



PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Poslijediplomski sveučilišni studij

Biofizika

Ivana Gunjača

OTKRIVANJE GENETIČKIH ČIMBENIKA POVEZANIH S
UKUPNOM RAZINOM HORMONA ŠTITNE ŽLIJEZDE U SERUMU

Doktorski rad

Split, 2020.

Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za fiziku, Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Biofizika

„Otkrivanje genetičkih čimbenika povezanih s ukupnom razinom hormona štitne žlijezde u serumu“

Doktorski rad autorice Ivane Gunjače, kao dio obaveza potrebnih da se dobije doktorat znanosti, izrađen pod vodstvom mentorice izv. prof. dr. sc. Maje Barbačić i komentorice izv. prof. dr. sc. Marije Raguž.


Dobiveni akademski naziv i stupanj: doktorica prirodnih znanosti iz polja biologije

Povjerenstvo za ocjenu i obranu doktorskog rada u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Irena Drmić Hofman



2. Prof. dr. sc. Jasna Puizina

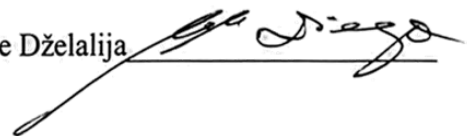


3. Doc. dr. sc. Matilda Šprung



Potvrđujemo da je disertacija obranjena dana 24. ožujka 2020.

Voditelj studija: prof. dr. sc. Mile Dželalija





DEKAN:



Prof. dr. sc. Nikola Koceić-Bilan

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Doktorski rad

**„OTKRIVANJE GENETIČKIH ČIMBENIKA POVEZANIH S UKUPNOM RAZINOM
HORMONA ŠTITNE ŽLIJEZDE U SERUMU“**

Ivana Gunjača

Rad je izrađen u:
Medicinskom fakultetu, Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska

Sažetak

Hormoni štitnjače su neophodni za normalan rast, razvoj i metabolizam svake stanice u tijelu. Štitna žlijezda proizvodi dva hormona, tiroksin (T_4) i trijodtironin (T_3), i izlučuje ih u krvotok gdje je najveći dio hormona štitnjače vezan na proteinske nosače dok oko 0,03 % ukupnog T_4 i 0,3 % ukupnog T_3 u serumu cirkulira u slobodnom, nevezanom obliku. Serumski parametri štitnjače pokazuju značajnu raznolikost između zdravih pojedinaca koja je, pored okolišnih čimbenika, u znatnoj mjeri određena i genetičkim čimbenicima, ali genetički čimbenici koji određuju koncentraciju ukupnih hormona štitnjače T_4 i T_3 nisu još uvijek dovoljno istraženi. S ciljem otkrivanja genetičkih čimbenika koji utječu na koncentracije ukupnih hormona štitnjače, provedena je prva meta-analiza cjelogenomskih analiza povezanosti za ukupnu koncentraciju hormona T_4 za 1121 ispitanika s područja grada Splita i otoka Korčule. Provedene su i cjelogenomske analize povezanosti za ukupnu koncentraciju hormona T_3 i omjer T_3/T_4 za ispitanike s područja grada Splita. Najznačajniji rezultati provedenih analiza su identifikacija genske varijante rs12282281 unutar gena *SLC22A9*, povezane s ukupnom koncentracijom hormona T_4 , te genske varijante rs11822642 unutar iste genomske regije, povezane s omjerom T_3/T_4 , i to na cjelogenomskoj razini značajnosti. Gen *SLC22A9* kodira za transportni protein koji prenosi organske anione, a posreduje i u prijenosu širokog spektra različitih molekula. Protein *SLC22A9* pripada superobitelji nosača otopljenih tvari SLC, a u istu superobitelj pripadaju i svi identificirani prijenosnici hormona štitnjače do danas. Ovaj rad po prvi put povezuje *SLC22A9* s prijenosom hormona štitnjače.

(90 stranica, 24 slike, 7 tablica, 194 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski)

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu i Sveučilišnoj knjižnici u Splitu.

Ključne riječi: hormoni štitnjače, GWAS, meta-analiza, *SLC22A9*, SNP, tiroksin, trijodtironin

Mentori: dr. sc. Maja Barbalić, izvanredna profesorica i dr. sc. Marija Raguž, izvanredna profesorica

Ocjenjivači: 1. dr. sc. Irena Drmić Hofman, redovita profesorica u trajnom zvanju

2. dr. sc. Jasna Puizina, redovita profesorica u trajnom zvanju

3. dr. sc. Matilda Šprung, docentica

Rad prihvaćen: 11. ožujka 2020.

University of Split

Faculty of Science

Ph.D. thesis

**IDENTIFICATION OF GENETIC FACTORS ASSOCIATED WITH TOTAL SERUM LEVELS
OF THYROID HORMONES**

Ivana Gunjača

Thesis performed at:

The University of Split School of Medicine, Split, Croatia

Abstract

Thyroid hormones (THs) are essential for normal development, cellular growth and metabolism of every cell in the body. The thyroid gland produces two THs, thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃), and secretes them into the bloodstream where most of the THs are bound to carrier proteins while about 0.03 % of total T₄ and 0.3 % of total T₃ circulate in the serum in free, unbound form. In healthy individuals, serum thyroid parameters show significant interindividual variability mainly determined by genetic factors, in addition to environmental factors, but the genetic background underlying total T₃ and T₄ levels is still insufficiently known. To detect genetic variants associated with total THs levels, the first genome-wide meta-analysis of total T₄ levels was carried out in 1121 individuals from the city of Split and the island of Korčula. The genome-wide association analyses of total T₃ levels and T₃/T₄ ratio were conducted in the individuals from the city of Split. The most significant results of the analyses are the identification of the genetic variant rs12282281 within the *SLC22A9* gene for the genome-wide meta-analysis of total T₄ levels, and the genetic variant rs11822642 within the same genomic region for the T₃/T₄ ratio at the genome-wide significant level. The *SLC22A9* encodes for an organic anion transporter and mediates the transfer of a wide range of different molecules. *SLC22A9* belongs to the SLC superfamily of solute carriers, the same family in which all THs transport proteins known to date belong. This work for the first time associates *SLC22A9* with TH transport.

(90 pages, 24 figures, 7 tables, 194 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the National and University Library in Zagreb and the University Library in Split.

Keywords: thyroid hormones, GWAS, meta-analysis, *SLC22A9*, SNP, thyroxine, triiodothyronine

Supervisors: Maja Barbalić, associate professor and Marija Raguž, associate professor

Reviewers: 1. Irena Drmić Hofman, full professor tenure

2. Jasna Puizina, full professor tenure

3. Matilda Šprung, assistant professor

Thesis accepted: 11th March 2020

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Sinteza i sekrecija hormona štitnjače.....	2
1.2.	Hormoni štitnjače u cirkulaciji	5
1.3.	Transport hormona štitnjače.....	6
1.4.	Periferni metabolizam hormona štitnjače.....	8
1.5.	Djelovanje hormona štitnjače	11
1.6.	Regulacija hormona štitnjače	12
1.7.	Važnost hormona štitnjače.....	14
1.8.	Poremećaji funkcije štitnjače	16
1.8.1.	Hipotireoza	16
1.8.2.	Hipertireoza.....	17
1.9.	Genetičke studije povezanosti	18
1.9.1.	Genske varijante.....	18
1.9.2.	Istraživanja genskih varijanti	24
1.9.3.	Kandidatne genetičke studije i cjelogenomske analize povezanosti.....	25
1.10.	Genetička određenost hormona štitnjače.....	27
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	30
3.	MATERIJALI I METODE	31
3.1.	Ispitanici.....	31
3.2.	Fenotipska svojstva.....	32
3.3.	Izolacija DNK.....	32
3.4.	Genotipizacija i imputacija.....	32
3.5.	Računalne analize.....	34
3.5.1.	Računalni program R.....	34

3.5.2.	Cjelogenomske analize povezanosti	34
3.5.3.	Meta-analiza.....	35
3.5.4.	Razina značajnosti.....	35
3.5.5.	Grafički prikaz rezultata	35
3.5.6.	Bioinformatičke baze podataka	36
4.	REZULTATI.....	37
4.1.	Rezultati cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T ₄	38
4.1.1.	Kohorta Korčula.....	38
4.1.2.	Kohorta Split.....	40
4.2.	Rezultati meta-analize.....	42
4.3.	Rezultati cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T ₃	45
4.4.	Rezultati cjelogenomskih analiza povezanosti za omjer T ₃ /T ₄	48
4.5.	Lokus SLC22A9	51
4.6.	Usporedba rezultata s literaturnim podacima.....	52
5.	RASPRAVA.....	54
6.	ZAKLJUČAK.....	67
7.	LITERATURA	69
8.	KRATKI ŽIVOTOPIS.....	88

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Prikaz štitnjače	1
Slika 1.2. Prikaz kemijske strukture hormona T_4 i T_3	4
Slika 1.3. Dejodinacija hormona štitnjače enzimima D1, D2 i D3.	9
Slika 1.4. Periferni metabolizam hormona štitnjače.....	10
Slika 1.5. Pojednostavljeni pregled HPT osi, sinteze hormona štitnjače i djelovanja hormona štitnjače u ciljnim tkivima.....	13
Slika 1.6. Normalni i tautomerni oblici purinskih i pirimidinskih baza DNK.....	21
Slika 1.7. Nastanak mutacija tautomernim pomakom baze timina i replikacijom DNK.....	22
Slika 1.8. Spontana depurinacija	23
Slika 4.1. Manhattan graf cjelogenomske analize povezanosti za hormon T_4 u kohorti Korčula...	39
Slika 4.2. Q-Q graf cjelogenomske analize povezanosti hormona T_4 u kohorti Korčula.....	39
Slika 4.3. Manhattan graf cjelogenomske analize za hormon T_4 u kohorti Split.....	41
Slika 4.4. Q-Q graf cjelogenomske analize povezanosti za hormon T_4 u kohorti Split	41
Slika 4.5. Manhattan graf meta-analize cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T_4 u kohortama Split i Korčula	43
Slika 4.6. Q-Q graf meta-analize cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T_4 u kohortama Split i Korčula	43
Slika 4.7. Detaljan prikaz regije na 11. kromosomu za lokus rs12282281	44
Slika 4.8. Manhattan graf cjelogenomske analize povezanosti za hormon T_3 u kohorti Split	46
Slika 4.9. Q-Q graf cjelogenomske analize povezanosti hormona T_3 u kohorti Split.....	46
Slika 4.10. Prikaz regije na 6. kromosomu za lokus rs4712793	47
Slika 4.11. Prikaz regije na 11. kromosomu za lokus rs116951285	47
Slika 4.12. Manhattan graf cjelogenomske analize povezanosti za omjer T_3/T_4 u kohorti Split	49
Slika 4.13. Q-Q graf cjelogenomske analize povezanosti za omjer T_3/T_4 u kohorti Split.....	49
Slika 4.14. Detaljan prikaz regije na 11. kromosomu za lokus rs11822642	50
Slika 4.15. Prikaz distribucije hormona T_4 , T_3 i omjera T_3/T_4 s obzirom na genotip u kohorti Split za polimorfizme: a) rs12282281 i b) rs11822642	52
Slika 5.1. Ilustracija predviđene topologije prijenosnika organskog aniona (OAT).....	56

POPIS TABLICA

Tablica 4.1. Deskriptivna statistika ispitanika u kohortama Split i Korčula za sva tri fenotipa	37
Tablica 4.2. Rezultati cjelogenomske analize povezanosti za hormon T ₄ u kohorti Korčula koji su dosegli sugestivnu značajnost ($P < 5 \times 10^{-6}$).....	38
Tablica 4.3. Rezultati cjelogenomske analize povezanosti za hormon T ₄ u kohorti Split koji su dosegli sugestivnu značajnost ($P < 5 \times 10^{-6}$).....	40
Tablica 4.4. Rezultati meta-analize cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T ₄ u kohortama Split i Korčula koji su dosegli sugestivnu značajnost ($P < 5 \times 10^{-6}$)	42
Tablica 4.5. Rezultati cjelogenomske analize povezanosti za hormon T ₃ u kohorti Split koji su dosegli sugestivnu značajnost ($P < 5 \times 10^{-6}$).....	45
Tablica 4.6. Rezultati cjelogenomske analize povezanosti omjera T ₃ /T ₄ u kohorti Split koji su dosegli cjelogenomsku ($P < 5 \times 10^{-8}$) i sugestivnu razinu značajnosti ($P < 5 \times 10^{-6}$)..	48
Tablica 4.7. Analiza literaturnih podataka GWA studija u meta-analizi hormona T ₄ i cjelogenomskim analizama povezanosti hormona T ₃ i omjera T ₃ /T ₄	53

POPIS KRATICA

BMI	Indeks tjelesne mase (engl. <i>body-mass index</i>)
BSP	Bromsulfoftalein (engl. <i>sulfobromophthalein</i>)
CNV	Varijacije u broju kopija (engl. <i>copy number variations</i>)
D1	Dejodinaza tip 1
D2	Dejodinaza tip 2
D3	Dejodinaza tip 3
DHEAS	Dehidroepiandrosteron sulfat
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
E3S	Estron-3-sulfat
EMS	Etil-meta-sulfonat
fT ₄	Slobodni tiroksin (engl. <i>free</i>)
fT ₃	Slobodni trijodtironin (engl. <i>free</i>)
FTC	Folikularni karcinom štitnjače (engl. <i>follicular thyroid carcinoma</i>)
GWAS	Cjelogenomska analiza povezanosti (engl. <i>genome-wide association study</i>)
HPT	Os hipotalamus-hipofiza-štitnjača (engl. <i>hypothalamic–pituitary–thyroid axis</i>)
HT	Hashimotov tireoiditis
IYD	Jodtirozin dejodinaza (engl. <i>iodotyrosine deiodinase</i>)
LAT	Prijenosnici neutralnih aminokiselina (engl. <i>L-type amino acid transporter</i>)
LD	Neravnoteža vezanosti (engl. <i>linkage disequilibrium</i>)
MCT	Prijenosnik monokarboksilata (engl. <i>monocarboxylate transporter</i>)
MFS	Superobitelj membranskih transportnih proteina (engl. <i>Major Facilitator Superfamily</i>)
NIS	Simporter natrija i jodida (engl. <i>Na⁺/I symporter</i>)
NTCP	Natrij/taurokolat polipeptidni kotransporter (engl. <i>Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide</i>)
OATP	Polipeptid koji prenosi organske anione (engl. <i>organic anion transporting polypeptide</i>)
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. <i>phosphatidylinositol-3-kinases</i>)
PKC ϵ	Protein kinaza C epsilon (engl. <i>protein kinase C epsilon</i>)
PTC	Papilarni karcinom štitnjače (engl. <i>papillary thyroid carcinoma</i>)
PTU	Propiltiouracil
PTH	Paratireoidni hormon

rT ₃	Reverzni T ₃
SNP	Polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single-nucleotide polymorphism</i>)
T ₂	Dijodtironin
T ₄	Tiroksin
T ₃	Trijodtironin
Tg	Tireoglobulin
TBG	Globulin koji veže tiroksin (engl. <i>thyroxin binding globulin</i>)
TBPA	Prealbumin koji veže tiroksin (engl. <i>thyroxin binding prealbumin</i>)
TMD	Transmembranska domena (engl. <i>transmembrane domain</i>)
TPO	Štitna peroksidaza (engl. <i>thyroid peroxidase</i>)
TR	Receptor hormona štitnjače (engl. <i>thyroid hormone receptor</i>)
TR α	Receptor hormona štitnjače alfa (engl. <i>thyroid hormone receptor alpha</i>)
TR β	Receptor hormona štitnjače beta (engl. <i>thyroid hormone receptor beta</i>)
TRE	Regulacijski elementi hormona štitnjače (engl. <i>thyroid hormone response elements</i>)
TRH	Tireoliberin (engl. <i>thyrotropin releasing hormone</i>)
TSH	Tireotropin (engl. <i>thyroid-stimulating hormone</i>)
TSHR	Receptor za hormon tireotropin (engl. <i>thyroid stimulating hormone receptor</i>)
TTR	Transtiretin
TgAt	Protutijela protiv tireoglobulina
TPOAt	Protutijela protiv štitne peroksidaze
RXR	Receptor za retinoid X (engl. <i>retinoid X receptor</i>)
SE	Standardna pogreška (engl. <i>standard error</i>)

PROŠIRENI SAŽETAK

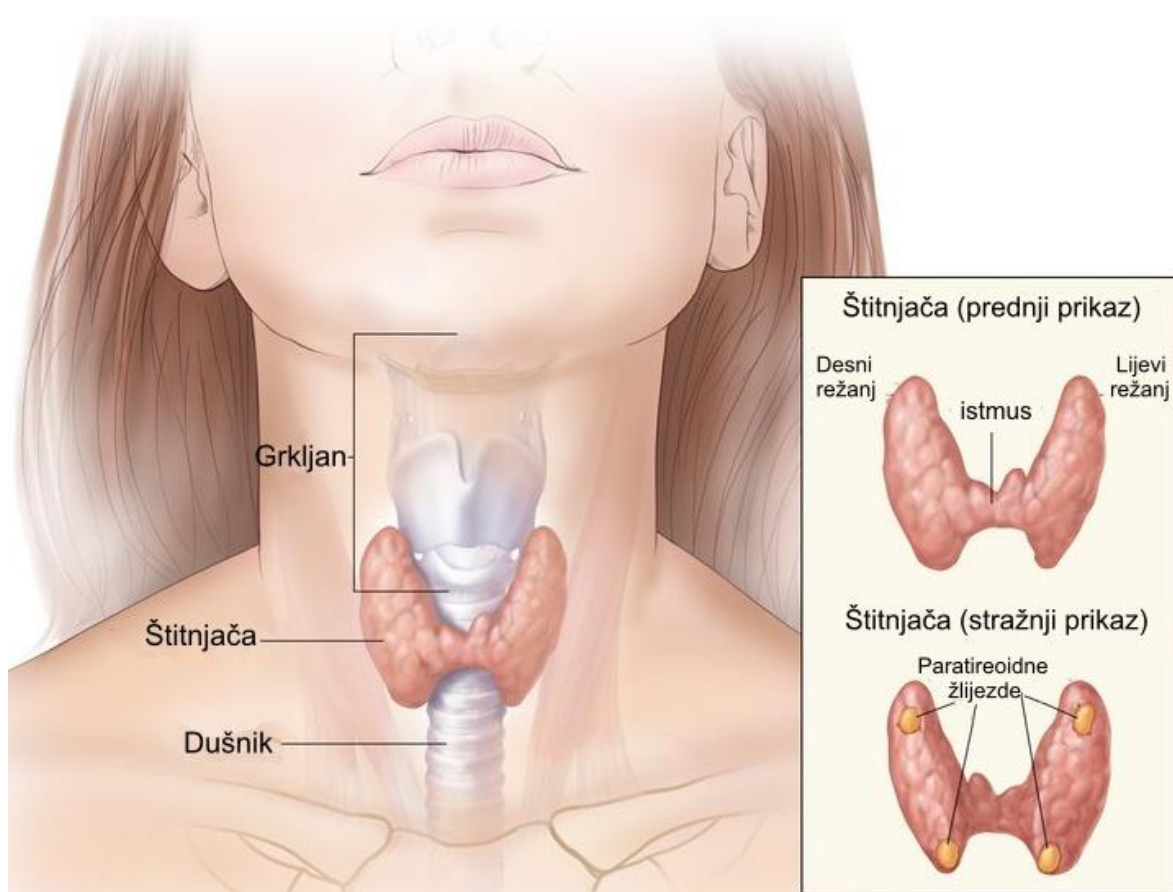
Hormoni štitnjače su neophodni za normalan rast, razvoj i metabolizam svake stanice u tijelu. Štitnjača proizvodi dva hormona, tiroksin (T_4) i trijodtironin (T_3), i izlučuje ih u krvotok gdje je najveći dio hormona štitnjače vezan na proteinske nosače dok oko 0,03 % ukupnog T_4 i 0,3 % ukupnog T_3 u serumu cirkulira u slobodnom, nevezanom obliku. Serumski parametri štitnjače pokazuju značajnu raznolikost između zdravih pojedinaca koja je, pored okolišnih čimbenika, u znatnoj mjeri određena i genetičkim čimbenicima, ali genetički čimbenici koji određuju koncentraciju ukupnih hormona štitnjače T_4 i T_3 nisu još uvijek dovoljno istraženi.

Kako bi identificirali genetičke čimbenike koji utječu na koncentracije ukupnih hormona štitnjače, provedena je prva meta-analiza cjelogenomskih analiza povezanosti za ukupnu koncentraciju hormona T_4 za 1121 ispitanika s područja grada Splita i otoka Korčule. Provedene su i cjelogenomske analize povezanosti za ukupnu koncentraciju hormona T_3 i omjer T_3/T_4 za ispitanike s područja grada Splita. Provedenim analizama su prvi put definirane genske varijante povezane s koncentracijama ukupnih hormona štitnjače, međutim, te varijante je potrebno dodatno potvrditi na većem uzorku ispitanika te potvrditi u drugim, neovisnim kohortama. Usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim podacima za slobodne hormone štitnjače, potvrđene su i genske varijante povezane s ukupnom koncentracijom hormona štitnjače T_4 i omjerom T_3/T_4 na razini značajnosti $P < 0.05$.

Najznačajniji rezultati provedenih analiza su identifikacija lokusa koji obuhvaća gen *SLC22A9*, gdje je genska varijanta rs12282281 pokazala povezanost s ukupnom koncentracijom hormona T_4 , a genska varijanta rs11822642 povezanost s omjerom T_3/T_4 na cjelogenomskoj razini značajnosti. Gen *SLC22A9* kodira za transportni protein koji prenosi organske anione te posreduje u prijenosu širokog spektra različitih molekula, a pripada superobitelji nosača otopljenih tvari SLC (engl. *Solute Carrier family*). U istu superobitelj pripadaju i svi do sad identificirani prijenosnici hormona štitnjače, međutim, *SLC22A9* do sad još nije bio povezivan s transportom hormona štitnjače. Osim što pripada istoj superobitelji SLC, protein *SLC22A9* pokazuje i sličnosti s ostalim transportnim proteinima hormona štitnjače prenoseći iste supstrate. Također, isključivo je eksprimiran u jetri gdje većina hormona T_3 i nastaje dejodinacijom hormona T_4 . Stoga ti rezultati upućuju na potencijalnu ulogu *SLC22A9* kao novog transportnog proteina hormona štitnjače. Rezultati prezentirani u ovoj doktorskoj disertaciji upotpunjuju rastuće znanje o genetičkoj pozadini fenotipova povezanih s funkcijom štitne žlijezde.

1. UVOD

Štitnjača (lat. *thyroidea*) je endokrini žlijezda smještena u donjem dijelu vrata, neposredno ispod grkljana. Sastoji se od desnog i lijevog režnja (lobus dexter et sinister), koji su povezani središnjim suženim dijelom (isthmusom) što joj daje oblik leptira ili slova H (Slika 1.1.). Volumen štitnjače je od 15 do 30 cm³, a masa normalne štitnjače u odrasle osobe iznosi od 15 do 20 g. Štitnjača je jedna i od najjače prokrvljenih organa u tijelu, opskrbljena je s dvije tireoidne arterije, dok venska cirkulacija ide kroz dvije skupine tireoidnih vena, te volumen krvi koji proteče kroz štitnjaču u jednoj minuti je i do pet puta veći od njezine mase. Neposredno iza štitnjače, uz gornji i donji pol lijevog i desnog režnja nalaze se četiri paratireoidne žlijezde, koje luče paratireoidni hormon (PTH) koji regulira normalnu koncentraciju kalcija u krvi (Guyton i sur., 2017; Halbauer i sur., 2001).



Slika 1.1. Prikaz štitnjače, preuzeto s <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=9268> i prilagođeno

Tkivo štitnjače je građeno od velikog broja folikula različite veličine, obloženih jednoslojnim folikularnim epitelom. Ovisno o funkcionalnoj aktivnosti štitnjače, folikularni epitel može biti cilindrični, kubični ili pločasti. Što je aktivnost žlijezde veća folikule će izgrađivati cilindrične stanice, a u manje aktivnoj žlijezdi prevladavat će pločasti ili kubični epitel (Halbauer i sur., 2001). Stanice folikularnog epitela su građene od apikalne membrane, koja je okrenuta prema lumenu folikula i bazolateralne membrane, koja je okrenuta prema krvotoku. Unutrašnjost, odnosno lumen folikula, ispunjena je proteinskim koloidom, koji i čini ukupnu masu štitnjače, a glavni sastojak koloida je glikoprotein tireoglobulin (Tg), prekursor hormona štitnjače. Od vrha folikularnih stanica pa sve do koloida se protežu brojni mikrovili, a cijela je citoplazma bogata liposomima, endoplazmatskim retikulumom i mitohondrijima. Na površini folikularnih stanica dolazi do jodiranja, egzocitoze i početne faze sekrecije hormona štitnjače.

Osim folikularnih stanica, štitnjača sadrži i parafolikularne ili *C stanice*, koje su uključene u folikularni epitel ili su umetnute između folikula, a sadrže hormon kalcitonin, koji sudjeluje u regulaciji razine kalcija u krvi (Salvatore i sur., 2016).

1.1. Sinteza i sekrecija hormona štitnjače

Primarna funkcija štitnjače je skladištenje, sinteza i sekrecija hormona tiroksin (T₄) i trijodtironin (T₃). Sinteza hormona štitnjače zahtijeva prijenos jodida u folikul štitnjače uz pomoć simportera natrija i jodida (engl. *Na⁺/I symporter*, NIS), oksidaciju joda uz pomoć enzima štitne peroksidaze (engl. *thyroid peroxidase*, TPO) i sintezu glikoproteina Tg (Salvatore i sur., 2016).

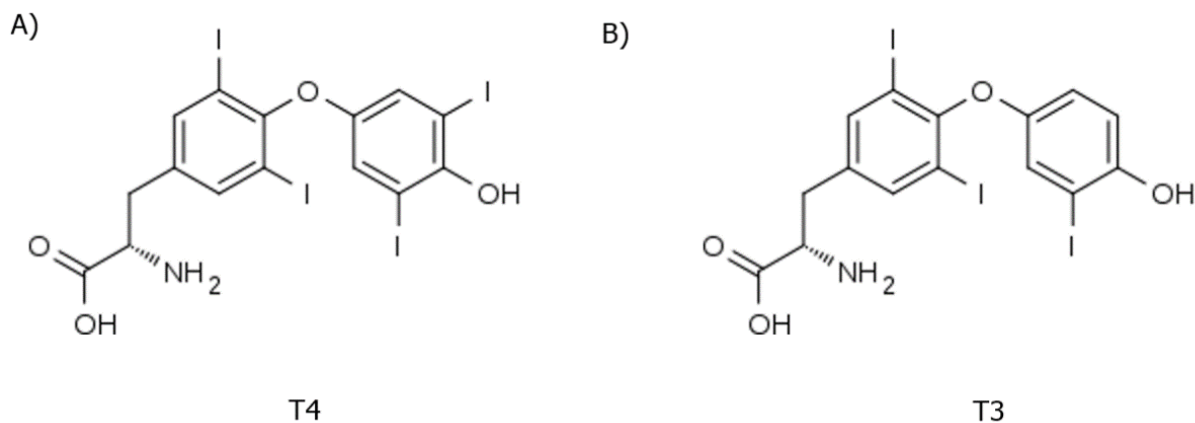
Formiranje hormona štitnjače zahtijeva dostupnost odgovarajućih količina joda. Za ljudski organizam potreban je dnevni unos od najmanje 100 µg joda, s obzirom na to da se jod unosi isključivo putem hrane i apsorbira iz gastrointestinalnog trakta kao jodid te odlazi u cirkulaciju (Salvatore i sur., 2016). Transport jodida iz krvi u unutrašnjost stanica štitnjače je prvi korak u biosintezi hormona štitnjače, a odvija se preko bazolateralne membrane uz pomoć simportera natrija i jodida koji kotransportom prenosi dva iona natrija i jedan ion joda u unutrašnjost stanice, a djelovanje simportera ovisi o elektrokemijskom gradijentu kojeg stvara natrijsko-kalijska ATPazna crpka (Hingorani i sur., 2010; Levy i sur., 1998; Ravera i sur., 2017). Osim što ima veliki afinitet prema jodu, NIS posreduje i u transportu drugih iona, kao što su tiocijanat (SCN⁻) i perklorat (ClO₄⁻), a koji mogu inhibirati akumulaciju joda u stanicama štitnjače (Wolff, 1998). Pored aktivnog transporta na bazolateralnoj strani folikula, transport jodida u lumen folikula uključuje i pasivan transport kroz apikalnu membranu pomoću prijenosnika pendrin, kojeg kodira gen *SLC26A4*. Mutacije u genu *SLC26A4* dovode do Pendredovog sindroma, autosomnog

recesivnog poremećaja kojeg karakterizira gluhoća praćena s gušavošću (Everett i sur., 1997; Taylor i sur., 2002).

Nakon prijenosa jodida u unutrašnjost stanica štitnjače, dolazi do oksidacije i organifikacije jodida, što je sljedeći korak u sintezi hormona štitnjače, a taj proces se odvija uz pomoć enzima peroksidaze (TPO) i pridruženog vodikovog peroksida (H_2O_2). Jodidi se pretvaraju u oksidirani oblik joda (iz J^- u J^0) uz pomoć TPO i H_2O_2 , te se potom izravno vežu na aminokiselinske ostatke tirozina na molekuli Tg čime nastaju prekursori hormona štitnjače (Mansourian, 2011). Peroksidaza je integralni membranski glikoprotein koji se sastoji od 933 aminokiseline, smještena je na apikalnoj membrani stanice te je homodimer, iz skupine hem proteina i aktivno mjesto enzima čini prostetička skupina porfirina. Peroksidaza je važna za normalno funkcioniranje štitnjače regulirajući vezanje joda na tirozinske ostatke na molekuli Tg i spajanje jodtirozina, da bi se u konačnici i stvorili hormoni T_4 i T_3 , te ako postoji nasljedni nedostatak enzima TPO u stanicama, ili ako je sustav zakočen, obustavlja se i stvaranje hormona štitnjače (Guyton i sur., 2017).

Tireoglobulin (Tg) je glikoprotein molekularne mase 660 kDa, koji sadrži dvije identične podjedinice (330 kDa), duljine 2749 aminokiselinskih ostataka, uključujući i signalni peptid od 19 aminokiselinskih ostataka, a nalazi se na apikalnoj površini stanica štitnjače. Molekula Tg sadrži oko 134 tirozinskih ostataka, te je svaka potencijalno mjesto za vezanje joda, međutim, samo dio njih (oko 25 - 30 tirozinskih ostataka) sudjeluje u sintezi hormona štitnjače (Dedieu i sur., 2011; Xiao i sur., 1996). Zadnji korak u sintezi hormona štitnjače uključuje jodiranje tirozina u monojodtirozin, a zatim u dijodtirozin, na molekuli Tg. Spajanjem jedne molekule monojodtirozina s jednom molekulom dijodtirozina nastaje molekula trijodtironin (T_3), a spajanje dviju molekula dijodtirozina nastaje molekula tetrajodtironin (tiroksin, T_4). Proces sparivanja počinje katalitičkom reakcijom enzima TPO odnosno oksidacijom jodtirozinskih ostataka, a proces ovisi o strukturnoj konformaciji molekula Tg (Cahnmann i sur., 1977; Mansourian, 2011; Virion i sur., 1981). Formiranje jodtironina uključuje stvaranje veze između jodfenolnog dijela tirozina, kao donora, i hidroksilne grupe tirozina, kao akceptora. Nakon cijepanja intermedijarnog produkta nastaje jodtironin (T_4 ili T_3) s jedne strane i dehidroalaninski ostatak na peptidnom lancu s druge strane (Citterio i sur., 2018; Dunn i sur., 1999). Sintetizirani hormoni štitnjače sastoje se od dva benzenska prstena, vanjskoga fenolnog (beta) prstena i unutarnjega tirozilnog (alfa) prstena (Slika 1.2.). Po završetku sinteze hormona u štitnjači, svaka molekula Tg sadrži i do 30 molekula T_4 , a samo nekoliko molekula T_3 (Guyton i sur., 2017). Nakon jodiranja i fenolnog spajanja, Tg s vezanim T_4 i T_3 pohranjuje se u lumen folikula štitnjače.

Hormoni štitnjače mogu biti pohranjeni u lumenu i po nekoliko mjeseci, u količinama koje su dovoljne za podmirenje normalne potrebe organizma tijekom dva do tri mjeseca, stoga se i posljedice nedostatka hormona štitnjače zamijete tek nakon par mjeseci (Guyton i sur., 2017).



Slika 1.2. Prikaz kemijske strukture hormona A) T₄ (3,5,3',5'-tetrajodtironin) i B) T₃ (3,5,3'-trijodtironin)

Sve dok organizam ne ukaže potrebu za hormonima štitnjače, T₄ i T₃ ostaju vezani za Tg u folikulima, te su inaktivni, a da bi bili aktivni moraju se odcijepiti s molekule Tg i izlučiti u cirkulaciju odnosno krvotok. Lučenje hormona iz štitnjače potiče TSH vežući se za receptore na bazalnoj membrani folikularnih stanica te se hormoni štitnjače oslobađaju iz apikalnih dijelova folikula. U apikalnom dijelu se pojavljuju unutarstanične kapljice koloida koje sadrže Tg na koji se vežu lizosomi bogati proteazama te proteolizom Tg se oslobađaju hormoni T₄ i T₃ koji se potom otpuštaju u krv (Solter, 2007). Proteolizom Tg se ne oslobađaju samo hormoni T₄ i T₃ već i jodtirozini, monojodtirozin i dijodtirozin, koji se podvrgavaju dejodinaciji flavoproteinske dejodinaze (engl. *iodotyrosine deiodinase*, IYD) koju kodira gen *DEHAL1*, a koja odcjepljuje jod iz njihovih molekula, pri čemu se oslobođeni jod ponovno upotrebljava u novom ciklusu sinteze hormona (Moreno i sur., 2010; Thomas i sur., 2009).

1.2. Hormoni štitnjače u cirkulaciji

U cirkulaciji se nalazi nekoliko oblika jodtironina i njihovih metaboličkih derivata. Od svih hormona, hormon T_4 se nalazi u najvećoj koncentraciji i jedini je koji nastaje isključivo izravnim izlučivanjem iz štitnjače. Hormon T_3 se također oslobađa iz štitnjače, ali u puno manjim količinama, a oko 80 % koncentracije hormona T_3 potječe iz perifernih tkiva, najviše iz jetre i bubrega, gdje nastaje perifernom konverzijom enzimima dejodinaza iz hormona T_4 (Bianco i sur., 2002; Salvatore i sur., 2016). Hormon T_4 se smatra prohormonom iz kojeg nastaje biološki aktivan hormon T_3 . Preostali jodtironini i njihovi derivati - produkti sulfatacije (T_4S) i glukuronidacije (T_4G), nastaju u perifernim tkivima iz T_4 i T_3 , od kojih su glavni 3,3',5'-trijodtironin (reverzni T_3 ili rT_3) i 3,3'-dijodtironin (3,3'- T_2) (Salvatore i sur., 2016; Tong i sur., 2007). Hormoni štitnjače su netopljivi u vodi i njihova distribucija putem krvožilnog sustava je otežana, pa se vežu na glikoproteine u krvi i cirkuliraju vezani na proteinske nosače, i to na globulin koji veže tiroksin (engl. *thyroxin binding globulin*, TBG), transtiretin (TTR) i albumin.

Globulin koji veže tiroksin (TBG) je glavni proteinski nosač hormona štitnjače u cirkulaciji, čija je molekularna masa oko 46 kDa, pri čemu 20 % mase čine ugljikohidrati. Posjeduje i najveći afinitet za vezanje hormona štitnjače, te veže oko 65 % hormona T_4 i 80 % hormona T_3 (Hulbert, 2000) i iako veže više hormona T_3 , ima veći afinitet vezanja hormona T_4 nego T_3 , što ovisi o konformacijskoj promjeni molekule TBG i stupnju glikolizacije. Koncentracija molekule TBG i afinitet vezanja su u korelaciji s ukupnom koncentracijom hormona štitnjače (Mondal i sur., 2016; Salvatore i sur., 2016).

Transtiretin (TTR), poznat kao i prealbumin koji veže tiroksin (engl. *thyroxin binding prealbumin*, TBPA), sastoji se od četiri identična polipeptidna lanca ukupne molekularne mase oko 55 kDa (Salvatore i sur., 2016). Ima manji afinitet vezanja hormona štitnjače od molekule TBG, te veže oko 15 % hormona T_4 i 9 % hormona T_3 (Hulbert, 2000). Transtiretin se sintetizira u jetri i koroidnom pleksusu te osim što prenosi hormone štitnjače u plazmi, glavni je proteinski nosač hormona štitnjače u cerebrospinalnoj tekućini, sudjelujući u prijenosu hormona T_4 i T_3 u središnjem živčanom sustavu (Mondal i sur., 2016; Solter, 2007).

Iako se u plazmi nalazi u najvećoj koncentraciji, afinitet albumina za vezanje hormona T_4 i T_3 je mnogo manji u odnosu na molekule TBG i TTR, te veže 20 % hormona T_4 i 11 % hormona T_3 (Hulbert, 2000). Promjene koncentracije albumina imaju mali utjecaj na ukupne koncentracije hormona štitnjače, pa su promjene u koncentraciji hormona štitnjače moguće jedino ako postoji pad koncentracije i ostalih proteinskih nosača, s obzirom na to da se sva tri proteinska nosača sintetiziraju u jetri (Salvatore i sur., 2016).

