

*Università degli Studi del Piemonte Orientale*  
*“Amedeo Avogadro”*



*Dottorato di Ricerca*  
*in*  
*Medicina Molecolare*

*Ciclo XXIV*

*RELAZIONE 2° anno*

*Analisi molecolare e studio di funzione del gene TSHR in  
soggetti con ipotiroidismo subclinico*

*Candidato:*  
**Stefania Moia**

*Responsabile Scientifico:*  
**Prof. G. Bona**

# SEZIONE 1

## Risultati scientifici

### 1. Introduzione

#### Asse ipotalamo-ipofisario

La tiroide è una ghiandola endocrina, di tipo follicolare, localizzata nella regione anteriore del collo; produce due ormoni, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), regolatori della crescita e del metabolismo e secerne inoltre un altro ormone, la calcitonina, coinvolto nella regolazione del calcio (1).

La secrezione e la sintesi degli ormoni tiroidei sono controllate da due ghiandole situate nell'area cerebrale: l'ipofisi e l'ipotalamo. La prima ha lo scopo di produrre la tireotropina, nota anche con la sigla TSH (thyroid-stimulating hormone), la quale ha il compito di incrementare la produzione degli ormoni T3 e T4, esercitando un'azione trofica sulla tiroide con conseguente ipertrofia delle sue cellule follicolari. L'ipotalamo, a sua volta, influisce sulla regolazione del TSH tramite la produzione dell'ormone liberante la tireotropina, noto anche con la sigla TRH (thyrotropin-releasing hormone). Questa regolazione è nota con il nome di asse ipotalamo-ipofisario (Figura 1).

La tireotropina è una glicoproteina prodotta dall'ipofisi anteriore ed è composta da due subunità proteiche, alfa e beta, che unite formano l'ormone vero e proprio; la subunità alfa è del tutto simile a quella di altre tropine ipofisarie (FSH, LH, HCG), mentre la subunità beta è diversa per ciascuno di queste molecole conferendo loro la specificità biologica (1).

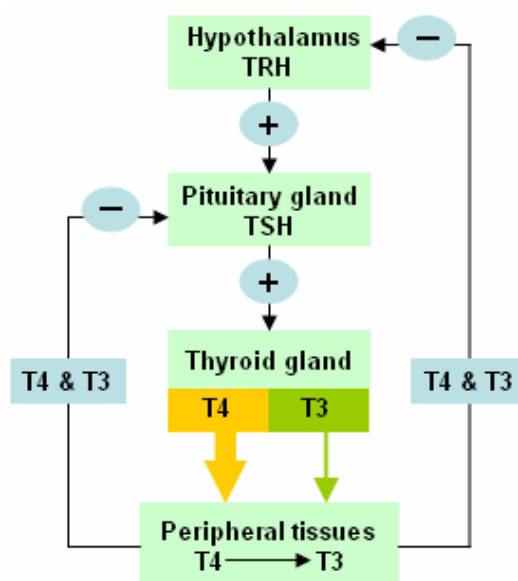


Figura 1. Asse ipotalamo-ipofisario

Gli ormoni tiroidei sono prodotti a partire dall'aminoacido tirosina ed esercitano diversi effetti sulla differenziazione, sulla crescita e sul metabolismo grazie all'interazione con i loro recettori nucleari. La tirosina necessaria alla sintesi è ricavata dalla degradazione della tireoglobulina.

La tireoglobulina è una glicoproteina dimerica di 660kDa, sintetizzata dai tireociti, cioè dalle cellule epiteliali che rivestono i follicoli tiroidei ed è la componente principale della sostanza colloide che si trova nel lume follicolare. Sulla membrana apicale del tireocita l'enzima tireoperossidasi (TPO), attraverso il meccanismo della perossidazione, catalizza l'organificazione dello iodio presente nei residui tirosinici della tireoglobulina; i residui di tirosina vengono così iodurati a formare 3-monoiodotirosina (MIT) e 3,5-diiodotirosina (DIT). Lo iodio necessario alla reazione viene trasportato all'interno del tireocita grazie all'azione di un simporto sodio-iodio localizzato sulla membrana delle cellule della tiroide ( $\text{Na}^+\text{-I}$  Symporter). Un residuo di MIT e uno di DIT per condensazione formeranno all'interno del lume follicolare 3,5,3'-triiodotironina ( $\text{T}_3$ ) mentre due residui di DIT daranno origine ad una molecola di tiroxina ( $\text{T}_4$ ) (2).

