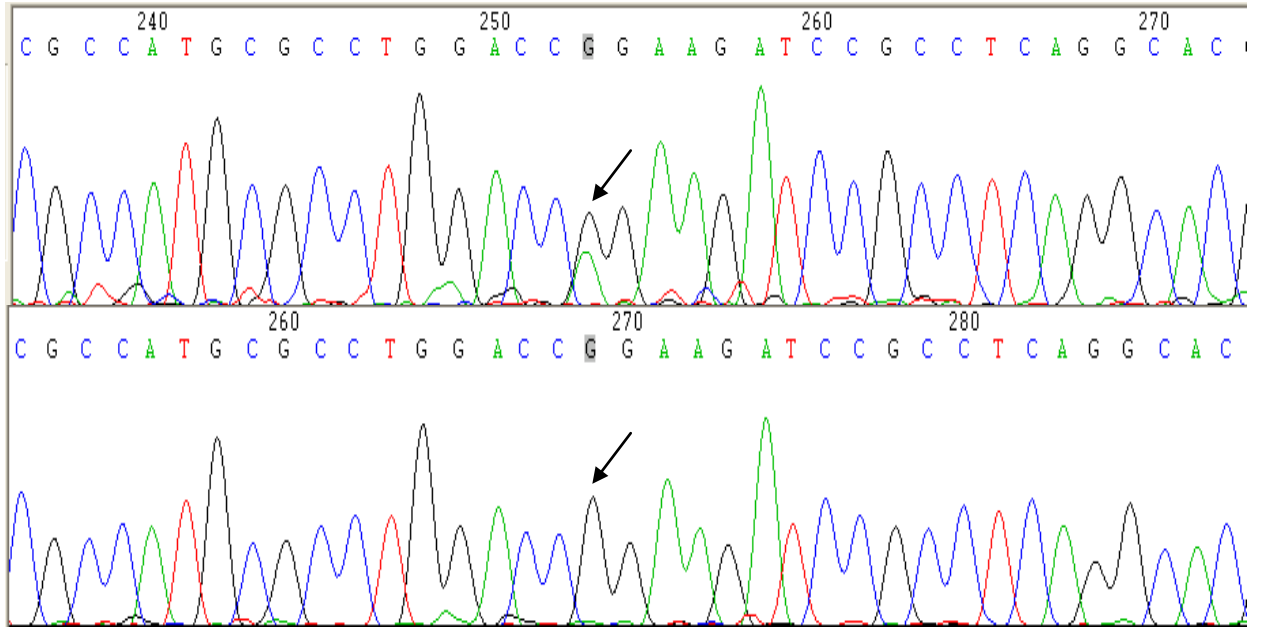


B) Anne-Kontrol

Resim 3: TSHR gen mutasyonu



C) Kardeş-Kontrol

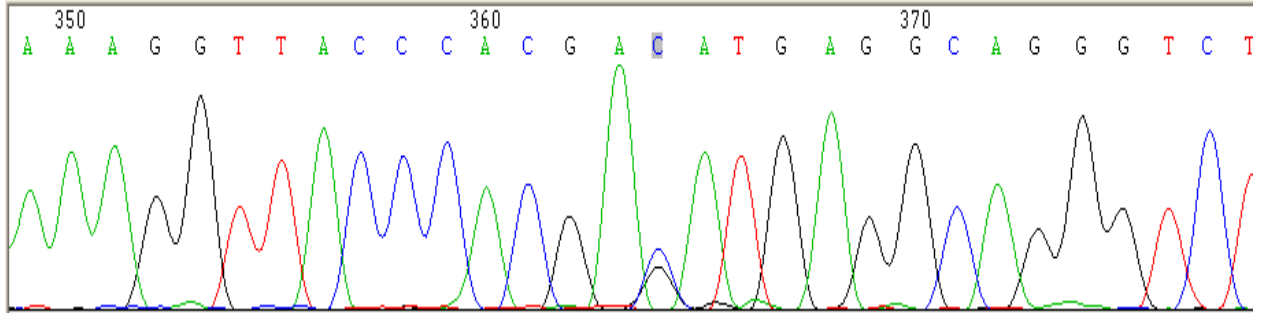


D) Baba-Kontrol

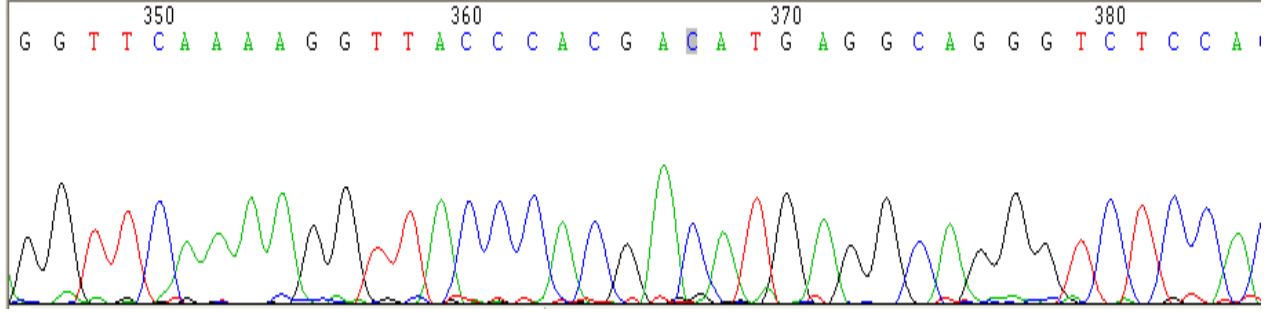
Resim 3: TSHR gen mutasyonu (Devamı)

Ekzon 10_2 parçasında R531Q homozigot mutasyonunun olguda ve aile bireylerinde gösterilmesi, kontrol dizi ile karşılaştırması. (c.1592 CGG>CAG)

- A) Olgu Mutant dizi ve kontrol dizisi (Homozigot form)
- B) Anne Mutant dizi ve kontrol dizisi (Heterozigot form)
- C) Kardeş Mutant dizi ve kontrol dizisi (Heterozigot form)
- D) Baba Mutant dizi ve kontrol dizisi (Heterozigot form)



A)

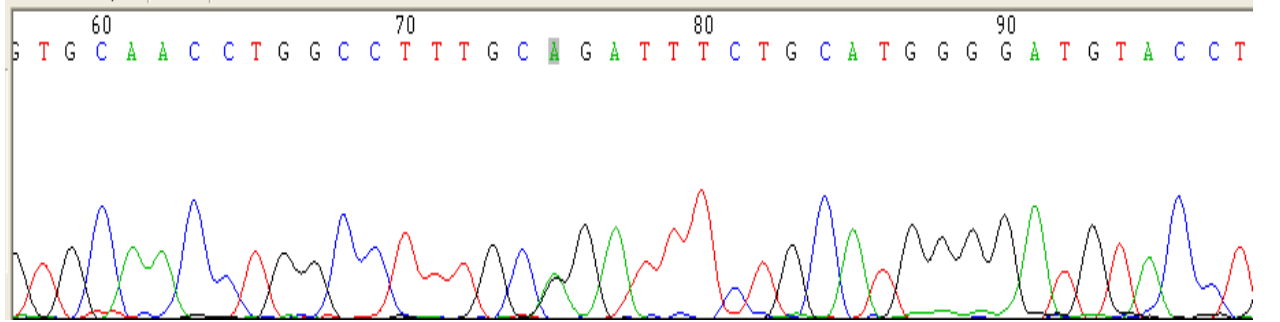


B)

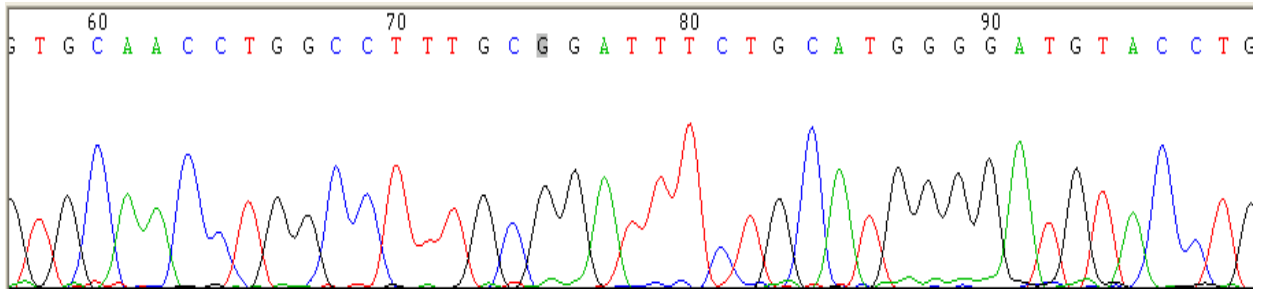
Resim 4: TSHR gen polimorfizmi
Ekzon 10_3 parçasında heterozigot D727E (C>G) polimorfizmi ve kontrol dizi ile karşılaştırması. (c.2181 GAC>GAG)

A) Heterozigot mutant dizi

B) Kontrol dizi



A)



B)

Resim 5: TSHR gen polimorfizmi
Ekzon 10_2 parçasında heterozigot A459A (G>A) polimorfizmi ve kontrol dizi ile karşılaştırması. (c.1377 GCG>GCA)