Koncentraciju ukupnih hormona štitnjače čine hormoni vezani na proteinske nosače i hormoni koji su nevezani tj. slobodni (engl. *free*), a manje od 1 % hormona je prisutno u krvi u slobodnom obliku. Slobodni T_4 (fT_4) čini 0,03 % ukupnog hormona T_4 , a slobodni T_3 (fT_3) 0,3 % ukupnog T_3 . S obzirom na to da T_3 ima niži afinitet vezanja na proteinske nosače, tako je i veći udio T_3 u slobodnom, nevezanom obliku, a u tom obliku hormoni štitnjače i ulaze u ciljna tkiva i pokazuju svoju biološku aktivnost. Vezani hormoni služe kao rezervoar cirkulirajućih hormona štitnjače te osiguravaju dostatnu i ravnomjernu distribuciju hormona štitnjače perifernim tkivima (Mendel i sur., 1987; Solter, 2007) te štite hormone štitnjače od brze inaktivacije i izlučivanja mokraćom ili putem žuči (Salvatore i sur., 2016). Ukupna koncentracija hormona štitnjače u cirkulaciji proporcionalna je koncentraciji proteinskih nosača pa se time održava i optimalna razina koncentracije slobodnih hormona štitnjače (Schussler, 2000).

1.3. Transport hormona štitnjače

S obzirom na lipofilnu strukturu hormona štitnjače, dugo se smatralo da hormoni štitnjače u stanicu ulaze pasivnom difuzijom. Međutim, postalo je sve jasnije da hormoni štitnjače ne difundiraju slobodno preko stanične membrane, već su im za prijenos preko membrane potrebni specifični prijenosnici (transporteri). Do danas je otkriveno nekoliko transportnih proteina, sposobnih za prijenos hormona štitnjače, koji su povezani s različitim obiteljima transportnih proteina, uključujući: prijenosnike monokarboksilata, MCT8 i MCT10 (engl. *monocarboxylate transporter*, MCT), polipeptide koji prenose organske anione (engl. *organic anion transporting polypeptide*, OATP), prijenosnike neutralnih aminokiselina (engl. *L-type amino acid transporter*, LAT) i natrijev/taurokolat polipeptidni kotransporter (engl. *Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide*, NTCP). Navedeni prijenosnici se razlikuju u ekspresiji i afinitetu prijenosa hormona štitnjače i njihovih metabolita, kao i sposobnosti prijenosa drugih molekula. Od svih identificiranih prijenosnika hormona štitnjače MCT8 je specifičan baš za prijenos hormona štitnjače, dok ostali osim transporta hormona štitnjače posreduju i u prijenosu širokog spektra drugih molekula.

Proteini MCT8 (ili SLC16A2) i MCT10 (ili SLC16A10) pripadaju obitelji prijenosnika monokarboksilata, a eksprimirani su u različitim tkivima gdje olakšavaju transport hormona T_3 , T_4 , rT_3 i T_2 kroz stanične membrane (Friesema i sur., 2003). Protein MCT8 je specifičan prijenosnik hormona štitnjače u stanicama moždanog tkiva, ali je eksprimiran i u jetri i bubrezima. U moždanom tkivu, u astrocitima, MCT8 omogućava i izlazak hormona T_3 , koji se aktivira enzimom dejodinaze 2 iz T_4 , tako da je T_3 dostupan za transport u neurone opet uz pomoć

prijenosnika MCT8 (Guadano-Ferraz i sur., 1999). Protein MCT10 je učinkovitiji u prijenosu hormona T_3 nego T_4 te nije specifičan samo za moždano tkivo već je njegova ekspresija utvrđena i u bubrezima, jetri, crijevima i placenti (van der Deure i sur., 2008a). Od svih članova obitelji MCT, MCT10 ima najveću homologiju s MCT8, a oba i prenose hormone štitnjače, s tim da MCT10 također prenosi i aromatske aminokiseline, dok za MCT8 nije utvrđeno da prenosi druge supstrate osim hormona štitnjače (van der Deure i sur., 2008a). Do danas, MCT8 je i jedini prijenosnik hormona štitnjače s poznatim patogenim mutacijama u ljudi. Mutacije u genu *MCT8* uzrokuju ozbiljan neurološki poremećaj s povišenim koncentracijama hormona T_3 u serumu, također poznat i kao Allan-Herndon-Dudley (AHDS) sindrom (Dumitrescu i sur., 2004).

Proteini OATP (ili SLCO) pripadaju velikoj obitelji prijenosnika polipeptida organskih aniona te nekoliko proteina iz obitelji OATP olakšava prijenos hormona T_4 , T_3 i rT_3 preko stanične membrane, ali i prijenos njihovih sulfata - T_4S , T_3S i rT_3S (Fujiwara i sur., 2001; Kullak-Ublick i sur., 2001). Proteini OATP obitelji su široko rasprostranjeni u tkivima, a karakterističan je prijenosnik OATP1C1 (ili SLCO1C1), koji u usporedbi s ostalim članovima obitelji OATP ima najveći afinitet za prijenos hormona štitnjače, a eksprimiran je pretežno u mozgu i omogućava transport hormona T_4 kroz krvno-moždanu barijeru (Hagenbuch, 2007; Sugiyama i sur., 2003). Osim OATP1C1, još nekoliko proteina iz obitelji OATP prenose hormone štitnjače, a to su prijenosnici OATP1B1, OATP1B3 i OATP1A2 (Abe i sur., 1999; Abe i sur., 1998).

Proteini LAT pripadaju obitelji prijenosnika neutralnih aminokiselina, te pored aminokiselina, LAT1 (ili SLC7A5) i LAT2 (ili SLC7A8) prenose i hormone štitnjače T_4 i T_3 , s tim da je LAT1 učinkovitiji prijenosnik hormona T_3 nego LAT2 (Morimoto i sur., 2008). Istraživanja su pokazala da LAT2 prenosi T_3 i T_2 , ali ne rT_3 i T_4 (Kinne i sur., 2015; Krause i sur., 2017). LAT1 i LAT2 također značajno olakšavaju stanični unos monojodtirozina (Zevenbergen i sur., 2015). Eksprimirani su u više tkiva, i to u jetri, bubrezima, placenti, mozgu, mišićnom tkivom i gastrointestinalnom traktu, ali njihova uloga kao prijenosnika hormona štitnjače, kao i molekularni mehanizmi u kojima sudjeluju, još nisu u potpunosti razjašnjeni.

Natrij/taurokolat polipeptidni kotransporter, poznat kao NTCP (ili SLC10A1), je glikoprotein eksprimiran isključivo u jetri te nije otkriven ni u jednom drugom tkivu. Uključen je u enterohepatičku cirkulaciju soli žučnih kiselina (Anwer i sur., 2014), te je i jedan od prvih prijenosnika koji je identificiran da prenosi hormone štitnjače T_4 i T_3 , a kasnije je otkriveno da prenosi i njihove derivate, sulfate T_4S i T_3S (Friesema i sur., 1999; Visser i sur., 2010).

1.4. Periferni metabolizam hormona štitnjače

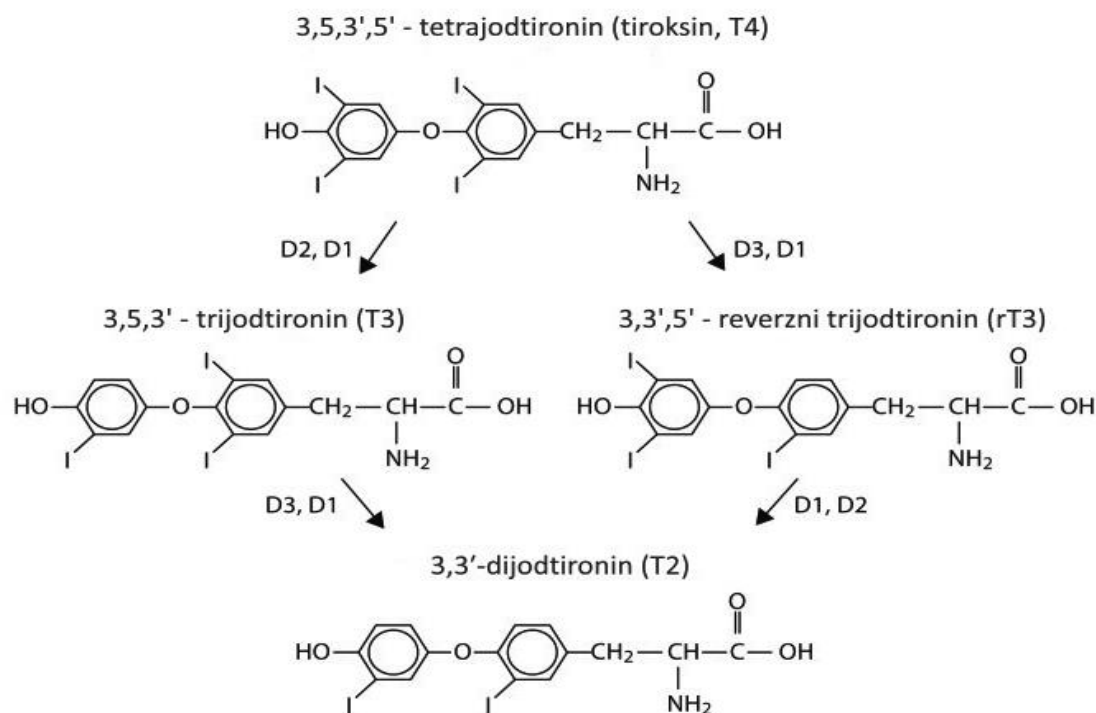
Iz štitnjače potječe sav hormon T_4 prisutan u cirkulaciji te samo oko 20 % hormona T_3 , a većina hormona T_3 koji je u cirkulaciji nastaje dejodinacijom hormona T_4 u perifernim tkivima. Metabolička aktivnost hormona štitnjače je primarno određena unutarstaničnom koncentracijom hormona T_3 , kao biološki aktivnog oblika hormona štitnjače, a koja ovisi o dostupnosti T_4 i T_3 u cirkulaciji, transportu hormona štitnjače kroz staničnu membranu i aktivnosti enzima dejodinaza, koje aktiviraju ili inaktiviraju hormone štitnjače (van der Deure i sur., 2007). Procesi aktivacije i deaktivacije hormona štitnjače imaju važnu ulogu u balansiranju koncentracija hormona štitnjače u tijelu.

Glavni metabolički put hormona štitnjače je dejodinacija posredovana specifičnim enzimima dejodinazama koje uklanjaju atome joda s unutarnjega tirozilnog ili vanjskoga fenolnog benzenskog prstena, što dovodi do stvaranja aktivnih i inaktivnih metabolita. Biološka aktivnost hormona štitnjače u velikoj je mjeri određena dejodinacijom vanjskog prstena (na 5'- položaju) hormona T_4 u njegov aktivni oblik T_3 , a koji svoju aktivnost dalje iskazuje vežući se na receptore u ciljnim stanicama. Ovu reakciju kataliziraju enzimi dejodinaza tip 1 i 2 (D1 i D2), dok dejodinaza tip 3 (D3) katalizira reakciju dejodinacije unutarnjeg prstena hormona T_4 čime pak nastaje inaktivni oblik hormona štitnjače - rT_3 . Hormon T_3 se dalje može inaktivirati dejodinacijom unutarnjeg prstena što rezultira stvaranjem T_2 , metabolita koji se također može dobiti i dejodinacijom vanjskog prstena rT_3 (Slika 1.3.). Sve tri vrste dejodinaza su različito zastupljene u tkivima, a razlikuju se i u učinkovitosti iskorištavanja supstrata, kinetici i osjetljivosti na inhibitore (Kelly, 2000), ali imaju i par zajedničkih karakteristika. Sve tri dejodinaze su slične strukture i homodimeri, te iako su eksprimirane u različitim tkivima, sve su integralni membranski proteini i selenoproteini, koje sadrže aminokiselinu selenocistein u aktivnom katalitičkom centru (Larsen i sur., 2012).

Dejodinaza tip 1 (D1) je selenoprotein koja se nalazi u plazma membrani u jetri, bubrezima, štitnjači i hipofizi, te je jedina dejodinaza koja može katalizirati dejodinaciju vanjskog (5'- dejodinacija), ali i unutarnjeg (5 - dejodinacija) prstena hormona T_4 . Položaj dejodinaze u plazma membrani te položaj katalitičkog centra na citoplazmatskoj strani omogućava olakšan pristup cirkulirajućem hormonu T_4 . Preferirani supstrati D1 su rT_3 i sulfatirani T_3 (T_3S) (Moreno i sur., 1994), što upućuje na to da D1 ima važnu ulogu u regeneraciji jodida iz neaktivnih metabolita za ponovnu upotrebu u sintezi hormona štitnjače (Schneider i sur., 2006).

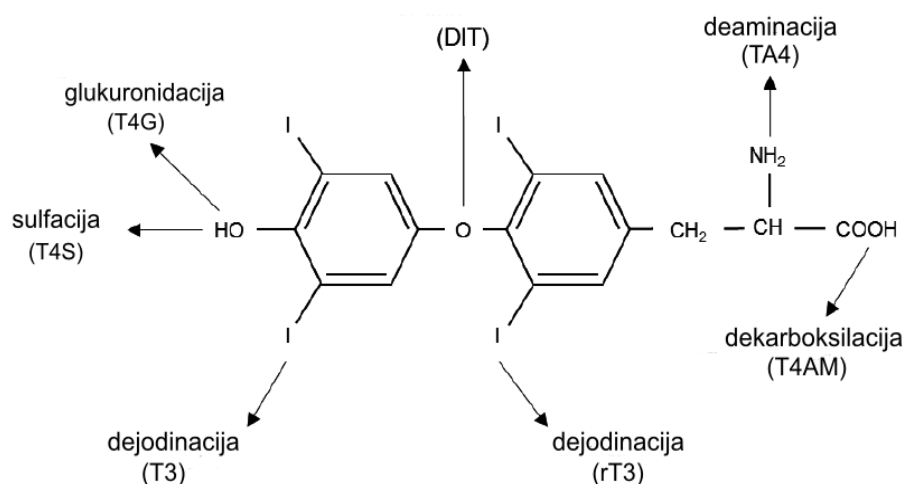
Dejodinaza tip 2 (D2) nalazi se na membrani endoplazmatskog retikuluma, te je najzastupljenija u mozgu, a manjim dijelom u hipofizi, skeletnom mišiću i smeđem masnom tkivu. Za razliku od D1, D2 je sposobna samo za dejodinaciju vanjskog prstena hormona T₄ i smatra se da igra glavnu ulogu u lokalnoj proizvodnji hormona T₃ u mozgu (van der Spek i sur., 2017). Katalizira i dejodinaciju rT₃ u 3,3'-T₂.

Dejodinaza tip 3 (D3) je enzim koji inaktivira hormone štitnjače jer može katalizirati dejodinaciju samo na unutarnjem prstenu, te je kao i D1, prisutna u plazma membrani. Visoko je zastupljena u tkivu posteljice i igra važnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja regulirajući koncentraciju hormona štitnjače u fetusu (van der Spek i sur., 2017). Funkcija D3 je i da štiti tkiva od prekomjerne koncentracije aktivnog hormona T₃ štitnjače katalizirajući razgradnju T₃ ili preusmjeravanjem metabolizma T₄ u rT₃, čime modulira unutarstaničnu koncentraciju hormona štitnjače održavajući homeostazu hormona štitnjače (Peeters i sur., 2012).



Slika 1.3. Dejodinacija hormona štitnjače enzimima D1, D2 i D3. Preuzeto i prilagođeno iz Larsen i sur., 2012.

Sekundarni metabolički put hormona štitnjače obuhvaća konjugaciju fenolne hidroksilne skupine vanjskoga fenolnog prstena s glukuronskom ili sulfatnom kiselinom. Ti procesi zbivaju se u perifernim tkivima, prvenstveno u jetri, a u manjoj mjeri u bubrezima (Kelly, 2000). Konjugacija fenolne hidroksilne skupine (4'-OH) sa sulfatnom ili glukuronskom kiselinom povećava topljivost supstrata u vodi i tako olakšava njihovo izlučivanje putem žuči ili mokraće (Peeters i sur., 2012). Sulfataciju hormona štitnjače katalizira grupa citosolnih sulfotransferaza, a glukuronidaciju uridin-5'-difosfat-glukuronoziltransferaze. U ciklusu enterohepatičke cirkulacije glukuronidirani hormoni štitnjače (T₃G i T₄G) se izlučuju u žuč i djelomično hidroliziraju oslobađajući hormone T₃ i T₄ koji se reapsorbiraju i ponovo ulaze u cirkulaciju (de Herder i sur., 1989; van der Spek i sur., 2017). U normalnim uvjetima, serumske koncentracije T₄S i T₃S su niske zbog brze dejodinacije pomoću D1, što sugerira da je sulfatacija primarni korak koji vodi do inaktivacije hormona štitnjače (Visser, 1994). Povišene koncentracije T₄S i T₃S su primijećene u fetalnoj krvi, kao i u bolesnika s netireoidnim bolestima i u bolesnika liječenih inhibitorom D1, a u bolesnika s hipotireozom je povećan i serumski omjer T₃S/T₃ (Chopra, 1996). U ovim uvjetima, sulfataze prisutne u različitim tkivima mogu pretvoriti T₃S u aktivni hormon T₃, te se smatra da glukuronidirani i sulfatirani hormoni štitnjače mogu djelovati kao rezervoari neaktivnih hormona štitnjače iz kojih prema potrebi nastaje aktivni hormon T₃, pogotovo u uvjetima slabe aktivnosti dejodinaza (npr. kod hipotireoze, u netireoidnim bolestima, manjak selena) (Peeters i sur., 2012; Visser, 1994; Wu i sur., 2005). Osim dejodinacije i konjugacije, hormoni štitnjače se još metaboliziraju i dekarboksilacijom, oksidativnom deaminacijom i cijepanjem esterskih veza (Slika 1.4.)



Slika 1.4. Periferni metabolizam hormona štitnjače. Preuzeto i prilagođeno iz Peeters i sur., 2012

1.5. Djelovanje hormona štitnjače

Hormoni štitnjače reguliraju stanične funkcije kroz dva različita mehanizma: genski i negenski. Do metaboličkih djelovanja hormona štitnjače dolazi kad se hormoni štitnjače vežu na određene receptore u jezgri stanica regulirajući proces genske transkripcije, što se smatra genskim mehanizmom aktivnosti, te je primarno djelovanje hormona štitnjače rezultat vezanja hormona T_3 za specifične receptore u jezgri ciljnih stanica. Djelovanje hormona štitnjače je posredovano putem jezgrenih receptora hormona štitnjače (engl. *thyroid hormone receptor*, TR) koji pripadaju superobitelji jezgrenih receptora u koju spadaju i steroidi, retinoidi i vitamin D. Dva gena koja kodiraju receptore su *THRA* i *THRB*, s tim da *THRA* kodira receptor hormona štitnjače alfa ($TR\alpha$), a *THRB* kodira receptor hormona štitnjače beta ($TR\beta$). Ovi geni kodiraju četiri aktivne izoforme receptora ($TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$, $TR\beta_1$ i $TR\beta_2$), od kojih $TR\alpha_1$, $TR\beta_1$ i $TR\beta_2$ vezuju hormone štitnjače uz 10-ak puta veći afinitet za T_3 u odnosu na T_4 (afinitet $T_3:T_4$ je 10:1). Ekspresija pojedinih izoformi TR specifična je za određena tkiva, što ukazuje na različite funkcije u različitim tkivima. Proteini $TR\alpha$ su prisutni u većini tkiva, s tim da se $TR\alpha_1$ najviše eksprimira u srcu i mozgu. Protein $TR\beta_1$ je pretežno ekspimiran u jetri, bubrezima, mozgu i štitnjači, dok je ekspresija $TR\beta_2$ uglavnom ograničena na hipofizu (Brent, 2012; Mondal i sur., 2016). Proces transkripcije započinje vezanjem hormona štitnjače na specifične jezgrene receptore (TR). Unutar jezgre TR moduliraju transkripciju vezanjem specifičnih nukleotidnih sekvenci DNK koji se nazivaju regulacijski elementi hormona štitnjače (engl. *thyroid hormone response elements*, TRE). Nakon prepoznavanja TRE, TR stvaraju heterodimere s receptorom za retinoid X (engl. *retinoid X receptor*, RXR) čime se drastično povećava afinitet vezivanja TR za TRE što dovodi do aktivacije transkripcije (Guyton i sur., 2017; Yen, 2001).

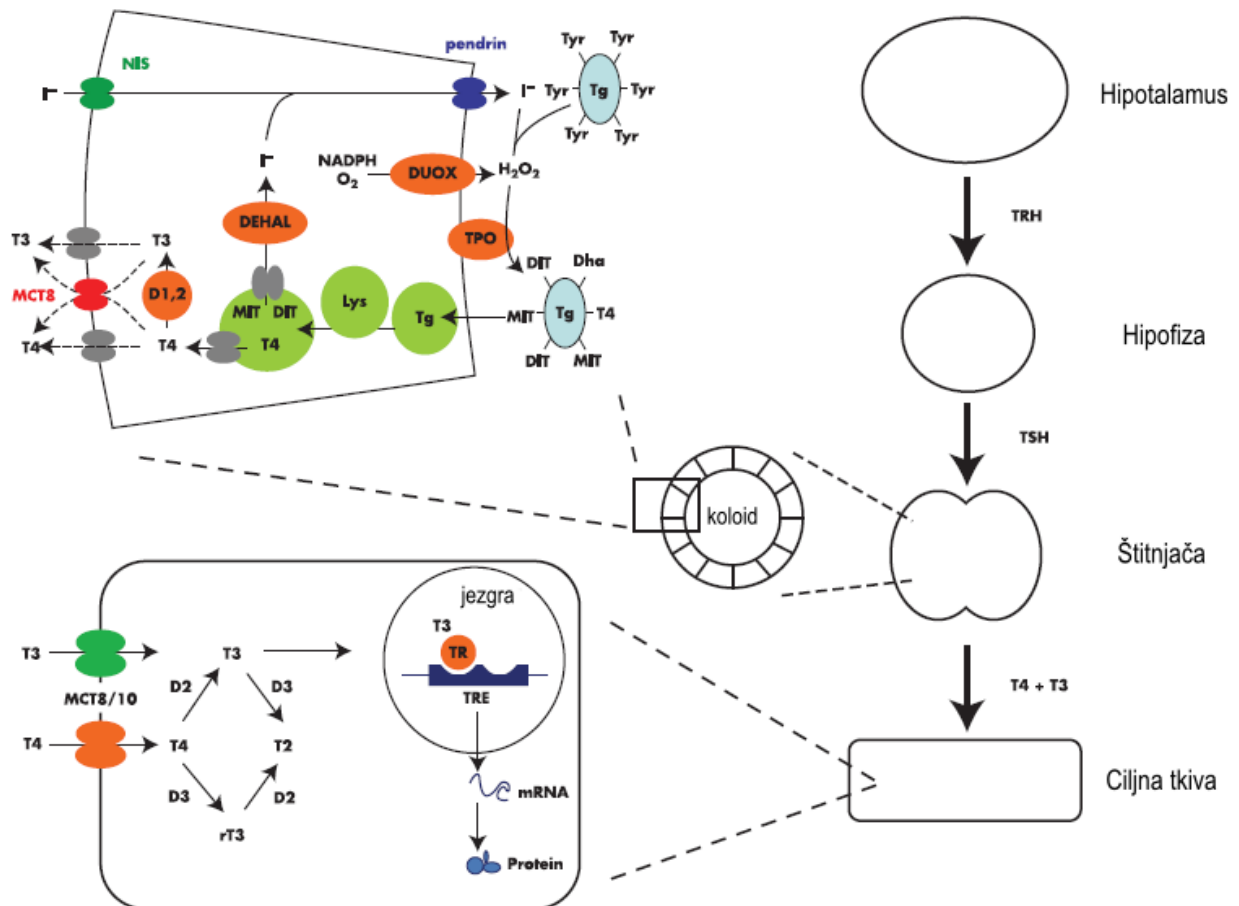
Negenski mehanizam djelovanja hormona štitnjače je vezanje hormona štitnjače za receptore na staničnoj membrani i u citoplazmi, te je neovisan o učincima hormona na transkripciju gena. Jedan od mehanizama uključuje vezanje hormona na receptore plazma membrane i to na integralni membranski receptor integrin $\alpha V\beta_3$, koji sadrži domenu kojom vezuje hormone T_3 i T_4 čime se aktiviraju biokemijski mehanizmi i različiti signalni putevi unutar stanice (Davis i sur., 2011). Hormoni štitnjače se mogu, i bez ulaska u stanicu, vezati i za citosolne receptore, aktivirajući druge signalne putove (Davis i sur., 2008). Učinci receptora rT_3 na aktin u citoskeletu u razvoju mozga, i T_2 na metabolizam mitohondrija također ukazuju na važna negenska djelovanja hormona štitnjače (Davis i sur., 2008; Moreno i sur., 2008). Negenski učinak hormona je bitan i u regulaciji važnih fizioloških funkcija, kao što su koncentracija triglicerida, koncentracija glukoze u krvi, tjelesna temperatura i frekvencija pulsa (Hones i sur., 2017), a

djeluju i na aktivnost mitohondrija čime utječu na proizvodnju energije unutar stanice (Lanni i sur., 2016).

1.6. Regulacija hormona štitnjače

Hormoni štitnjače svojim djelovanjem snažno utječu na gotovo sve stanice u organizmu. Njihov utjecaj očituje se kroz mnoge fiziološke procese u organizmu tako što povećavaju sintezu mnogih proteina i metabolizam ugljikohidrata, reguliraju potrošnju i proizvodnju energije, pojačavaju sintezu i razgradnju kolesterola i triglicerida, utječu na mitohondrijski metabolizam stimulirajući stanično disanje i oksidativnu fosforilaciju. Da bi se održala optimalna razina bazalnog metabolizma, hormoni štitnjače se neprestano luče razmjerno metaboličkim potrebama organizma (Guyton i sur., 2017). Regulacija i nadzor lučenja hormona štitnjače su bitni za održavanje stalne koncentracije hormona u krvi, a regulirani su unutar osi hipotalamus-hipofiza-štitnjača (engl. *hypothalamic–pituitary–thyroid axis*, HPT) (Slika 1.5.). Lučenje hormona štitnjače je pod kontrolom hormona tireotropina (engl. *thyroid-stimulating hormone*, TSH) kojeg luči hipofiza, a TSH pak nadzire hormon tireoliberin, tj. hormon koji oslobađa tireotropin (engl. *thyrotropin releasing hormone*, TRH), iz hipotalamusa. Porast ili pad koncentracije hormona štitnjače u krvi registriraju hipotalamus i hipofiza što dovodi do kočenja odnosno lučenja sekrecije TRH i TSH, te se regulacijskim mehanizmom negativne povratne sprege između hipotalamusa, hipofize i štitnjače održava stalna koncentracija hormona štitnjače u krvi (Halbauer i sur., 2001). Sve faze sinteze i sekrecije hormona štitnjače, počevši od preuzimanja joda iz cirkulacije pa do sekrecije hormona u krv, su pod utjecajem TSH, ali i pod utjecajem autoregulacijskih mehanizama u samoj žlijezdi ovisnih o raspoloživosti joda (Halbauer i sur., 2001; Solter, 2007). Fiziološka uloga i aktivnost TSH se ostvaruje vezivanjem TSH za membranske receptore (engl. *thyroid stimulating hormone receptor*, TSHR) koji se nalaze na bazolateralnoj membrani stanica štitnjače. TSH stimulira štitnjaču na proizvodnju hormona, što povećava lučenje T_4 i T_3 iz štitnjače povećavajući proteolizu tireoglobulina u folikulama zbog čega se hormoni štitnjače otpuštaju u krv, a njihova količina u folikulama se smanjuje. TSH povećava i rad simportera natrija i jodida, povećavajući time unos jodida u stanice štitnjače, uslijed čega se odnos stanične i izvanstanične koncentracije jodida može višestruko povećati. Potiče i jodiranje tirozina te njegovo udruživanje u hormone štitnjače, povećava volumen i sekrecijsku aktivnost stanica štitnjače, te uzrokuje hipertrofiju stanica štitnjače mijenjajući epitel stanica iz kubičnog u cilindrični (Guyton i sur., 2017; Solter, 2007).

Aktivnosti HPT osi, kao i sve njene komponente, osjetljive su na variranje u koncentraciji i perifernoj dostupnosti hormona štitnjače, jer i veoma male varijacije u koncentraciji hormona štitnjače aktiviraju mehanizam negativne povratne sprege a sve u svrhu kako bi se održala optimalna koncentracija hormona u cirkulaciji.



Slika 1.5. Pojednostavljeni pregled HPT osi, sinteze hormona štitnjače i djelovanja hormona štitnjače u ciljnim tkivima. U štitnjači, apsorbirani jod koji je u cirkulaciji prisutan kao jodid, aktivno se transportira preko bazolateralne membrane folikularnih stanica štitnjače pomoću simportera natrija i jodida (NIS), i pasivno kroz apikalnu membranu pomoću proteinskog prijenosnika pendrina. Tg je glikoprotein čiji su tirozinski ostaci supstrati za jodiranje i stvaranje hormona štitnjače. TPO igra važnu ulogu u jodiranju Tg-a, koja uz pomoć vodikovog peroksida (H_2O_2), veže jod na tirozinske ostatke. Jodirani tirozini unutar Tg-a se zatim povezuju u tvorbu jodtironina. Spajanjem dva dijodtirozina nastaje T_4 , a spajanjem jednog monojodtirozina i jednog dijodtirozina nastaje T_3 . Jod se reciklira jodtirozin dejodinazom (IJD), također poznatom kao DEHAL1. 80 % cirkulirajućeg hormona T_3 nastaje izvan štitnjače perifernom konverzijom prohormona T_4 dejodinazama tip 1 i 2 (D1 i D2). D1 je prisutna u jetri i bubrezima, dok je D2 uglavnom prisutna u mozgu, skeletnim mišićima i srcu. D3 je uglavnom odgovorna za unutarstaničnu razgradnju T_4 i T_3 gdje nastaju rT_3 i T_2 , a prisutna je u mozgu, koži i placenti. Stanični unos T_4 i T_3 posredovan je membranskim prijenosnicima MCT8 i MCT10. Hormon T_3 se smatra glavnim bioaktivnim hormonom štitnjače, koji pokazuje svoje učinke vezanjem na unutarstanične receptore (TR). Preuzeto i prilagođeno iz Medici i sur., 2015.

1.7. Važnost hormona štitnjače

U zdravih ispitanika, koncentracije hormona štitnjače u serumu pokazuju značajne razlike među pojedincima (interindividualne varijacije), dok je varijabilnost mnogo manja kod iste osobe tijekom dužeg vremenskog razdoblja (intraindividualna varijacija), ukazujući na važan utjecaj genetičkih čimbenika na regulaciju hormona štitnjače što zajedno s čimbenicima okoliša, poput prehrane i pušenja, rezultira specifičnim vrijednostima hormona štitnjače koji su različiti za svakog pojedinca (Andersen i sur., 2002). Dosadašnja istraživanja su pokazala da i manje varijacije u koncentraciji hormona štitnjače u serumu, čak i ako su koncentracije hormona štitnjače unutar referentnih vrijednosti, mogu imati važne posljedice na kliničke ishode, kao što su metabolički sindrom (Ruhla i sur., 2010), ateroskleroza (Toft, 2001), mineralna gustoća kostiju (Murphy i sur., 2010), fibrilacija atrijska (Heeringa i sur., 2008) i bolesti kardiovaskularnog sustava (Asvold i sur., 2008; Taylor i sur., 2013). Od prehrane, unos joda ima značajan utjecaj na promjene koncentracije hormona štitnjače u serumu. Nedovoljan unos joda povezan je s gušavošću, smanjenom proizvodnjom T_4 , povećanim omjerom sekrecije T_3/T_4 i povećanim omjerom cirkulirajućih koncentracija T_3/T_4 (Fisher, 1996).

Kao što je naglašeno prije, hormoni štitnjače u krvi cirkuliraju vezani na različite proteinske nosače. Količina i afinitet vezanja proteinskih nosača određuje količinu ukupnih hormona štitnjače, dok je manja količina hormona u slobodnom, nevezanom obliku konstantna i usko povezana s funkcijskim stanjem štitnjače. Promjene koncentracije proteinskih nosača rezultiraju promjenom koncentracije ukupnih hormona štitnjače, ali ne utječu na njihovu djelotvornost (Solter, 2007). Hormoni štitnjače se otpuštaju u krvotok po potrebi i pod utjecajem TSH. Čak i vrlo male promjene u koncentracijama hormona štitnjače uzrokuju višestruke promjene u razini TSH u suprotnom smjeru, pa i vrlo mali porast koncentracije hormona T_4 ili T_3 može biti dovoljan da potisne izlučivanje TSH, iako koncentracije T_4 i T_3 mogu biti unutar referentnog raspona. Stoga je TSH najosjetljiviji parametar za utvrđivanje funkcije štitnjače, te se koristi kao početni dijagnostički test u procjeni funkcije štitnjače. Osim TSH, za utvrđivanje poremećaja u radu štitnjače mjere se i koncentracije ukupnih (T_4 i T_3) i slobodnih hormona štitnjače (fT_4 i fT_3).

U našim kliničkim centrima se rutinski najčešće, uz TSH, određuju i koncentracije ukupnih hormona štitnjače, a u svjetskim kliničkim centrima sklonost k određivanju ukupnih ili slobodnih koncentracija hormona štitnjače je podjednaka, ali u nekim laboratorijima se preferira određivanje slobodne koncentracije hormona, fT_4 i fT_3 . Određivanje koncentracije slobodnih hormona štitnjače je pouzdanije od određivanja koncentracije ukupnih hormona u stanjima koja

utječu na promjenu proteinskih nosača (trudnoća, uzimanje oralnih kontraceptiva, neke nasljedne bolesti) te je tad zbog povišene koncentracije proteinskih nosača povišena i koncentracija ukupnih hormona štitnjače, a ne zbog poremećaja funkcije štitnjače (Kusić i sur., 2009). Neke laboratorijske metode određivanja slobodnih hormona štitnjače imaju nedostatke, jer nisu sasvim neovisne o koncentraciji proteinskih nosača. Za razliku od koncentracije ukupnih hormona štitnjače koja se određuje u nanomolima, koncentracija slobodnih hormona štitnjače se određuje u pikomolima, što može utjecati na točnost (Solter, 2007). Pouzdane metode koje izravno mjere fT_4 i fT_3 se temelje na fizičkom odvajanju slobodnog od ukupnog hormona (ekvilibrirska dijaliza ili ultrafiltracija), ali su složene i skupe za rutinsku primjenu (Kusić i sur., 2009).

Kombinirajući koncentracije hormona štitnjače dobivaju se parametri homeostaze štitnjače koji mogu u određenim uvjetima dati vrijedne informacije za klinička istraživanja i diferencijalnu dijagnozu poremećaja štitnjače (Dietrich i sur., 2012). Najjednostavnija metoda kojom se postojeće znanje o homeostazi štitnjače iskorištava u dijagnostičke svrhe je izračunavanje omjera T_3/T_4 , parametra koji se odražava na funkciju štitnjače i djelovanje hormona na tkiva (Mirjanic-Azaric i sur., 2016; Mortoglou i sur., 2004; Wilkin i sur., 1984), a može se izračunati iz ukupnih ili slobodnih hormona štitnjače (Dietrich i sur., 2012). Pokazano je da je omjer T_3/T_4 povišen kod određenih poremećaja štitnjače (Amino i sur., 1981; Miyauchi i sur., 2008; Takamatsu i sur., 1986) i nedostatka joda (Horn i sur., 1975), dok je smanjen kod netireoidnih bolesti (Laurberg, 1984) i centralnog hipotireoidizma (Sesnilo i sur., 2011). Nadalje, omjer T_3/T_4 se odražava i na prehrambene učinke (Fisher, 1996) i učinke lijekova na dejodinaciju (Dong, 2000), a koristan je i kod razlikovanja tireoiditisa od ostalih uzroka tireotoksikoze (Mortoglou i sur., 2004).

1.8. Poremećaji funkcije štitnjače

Za održavanje normalne metaboličke aktivnosti u tijelu, u svakom se trenutku mora lučiti točno određena količina hormona štitnjače, što omogućuju posebni mehanizmi negativne povratne sprege koji djeluju preko HPT osi i tako nadziru količinu lučenja štitnjače. Poremećaji u funkciji štitnjače dovode do pojačanog ili oslabljenog rada štitnjače, čime se proizvodi više ili manje hormona štitnjače nego što organizmu treba, a to dovodi do nastanka različitih bolesti štitnjače.

1.8.1. Hipotireoza

Hipotireoza je stanje smanjenog stvaranja, izlučivanja i djelovanja hormona štitnjače što dovodi do usporavanja tjelesnog metabolizma (Solter, 2007). Najčešći simptomi hipotireoze su umor, suhoća kože i kose, otečenost očnih kapaka, uvećanje tjelesne mase, zaboravljivost, opstipacija, osjetljivost na hladnoću, dispneja i promuklost. Može biti primarna, sekundarna ili tercijarna, a zbog mehanizma povratne sprege dolazi do porasta TSH. Sekundarna i tercijarna hipotireoza se pojavljuju rjeđe, dok je primarna hipotireoza posljedica poremećaja i bolesti štitnjače. Uzrok primarne hipotireoze je nedostatak joda, što uzrokuje nastanak gušavosti, jer štitnjača ne može stvarati hormone te se potiče stvaranje TSH koji potiče stanice štitnjače na lučenje velike količine Tg-a u folikule, pa štitnjača postaje sve veća. I drugi, češći uzrok oslabljenog rada štitnjače, je kronična upala štitnjače odnosno Hashimotov tireoiditis (HT), što dovodi do stvaranja protutijela koja su usmjerena na Tg (TgAt) i TPO (TPOAt), i snižene koncentracije hormona štitnjače. Također, hipotireoza može nastati i kod liječenja hipertireoze radioaktivnim jodom, nakon primjene antitireoidnih lijekova, i nakon operacije štitnjače kada se odstrani većina žlijezde ili pak cijela žlijezda. Ako se hipotireoza razvije tijekom adolescencije može usporiti rast i razvoj sekundarnih spolnih osobina, a ako se javi u najranijem djetinjstvu može doći do zaostajanja u tjelesnom rastu i mentalne zaostalosti odnosno do pojave kretinizma. Stoga se danas koncentracije hormona štitnjače kontroliraju odmah po rođenju djeteta. U laboratorijskoj dijagnostici najveću važnost pri postavljanju dijagnoze hipotireoze imaju povišene vrijednosti TSH i snižene vrijednosti T₄ (fT₄) hormona. Hipotireoza se jednostavno liječi uzimanjem nadomjesne terapije hormona štitnjače u obliku sintetskog T₄ (levotiroksina) (Guyton i sur., 2017; Solter, 2007).