Esiste un raffinato meccanismo di controllo retroattivo tra la produzione di TSH e la produzione di ormoni tiroidei: questi ultimi, al crescere della loro concentrazione, inibiscono il TSH che pertanto cessa di stimolarne la produzione consentendone un abbassamento in circolo; bassi livelli, d'altra parte, stimolano la produzione di TSH che, stimolando la tiroide, riporta i livelli degli ormoni tiroidei ai valori normali. Il ruolo del TSH è quindi sostanzialmente quello di regolare la proliferazione delle cellule della tiroide e mantenere nei livelli fisiologici i livelli degli ormoni tiroidei (Figura 1).

Deficienze nella produzione o nell'attività degli ormoni tiroidei portano ad ipotiroidismo, una delle più frequenti disfunzioni ormonali riscontrabile in età pediatrica; l'ipotiroidismo è classificabile come terziario se ipotalamico, secondario se ipofisario oppure primario se tiroideo (2).

### Ipotiroidismo subclinico

Le patologie a carico della tiroide sono molte e dovute a diverse cause. Di nostro interesse in questo studio è la condizione denominata ipotiroidismo subclinico idiopatico, un disordine caratterizzato da una elevata concentrazione sierica di TSH associata a valori di ormoni tiroidei nella norma (3).

L'ipotiroidismo subclinico ha una prevalenza nella popolazione adulta dell'1-10% (4) mentre tale prevalenza è inferiore al 2% in età pediatrica anche se gli studi a riguardo su bambini o adolescenti sono ancora limitati (5,6).

Sebbene nella maggior parte dei casi la patologia rimanga stabile nel tempo (70-80% a 10 anni), è ormai noto che solo in una piccola percentuale di casi l'ipotiroidismo può regredire; spesso

l'ipotiroidismo subclinico può purtroppo evolvere verso l' ipotiroidismo conclamato, anche se tale condizione è però molto più frequente nelle forme autoimmuni.

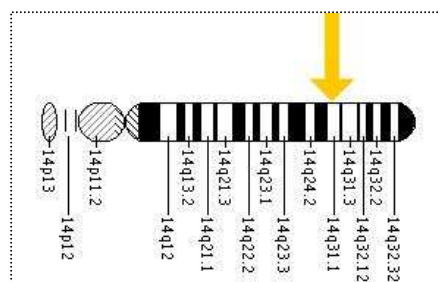
La diagnosi di ipotiroidismo subclinico è determinata solitamente da analisi effettuate in laboratorio in quanto in genere i pazienti sono asintomatici e non manifestano segni o sintomi di disfunzionalità tiroidea. Il principale segno clinico rilevabile nei pazienti è il gozzo, doppiamente frequente nei soggetti ipotiroidei rispetto alla popolazione normale (3); sintomi frequentemente associati sono anche l'aumento di peso, livelli elevati di colesterolo, scarsa velocità di crescita, anemia, sonnolenza, debolezza e scarso sviluppo psicomotorio e cognitivo (6,7).

Molte patologie sia tiroidee che extra-tiroidee sono associabili alla patogenesi di ipotiroidismo subclinico (8); tra quelle correlabili alla tiroide le più frequenti sono la carenza iodica, la tiroidite di Hashimoto e il morbo di Graves mentre le extratiroidee comprendono il diabete mellito, la fibrosi cistica, il morbo celiaco e l'insufficienza renale cronica (3). La terapia esistente è a base di somministrazioni di L-tiroxina, ma considerato che nel 40% dei casi i livelli di TSH scendono a livelli normali spontaneamente esistono pareri contrastanti sulla necessità di trattamento (2).

In letteratura è stato ampiamente dimostrato il coinvolgimento anche di una componente genetica responsabile dell'insorgenza dell'ipotiroidismo subclinico; in particolare nel corso di questi anni è stata notata la relazione esistente tra la presenza di mutazioni localizzate nei geni codificanti per proteine coinvolte nel signaling del TSH e del suo recettore e la patogenesi di ipotiroidismo subclinico.