A) Mutant dizi

B) Kontrol dizi

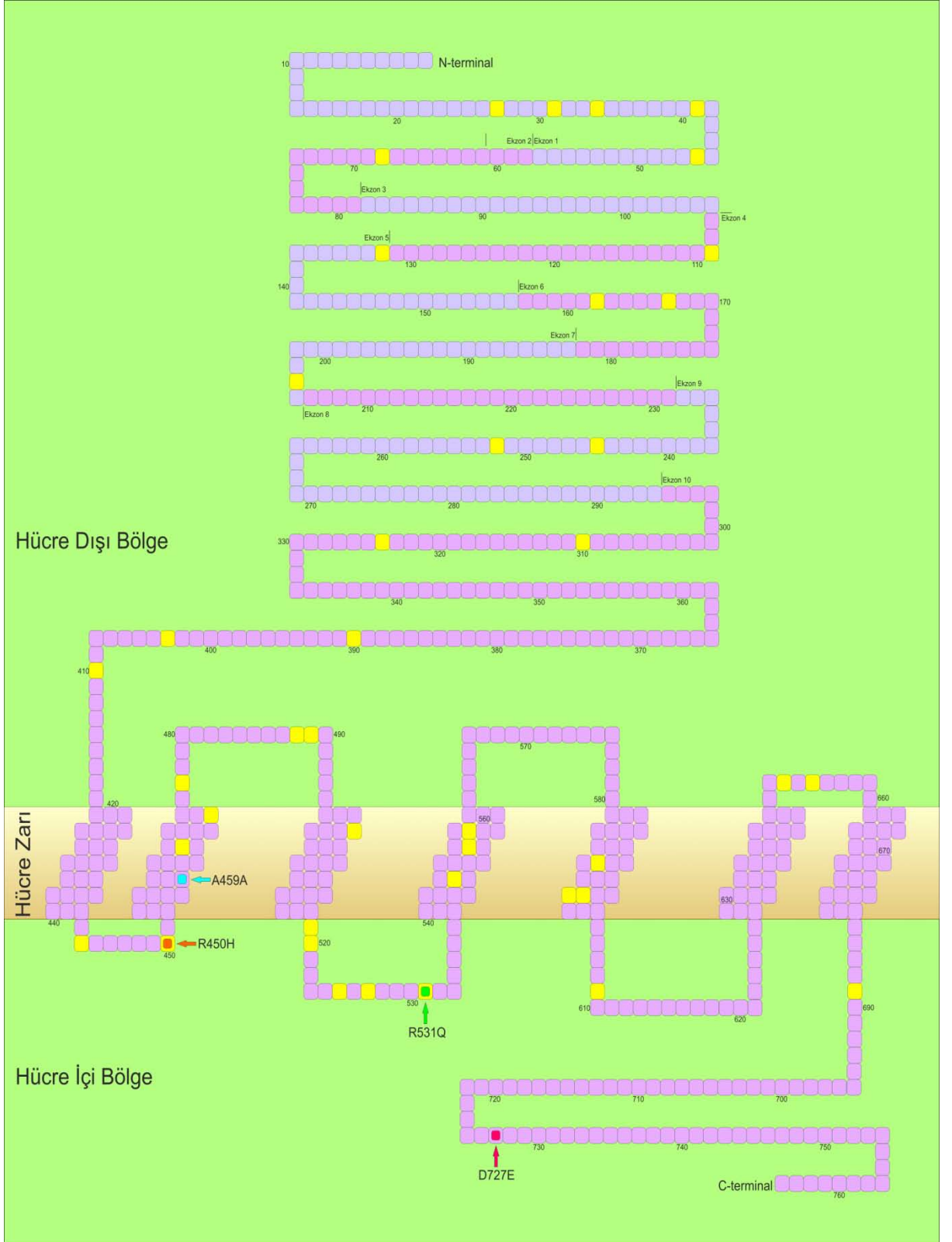
Hastaların klinik ve genetik durumları tablo18’de, saptanan genetik anormalliğin detayları tablo19’da gösterilmektedir.

Tablo 18. Genetik anormallik saptanan hastaların klinik ve genetik durumları

Klinik	Polimorfizm		Mutasyon	
	EKZON 10_2	EKZON 10_3	EKZON 10_1	EKZON 10_2
TİROİD HİPOPLAZİ		Heterozigot D727E (C>G)		
TİROİD HİPOPLAZİ		Heterozigot D727E (C>G)	Heterozigot R450H (G>A)	
TİROİD HİPOPLAZİ		Heterozigot D727E (C>G)		
SUBKLİNİK HİPOTİROİDİ	Heterozigot A459A (G>A)	Heterozigot D727E (C>G)		
TİROİD HİPOPLAZİ		Heterozigot D727E (C>G)	Heterozigot R450H (G>A)	
TİROİD HİPOPLAZİ		Heterozigot D727E (C>G)		
TİROİD HİPOPLAZİ		Heterozigot D727E (C>G)		
TİROİD AGENEZİ				Homozigot R531Q (C>A)
TİROİD HİPOPLAZİ		Heterozigot D727E (C>G)		

Tablo19. Otoimmün olmayan konjenital hipotiroidizmlili hastalarda TSHR geninde saptanan değişikliklerin detayları.

Nükleotid değişimi	Protein değişimi	Mutasyon tipi	Ekzonda yerleşimi	Daha önce yayımlanmış mı?	Etkilenen olgu sayısı	Fenotip
c1349 G>A	p.R450H	Missense	Ekzon 10_1	Evet	2	Tiroid hipoplazi
c1592 G>A	p.R531Q	Missense	Ekzon 10_2	Hayır	1	Tiroid Agenezi
		Polimorfizm				
c2181 G>C	p.D727E		Ekzon 10_3	Evet	8	Tiroid hipoplazi (n:7) Subklinik hipotiroidi (n:1)
c1377 G>A	p.A459A		Ekzon 10_2	Evet	1	Subklinik hipotiroidi



Şekil 15. Tespit edilen mutasyonların reseptör üzerinde şematik gösterimi.

Sarı: Daha önceden tespit edilen LOF mutasyonları.

Kırmızı ve Yeşil: Tez çalışmasında tespit edilen mutasyonlar

Pembe ve Mavi: Tez çalışmasında tespit edilen polimorfizmler

5. TARTIŞMA

Primer konjental hipotiroidizm, iyotun yeterli olduğu bölgelerde 1/3000-4000'lik bir sıklıkla en fazla gözlenen yenidoğan endokrin hastalığıdır (149). Bazı nadir hipofizer ya da hipotalamik kaynaklı santral hipotiroidi vakaları dışında, KH azalmış tiroid hormon seviyelerine cevap olarak TSH değerinin yükselmesi olarak tanımlanabilmektedir (149, 91, 150).

KH hastaları farklı şekillerde sınıflandırılmakla birlikte kabaca iki gruba ayrılabilir.

-Guatr birlikteliği gösteren tiroid hormon biyosentez bozukluğunun gözlendiği olgular (%15)

-Tiroid bezi gelişim bozukluğunun gözlendiği (disembriyogenezis, disgenezis) olgular (%85) (151, 152).

Dishormonogenez ve guatr ile seyreden KH, Tg (153), TPO (154, 155), NIS (156) PDS (133), DUOX 2 (157) ve DEHAL1 (158), gibi tiroid hormon sentezinin

kodlanmasından sorumlu gen mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Bu olgular klasik mendelian kalıtım göstermektedir. Yerinde ve normal boyutunda tiroid bezine sahip konjenital hipotiroidi hastalarında TSHR'ünün heterozigot fonksiyon kaybettiren mutasyonları sorumlu tutulurken (159); hipoplastik bezin gözleendiği KH'de ise TSHR'ünün homozigot fonksiyon kaybettiren mutasyonları neden olarak gösterilmektedir (104). Kalıcı KH vakalarında %85'lik bir oranı oluşturan (160) tiroid disgenezisi olguları organagenezis basamağında tiroid bezinin agenezisi (%35-40), hipoplazisi (%5) ya da ektopisi (%35-45) şeklinde oluşan heterojen bir grup bozukluktan meydana gelmektedir.

Türkiye'de yapılan bir çalışmada KH sıklığı canlı doğumlarda ortalama 1/2736 olarak rapor edilirken, tiroid disgenezili olgular 1/3517 olarak bildirilmiştir (161). TSH direnci nadir bir durum olarak rapor edilmekle birlikte tam bir veri bulunmamaktadır. Bununla birlikte yakın zamanda Narumi ve arkadaşlarının (16) Japon KH'li hastalarda TSHR geninde yaptıkları araştırmada, biallelik TSHR LOF mutasyon sıklığı %4.3 olarak bildirilirken monoallelik TSHR LOF mutasyon sıklığı % 9.4 olarak bildirilmiştir. Buna istinaden Japon toplumunda biallelik TSHR mutasyon taşıyıcılık sıklığı 1:118.000 olarak genellenirken heterozigot (monoallelik) TSHR mutasyon taşıyıcılık sıklığı 1:172 gibi yüksek bir değer olarak tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada tespit edilen mutasyonların büyük bir bölümünü R450H değişken alleli meydana getirmektedir. Yapılan tez çalışmasında da 2/56'lık bir oranla R450H değişken alleli en sık gözlenen mutasyon olmuştur. Bunu 1/56'lık bir oranla daha önce yayınlanmamış bir mutasyon olan R531Q takip etmiştir. Tespit edilen bu mutasyonların konjenital hipotiroidili Türk çocuklarının küçük bir kısmını oluşturan çalışma grubunda saptanabilmiş olması toplumumuzda da TSHR mutasyon sıklığının yüksek olduğu anlamına gelebilmektedir.