1.8.2. Hipertireoza

Hipertireoza je stanje povećane sinteze, izlučivanja i djelovanja hormona štitnjače, što dovodi do pojačanog metabolizma (Solter, 2007). Simptomi koji se javljaju su ubrzan rad srca, nervoza, prekomjerno znojenje, gubitak težine uz povećanje apetita, nepodnošljivost topline i izbočenost očiju. Najčešći oblik hipertireoze je autoimuna Basedowljeva ili Gravesova bolest, u kojoj se stvaraju protutijela koja se vežu za iste membranske receptore kao i TSH time potičući trajnu aktivaciju cAMP u stanici i razvoj hipertireoze. Ostali oblici pojačanog rada štitnjače su toksična multinodozna guša i toksični adenom gdje čvorovi u štitnjači mogu biti uzrokom hipertireoze (Guyton i sur., 2017; Solter, 2007). U slučaju hipertireoze, vrijednosti TSH su niže od normalne, a vrijednosti hormona T_4 i T_3 su povišene, te u hipertireozu obično više poraste koncentracija hormona T_3 , zbog povećanog lučenja T_3 i ubrzane konverzije hormona T_4 u T_3 u perifernim tkivima. Liječenje ovisi o uzroku hipertireoze i obliku poremećaja, a provodi se pomoću antitireoidnih lijekova, i to propiltiouracila (PTU) i metimazola koji blokiraju TPO, smanjuju organifikaciju joda i ometaju spajanje jodotironina. PTU u visokim dozama uz to koči i perifernu konverziju T_4 u T_3 . Kod težeg oboljenja provodi se liječenje radioaktivnim jodom ili se kirurški uklanja štitnjača.

1.9. Genetičke studije povezanosti

Jedan od ciljeva humane genetike je identificirati genetičke čimbenike koji utječu na nastanak složenih bolesti. Veliki napredak postignut je završetkom Projekta ljudskog genoma (engl. *Human Genome Project*) 2003. godine. Taj projekt, koji je pokrenut 1990. godine, odredio je DNK slijed cijelog ljudskog genoma, identificirao približno 20 000 gena i pohranio te informacije u javno dostupne baze podataka (Office of Science, 2002). Postoji mnoštvo različitih tehnologija, studija i analitičkih alata za identifikaciju gena koji utječu na nastanak određene bolesti, a dva osnovna pristupa koja se koriste su analize vezanosti (engl. *linkage analysis*) i studije povezanosti (engl. *association analysis*). Analize vezanosti se temelje na kosegregaciji genskih varijanti s bolesti unutar članova obitelji, a temelje se na Mendelovim principima nasljeđivanja te otkrivaju rijetke alele s viskom učinkom na pojavnost bolesti (Bailey-Wilson i sur., 2011), dok studije povezanosti za cilj imaju identificirati gene, odnosno genske varijante, povezane s bolešću ili određenim fenotipskim svojstvom (Newton-Cheh i sur., 2005).

1.9.1. Genske varijante

Sve genetičke studije usmjerene su na razumijevanje povezanosti uočenih razlika u fenotipu i temeljnih varijacija u genotipu. Sekvenciranje ljudskog genoma omogućilo je identifikaciju velikog broja gena koji se nalaze u podlozi brojnih stanja i bolesti. Štoviše, danas je moguće identificirati gotovo svaku gensku varijantu u protein kodirajućim regijama kod pojedinca (sekvenciranjem egzoma) ili u njegovom čitavom genomu (sekvenciranjem cijelog genoma). Svaki čovjek ima dvije kopije svog genoma, po jednu od svakog roditelja, a svaka se kopija sastoji od niza od oko 3 milijarde baza. Kada se uspoređuju dvije kopije ljudskog genoma, bilo u iste osobe ili između dviju različitih osoba, u prosjeku se 1 od 1000 baza razlikuje, odnosno 99,9 % ih je isto (Majithia i sur., 2016). Glavni izvori genetičke raznolikosti među ljudima su različite vrste mutacija i rekombinacija genetičkog materijala. Mutacije su trajne promjene u strukturi molekule DNK, koje mogu promijeniti jedan ili više nukleotida unutar slijeda DNK. Ako se mutacija dogodi u spolnim stanicama i ne dođe do popravka izmijenjenog slijeda molekule DNK, mutacija se prenosi na potomstvo te se širi unutar populacije. Mutacije koje poboljšavaju svojstva organizma se dalje prenose i šire u populaciji, pa se mutacije smatraju pokretačkom snagom evolucije i izvorom genetičke raznolikosti. Kada se mutacija tijekom generacija proširi u populaciji i kada je pronalazimo u učestalosti većoj od 1 % nazivamo je polimorfizmom (Brookes, 1999).

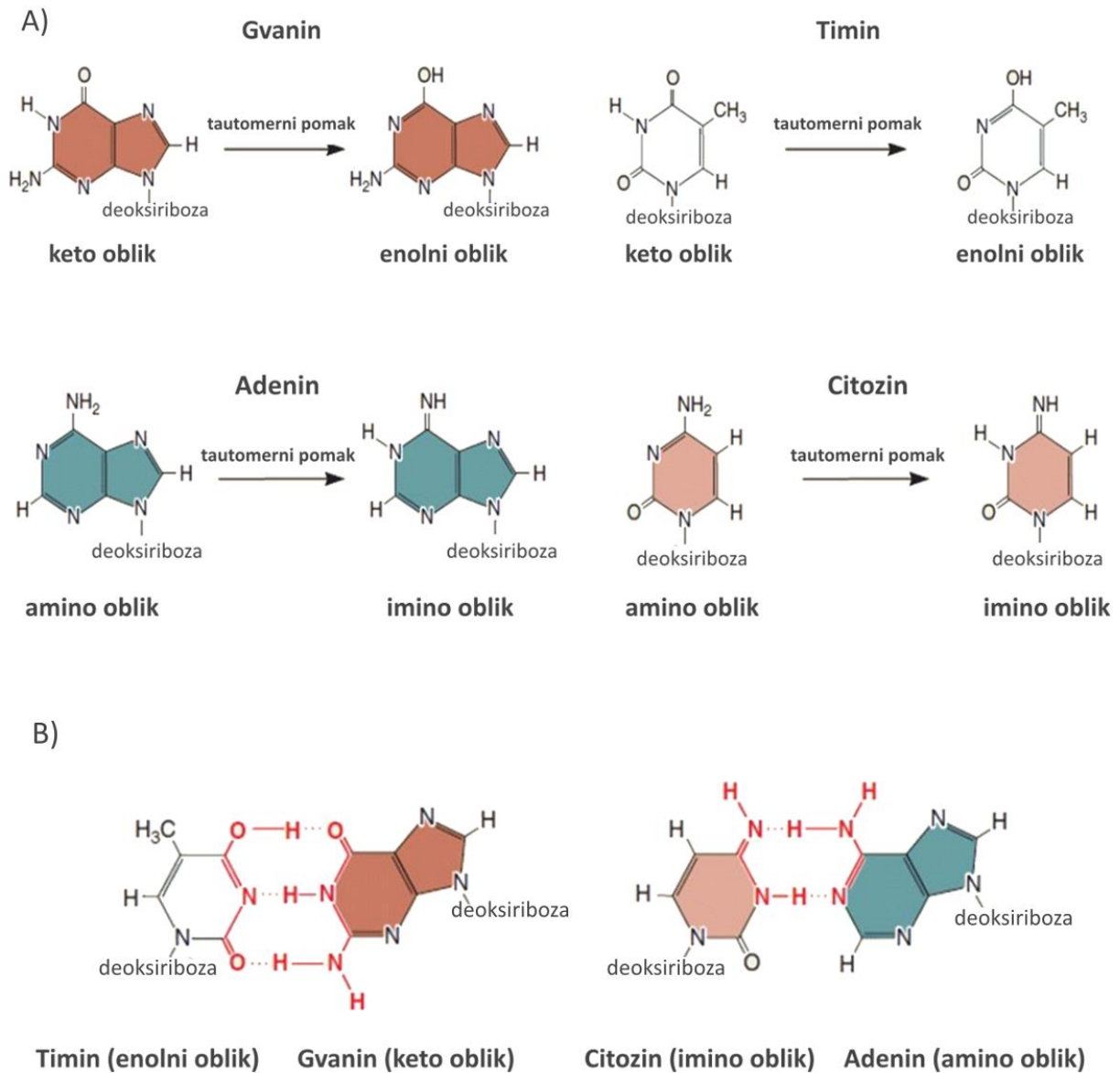
Polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single-nucleotide polymorphism*, SNP) su najčešća vrsta promjena u slijedu molekule DNK gdje dolazi do promjene odnosno supstitucije jednog nukleotida. Iako mnogi polimorfizmi nemaju negativan učinak na zdravlje čovjeka, neki polimorfizmi mogu imati veći rizik za razvoj određenih poremećaja. Polimorfizmi imaju širok spektar bioloških učinaka, ovisno o tome gdje se u genomu pojavljuju i mijenjaju li funkciju sekvence DNK, a mogu se nalaziti bilo gdje u slijedu DNK, u nekodirajućim i kodirajućim regijama, u regulatornoj regiji ili u intergenskim regijama. Polimorfizmi u kodirajućim, egzonskim regijama gena, mogu dovesti do promjene aminokiseline u proteinu kojeg taj gen kodira i time mogu nastati ili djelomično promijenjeni proteini ili potpuno nefunkcionalni proteini. Polimorfizmi u nekodirajućim regijama i unutar regulatornih genskih regija, mogu utjecati na razinu genske ekspresije, samim time i na količinu proteina kojeg taj gen kodira, zbog promjene u afinitetu vezanja transkripcijskog faktora, a mogu utjecati i na izrezivanje (engl. *splicing*) glasnike RNK. Ako se polimorfizmi nalaze unutar 3' neprepisujuće regije (engl. *untranslated region*, UTR) mogu utjecati na stabilnost mRNK i na učinkovitost translacije proteina (Bush i sur., 2012; Griffith i sur., 2008).

Osim polimorfizma jednog nukleotida, druge genske varijante koje se pojavljuju u ljudskom genomu su kratke insercije i delecije (nazvane i *indeli*), a odnose se na umetanje ili gubitak jednog ili više nukleotida u slijedu molekule DNK. Insercije i delecije koji se pojavljuju u kodirajućim regijama gena mogu uzrokovati mutacije pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift mutations*). Budući da se genetski kod sastoji od tripleta (slijeda od tri baze koje kodiraju jednu aminokiselinu), mutacije pomaka okvira čitanja mijenjaju način na koji će se svaka sljedeća baza u nizu prevoditi u protein, što može rezultirati inaktivacijom proteina.

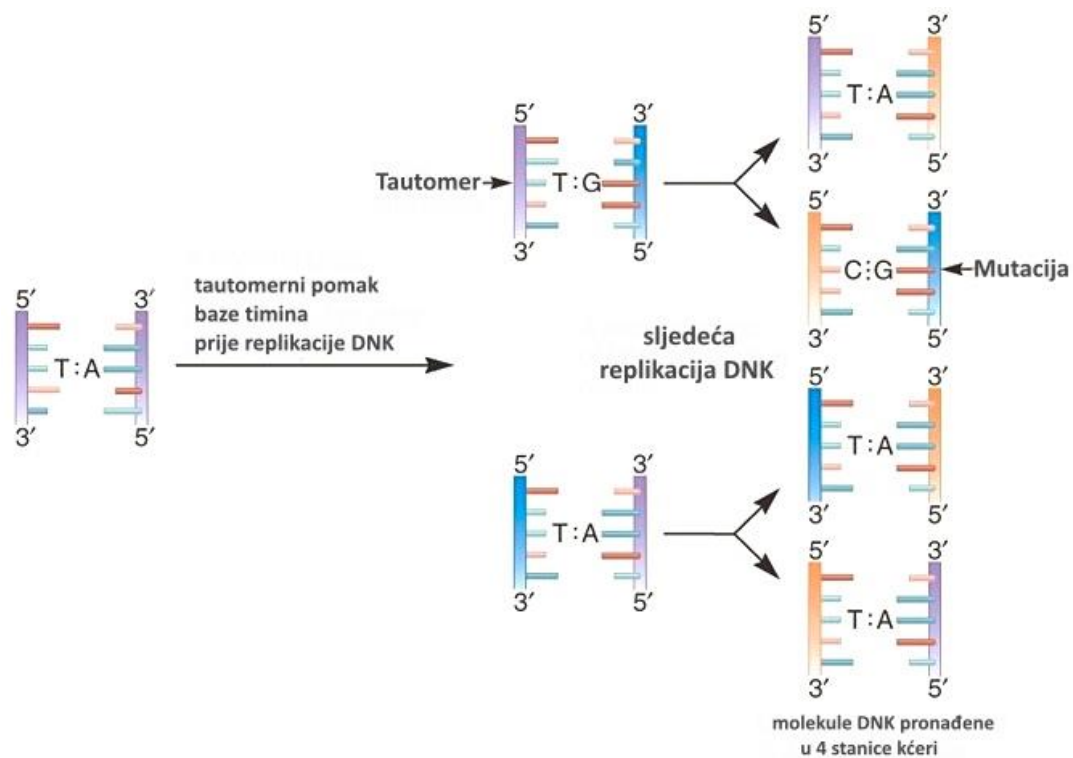
Ljudski genom se razlikuje i u broju kopija gena, što znači da jedna osoba može imati jednu ili više kopija pojedinih gena, a rjeđe jedan ili više gena može u potpunosti nedostajati. Te vrste genskih varijanti poznate su i kao varijacije u broju kopija (engl. *copy number variations*, CNV). CNV-ovi su rezultat insercija, delecija i duplikacija velikih segmenata molekule DNK, a ti segmenti su dovoljno veliki da uključuju i čitave gene te mogu utjecati na aktivnost istih. CNV-ovi imaju velik doprinos genetičkoj raznolikosti među pojedincima jer se procjenjuje da se 0,4 % ljudskog genoma razlikuje s obzirom na broj kopija gena, što bi značilo da je među ljudima 99,5 % genoma identično, a ne kao što je prvobitno procijenjeno na 99,9 % (Levy i sur., 2007). Mnogi CNV-ovi ne utječu na zdravlje ili razvoj čovjeka, međutim, neki mogu imati važnu ulogu u nastajanju različitih poremećaja.

Važno je napomenuti i da sastav parova baza u slijedu molekule DNK nije jedina molekularna odrednica ekspresije fenotipa, već je molekula DNK podložna i drugim oblicima modifikacija, poput metilacije citozina ili pakiranju nukleosoma s različitim biokemijski modificiranim histonima, od kojih svaki može promijeniti ekspresiju i funkciju gena. Te modifikacije dovode do promjene ekspresije gena i staničnog fenotipa koje nisu posljedica promjene sekvence DNK i nazivaju se epigenetske varijacije. Smatra se da su epigenetske modifikacije normalan dio ljudskog razvoja i jedan od razloga što različite stanice imaju različita svojstva, iako dijele identičan slijed DNK (Majithia i sur., 2016).

Mutacije mogu nastati spontano, i to najčešće nastaju zbog grešaka tijekom replikacije DNK pogrešnim djelovanjem enzima polimeraze, gdje može doći do pogrešne ugradnje nukleotida, ili zbog tautomerne promjene baza. Purinske i pirimidinske baze mogu postojati u tautomernim oblicima, to jest u alternativnim kemijskim oblicima koji se razlikuju u samo jednom pomaku protona u molekuli. Biološki važni tautomeri su keto-enolni oblici timina i gvanina i amino-imino oblici citozina i adenina (Slika 1.6.). Tautomerni pomaci mijenjaju vezujuću strukturu molekule, omogućujući vezanje vodika s nekomplementarnim bazama (Tamarin, 1999). Primjerice, tautomerni enolni oblik baze timina se može spariti s gvaninom, što nakon replikacije DNK može dovesti do trajnih promjena parova baza i u konačnici do mutacije (Slika 1.7.)

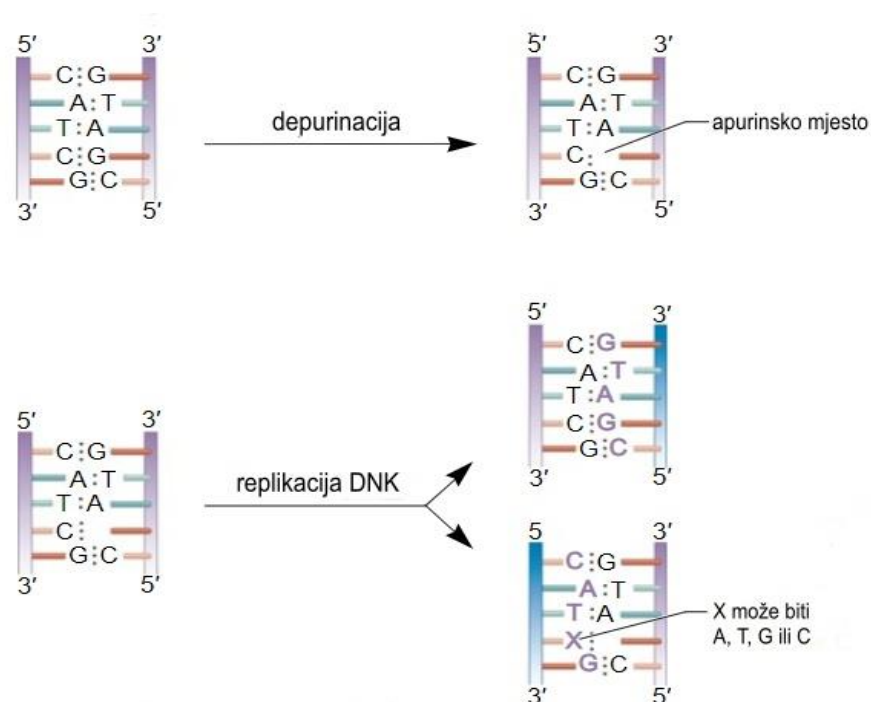


Slika 1.6. Normalni i tautomerni oblici purinskih i pirimidinskih baza DNK. A) Gvanin i timin mogu postojati u keto obliku ili, rjeđe, u enolnom obliku. Adenin i citozin mogu postojati u amino obliku ili, rjeđe, u imino obliku. B) Primjeri sparivanja rijetkog enolnog oblika timina s uobičajenim keto oblikom gvanina; i rijetkog imino oblika citozina s uobičajenim amino oblikom adenina. Preuzeto i prilagođeno iz Brooker, 2005.



Slika 1.7. Nastanak mutacija tautomernim pomakom baze timina i replikacijom DNK. Preuzeto i prilagođeno iz Brooker, 2005.

Spontana oštećenja molekule DNK mogu nastati gubitkom baza i spontanom deaminacijom baza. Gubitak baza je posljedica hidrolize *N*-glikozidnih veza, te je češći gubitak purinskih baza (depurinacija) nego pirimidinskih baza (depirimidinacija). Zbog kidanja veza između purinske/pirimidinske baze i deoksiriboze, nastaje AP mjesto (apurinsko/apirimidinsko mjesto) u molekuli DNK, koje može zaustaviti replikaciju ili uzrokovati jednolančane lomove (Slika 1.8.). Deaminacija, ili gubitak amino skupine, je rezultat kemijske nestabilnosti pirimidinske baze citozina te purinskih baza adenina i gvanina. Tim procesom nastaju neprirodne baze u molekuli DNK, od citozina uracil, od adenina hipoksantin, a od gvanina ksantin, te kada se ne bi odstranjivale iz molekule DNK, drastično bi promijenile gensku uputu (Zergollern, 1994).



Slika 1.8. Spontana depurinacija. Dolazi do kidanja veze između gvanina i deoksiriboze, čime se oslobađa baza, što ostavlja apurinsko mjesto u DNK. Ako apurinsko mjesto ostane u DNK prilikom replikacije, bilo koji od ostala četiri nukleotida se mogu dodati novonastalom lancu. Preuzeto i prilagođeno iz Brooker, 2005.

Osim spontanih, mutacije mogu biti i inducirane, nastale zbog egzogenih štetnih izlaganja zračenju (npr. ultraljubičastom i ionizirajućem) ili zbog izloženosti kemijskim mutagenim čimbenicima (Dorak, 2017), pa se gore spomenuti proces deaminacije može inducirati npr. djelovanjem dušikaste kiseline (HNO_2), dovodeći do učestalijeg stvaranja uracila, hipoksantina i ksantina nego u normalnim uvjetima. Kemijski mutageni su i alkilirajući spojevi, koji mogu promijeniti specifičnost sparivanja baza što može dovesti do supstitucija baza ili zastoja u replikaciji DNK. Primjeri alkilirajućih spojeva su bojni otrovi (engl. *nitrogen mustard*) i etilmetasulfonat (EMS). Mutagena sredstva su i analozi purinskih i pirimidinskih baza (spojevi slični normalnim bazama DNK). Primjerice, 5-bromouracil je analog pirimidina, a 2-aminopurin je analog purina, koji se mogu ugraditi u molekulu DNK prilikom replikacije, izazivajući pogreške u sparivanju baza (Brooker, 2005).

1.9.2. Istraživanja genskih varijanti

Završetkom mapiranja ljudskog genoma otkriveno je 3,7 milijuna SNP-ova u ljudskom genomu, te je bilo potrebno ispitati njihovu učestalost u različitim populacijama. To je najprije i učinjeno u sklopu međunarodnog projekta „HapMap“ (engl. *International HapMap Project*) koji je započeo 2002. godine, a završio 2009. godine, a kasnije i u projektu „1000 Genoma“ (engl. *1000 Genomes project*). Glavni cilj projekta „HapMap“ je bio otkriti i analizirati uobičajene obrasce genetičke varijabilnosti uključene u zdravlje i nastanak bolesti u čovjeka. HapMap baza podataka je znatno olakšala provođenje genetičkih studija opisujući haplotipove (kombinacije alela na istom kromosomu), njihove lokacije u genomu i učestalost polimorfizama u različitim populacijama širom svijeta. Krajem 2008. godine je započeo još jedan međunarodni projekt „1000 Genoma“ s ciljem identifikacije i katalogiziranja svih genskih varijanti (SNP-ova i svih vrsta strukturnih varijanti) unutar genoma koje se pojavljuju s učestalošću od barem 1 % u istraživanim populacijama. Projekt je završio 2015. godine, a provodio se u četiri faze. U prvoj fazi projekta je analiziran i sekvenciran genom 1092 osobe iz 14 populacija, pri čemu je otkriveno 38 milijuna SNP-ova, oko 1,4 milijuna kratkih insercija i delecija te više od 14 000 većih delecija (Abecasis i sur., 2012). U zadnjoj, trećoj fazi, sekvenciranjem cijelog genoma i egzoma 2504 osobe iz 26 populacija ukupno je pronađeno i opisano više od 88 milijuna genskih varijanti i to 84,7 milijuna SNP-ova, 3,6 milijuna kratkih insercija i delecija te 60 000 strukturnih varijanti (Auton i sur., 2015). Prema rezultatima projekta „1000 Genoma“, genom pojedinca razlikuje se od referentnog ljudskog genoma na 4,1 do 5,0 milijuna mjesta, te iako većinu genskih varijanti čine SNP-ovi i kratki *indeli*, procjenjuje se i da ljudski genom sadrži 2100 do 2500 strukturnih varijanti koje obuhvaćaju oko 20 milijuna baza sekvence DNK (Sudmant i sur., 2015).

1.9.3. Kandidatne genetičke studije i cjelogenomske analize povezanosti

Prve studije povezanosti koje su se počele provoditi su kandidatne genetičke studije, kod kojih se istraživanje bazira na hipotezi koja dovodi u vezu djelovanje kandidatnog gena s nastankom bolesti. Polimorfizmi unutar odabranog gena se potom odabiru prema svojoj funkcionalnosti i položaju, te se testira njihova povezanost s bolešću. Dosadašnje kandidatne studije uglavnom su slijedile biološke hipoteze, nastale eksperimentalnim dokazima da su određeni biološki putovi vjerojatno uključeni u nastanak bolesti (Zondervan, 2011). Posljednjih nekoliko godina sve veću pažnju poprimaju cjelogenomske studije odnosno cjelogenomske analize povezanosti (engl. *genome-wide association study*, GWAS). Kod cjelogenomskih analiza povezanosti istraživanje se bazira na pretpostavci da sve genomske regije imaju utjecaj na nastanak neke bolesti (engl. *hypothesis-free*), te istražuju povezanost velikog broja genetičkih varijanti u genomu s različitim bolestima ili fenotipskim osobinama. Provedba cjelogenomskih studija je omogućena sekvenciranjem humanog genoma, stvaranjem baze podataka referentnih haplotipova svjetskih populacija („HapMap“ i „1000 Genoma“), razvojem brzih i jeftinijih tehnika genotipiziranja te stvaranjem naprednih bioinformatičkih alata.

Genske varijante koje se najčešće ispituju u cjelogenomskim studijama su polimorfizmi jednog nukleotida, ali mogu se istraživati i druge genske varijante kao što su insercije, delecije i translokacije. Tipična cjelogenomska studija obuhvaća: (1) odabir velikog broja ispitanika s bolešću (ili osobinom od interesa) i kontrolnih ispitanika za usporedbu; (2) izolaciju DNK i genotipizaciju ispitanika (utvrđivanje genotipa pojedinaca, odnosno alela pojedinaca) (3) provedbu statističkih i računalnih analiza za utvrđivanje povezanosti genskih varijanti i bolesti (osobina od interesa) i (4) replikaciju identificiranih genetičkih varijanti za koje se pokazalo da su povezane s bolešću (ili osobinom od interesa) u uzorku neovisne populacije i/ili eksperimentalnim ispitivanjem funkcionalnih implikacija (Pearson i sur., 2008). U analizu je potrebno uključiti što veći broj ispitanika kako bi se uočio čak i jako mali učinak genetičkih varijanti, a u pravilu se analizira više od milijun genskih varijanti po osobi.

Sve genetičke studije koriste jednu važnu značajku u svom dizajnu, a to je postojanje neravnoteže vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*, LD) unutar genoma, koji je mjera povezanosti između dvaju alela koji se nalaze jedan blizu drugoga na kromosomu, i nasljeđuju se zajedno češće nego što bi bilo očekivano slučajnim nasljeđivanjem (Gabriel i sur., 2002). Postoje različite baze podatka koje sadrže informacije o LD strukturi čitavog genoma, pa je time i olakšano izvođenje cjelogenomskih studija. Najčešće standardne jedinice koje se koriste za prikaz LD odnosa su D' i r^2 (Balding, 2006), čije se vrijednosti kreću od 0 do 1, te se u genetičkim

analizama češće koristi r^2 kao mjera za statističku snagu LD. Vrijednost 0 označava potpunu ravnotežu vezanosti (engl. *linkage equilibrium*), što podrazumijeva čestu rekombinaciju između dva polimorfizma, a ako je vrijednost veća od 0.8, smatra se da su polimorfizmi u potpunom LD-u i da se gotovo uvijek nasljeđuju zajedno, što znači da se ne razdvajaju rekombinacijom (Bush i sur., 2012; Pearson i sur., 2008). Neravnoteža vezanosti gena (LD) je iznimno koristan parametar jer se i polimorfizmi, koji naizgled ne utječu na funkcionalnost proteina kojeg kodira zadani gen, mogu nalaziti u LD-u s mogućim uzročnim polimorfizmom (engl. *causal variant*) koji sudjeluje u nastanku bolesti pa se takvi polimorfizmi smatraju biljezima uzročnog polimorfizma. Isto tako, svi polimorfizmi u području od interesa ne moraju se genotipizirati, već je dovoljno genotipizirati dio njih, ili čak samo jedan, koji će ujedno nositi informaciju i o polimorfizmima koji se nalaze u blizini. Time se uvelike i smanjuje broj polimorfizama koje je potrebno genotipizirati da bi se obuhvatio cijeli genom. Razvojem složenih matematičkih algoritama omogućeno je i predviđanje genotipova polimorfizama koji nisu direktno genotipizirani metodom imputacije, koristeći informacije genotipiziranih polimorfizama na temelju javno dostupnih referentnih panela, što omogućuje još veću iskoristivost cjelogenomskih studija jer se time povećava broj polimorfizama koji se istražuju, a time i snaga cjelogenomskih studija (Zheng-Bradley i sur., 2016). Geni i polimorfizmi za koje se otkrije povezanost s nekom bolešću, mogu služiti i kao biljezi za određenu bolest te je jedan od ciljeva cjelogenomskih studija korištenje genetičkih faktora rizika za predviđanje i utvrđivanje patogeneze bolesti, što u konačnici može utjecati na poboljšanje terapija koje se trenutno koriste, ali i na sam razvoj novih terapija (Bush i sur., 2012).

1.10. Genetička određenost hormona štitnjače

Brojna istraživanja su pokazala da na koncentracije hormona štitnjače utječu i genetički i okolišni čimbenici. Procjenjuje se da je 45 - 65 % ukupne varijacije u funkciji štitnjače određeno genetičkim čimbenicima, a za ostatak varijacije se smatra da su posljedica okolišnih čimbenika (unos joda i pušenje), ali i individualnih karakteristika (npr. dob, indeks tjelesne mase) (Andersen i sur., 2014; Medici i sur., 2011). Rezultati blizanačkih studija su pokazali da je 39 - 65 % varijacije serumskih koncentracija hormona TSH i fT_4 određeno genetičkim čimbenicima (Hansen i sur., 2004; Panicker i sur., 2008a). U studiji koja je istraživala serumske parametre hormona štitnjače u meksičko-američkoj populaciji, procjenjuje se da je 26 - 64 % varijacije u serumskim koncentracijama slobodnih i ukupnih hormona štitnjače određeno genetičkim čimbenicima (Samollow i sur., 2004), dok je studija Martina i suradnika (1998) pokazala da je 30 % varijacije serumske koncentracije ukupnog T_4 i T_3 genetički uvjetovano. Kandidatnim i cjelogenomskim studijama povezanosti identificirano je preko 40 gena povezanih s funkcijom štitnjače, ali uglavnom genske varijante koje su otkrivene su povezane s koncentracijama hormona TSH, te fT_4 i fT_3 (Arnaud-Lopez i sur., 2008; Malinowski i sur., 2014; Nielsen i sur., 2017; Popovic i sur., 2019; Porcu i sur., 2013; Taylor i sur., 2015). Do danas, nije provedena ni jedna cjelogenomska analiza povezanosti za ukupne koncentracije hormona štitnjače T_4 i T_3 .

Provedeno je nekoliko kandidatnih studija koje su analizirale ograničen broj gena povezanih s koncentracijama hormona $(f)T_4$ i T_3 u serumu, a prve kandidatne studije koje su analizirale povezanost genskih varijanti s koncentracijama hormona štitnjače fokusirale su se na gene koji kodiraju enzime dejodinaze (*DIO1* i *DIO2*). U genu *DIO1* pronađena su tri polimorfizma, rs11206244 (*DIO1*-C785T), rs12095080 (*DIO1*-A1814G) i rs2235544, povezana s koncentracijama hormona štitnjače u serumu (posebno s koncentracijama T_3 i rT_3) kod zdravih ispitanika u različitim populacijama. Alel T polimorfizma rs11206244 povezan je s višim koncentracijama hormona fT_4 , T_4 i rT_3 u kombinaciji s nižim koncentracijama $(f)T_3$ u serumu (de Jong i sur., 2007; Panicker i sur., 2008b; Peeters i sur., 2003). Kao posljedica toga, ta varijanta alela povezana je s nižim omjerima T_3/rT_3 i T_3/T_4 . Ti podatci sugeriraju negativan utjecaj varijante *DIO1*-785T na aktivnost D1, budući da D1 u jetri ima ključnu ulogu u proizvodnji hormona T_3 iz hormona T_4 , kao i u razgradnji rT_3 . Polimorfizmi rs11206244 i rs12095080 smješteni su u 3'-netranslatiranoj regiji (UTR) u genu *DIO1*, a polimorfizam rs12095080 je proučavan u manje studija i pokazao je suprotne rezultate od polimorfizma rs11206244. Alel G polimorfizma rs12095080 povezan je s većim omjerom T_3/rT_3 u dvije neovisne kohorte, što sugerira da je ta

varijanta povezana s povećanom aktivnošću enzima D1 (de Jong i sur., 2007; Peeters i sur., 2003) Polimorfizam rs2235544 je pokazao povezanost sa smanjenom koncentracijom hormona fT_4 i rT_3 , i povećanim omjerom fT_3/fT_4 (Panicker i sur., 2008b), što ukazuje na povećanu aktivnost enzima D1. U kandidatnoj studiji, koja je analizirala čak 68 gena povezanih s koncentracijama hormona štitnjače, Medici i suradnici (2011) također su pokazali značajnu povezanost polimorfizma rs2235544 s fT_4 , a ta povezanost je potvrđena i u meta-analizi cjelogenomske analize povezanosti za hormone TSH i fT_4 u studiji Porcu i suradnika (2013).

Kandidatne studije za gen *DIO2* su se uglavnom usredotočile na dva polimorfizma, rs12885300 i rs225014, smještena u egzonima. Polimorfizam rs225014 je najbolje proučeni polimorfizam *in vitro*, kao i *in vivo*, ali nije povezan s promjenama koncentracije hormona štitnjače, što je pokazano u različitim populacijama zdravih ispitanika, ali i u ispitanika s bolestima štitnjače (Appelhof i sur., 2005; Guerra i sur., 2013; Panicker i sur., 2008b; Peeters i sur., 2005; Peeters i sur., 2003). U kandidatnoj studiji Peetersa i suradnika (2005) polimorfizam rs12885300 (*DIO2*-ORFa-Gly3Asp) je povezan s povećanim omjerom T_3/rT_3 i T_3/T_4 , što sugerira porast aktivnosti enzima D2. Međutim, taj rezultat nije ponovljen u drugim kohortama (de Jong i sur., 2007).

U novije vrijeme cjelogenomske studije su se pokazale uspješnijima u identificiranju genskih varijanti povezanih s funkcijom štitnjače. U velikoj meta-analizi cjelogenomske studije Porcu i suradnika (2013), koja je obuhvatila 26 420 zdravih ispitanika, identificirano je devetnaest genskih lokusa povezanih s koncentracijom hormona TSH, a među 17 520 zdravih ispitanika identificirana su četiri genska lokusa povezana s koncentracijom hormona fT_4 unutar referentnih vrijednosti, i to na cjelogenomskoj razini značajnosti od $P < 5 \times 10^{-8}$. Identificirani genski lokusi povezani s koncentracijom hormona TSH se nalaze blizu ili unutar gena *PDE8B*, *PDE10A*, *CAPZB*, *MAF/LOC440389*, *VEGFA*, *NR3C2*, *IGFBP5*, *NFIA*, *SOX9*, *PRDM11*, *FGF7*, *INSR*, *ABO*, *MIR1179*, *NRG1*, *MBIP*, *ITPK1*, *SASH1* i *GLIS3*, a genski lokusi povezani s koncentracijom hormona fT_4 blizu ili unutar gena *DIO1*, *LHX3*, *FOXE1* i *AADT*. Od navedenih devetnaest genskih lokusa povezanih s TSH, četiri genska lokusa su već otprije identificirana i potvrđena i u drugim cjelogenomskim i kandidatnim studijama, a to su: *PDE8B*, *CAPZB*, *NR3C2* i *MAF/LOC440389* (Arnaud-Lopez i sur., 2008; Medici i sur., 2011; Panicker i sur., 2010; Rawal i sur., 2012), dok je za koncentraciju hormona fT_4 genski lokus *DIO1* potvrđen s istim polimorfizmom (rs2235544) kao i u ranije objavljenim kandidatnim studijama (Medici i sur., 2011; Panicker i sur., 2008b). Međutim, zajednički učinak navedenih genskih polimorfizama objašnjava svega 5,64 % varijacije u koncentraciji TSH, i 2,30 % varijacije u koncentraciji fT_4 .