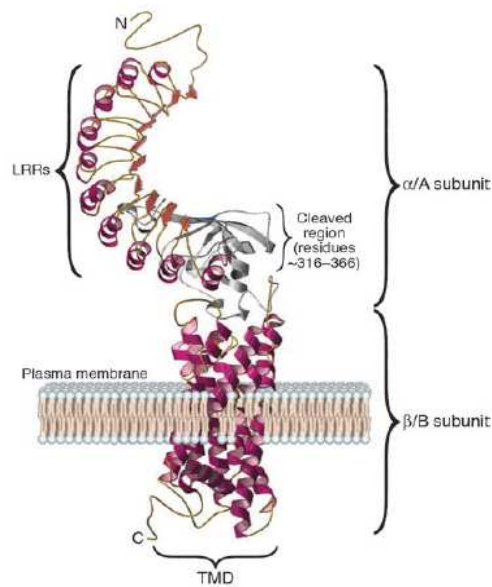
### Il recettore del TSH (TSHR)

Il TSH esercita la sua azione legandosi al dominio extracellulare del suo recettore. Il TSHR è un classico recettore accoppiato a proteine G formato da sette eliche transmembrana ed è presente sulla membrana basolaterale delle cellule follicolari della tiroide. Il gene umano per il TSHR è localizzato sul cromosoma 14q31, è formato da 10 esoni, si estende per oltre 60 kb e codifica per una proteina di 764 aminoacidi (Figura 2) (9).



**Figura 2.** Il gene umano per il TSHR è localizzato sul cromosoma 14q31

Il TSHR è composto da due subunità, denominate  $\alpha$  e  $\beta$ , codificate dallo stesso gene e unite da ponti disolfuro; la subunità  $\alpha$  comprende il dominio extracellulare mentre la subunità  $\beta$  contiene la porzione di recettore ancorata alla membrana e il dominio intracellulare (figura 3) (10). L'instaurarsi di interazioni intramolecolari tra il dominio extracellulare e i loop del dominio transmembrana mantengono il recettore in una conformazione chiusa e inattiva.



**Figura 3.** Modello strutturale del TSHR con evidenziate le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  e i 7 domini transmembrana (10)

Il TSHR è caratterizzato da un segmento aminoterminale glicosilato responsabile del legame ad alta affinità con il TSH, codificato dai primi nove esoni, mentre l'esone 10 codifica per i sette domini transmembrana e la coda citoplasmatica; inoltre una sequenza segnale di 21 aminoacidi precede il grande dominio extracellulare (11). La glicosilazione della porzione di legame, caratterizzata dal classico "leucine repeat motifs" (LRRs), è indispensabile per il legame ad alta affinità con l'ormone.

Un taglio proteolitico post-traduzionale divide il TSHR nelle sue due subunità, grazie alla rimozione di un segmento polipeptidico di 50 aminoacidi che si estende dal residuo 316 al residuo 366 (Figura 3); i ponti disolfuro sono ridotti grazie a proteine disolfuro isomerasi che portano al rilascio della subunità  $\alpha$  dalla porzione ancorata alla membrana e alla conseguente maturazione del recettore. La rimozione di questa porzione aminoacidica porta ad una forma recettoriale attiva in grado di legare l'ormone (12).

Il corretto folding del dominio extracellulare è garantito dalla formazione di ponti disolfuro; tale dominio infatti contiene 11 residui di cisteina e si è potuto osservare che 8 di queste cisteine

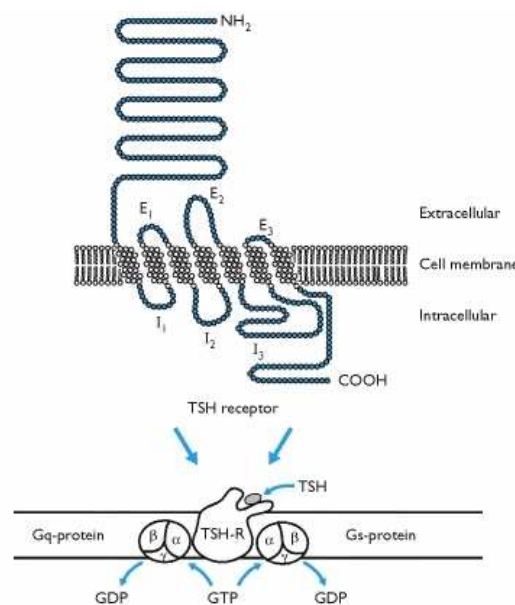
presenti nella struttura nel TSHR sono altamente conservate nella sequenza di tutti i recettori che legano ormoni glicoproteici. La presenza dei ponti disolfuro è necessaria non solo per il corretto folding recettoriale ma anche per la formazione di strutture dimeriche funzionalmente attive del TSHR.

Alcuni aminoacidi sono indispensabili per la corretta funzionalità recettoriale. In particolare è noto che la cisteina in posizione 41 è cruciale per la formazione e il mantenimento del sito di legame per il TSH, in quanto studi precedenti in vitro hanno dimostrato che la perdita di tale cisteina causa la mancata formazione del ponte disolfuro e l'impossibilità di legare l'ormone (13).