Ancak Tük toplumuna genellenebilecek bir oran ortaya çıkarabilmek için daha geniş ve kapsamlı populasyon taraması ile mevcut çalışma grubu değerlerinin desteklenmesi gerekmektedir.

Farklı çalışma gruplarında yapılan monoallelik ve biallelik TSHR mutasyon sıklığı tablo 20'de gösterilmiştir. Çalışma yapılan hasta grubu da literatür verileri ile tabloda kıyaslanmıştır.

Tablo 20. Monoallel ve biallelik TSHR mutasyon sıklığının farklı çalışma gruplarındaki dağılımı (168).

Çalışmanın yapıldığı Ülke	Çalışmanın yapıldığı hasta grubu	TSHR mutasyon sıklığı	Referans Kaynak
İtalya	Jüvenil, TSH yüksekliği ile karakterize otoimmün olmayan tiroid hastalığı (10 bağımsız olgu)	Biallelik: 1/10 Monoallel: 3/10	101
İtalya	Bezin normal yerleşimde olduğu KH hastaları (23 bağımsız olgu)	Monoallel: 1/23	162, 163
İtalya	TSH yüksekliği ile karakterize otoimmün olmayan tiroid hastalığı (8 çocuk, 34 erişkin)	6/8 ailesel olgu (1 Biallelik) 0/34 sporadik olgu	164
İtalya	Bezin normal yerleşimde olduğu KH hastası (n:14), TSH yüksekliği ile karakterize otoimmün olmayan tiroid hastalığı (n:116)	Biallelik: 1/14 Monoallel: 2/14KH ve 13/116 subklinik hipotiroidi hastası	13
İtalya	TSH yüksekliği ile karakterize otoimmün olmayan tiroid hastalığı (48 bağımsız olgu; yaşları 0.5-18 aralığında)	Monoallel:11/48	165
Çin	79 KH hastası	Monoallel: 2/79	12
Japonya	Yenidoğan taramasında pozitif TSH tarama sonucu olan olgular (n: 353.000 yenidoğan)	Biallelik: 1/118.000 Monoallel: 1/172	16

İsrail	Akraba arap-müslüman popülasyon -KH hastalıklı 1 ailenin 46 üyesi -Aynı popülasyondan 163 kontrol	Biallelik: 9/46 ve 0/163 Monoallelik: 24/46 ve 7/163	166
İtalya	TSH yüksekliği ile karakterize otoimmün olmayan tiroid hastalığı (n: 88, yaşalar: 1-18)	Monoallelik: 10/88	167
İtalya	TSH yüksekliği ile karakterize otoimmün olmayan tiroid hastalığı (n: 38, yaşalar: 0.5-18)	Monoallelik: 11/38	15
Türkiye	TSH yüksekliği ile karakterize otoimmün olmayan tiroid hastalığı (n: 56, yaşalar: 0-18)	Biallelik: 1/56 Monoallelik: 2/56	Tez çalışması (2010)

Son yıllarda yapılan çalışmalarda TSHR geninde meydana gelen mutasyonlar kazanılmış, konjenital ya da ailesel tiroid hastalıklarında neden olarak gösterilmektedir. Oluşan mutasyonun doğasına göre fonksiyon kaybettiren mutasyonlar (LOF) ya da fonksiyon kazandıran mutasyonlar (GOF); hipotiroidizm ya da hipertiroidizm kliniği ortaya çıkarabilmektedir. 1998 yılına kadarki dönemde yapılan çalışmalarda normal reseptör fonksiyonu üzerinde LOF mutasyonlarının önemi tam olarak anlaşılmazken, GOF mutasyonlarının reseptörde patofizyolojik olarak reseptörün normal agonisti yokluğunda bile sürekli bazal aktivitesinin devamını sağladığı ortaya çıkarılmıştır (169).

2000 li yıllara gelindiğinde yapılan çalışmalarda LOF mutasyonlarının reseptör seviyesinde TSH ilgisinde ya da hücre yüzey ekspresyonunda azalma ile cAMP seviyesini azaltarak etkilediği gösterilmiştir (170).

TSH direnci TSHR'ü LOF mutasyonu varlığında gözlenen bir KH klinik tablosudur. TSH direnci varlığında tiroid bezi normal yerinde olmasına rağmen biyolojik olarak aktif olan TSH hormonuna cevap değişen derecelerde azalmıştır. Bu olgularda tiroid direncinin derecesine bağlı olarak; artmış TSH düzeyi ve normal serum tiroid hormon değerinin gözlendiği subklinik hipotiroididen (Kısmi TSH direnci), ciddi hipotiroidinin gözlendiği (Tam TSH direnci) hipotiroidiye kadar değişen klinik söz konusudur (171).

Son 10 yılda yapılan araştırmalar TSHR'ünün LOF mutasyonlarının TSH hormon direnci ve değişen derecelerde tiroid hipoplazisinin yanı sıra bariz atrezis kliniği ile birlikte de gözlemlenebileceğini ortaya koymuştur (170).

TSHR'ünün 20 yıl önce klonlanmasından günümüze kadar TSH direncinden sorumlu 48 farklı LOF mutasyonu tanımlanmıştır. Bu çalışmada bulunan mutasyonlar ile birlikte LOF mutasyonları tablo 21'de özetlenmiştir. Bu mutasyonlar missense (aminoasit değişimine neden olan. Ör: P162A), nonsense (Erken dur kodonu oluşturan. ör: W546X), frameshift delesyonlar/insersiyonlar (bu tür mutasyonlar farklı protein oluşumuna ya da erken dur kodonu oluşumuna neden olarak etki göstermektedir.) ya da intron-ekzon sınırında (bu bölge mutasyonları birleştirme hatalarına ya da ekzon atlamalarına neden olarak etki göstermektedir.) değişiklikler olarak ortaya çıkabilmektedir.

Tablo 21. TSHR’ünde tespit edilen fonksiyon kaybettiren mutasyonlar, mutasyonun özellikleri ve referans kaynakları (168).

Mutasyon	Mutasyonun fonksiyonel etkisi	Referans
Kodlayıcı dizi nokta mutasyonları		
P27T	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ve cAMP ↓	13, 172
E34K	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ve cAMP ↓	13, 172
R46P	Hücre yüzey ekspresyonu ↓↓ TSH bağlama ve cAMP yok	13, 172
C31X	TSH bağlama ↓	15
C41S	Hücre yüzey ekspresyonu yok ↓↓ cAMP Dominant negatif etki	98, 101, 171
P68S	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ ↓ cAMP	15, 166
R109Q	TSH bağlama ↓	13, 15, 102, 167
G132R	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ ↓ cAMP	16
P162A	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ↓ ↑ cAMP	13, 15, 97, 98, 107, 159, 164, 167
I167N	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ve cAMP ↓	97
A204V	Hücre yüzey ekspresyonu ↓	16
G245S	Bilinmeyen fonksiyon ↓ cAMP	12
L252P	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ve cAMP ↓	13, 164
R310C	TSH bağlama ↓ ↑ Ardışık aktivite (CA) ↓ cAMP cevabı	15, 99
Q324X	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ve cAMP ↓	98
C390W	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ↓ ↑ CA ve ↓ cAMP cevabı	15, 98, 103, 162
D403N	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ve cAMP ↓	13, 15, 16, 167, 172
D410N	= TSH bağlama ↓ cAMP	15, 98, 159
Y444X	Kesik reseptör	173
R450H	= Hücre yüzey ekspresyonu TSH bağlama ve cAMP ↓	16, 100, 174, 175, 176 Tez çalışması (2010)
L467P	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ ↓ cAMP Dominant negatif etki	101, 171

V473I	= Hücre yüzey ekspresyonu ↓ cAMP ve IP	176
T477I	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ ↓ cAMP	105
W488R	Hücre yüzey ekspresyonu ↓↓ ↓↓ TSH binding and cAMP	13, 167, 172
Q489H	= Hücre yüzey ekspresyonu TSH bağlama ve cAMP↓↓↓	170
G498S	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ve cAMP↓	100
R519C	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ↓ ↓ cAMP ve IP	176
R519G	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ↓ ↓ cAMP ve IP	176
W520X	Hücre yüzey ekspresyonu ↓	167
Y601H	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ ↓ cAMP ve IP	177
R609X	Kesik reseptör	178, 179
L653V	= Hücre yüzey ekspresyonu = TSH bağlama ↓ cAMP ve IP	166, 180
V689G	Bilinmeyen fonksiyon	12
Kodlayıcı dizi Delesyon / insersiyonları		
Q8fsX62	Hücre yüzey ekspresyonu ↓ TSH bağlama ve cAMP ↓	159
123–124insTGCA	Kesik reseptör	13, 167
I152fsX157	Kesik reseptör	15
555– 561delTATTCTT	Kesik reseptör	13, 167
406–412 del+ins	Kesik reseptör	103
T655X(delAC)	Kesik reseptör	101, 181
İntronik mutasyonları		
İntron 5 G to A-1	Birleştirme hasarı	106
Intron 6 G to C +3 – del 157–182	Birleştirme hasarı	181
Missense mutasyon		
R531Q	Fonksiyonel karakterizasyonu henüz yapılmamış	Tez çalışması (2010)

Yine yapılan geniş çaplı araştırmalar hastalığın birleşik heterozigot ya da homozigot aktarılan çekinik özellikte kalıtıma uyduğunu göstermiştir (97, 106). 2002 yılında Alberti ve arkadaşları monoallelik mutasyonun gözlemlendiği dominant kalıtım özelliğini göstermişlerdir (Tablo 22) (101).