Cjelogenomska studija, provedena na 1346 ispitanika iz kineske populacije, također je potvrdila prethodno prijavljene genske lokuse povezane s koncentracijom hormona TSH, koji se nalaze u blizini gena *FOXE1* i *CAPZB*, ali su identificirali i novu gensku varijantu povezanu s koncentracijama TSH, koja se nalazi unutar gena *XKR4* (Zhan i sur., 2014). Taylor i suradnici (2015) su otišli korak dalje te su proveli sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole-genome sequencing*, WGS) kako bi ispitali genske varijante povezane s koncentracijama TSH i fT_4 te su u svojim analizama potvrdili jedanaest već prethodno objavljenih genetičkih lokusa povezanih s koncentracijama TSH (*PDE8B*, *PDE10A*, *CAPZB*, *IGFBP2*, *NR3C2*, *VEGFA*, *FOXE1*, *ABO*, *MAF*, *MBIP*) te tri povezana s koncentracijama fT_4 (*DIO1*, *LHX3*, *AADT*). Nadalje, identificirali su i nove genske varijante u genima *SYN2* i *PDE8B* povezane s koncentracijama TSH, a u genu *B4GALT6* genske varijante povezane s koncentracijama fT_4 . Nedavna studija Teumera i suradnika (2018), koja je do danas najveća objavljena cjelogenomska studija za koncentracije hormona TSH i fT_4 , provedena na 72 167 ispitanika europskog podrijetla, otkrila je devetnaest novih genskih lokusa povezanih s koncentracijama TSH (*DIRC3*, *TM4SF4*, *IGF2BP2*, *HES1*, *PSORS1C1*, *SLC25A37*, *SULF1*, *TG*, *C9orf92*, *GATA3*, *PTEN*, *CADM1*, *SPATA13*, *TSHR*, *ADCY9*, *MIR365A*, *NSF*, *BCAS3*, *PRKX*) i šesnaest novih lokusa povezanih s koncentracijama fT_4 (*ACMSD*, *SOX2-OT*, *ID4*, *SLC17A4*, *LOC728012*, *CA8*, *GLIS3*, *NEK6*, *FNBP4*, *SLCO1B1*, *DIO2*, *DIO3OS*, *USP3*, *SNX29*, *NCOR1*, *MC4R*). Zajednički učinak navedenih genskih polimorfizama objašnjava 33 % varijacije u razini TSH, i 21 % varijacije u razini fT_4 . Neki od novo identificiranih lokusa uključuju i gene koji su prethodno bili uključeni u razvoj štitnjače (*GLIS3*), djelovanje i transport hormona štitnjače (*NCOR1*, *TTR*, *SLCO1B1*), metabolizam hormona štitnjače (*DIO2*, *DIO3OS*) i karcinom štitnjače (npr. *HES1*, *SPATA13*, *DIRC3*, *ID4*), te je pronađeno više neovisnih genskih varijanti u genima *PDE8B*, *DIO1*, *DIO2*, *TSHR* i *CAPZB*. U okviru naše istraživačke grupe, provedena je cjelogenomska analiza povezanosti s koncentracijama hormona TSH te fT_4 i fT_3 na 1731 ispitaniku u hrvatskoj populaciji, u kojoj je identificirana genska varijanta unutar gena *EPHB2* povezana s koncentracijom hormona fT_3 koja je dosegla cjelogenomsku razinu značajnosti, te je identificiran novi genski lokus povezan s koncentracijama TSH, koji se nalazi uzvodno od gena *PTPNI* (Popovic i sur., 2019).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cjelogenomskim analizama povezanosti je identificirano nekoliko desetina genskih varijanti povezanih s koncentracijama hormona štitnjače – TSH te fT₄ i fT₃. Do danas, nije provedena niti jedna cjelogenomska analiza povezanosti za ukupne koncentracije hormona štitnjače T₄ i T₃. Ciljevi ove doktorske disertacije su sljedeći:

1. meta-analizom cjelogenomskih analiza povezanosti odrediti genske varijante povezane s ukupnom koncentracijom hormona T₄ u općoj populaciji ispitanika s područja grada Splita i otoka Korčule
2. cjelogenomskim analizama povezanosti odrediti genske varijante povezane s ukupnom koncentracijom hormona T₃ u općoj populaciji ispitanika s područja grada Splita
3. cjelogenomskim analizama povezanosti odrediti genske varijante povezane s omjerom hormona T₃/T₄ u općoj populaciji ispitanika s područja grada Splita
4. usporediti rezultate ovog istraživanja s rezultatima prethodno objavljenih cjelogenomskih analiza povezanih s fenotipom slobodnih hormona štitnjače, provedenim u drugim populacijama.

Navedenim analizama nadopunit će se postojeće znanje o genetičkoj pozadini funkcije štitne žlijezde te doprinijeti boljem razumijevanju bioloških putova povezanih s funkcijom štitnjače.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Ispitanici u ovom istraživanju uključeni su u okviru projekta „10 001 Dalmatinac - Hrvatska biobanka“, u kojem su prikupljeni i pohranjeni biološki uzorci ispitanika te stvorena opsežna baza genotipskih i fenotipskih podataka. Projekt se provodi od 1999. godine, a uspostavljen je s ciljem stvaranja registara zdravih ispitanika i pacijenata sa specifičnim bolestima i stanjima, i to prikupljanjem reprezentativnog uzorka, provođenjem međunarodno standardiziranih zdravstvenih anketa, mjerenjem različitih biokemijskih parametara, a sve u svrhu istraživanja genetičkih i okolišnih odrednica zdravlja i bolesti u hrvatskoj populaciji, s posebnim interesom na izolirane otočne populacije, koje se smatraju prikladnima za istraživanja zbog njihove smanjene genetičke i okolišne raznolikosti (Rudan i sur., 2009).

Ispitanici uključeni u ovo istraživanje potječu iz dviju populacija, s područja grada Splita (kohorta Split) i otoka Korčule (kohorta Korčula). Istraživanja na otoku Korčuli provedena su 2007. godine, a sudjelovalo je 969 ispitanika, u dobi od 18 do 98 godina, iz grada Korčule i mjesta Lumbarda, Račišće i Žrnovo. Istraživanja u gradu Splitu provedena su od 2008. do 2009. godine, a sudjelovalo je 1012 ispitanika koji pripadaju općoj populaciji, u dobi od 18 do 85 godina. Ispitanici su dobrovoljno sudjelovali u istraživanju nakon obavještanja putem sredstava javnog informiranja (radijske emisije, poster, novine, plakati, poštanski pozivi) u kojem su bili upoznati s ciljevima i detaljnim informacijama o samom istraživanju. Od ispitanika su sakupljeni uzorci krvi, te su nakon obrade serum i plazma pohranjeni na temperaturi od -80°C i korišteni za različita biokemijska mjerenja. Ispitanici su ispunili i nekoliko anketnih upitnika, te su provedena razna antropometrijska mjerenja, kao i mnoga fiziološka ispitivanja. Prije uključivanja u istraživanje svi ispitanici su potpisali informirani pristanak odobren od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa: 003-08/11-03/0005, ur. br: 2181-198-03-04/10-11-0008). Kako bi u ovo istraživanje bili uključeni isključivo zdravi ispitanici koji nemaju bolesti štitnjače, iz kohorti Split i Korčula isključeni su ispitanici koji su primali terapiju zbog bolesti štitnjače, ispitanici koji su operirali štitnjaču, ispitanici koji su imali pozitivna protutijela štitnjače ($\text{TgAt} > 100 \text{ IU/mL}$, $\text{TPOAt} > 16 \text{ IU/mL}$) te oni koji su imali koncentracije hormona štitnjače u krvi (T_3 , T_4 , TSH , fT_3 i fT_4) izvan referentnih vrijednosti (T_3 : 1.3 - 3.6 nmol/L, T_4 : 57 - 161 nmol/L, TSH : 0.3 - 3.6 mIU/L, fT_3 : 3.3 - 6.47 pmol/L i fT_4 : 10.29-21.88 pmol/L). U konačnici, u ovo istraživanje je bilo uključeno 498 ispitanika iz kohorte Korčula i 623 ispitanika iz kohorte Split.

3.2. Fenotipska svojstva

Za određivanje fenotipskih svojstava ispitanika, a u svrhu ovog istraživanja, izmjerene su ukupne koncentracije hormona T₄ i T₃ u serumu ispitanika. Serum za analizu dobiven je iz uzorka periferne krvi ispitanika. Nakon centrifugiranja, serum je pohranjen na -80°C, a supernatant s leukocitima je odmah korišten za izolaciju DNK. Koncentracije hormona T₄ i T₃ u serumu ispitanika određene su kemiluminiscentnom metodom (Hubl i sur., 2000) uz pomoć komercijalnog kompleta koristeći potpuno automatizirani instrument "Liaison Biomedica Chemiluminescence Analyzer", u Laboratoriju za biokemiju, na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu u Kliničkom bolničkom centru Split. Koncentracija hormona T₄ izmjerena je ispitanicima u kohortama Split i Korčula, a koncentracija hormona T₃ samo ispitanicima u kohorti Split (N=577). Ispitanicima za koje su bile dostupne izmjerene koncentracije oba hormona, izračunat je omjer T₃/T₄ (N=571).

3.3. Izolacija DNK

DNK ispitanika izolirana je u Laboratoriju Katedre za medicinsku biologiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, korištenjem komercijalnog kompleta Illustra Nucleon BACC 3 Genomic DNA Extraction Kit (GE Health Care – Life Sciences, New Jersey, USA) prema protokolu proizvođača (https://uk.vwr.com/assetsvc/asset/en_GB/id/17889994/contents).

3.4. Genotipizacija i imputacija

Nakon izolacije, DNK ispitanika je poslana na genotipizaciju u Medical Research Council, Human Genetic Unit, Edinburgh, Velika Britanija. Genotipizacija ispitanika provedena je korištenjem komercijalnih genotipizacijskih platformi tvrtke Illumina. Genotipizacija ispitanika s područja grada Splita je provedena na dvije genotipizacijske platforme, pa su 531 ispitanik iz Splita i svi ispitanici s otoka Korčule, genotipizirani korištenjem HumanCNV370-Duo BeadChip genotipizacijske platforme koja sadrži oko 350 000 genskih polimorfizama, a preostali dio ispitanika s područja grada Splita, njih 481, je genotipiziran korištenjem HumanOmniExpress BeadChip platforme koja sadrži oko 969 000 genskih polimorfizama.

Nakon genotipizacije, provedena je kontrola kvalitete uzoraka i dobivenih genotipova. Standardni set filtera koji se koristi za filtriranje genskih polimorfizama uključuje: uspješnost genotipiziranja, odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže¹ (H-W) i učestalost rjeđeg alela (engl. *minor allele frequency*, MAF), pa su sukladno tome iz analize isključeni genski polimorfizmi čiji je postotak uspješnosti genotipiziranja bio manji od 98 %, genski polimorfizmi koji nisu bili u H-W ravnoteži ($p < 10^{-7}$), te genski polimorfizmi čija je frekvencija rjeđeg alela bila manja od 1 %. Iz daljnje analize su isključeni i ispitanici čiji je postotak uspješnosti genotipiziranja bio manji od 97 %.

Kako bi se povećao ukupni broj genskih polimorfizama za analizu, a time i snaga cjelogenomske studije, napravljena je imputacija genotipova. Imputacija je također provedena na Sveučilištu u Edinburghu na Odjelu za humanu genetiku, korištenjem računalnog programa IMPUTE 2 (Howie i sur., 2009), kojim se izračunavaju vjerojatnosti genotipova polimorfizama koji nisu direktno genotipizirani, koristeći javno dostupne referentne panele haplotipova poput „1000 Genoma“ (engl. „*1000 Genomes project*“). Kako je genotipizacija ispitanika s područja grada Splita provedena na dvije različite genotipizacijske platforme, tako su i podaci imputirani u dva navrata. Dio ispitanika kohorte Split (Split 2) imputiran je prema referentnom panelu „1000 Genoma“ i pretvoren u referentni panel koristeći računalni program SNPTEST (Marchini i sur., 2010), te je uz referentni panel „1000 Genoma“ poslužio za imputaciju preostalog dijela ispitanika kohorte Split (Split 1). Svi ispitanici s otoka Korčule imputirani su prema referentnom panelu „1000 Genoma“. Kao i kod genotipizacije, nakon završetka imputacije, provedena je kontrola kvalitete imputiranih podataka koristeći standardni set filtera, pa su iz analize izbačeni genski polimorfizmi čija je frekvencija rjeđeg alela bila manja od 0.01 i genski polimorfizmi koji nisu bili u H-W ravnoteži ($p < 10^{-7}$). Računalni program SNPTEST sadrži i mjerne podatke za procjenu kvalitete imputacije (tzv. *info score*) koja leži u rasponu od 0 do 1. Ako polimorfizam ima nisku kvalitetu imputacije, odnosno nizak *info score*, nije pogodan za daljnju analizu pa su genski polimorfizmi čiji je *info score* bio manji od 0.4 izbačeni iz analize.

¹ H-W ravnoteža - frekvencije alela se neće mijenjati iz generacije u generaciju ako u populaciji nema mutacija, migracija, genetičkog pomaka i prirodne selekcije. Odstupanje od HW ravnoteže kod zdravih ispitanika može značiti da je došlo do nepravilnosti prilikom genotipiziranja, a može upozoriti i na postojanje populacijske stratifikacije.

3.5. Računalne analize

3.5.1. Računalni program R

Sve analize u ovom istraživanju provedene su korištenjem računalnog programa R (version 3.3.1) te dostupnih paketa R (Team, 2017). R je programski sustav za upravljanje podacima, za numeričku i grafičku analizu istih, koji pripada grupi alata otvorenog kôda (engl. „*open-source*“), što znači da se može slobodno koristiti i distribuirati. Dostupan je putem interneta na adresi <https://cran.r-project.org/> te radi na različitim platformama kao što su UNIX, Windows i MacOS, te pruža širok izbor metoda za analizu podataka uključujući statističke testove, linearno i nelinearno modeliranje i analize vremenskih serija, odnosno klasteriranje. Naprednije grafičke i numeričke analize zahtijevaju procedure sadržane u paketima (engl. *packages*), skupovima generičkih funkcija koji nude najsuvremenije mogućnosti za obradu podataka. Paketi su također slobodno dostupni na internetu i integrirani izravno sa sustavom R (Team, 2017).

3.5.2. Cjelogenomske analize povezanosti

Cjelogenomske analize povezanosti provedene su za svaki hormon odnosno omjer zasebno. Kolmogorov-Smirnovljevim testom utvrđeno je da razine hormona nisu normalno distribuirane stoga je korištena rang-transformacija za postizanje normalne distribucije podataka. Metodom linearne regresije, razine hormona T_4 , T_3 i omjera T_3/T_4 , su prvo prilagođene za utjecaj dobi, spola i BMI (engl. *body-mass index*), s obzirom na to da te varijable utječu na koncentracije istraživanih hormona. Cjelogenomska analiza povezanosti provedena je korištenjem linearnog mješovitog modela (engl. *linear mixed model*), pomoću kojeg se u analizi uzima u obzir i prilagodba za srodstvo ispitanika, kao i moguća populacijska stratifikacija unutar uzorka. Korišten je aditivni genetički model koji pretpostavlja da postoji ujednačeno, linearno povećanje rizika za svaku kopiju alela. Cjelogenomska analiza povezanosti za kohortu Split provedena je pomoću računalnog programa 'SNPTEST' (Marchini i sur., 2010), a za kohortu Korčula pomoću računalnih programa 'GenABEL' (Karssen i sur., 2016) i 'VariABEL' (Struchalin i sur., 2012), oba implementirana u program R.

3.5.3. Meta-analiza

Rezultati pojedinačnih cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T₄ kohorti Split i Korčula su kombinirani i objedinjeni meta-analizom, primjenom metode inverzne varijance sa stalnim učinkom, koristeći računalni program R. Meta-analizom povećava se snaga studije te se umanjuje mogućnost dobivanja lažno pozitivnih rezultata. Za procjenu heterogenosti između veličina učinaka iz pojedinih kohorti korištena je statistika I^2 koja može poprimiti vrijednosti od 0 % do 100 %. Ako se heterogenost uoči, za meta-analizu koristi se model slučajnih učinaka (engl. *random model*), u suprotnom se koristi model stalnih učinaka (engl. *fixed model*). S obzirom na to da heterogenost nije uočena ($HetI^2 = 0.0$ %), nije bilo potrebe provoditi meta-analizu sa slučajnim učinkom.

3.5.4. Razina značajnosti

U cjelogenomskim analizama povezanosti testira se nekoliko milijuna polimorfizama, stoga je potrebno prilagoditi granicu značajnosti za višestruka testiranja. Razina statističke značajnosti za cjelogenomske analize povezanosti određena je na temelju Bonferronijeve korekcije, gdje je vrijednost α od 0,05 prilagođena na $\alpha = (0,05/n)$, a n je broj provedenih testiranja (ukupan broj polimorfizama), te je cjelogenomska značajnost određena na razini $P < 5 \times 10^{-8}$. U ovom istraživanju smo za sugestivnu značajnost koristili P-vrijednosti između 5×10^{-8} i 5×10^{-6} .

3.5.5. Grafički prikaz rezultata

Nakon provedenih cjelogenomskih analiza za svaki hormon pojedinačno, kao i nakon meta-analize, rezultati su grafički prikazani Manhattan grafom (engl. *Manhattan plot*) i kvantil-kvantil grafom (engl. *quantile-quantile plot*, Q-Q plot), pomoću paketa "qqman" iz programa R. Manhattan graf je prikaz svih polimorfizma uključenih u cjelogenomsku analizu, u skladu s njihovim položajem na svakom kromosomu u odnosu na negativni logaritam P-vrijednosti te se polimorfizmi s najznačajnijom povezanošću (najnižom P-vrijednosti) ističu na grafu. Kvantil-kvantil graf prikazuje očekivanu distribuciju P-vrijednosti u odnosu na dobivene P-vrijednosti. Faktor genomske inflacije (engl. *genomic inflation factor*, λ) je omjer medijana dobivene i očekivane distribucije P-vrijednosti. Ako je λ znatno veća od jedan, postoji veća vjerojatnost lažno pozitivnih rezultata. *LocusZoom* (dostupan na adresi <http://locuszoom.sph.umich.edu/>) je računalni program za vizualizaciju rezultata koji su dobiveni cjelogenomskim analizama povezanosti, a koristi informacije o LD strukturi genoma koristeći referentne panele haplotipova

HapMap faza II i „1000 Genoma“ (Pruim i sur., 2010). Regionalni grafovi povezanosti (engl. *regional association plot*) za identificirane genske polimorfizme napravljeni su korištenjem računalnog programa *LocusZoom*.

3.5.6. Bioinformatičke baze podataka

Bioinformatičke baze podataka i genomski preglednici *UCSC* i *Ensembl* korišteni su za identifikaciju gena u regijama gdje su identificirani značajniji genski polimorfizmi. Genomski preglednik *UCSC Genome Browser* (dostupan na adresi <http://genome.ucsc.edu/>) sadrži genomske podatke različitih organizama i informacije o svim genima, lokacijama gena na kromosomu, genskim varijantama, ekspresiji gena, kao i informacije o povezanosti gena, odnosno genskih varijanti, s različitim bolestima (Kent i sur., 2002). Baza podataka *Ensembl* (dostupna na adresi <http://www.ensembl.org/>) je zajednički projekt instituta Welcome Trust Sanger i EMBL-EBI, sa svrhom anotacije niza eukariotskih genoma te daje detaljan opis gena i genomskih regija. *Ensembl* sadrži i informacije o transkriptima gena, genskim varijantama, homologiji sekvenci, regulatornim elementima i proteinskim domenama (Yates i sur., 2015).

Za interpretaciju mogućih funkcionalnih učinaka genskih varijanti korištene su baze podataka *ENCODE*, *VEP* i *GTEx*. Baza podataka *ENCODE* (dostupna na adresi <https://www.encodeproject.org/>) je javni istraživački konzorcij kojeg je uspostavio Nacionalni institut za istraživanje ljudskog genoma (NHGRI), a obuhvaća popis funkcionalnih elemenata u genomu čovjeka, uključujući elemente koji djeluju na razini proteina, ribonukleinske kiseline (RNK) i regulatorne elemente. U sklopu projekta *ENCODE* provedeno je mapiranje brojnih epigenetičkih oznaka, uz istovremenu kvantifikaciju transkripcijske aktivnosti na razini cijelog genoma. *VEP* (dostupan na adresi <https://www.ensembl.org/Tools/VEP>) je *Ensembl*ov računalni program kojim se također određuje funkcionalni učinak varijanti na transkripte i proteinske sekvence, kao i na regulatorne regije. Za identifikaciju genskih varijanti koje objašnjavaju varijaciju na razini ekspresije gena korištena je baza podataka *GTEx* (dostupna na adresi <https://gtexportal.org/home/>). *GTEx* je sveobuhvatni javni resurs za proučavanje tkivne ekspresije i regulacije gena, a omogućuje proučavanje ekspresije kvantitativnih obilježja lokusa (engl. *expression quantitative trait loci*, eQTL), odnosno analizu varijanti ekspresije gena izmjerenih u stanicama i tkivima.

4. REZULTATI

Nakon primjene kriterija isključenja opisanih u prethodnom poglavlju, broj ispitanika uključenih u ovo istraživanje je 623 ispitanika iz kohorte Split i 498 ispitanika iz kohorte Korčula, dakle ukupno 1121 ispitanik. Od 623 ispitanika u kohorti Split, njih 347 (56 %) su žene, a 276 (44 %) muškarci. Prosječna dob ispitanika je 52 godine. U kohorti Korčula od 498 ispitanika, 306 (61 %) čine žene, a 192 (39 %) su muškarci, s prosječnom dobi od 56 godina. Deskriptivna statistika za fenotipska svojstva ispitanika odnosno za hormone T_4 , T_3 i omjer T_3/T_4 , napravljena je koristeći računalni program R, i prikazana je u Tablici 4.1. Zbog odstupanja od normalne distribucije, za prikaz varijabli korišten je medijan i interkvartilni raspon. Medijan koncentracije hormona T_4 (s interkvartilnim rasponom) iznosi 115 (99.2, 123) nmol/L u kohorti Split, te 92 (81.9, 112) nmol/L u kohorti Korčula. U cjelogenomskoj analizi povezanosti za hormon T_3 uključeno je ukupno 577 ispitanika, i to 312 žena (54 %) i 265 (46 %) muškaraca, prosječne dobi od 52 godine. Medijan koncentracije hormona T_3 (s interkvartilnim rasponom) u kohorti Split iznosi 1.7 (1.5, 1.9) nmol/L. U cjelogenomskoj analizi povezanosti za omjer T_3/T_4 sudjelovao je ukupno 571 ispitanik, od toga 311 žena (54 %) i 260 muškaraca (46 %), prosječne dobi od 52 godine. Medijan omjera T_3/T_4 je 0.015 (0.014, 0.018).

Tablica 4.1. Deskriptivna statistika ispitanika u kohortama Split i Korčula za sva tri fenotipa

Fenotip	Split	Korčula
T₄		
N	623	498
Žene, N (%)	347 (56 %)	306 (61 %)
Medijan dobi (qL, qU)	52 (39, 61)	56 (46, 67)
Medijan BMI, kg/m ² (qL, qU)	26.85 (23.9, 29.9)	27.6 (25.0, 30.5)
Medijan T ₄ , nmol/L (qL, qU)	115 (99.2, 123)	92 (81.9, 112)
T₃		
N	577	
Žene, N (%)	312 (54 %)	
Medijan dobi (qL, qU)	52 (39, 61)	
Medijan BMI, kg/m ² (qL, qU)	26.82 (24, 29.87)	
Medijan T ₃ , nmol/L (qL, qU)	1.7 (1.5, 1.9)	
T₃/T₄		
N	571	
Žene, N (%)	311 (54 %)	
Medijan dobi (qL, qU)	52 (39, 61)	
Medijan BMI, kg/m ² (qL, qU)	26.78 (24, 29.86)	
Medijan T ₃ /T ₄ (qL, qU)	0.015 (0.014, 0.018)	

N – broj ispitanika, qL- donji kvartil, qU-gornji kvartil

4.1. Rezultati cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T₄

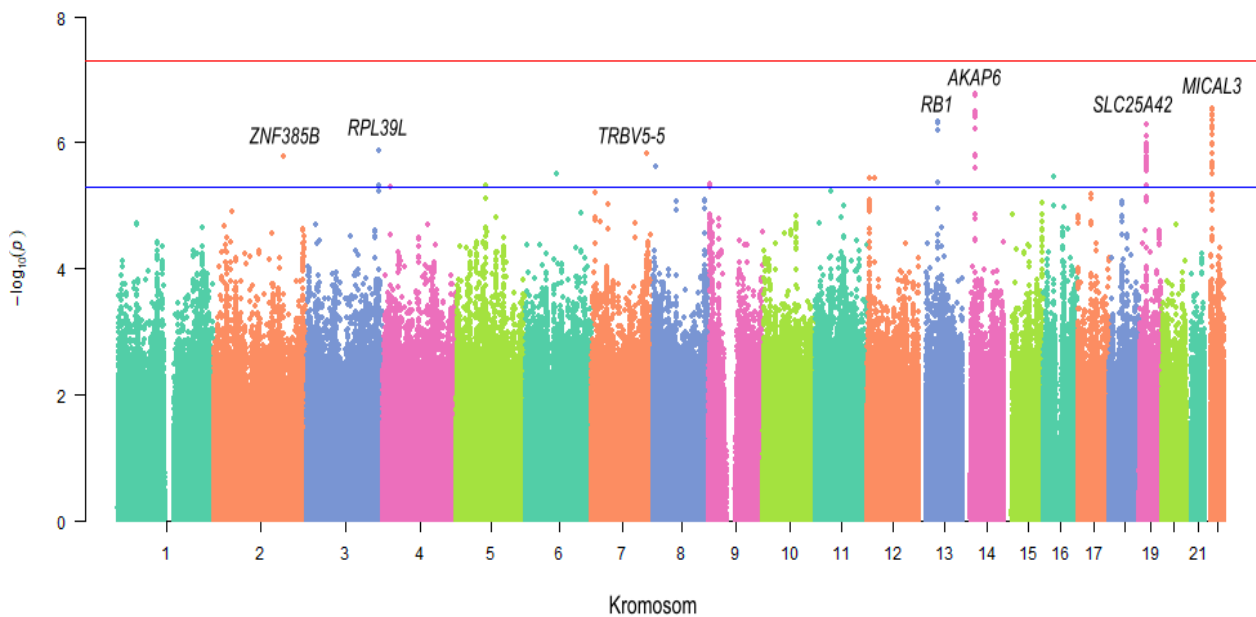
4.1.1. Kohorta Korčula

Nakon provedene cjelogenomske analize povezanosti za hormon T₄ u kohorti Korčula, niti jedan polimorfizam nije dosegao cjelogenomsku razinu značajnosti ($P < 5 \times 10^{-8}$). Dvanaest polimorfizama je pokazalo sugestivnu značajnost i to polimorfizmi: rs10144948 u genu *AKAP6* na 14. kromosomu, rs388415 u genu *MICAL3* na 22. kromosomu, rs150597735 u genu *RBI* na 13. kromosomu, rs4808184 u genu *SLC25A42* na 19. kromosomu, rs7627911 u genu *RPL39L* na 3. kromosomu, rs6943525 blizu gena *TRBV5-5* na 7. kromosomu, rs1515310 u *ZNF385B* genu na 2. kromosomu, rs4840920 koji se nalazi u intergenskoj regiji na 8. kromosomu, rs146617292 u genu *GSGIL* na 16. kromosomu, rs148741293 u genu *RERGL* na 12. kromosomu, rs1854944 u genu *FLJ35024* na 9. kromosomu, i rs11959011 u genu *WDR41* na 5. kromosomu. Većina identificiranih varijanti su intronske varijante. Svi rezultati sa sugestivnom značajnošću ($P < 5 \times 10^{-6}$) su prikazani u Tablici 4.2. Grafički prikaz rezultata je na Slici 4.1. Faktor genomske inflacije za cjelogenomsku analizu povezanosti za hormon T₄ u kohorti Korčula iznosi $\lambda = 0.99$ što upućuje na nepostojanje genomske inflacije (Slika 4.2.)

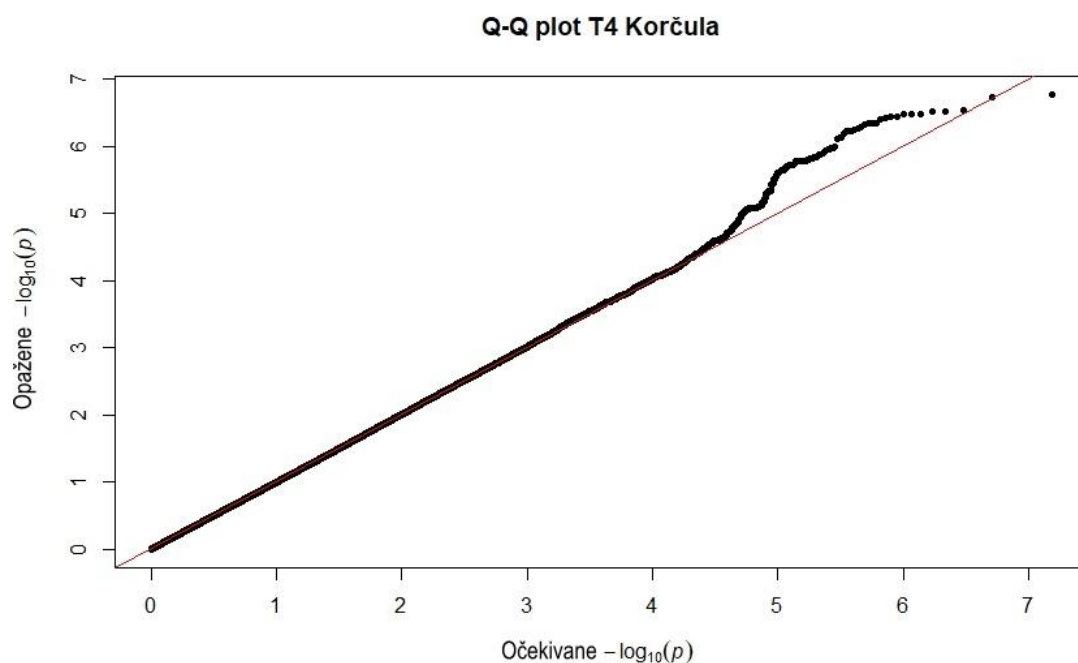
Tablica 4.2. Rezultati cjelogenomske analize povezanosti za hormon T₄ u kohorti Korčula koji su dosegli sugestivnu značajnost ($P < 5 \times 10^{-6}$)

SNP	Kr.	Pozicija	Gen	Varijanta	A1/A0	MAF	β	SE	P
rs10144948	14	33041374	<i>AKAP6</i>	intron	G/A	0.141	0.51	0.10	1.71×10^{-7}
rs388415	22	18294211	<i>MICAL3</i>	intron	C/T	0.375	-0.40	0.08	2.91×10^{-7}
rs150597735	13	48885869	<i>RBI</i>	intron	T/G	0.036	-1.01	0.20	4.63×10^{-7}
rs4808184	19	19217727	<i>SLC25A42</i>	intron	A/G	0.16	0.46	0.09	5.18×10^{-7}
rs7627911	3	186893025	<i>RPL39L</i>	intron	T/C	0.161	-0.45	0.09	1.34×10^{-6}
rs6943525	7	142147218	<i>TRBV5-5</i>	uzvodno od gena	A/T	0.257	-0.42	0.08	1.53×10^{-6}
rs1515310	2	180446786	<i>ZNF385B</i>	intron	T/G	0.369	-0.34	0.07	1.70×10^{-6}
rs4840920	8	6241606	-	intergenska	C/G	0.195	-0.43	0.09	2.39×10^{-6}
rs146617292	16	27958897	<i>GSGIL</i>	intron	G/A	0.199	-0.42	0.09	3.47×10^{-6}
rs148741293	12	18348647	<i>RERGL</i>	intron	G/T	0.039	0.92	0.20	3.62×10^{-6}
rs1854944	9	2436508	<i>FLJ35024</i>	intron	G/A	0.42	-0.31	0.07	4.54×10^{-6}
rs11959011	5	76803148	<i>WDR41</i>	intron	C/T	0.051	-0.80	0.17	4.68×10^{-6}

Kr-kromosom, A1-efektni alel, A0-drugi alel, MAF-frekvencija rjeđeg alela (engl. *minor allele frequency*), β -veličina efekta polimorfizma, SE-standardna pogreška (engl. *standard error*)



Slika 4.1. Manhattan graf cjelogenomske analize povezanosti za hormon T_4 u kohorti Korčula. Crvena linija predstavlja cjelogenomsku granicu značajnosti ($P < 5 \times 10^{-8}$), dok plava linija predstavlja granicu sugestivne značajnosti ($P < 5 \times 10^{-6}$). Na osi x su prikazani svi SNP-ovi uključeni u cjelogenomsku analizu, u skladu s njihovim položajem na svakom kromosomu, u odnosu na negativni logaritam P - vrijednosti na osi y. SNP-ovi s najznačajnijim asocijacijama (najnižom P - vrijednosti) ističu se na grafu.



Slika 4.2. Q-Q graf cjelogenomske analize povezanosti hormona T_4 u kohorti Korčula koji prikazuje odnos očekivanih i dobivenih P-vrijednosti.

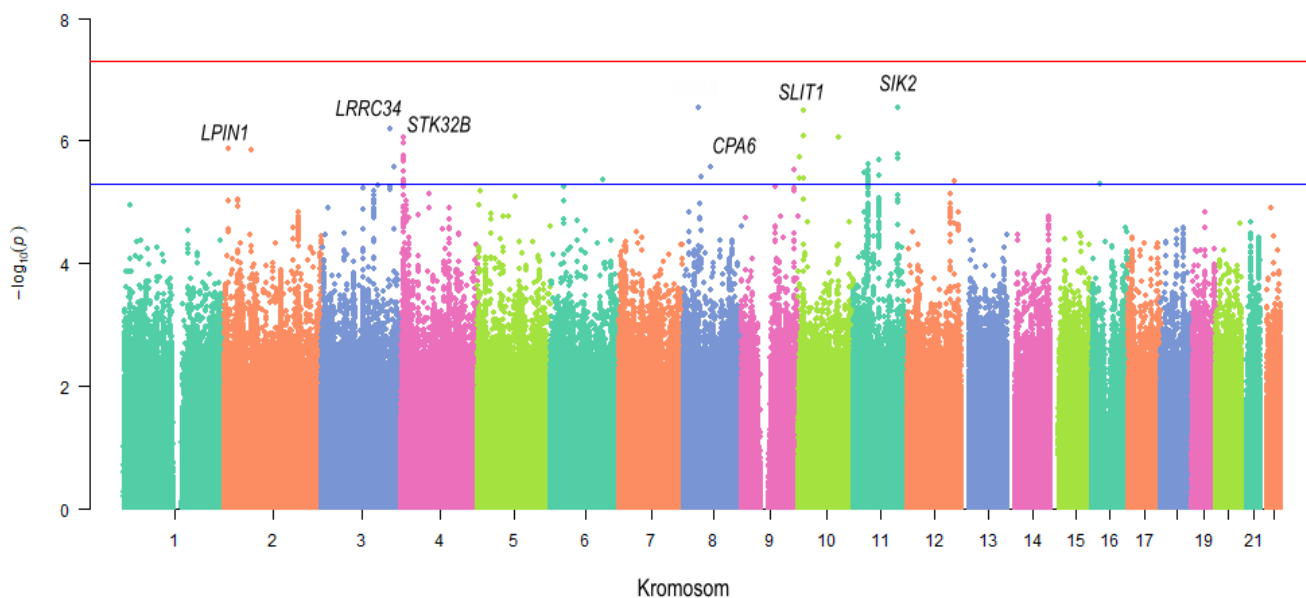
4.1.2. Kohorta Split

U cjelogenomskoj analizi povezanosti za hormon T₄ u kohorti Split također niti jedan genski polimorfizam nije dosegao cjelogenomsku granicu značajnosti ($P < 5 \times 10^{-8}$), ali je identificirano nekoliko sugestivno značajnih polimorfizama ($P < 5 \times 10^{-6}$). Polimorfizmi - rs55635531 koji se nalazi u blizini gena *RNF5P1* na 8. kromosomu, rs117510992 u genu *SIK2* na 11. kromosomu, rs10795909 blizu gena *UPF2* na 10. kromosomu, rs35221505 u genu *LRRC34* na 3. kromosomu, rs6817527 u genu *STK32B* na 4. kromosomu i rs148428310 u genu *SLIT1* na 10. kromosomu - dosegli su razinu značajnosti od $P < 5 \times 10^{-7}$. U Tablici 4.3. prikazani su svi rezultati cjelogenomske analize u kohorti Split koji su dosegli sugestivnu značajnost. Rezultati cjelogenomske analize za hormon T₄ u kohorti Split grafički su prikazani na Slici 4.3. Faktor genomske inflacije za cjelogenomsku analizu povezanosti za hormon T₄ u kohorti Split iznosi $\lambda = 1.0$ (Slika 4.4).

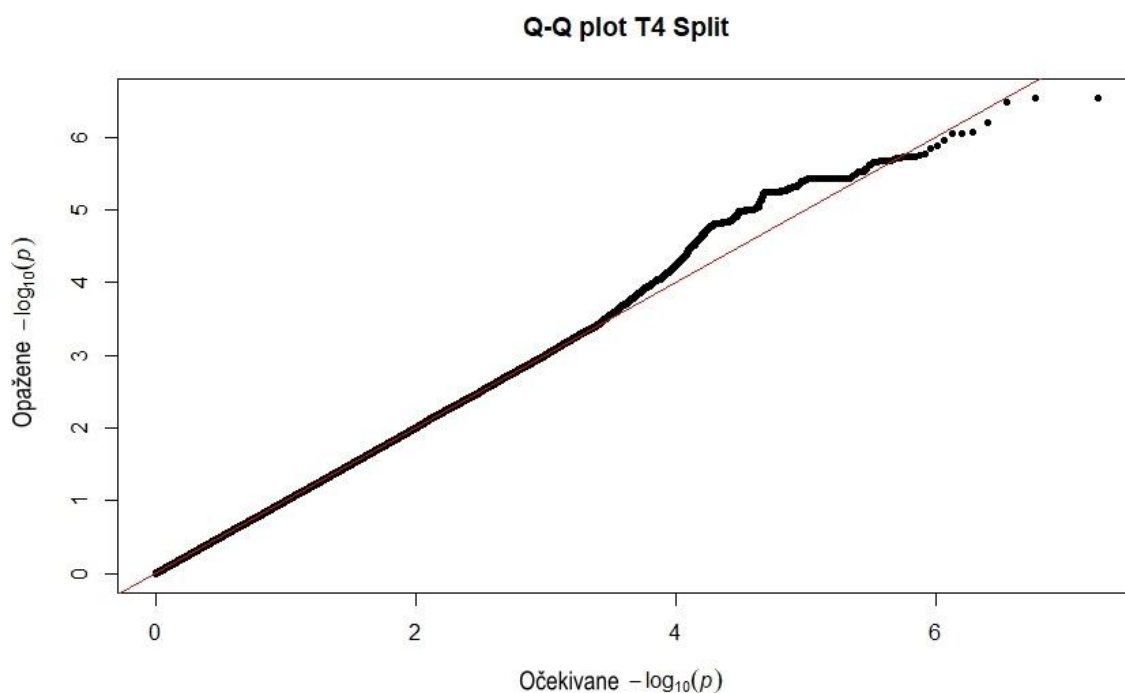
Tablica 4.3. Rezultati cjelogenomske analize povezanosti za hormon T₄ u kohorti Split koji su dosegli sugestivnu značajnost ($P < 5 \times 10^{-6}$)

SNP	Kr.	Pozicija	Gen	Varijanta	A1/A0	MAF	β	SE	P
rs55635531	8	38434523	blizu <i>RNF5P1</i>	intergenska	A/G	0.018	1.17	0.23	2.92×10^{-7}
rs117510992	11	111542688	<i>SIK2</i>	intron	A/G	0.058	0.70	0.14	2.94×10^{-7}
rs10795909	10	11949902	blizu <i>UPF2</i>	intergenska	T/C	0.467	-0.29	0.06	3.25×10^{-7}
rs35221505	3	169523028	<i>LRRC34</i>	intron	A/G	0.022	1.03	0.21	6.41×10^{-7}
rs6817527	4	5346185	<i>STK32B</i>	intron	C/T	0.178	0.38	0.08	8.91×10^{-7}
rs148428310	10	98861221	<i>SLIT1</i>	intron	G/A	0.015	-1.28	0.26	9.02×10^{-7}
rs6729430	2	11934756	<i>LPIN1</i>	intron	T/C	0.017	1.35	0.28	1.33×10^{-6}
rs56061611	2	68032115	<i>LINC01812</i>	intron	C/G	0.089	0.58	0.12	1.43×10^{-6}
rs10903963	10	3139701	<i>PFKP</i>	intron	C/T	0.067	-0.60	0.12	1.82×10^{-6}
rs147068102	11	63188901	blizu <i>SLC22A9</i>	intergenska	A/C	0.027	-0.88	0.19	2.08×10^{-6}
rs192740101	8	68505728	<i>CPA6</i>	intron	C/T	0.014	-1.49	0.32	2.70×10^{-6}
rs76849828	9	129065257	blizu <i>LOC101929116</i>	intergenska	T/G	0.045	0.65	0.14	2.97×10^{-6}
rs73586894	6	129183383	blizu <i>LAMA2</i>	intergenska	A/G	0.055	0.60	0.13	4.43×10^{-6}
rs35354721	12	118299899	<i>KSR2</i>	intron	C/T	0.087	0.47	0.10	4.58×10^{-6}
rs186667740	16	20927053	<i>LYRM1</i>	intron	C/T	0.109	0.53	0.12	4.94×10^{-6}

Kr-kromosom, A1-efektni alel, A0-drugi alel, MAF-frekvencija rjeđeg alela (engl. *minor allele frequency*), β -veličina efekta polimorfizma, SE-standardna pogreška



Slika 4.3. Manhattan graf cjelogenomske analize za hormon T_4 u kohorti Split. Crvena linija predstavlja cjelogenomsku granicu značajnosti ($P < 5 \times 10^{-8}$), dok plava linija predstavlja granicu sugestivne značajnosti ($P < 5 \times 10^{-6}$). Na osi x su prikazani svi SNP-ovi uključeni u cjelogenomsku analizu, u skladu s njihovim položajem na svakom kromosomu, u odnosu na negativni logaritam P-vrijednosti na osi y. SNP-ovi s najznačajnijim asocijacijama (najnižom P-vrijednosti) ističu se na grafu.