Il TSHR, oltre che sulla membrana basolaterale delle cellule follicolari della tiroide, è espresso anche in tessuti extra-tiroidali; la presenza dell'RNA messaggero del TSHR è stata rilevata anche in fibroblasti, adipociti, linfociti, specifiche regioni del cervello, ghiandola surrenale, miociti cardiaci, fegato e timo, anche se gli studi a riguardo sono ancora limitati (14,15). Il TSHR subisce una regolazione in base al tempo di emivita dell'RNA messaggero del suo ligando TSH: in caso di elevate concentrazioni di TSH il recettore viene down-regolato (16).

### Signaling cellulare del TSHR

I cambiamenti strutturali nel TSHR, prodotti dall'interazione con l'ormone TSH, attivano le proteine G accoppiate al recettore; queste proteine G contengono tre subunità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ : la dissociazione della subunità  $\alpha$  dal complesso  $\beta\gamma$  e la conversione delle molecole di GDP in GTP porta alla trasduzione del segnale e infine alla risposta cellulare (Figura 4) (17).

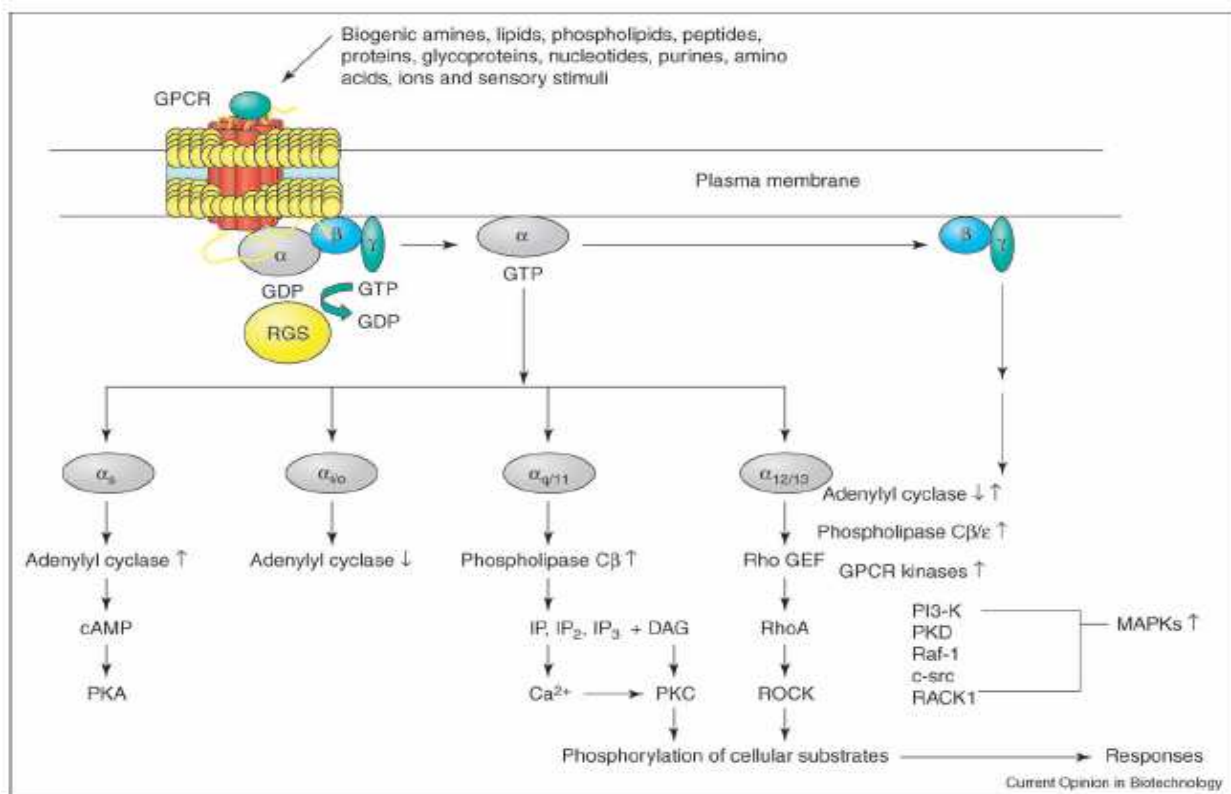


**Figura 4.** Meccanismo d'azione del TSHR: il legame dell'ormone attiva le proteine G associate al recettore e stimola la conversione del GDP in GTP

E' stato dimostrato che il recettore del TSH è in grado di legare due tipi di proteine G, quelle contenenti la subunità di tipo  $\alpha_s$  oppure quelle legate alla subunità  $\alpha_{q/11}$  (Figura 5) (17).