Tablo 22. TSH uyarısına tiroid cevabının derecesine göre TSH direnç sınıflaması (168).

Direnç Derecesi	Mutasyonlar	Kahtım	TSH düzeyi	sT ₄ düzeyi	Orijinal Referans
Tam	Biallelik	Resesif	↑↑↑	Düşük	104
Orta	Biallelik	Resesif	↑↑	Normal	97
Hafif	Monoallelik	Dominant	↑	Normal	101

TSHR'ünde oluşan bu doğal mutasyonlar kayda değer belirli bir bölge olmaksızın reseptör dizisinde herhangi bir yere yerleşebilmektedir. Ancak hücre içi bölgede yerleşen ve sinyal iletiminde rol oynayan C-terminal bölge korunmuş tek bölgedir. Bununla birlikte bazı mutasyonlar - C41S, P162A, C390W, R450H, W546X, A553T and T655fs gibi- birden fazla sayıda rapor edilmiştir. Özellikle W546X ve R450H mutasyonları Japonya ve Galler'de tiroid disfonksiyonunda ana rol oynamaktadır (16, 182, 168). TSHR'ünde gözlene LOF mutasyonlarının moleküler etki mekanizmaları farklılıklar göstermektedir. Örneğin hücre yüzeyinde reseptör ekspresyonunun azalması ya da olmaması, ligand bağlanmasında bozulma, reseptör aktive olamaması veya G proteinleri üzerinden etki gösterememesi gibi... (Tablo 21).

Kesik reseptör sentezine neden olan mutasyonlar genellikle reseptörünün plazma zarı üzerindeki ekspresyon miktarını etkiler. T655X (del AC) mutasyonu buna örnek olarak dominant TSH dirençli bir hastada gösterilmiştir. Bu çerçeve kayması (fs) mutasyonu TM7 başlangıç bölgesi ve C terminal kuyruğu eksik reseptör üretimine neden olmaktadır. Mutasyon COS-7 ve HEK293T hücrelerine aktarıldığında FACS analizinde mutant reseptörün hücre yüzey ekspresyonunun azaldığı bazal ve TSH uyarılmış cAMP üretiminin bozulduğu gösterilmiştir (101). Benzer bulgular TM4'te erken dur kodonu oluşturan W546X (102) ya da kodon 419'da (103) fs veya erken dur

kodonu oluşturan delesyon/insersiyon mutasyonlarında da gözlenmiştir. Diğer yandan reseptörün TSH bağlayıcı etkisine müdahil olan, LRR aminoterminal bölgesinde delesyonun gözlendiği ekzon 6 atlayan mutasyonları da iki hastada bildirmiştir (181).

Başlangıçta ECD'de yerleşen missense mutasyonlarının ligand bağlanmasını etkilediği düşünüldü. Ancak yapılan çalışmalarda bu bölgede tanımlanan mutasyonların çoğu azalmış hücre yüzey ekspresyonu ile karakterize idi. Bu endoplazmik retikulumdan plazma membranına uyumsuz taşıma ve ekleme nedeni olan reseptör hatalı katlanmasının muhtemel bir sonucudur. Bu durum ECD'nin genel bütünlüğünün korunmasında rol oynayan residülerin etkilendiği mutasyonlarda beklenebilir. Örneğin LRR bölgesinin N-terminal bölgesi ile diğer sistein residüleri arasında disülfid bağları oluşturduğu düşünülen kodon 41'in sistein residüsünde gözlenen mutasyon (C41S) reseptörün hücre içi yakalaması ile ilgilidir (101, 171). Benzer bulgu C390W mutasyonunda da gösterilmiştir. Ancak bu mutant hücre yüzeyinde ekspresyon kısmi olarak devam etmektedir. Ayrıca elde edilen deneysel verilerde TSH bağlama ilgisinde belirgin azalma gösterilmiştir (102). ECD'deki bazı mutasyonlar beklenmedik bir şekilde ligand bağımsız olarak aktivite artışı göstermektedir. C390W (98) ve R310C (99) buna örnekler olarak verilebilir. Söz konusu bu mutasyonlarda hormon bağlanmasında ve cAMP aktivasyonunda azalma gözlenmesine rağmen reseptörün bazal aktivitesi artmıştır. Bu bulgu ECD'in inhibitör etkisine kanıt olarak yorumlanmıştır. Buna ek olarak R310C'nin artmış bazal aktivitesi etkilenen hastalardaki ötroidizmi de açıklayabilir (99).

Normal olarak hormon bağlayan ancak adenilat siklazı aktive edemeyen mutasyon da yayınlanmıştır. Bu mutasyon örneğin TM1 bölgesine çok yakın olan bağlantı bölgesi sonundaki D410N mutasyonudur. Bu nedenle bu bölge ECD'deki

aktivasyon sinyalinin serpentin yapıya aktarıldığı bölge olarak gösterilmemiştir. TM segmentleri ve bağlayıcı bölgedeki missense mutasyonların reseptör aktivasyonu veya G proteinlerle eşleşme ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte serpentin yapıyı etkileyen LOF mutasyonları hücre yüzey ekspresyonunda belirgin azalma ile de karakterizedir. Buna bağlı olarak ekzon 10'da kodlanan missense LOF mutasyonları membran hedefleme kusuruna yol açan temel mekanizma olarak görülmektedir. Ayrıca R450H ve V473I mutasyonları (176) da bildirilmiştir. Bu mutasyonlar hücre zarında ekspresyonda değişiklik oluşturmamakta ancak sinyal iletimde bozukluğa yol açmaktadır. Bu da TM2'deki residülerin TSH tarafından tetiklenen sinyal iletimde rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada heterozigot formda bulunan R450H mutasyonunun TSH bağlama ve cAMP düzeyinde azalma ile etki gösterdiği tabloda da belirtilmiştir. Ayrıca bulunan bu mutasyon hipotiroid olan hastanın kliniği ile de uyum göstermektedir. Yine tespit edilen ancak daha önceden bildirilmemiş olan homozigot R531Q mutasyonunun da hipotiroidi kliniğinde etken olduğunu düşünülmektedir. Ancak bu mutasyonun etkisinin net bir şekilde karakterizasyonu için in vitro olarak fonksiyonel çalışmasının yapılması ve bu görüşün desteklenmesi gerekmektedir.

Heterozigot TSHR mutasyonlu hastalarda TSH direnç mekanizması daha az belirgindir. Bunun nedeni olarak mutant TSHR'ü tarafından yabancı tip reseptör üzerine gen dozajı (haploinsufficiency) ya da dominant negatif etki gösterdiği düşünülmektedir. 2005 yılında Calebiro ve arkadaşları in vitro olarak yabancı tip reseptörün olgunlaşma ve hücre zarına yönelme aşamasında dominant negatif etki gösteren mutasyonların varlığını ortaya koymuşlardır (C41S, L467P, C600R). Çalışmalarında yabancı tip ve mutant tip TSHR'leri ile eşzamanlı transfekte edilen hücrelerde, sadece yabancı tip TSHR'leri ile transfekte edilen hücrelere göre bazal ve TSH ile uyarılmış cAMP

üretimini azaldığı gözlemlenmiştir. Bunların çalışmalarının sonucunda heterozigot LOF TSHR mutasyonlu olgularda TSH direncinin gözlenme nedeni olarak hücre yüzeyine hücre içinde muhafaza edilen mutant TSHR'lerinin oligomerizasyonu ile yabancı genotipe sahip TSHR miktarının hücre yüzeyinde azalması gösterilmiştir (171, 183).