Slika 4.4. Q-Q graf cjelogenomske analize povezanosti za hormon T_4 u kohorti Split.

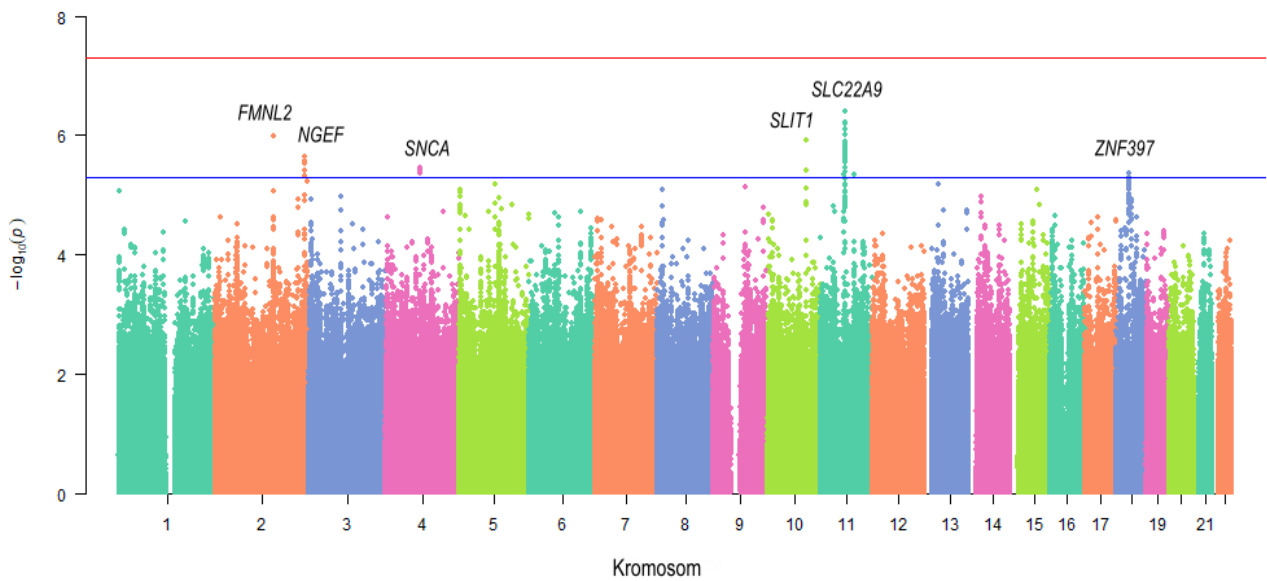
4.2. Rezultati meta-analize

Rezultati pojedinačnih cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T₄ kohorti Split i Korčula su objedinjeni meta-analizom. U meta-analizi cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T₄ ukupno je sudjelovao 1121 ispitanik - 623 ispitanika kohorte Split i 498 ispitanika kohorte Korčula (Tablica 4.1.). U Tablici 4.4. su prikazani svi rezultati meta-analize za hormon T₄ kohorti Split i Korčula, koji su dosegli sugestivnu razinu značajnosti od $P < 5 \times 10^{-6}$, a na Slici 4.5. je grafički prikaz rezultata meta-analize. Najmanju P-vrijednost ima polimorfizam rs12282281 ($P = 4.00 \times 10^{-7}$, $\beta = -0.88$, $SE = 0.17$, $MAF = 0.018$, za alel G) koji se nalazi na 11. kromosomu unutar gena *SLC22A9*. Regionalni graf povezanosti za taj polimorfizam prikazan je na Slici 4.7. Osim navedenog polimorfizma, polimorfizmi: rs6756332 u genu *FMNL2* na 2. kromosomu, rs148428310 u genu *SLIT1* na 10. kromosomu, rs4973585 u genu *NGEF* na 2. kromosomu, rs189994040 u genu *SNCA* na 4. kromosomu i rs73426512 u genu *ZNF397* na 18. kromosomu, dosegli su sugestivnu značajnost na razini od $P < 5 \times 10^{-6}$ (Tablica 4.4.). Sve navedene varijante su intronske varijante. Pouzdanost rezultata ispitana je faktorom genomske inflacije koji za meta-analizu iznosi $\lambda = 1.0$, što ne ukazuje na povećanu vjerojatnost lažno pozitivnih rezultata (Slika 4.6.).

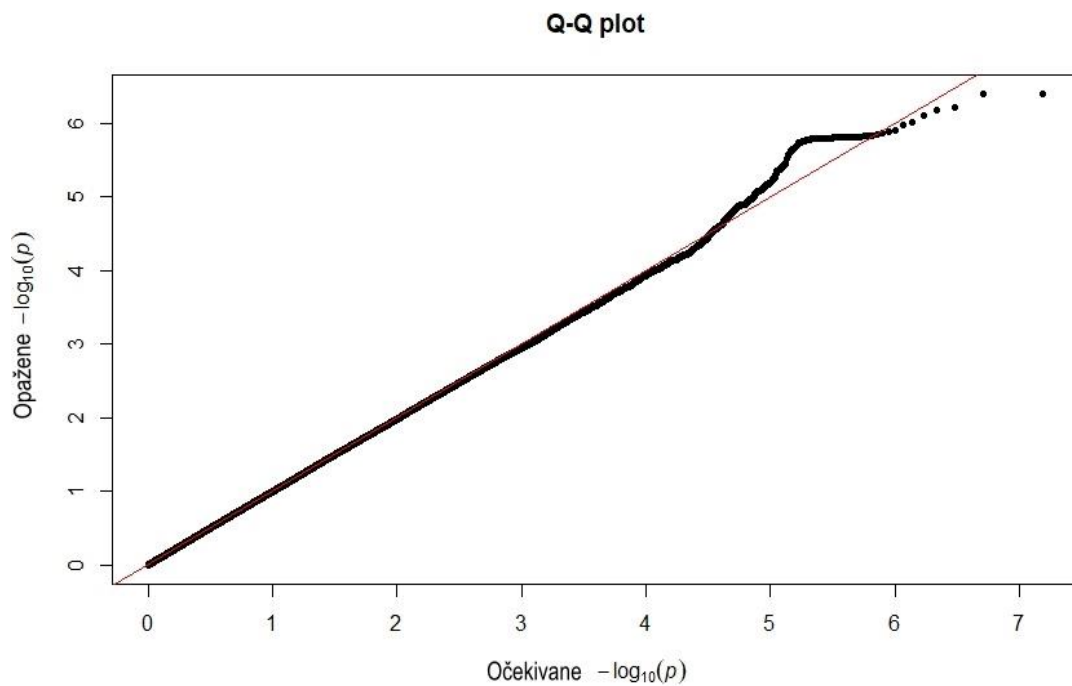
Tablica 4.4. Rezultati meta-analize cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T₄ u kohortama Split i Korčula koji su dosegli sugestivnu značajnost ($P < 5 \times 10^{-6}$)

SNP	Kr.	Pozicija	Gen	Varijanta	A1/A0	MAF	β	SE	P
rs12282281	11	63168015	<i>SLC22A9</i>	intron	G/A	0.018	-0.88	0.17	4.00×10^{-7}
rs6756332	2	153198985	<i>FMNL2</i>	intron	G/C	0.292	0.24	0.05	1.04×10^{-6}
rs148428310	10	98861221	<i>SLIT1</i>	intron	G/A	0.022	-0.87	0.18	1.24×10^{-6}
rs4973585	2	233819091	<i>NGEF</i>	intron	C/T	0.478	0.20	0.04	2.31×10^{-6}
rs189994040	4	90681795	<i>SNCA</i>	intron	T/A	0.023	0.73	0.16	3.56×10^{-6}
rs73426512	18	32822352	<i>ZNF397</i>	intron	T/C	0.132	0.28	0.06	4.25×10^{-6}

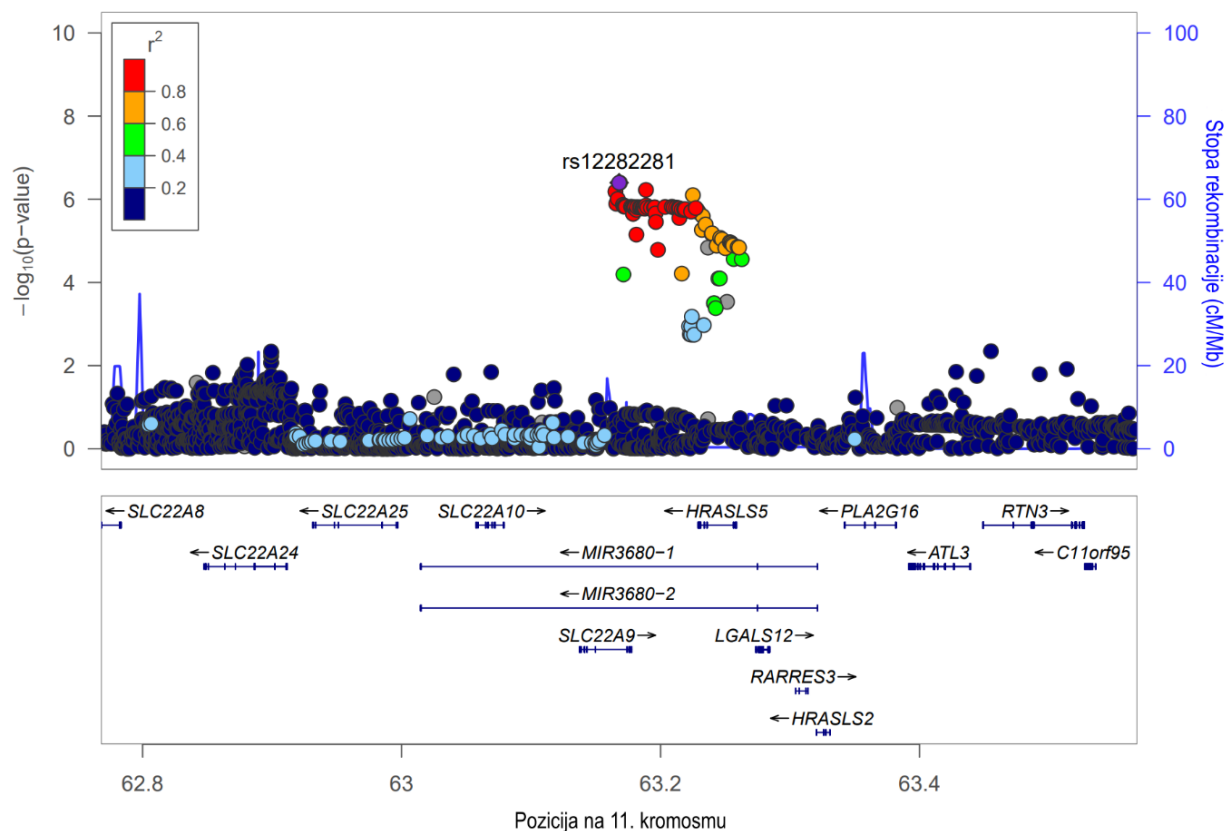
Kr-kromosom, A1- efektni alel, A0 - drugi alel, MAF-frekvencija rjeđeg alela (engl. *minor allele frequency*), β -veličina efekta polimorfizma, SE-standardna pogreška



Slika 4.5. Manhattan graf meta-analize cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T₄ u kohortama Split i Korčula. Crvena linija predstavlja cjelogenomsku granicu značajnosti ($P < 5 \times 10^{-8}$), dok plava linija predstavlja granicu sugestivne značajnosti ($P < 5 \times 10^{-6}$). Na osi x su prikazani svi SNP-ovi uključeni u cjelogenomsku analizu, u skladu s njihovim položajem na svakom kromosomu, u odnosu na negativni logaritam P-vrijednosti na osi y. SNP-ovi s najznačajnijim asocijacijama (najnižom P-vrijednosti) ističu se na grafu.



Slika 4.6. Q-Q graf meta-analize cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T₄ u kohortama Split i Korčula.



Slika 4.7. Detaljan prikaz regije na 11. kromosomu za lokus rs12282281 unutar gena *SLC22A9*. Najznačajniji SNP označen je ljubičastom bojom, dok boje drugih SNP-ova predstavljaju LD s najznačajnijim SNP-om. Intenzitet boje ostalih SNP-ova unutar regije predstavlja stupanj njihovog LD-a (r^2) s referentnim SNP-om: crvena ($r^2 \geq 0,8$), narančasta ($0,6 \leq 0,8$), zelena ($0,4 \leq 0,6$), svijetloplava ($0,2 \leq 0,4$) i tamnoplave boje ($r^2 \leq 0,2$). Ispod grafa su prikazane lokacije poznatih gena u regiji.

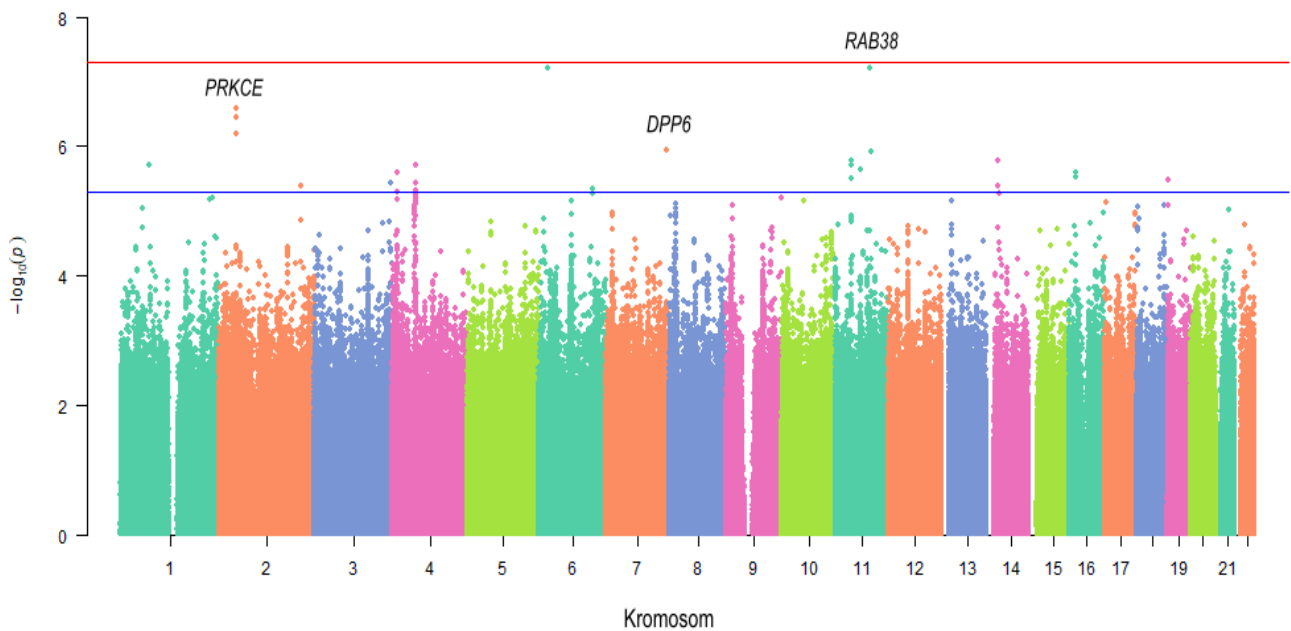
4.3. Rezultati cjelogenomskih analiza povezanosti za hormon T₃

Rezultati cjelogenomske analize povezanosti za hormon T₃ u kohorti Split su prikazani u Tablici 4.5. i na Slici 4.8. Graničnu razinu cjelogenomske značajnosti pokazali su polimorfizmi rs4712793 ($P = 6.09 \times 10^{-8}$, $\beta = 0.23$, $SE = 0.04$, za alel G), smješten na 6. kromosomu koji se nalazi blizu gena *NRSNI*, i polimorfizam rs116951285 ($P = 6.25 \times 10^{-8}$, $\beta = -1.17$, $SE = 0.22$, za alel C) koji se nalazi na 11. kromosomu unutar gena *RAB38*. Regionalni grafovi povezanosti za navedene polimorfizme prikazani su na Slikama 4.10. i 4.11. Polimorfizam rs10192064, koji se nalazi na 2. kromosomu unutar gena *PRKCE* je pokazao sugestivnu razinu značajnosti ($P = 2.65 \times 10^{-7}$). Ostalih osam polimorfizama, koji su dosegli sugestivnu razinu značajnosti od $P < 5 \times 10^{-6}$, su intergenske varijante osim polimorfizma rs11036283 koji se nalazi unutar gena *LRRC4C* (Tablica 4.5.). Faktor genomske inflacije za cjelogenomsku analizu povezanosti hormona T₃ iznosi $\lambda = 1.00$ (Slika 4.9).

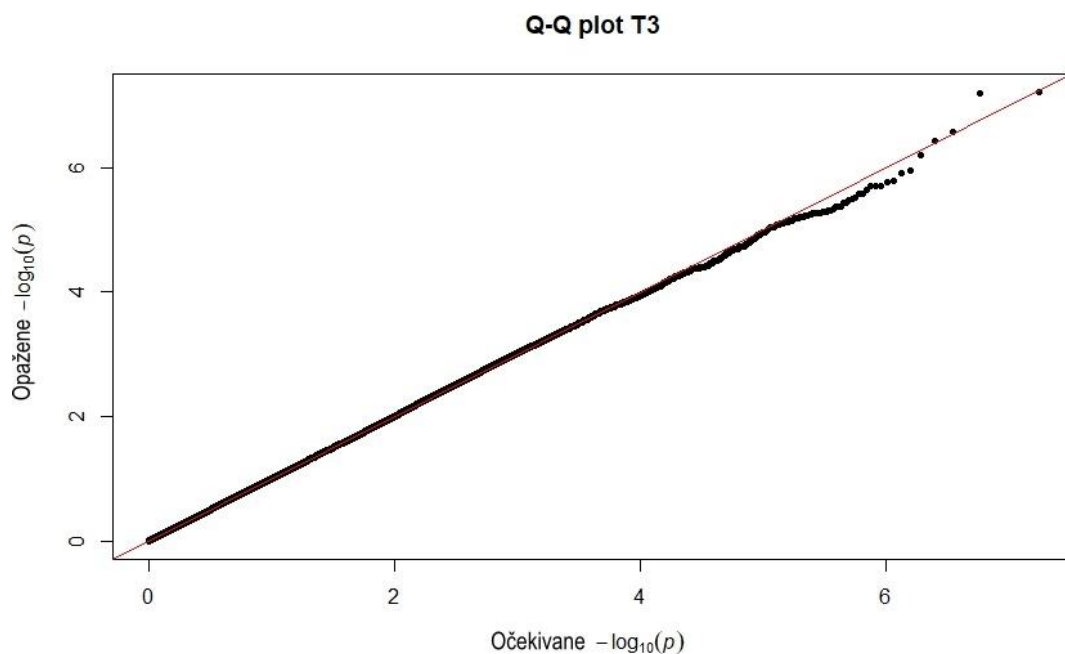
Tablica 4.5. Rezultati cjelogenomske analize povezanosti za hormon T₃ u kohorti Split koji su dosegli sugestivnu značajnost ($P < 5 \times 10^{-6}$)

SNP	Kr.	Pozicija	Gen	Varijanta	A1/A0	MAF	β	SE	P
rs4712793	6	23856930	blizu <i>NRSNI</i>	intergenska	G/A	0.443	0.23	0.04	6.09×10^{-8}
rs116951285	11	87858164	<i>RAB38</i>	intron	C/T	0.019	-1.17	0.22	6.25×10^{-8}
rs10192064	2	46080402	<i>PRKCE</i>	intron	C/T	0.350	-0.31	0.06	2.65×10^{-7}
rs145757720	7	153446714	blizu <i>DPP6</i>	intergenska	T/C	0.446	0.22	0.04	1.21×10^{-6}
rs1950580	14	27456562	blizu <i>LOC101927081</i>	intergenska	G/A	0.041	0.71	0.15	1.63×10^{-6}
rs11036283	11	41216096	<i>LRRC4C</i>	intron	A/G	0.336	-0.29	0.06	1.69×10^{-6}
rs4860544	4	60270968	-	intergenska	T/C	0.327	0.29	0.06	1.92×10^{-6}
rs149325385	1	71846074	blizu <i>NEGR1</i>	intergenska	A/G	0.016	1.21	0.25	1.92×10^{-6}
rs12448370	16	17844082	blizu <i>XYLT1</i>	intergenska	A/C	0.399	0.30	0.06	2.56×10^{-6}
rs4807438	19	3309136	blizu <i>CELF5</i>	intergenska	A/G	0.155	-0.46	0.10	3.30×10^{-6}
rs2720957	3	194770434	blizu <i>XXYLT1</i>	intergenska	C/G	0.148	-0.44	0.09	3.65×10^{-6}

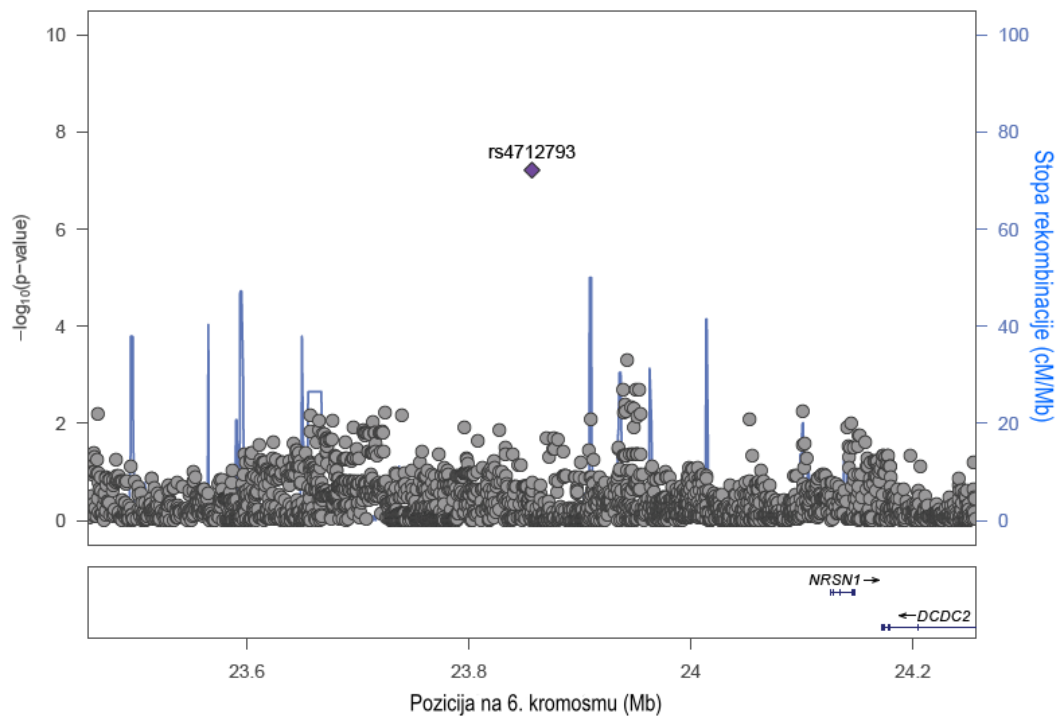
Kr-kromosom, A1- efektni alel, A0-drugi alel, MAF-frekvencija rjedeg alela (engl. *minor allele frequency*), β -veličina efekta polimorfizma, SE-standardna pogreška



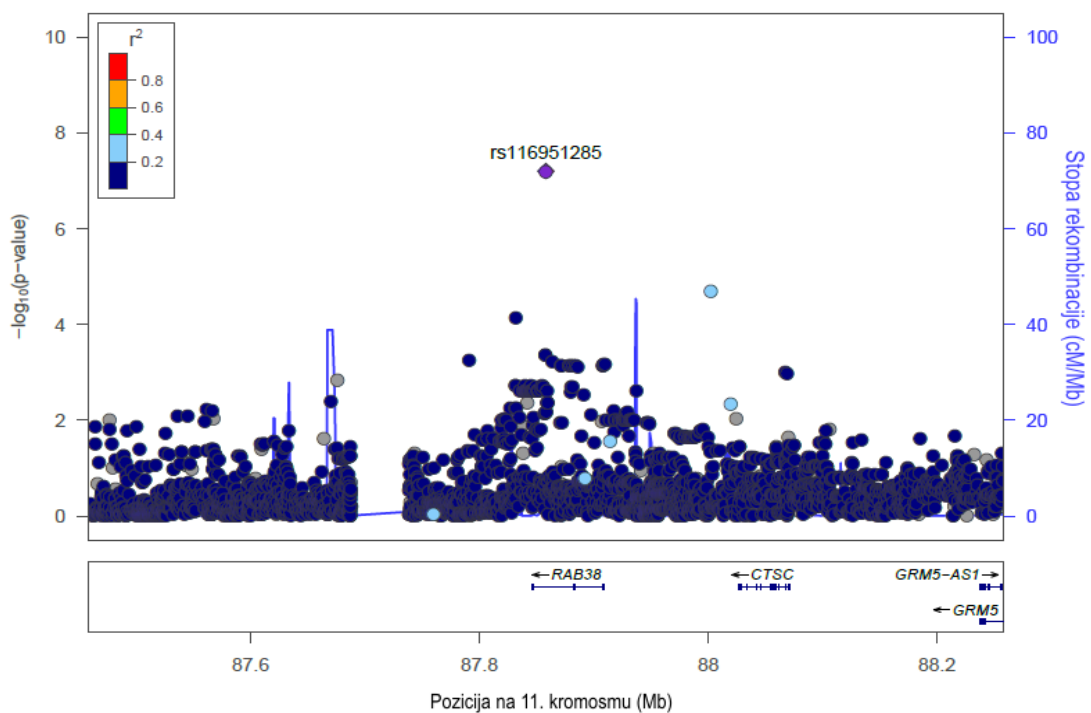
Slika 4.8. Manhattan graf cjelogenomske analize povezanosti za hormon T_3 u kohorti Split. Crvena linija predstavlja cjelogenomsku granicu značajnosti ($P < 5 \times 10^{-8}$), dok plava linija predstavlja granicu sugestivne značajnosti ($P < 5 \times 10^{-6}$). Na osi x su prikazani svi SNP-ovi uključeni u cjelogenomsku analizu, u skladu s njihovim položajem na svakom kromosomu, u odnosu na negativni logaritam P-vrijednosti na osi y. SNP-ovi s najznačajnijim asocijacijama (najnižom P-vrijednosti) ističu se na grafu.



Slika 4.9. Q-Q graf cjelogenomske analize povezanosti hormona T_3 u kohorti Split.



Slika 4.10. Prikaz regije na 6. kromosomu za lokus rs4712793 blizu gena *NRSN1*. Najznačajniji SNP označen je ljubičastom bojom, dok boje drugih SNP-ova predstavljaju LD s najznačajnijim SNP-om.



Slika 4.11. Prikaz regije na 11. kromosomu za lokus rs116951285 u genu *RAB38*. Najznačajniji SNP označen je ljubičastom bojom, dok boje drugih SNP-ova predstavljaju LD s najznačajnijim SNP-om. Intenzitet boje ostalih SNP-ova unutar regije predstavlja stupanj njihovog LD-a (r^2) s referentnim SNP-om: crvena ($r^2 \geq 0,8$), narančasta ($0,6 \leq r^2 < 0,8$), zelena ($0,4 \leq r^2 < 0,6$), svijetloplava ($0,2 \leq r^2 < 0,4$) i tamnoplave boje ($r^2 \leq 0,2$). Ispod grafa su prikazane lokacije poznatih gena u regiji.

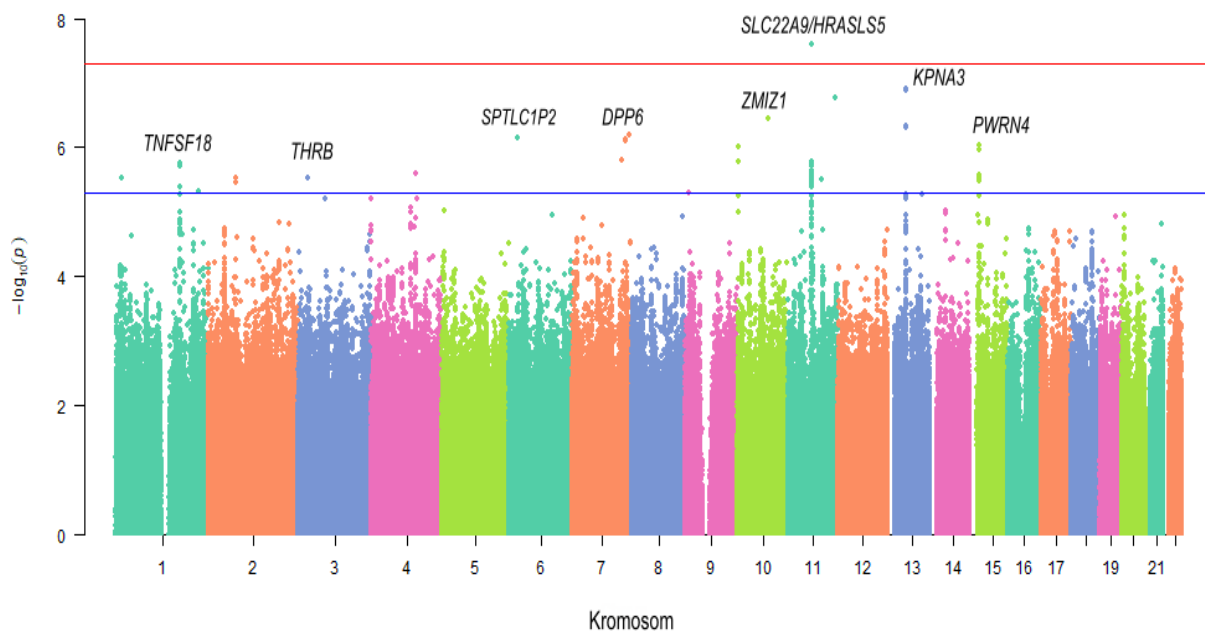
4.4. Rezultati cjelogenomskih analiza povezanosti za omjer T₃/T₄

U cjelogenomskoj analizi povezanosti za omjer T₃/T₄, polimorfizam rs1182264 je dosegao cjelogenomsku granicu značajnosti ($P = 2.50 \times 10^{-8}$), a nalazi se na 11. kromosomu između gena *SLC22A9* i *HRASLS5*. Regionalni graf povezanosti za polimorfizam rs1182264 prikazan je na Slici 4.14. Sugestivnu razinu značajnosti ($P < 5 \times 10^{-7}$) dosegli su polimorfizmi rs4941659 blizu gena *KPNA3* na 13. kromosomu, rs12360138 u genu *ZMIZI* na 10. kromosomu, rs145757720 blizu gena *DPP6* na 7. kromosomu, rs4712793 blizu gena *NRSNI* na 6. kromosomu, rs4778270 u genu *PWRN4* na 15. kromosomu i rs10903963 u genu *PFKP* na 10. kromosomu, a ostalih pet polimorfizama prikazanih u Tablici 4.6. – rs6425201, rs9307484, rs146024196, rs10927459, rs76647776 – dosegli su razinu značajnosti od $P < 5 \times 10^{-6}$. Svi rezultati cjelogenomske analize za omjer T₃/T₄ su prikazani u Tablici 4.6. a grafički na Slici 4.12. Za cjelogenomsku analizu povezanosti za omjer T₃/T₄ faktor genomske inflacije iznosi $\lambda = 1.00$ (Slika 4.13.)

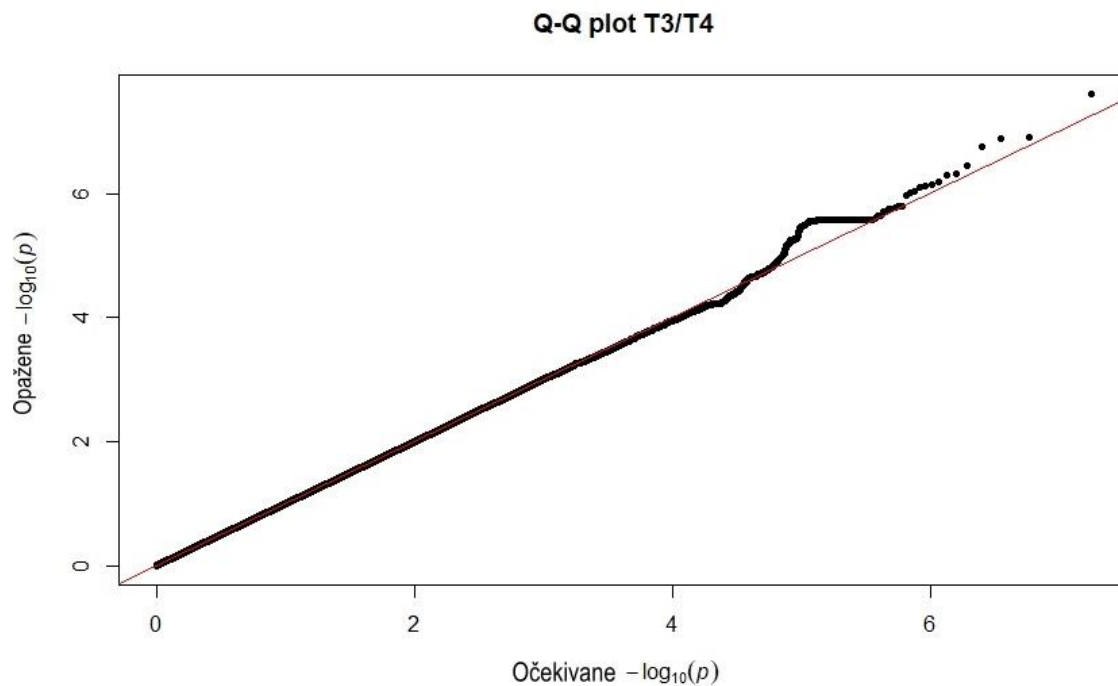
Tablica 4.6. Rezultati cjelogenomske analize povezanosti omjera T₃/T₄ u kohorti Split koji su dosegli cjelogenomsku ($P < 5 \times 10^{-8}$) i sugestivnu razinu značajnosti ($P < 5 \times 10^{-6}$)

SNP	Kr.	Pozicija	Gen	Varijanta	A1/A0	MAF	β	SE	P
rs11822642	11	63224142	blizu <i>SLC22A9</i> i <i>HRASLS5</i>	intergenska	T/C	0.042	0.83	0.15	2.50x10⁻⁸
rs4941659	13	50403124	blizu <i>KPNA3</i>	intergenska	G/A	0.495	0.30	0.06	1.26x10 ⁻⁷
rs12360138	10	80958629	<i>ZMIZI</i>	intron	G/A	0.039	-0.83	0.16	3.59x10 ⁻⁷
rs145757720	7	153446714	blizu <i>DPP6</i>	intergenska	T/C	0.442	0.22	0.04	6.40x10 ⁻⁷
rs4712793	6	23856930	blizu <i>NRSNI</i>	intergenska	G/A	0.438	0.21	0.04	7.01x10 ⁻⁷
rs4778270	15	24227492	<i>PWRN4</i>	intron	G/A	0.495	-0.28	0.06	9.10x10 ⁻⁷
rs10903963	10	3139701	<i>PFKP</i>	intron	C/T	0.069	0.61	0.12	9.62x10 ⁻⁷
rs6425201	1	173012804	<i>TNFSF18</i>	intron	T/C	0.056	0.60	0.12	1.80x10 ⁻⁶
rs9307484	4	121056511	-	intergenska	G/T	0.427	-0.28	0.06	2.52x10 ⁻⁶
rs146024196	3	24464162	<i>THR3</i>	intron	T/C	0.015	-1.23	0.26	3.01x10 ⁻⁶
rs10927459	1	14861570	<i>KAZN</i>	intron	A/C	0.331	0.29	0.06	3.00x10 ⁻⁶
rs76647776	2	74258169	<i>TET3</i>	intron	C/G	0.031	0.89	0.19	3.04x10 ⁻⁶

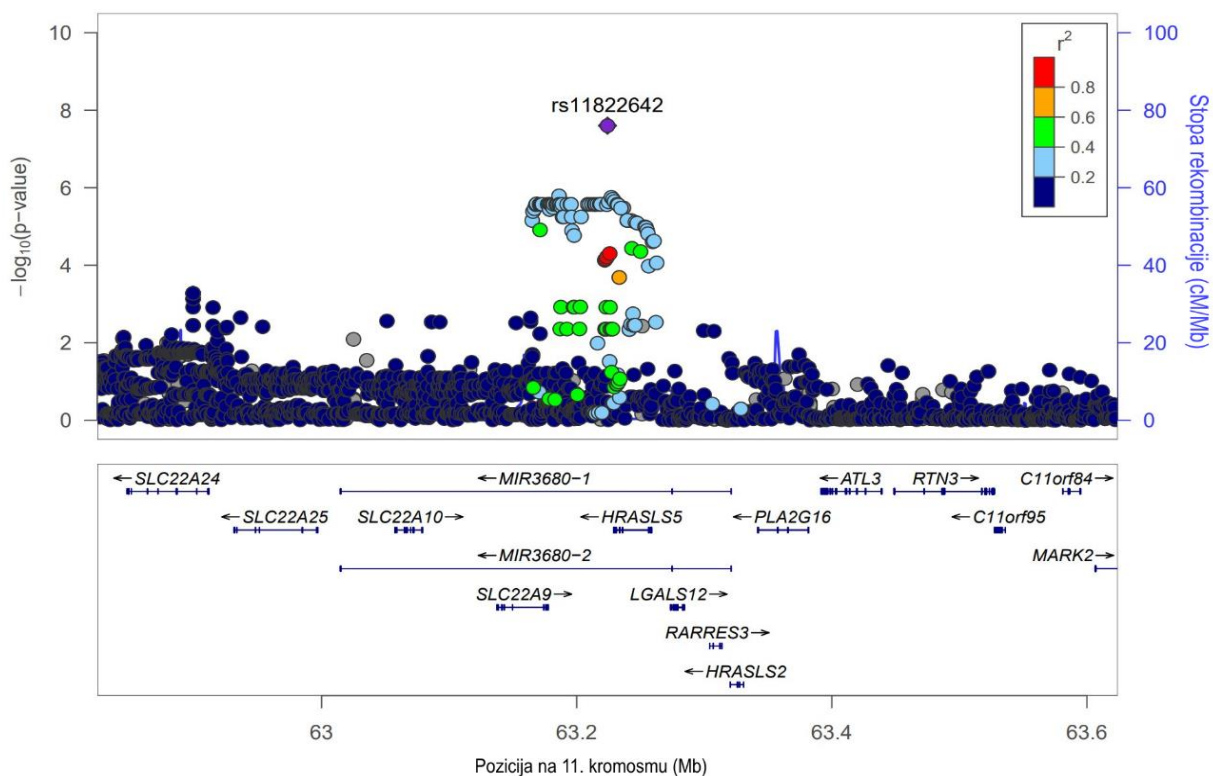
Kr-kromosom, A1-efektni alel, A0-drugi alel, MAF-frekvencija rjeđeg alela (engl. *minor allele frequency*), β -veličina efekta polimorfizma, SE-standardna pogreška. Polimorfizam s cjelogenomskom granicom značajnosti ($P < 5 \times 10^{-8}$) je podebljan.