Le proteine G associate alla subunità  $\alpha_s$  stimolano la via di trasduzione del segnale legata all'adenilato ciclasi, che porta alla produzione del secondo messaggero AMP ciclico (cAMP) e all'attivazione successiva della proteina chinasi A (PKA).

Le proteine G contenenti la subunità  $\alpha_{q/11}$  stimolano invece la via della fosfolipasi C (PLC). La fosfolipasi C porta alla conversione dell'inositolo 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) in inositolo 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerolo (DAG). Il conseguente rilascio di Ca<sup>2+</sup> intracellulare attiva la proteina chinasi C (PKC). L'effetto finale è il mantenimento della crescita e della funzionalità delle cellule della tiroide. Nell'uomo è ormai noto che sono necessarie concentrazioni più elevate di TSH per attivare questa seconda via di trasduzione del segnale accoppiata all'inositolo fosfato rispetto alla via dell'cAMP (17).



**Figura 5.** Vie di trasduzione del segnale dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR). Il recettore del TSH è in grado di legare due tipi di proteine G: contenenti la subunità di tipo  $\alpha_s$  oppure la subunità  $\alpha_{q/11}$ . Si attivano così due vie di trasduzione del segnale differenti, con attivazione della Proteina chinasi A (PKA) o alternativamente della Proteina chinasi C (PKC) (18).

## Mutazioni note presenti nel gene del TSHR

Negli ultimi anni sono state identificate nell'uomo numerose mutazioni puntiformi localizzate nelle regioni codificanti del gene del TSHR, risultate responsabili di vari difetti strutturali nella proteina da esso prodotta. Inoltre un elevato numero di polimorfismi di un singolo nucleotide (SNP) e microsatelliti sono stati identificati nel locus del TSHR.

Le mutazioni riscontrate nel gene del TSHR sono suddivisibili in due categorie, germinali oppure somatiche.

E' stato dimostrato che alcune mutazioni germinali possano essere la causa dell'insorgere dell'ipertiroidismo congenito, incrementando l'attività basale del recettore e rendendolo costitutivamente attivo anche in assenza del ligando (mutazioni gain of function) (11).

Altre mutazioni germinali interferiscono invece con la normale funzionalità recettoriale e sono così associabili alla resistenza al TSH e all'ipotiroidismo congenito (mutazioni loss of function) (19).

Le mutazioni di tipo somatico invece portano ad un fenotipo clinico diverso rappresentato dall'adenoma tossico di Plummer e dal gozzo multinodulare tossico e, anche se più raramente, dal carcinoma tiroideo.

La condizione di ipotiroidismo subclinico è spesso causata da mutazioni di tipo loss of function distribuite lungo l'intera sequenza del TSHR (Figura 6). Sono state descritte mutazioni missenso (con sostituzione di un aminoacido con un altro), nonsense (con introduzione di un codone di stop) oppure delezioni, inserzioni o mutazioni nei siti di splicing.

Studi precedenti hanno dimostrato che la presenza di mutazioni missenso nel dominio extracellulare del TSHR può essere la causa di una ridotta o di una completa impossibilità di legare l'ormone; la maggior parte delle mutazioni riportate in questa regione sono caratterizzate da una ridotta espressione del recettore sulla superficie cellulare; ciò può essere dovuto probabilmente a un misfolding del recettore incompatibile con la sua esportazione dal reticolo endoplasmatico e la corretta inserzione nella membrana plasmatica. Il mancato legame con l'ormone porta così alla conseguente abolizione di tutto il signaling cellulare.

Il TSH si lega al dominio extracellulare del recettore codificato dai primi 400 residui aminoacidici; studi in vitro hanno però dimostrato che la delezione dei residui 38-45 impedisce il legame dell'ormone al recettore, mentre la perdita dei residui 317-366, invece, non influenza il legame e neanche il conseguente accumulo di cAMP (20,21).