Nihayetinde azalmış hücre yüzey ekspresyonu, azalmış ligand ilgisi, bozulmuş reseptör aktivasyonu ya da G protein eşleşmesi TSHR LOF mutasyonlarında gözlenen inaktivasyon mekanizmalarıdır. Reseptör fonksiyon değerinin in vitro ölçülmesi ile genotipteki anormalliklerin fenotipik olarak kliniğe yansması arasında bariz bir uyum saptanmıştır (184). Örneğin C41S ve T655X(del AC) mutasyonları in vitro olarak minimum hücre yüzey ekspresyonu ve bazal cAMP seviyesine neden olmaktadır. Bu hastalara klinikte TSH düzeyinin çok yüksek olduğu dominant TSH direnci olarak yansmaktadır (101). Benzer durum Japon ailelerden oluşan çalışma grubunda da bildirilmiştir (176). Etkilenen olguların tamamı R450H mutasyonu V733I, R519G veya R519C mutasyonları ile birleşik heterozigosite göstermektedir. İlginç olarak bu mutasyonlarda (R519G > R519C > R450H > V473I) in vitro ortamda gözlenen cAMP üretiminin uyarılmasındaki bozukluk ile hastalarda gözlenen mutasyonlardaki (R519G/R450H > R519C/R450H > V473I/R450H) serum TSH düzeyleri arasında uyum söz konusudur. Tüm bu anlatılanlara ek olarak çalışma grubunda TSHR'ü kodon 459 ve 727 tespit edilen polimorfizmler de bulunmaktadır. Bunlardan kodon 727'de gözlenen polimorfizm yerleşim olarak daha önceden yayınlanmış olan D727E, p.Asp727Glu polimorfizmine uymaktadır. Ancak yapılan araştırmalarda daha önceden tespit edilmiş olan bu D727E polimorfizmi literatürde yerini otoimmün olmayan hiperfonksiyone tiroid nodülleri ve toksik multinodüler guatr hastaları gibi olgularda TSHR'ünde fonksiyon kazandıran polimorfizm olarak almıştır (185, 186). Otoimmün

olmayan konjenital hipotiroidi olgularından oluşan çalışma grubunda tespit edilen kodon 727 polimorfizminde beklenen etki ise LOF tiptedir. Dolayısı ile bu polimorfizmin mevcut hipotiroid hasta grubunda tespiti literatür verilerine aksi yönde özellik taşımaktadır. Kodon 459'da tespit edilen A459A, p.Ala459Ala polimorfizmi ise daha önceden bilinen bir polimorfizm değildir. İlk kez bu çalışma grubunda tespit edilmiş olup bunun da etkisi fonksiyonel olarak kesin bir şekilde ifade edilmelidir. Mevcut olan bu polimorfizmler tek başlarına ya da yapılan tez araştırmasına dâhil olmayan ekzon 10 dışında kalan bir bölgede bulunan başka bir mutasyon ya da polimorfizmle birlikte hali hazırdaki hastalığın etiyolojik faktörü olarak açıklanabilir. Bunun ispatlanabilmesi için diğer bölgeleri de taramak üzere ileri araştırmalar yapılmalı, tüm ekzon dizilemesi uygulanmalıdır.

Fenotip üzerindeki ağırlığın ciddiyetini etkileyen faktörlerden biri mutasyon tipi iken diğer bir faktör ise etkilenen mutant allel sayısıdır. Aslında tek TSHR allelinde mutasyonu taşıyan dominant formlar çoğunlukla hafiftir. Ancak iki mutant allel söz konusu olduğunda fenotip daha ağırdır. Bu nedenle TSH direnci resesif bir hastalık olarak tanımlanır (97, 149). Sonuç olarak basit heterozigot TSHR mutasyonu taşıyan olgular dominant TSH direnci gösteren aileler olarak nitelendirilebilir (101). Yapılan bu çalışmada da R531Q mutasyonunu homozigot formda taşıyan olgunun kliniği agenezi oluşturacak kadar ciddi iken heterozigot formda taşıyan anne ve babasının tiroid bezi ile ilgili doğrudan ya da dolaylı daha önceden araştırmaya gerek duyulacak herhangi bir klinik şikâyeti olmamıştır. Bu veri de literatürdeki bilgileri destekler niteliktedir.

Yabancıl tip TSHR'ünde gözlenen mutant alleller ve mutasyon tipi TSHR'ünün fonksiyonu üzerinde etkisini gösteren başlıca faktördür. Ancak aynı mutasyonu taşıyan farklı kişilerde ya da ailenin farklı bireyleri arasında tiroid fonksiyon testleri farklılıklar

göstermektedir. R450H mutasyonunu tespit edilen iki kardeş buna örnek olarak gösterilebilir. Kardeşlerden biri hipotiroidi kliniğini hem laboratuvar değerleri hem de fenotipik yansıma olarak daha ağır bir formda geçirirken diğer kardeş daha hafif formda göstermektedir. Hatta hafif formun gözlemlendiği kardeşte klinik tanı daha geç yaşta konabilmiştir. Buna ek olarak mutasyonu taşıyan hasta bir olguda TSH düzeyleri değişiklikler de gösterebilmektedir. Bu bulgular da hastalığın kliniği üzerinde henüz bilinmeyen genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerin de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Otoimmün olmayan primer konjenital hipotiroidi gerek aileler gerekse hastalar açısından psikososyal ve klinik anlamda oldukça önemli olumsuz etkilere sahiptir. Bu nedenle önlenebilir zekâ geriliğinin gözlenebildiği konjenital hipotiroidi hastalarının mutlaka erken teşhis edilip tedavisi verilmelidir.

Hastalığın patogeneğinde farklı genetik mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. TSHR gen mutasyonu da bunlardan biridir.

TSHR geni üzerine çalışmalar sıklıkla ailelerde ya da bireylerde TSHR geni taraması ile yeni mutasyonların tespiti, bilinen mutasyonların belli hasta gruplarında aranması veya mutasyonun etkisinin cAMP üzerinden değerlendirildiği fonksiyonel çalışmalar olarak yapılmıştır. Bu gen üzerinde otoimmün olmayan primer konjenital hipotiroidi hastalarına yönelik toplum tabanlı çalışmalar nadirdir ve tiroid hastalıklarının sık görüldüğü uzak doğu ülkelerinde yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda farklı populasyonlarda farklı mutasyonlar da tespit edilmiştir.

Bu çalışmada otoimmün olmayan primer konjenital hipotiroidili Türk çocuk hastalarında sorumlu olabilecek mutasyon ve polimorfizmler mevcut bütçe doğrultusunda küçük bir hasta grubunda TSHR geni ekzon 10 bölgesinde dizileme metodu ile gösterilmiştir. Ancak verilerin Türk toplumuna genellenebilmesi için daha geniş ve kapsamlı projeler ile desteklenmesi gerekmektedir.

Literatüre ilk kez kazandırılan mutasyon ve polimorfizmlerin de fonksiyonel çalışmalarla desteklenmesi hastalık üzerinde oluşturduğu düşünülen etkisini kesin olarak ispat edebilmek için önemlidir.

Sonuç olarak bu çalışma planlanırken otoimmün olmayan konjenital hipotiroidi etiyolojisinde rol oynadığı ispat edilen TSHR mutasyonlarının Türk çocuklarındaki sıklık ve profilinin ortaya çıkarılması hedeflendi. Yapılan bu çalışmanın daha geniş ve kapsamlı projelerle desteklenmesi ile elde edilebilecek olan veriler, sonraki dönemlerde tedavi amacıyla hedefe yönelik moleküler temelli ilaçların da içinde yer aldığı yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine ve bu protokollerin klinikte kullanımlarına ve olası muhtemel gen tedavisine ışık tutacaktır. İleriki nesillere verilebilecek doğum öncesi ve doğum sonrası genetik danışmanlıkta da bu veriler önem arz edecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Ataş A, Çakmak A, Karazeybek H. Konjenital Hipotiroidizm. Güncel Pediatri 2007;5: 70-6.
2. Yordam N, Calikoglu AS, Hatun S, Kandemir N ve ark. Screening for congenital hypothyroidism in Turkey. Eur J Pediatr 1995;154:614-6.
3. Franchi S. Disorders of the thyroid gland. In: Behrman RE, Kliegman RM Jenson HB eds. Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: WB Saunders Co 2000;1696-704
4. Cinaz P. Konjenital Hipotiroidi. Klinik Pediatri 2003;2:59-63.
5. Tamam M, Adalet I, Bakir B ve ark. Diagnostic spectrum of congenital hypothyroidism in Turkish children. Pediatr Int 2009;51:464-8.
6. Vanvooren V, Uchino S, Duprez L et al. Oncogenic mutations in the thyrotropin receptor of autonomously functioning thyroid nodules in the Japanese population. EJE 2002;147:287-91.

7. Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C et al. Thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev* 2002;82: 473-502.
8. Xie J, Pannain S, Pohlenz J. Resistance to Thyrotropin (TSH) in Three Families Is not Associated with Mutations in the TSH Receptor or TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82: 3933-40.
9. Porcellini A, Fenzi G, Avvedimento EV. Mutations of thyrotropin gene. *C. Mol. Met* 1997; 75: 567-75.
10. Siegel R.D, Lee SL. Toxic nodular goiter. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1998;27: 151-68.
11. Kopp P. Human genome and disease: Review, The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell. Mol. Life Sci* 2001;58: 1301-22.
12. Yuan ZF, Luo YF, Wu YD et al. Thyrotropin receptor gene inactivating mutation in Chinese children with congenital hypothyroidism. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2007;45:508-12.
13. Camilot M, Teofoli F, Gandini A. Thyrotropin receptor gene mutations and TSH resistance: variable expressivity in the heterozygotes. *Clin Endocrinol* 2005;63:146-51.
14. Fricke-Otto S, Pfarr N, Mühlenberg R et al. Mild Congenital Primary Hypothyroidism in a Turkish Family Caused by a Homozygous Missense Thyrotropin Receptor (TSHR) Gene Mutation (A593 V). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005;113: 582–5.
15. Nicoletti A, Bal M, De Marco G et al. Thyrotropin-Stimulating Hormone Receptor Gene Analysis in Pediatric Patients with Non Autoimmune Subclinical Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94: 4187–94.