Slika 4.12. Manhattan graf cjelogenomske analize povezanosti za omjer T_3/T_4 u kohorti Split. Crvena linija predstavlja cjelogenomsku granicu značajnosti ($P < 5 \times 10^{-8}$), dok plava linija predstavlja granicu sugestivne značajnosti ($P < 5 \times 10^{-6}$). Na osi x prikazani su svi SNP-ovi uključeni u cjelogenomsku analizu, u skladu s njihovim položajem na svakom kromosomu, u odnosu na negativni logaritam P-vrijednosti na osi y. SNP-ovi s najznačajnijim asocijacijama (najnižom P-vrijednosti) ističu se na grafu.



Slika 4.13. Q-Q graf cjelogenomske analize povezanosti za omjer T_3/T_4 u kohorti Split.

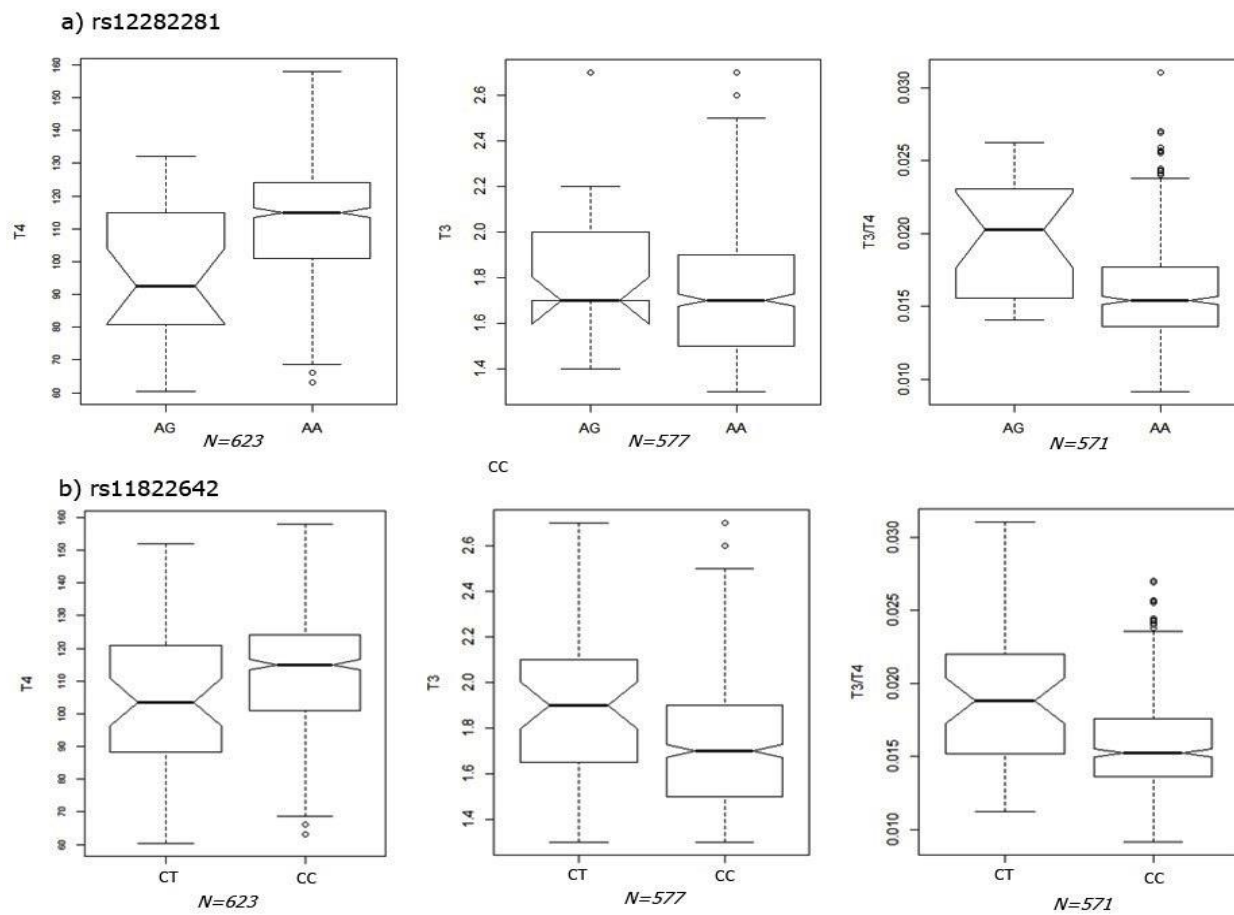


Slika 4.14. Detaljan prikaz regije na 11. kromosomu za lokus rs11822642 koji se nalazi između gena *SLC22A9* i *HRASLS5*. Najznačajniji SNP označen je ljubičastom bojom, dok boje drugih SNP-ova predstavljaju LD s najznačajnijim SNP-om. Intenzitet boje ostalih SNP-ova unutar regije predstavlja stupanj njihovog LD-a (r^2) s referentnim SNP-om: crvena ($r^2 \geq 0,8$), narančasta ($0,6 \leq r^2 < 0,8$), zelena ($0,4 \leq r^2 < 0,6$), svijetloplava ($0,2 \leq r^2 < 0,4$) i tamnoplave boje ($r^2 \leq 0,2$). Ispod grafa su prikazane lokacije poznatih gena u regiji.

4.5. Lokus *SLC22A9*

U dvije provedene analize pronađeni su genski polimorfizmi unutar ili u blizini gena *SLC22A9* na 11. kromosomu, i to genski polimorfizam rs11822642 povezan s omjerom T_3/T_4 , koji je pokazao cjelogenomsku razinu značajnosti ($P = 2.50 \times 10^{-8}$), i genski polimorfizam rs12282281, koji se nalazi u intronu gena *SLC22A9*, povezan s koncentracijom hormona T_4 koji je pokazao sugestivnu razinu značajnosti ($P = 4.00 \times 10^{-7}$). Ta dva polimorfizma su u umjerenom LD-u ($r^2 = 0.42$ za europsku populaciju). Genski polimorfizam rs11822642, koji pokazuje najznačajniju povezanost s omjerom T_3/T_4 , nalazi se ~46 kb od gena *SLC22A9* i ~4 kb od gena *HRASLS5* (Slika 4.14.). Pretraživanjem bioinformatičkih baza podataka (*ENCODE*, *GTEX*, *VEP*) nisu pronađeni mogući funkcionalni učinci dobivenih genskih polimorfizama kao ni značajni eQTL-ovi. Alel T polimorfizma rs1182264 povezan je s višim omjerom T_3/T_4 ($\beta = 0.83$, $SE = 0.15$) i smanjenom koncentracijom hormona T_4 ($P = 0.00066$, $\beta = -0.37$, $SE = 0.11$).

Između hormona T_3 i T_4 postoji slaba korelacija ($r = 0.24$), dok je za omjer T_3/T_4 pokazana jača korelacija (s negativnim korelacijskim faktorom) s koncentracijom hormona T_4 ($r = -0.67$, $P < 0.0001$), nego s koncentracijom hormona T_3 ($r = 0.52$, $P < 0.0001$). Na Slici 4.15. dijagramom pravokutnika (engl. *box-plot*) prikazana je distribucija hormona T_4 i T_3 te omjera T_3/T_4 u kohorti Split s obzirom na genotip, za polimorfizme rs11822642 (najznačajniji genski polimorfizam povezan s omjerom T_3/T_4) i rs12282281 (najznačajniji genski polimorfizam povezan s ukupnom koncentracijom hormona T_4).



Slika 4.15. Prikaz distribucije hormona T_4 , T_3 i omjera T_3/T_4 s obzirom na genotip u kohorti Split za polimorfizme: a) rs12282281 i b) rs11822642

4.6. Usporedba rezultata s literaturnim podatcima

Tablica 4.7. prikazuje usporedbu cjelogenomskih rezultata iz naše studije s objavljenim rezultatima iz literature koji su povezani s fenotipom slobodnih hormona štitnjače (fT_3 i fT_4) s obzirom na to da nisu rađene cjelogenomske analize povezanosti s koncentracijama ukupnih hormona štitnjače. Od 26 genskih varijanti tri polimorfizma, prethodno povezana s hormonom fT_4 , pokazala su povezanost s omjerom T_3/T_4 na razini značajnosti $P < 0.05$, i to polimorfizmi: rs17185536 smješten u genu *LOC728012* na 6. kromosomu, rs12907106 smješten u genu *USP3* na 15. kromosomu, i rs11103377 smješten u genu *LHX3* na 9. kromosomu. Dva polimorfizma, rs10119187 smješten u genu *GLIS3* na 9. kromosomu i rs2235544 smješten u genu *DIO1* na 1. kromosomu, prethodno povezani s hormonom fT_4 , u našoj analizi pokazali su povezanost s hormonom T_4 na razini značajnosti $P < 0.05$.

Tablica 4.7. Analiza literaturnih podataka GWA studija u meta-analizi hormona T₄ i cjelogenomskim analizama povezanosti hormona T₃ i omjera T₃/T₄

SNP	Kr.	PMID	A1	Gen	Literatura			A1/ A0	T ₄ (meta-analiza)			T ₃			T ₃ /T ₄		
					β	SE	P		β	SE	P	β	SE	P	β	SE	P
ft4																	
rs4954192	2	30367059	T	ACMSD	-0,03	0,006	9,3E ⁻⁰⁹	T/C	0,01	0,05	0,812	-0,03	0,06	0,683	-0,04	0,06	0,538
rs6785807	3	30367059	A	SOX2-OT	-0,06	0,009	6,9E ⁻¹¹	A/G	0,03	0,06	0,588	-0,07	0,08	0,394	-0,12	0,08	0,132
rs10946313	6	30367059	T	ID4	0,04	0,006	6,2E ⁻¹²	C/T	-0,02	0,05	0,719	0,00	0,06	0,949	0,03	0,06	0,618
rs9356988	6	30367059	A	SLC17A4	-0,05	0,007	5,7E ⁻¹⁴	A/G	-0,08	0,05	0,109	-0,02	0,06	0,770	0,10	0,07	0,123
rs17185536	6	30367059	T	LOC728012	0,07	0,008	2,7E ⁻²⁰	T/C	0,04	0,05	0,463	-0,05	0,07	0,449	-0,15	0,07	0,037
rs67583169	8	30367059	C	CA8	0,06	0,009	7,1E ⁻¹²	G/C	-0,05	0,06	0,384	-0,07	0,08	0,405	0,05	0,08	0,573
rs10119187	9	30367059	T	GLIS3	0,05	0,008	8,0E ⁻¹⁰	C/T	-0,13	0,05	0,016	-0,08	0,07	0,312	0,07	0,07	0,329
rs10818937	9	30367059	T	NEK6	-0,04	0,006	4,9E ⁻¹¹	T/C	-0,05	0,05	0,316	-0,04	0,07	0,541	0,00	0,07	0,993
rs11039355	11	30367059	T	FNBP4	-0,04	0,006	7,9E ⁻¹¹	T/C	-0,08	0,05	0,099	-0,05	0,06	0,410	0,03	0,06	0,639
rs4149056	12	30367059	T	SLCO1B1	-0,05	0,007	6,3E ⁻¹¹	C/T	0,07	0,06	0,213	-0,03	0,07	0,662	-0,06	0,07	0,420
rs225014	14	30367059	T	DIO2	0,05	0,006	4,6E ⁻¹⁷	C/T	-0,08	0,04	0,067	-0,07	0,06	0,224	0,03	0,06	0,647
rs978055	14	30367059	A	DIO2	0,04	0,007	1,1E ⁻⁰⁸	A/T	-0,02	0,04	0,731	-0,04	0,06	0,563	0,01	0,06	0,860
rs11626434	14	30367059	C	DIO3OS	0,05	0,007	1,7E ⁻¹⁶	C/G	-	0,05	0,984	0,05	0,06	0,479	0,02	0,06	0,706
rs12323871	14	30367059	T	DIO3OS	-0,05	0,008	1,4E ⁻⁰⁸	T/C	-0,01	0,06	0,806	-0,02	0,08	0,810	-0,002	0,08	0,978
rs12907106	15	30367059	C	USP3	-0,04	0,007	3,7E ⁻⁰⁸	G/C	0,02	0,05	0,677	-0,09	0,07	0,187	-0,14	0,07	0,038
rs8063103	16	30367059	C	SNX29	-0,05	0,009	7,8E ⁻⁰⁹	G/C	0,05	0,06	0,393	0,04	0,08	0,601	0,00	0,08	0,968
rs11078333	17	30367059	A	NCOR1	0,04	0,006	2,0E ⁻¹²	T/A	-0,09	0,05	0,060	0,02	0,06	0,718	0,09	0,06	0,157
rs56069042	18	30367059	A	MC4R	0,10	0,017	3,6E ⁻⁰⁹	G/A	0,004	0,15	0,975	0,17	0,21	0,415	0,10	0,21	0,638
rs2235544	1	25743335	A	DIO1	0,15	0,013	5,2E ⁻³⁴	A/C	0,12	0,04	0,005	0,05	0,06	0,358	-0,10	0,06	0,091
rs7694879	4	25743335	T	AADAT	0,14	0,022	4,2E ⁻¹⁰	T/C	-0,03	0,08	0,721	0,11	0,11	0,306	0,10	0,11	0,374
rs11103377	9	25743335	G	LHX3	0,09	0,013	1,4E ⁻¹¹	G/A	0,05	0,04	0,291	-0,02	0,06	0,742	-0,11	0,06	0,047
rs113107469	18	25743335	T	B4GALT6	0,22	0,037	1,3E ⁻⁹	T/C	0,02	0,11	0,824	0,15	0,15	0,316	0,07	0,15	0,635
rs11206244	1	21367965	A	DIO1	0,16	0,03	5,0E ⁻¹⁰	T/C	0,09	0,05	0,059	0,06	0,06	0,334	-0,05	0,06	0,379
rs11726248	4	23408906	A	AADAT	0,11	0,019	5,2E ⁻⁹	A/G	-0,03	0,07	0,653	0,18	0,09	0,057	0,09	0,09	0,351
rs7860634	9	23408906	A	LHX3	0,10	0,013	2,3E ⁻¹⁴	A/G	0,04	0,05	0,391	-0,01	0,06	0,908	-0,10	0,06	0,116
ft3																	
rs67142165	1	30843173	T	EPHB2	0,34	0,06	9,27E ⁻⁹	T/C	-0,05	0,07	0,465	-0,02	0,09	0,829	0,05	0,09	0,571

Kr. - kromosom; PMID - identifikacijski broj članka u bazi "PubMed"; A1 – efektivi alel, A2 – drugi alel. Polimorfizmi s P-vrijednosti manjom od 0.05 su osjenčani.

5. RASPRAVA

Hormoni štitnjače djeluju na gotovo sve stanice u organizmu i bitni su za normalan rast i razvoj organizma. Poremećaji funkcije štitnjače su česti u općoj populaciji, osobito u žena, te se dijagnostički testovi za utvrđivanje bolesti štitnjače svrstavaju među najčešće izvođene pretrage (Kusić i sur., 2009). Klinička slika bolesti štitnjače vrlo je promjenjiva, a često i nespecifična, stoga se dijagnoza disfunkcije štitnjače uglavnom temelji na biokemijskim mjerenjima. Parametri serumske razine hormona štitnjače pokazuju značajne razlike između pojedinaca, pri čemu su genetičke varijacije bitni čimbenici. Genetička pozadina povezana s koncentracijama slobodnih hormona štitnjače (fT_4 i fT_3) u zdravih ispitanika istraživana je u nekoliko kandidatnih i cjelogenomskih studija te je do danas pronađeno preko 20 gena povezanih s koncentracijama slobodnih hormona štitnjače. Iako su slobodni hormoni štitnjače biološki aktivni oblici, identifikacija genetičke pozadine ukupnih koncentracija hormona štitnjače može dati jednako važne podatke s obzirom na to da predstavljaju ukupnu dostupnost hormona štitnjače u cirkulaciji. Također, mjerenja ukupnih hormona štitnjače u kombinaciji s drugim testovima štitnjače, koriste se u dijagnostici poremećaja funkcije štitnjače i daju pouzdane podatke o stanju štitnjače, u odsutnosti bilo kakvih poremećaja vezanja na proteinske nosače. U ovom istraživanju, u kojem je sudjelovao sveukupno 1121 ispitanik, provedene su prve cjelogenomske analize povezanosti za identifikaciju genskih varijanti povezanih s ukupnim koncentracijama hormona štitnjače T_4 i T_3 . Najvažniji rezultat je identifikacija genskih varijanti u genomskoj regiji *SLC22A9* koje su pokazale povezanost s ukupnom koncentracijom hormona T_4 i s omjerom T_3/T_4 .

Cjelogenomskim analizama povezanosti za koncentraciju hormona T_4 u kohortama Split i Korčula nije identificiran ni jedan polimorfizam na cjelogenomskoj razini značajnosti, ali je nekoliko polimorfizama pokazalo sugestivnu značajnost. Da bi povećali snagu studije, rezultati cjelogenomskih analiza povezanosti za koncentraciju hormona T_4 su objedinjeni meta-analizom. U meta-analizi, genski polimorfizam koji je pokazao najznačajniju povezanost s koncentracijom hormona T_4 je rs12282281, koji se nalazi unutar gena *SLC22A9* na 11. kromosomu. Alel G polimorfizma rs12282281 povezan je sa smanjenom koncentracijom hormona T_4 u serumu.

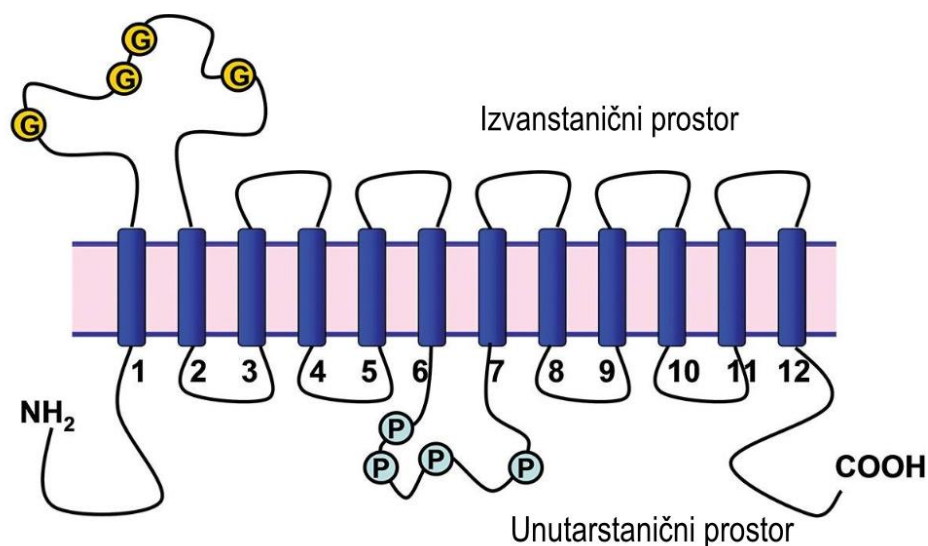
Gen *SLC22A9* kodira za transportni protein iz obitelji SLC22, a pripada superobitelji nosača otopljenih tvari SLC (engl. *Solute Carrier family*), drugoj najvećoj skupini membranskih transportnih proteina koji posreduju u transportu širokog spektra molekula (Koepsell, 2013). Prema dostupnim bazama podataka (dostupno na adresi <http://slc.bioparadigms.org/>), u

superobitelji SLC trenutno postoji više od 400 proteina podijeljenih u 65 obitelji (Bai i sur., 2017), a obitelj SLC22 je i dio klana obitelji MFS (engl. *Major Facilitator Superfamily*) (Höglund i sur., 2010). S obzirom na prijenos supstrata i funkciju koju obavljaju proteini obitelji SLC22, dijelimo ih u tri podskupine: 1) prijenosnike organskih aniona (OAT, od engl. *organic anion transporter*), u koju spada protein SLC22A9, (2) prijenosnike organskih kationa (OCT, od engl. *organic cation transporter*) i (3) prijenosnike karnitina (OCTN, od engl. *organic carnitine transporters*) (Koepsell, 2013). SLC22A9 (također poznat i kao OAT7) je prijenosnik organskih aniona, eksprimiran pretežno u jetri i smješten u sinusoidalnoj membrani hepatocita, te za razliku od ostalih proteina iz obitelji SLC22, pokazuje specifičnu selektivnost supstrata prenoseći sulfatirane konjugate (Shin i sur., 2007) pa prenosi konjugate steroidnih hormona, estron sulfata (engl. *estrone-3-sulfate*, E3S) i dehidroepiandrosteron sulfata (engl. *dehydroepiandrosterone sulfate*, DHEAS), a posjeduje i jedinstveni mehanizam izmjene sulfatnih konjugata s kratkolančanim masnim kiselinama na sinusoidnoj membrani hepatocita jetre (Shin i sur., 2007).

Hormoni štitnjače ne difundiraju slobodno preko stanične membrane, već su im za prijenos preko membrane potrebni specifični transportni proteini (Hennemann i sur., 2001). Nakon sinteze u štitnjači, hormoni T₄ i T₃ otpuštaju se u cirkulaciju preko bazolateralne membrane prvenstveno uz pomoć prijenosnika MCT8, dok je stanični unos T₄ i T₃ posredovan i brojnim drugim membranskim transportnim proteinima. Uz MCT8, pokazano je da MCT10 (Friesema i sur., 2003), nekoliko proteina iz obitelji OATP (Fujiwara i sur., 2001), LAT (Schweizer i sur., 2014) i NTCP (Friesema i sur., 1999; Visser i sur., 2010) imaju sposobnost prenošenja hormona štitnjače, te svi poznati hormoni štitnjače pripadaju superobitelji SLC, kao i SLC22A9. Međutim, SLC22A9 dosad još nije bio povezivan s transportom hormona štitnjače.

Svi navedeni transportni proteini hormona štitnjače pokazuju uobičajenu topologiju sadreći 12 transmembranskih domena (TMD), građenih od α -uzvojnica, s N- i C- terminalnim krajevima koji se nalaze unutar stanice (Kinne i sur., 2011), osim prijenosnika NTCP za kojeg je predviđena struktura od sedam TMD (Hagenbuch i sur., 1994). Za prijenosnike obitelji SLC22, odnosno podskupinu OAT, u koju spada i SLC22A9, također je predviđena struktura od 12 TMD građenih od α -uzvojnica s oba terminalna kraja unutar stanice (Roth i sur., 2012). S obzirom na klasifikacije obrazaca smatanja proteina, MCT8, MCT10 i proteini obitelji OATP i LAT, pripadaju obitelji MFS, kao i SLC22A9. Iako obitelj proteina OATP također pripada obitelji MFS u pogledu sličnosti sekvenci, evolucijski je udaljenija od MCT8 i MCT10, a LAT1 i LAT2 još su više udaljeni od MCT8 (Kinne i sur., 2011). Poravnavanjem sekvenci otkriveno je da MCT8 i njegov bliski homolog, MCT10, ne sadrže mjesta izvanstanične glikozilacije, kao ni LAT, ali neki drugi prijenosnici hormona štitnjače, poput proteina iz obitelji OATP, sadrže. Proteini OATP sadrže

izvanstanične petlje s više predviđenih mjesta *N*-glikozilacije, iako točan položaj ovisi o proteinu. Velika peta izvanstanična petlja sadrži mnogo konzerviranih cisteinskih ostataka, za koje se pokazalo da formiraju disulfidne mostove i važni su za površinsku ekspresiju proteina OATP. Kod OAT-a, postoji velika izvanstanična petlja između TMD1 i TMD2, važna za *N*-glikozilaciju proteina, a u nekim slučajevima i za njegovu homo-oligomerizaciju (nosi konzervirane cisteinske ostatke za formiranje disulfidnih mostova), kao i velika unutarstanična petlja između TMD6 i TMD7, uključena u posttranskripcijsku regulaciju (Nigam i sur., 2015) (Slika 5.1.) Transportni proteini hormona štitnjače predstavljaju primjer konvergentne evolucije, jer je nekoliko obitelji transportnih proteina evoluiralo u proteine koji su sposobni za transport hormona štitnjače, usprkos njihovim strukturnim razlikama (Litwack, 2018).



Slika 5.1. Ilustracija predviđene topologije prijenosnika organskog aniona (OAT). Transmembranske domene povezane su velikom izvanstaničnom i unutarstaničnom petljom, s oba N- i C- kraja unutar stanice (G - mjesta glikozilacije; P - mjesta fosforilacije). Prilagođeno i preuzeto iz Nigam i sur., 2015.

Osim što pokazuje sličnu topologiju u sekundarnoj strukturi od 12 TMD, SLC22A9 pokazuje i sličnosti s ostalim transportnim hormonima štitnjače prenoseći iste supstrate - sulfatne konjugate i konjugate steroidnih hormona (E3S i DHEAS). Transportni proteini OATP1B1 i OATP1B3 iz obitelji OATP, uključeni su u transport hormona T₄ i T₃ (Abe i sur., 1999; Abe i sur., 1998), ali je OATP1B1 uključen i u prijenos njihovih sulfata - T₄S i T₃S (van der Deure i sur., 2008b). Proteini obitelji OATP također pokazuju i tkivnu specifičnost pa su proteini OATP1B1 i OATP1B3 eksprimirani isključivo u jetri, u sinusoidalnoj ili bazolateralnoj membrani hepatocita, kao i SLC22A9. Protein OATP2B1 prenosi konjugate steroidnih hormona, E3S i DHEAS (Kullak-Ublick i sur., 2001; Pizzagalli i sur., 2003), ali osim u jetri lokaliziran je i u placenti i na apikalnoj membrani epitelnih stanica crijeva. OATP1A2 je prijenosnik soli žučnih kiselina i sulfobromftaleina (BSP, od engl. *sulfobromophthalein*) u jetri, ali i hormona štitnjače T₄, T₃ i rT₃ (Kullak-Ublick i sur., 1995). Također, pokazano je da olakšava i prijenos njihovih sulfata T₄S, T₃S i rT₃S te je osim u jetri eksprimiran i u mozgu i bubrezima (van der Deure i sur., 2010). Proteini OATP ne prenose samo hormone štitnjače već i druge organske anione, soli žučnih kiselina, neutralne spojeve pa čak i katione. Svi članovi proteina podobitelji OATP1 koji prenose hormone štitnjače smješteni su na istom klasteru (zajedno s povezanim pseudogenom) koji se nalazi u kromosomskoj regiji 12p12, i uz to, u prosjeku pokazuju oko 50 % homologije u slijedu aminokiselina (van der Deure i sur., 2010).

Tkivnu specifičnost pokazuje i transportni protein NTCP koji je lokaliziran u jetri, a uključen je u transport hormona T₄, T₄S i T₃S, ali i E3S i DHEAS (Visser i sur., 2010). U usporedbi s drugim prijenosnicima iz podskupine OAT, SLC22A9 također pokazuje tkivnu specifičnost s dominantnom ekspresijom u jetri, a pokazuje i specifičnu selektivnost supstrata prenoseći sulfatne konjugate (Shin i sur., 2007). Pokazano je da je sulfatacija važan put u metabolizmu hormona štitnjače (van der Deure i sur., 2008b), a sulfatni oblici hormona štitnjače (T₄S, T₃S) imaju niske koncentracije u cirkulaciji jer se brzo razgrađuju enzimom dejodinaza tipa 1, istim enzimom koji je odgovoran za pretvorbu i aktivaciju hormona T₄ u biološki aktivan T₃ (Wu i sur., 2005).

U istoj genomskoj regiji na 11. kromosomu, u blizini gena *SLC22A9*, polimorfizam rs11822642 povezan s omjerom T_3/T_4 , dosegao je cjelogenomsku razinu značajnosti, jedini u ovom istraživanju. Alel T polimorfizma rs11822642 povezan je s većim omjerom T_3/T_4 ($P = 2,11 \times 10^{-8}$) i smanjenom koncentracijom hormona T_4 ($P = 6.6 \times 10^{-4}$). Ova regija uključuje i druge gene iz obitelji nosača otopljenih tvari, *SLC22A10*, *SLC22A24* i *SLC22A25*, koji su svi dio podobitelji *SLC22A*, kao i *SLC22A9* (Slika 4.14.), te posreduju u prijenosu različitih spojeva od toksina iz okoliša, endogenih metabolita do različitih lijekova. Sva četiri transportna gena iz podobitelji *SLC22A* - *SLC22A10*, *SLC22A24*, *SLC22A25* i *SLC22A9* - smještena su na istom klasteru gena koji se nalazi na poziciji 11q12.3, te usporedbom sekvenci pokazuju 50 do 75 % sličnosti (Jacobsson i sur., 2007; Nigam i sur., 2015). Geni *SLC22A10* i *SLC22A25* imaju ograničenu ekspresiju u jetri, dok je za *SLC22A24* pokazano da je pretežno eksprimiran u bubregu (Jacobsson i sur., 2007). Točna funkcija ovih proteina, kao i supstrata koje prenose, još uvijek nije do kraja razjašnjena, ali je za gene iz obitelji nosača otopljenih tvari već ranije pokazano da filogenetički srodni proteini prenose iste ili slične supstrate (Eraly i sur., 2004; Jacobsson i sur., 2007; Wu i sur., 2009).

Cjelogenomskim analizama povezanosti i analizama egzoma su identificirani polimorfizmi unutar gena obitelji *SLC22A* koji su povezani s koncentracijama različitih hormona i metabolita. Više neovisnih GWAS studija otkrilo je jaku povezanost polimorfizama s koncentracijama steroidnih metabolita u genima obitelji *SLC22A* i to na cjelogenomskoj razini značajnosti. U studiji Ruth i suradnika (2016) identificiran je polimorfizam rs112295236 uzvodno od gena *SLC22A9*, a nizvodno od gena *SLC22A24* i *SLC22A25*. Taj je polimorfizam pokazao cjelogenomsku razinu značajnosti s koncentracijom progesterona. U najnovijoj GWAS studiji, Yee i suradnici (2019) otkrili su jaku povezanost polimorfizama rs11231341 unutar gena *SLC22A24* s koncentracijama androsteron glukuronida i etioholanolon glukuronida, također na cjelogenomskoj razini značajnosti. Analizom egzoma, u studiji koju su proveli Yamada i suradnici (2017), pokazano je da je polimorfizam rs11231397 koji se nalazi u genu *SLC22A25* značajno povezan s fibrilacijom atrija u japanskoj populaciji. Alel C polimorfizma rs11231397 predstavlja faktor rizika za nastanak tog stanja, iako funkcionalni značaj ove povezanosti ostaje nepoznat.

Postojanje dvaju signala u istoj genomskoj regiji povezanih s koncentracijom hormona T_4 i omjerom T_3/T_4 , potvrđuje relevantnost ove genomске regije, koju je svakako potrebno dalje istražiti. Uzimajući u obzir predviđenu sekundarnu strukturu od 12 TMD (Roth i sur., 2012; Nigam i sur., 2015) i sličnosti u prijenosu istih supstrata s ostalim transportnim proteinima hormona štitnjače, a posebice sa superobitelji OATP (Kullak-Ublick i sur., 2001; Pizzagalli i sur., 2003; van der Deure i sur., 2008b), i s obzirom na dominantnu ekspresiju SLC22A9 u jetri, rezultati upućuju na potencijalnu ulogu SLC22A9 kao novog transportnog proteina hormona štitnjače. Međutim, potrebno je provođenje funkcionalnih studija da bi se utvrdio značaj SLC22A9 *in vivo*, a potrebne su i daljnje analize kako bi se razjasnili ovi rezultati.

Još jedan novi transportni protein iz superobitelji SLC identificiran je u nedavnoj velikoj meta-analizi Teumera i suradnika (2018). Pokazano je da je polimorfizam rs9356988 povezan s koncentracijom hormona fT_4 na cjelogenomskoj razini značajnosti, a nalazi se u genu *SLC17A4* i pripada obitelji SLC17, čiji članovi prenose različite organske anione. SLC17A4 je prijenosnik organskih aniona a posebno je ekspimiran u jetri, te bubrezima i gastrointestinalnom traktu (Togawa i sur., 2012). U istoj toj studiji SLC17A4 je dalje ispitivan *in vitro* gdje su funkcionalne analize pokazale da je ljudski SLC17A4 sposoban transportirati i hormone štitnjače T_4 i T_3 . Nadalje, s obzirom na uočene učinke SLC17A4 na transport T_4 i T_3 , dodatno su testirali i povezanost identificirane genske varijante u genu *SLC17A4* s koncentracijom hormona T_3 i omjerima T_3/fT_4 i fT_3/fT_4 , gdje je potvrđena povezanost rs9356988 i s omjerom T_3/fT_4 .

Pokazano je da polimorfizmi u genima koji kodiraju transportne proteine hormona štitnjače mogu utjecati na prijenos hormona štitnjače preko stanične membrane, a samim time i na koncentracije hormona štitnjače u serumu i tkivima (van der Deure i sur., 2007). Polimorfizmi u genima *OATP1B1* i *OATP1B3* detaljno su proučavani jer utječu na interindividualnu varijabilnost u odgovoru pojedinaca na lijekove (Smith i sur., 2005). Do danas se samo jedno istraživanje fokusiralo na povezanost polimorfizma rs4149056 (Val174Ala) u genu *OATP1B1* s koncentracijama hormona štitnjače u serumu, te je pokazano da je alel C povezan s višim koncentracijama T_4S i rT_3 , i nižim omjerom T_3/rT_3 (van der Deure i sur., 2008b). Ostala istraživanja koja su istraživala povezanost polimorfizama transportnih proteina s koncentracijama hormona štitnjače imala su ispitivani uzorak ograničene veličine i kontradiktorne rezultate (Lago-Lestón i sur., 2009; Roef i sur., 2013; van der Deure i sur., 2008).

Od ostalih pet sugestivno značajnih polimorfizama dobivenih u meta–analizi za hormon T₄, jedino je gen *NGEF* u kojem se nalazi intronska varijanta rs4973585 ($P = 2.31 \times 10^{-6}$), prethodno povezan s relevantnim fenotipom povezanim s funkcijom štitnjače. *NGEF* igra kritičnu ulogu u stvaranju neuronskih veza te djeluje kao neuronski čimbenik izmjene nukleotida gvanin (engl. *neuronal guanidine nucleotide exchange factor*). Studija iz Koreje je pokazala da je gen *NGEF* diferencijalno eksprimiran u papilarnom tumoru štitnjače (PTC) i da bi mogao biti potencijalni biomarker za taj tip tumora (Chung i sur., 2012). Wang i suradnici (2016) razvili su panel koji ima izvrsne performanse u razlikovanju benignih od malignih čvorova štitnjače, kombiniranjem samo četiri gena, a među njima je i *NGEF*.