Le mutazioni che coinvolgono il dominio intracellulare e le regioni transmembrana non comportano invece modificazioni nel legame con l'ormone; è possibile comunque osservare una diminuzione nella produzione di secondi messaggeri, visto che la via di trasduzione di segnale delle proteine G è compromessa (22), oppure si può avere la mancata attivazione del recettore. Inoltre le mutazioni

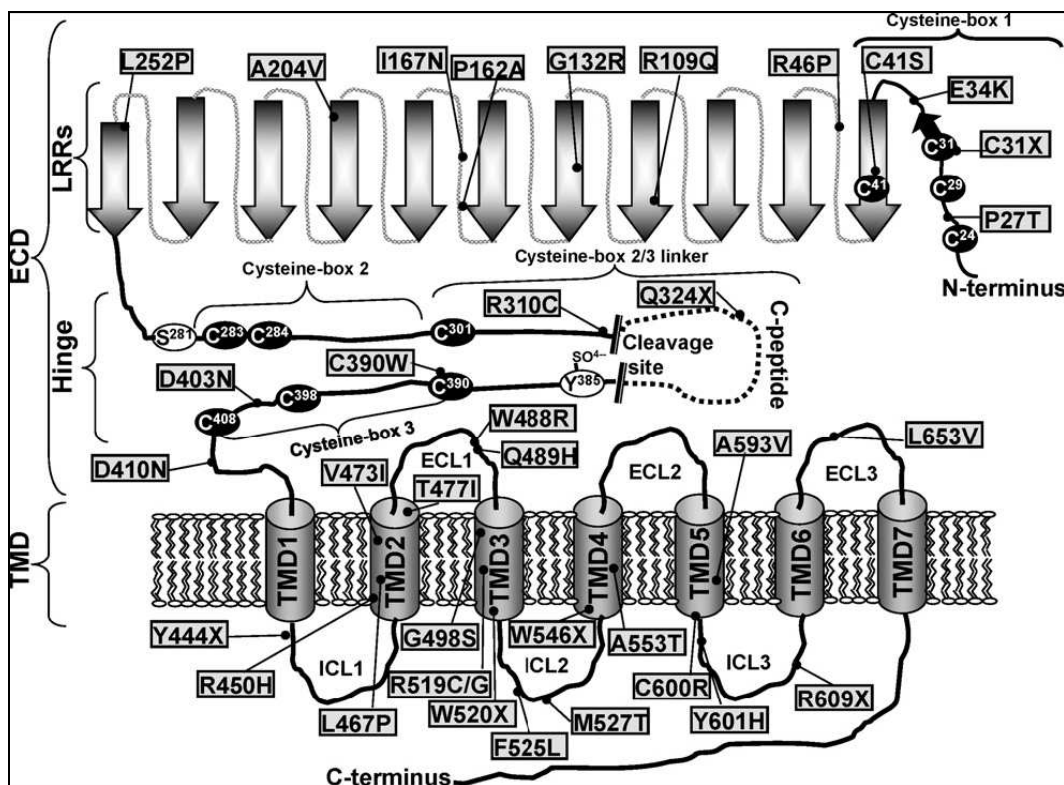


che coinvolgono i domini transmembrana sono anche caratterizzate da una significativa riduzione dell'espressione cellulare.

Nel gene del TSHR sono state anche trovate mutazioni di tipo nonsense che portano a forme recettoriali tronche; quando la porzione transmembrana, necessaria per il legame alle proteine G, viene deleta tutta la trasduzione del segnale è inevitabilmente interrotta (23).

Come è ormai noto per molti altri recettori accoppiati a proteine G, le forme del TSHR mutate oppure misfolding vengono ritenute e degradate nel reticolo endoplasmatico attraverso il pathway del proteosoma; si tratta comunque di casi molto rari.

Recentemente la scoperta che il TSHR, come molti altri recettori accoppiati a proteine G, può oligomerizzare nelle cellule, ha condotto all'ipotesi che la formazione di complessi tra forme wild type e mutate del recettore sia responsabile della parziale resistenza al TSH nei pazienti eterozigoti per queste mutazioni (24).



**Figura 6.** Rappresentazione schematica della struttura del TSHR; sono state indicate le numerose mutazioni di tipo loss of function note

## 2. Scopo del lavoro

Lo scopo del presente studio è stato analizzare un gruppo di bambini e adolescenti di età compresa tra 1 e 18 anni con queste caratteristiche: elevati valori di TSH in almeno due misurazioni, ormoni tiroidei nella norma e assenza di autoimmunità tiroidea. In questo gruppo selezionato di pazienti sono state analizzate alcune caratteristiche cliniche e valutati i parametri biochimici. In tutti i soggetti è stata inoltre condotta la diagnosi molecolare volta ad individuare la presenza di variazioni genetiche nel gene del recettore del TSH.