16. Narumi S, Muroya K, Abe Y et al. TSHR Mutations as a Cause of Congenital Hypothyroidism in Japan: A Population-Based Genetic Epidemiology Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1317–23.
17. Moore KL. The Neck. In: *Clinically Oriented Anatomy*. 3rd ed: Moore KL, Baltimore, Williams & Wilkins. 1992: 783-852.
18. Mark A. Sperling. *Pediatric Endocrinology*, 3rd Ed: Philadelphia, Elsevier. 2008:208-234.
19. Sadler GP, Clark OH, Van Heerden JA et al. Thyroid and Parathyroid. In: *Principles of Surgery*. 7th Ed: Schwartz SI, New York, Mc Graw Hill. 1999: 1661-713.
20. Dossel WE. Effects of depletion and substitution of perivesicular mesenchyme upon the development of the thyroid primordium. *J Elisha Mitchell Scientific Society* 1957; 73: 244.
21. Marinovic D, Garel C, Czernichow P et al. Additional phenotypic abnormalities with presence of cysts within the empty thyroid area in patients with congenital hypothyroidism due to thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88: 1212–16.
22. Pintar JE. Normal development of the hypothalamicpituitary- thyroid axis. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *The Thyroid*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2000:7–19.
23. Stone JA, Figueroa RE. Embryology and anatomy of the neck. *Neuroimaging Clin N Am* 2000;10:55–73.
24. Hoyes AD, Kershaw DR. Anatomy and development of the thyroid gland. *Ear Nose Throat J* 1985;64: 318–33.

25. Kumar R, Gupta R, Bal CS et al. Thyrotoxicosis in a patient with submandibular thyroid. *Thyroid* 2000;10: 363–5.
26. Oyar O. Boyun Ultrasonografisi. İzmir. E.Ü.Basımevi, 2000; 64.
27. Van Vliet G. Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clin. Genet.* 2003;63: 445-55.
28. Clark HO: Endocrine surgery of the thyroid and parathyroid glands. The CV Mosby Company Missouri 1985.
29. Middlesworth VL: The thyroid gland: A practical clinical treatise. Year Book Publisheres. Inc. Chiacago-London 1986.
30. Castanet M, Polak M, Bonaïti-Pellié C et al. Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2009–14.
31. Brook C, Clayton P, Brown R. Brook’s clinical pediatric endocrinology. 6th ed. The Thyroid, Rosalind S. Brown eds. Oxford. Blackwell Publishing 2009:250-83.
32. Damante G, Tell G, Di Lauro R. A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 2001;66: 307-56.
33. Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E et al. TTF2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J* 1997;16: 3185–97.

34. Parlato R, Simeone A, De Felice M et al. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J*, 2001;20: 2108.
35. Kimura S, Hara Y, Pineau T et al. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* 1996;10: 60–9.
36. Kimura S, Ward JM, Minoo P. Thyroid-specific enhancer binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia. *Biochimie* 1999;81: 321–7.
37. Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D et al. Partial deficiency of thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice. *J Clin Invest* 2002;109: 469–73.
38. Dathan N, Parlato R, Rosica A et al. Distribution of the titf2/foxe1 gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair. *Dev Dyn* 2002;224: 450–6.
39. De Felice M, Ovitt C, Biffali E et al. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* 1998;19: 395–8.
40. Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 1998;19: 87–90.
41. Di Palma T, Nitsch R, Mascia A et al. The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription. *J Biol Chem* 2003;278: 3395–402.

42. Flamant F, Poguet AL, Plateroti M et al. Congenital hypothyroid Pax8 (-/-) mutant mice can be rescued by inactivating the TRalpha gene. *Mol Endocrinol* 2002;16: 24–32.
43. Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A et al. Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 15462–67.
44. Marians RC, Blair HC, Unger P et al. Defining thyrotropin-dependent and independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 15776–81.
45. Macchia PE. Recent advances in understanding the molecular basis of primary congenital hypothyroidism. *Mol Med Today* 2000;6: 36–42
46. Hershman JH, Pittman JA: Response to synthetic thyrotropin-releasing hormone in man. *J Clin Endocrinol* 1970; 31: 457.
47. Kopp P. Human genome and disease: Review, The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell. Mol. Life Sci* 2001;58: 1301-22.
48. Guyton CA: Textbook of medical physiology. Seventh edition, W.B.Saunders Company, 1986.
49. Wyngaarden BJ, Smith HL: Textbook of medicine, W.B.Saunders Company, Philadelphia-Tokyo: 1988:1315-40.
50. Larsen PR, Silva JE, Kaplan MM. Relationship between circulating and intracellular thyroid hormones: Physiological and implication. *Endocrinol Rev* 1981; 2: 87-101
51. Ingbar HS, Brauerman EL: Werner's the thyroid. Fundamental and clinical text. JB Lippincott Company 1989.

52. Yiğit G, Yiğit Refik. Tiroid hastalıkları. 3. Baskı, Tiroid Fizyolojisi. Ed: Ünal G. Nobel tıp kitapevi, İstanbul, 2001:28-64.
53. Davis P.J, Davis F.B. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 1996; 6: 497-504,
54. Koloğlu S, Erdoğan G. Endokrinoloji Temel ve Klinik. 2. Baskı, Genel görüş ve bilgiler. Ed: Erdoğan G. Koloğlu. MNG Medikal & Nobel, Ankara, 2005:166.
55. Greenspan FS. The problem of the nodular goitre. *Med Clin N Am* 1991; 1: 195-209.
56. Shimkin PM, Sagerman RH. Lymphoma of the thyroid gland. *Radiology* 1969; 92: 812.
57. Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* 1992; 13: 596–611.
58. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC et al. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev* 1998;19: 673–716.
59. Vassart G, Pardo L, Costagliola S. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 119–26.
60. Kleinau G, Krause G. Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signalling mechanisms. *Endocr Rev* 2009;30: 133–51.
61. Smits G, Campillo M, Govaerts C et al. Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucinerich repeats responsible for ligand specificity. *EMBO J* 2003;22: 2692–703

62. Nagayama Y and Rapaport B. The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insights after its molecular cloning. *Mol. Endocrinol* 1992;92: 145-56.
63. Terry FD, Takao A, Reigh-Yi L et al. Thyrotropin receptor–associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest* 2005;115:1972–83.
64. Refetoff S, Sunthornthepvarakul T, Gottschalk ME et al. Resistance to thyrotropin and other abnormalities of the thyrotropin receptor. *Recent Prog Horm Res* 1996;51: 97-120.
65. Gross B, Mishari M, Sar S et al. Composite structure of the human thyrotropin receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;177: 679-87.
66. Luca P, Davide C, Daniela C et al. Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010; 322: 72–82.
67. Wonerow P, Neumann S, Gudermann T et al. Thyrotropin receptor mutations as a tool to understand thyrotropin receptor action. *J Mol Med* 2001; 79: 707-21.
68. Davies TF, Ando T, Lin RY. et al. Thyrotropin receptor–associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J. Clin. Invest* 2005; 115:1972–1983.
69. Chazenbalk G.D, Tanaka K, McLachlan SM et al. On the functional importance of thyrotropin receptor intramolecular cleavage. *Endocrinology* 1999; 140: 4516-20.
70. Kleinau G, Krause G. Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signalling mechanisms. *Endocr Rev* 2009;30: 133–51.

71. Costagliola S, Panneels V, Bonomi M et al. Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *EMBO J* 2002; 21: 504–13.
72. Bonomi M, Busnelli M, Persani L et al. Structural differences in the hinge region of the glycoprotein hormone receptors: evidence from the sulfated tyrosine residues. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 3351–63.
73. Nurwakagari P, Breit A, Hess C et al. A conformational contribution of the luteinizing hormone-receptor ectodomain to receptor activation. *J Mol Endocrinol* 2007;38: 259–75.
74. Mueller S, Kleinau G, Jaeschke H et al. Extended hormone binding site of the human thyroid stimulating hormone receptor: distinctive acidic residues in the hinge region are involved in bovine thyroid stimulating hormone binding and receptor activation. *J Biol Chem* 2008;283: 18048–55.
75. Saiardi A, Falasca P, Civitareale D. Synergistic transcriptional activation of the thyrotropin receptor promoter by cyclic AMP-responsive-element-binding protein and thyroid transcription factor-1. *Biochemical Journal* 1995; 310: 491–6.
76. Wang J, Whetsell M, Klein JR. Local hormone networks and intestinal T cell homeostasis. *Science* 1997; 275: 1937–9.
77. Stein SA, Oates EL, Hall CR et al. Identification of a point mutation in the thyrotropin receptor of the hyt/hyt hypothyroid mouse. *Mol Endocrinol* 1994; 8:129–38.
78. Crisp MS, Lane C, Halliwell M et al. Thyrotropin receptor transcripts in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2003–5.