Osim cjelogenomske značajnosti koju je pokazao polimorfizam rs11822642, u cjelogenomskoj analizi povezanosti za omjer T₃/T₄ identificirano je još jedanaest polimorfizama sa sugestivnom značajnošću. Polimorfizam rs146024196 ($P = 3.01 \times 10^{-6}$) nalazi se u genu *THRB* (engl. *Thyroid Hormone Receptor Beta*), čiji je proteinski produkt jedan od jezgrenih receptora za hormon T₃ koji posreduje u biološkim aktivnostima hormona štitnjače. Gen kodira tri izoforme proteina, TRβ1, TRβ2 i TRβ4, uključenih u regulaciju transkripcije ciljnih gena, time utječući na više fizioloških procesa, poput rasta stanica, diferencijacije, apoptoze i održavanja metabolizma. *THRB* je također uključen u patologiju brojnih bolesti, uključujući sindrom otpornosti na hormone štitnjače (RTH, od engl. *Resistance to Thyroid Hormone*), pretilost, neurodegenerativne poremećaje i rak. Također, mehanizam jezgrenog receptora TRβ je povezivan i s negenskim mehanizmima djelovanja što ima učinak na angiogenezu i proliferaciju stanica raka (Davis i sur., 2008; Puzianowska-Kuznicka i sur., 2013). Mutacije u genu *THRB* uzrokuju sindrom RTH (Alberobello i sur., 2011) kojeg karakterizira gušavost i visoka razina cirkulirajućih hormona štitnjače T₃ i T₄ s normalnim ili blago povišenim vrijednostima TSH. Neke genske varijante identificirane u genu *THRB* pokazale su povezanost s razinom TSH u serumu, međutim, rezultati nisu bili konzistentni (Sorensen i sur., 2008) ili su bili temeljeni na jednoj populaciji (Arnaud-Lopez i sur., 2008). U studiji Medicija i suradnika (2011), tri polimorfizma u genu *THRB* pokazala su povezanost s promijenjenim vrijednostima TSH u serumu, ali nakon korekcije za višestruka testiranja ti polimorfizmi nisu postigli statističku značajnost.

THRB može djelovati i kao tumor supresorski gen, a poremećaji ekspresije *THRB* nađeni su u različitim vrstama karcinoma. Jedan od karcinoma u kojem je primijećena poremećena ekspresija *THRB* je svjetlostanični papilarni karcinom bubrežnih stanica (engl. *clear cell renal cell carcinoma*, ccRCC), najčešći tip bubrežnog karcinoma. Zanimljivo je da se gen *THRB* nalazi unutar kromosomske regije 3p21-25, poznate i kao *vruće mjesto* (engl. *hot spot*) za mutacije u genima uključenim u patogenezu ccRCC-a. Uloga epigenetskih promjena u poremećajima *THRB* istraživana je u nekoliko studija, pogotovo uloga nekodirajućih molekula RNK, zvane mikroRNK (engl. *microRNA*, miRNA) koje imaju ključnu ulogu u posttranskripcijskoj regulaciji genske ekspresije. Wojcicka i suradnici (2014) analizirali su ekspresiju *THRB* u ccRCC-u i pokazali su da nenormalna ekspresija gena *THRB* ne proizlazi iz metilacije DNK u promotorskoj regiji gena *THRB*, već na ekspresiju *THRB* u ccRCC-u utječu mikroRNK, i to miR-155 i miR-425 koje se izravno vežu unutar 3' UTR regije gena *THRB*, te je povišena ekspresija ovih mikroRNK u ccRCC-u popraćena smanjenom regulacijom *THRB-a*. U studiji Jazdzewskog i suradnika (2011) pokazano je da mikroRNK izravno inhibiraju ekspresiju *THRB* u papilarnom karcinomu štitnjače (PTC). Ako dođe do hipermetilacije promotorskih regija može doći do smanjene aktivnosti, pa i utišavanja gena, što dovodi do niza promjena. Tako je hipermetilacija promotorske regije DNK koja doprinosi utišavanju *THRB*, zabilježena u nekoliko karcinoma, uključujući karcinome dojke, štitnjače, pluća i leukemije, a istraživanja su pokazala da su stope metilacije *THRB-a* vrlo različite u bolesnika, budući je hipermetilirani *THRB* otkriven u 25 – 80 % analiziranih karcinoma (Dunwell i sur., 2009; Iwasaki i sur., 2010; Joseph i sur., 2007; Ling i sur., 2010).

Sugestivnu značajnost u cjelogenomskoj analizi povezanosti za omjer T₃/T₄ pokazao je i polimorfizam rs12360138 (P = 3.59 x 10⁻⁷), smješten na 10. kromosomu u intronskoj regiji gena *ZMIZ1*. Gen *ZMIZ1* kodira protein koji je član obitelji proteina PIAS (engl. *protein inhibitor of activated STAT*), koji reguliraju aktivnost različitih transkripcijskih čimbenika, uključujući androgene, Smad 3/4 i p53 (Li i sur., 2006). Tuccili i suradnici (2015) pokazali su da je ekspresija *ZMIZ1* deregulirana u tkivima papilarnog karcinoma štitnjače, što vjerojatno i doprinosi progresiji tumora. Polimorfizam rs4778270 nalazi se u intronskoj regiji gena *PWRN4* (engl. *Prader-Willi region non-protein coding RNA 4*), dok se polimorfizam rs10903963 nalazi u intronskoj regiji gena *PFKFB*. Taj gen kodira za enzim fosfofruktokinazu u trombocitima i igra ključnu ulogu u regulaciji glikolize, pretvaranjem fruktoza-6-fosfata u fruktozu-1,6-bisfosfat. Enzim fosfofruktokinaza je povezana i s glavnim prijenosnikom glukoze u tijelu - GLUT4 (ili SLC2A1), a kontrolirana je i koncentracijom hormona T₃. Rezultati studije Moellera i suradnika (2006) pokazali su da aktiviranje signalnog puta fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K, od engl. *phosphatidylinositol-3-*

kinases) interakcijom hormona štitnjače T_3 i $TR\beta$ u citoplazmi, može dovesti do indirektne ekspresije gena *GLUT1*, *PFKP* i *MCT4* (ili *SLC16A4*), pokazujući time negenski učinak kompleksa T_3 - $TR\beta$ u citoplazmi, doprinoseći ukupnom učinku hormona štitnjače na ekspresiju gena (Moeller i sur., 2006).

Polimorfizam rs10927459 nalazi se u intronskoj regiji gena *KAZN*. Protein kodiran genom *KAZN* ima ulogu u povezivanju dezmosoma, staničnoj adheziji, organizaciji citoskeleta i apoptozi (Sevilla i sur., 2008; Wang i sur., 2009). Le Pennec i suradnici (2015) u svojoj studiji proveli su kvantifikaciju RNK, metodom RNA-Seq, u uzorcima različitih tipova karcinoma štitnjače te su identificirali četiri nova fuzijska gena, od kojih je najistaknutiji bio *KAZN-CIORF196*. Provedena analiza uzoraka RNK iz različitih tipova tumorskog tkiva štitnjače otkrila je da se transkript *KAZN-a* ponavlja u bolesnika i s papilarnim (PTC), folikularnim (FTC) i anaplastičnim karcinomima štitnjače, dok nije bio prisutan u normalnom tkivu štitnjače, ukazujući da je taj transkript specifičan za karcinome i da bi mogao biti korišten kao novi dijagnostički marker za razlikovanje benignih tumora štitnjače od zloćudnih tumora štitnjače (Le Pennec i sur., 2015).

Polimorfizam rs76647776 nalazi se u intronskoj regiji gena *TET3* (engl. *Tet Methylcytosine Dioxygenase 3*), koji pripada obitelji metil-citozin dioksigenaza, koje imaju ulogu u procesu demetilacije DNK. Metilacija na 5. ugljikovom atomu citozina, pri čemu nastaje baza 5-metil citozin (5mC), a koja se odvija u dijelovima DNK u kojima iza citozina slijedi gvanin, tzv. CpG dinukleotidnim sekvencama (engl. *cytosine-phosphate-guanine*), jedna je od čestih epigenetskih modifikacija prisutnih u ljudskom genomu. Dioksigenaza ima sposobnost kataliziranja konverzije 5mC u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC), a posreduje i pretvorbu 5hmC u 5-formil citozin (5fC) i pretvorbu 5fC u 5-karboksil citozin (5caC). Nadalje, selektivno se veže za promotorska područja ciljnih gena i pridonosi regulaciji ekspresije brojnih razvojnih gena (Xu i sur., 2012). Uz ulogu u demetilaciji DNK, *TET3* je također uključen u regrutaciju transferaze *O*-GlcNAc (*O*-vezana *N*-acetilglukozaminiltransferaza, OGT) na aktivnim promotorima H3K4me3 pa smanjenje aktivnosti *TET3* ili OGT rezultira izravnim smanjenjem H3K4me3 i istodobno smanjenom transkripcijom (Deplus i sur., 2013). Proteini TET imaju i važnu ulogu u reprogramiranju epigenetskog kromatina u zigoti nakon oplodnje. U istraživanju Guana i suradnika (2017) otkriven je mehanizam, neovisan o katalitičkoj aktivnosti *TET3*, za poboljšanje funkcije jezgrenih receptora hormona štitnjače $TR\alpha$ i $TR\beta$ 1. Interakcijom i stabilizacijom vezanja TR na kromatin, *TET3* ga štiti od ubikvitacije, razgradnje proteasoma i pogoduje aktiviranju ekspresije gena u prisutnosti hormona T_3 . Ta studija pokazala je način djelovanja *TET3* kao neklasičnog koaktivatora jezgrenih receptora TR-a, modulirajući stabilnost i pristup kromatinu, ali ne i njihovu transkripcijsku aktivnost.

U cjelogenomskoj analizi povezanosti s koncentracijom hormona T₃, sugestivnu razinu značajnosti pokazao je polimorfizam rs10192064 ($P = 2.65 \times 10^{-7}$), smješten na 2. kromosomu unutar gena *PRKCE*, koji kodira protein PKCε (engl. *protein kinase C epsilon*). PKCε je jedna od izoformi proteina koje pripadaju obitelji serin- i treonin- kinaza, a ima različite funkcije u različitim tipovima stanica, a sudjeluje i u različitim staničnim signalnim putovima. Smatra se da je ekspresija i aktivacija PKCε povezana sa staničnom transformacijom i tumorigenezom, a sposobnost PKCε da promiče tumorigenezu povezana je s regulacijom apoptoze. Knauf i suradnici (1999) pokazali su da je PKCε uključena u signalizaciju apoptoze u stanicama štitnjače te da gubitak ekspresije ili funkcije PKCε može sudjelovati u tumorigenezi štitnjače inhibirajući programiranu staničnu smrt. U nekoliko studija koje su istraživale karcinome štitnjače primjećene su epigenetske modifikacije koje obuhvaćaju nekodirajuće RNK, pogotovo miR-146, gdje su utvrđene abnormalnosti miR-146 kod određenih papilarnih karcinoma štitnjače (PTC). U istraživanju Zhang i suradnika (2014) otkriveno je da je u većini uzoraka PTC-a bila niža ekspresija PKCε zbog povišene razine miR-146a koja se veže unutar 3' UTR regije gena *PRKCE*, smanjujući tako ekspresiju PKCε u karcinomima štitnjače. Ekspresija miR-146a ovisi o aktivaciji jezgrinog čimbenika kappa B (engl. *nuclear factor kappaB*, NF-κB), a u PTC-u ekspresija NF-κB je povišena, te je miR-146a regulirana u PTC-u negativnom povratnom spregom s NF-κB, time suzbijajući ekspresiju PKCε. Istraživanje Zhanga i suradnika (2014) potvrdilo je tumorsku supresiju uloge miR-146a u stanicama karcinoma štitnjače što doprinosi apoptozi putem PKCε ciljane miR-146a u PTC-u te su njihova otkrića potvrdila da je i miR-146a uključena u mehanizam povratne sprege signalnog puta NF-κB u PTC-u.

Ostali geni sa sugestivnom značajnošću $P = 5 \times 10^{-6}$ dobiveni cjelogenomskim analizama hormona T₃, omjerom T₃/T₄ i meta-analizom hormona T₄, nemaju jasnu poveznicu s fiziologijom štitnjače. Polimorfizam rs6425201 nalazi se u intronskoj regiji gena *TNFSF18* koji kodira za citokin koji pripada obitelji čimbenika tumorske nekroze (TNF). Pokazano je da modulira preživljavanje T-limfocita u perifernim tkivima, eksprimiran je u endotelnim stanicama te se smatra važnim za interakciju između T-limfocita i endotelnih stanica. Polimorfizam rs6756332 nalazi se u intronskoj regiji gena *FMNL2* koji igra ulogu u regulaciji stanične morfologije i organizacije citoskeleta. Povećana ekspresija *FMNL2* uočena je u tumoru debelog crijeva (Zhu i sur., 2011), a također i u metastazama limfnih čvorova (Kitzing i sur., 2010). Polimorfizam rs148428310 nalazi se u intronskoj regiji gena *SLIT1* koji kodira za proteine koji vezuju i aktiviraju receptore ROBO (engl. *roundabout*) te imaju važnu signalnu ulogu u neurološkom razvoju većine životinja. Polimorfizam rs189994040 nalazi se u intronskoj regiji gena *SNCA* koji kodira protein

alfa-sinuklein, a defekti *SNCA* su uključeni u patogenezu Parkinsonove i Alzheimerove bolesti (Linnertz i sur., 2014; Siddiqui i sur., 2016). Polimorfizam rs73426512 nalazi se u intronskoj regiji gena *ZNF397* koji kodira protein s N-terminalnom SCAN domenom, a dulja izoforma sadrži devet C2H2 domena cinkovih prstiju u C-terminalnoj domeni. Pokazano je da skraćena izoforma *ZNF397* može djelovati kao transkripcijski represor, a studije su pokazale da i delecija dijela proteina *ZNF397* kojem nedostaje devet domena cinkovih prstiju može aktivirati transkripciju (Wu i sur., 2003). Polimorfizmi rs4941659, rs145757720 i rs4712793 su intergenske varijante koje se nalaze blizu gena *KPNA3*, *DPP6* i *NRSN1*. Gen *KPNA3* kodira za podjedinicu alfa-3 importina te je uključen u unos proteina u staničnu jezgru (Takeda i sur., 1997). Gen *DPP6* kodira membranski protein tip II koji je član obitelji serinskih proteaza. Taj protein nema aktivnost dipeptidil-aminopeptidaze (Strop i sur., 2004), najvjerojatnije zbog odsutnosti konzerviranog serinskog ostatka, koji je normalno prisutan u katalitičkoj domeni serinskih proteaza, ali modulira aktivnost kalijevog kanala *KCND2* (Soh i Goldstein, 2008). Gen *NRSN1* (engl. *neurensin 1*) kodira protein eksprimiran u mozgu koji ima ulogu u živčanom sustavu. Polimorfizam rs116951285 nalazi se u intronskoj regiji gena *RAB38* koji kodira protein koji ima važnu ulogu u kontroli proizvodnje melanina, biogeneze melanosoma (Gerondopoulos i sur., 2012) i u sazrijevanju fagosoma (Seto i sur., 2011). Polimorfizam rs11036283 nalazi u intronskoj regiji gena *LRRC4C* (engl. *leucine-rich repeat-containing protein 4c*), za kojeg se smatra da je uključen u razvoj i tumorigenezu živčanog tkiva, ali točna funkcija proteina kodiranog tim genom nije poznata. Ostali polimorfizmi, rs149325385, rs12448370, rs4807438 i rs2720957, dobiveni cjelogenomskom analizom povezanosti s hormonom T₃ u kohorti Split, su intergenske varijante najbliže genima *NEGR1* (engl. *neuronal growth regulator 1*), *XYLT1* (engl. *xylosyltransferase 1*), *CELF5* (engl. *CUGBP Elav-Like Family Member 5*), i *XXYLT1* (engl. *xyloside xylosyltransferase 1*).

Od 26 polimorfizama iz prethodno objavljenih cjelogenomskih studija, koji su povezani s fenotipovima slobodnih hormona štitnjače, u našem istraživanju dva su polimorfizma pokazala povezanost s ukupnim koncentracijama hormona T_4 i tri s omjerom T_3/T_4 na razini značajnosti $P < 0.05$ (Tablica 4.7.). Najveću povezanost pokazao je polimorfizam rs2235544 ($P = 5 \times 10^{-3}$) smješten u genu *DIO1*, koji je pokazao povezanost s ukupnom koncentracijom hormona T_4 . *DIO1* kodira za enzim dejodinazu tip 1 (D1) koja je prisutna u jetri, bubrezima i štitnjači te igra ključnu ulogu u stvaranju biološki aktivnog hormona T_3 iz T_4 , a također inaktivira hormon T_4 u rT_3 . Taj polimorfizam je bio među prvim polimorfizmima identificiranim u kandidatnim studijama, a kasnije je potvrđen i u svim meta-analizama u različitim populacijama. Polimorfizam rs2235544 gena *DIO1* utječe na koncentracije hormona fT_4 , rT_3 i omjer fT_3/fT_4 , posredno utječući na aktivnost enzima D1, a ponovio se i u ovom istraživanju što dodatno potvrđuje njegovu povezanost s regulacijom hormona štitnjače, ali i vjerodostojnost rezultata u ovom istraživanju. Drugi polimorfizam povezan s hormonom T_4 je rs10119187 ($P = 0.016$), smješten u genu *GLIS3*. Taj polimorfizam je povezan s koncentracijama fT_4 (Teumer i sur., 2018), a još jedan polimorfizam u istoj genskoj regiji je povezivan i s koncentracijama TSH. *GLIS3* kodira jezgri protein s pet C_2H_2 domena cinkovih prstiju. Djeluje kao supresor i aktivator transkripcije, a posebno je uključen u razvoj beta stanica gušterače, štitnjače, oka, jetre i bubrega. Lokus *GLIS3* ima i potencijalni klinički značaj s obzirom na to da su mutacije u tom genu povezane s kongenitalnim hipotireoidizmom i neonatalnim dijabetesom (Senee i sur., 2006).

S omjerom T_3/T_4 najveću povezanost pokazao je polimorfizam rs11103377 smješten u genu *LHX3* na 9. kromosomu. Gen *LHX3* kodira za transkripcijski čimbenik koji ima ključnu ulogu u razvoju hipofize. Mutacije u *LHX3* uzrokuju sindrom kombiniranog nedostatka hormona hipofize (engl. *combined pituitary hormone deficiency 3*, CPHD3) a karakterizira ga niska koncentracija hormona fT_4 i TSH, kao i potpuni nedostatak hormona rasta, prolaktina i gonadotropina. Povezan je i s promjenjivim senzoneuralnim gubitkom sluha i manjkom adrenokortikotropnog hormona (Netchine i sur., 2000; Ramzan i sur., 2017). Polimorfizam rs11103377 povezan je s povećanim koncentracijama TSH i fT_4 , te pozitivna povezanost *LHX3* s TSH i fT_4 sugerira učinak tog alela na razini HPT osi. Preostala dva polimorfizma povezana s omjerom T_3/T_4 , a koja su pokazala razinu značajnosti od $P < 0.05$, polimorfizam rs17185536 smješten u genu *LOC728012* i polimorfizam rs12907106 smješten u genu *USP3*, u ovom istraživanju su pokazali suprotan smjer učinka u odnosu na objavljene rezultate s fT_4 (Tablica 4.7.).

Osim što je ovo do sada jedina cjelogenomska studija koja je provedena za ukupne koncentracije hormona štitnjače, prednost ovog istraživanja je pažljiv odabir ispitanika. Iz istraživanja smo isključili sve ispitanike koji su imali bilo kakve bolesti štitnjače, ispitanike čije vrijednosti hormona (T_3 , T_4 , TSH, fT_3 i fT_4) nisu bile u referentnim vrijednostima ili su imali pozitivna protutijela na štitnjaču (TPO i Tg), pa se može reći da su u ovo istraživanje bili uključeni isključivo zdravi ispitanici, bez ikakvih poremećaja u radu štitnjače. Također, svi ispitanici potječu iz homogene populacije čime je izbjegnuta utjecaj populacijske stratifikacije.

Glavno ograničenje ovog istraživanja je mali uzorak. Za usporedbu, nedavna studija Teumera i suradnika (2018), koja je do danas najveća objavljena cjelogenomska studija povezanosti za koncentracije hormona TSH i fT_4 , provedena je na 72 167 ispitanika europskog podrijetla. Nadalje, nedostatak ovog istraživanja je što nema i odgovarajuće replikacijske kohorte za ukupnu koncentraciju hormona T_4 i T_3 . Iako su identificirane genske varijante povezane s ukupnim koncentracijama hormona štitnjače u genomskoj regiji *SLC22A9*, i to na cjelogenomskoj razini značajnosti, nužno je potvrditi navedenu povezanost u istraživanjima na znatno većem uzorku, a bilo bi potrebno i provođenje funkcionalnih studija kako bi se potvrdio značaj ovih rezultata *in vivo*.

6. ZAKLJUČAK

U posljednjih nekoliko godina napredak genetičkih istraživanja doveo je do otkrića velikog broja novih gena povezanih s (dis)funkcijom štitnjače. Razumijevanje genetičke osnove funkcije štitnjače je izuzetno značajno jer su istraživanja pokazala da čak i suptilne varijacije u funkciji štitnjače mogu imati značajne kliničke učinke. Cjelogenomske analize povezanosti dosad su bile vrlo uspješne u identificiranju novih genetičkih odrednica funkcije štitnjače, ipak, najveći udio genske varijacije koji utječe na funkciju štitnjače i dalje je ostao neobjašnjen.

Cilj ove doktorske disertacije bio je identificirati genetičke čimbenike koji reguliraju ukupne koncentracije hormona štitnjače T_4 i T_3 , kao i omjer T_3/T_4 . Provedenim analizama prvi put su definirane genske varijante povezane s ukupnim koncentracijama hormona štitnjače. Usporedbom dobivenih rezultata s prethodno objavljenim rezultatima za slobodne hormone štitnjače, potvrđene su dvije genske varijante povezane s ukupnom koncentracijom hormona T_4 i genska varijanta povezana s omjerom T_3/T_4 na razini značajnosti $P < 0.05$. Meta-analizom cjelogenomske analize povezanosti za ukupnu koncentraciju hormona T_4 identificirana je povezanost s lokusom koji obuhvaća gen *SLC22A9*, te je u istoj genomskoj regiji utvrđena povezanost i s omjerom T_3/T_4 . Gen *SLC22A9* kodira protein koji prenosi organske anione te posreduje u prijenosu širokog spektra različitih molekula. Brojne studije potvrdile su kako postoje specifični prijenosnici hormona štitnjače, te je pokazano da polimorfizmi u genima koji kodiraju za transportne proteine hormona štitnjače mogu dovesti do izmijenjenog transportnog kapaciteta. Takvi polimorfizmi ne utječu samo na prijenos hormona štitnjače preko stanične membrane, već i na koncentracije hormona štitnjače u serumu, ali i u tkivima. Dva polimorfizma, rs12282281 i rs11822642, koja su unutar/blizu gena *SLC22A9* imaju značajnu povezanost s promjenom ukupne koncentracije hormona T_4 i omjerom T_3/T_4 . Protein *SLC22A9* pripada superobitelji nosača otopljenih tvari SLC, u koju pripadaju i svi do sad identificirani prijenosnici hormona štitnjače. Također, pokazuje sličnosti s ostalim transportnim proteinima hormona štitnjače prenoseći iste supstrate, te je isključivo eksprimiran u jetri, koja je glavni metabolički organ u kojem većina hormona T_3 nastaje dejodinacijom hormona T_4 . Rezultati upućuju na potencijalnu ulogu *SLC22A9* kao novog transportnog proteina hormona štitnjače.

Važan sljedeći korak bio bi provođenje funkcionalnih studija kako bi se utvrdio značaj SLC22A9 *in vivo*, kao i potvrda pronađene povezanosti u neovisnoj populaciji. Osim navedenih studija, potrebno je provesti i analize na većem broju ispitanika, s ciljem otkrivanja novih uzročnih genskih varijanti, kako bi se otkrio još i sad velik dio nepoznate nasljednosti u funkciji štitnjače.

7. LITERATURA

- Abe, T., Kakyō, M., Sakagami, H., Tokui, T., Nishio, T., Tanemoto, M., . . . Yawo, H. (1998). Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (OATP3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22395-22401. doi: 10.1074/jbc.273.35.22395
- Abe, T., Kakyō, M., Tokui, T., Nakagomi, R., Nishio, T., Nakai, D., . . . Yawo, H. (1999). Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem*, 274(24), 17159-17163. doi: 10.1074/jbc.274.24.17159
- Abecasis, G. R., Auton, A., Brooks, L. D., DePristo, M. A., Durbin, R. M., Handsaker, R. E., . . . McVean, G. A. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491(7422), 56-65. doi: 10.1038/nature11632
- Alberobello, A.T., Congedo, V., Liu, H., Cochran, C., Skarulis, M. C., Forrest, D., Celi, F.S. (2011). An intronic SNP in the thyroid hormone receptor β gene is associated with pituitary cell-specific over-expression of a mutant thyroid hormone receptor β 2 (R338W) in the index case of pituitary-selective resistance to thyroid hormone. *Journal of translational medicine*, 9, 144-144. doi: 10.1186/1479-5876-9-144
- Amino, N., Yabu, Y., Miki, T., Morimoto, S., Kumahara, Y., Mori, H., . . . Miyai, K. (1981). Serum ratio of triiodothyronine to thyroxine, and thyroxine-binding globulin and calcitonin concentrations in Graves' disease and destruction-induced thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 53(1), 113-116. doi: 10.1210/jcem-53-1-113
- Andersen, S., Pedersen, K. M., Bruun, N. H., Laurberg, P. (2002). Narrow individual variations in serum T(4) and T(3) in normal subjects: a clue to the understanding of subclinical thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(3), 1068-1072. doi: 10.1210/jcem.87.3.8165
- Andersen, S. L., Olsen, J., Wu, C. S., Laurberg, P. (2014). Smoking reduces the risk of hypothyroidism and increases the risk of hyperthyroidism: evidence from 450,842 mothers giving birth in Denmark. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 80(2), 307-314. doi: 10.1111/cen.12279
- Anwer, M. S., Stieger, B. (2014). Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Arch*, 466(1), 77-89. doi: 10.1007/s00424-013-1367-0

- Appelhof, B. C., Peeters, R. P., Wiersinga, W. M., Visser, T. J., Wekking, E. M., Huyser, J., . . . Fliers, E. (2005). Polymorphisms in type 2 deiodinase are not associated with well-being, neurocognitive functioning, and preference for combined thyroxine/3,5,3'-triiodothyronine therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, *90*(11), 6296-6299. doi: 10.1210/jc.2005-0451
- Arnaud-Lopez, L., Usala, G., Ceresini, G., Mitchell, B. D., Pilia, M. G., Piras, M. G., . . . Naitza, S. (2008). Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *American journal of human genetics*, *82*(6), 1270-1280. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.04.019
- Asvold, B. O., Bjoro, T., Nilsen, T. I., Gunnell, D., Vatten, L. J. (2008). Thyrotropin levels and risk of fatal coronary heart disease: the HUNT study. *Arch Intern Med*, *168*(8), 855-860. doi: 10.1001/archinte.168.8.855
- Auton, A., Abecasis, G. R., Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Abecasis, G. R., Bentley, D. R., . . . National Eye Institute, N. I. H. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, *526*(7571), 68-74. doi: 10.1038/nature15393
- Bai, X., Moraes, T. F., Reithmeier, R. A. F. (2017). Structural biology of solute carrier (SLC) membrane transport proteins. *Mol Membr Biol*, *34*(1-2), 1-32. doi: 10.1080/09687688.2018.1448123
- Bailey-Wilson, J. E., Wilson, A. F. (2011). Linkage analysis in the next-generation sequencing era. *Human heredity*, *72*(4), 228-236. doi: 10.1159/000334381
- Balding, D. J. (2006). A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature Reviews Genetics*, *7*(10), 781-791. doi: 10.1038/nrg1916
- Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J., Larsen, P. R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*, *23*(1), 38-89. doi: 10.1210/edrv.23.1.0455
- Brent, G. A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest*, *122*(9), 3035-3043. doi: 10.1172/jci60047
- Brooker, R. J. (2005). *Genetics: Analysis and Principles* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill Science/Engineering/Math.
- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177-86. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00219-X
- Bush, W. S., Moore, J. H. (2012). Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS computational biology*, *8*(12), e1002822-e1002822. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002822

- Cahnmann, H. J., Pommier, J., Nunez, J. (1977). Spatial requirement for coupling of iodotyrosine residues to form thyroid hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5333-5335. doi: 10.1073/pnas.74.12.5333
- Chopra, I. J. (1996). Nonthyroidal illness syndrome or euthyroid sick syndrome? *Endocr Pract*, 2(1), 45-52. doi: 10.4158/ep.2.1.45
- Chung, K. W., Kim, S. W. (2012). Gene expression profiling of papillary thyroid carcinomas in Korean patients by oligonucleotide microarrays. *J Korean Surg Soc*, 82(5), 271-280. doi: 10.4174/jkss.2012.82.5.271
- Citterio, C. E., Morishita, Y., Dakka, N., Veluswamy, B., Arvan, P. (2018). Relationship between the dimerization of thyroglobulin and its ability to form triiodothyronine. *J Biol Chem*, 293(13), 4860-4869. doi: 10.1074/jbc.RA118.001786
- Davis, P. J., Leonard, J. L., Davis, F. B. (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*, 29(2), 211-218. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.09.003
- Davis, P. J., Davis, F. B., Mousa, S. A., Luidens, M. K., Lin, H. Y. (2011). Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51, 99-115. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010510-100512
- Deplus, R., Delatte, B., Schwinn, M. K., Defrance, M., Mendez, J., Murphy, N., . . . Fuks, F. (2013). TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J*, 32(5), 645-655. doi: 10.1038/emboj.2012.357
- de Herder, W. W., Hazenberg, M. P., Pennock-Schroder, A. M., Oosterlaken, A. C., Rutgers, M., Visser, T. J. (1989). On the enterohepatic cycle of triiodothyronine in rats; importance of the intestinal microflora. *Life Sci*, 45(9), 849-856. doi: 10.1016/0024-3205(89)90179-3
- de Jong, F. J., Peeters, R. P., den Heijer, T., van der Deure, W. M., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., . . . Breteler, M. M. (2007). The association of polymorphisms in the type 1 and 2 deiodinase genes with circulating thyroid hormone parameters and atrophy of the medial temporal lobe. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(2), 636-640. doi: 10.1210/jc.2006-1331
- Dedieu, A., Gaillard, J. C., Pourcher, T., Darrouzet, E., Armengaud, J. (2011). Revisiting iodination sites in thyroglobulin with an organ-oriented shotgun strategy. *J Biol Chem*, 286(1), 259-269. doi: 10.1074/jbc.M110.159483
- Dietrich, J. W., Landgrafe, G., Fotiadou, E. H. (2012). TSH and Thyrotropic Agonists: Key Actors in Thyroid Homeostasis. *Journal of Thyroid Research*, 2012, 29. doi: 10.1155/2012/351864
- Dong, B. J. (2000). How medications affect thyroid function. *The Western journal of medicine*, 172(2), 102-106. doi: 10.1136/ewjm.172.2.102

- Dorak, M. Tevfik. (2017). *Genetic Association Studies: Background, Conduct, Analysis, Interpretation* (pp. 230).
- Dumitrescu, A. M., Liao, X. H., Best, T. B., Brockmann, K., Refetoff, S. (2004). A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet*, 74(1), 168-175. doi: 10.1086/380999
- Dunn, J. T., Dunn, A. D. (1999). The importance of thyroglobulin structure for thyroid hormone biosynthesis. *Biochimie*, 81(5), 505-509. doi: 10.1016/s0300-9084(99)80102-3
- Dunwell, T. L., Hesson, L. B., Pavlova, T., Zabarovska, V., Kashuba, V., Catchpoole, D., . . . Latif, F. (2009). Epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics*, 4(3), 185-193. doi: 10.4161/epi.4.3.8752
- Eraly, S. A., Monte, J. C., Nigam, S. K. (2004). Novel slc22 transporter homologs in fly, worm, and human clarify the phylogeny of organic anion and cation transporters. *Physiological Genomics*, 18(1), 12-24. doi: 10.1152/physiolgenomics.00014.2004
- Everett, L. A., Glaser, B., Beck, J. C., Idol, J. R., Buchs, A., Heyman, M., . . . Green, E. D. (1997). Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet*, 17(4), 411-422. doi: 10.1038/ng1297-411
- Fisher, D. A. (1996). Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations. *Clin Chem*, 42(1), 135-139. doi: 10.1093/clinchem/42.1.135
- Friesema, E. C., Docter, R., Moerings, E. P., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P. J., . . . Visser, T. J. (1999). Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun*, 254(2), 497-501. doi: 10.1006/bbrc.1998.9974
- Friesema, E. C., Ganguly, S., Abdalla, A., Manning Fox, J. E., Halestrap, A. P., Visser, T. J. (2003). Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem*, 278(41), 40128-40135. doi: 10.1074/jbc.M300909200
- Fujiwara, K., Adachi, H., Nishio, T., Unno, M., Tokui, T., Okabe, M., . . . Abe, T. (2001). Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology*, 142(5), 2005-2012. doi: 10.1210/endo.142.5.8115
- Gabriel, S. B., Schaffner, S. F., Nguyen, H., Moore, J. M., Roy, J., Blumenstiel, B., . . . Altshuler, D. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 296(5576), 2225-2229. doi: 10.1126/science.1069424

- Gerondopoulos, A., Langemeyer, L., Liang, J. R., Linford, A., Barr, F. A. (2012). BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Curr Biol*, 22(22), 2135-2139. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.020
- Griffith, O. L., Montgomery, S. B., Bernier, B., Chu, B., Kasaian, K., Aerts, S., . . . Jones, S. J. (2008). ORegAnno: an open-access community-driven resource for regulatory annotation. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), 15. doi: 10.1093/nar/gkm967
- Guadano-Ferraz, A., Escamez, M. J., Rausell, E., Bernal, J. (1999). Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J Neurosci*, 19(9), 3430-3439. doi: 10.1523/jneurosci.19-09-03430.1999
- Guan, W., Guyot, R., Samarut, J., Flamant, F., Wong, J., iGauthier, K. C. (2017). Methylcytosine dioxygenase TET3 interacts with thyroid hormone nuclear receptors and stabilizes their association to chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(31), 8229-8234. doi: 10.1073/pnas.1702192114
- Guerra, A., Sapio, M. R., Carrano, M., Di Stasi, V., Volpe, A., Murino, A., . . . Vitale, M. (2013). Prevalence of Dio2(T92A) polymorphism and its association with thyroid autoimmunity. *J Endocrinol Invest*, 36(5), 303-306. doi: 10.3275/8618
- Guyton, A.C. , Hall, J.E. (2017). *Medicinska fiziologija* (13 ed.). Zagreb: Medicinska naklada.
- Hagenbuch, B., Meier, P. J. (1994). Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest*, 93(3), 1326-1331. doi: 10.1172/jci117091
- Hagenbuch, B. (2007). Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21(2), 209-221. doi: 10.1016/j.beem.2007.03.004
- Halbauer, M., Šarčević, B., Tomić Brzac, H. (2001). *Citološko-patohistološki atlas bolesti štitne žlijezde i doštitnih žlijezda s ultrazvučnim slikama*: Nakladni zavod Globus.
- Hansen, P. S., Brix, T. H., Sorensen, T. I., Kyvik, K. O., Hegedus, L. (2004). Major genetic influence on the regulation of the pituitary-thyroid axis: a study of healthy Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(3), 1181-1187. doi: 10.1210/jc.2003-031641
- Heeringa, J., Hoogendoorn, E. H., van der Deure, W. M., Hofman, A., Peeters, R. P., Hop, W. C., . . . Wittteman, J. C. (2008). High-normal thyroid function and risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Arch Intern Med*, 168(20), 2219-2224. doi: 10.1001/archinte.168.20.2219

- Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E. C., de Jong, M., Krenning, E. P., Visser, T. J. (2001). Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev*, 22(4), 451-476. doi: 10.1210/edrv.22.4.0435
- Hingorani, Mohan, Spitzweg, Christine, Vassaux, Georges, Newbold, Kate, Melcher, Alan, Pandha, Hardev, . . . Harrington, Kevin. (2010). The biology of the sodium iodide symporter and its potential for targeted gene delivery. *Current cancer drug targets*, 10(2), 242-267. doi: 10.2174/156800910791054194
- Höglund, P. J., Nordström, K. J.V., Schiöth, H. B., Fredriksson, R. (2010). The Solute Carrier Families Have a Remarkably Long Evolutionary History with the Majority of the Human Families Present before Divergence of Bilaterian Species. *Molecular Biology and Evolution*, 28(4), 1531-1541. doi: 10.1093/molbev/msq350
- Hones, G. S., Rakov, H., Logan, J., Liao, X. H., Werbenko, E., Pollard, A. S., . . . Moeller, L. C. (2017). Noncanonical thyroid hormone signaling mediates cardiometabolic effects in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(52), E11323-e11332. doi: 10.1073/pnas.1706801115
- Horn, K., Koeppen, D., Pickardt, C. R., Scriba, P. C. (1975). Thyroidal autoregulation in nontoxic goiter patients: normalization of the T3/T4 ratio in serum by treatment with potassium iodide. *Klin Wochenschr*, 53(2), 94-95. doi: 10.1007/bf01482716
- Howie, B. N., Donnelly, P., Marchini, J. (2009). A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS genetics*, 5(6), e1000529-e1000529. doi: 10.1371/journal.pgen.1000529
- Hubl, W., Meissner, D., Demant, T., Becker, W., Hormann, R., Bach, M., Mack, M. (2000). Evaluation of the LIAISON thyroid chemiluminescence immunoassays. *Clin Lab*, 46(3-4), 181-189.
- Hulbert, A. J. (2000). Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biological Reviews*, 75(4), 519-631. doi: 10.1111/j.1469-185X.2000.tb00054.x
- Iwasaki, Y., Sunaga, N., Tomizawa, Y., Imai, H., Iijima, H., Yanagitani, N., . . . Mori, M. (2010). Epigenetic inactivation of the thyroid hormone receptor beta1 gene at 3p24.2 in lung cancer. *Ann Surg Oncol*, 17(8), 2222-2228. doi: 10.1245/s10434-010-0956-9
- Jacobsson, J. A., Haitina, T., Lindblom, J., Fredriksson, R. (2007). Identification of six putative human transporters with structural similarity to the drug transporter SLC22 family. *Genomics*, 90(5), 595-609. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.03.017