Sono stati inoltre eseguiti gli studi funzionali in vitro sulla nuova mutazione W520X trovata in un solo soggetto e nella madre, al fine di valutare l'effetto di tale variazione sul signaling recettoriale; in considerazione del fatto che la mutazione è di tipo nonsense e introduce un prematuro codone di stop nella sequenza del TSHR, è stata analizzata l'espressione del recettore in membrana e la produzione di secondi messaggeri, conseguente al legame delle proteine G, quali AMP ciclico (cAMP) e inositolo fosfato.

## 3. Materiali e metodi

### Selezione dei pazienti

Sono stati reclutati 108 pazienti (56 maschi e 52 femmine) di età superiore ad un anno, provenienti da diversi centri italiani e i cui genitori hanno acconsentito allo studio. Tutti i soggetti inclusi nello studio presentavano in almeno due differenti misurazioni valori sierici di TSH superiori al range di normalità nonostante valori normali di ormoni tiroidei.

Sono stati esclusi dallo studio tutti gli individui che sono risultati positivi per la presenza di anticorpi diretti contro epitopi tiroidei, cioè per anticorpi anti-tireoperossidasi (TPO-Ab) oppure per anticorpi anti-tireoglobulina (Tg-Ab). Inoltre sono stati esclusi i falsi positivi allo screening neonatale per l'ipotiroidismo, oppure i soggetti affetti da patologie correlabili alla tiroide o affetti da malattie croniche.

L'analisi molecolare è stata condotta inoltre su 112 soggetti sani di controllo.

Per ogni paziente sono state registrate le caratteristiche cliniche e analizzati i parametri biochimici.

Le caratteristiche cliniche analizzate includevano sesso, età, peso, altezza, stato puberale, familiarità per patologie tiroidee, presenza di gozzo alla palpazione, volume tiroideo e presenza di ecogenicità all'ultrasonografia. I parametri biochimici analizzati includevano invece i valori di TSH, fT3, fT4 e l'escrezione urinaria di iodio giornaliera (UIE).

I livelli sierici di TSH, fT3, fT4, TPO-Ab e Tg-Ab sono stati misurati utilizzando il metodo della chemiluminescenza diretta (Advia Centaur CP Immunoassay System, Siemens Healthcare Diagnostic, Deerfield, IL).

I range di normalità considerati nello studio sono stati:

- 0,35 - 4,5  $\mu$ UI/ml per il TSH;
- 2,3 - 4,2 pg/ml per fT3;
- 0,89 - 1,76 ng/dl per fT4;
- titoli anticorpali (TPO-Ab e Tg-Ab) inferiori a 60 IU/ml.

Il protocollo oggetto dello studio è stato approvato dal comitato etico locale e il consenso informato è stato firmato dai genitori di ogni paziente.

### Analisi molecolare del gene del TSHR

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico e i 10 esoni codificanti del gene del TSHR e le regioni introniche fiancheggianti sono state amplificate tramite PCR. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 30  $\mu$ l utilizzando 100 ng di DNA genomico e la polimerasi AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). La sequenza dei primers utilizzati e le temperature dei protocolli di PCR sono mostrati in tabella 1. L'esone 10, in quanto molto esteso, è stato suddiviso in 4 frammenti fiancheggianti per poterlo amplificare completamente (denominati A,B,C e D).

Il prodotto di amplificazione è stato visualizzato su gel di agarosio al 2% prima dell'analisi dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography).

L'analisi dHPLC permette, in condizioni parzialmente denaturanti e sotto un diretto controllo della temperatura, di discriminare all'interno di prodotti eterogenei di PCR, molecole di DNA eteroduplex rispetto alle molecole omoduplex in quanto gli eteroduplex una volta rinaturati presentano un punto di disappaiamento. L'eteroduplex si comporta cromatograficamente in modo differente sia dall'omoduplex non mutato che dall'omoduplex mutato: l'eteroduplex è solitamente più veloce (meno trattenuto) degli omoduplex e da ciò si può caratterizzare la presenza di una variazione nucleotidica in un campione. La presenza di una mutazione o di un polimorfismo si evidenzia quindi, mediante picchi ulteriori o con un profilo diverso rispetto al wild type.

L'analisi dHPLC di ogni campione amplificato è stata eseguita utilizzando lo strumento wave DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Omaha, NE), a due differenti temperature (Tabella 1). 10  $\mu$ l di ogni campione sono stati miscelati con un uguale volume di un campione di riferimento wild-type ottenuto utilizzando le stesse condizioni di amplificazione. Per ottenere la formazione di

eteroduplex i prodotti di PCR sono stati denaturati e successivamente sottoposti a rinaturazione graduale tra 95 e 41°C.