79. Endo T, Ohta K, Haraguchi K et al. Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor cDNA from fat cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 10833-7.
80. B. Corvilain, J. Van Sande, J. E. Dumont et al. Somatic and germline mutations of the TSH receptor and thyroid diseases. *Clinical Endocrinology* 2001; 55: 143-58.
81. Dumont JE, Lamy F, Roger P et al. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiological Reviews* 1992; 72: 667-97.
82. Parma J, Duprez L, Van Sande J et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature (Lond.)*. 1993; 365:649-51.
83. Kosugi S, Okajima F, Ban T et al. Substitutions of different regions of the third cytoplasmic loop of the TSH receptor have selective effects on constitutive, TSH-, and TSH receptor autoantibody- stimulated phosphoinositide and cAMP signal generation. *Mol. Endocrinol* 1994;7:1009-20.
84. Parma J, Van Sande J, Swillens S et al. Somatic mutations causing constitutive activity of the thyrotropin receptor are the major cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutations activating both the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inositol phosphate-Ca²⁺ cascades. *Mol Endocrinol* 1995;9:725-33.
85. Duprez L, Parma J, Van Sande J et al. Germline mutations in the thyrotropin receptor gene cause non-autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism. *Nat Genet* 1994;7:396-401.

86. Van Sande J, Parma J, Tonacchera M et al. Somatic and germline mutations of the TSH receptor gene in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2577-85.
87. Park SM, Clifton-Bligh RJ, Betts P et al. Congenital hypothyroidism and apparent athyreosis with compound heterozygosity or compensated hypothyroidism with probable hemizygoty for inactivating mutations of the TSH receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:220-7.
88. Kopp P. Perspective: Genetic defects in the etiology of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 2002; 143: 2019-24.
89. Gillam MP, Kopp P. Genetic regulation of thyroid development. *Curr Opin Pediatr* 2001;13: 358–63.
90. Gillam MP, Kopp P. Genetic defects in thyroid hormone synthesis. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13: 364–72.
91. Park SM, Chatterjee VKK. Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* 2005;42: 379–389.
92. Cao XY, Jiang XM, Dou et al. Timing of vulnerability of the brain to iodine deficiency in endemic cretinism. *N Engl J Med* 1994;331:1739–44.
93. Klein RZ, Mitchell ML. Hypothyroidism in infants and children. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner and Ingbar's the thyroid*, 7th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:984–1008.
94. Grant DB, Smith I. Survey of neonatal screening for primary hypothyroidism in England, Wales, and Northern Ireland 1982–84. *BJM* 1988;296:1355–8.

95. Law WY, Bradley DM, Lazarus JH et al. Congenital hypothyroidism in Wales (1982–1993): demographic features, clinical presentation and effects on early neurodevelopment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48: 201–7.
96. Evans C, Jordan NJ, Owens G et al. Potent thyrotrophin receptor-blocking antibodies: a cause of transient congenital hypothyroidism and delayed thyroid development. *Eur J Endocrinol* 2004;150:265–8.
97. Sunthornthepvarakul T, Gootschalk ME, Hayashi Y et al. Resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. *N Engl J Med* 1995;332:155–60.
98. De Roux N, Misrahi M, Brauner R et al. Four families with loss of function mutations of the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metabol* 1996;81: 4229–35.
99. Russo D, Betterle C, Arturi F et al. A novel mutation in the thyrotropin (TSH) receptor gene causing loss of TSH binding but constitutive receptor activation in a family with resistance to TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 4238–42.
100. Nagashima T, Murakami M, Onigata K et al. Novel inactivating missense mutations in the thyrotropin receptor gene in Japanese children with resistance to thyrotropin. *Thyroid* 2001;11: 551–9.
101. Alberti L, Proverbio MC, Costagliola S et al. Germline mutations of TSH receptor gene as cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87: 2549–55.

102. Clifton-Bligh RJ, Gregory JW, Ludgate M, et al. Two novel mutations in the thyrotropin (TSH) receptor gene in a child with resistance to TSH. *J Clin Endocrinol Metabol* 1997;82: 1094–100.
103. Biebermann H, Schoneberg T, Krude H et al. Mutations in the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metabol* 1997;82: 3471–80.
104. Abramowicz MJ, Duprez L, Parma J et al. Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland. *J Clin Invest* 1997;99: 3018–24
105. Tonacchera M, Agretti P, Pinchera A et al. Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin (TSH) and absent circulating thyroglobulin: evidence for a new inactivating mutation of the TSH receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85: 1001–8.
106. Bretones P, Duprez L, Parma J et al. A familial case of congenital hypothyroidism caused by a homozygous mutation of the thyrotropin receptor gene. *Thyroid* 2001;11: 977–80.
107. Tonacchera M, Agretti P, De Marco G et al. Thyroid resistance to TSH complicated by autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86: 4543–6.
108. Guazzi S, Price M, De Felice M et al. Thyroid nuclear factor 1 (TTF 1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J* 1990;9: 3631–9.

109. Breedveld GJ, van Dongen JWF, Danesino C et al. Mutations in TITF-1 are associated with benign hereditary chorea. *Hum Mol Genet* 2002;11: 971–9.
110. Lazzaro D, Price M, de Felice M et al. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development* 1991;113:1093–104.
111. Civitreale D, Lonigro R, Sinclair AJ et al. A thyroid-specific nuclear protein essential for tissue-specific expression of the thyroglobulin promoter. *EMBO J* 1989;8: 2537–42.
112. Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwartz M et al. Cell-typespecific expression of the rat thyroperoxidase promoter indicates common mechanisms for thyroid-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 1992;12: 576–88.
113. Bruno MD, Bohinski RJ, Huelsman KM et al. Lung cellspecific expression of the murine surfactant protein A (SP-A) gene is mediated by interactions between the SP-A promoter and thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem* 1995;270:6531–6.
114. Devriendt K, Vanhole C, Matthijs G et al. Deletion of the thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *N Engl J Med* 1998;338:1317–18.
115. Doyle DA, Gonzalez I, Thomas B et al. Autosomal dominant transmission of congenital hypothyroidism, neonatal respiratory distress, and ataxia caused by a mutation of NKX2–1. *J Pediatr* 2004;145:190–3.

116. Krude H, Biebermann H, von Moers A et al. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest* 2002;109:475–80.
117. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P et al. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* 1998;19: 399–401.
118. Bamforth JS, Hughes IA, Lazarus JH et al. Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *Med Genet* 1989;26: 49–60
119. Poleev A, Wendler F, Gickenscher H et al. Distinct functional properties of three human paired-box-proteins, PAX8, isoforms generated by alternative splicing in thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Eur J Biochem* 1995;228:899–911.
120. Di Magliano MP, Di Lauro R, Zannini M. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13144–9.
121. Macchia PA, Lapi P, Krude H, et al. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet* 1998;19:83–6.
122. Meeus L, Gilbert B, Rydlewski C et al. Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4285–91.
123. Fraizer GC, Shimamura R, Zhang X et al. PAX8 regulates human WT1 transcription through a novel DNA binding site. *J Biol Chem* 1997;272:30678–87.

124. Espinoza CR, Schmitt TL, Loos U. Thyroid transcription factor 1 and Pax8 synergistically activate the promoter of human thyroglobulin gene. *J Mol Endocrinol* 2001;27: 59–67.
125. Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T et al. Isolation and characterization of the human Gsa gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2081–5.
126. Aldred MA, Trembath RC. Activating and inactivating mutations in the human GNAS1 gene. *Hum Mutation* 2000;16:183–9.
127. Wilson LC, Oude Luttikhuis MEM, Clayton PT et al. Parental origin of Gsa gene mutations in Albright's hereditary osteodystrophy. *J Med Genet* 1994;31:835–9.
128. Yu D, Yu S, Schuster V et al. Identification of two novel deletion mutations within the Gs alpha gene (GNAS1) in Albright hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3254–9.
129. De Vijlder JJM, Vulsma T. Hereditary Metabolic Disorders causing hypothyroidism. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner and Ingbar's the thyroid*, 7th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:749–55.
130. Berge-Lefranc JL, Cartonzon G, Mattei MG et al. Localisation of the thyroglobulin gene by in situ hybridization to human chromosomes. *Hum Genet* 1985;69:28–31.
131. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996;379:458–60.

132. Smanik PA, Ryu K-Y, Theil KS et al. Expression, exonintron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* 1997;138:3555–8.
133. Everett LA, Glaser B, Beck JC et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 1997;17:411–22.
134. Royaux IE, Suzuki K, Mori A et al. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 2000;14:839–45.
135. Reardon W, Trembath RC. Pendred syndrome. *J Med Genet* 1996;33:1037–40.
136. Batsakis JG, Nishiyama RH. Deafness with sporadic goitre. *Arch Otolaryngol* 1962;76: 401–6
137. Masmoudi S, Charfedine L, Hmani M et al. Pendred syndrome: phenotypic variability in two families carrying the same PDS missense mutation. *Am J Med Genet* 2000;90: 38–44.
138. Caillou B, Dupuy C, Lacroix L et al. Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (ThoX, LNOX, Duox) genes and proteins in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3351–8.
139. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A et al. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 2003;278:40128–35.

140. Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB et al. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* 2004;74:168–75
141. Leibowitz S, Roosin P, Rosenn M Chronic norepinephrine injection into the hypothalamic paraventricular nucleus produces hyperphagia and increased body weight in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1984;21:801–8.
142. Wilson G R, Curry WR. Subclinical Thyroid Disease. *Am Fam Physician* 2005;72:1517-24.
143. Saiki RK, Bugavan TL, Horn GT et al. Analysis of enzymatically amplified beta globin and HLA-DQ alpha DNA with allelespecific oligonucleotide probes. *Nature* 1986;13:163-6.
144. Saiki RK, Gelfand DL, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-91.
145. Dennis Lo YM. *Clinical Applications of PCR*. Humana Press inc. 1998: 3-10.
146. William S K, Michael RC. *Concepts of Genetics* (Çev:Öner C). Ankara: Palme Yayıncılık, 2002: 744-745
147. Eberhard P. *Genetik Atlası* (Çev:Lüleci G, Sakızlı M, Alper Ö). İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2000: 53-56.
148. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
149. De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr. Rev* 2004;25:722–46.

150. LaFranchi S. Congenital hypothyroidism: etiologies, diagnosis, and management. *Thyroid* 1999;9: 735–40
151. Refetoff S, Dumont JE, Vassart G. Thyroid disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. McGraw Hill, New York, 2001:4029–76
152. Vassart G, Dumont JE, Refetoff S. Thyroid disorders. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7 ed. London, New York, Tokyo. McGraw Hill. 1995.
153. Medeiros-Neto G, Targovnik HM, Vassart G. Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. *Endocr Rev* 1993;14:165–83.
154. Abramowicz MJ, Targovnik HM, Varela V et al. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *J Clin Invest* 1992;90:1200–4.
155. Abramowicz MJ, Vassart G, Christophe D. Functional study of the human thyroid peroxidase gene promoter. *Eur J Biochem* 1992;203:467–73.
156. Pohlenz J, Medeiros-Neto G, Gross JL et al. Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by a homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240,:488–91.
157. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ et al. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 2002;347:95–102.

158. Moreno JC, Klootwijk W, van Toor H et al. Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism. *N Engl J Med* 2008;358:1811–8.
159. Tonacchera M, Di Cosmo C, De Marco G et al. Identification of TSH receptor mutations in three families with resistance to TSH. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 2007;67:712–8.
160. Karakoc E, Turan S, Akpinar I et al. Screening of Parents and Siblings of Patients with Thyroid Dysgenesis by Thyroid Function Tests and Ultrasound. *Horm Res* 2008;70:329–39.
161. Yordam N, Ozon A, Alikasifoglu A et al. Results of neonatal screening for congenital hypothyroidism in Turkey: Hacettepe experience. *Horm Res* 2003;60:100.
162. Calaciura F, Motta RM, Miscio G et al. Subclinical hypothyroidism in early childhood: a frequent outcome of transient neonatal hyperthyrotropinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3209–14.
163. Calaciura F, Miscio G, Coco A et al. Genetics of specific phenotypes of congenital hypothyroidism: a population-based approach. *Thyroid* 2002;12:945–51.
164. Tonacchera M, Perri A, De Marco G et al. Low prevalence of thyrotropin receptor mutations in a large series of subjects with sporadic and familial nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5787–93.
165. Cordella D, De Marco A, Calebiro D et al. Prevalence of inactivating TSH receptor (TSHR) mutations in a large series of pediatric subjects with non-

- autoimmune mild hyper-thyrotropinemia (hyperTSH). *Endocrine Abstracts* 2007. 14, OC1.1.
166. Tenenbaum-Rakover Y, Grasberger H, Mamasiri S et al. Loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor gene as a major determinant of hyperthyrotropinemia in a consanguineous community. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1706–12.
167. Rapa A, Monzani A, Moia S et al. Subclinical hypothyroidism in children and adolescents: a wide range of clinical, biochemical, and genetic factors involved. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2414–20.
168. Luca P, Davide C, Daniela C et al. Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010; 322: 72–82.
169. Duprez L, Parma J, Van Sande J et al. TSH Receptor Mutations and Thyroid Disease. *TEM* 1998;9:4.
170. Sura-Trueba S, Aumas C, Carre A et al. An inactivating mutation within the first extracellular loop of the thyrotropin receptor impedes normal posttranslational maturation of the extracellular domain. *Endocrinology* 2009;150:1043–50.
171. Calebiro D, de Filippis T, Lucchi S et al. Intracellular entrapment of wild-type TSH receptor by oligomerization with mutants linked to dominant TSH resistance. *Human Molecular Genetics* 2005;14:20.
172. De Marco G, Agretti P, Camilot M et al. Functional studies of new thyrotropin receptor (TSHr) mutations identified in patients affected by

- hypothyroidism or isolated hyperthyrotropinaemia. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2009;70:335–8.
173. Jeziorowska A, Pniewska-Siark B, Brzeziańska E et al. A novel mutation in the thyrotropin (thyroid-stimulating hormone) receptor gene in a case of congenital hypothyroidism. 2006;16:1303-9
174. Kanda K, Mizuno H, Sugiyama Y et al. Kanda et al. Clinical significance of heterozygous carriers associated with compensated hypothyroidism in R450H, a common inactivating mutation of the thyrotropin receptor gene in Japanese. *Endocrine*. 2006; 30:383-8.
175. Shibayama K, Ohyama Y, Hishinuma A et al. Subclinical hypothyroidism caused by a mutation of the thyrotropin receptor gene. *Pediatr Int* 2005;47:105–8.
176. Tsunekawa K, Onigata K, Morimura T et al. Identification and functional analysis of novel inactivating thyrotropin receptor mutations in patients with thyrotropin resistance. *Thyroid* 2006;16:471–9.
177. Takeshita A, Nagayama Y, Yamashita S et al. Sequence analysis of the thyrotropin (TSH) receptor gene in congenital primary hypothyroidism associated with TSH unresponsiveness. *Thyroid* 1994;4:255–9.
178. Tiosano D, Pannain S, Vassart G 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;9:887–94.
179. Richter-Unruh A, Hauffa BP, Pfarr N et al. Congenital primary hypothyroidism in a Turkish family caused by a homozygous nonsense mutation (R609X) in the thyrotropin receptor gene. *Thyroid* 2004;14: 971–4.

180. Grasberger H, Van Sande J, Hag-Dahood Mahameed A et al. A familial thyrotropin (TSH) receptor mutation provides in vivo evidence that the inositol phosphates/Ca²⁺ cascade mediates TSH action on thyroid hormone synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92: 2816–20.
181. Gagné N, Parma J, Deal C et al. Apparent congenital athyreosis contrasting with normal plasma thyroglobulin levels and associated with inactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1771–5.
182. Jordan N, Williams N, Gregory JW et al. The W546X mutation of the thyrotropin receptor gene: potential major contributor to thyroid dysfunction in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88 :1002–3.
183. Persani L, Calebiro D, Bonomi M. Technology insight: modern methods to monitor protein-protein interactions reveal functional TSH receptor oligomerization. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3, 180–90.
184. Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J et al. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 2001;22: 631–56.
185. Mühlberg T, Herrmann K, Joba W et al. Lack of association of nonautoimmune hyperfunctioning thyroid disorders and a germline polymorphism of codon 727 of the human thyrotropin receptor in a European Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Aug;85:2640-3.

10. EKLER

EK-1: Etik Kurul Onayı

EK-2: Tez onay belgesi

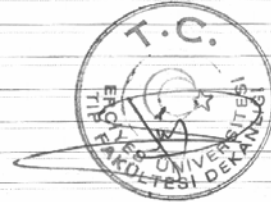
KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	: KAYSERİ 1 NOLU ETİK KURULU
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Konjenital Hipotroidizmli Türk Çocuklarında TSHR Geni İnaktivatör Mutasyonu Genetik Araştırması			
	ARİŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU				
	EUDRACT NUMARASI				
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Yusuf Özkul			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Genetik			
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI				
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ				
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	Kayseri 1 Nolu Etik Kurulu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ				
	UZMANLIK TEZİ/ AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ	<input checked="" type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI	<input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ ÇÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	
	SIGORTA	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	
	ILAN	
	YILLIK BİLDİRİM	
	SONUÇ RAPORU	
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	



Etik Kurul Değerlendirme Formu
28 Nisan 2009 Versiyon No: 1

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2009/130	Karar Tarihi : 05.11.2009
	Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Yusuf Özkul'un sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibine ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İy Klinik Uygulamaları Kulavuzu, ve Etik Kurul SOP
---------------	---

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Nazan DOLU	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rek. Cer.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. H. Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	
Yrd. Doç. Dr. Gülay YILDIRIM	Deontoloji	C.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	
Öğr. Gör. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Tıp Bilişimi ve Biyostatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	
Ecz. Dilşad KÜÇÜKKEMAH	Eczacı	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	E.Ü.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	
Sevtap KOÇER			E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> X	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	



Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

T.C.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA**

Dr. Aslıhan Kiraz'a ait "Otoimmün Olmayan Primer Konjenital Hipotroidizmli Türk Çocuklarında TSHR Geni İnaktivatör Mutasyonlarının Araştırılması" adlı çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 27/12/2010

İmza

Başkan: Prof. Dr. Munis Dündarİmza

Üye: Prof. Dr. Yusuf Özkulİmza

Üye: Prof. Dr. Selim Kurtoğluİmza

Üye: Prof. Dr. Türkan Patiroğlu İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Çetin Saatçi İmza