- Jazdzewski, K., Boguslawska, J., Jendrzewski, J., Liyanarachchi, S., Pachucki, J., Wardyn, K. A., . . . de la Chapelle, A. (2011). Thyroid hormone receptor beta (THRB) is a major target gene for microRNAs deregulated in papillary thyroid carcinoma (PTC). *J Clin Endocrinol Metab*, 96(3), E546-553. doi: 10.1210/jc.2010-1594
- Joseph, B., Ji, M., Liu, D., Hou, P., iXing, M. (2007). Lack of mutations in the thyroid hormone receptor (TR) alpha and beta genes but frequent hypermethylation of the TRbeta gene in differentiated thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(12), 4766-4770. doi: 10.1210/jc.2007-0812
- Karssen, L. C., van Duijn, C. M., Aulchenko, Y. S. (2016). The GenABEL Project for statistical genomics. *F1000Research*, 5, 914-914. doi: 10.12688/f1000research.8733.1
- Kelly, G. S. (2000). Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. *Altern Med Rev*, 5(4), 306-333.
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res*, 12(6), 996-1006. doi: 10.1101/gr.229102
- Kinne, A., Schülein, R., Krause, G. (2011). Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid research*, 4 Suppl 1(Suppl 1), S7-S7. doi: 10.1186/1756-6614-4-s1-s7
- Kinne, A., Wittner, M., Wirth, E. K., Hinz, K. M., Schülein, R., Köhrle, J., Krause, G. (2015). Involvement of the L-Type Amino Acid Transporter Lat2 in the Transport of 3,3'-Diiodothyronine across the Plasma Membrane. *European thyroid journal*, 4(Suppl 1), 42-50. doi: 10.1159/000381542
- Kitzing, T. M., Wang, Y., Pertz, O., Copeland, J. W., Grosse, R. (2010). Formin-like 2 drives amoeboid invasive cell motility downstream of RhoC. *Oncogene*, 29(16), 2441-2448. doi: 10.1038/onc.2009.515
- Knauf, J. A., Elisei, R., Mochly-Rosen, D., Liron, T., Chen, X. N., Gonsky, R., . . . Fagin, J. A. (1999). Involvement of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) in thyroid cell death. A truncated chimeric PKCepsilon cloned from a thyroid cancer cell line protects thyroid cells from apoptosis. *J Biol Chem*, 274(33), 23414-23425. doi: 10.1074/jbc.274.33.23414
- Koepsell, H. (2013). The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 413-435. doi: 10.1016/j.mam.2012.10.010
- Krause, G., Hinz, K. M. (2017). Thyroid hormone transport across L-type amino acid transporters: What can molecular modelling tell us? *Mol Cell Endocrinol*, 458, 68-75. doi: 10.1016/j.mce.2017.03.018

- Kullak-Ublick, G. A., Hagenbuch, B., Stieger, B., Schteingart, CD, Hofmann, AF, Wolkoff, AW, Meier, PJ. (1995). Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology*, *109*, 1274-1282. doi: 10.1016/0016-5085(95)90588-x
- Kullak-Ublick, G. A., Ismail, M. G., Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., . . . Hagenbuch, B. (2001). Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*, *120*(2), 525-533. doi: 10.1053/gast.2001.21176
- Kusić, Z. , Jukić, T., Franceschi, M., Dabelić, N., Rončević, S., Lukinac, Lj., . . . Bence-Žigman, Z. (2009). Smjernice Hrvatskog društva za štitnjaču za racionalnu dijagnostiku poremećaja funkcije štitnjače. *Liječnički Vjesnik*, *131*, 328-338
- Lago-Lestón, R., Iglesias, M.-J., San-José, E., Areal, C., Eiras, A., Araújo-Vilar, D., . . . Domínguez-Gerpe, L. (2009). Prevalence and functional analysis of the S107P polymorphism (rs6647476) of the monocarboxylate transporter 8 (SLC16A2) gene in the male population of north-west Spain (Galicia). *Clinical Endocrinology*, *70*(4), 636-643. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03377.x
- Lanni, A., Moreno, M., Goglia, F. (2016). Mitochondrial Actions of Thyroid Hormone. *Compr Physiol*, *6*(4), 1591-1607. doi: 10.1002/cphy.c150019
- Larsen, P. Reed, Zavacki, Ann Marie. (2012). The role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action. *European thyroid journal*, *1*(4), 232-242. doi: 10.1159/000343922
- Laurberg, P. (1984). Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. *Metabolism*, *33*(4), 379-392. doi: 10.1016/0026-0495(84)90203-8
- Le Pennec, S., Konopka, T., Gacquer, D., Fimereli, D., Tarabichi, M., Tomas, G., . . . Maenhaut, C. (2015). Intratumor heterogeneity and clonal evolution in an aggressive papillary thyroid cancer and matched metastases. *Endocr Relat Cancer*, *22*(2), 205-216. doi: 10.1530/erc-14-0351
- Levy, O., De la Vieja, A., Ginter, C. S., Riedel, C., Dai, G., Carrasco, N. (1998). N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem*, *273*(35), 22657-22663. doi: 10.1074/jbc.273.35.22657
- Levy, S., Sutton, G., Ng, P. C., Feuk, L., Halpern, A. L., Walenz, B. P., . . . Venter, J. C. (2007). The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol*, *5*(10), e254. doi: 10.1371/journal.pbio.0050254

- Li, X., Thyssen, G., Beliakoff, J., Sun, Z. (2006). The Novel PIAS-like Protein hZimp10 Enhances Smad Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23748-23756. doi: 10.1074/jbc.M508365200
- Ling, Y., Xu, X., Hao, J., Ling, X., Du, X., Liu, X., Zhao, X. (2010). Aberrant methylation of the THRB gene in tissue and plasma of breast cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 196(2), 140-145. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2009.09.010
- Linnertz, C., Lutz, M. W., Ervin, J. F., Allen, J., Miller, N. R., Welsh-Bohmer, K. A., . . . Chiba-Falek, O. (2014). The genetic contributions of SNCA and LRRK2 genes to Lewy Body pathology in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 23(18), 4814-4821. doi: 10.1093/hmg/ddu196. Epub 2014 Apr 28.
- Litwack, G. (2018). *Thyroid Hormone*: Elsevier Science.
- Majithia, A. R., Altshuler, D., Hirschhorn, J. N. (2016). Chapter 4 - Genetics of Endocrinology. In S. Melmed, K. S. Polonsky, P. R. Larsen & H. M. Kronenberg (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology* (Thirteenth Edition) (pp. 49-68).
- Malinowski, J. R., Denny, J. C., Bielinski, S. J., Basford, M. A., Bradford, Y., Peissig, P. L., . . . Crawford, D. C. (2014). Genetic variants associated with serum thyroid stimulating hormone (TSH) levels in European Americans and African Americans from the eMERGE Network. *PLoS One*, 9(12), e111301-e111301. doi: 10.1371/journal.pone.0111301
- Mansourian, A. R. (2011). Metabolic pathways of tetraiodothyronine and triiodothyronine production by thyroid gland: a review of articles. *Pak J Biol Sci*, 14(1), 1-12. doi: 10.3923/pjbs.2011.1.12
- Marchini, J., Howie, B. (2010). Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, 11, 499. doi: 10.1038/nrg2796
- Martin, L. J., Crawford, M. H. (1998). Genetic and environmental components of thyroxine variation in Mennonites from Kansas and Nebraska. *Human biology*, 70(4), 745-760.
- Medici, M., van der Deure, W. M., Verbiest, M., Vermeulen, S. H., Hansen, P. S., Kiemeneij, L. A., . . . Peeters, R. P. (2011). A large-scale association analysis of 68 thyroid hormone pathway genes with serum TSH and FT4 levels. *164*(5), 781. doi: 10.1530/eje-10-1130
- Medici, M., Visser, W. E., Visser, T. J., Peeters, R. P. (2015). Genetic determination of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis: where do we stand? *Endocrine Reviews*, 36(2), 214-244. doi: 10.1210/er.2014-1081
- Mendel, C. M., Weisiger, R. A., Jones, A. L., Cavalieri, R. R. (1987). Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study*. *Endocrinology*, 120(5), 1742-1749. doi: 10.1210/endo-120-5-1742

- Mirjanic-Azaric B., Ignjatovic S., Sajinovic N. (2016). The impact of serum triiodothyronine to thyroxine (t3/ t4) ratio in euthyroid subjects. *Annals Thyroid Res.*, 2(2), 66-68.
- Miyauchi, A., Takamura, Y., Ito, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F., . . . Nishikawa, M. (2008). 3,5,3'-Triiodothyronine thyrotoxicosis due to increased conversion of administered levothyroxine in patients with massive metastatic follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(6), 2239-2242. doi: 10.1210/jc.2007-2282
- Moeller, L. C., Cao, X., Dumitrescu, A. M., Seo, H., iRefetoff, S. (2006). Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nuclear receptor signaling*, 4, e020. doi: 10.1621/nrs.04020
- Mondal, S., Raja, K., Schweizer, U., Mughesh, G. (2016). Chemistry and biology in the biosynthesis and action of thyroid hormones. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55(27), 7606-7630. doi: 10.1002/anie.201601116
- Moreno, J. C., Visser, T. J. (2010). Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to iodotyrosine deiodinase (DEHAL1) gene mutations. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 322(1), 91-98. doi: 10.1016/j.mce.2010.03.010
- Moreno, M, Berry, M J, Horst, C, Thoma, R, Goglia, F, Harney, JW, . . . Visser, TJ. (1994). Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. *FEBS Lett*, 344(2-3), 143-146. doi: 10.1016/0014-5793(94)00365-3
- Moreno, M., de Lange, P., Lombardi, A., Silvestri, E., Lanni, A., Goglia, F. (2008). Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid*, 18(2), 239-253. doi: 10.1089/thy.2007.0248
- Morimoto, E., Kanai, Y., Kim, D. K., Chairoungdua, A., Choi, H. W., Wempe, M. F., . . . Endou, H. (2008). Establishment and characterization of mammalian cell lines stably expressing human l-type amino acid transporters. *Journal of Pharmacological Sciences*, 108(4), 505-516. doi: 10.1254/jphs.08232FP
- Mortoglou, A., Candiloros, H. (2004). The serum triiodothyronine to thyroxine (T3/T4) ratio in various thyroid disorders and after Levothyroxine replacement therapy. *Hormones (Athens)*, 3(2), 120-126. doi: 10.14310/horm.2002.11120
- Murphy, E., Gluer, C. C., Reid, D. M., Felsenberg, D., Roux, C., Eastell, R., Williams, G. R. (2010). Thyroid function within the upper normal range is associated with reduced bone mineral density and an increased risk of nonvertebral fractures in healthy euthyroid postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(7), 3173-3181. doi: 10.1210/jc.2009-2630

- Netchine, I., Sobrier, M. L., Krude, H., Schnabel, D., Maghnie, M., Marcos, E., . . . Amselem, S. (2000). Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet*, 25(2), 182-186. doi: 10.1038/76041
- Newton-Cheh, C., Hirschhorn, J. N. (2005). Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res*, 573(1-2), 54-69. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.01.006
- Nielsen, T. R., Appel, E. V., Svendstrup, M., Ohrt, J. D., Dahl, M., Fonvig, C. E., . . . Grarup, N. (2017). A genome-wide association study of thyroid stimulating hormone and free thyroxine in Danish children and adolescents. *PLoS One*, 12(3), e0174204. doi: 10.1371/journal.pone.0174204
- Nigam, Sanjay K., Bush, Kevin T., Martovetsky, Gleb, Ahn, Sun-Young, Liu, Henry C., Richard, Erin, . . . Wu, Wei. (2015). The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective. *Physiological reviews*, 95(1), 83-123. doi: 10.1152/physrev.00025.2013
- Office of Science, U.S. Department of Energy. (2002). *Human Genome News*. Preuzeto s https://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/index.shtml
- Panicker, V, Wilson, SG, Spector, TD, Brown, SJ, Falchi, M, Richards, JB, . . . Walsh, JP. (2008a). Heritability of serum TSH, free T4 and free T3 concentrations: a study of a large UK twin cohort. *Clinical Endocrinology*, 68(4), 652-659. doi: 10.1111/j.1365-2265.2007.03079.x
- Panicker, V., Cluett, C., Shields, B., Murray, A., Parnell, K. S., Perry, J. R., . . . Frayling, T. M. (2008b). A common variation in deiodinase 1 gene DIO1 is associated with the relative levels of free thyroxine and triiodothyronine. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(8), 3075-3081. doi: 10.1210/jc.2008-0397
- Panicker, V., Wilson, S. G., Walsh, J. P., Richards, J. B., Brown, S. J., Beilby, J. P., . . . Spector, T. D. (2010). A locus on chromosome 1p36 is associated with thyrotropin and thyroid function as identified by genome-wide association study. *Am J Hum Genet*, 87(3), 430-435. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.08.005
- Pearson, T. A., Manolio, T. A. (2008). How to interpret a genome-wide association study. *Jama*, 299(11), 1335-1344. doi: 10.1001/jama.299.11.1335
- Peeters, R. P., van Toor, H., Klootwijk, W., de Rijke, Y. B., Kuiper, G. G., Uitterlinden, A. G., Visser, T. J. (2003). Polymorphisms in thyroid hormone pathway genes are associated with plasma TSH and iodothyronine levels in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(6), 2880-2888. doi: 10.1210/jc.2002-021592

- Peeters, R. P., van den Beld, A. W., Attalki, H., Toor, Hv, de Rijke, Y. B., Kuiper, G. G., . . . Visser, T. J. (2005). A new polymorphism in the type II deiodinase gene is associated with circulating thyroid hormone parameters. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289(1), 22. doi: 10.1152/ajpendo.00571.2004
- Peeters, R. P., Visser, T.J. (2012). *Metabolism of Thyroid Hormone*. Endotext: South Dartmouth (MA).
- Pizzagalli, F., Varga, Z., Huber, R. D., Folkers, G., Meier, P. J., St-Pierre, M. V. (2003). Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(8), 3902-3912. doi: 10.1210/jc.2003-030174
- Popovic, M., Matana, A., Torlak, V., Boutin, T., Brdar, D., Gunjaca, I., . . . Zemunik, T. (2019). Genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with free triiodothyronine and thyroid-stimulating hormone. *J Endocrinol Invest*. doi: 10.1007/s40618-019-01030-9
- Porcu, E., Medici, M., Pistis, G., Volpato, C. B., Wilson, S. G., Cappola, A. R., . . . Naitza, S. (2013). A meta-analysis of thyroid-related traits reveals novel loci and gender-specific differences in the regulation of thyroid function. *PLoS Genet*, 9(2), 7. doi: 10.1371/journal.pgen.1003266
- Pruim, R. J., Welch, R. P., Sanna, S., Teslovich, T. M., Chines, P. S., Gliedt, T. P., . . . Willer, C. J. (2010). LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics*, 26(18), 2336-2337. doi: 10.1093/bioinformatics/btq419
- Puzianowska-Kuznicka, M., Pawlik-Pachucka, E., Owczarzewicz, M., Budzinska, M., iPolosak, J. (2013). Small-molecule hormones: molecular mechanisms of action. *Int J Endocrinol*, 2013, 601246. doi: 10.1155/2013/601246
- Ramzan, Khushnooda, Bin-Abbas, Bassam, Al-Jomaa, Lolwa, Allam, Rabab, Al-Owain, Mohammed, Imtiaz, Faiqa. (2017). Two novel LHX3 mutations in patients with combined pituitary hormone deficiency including cervical rigidity and sensorineural hearing loss. *BMC endocrine disorders*, 17(1), 17-17. doi: 10.1186/s12902-017-0164-8
- Ravera, Silvia, Reyna-Neyra, Andrea, Ferrandino, Giuseppe, Amzel, L. Mario, Carrasco, Nancy. (2017). The sodium/iodide symporter (NIS): molecular physiology and preclinical and clinical applications. *Annual review of physiology*, 79, 261-289. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034125
- Rawal, R., Teumer, A., Volzke, H., Wallaschofski, H., Ittermann, T., Asvold, B. O., . . . Homuth, G. (2012). Meta-analysis of two genome-wide association studies identifies four genetic loci associated with thyroid function. *Hum Mol Genet*, 21(14), 3275-3282. doi: 10.1093/hmg/dds136

- Roef, G. L., Rietzschel, E. R., De Meyer, T., Bekaert, S., De Buyzere, M. L., Van daele, C., . . . Taes, Y. E. (2013). Associations between single nucleotide polymorphisms in thyroid hormone transporter genes (MCT8, MCT10 and OATP1C1) and circulating thyroid hormones. *Clin Chim Acta*, *425*, 227-232. doi: 10.1016/j.cca.2013.08.017
- Roth, M., Obaidat, A., Hagenbuch, B. (2012). OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*, *165*(5), 1260-1287. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x
- Rudan, I., Marusić, A., Janković, S., Rotim, K., Boban, M., Lauc, G., . . . Polasek, O. (2009). "10001 Dalmatians:" Croatia launches its national biobank. *Croatian medical journal*, *50*(1), 4-6. doi: 10.3325/cmj.2009.50.4
- Ruhla, S., Weickert, M. O., Arafat, A. M., Osterhoff, M., Isken, F., Spranger, J., . . . Mohlig, M. (2010). A high normal TSH is associated with the metabolic syndrome. *Clin Endocrinol*, *72*(5), 696-701. doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03698.x
- Ruth, K. S., Campbell, P. J., Chew, S., Lim, E. M., Hadlow, N., Stuckey, B. G., . . . Perry, J. R. (2016). Genome-wide association study with 1000 genomes imputation identifies signals for nine sex hormone-related phenotypes. *Eur J Hum Genet*, *24*(2), 284-290. doi: 10.1038/ejhg.2015.102
- Salvatore, D., Davies, T. F., Schlumberger, M.-J., Hay, I. D., Larsen, P. R. (2016). Chapter 11 - Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. In S. Melmed, K. S. Polonsky, P. R. Larsen & H. M. Kronenberg (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition)* (pp. 333-368).
- Samollow, P. B., Perez, G., Kammerer, C. M., Finegold, D., Zwartjes, P. W., Havill, L. M., . . . Barmada, M. M. (2004). Genetic and environmental influences on thyroid hormone variation in Mexican Americans. *J Clin Endocrinol Metab*, *89*(7), 3276-3284. doi: 10.1210/jc.2003-031706
- Schneider, M. J., Fiering, S. N., Thai, B., Wu, S. Y., St Germain, E., Parlow, A. F., . . . Galton, V. A. (2006). Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology*, *147*(1), 580-589. doi: 10.1210/en.2005-0739
- Schussler, G. C. (2000). The thyroxine-binding proteins. *Thyroid*, *10*(2), 141-149. doi: 10.1089/thy.2000.10.141
- Schweizer, U., Johannes, J., Bayer, D., Braun, D. (2014). Structure and function of thyroid hormone plasma membrane transporters. *European Thyroid Journal*, *3*(3), 143-153. doi: 10.1159/000367858

- Senee, V., Chelala, C., Duchatelet, S., Feng, D., Blanc, H., Cossec, J. C., . . . Julier, C. (2006). Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. *Nat Genet*, 38(6), 682-687. doi: 10.1038/ng1802
- Sesnilo, G., Simó, O., Choque, L., Casamitjana, R., Puig-Domingo, M., Halperin, I. (2011). Serum free triiodothyronine (T3) to free thyroxine (T4) ratio in treated central hypothyroidism compared with primary hypothyroidism and euthyroidism. *Endocrinología y Nutrición*, 58(1), 9-15. doi: 10.1016/j.endonu.2010.09.006
- Seto, S., Tsujimura, K., Koide, Y. (2011). Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic*, 12(4), 407-420. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01165.x
- Sevilla, L., Nachat, R., Groot, K., iWatt, F. (2008). Kazrin regulates keratinocyte cytoskeletal networks, intercellular junctions and differentiation. *Journal of Cell Science*, 121, 3561-3569. doi: 10.1242/jcs.029538
- Shin, H. J., Anzai, N., Enomoto, A., He, X., Kim, D. K., Endou, H., Kanai, Y. (2007). Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate. *Hepatology*, 45(4), 1046-1055. doi: 10.1002/hep.21596
- Siddiqui, I. J., Pervaiz, N., Abbasi, A. A. (2016). The Parkinson Disease gene SNCA: Evolutionary and structural insights with pathological implication. *Scientific reports*, 6, 24475-24475. doi: 10.1038/srep24475
- Smith, N. F., Figg, W. D., Sparreboom, A. (2005). Role of the liver-specific transporters OATP1B1 and OATP1B3 in governing drug elimination. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 1(3), 429-445. doi: 10.1517/17425255.1.3.429
- Soh, H., i Goldstein, S. A. N. (2008). I SA channel complexes include four subunits each of DPP6 and Kv4.2. *J Biol Chem*, 283(22), 15072-15077. doi: 10.1074/jbc.M706964200
- Solter, M. (2007). *Bolesti štitnjače : klinička tireoidologija*. Zagreb: Medicinska naklada.
- Sorensen, H. G., van der Deure, W. M., Hansen, P. S., Peeters, R. P., Breteler, M. M., Kyvik, K. O., . . . Visser, T. J. (2008). Identification and consequences of polymorphisms in the thyroid hormone receptor alpha and beta genes. *Thyroid*, 18(10), 1087-1094. doi: 10.1089/thy.2008.0236
- Strop, P., Bankovich, A. J., Hansen, K. C., Garcia, K. C., iBrunger, A. T. (2004). Structure of a human A-type potassium channel interacting protein DPPX, a member of the dipeptidyl aminopeptidase family. *Journal of molecular biology*, 343(4), 1055-1065. doi: 10.1016/j.jmb.2004.09.003

- Struchalin, M. V., Amin, N., Eilers, P. H. C., van Duijn, C. M., Aulchenko, Y. S. (2012). An R package "VariABEL" for genome-wide searching of potentially interacting loci by testing genotypic variance heterogeneity. *BMC genetics*, 13, 4-4. doi: 10.1186/1471-2156-13-4
- Sudmant, P. H., Rausch, T., Gardner, E. J., Handsaker, R. E., Abyzov, A., Huddleston, J., . . . The Genomes Project, Consortium. (2015). An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*, 526(7571), 75-81. doi: 10.1038/nature15394
- Sugiyama, D., Kusuhara, H., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Nozaki, Y., Aburatani, H., Sugiyama, Y. (2003). Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem*, 278(44), 43489-43495. doi: 10.1074/jbc.M306933200
- Tamarin, R. H. (1999). *Principles of Genetics* (6th ed.). Boston: McGraw-Hill.
- Takamatsu, J., Kuma, K., Mozai, T. (1986). Serum triiodothyronine to thyroxine ratio: a newly recognized predictor of the outcome of hyperthyroidism due to Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 62(5), 980-983. doi: 10.1210/jcem-62-5-980
- Takeda, S., Fujiwara, T., Shimizu, F., Kawai, A., Shinomiya, K., Okuno, S., . . . Hirai, Y. (1997). Isolation and mapping of karyopherin alpha 3 (KPNA3), a human gene that is highly homologous to genes encoding *Xenopus* importin, yeast SRP1 and human RCH1. *Cytogenet Cell Genet*, 76(1-2), 87-93. doi: 10.1159/000134521
- Taylor, J. P., Metcalfe, R. A., Watson, P. F., Weetman, A. P., Trembath, R. C. (2002). Mutations of the PDS gene, encoding pendrin, are associated with protein mislocalization and loss of iodide efflux: implications for thyroid dysfunction in pendred syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(4), 1778-1784. doi: 10.1210/jcem.87.4.8435
- Taylor, P. N., Razvi, S., Pearce, S. H., Dayan, C. M. (2013). Clinical review: A review of the clinical consequences of variation in thyroid function within the reference range. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(9), 3562-3571. doi: 10.1210/jc.2013-1315
- Taylor, P. N., Porcu, E., Chew, S., Campbell, P. J., Traglia, M., Brown, S. J., . . . Wilson, S. G. (2015). Whole-genome sequence-based analysis of thyroid function. *Nat Commun*, 6(5681). doi: 10.1038/ncomms6681
- Team, R Core. (2017). R: A Language and Environment for Statistical Computing. from R Foundation for Statistical Computing, <https://www.R-project.org/>
- Teumer, A., Chaker, L., Groeneweg, S., Li, Y., Di Munno, C., Barbieri, C., . . . Medici, M. (2018). Genome-wide analyses identify a role for SLC17A4 and AADAT in thyroid hormone regulation. *Nature communications*, 9(1), 4455-4455. doi: 10.1038/s41467-018-06356-1

- Thomas, S. R., McTamney, P. M., Adler, J. M., Laronde-Leblanc, N., Rokita, S. E. (2009). Crystal structure of iodotyrosine deiodinase, a novel flavoprotein responsible for iodide salvage in thyroid glands. *J Biol Chem*, 284(29), 19659-19667. doi: 10.1074/jbc.M109.013458
- Toft, A. D. (2001). Clinical practice. Subclinical hyperthyroidism. *N Engl J Med*, 345(7), 512-516. doi: 10.1056/NEJMcp010145
- Togawa, N., Miyaji, T., Izawa, S., Omote, H., Moriyama, Y. (2012). A Na⁺-phosphate cotransporter homologue (SLC17A4 protein) is an intestinal organic anion exporter. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302(11), C1652-1660. doi: 10.1152/ajpcell.00015.2012
- Tong, Z., Li, H., Goljer, I., McConnell, O., Chandrasekaran, A. (2007). In vitro glucuronidation of thyroxine and triiodothyronine by liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos*, 35(12), 2203-2210. doi: 10.1124/dmd.107.016972
- Tuccilli, C., Baldini, E., Sorrenti, S., Di Gioia, C., Bosco, D., Ascoli, V., . . . Ulisse, S. (2015). Papillary thyroid cancer is characterized by altered expression of genes involved in the sumoylation process. *J Biol Regul Homeost Agents*, 29(3), 655-662.
- van der Deure, W. M., Peeters, R. P., Visser, T. J. (2007). Genetic variation in thyroid hormone transporters. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21(2), 339-350. doi: 10.1016/j.beem.2007.03.006
- van der Deure, W.M., Hansen, P.S., Peeters, R P., Kyvik, K.O., Friesema, E.C., Hegedus, L., Visser, T.J. (2008a). Thyroid hormone transport and metabolism by organic anion transporter 1C1 and consequences of genetic variation. *Endocrinology*, 149(10), 5307-5314. doi: 10.1210/en.2008-0430
- van der Deure, WM., Friesema, EC., de Jong, F.J., de Rijke, Y.B., de Jong, F.H., Uitterlinden, A.G., . . . Visser, TJ. (2008b). Organic anion transporter 1B1: an important factor in hepatic thyroid hormone and estrogen transport and metabolism. *Endocrinology*, 149(9), 4695-4701. doi: 10.1210/en.2008-0169
- van der Deure, W. M., Peeters, R. P., Visser, T. J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *J Mol Endocrinol*, 44(1), 1-11. doi: 10.1677/JME-09-0042
- van der Spek, Anne H., Fliers, Eric, Boelen, Anita. (2017). The classic pathways of thyroid hormone metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 458, 29-38. doi: 10.1016/j.mce.2017.01.025

- Virion, A., Pommier, J., Deme, D., Nunez, J. (1981). Kinetics of thyroglobulin iodination and thyroid hormone synthesis catalyzed by peroxidases: the role of H₂O₂. *Eur J Biochem*, *117*(1), 103-109. doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06308.x
- Visser, T. J. (1994). Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chem Biol Interact*, *92*(1-3), 293-303. doi: 10.1016/0009-2797(94)90071-x
- Visser, W. E., Wong, W. S., van Mullem, A. A., Friesema, E. C., Geyer, J., Visser, T. J. (2010). Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family. *Mol Cell Endocrinol*, *315*(1-2), 138-145. doi: 10.1016/j.mce.2009.08.003
- Visser, W. E., Friesema, E. C., Visser, T. J. (2011). Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol*, *25*(1), 1-14. doi: 10.1210/me.2010-0095
- Wang, Q-X., Chen, E-D., Cai, Y-F., Li, Q., Jin, Y-X., Jin, W-X, . . . Zhang, X-H. (2016). A panel of four genes accurately differentiates benign from malignant thyroid nodules. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *35*(1), 169. doi: 10.1186/s13046-016-0447-3
- Wang, Q., Liu, M., Li, X., Chen, L., iTang, H. (2009). Kazrin F is involved in apoptosis and interacts with BAX and ARC. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *41*, 763-772. doi: 10.1093/abbs/gmp065
- Wilkin, T. J., Isles, T. E. (1984). The behavior of the triiodothyronine/thyroxine (T₃/T₄) ratio in normal individuals, and its implications for the regulation of euthyroidism. *J Endocrinol Invest*, *7*(4), 319-322. doi: 10.1007/bf03351009
- Wojcicka, A., Piekielko-Witkowska, A., Kedzierska, H., Rybicka, B., Poplawski, P., Boguslawska, J., . . . Nauman, A. (2014). Epigenetic regulation of thyroid hormone receptor beta in renal cancer. *PLoS one*, *9*(5), e97624-e97624. doi: 10.1371/journal.pone.0097624
- Wolff, J. (1998). Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacol Rev*, *50*(1), 89-105.
- Wu, S. Y., Green, W. L., Huang, W. S., Hays, M. T., Chopra, I. J. (2005). Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid*, *15*(8), 943-958. doi: 10.1089/thy.2005.15.943
- Wu, W., Baker, M. E., Eraly, S. A., Bush, K. T., Nigam, S. K. (2009). Analysis of a large cluster of SLC22 transporter genes, including novel USTs, reveals species-specific amplification of subsets of family members. *Physiol Genomics*, *38*(2), 116-124. doi: 10.1152/physiolgenomics.90309.2008
- Wu, Y., Yu, L., Bi, G., Luo, K., Zhou, G., Zhao, S. (2003). Identification and characterization of two novel human SCAN domain-containing zinc finger genes ZNF396 and ZNF397. *Gene*, *310*, 193-201. doi: 10.1016/s0378-1119(03)00551-1

- Xiao, Sen, Dorris, Martha L., Rawitch, Allen B., Taurog, Alvin. (1996). Selectivity in Tyrosyl Iodination Sites in Human Thyroglobulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 334(2), 284-294. doi: 10.1006/abbi.1996.0457
- Xu, Y., Xu, C., Kato, A., Tempel, W., Abreu, J. G., Bian, C., . . . Shi, Y. G. (2012). Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell*, 151(6), 1200-1213. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.014
- Yamada, Y., Sakuma, J., Takeuchi, I., Yasukochi, Y., Kato, K., Oguri, M., . . . Tanaka, M. (2017). Identification of TNFSF13, SPATC1L, SLC22A25 and SALL4 as novel susceptibility loci for atrial fibrillation by an exomewide association study. *Mol Med Rep*, 16(5), 5823-5832. doi: 10.3892/mmr.2017.7334
- Yates, Andrew, Akanni, Wasiiu, Amode, M. Ridwan, Barrell, Daniel, Billis, Konstantinos, Carvalho-Silva, Denise, . . . Flicek, Paul. (2015). Ensembl 2016. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D710-D716. doi: 10.1093/nar/gkv1157
- Yee, S. W., Stecula, A., Chien, H-C., Zou, L., Feofanova, E. V., van Borselen, M., . . . Giacomini, K. M. (2019). Unraveling the functional role of the orphan solute carrier, SLC22A24 in the transport of steroid conjugates through metabolomic and genome-wide association studies. *bioRxiv*, 648238. doi: 10.1101/648238
- Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews*, 81(3), 1097-1142. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1097
- Zergollern, Ljiljana. (1994). *Humana genetika: odabrana poglavlja*. Hrvatska: Medicinska naklada.
- Zevenbergen, C., Meima, M. E., Lima de Souza, E. C., Peeters, R. P., Kinne, A., Krause, G., . . . Visser, T. J. (2015). Transport of Iodothyronines by Human L-Type Amino Acid Transporters. *Endocrinology*, 156(11), 4345-4355. doi: 10.1210/en.2015-1140
- Zhan, M., Chen, G., Pan, C. M., Gu, Z. H., Zhao, S. X., Liu, W., . . . Song, H. D. (2014). Genome-wide association study identifies a novel susceptibility gene for serum TSH levels in Chinese populations. *Hum Mol Genet*, 23(20), 5505-5517. doi: 10.1093/hmg/ddu250
- Zhang, X., Li, D., Li, M., Ye, M., Ding, L., Cai, H., . . . Lv, Z. (2014). MicroRNA-146a targets PRKCE to modulate papillary thyroid tumor development. *Int J Cancer*, 134(2), 257-267. doi: 10.1002/ijc.28141
- Zheng-Bradley, X., Flicek, P.. (2016). Applications of the 1000 Genomes Project resources. *Briefings in Functional Genomics*, 16(3), 163-170. doi: 10.1093/bfpg/elw027

- Zhu, Xi-ling, Zeng, Yuan-feng, Guan, Jian, Li, Yu-fa, Deng, Yong-jian, Bian, Xiu-wu, . . . Liang, Li. (2011). FMNL2 is a positive regulator of cell motility and metastasis in colorectal carcinoma. *The Journal of Pathology*, 224(3), 377-388. doi: 10.1002/path.2871
- Zondervan, K. T. (2011). Chapter 3 - Genetic Association Study Design. In E. Zeggini & A. Morris (Eds.), *Analysis of Complex Disease Association Studies* (pp. 25-48). San Diego: Academic Press.

8. KRATKI ŽIVOTOPIS

Obrazovanje:

- Diplomski studij (2004. – 2010.)
Prirodoslovno-matematički fakultet, smjer - molekularna biologija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Radno iskustvo:

- Asistent na Katedri za medicinsku biologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Split (2014. – danas)
- Citogenetičar u „Laboratoriju za humanu genetiku“, Klinički bolnički centar Split, Split (2012. – 2013.)

Nagrade:

- Nagrada mladog istraživača („**Young investigator award**“) za najbolju kratku oralnu prezentaciju prezentirano na „Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies“, Split (2017.)

Publikacije:

1. Matana A, Boutin T, Torlak V, Brdar D, **Gunjača I**, Kolčić I, et al. Genome-wide analysis identifies two susceptibility loci for positive thyroid peroxidase and thyroglobulin antibodies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019;105(3).
2. Matana A, Popović M, Boutin T, Torlak V, Brdar D, **Gunjača I**, i sur. Genetic Variants in the ST6GAL1 Gene Are Associated with Thyroglobulin Plasma Level in Healthy Individuals. *Thyroid*. 2019;13(10)
3. Popović M, Matana A, Torlak V, Boutin T, Brdar D, **Gunjača I**, i sur. Genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with free triiodothyronine and thyroid-stimulating hormone. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2019;7(10):019-01030
4. **Gunjača I**, Matana A, Boutin T, Torlak V, Punda A, Polašek O, i sur. Genome-wide association meta-analysis for total thyroid hormone levels in Croatian population. *Journal of human genetics*. 2019;64(5):473-80.
5. Popović M, Matana A, Torlak V, Brdar D, **Gunjača I**, Boraska Perica V, i sur. The effect of multiple nutrients on plasma parathyroid hormone level in healthy individuals. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2019:1-7.
6. Brčić L, Barić A, Gračan S, Brekalo M, Kaličanin D, **Gunjača I**, i sur. Genome-wide association analysis suggests novel loci for Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2019;42(5):567-76.
7. Matana A, Popović M, Boutin T, Torlak V, Brdar D, **Gunjača I**, i sur. Genome-wide meta-analysis identifies novel gender specific loci associated with thyroid antibodies level in Croatians. *Genomics*. 2019;111(4):737-43
8. Matana A, Brdar D, Torlak V, Boutin T, Popović M, **Gunjača I**, i sur. Genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with parathyroid hormone level. *Molecular Medicine*. 2018;24(1):15.
9. Boljat A, **Gunjača I**, Konstatinović I, Vidan N, Boraska Perica V, Pehlić M, Škrabić V, Zemunik T. Environmental Risk Factors for Type 1 Diabetes Mellitus Development. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2017;125(08): 563-570
10. Brčić L, Gračan S, Barić A, **Gunjača I**, Torlak Lovrić V, Kolčić I, Zemunik T, Polašek O, Barbalić M, Punda A, Boraska Perica V. Association of Established Thyroid-stimulating Hormone and Free Thyroxine Genetic Variants with Hashimoto's Thyroiditis. *Immunological Investigations*. 2017;46(6):625-38

11. Barić A, Brčić L, Gračan S, Torlak Lovrić V, **Gunjača I**, Šimunac M, Brekalo M, Boban M, Polašek, O, Barbalić M, Zemunik T, Punda A, Boraska Perica V. Association of established hypothyroidism-associated genetic variants with Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2017;40(10):1061-7
12. Vulić R, Čulić V, Misković S, **Gunjača I**, Roje D, Lasan R, Pavelić J. Prenatal diagnosis with genetic counseling in UHC Split, Croatia. *Int. J. of Adv. Res.* 2017, 5 (3). 1272-1276
13. Cherepnalkovski AP, Zemunik T, Glamocanin S, Piperkova K, **Gunjača I**, Kocheva S, Jovanova BC, Krzelj V. Molecular Characterization of Glucose-6-phosphate dehydrogenase Deficiency in Families from the Republic of Macedonia and Genotype-phenotype Correlation. *Med Arh.* (2015), 69(5): 284-288