I campioni risultati positivi all'analisi dHPLC sono stati usati come template per il sequenziamento diretto utilizzando il kit di reazione di sequenza Big-Dye Terminator Cycle (Applied Biosystem, Foster City, CA) e un sequenziatore automatico ABI 3100. Gli elettroferogrammi ottenuti saranno confrontati con le sequenze di riferimento wild type e poi allineati utilizzando software disponibili in rete.

**Tabella 1.** Sequenza dei primers, dimensione dei frammenti , temperatura di annealing di ogni protocollo di PCR e temperatura di parziale denaturazione di ogni frammento  
F = primer forward; R = primer reverse; TD = touch-down PCR

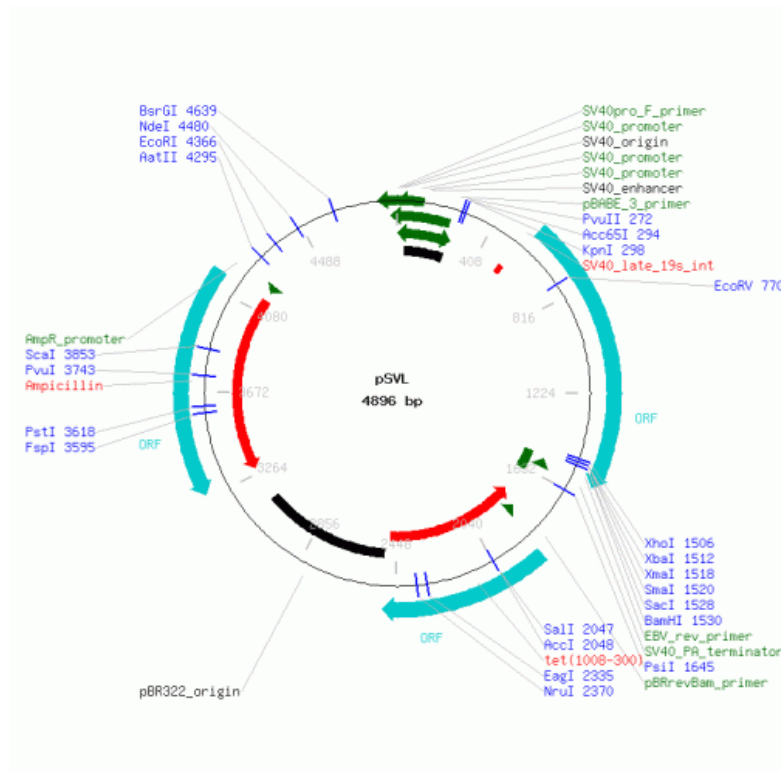
| <b>ESONE</b> | <b>Sequenza dei primers<br/>(5' → 3')</b>           | <b>Dimensione<br/>del prodotto<br/>PCR (bp)</b> | <b>Temperature di<br/>annealing di PCR (°C)</b> | <b>Temperature analisi<br/>dHPLC (°C)</b> |
|--------------|---|---|---|---|
| 1            | F-cctcttttccccttctcca<br>R-ccagagatcaaggcatctgcag   | 400   | 60-50 (TD)                                      | 62.1<br>60.1                              |
| 2            | F-tggttctttggtatgtttgtga<br>R-acttgcataaatcaatggcag | 344   | 51  | 53.4<br>51.4                              |
| 3            | F-gcagaatccatgagggtgt<br>R-caatgggagctggtttct       | 301   | 51  | 56.1<br>54.1                              |
| 4            | F-ggtaccctgtggcgtaaatg<br>R-atggtgtatagcctgggtcg    | 330   | 51  | 56.2<br>54.2                              |
| 5            | F-ttgtcttcagaacctatgctt<br>R-cactggcatgaagtaaggca   | 335   | 60-50 (TD)                                      | 54.7<br>52.7                              |
| 6            | F-ctgctgcagaaggaaagcat<br>R-tccaagagccatactgcctt    | 227   | 60-50 (TD)                                      | 57.1<br>55.1                              |
| 7            | F-gcaccacttctcaccagtca<br>R-tctcctggtgtgtgtgtgtgtgt | 352   | 51  | 58.8<br>56.8                              |
| 8            | F-gtgctcaagccagaagaaga<br>R-gttgctgtctcgggtaaagg    | 357   | 51  | 54.3<br>52.3                              |
| 9            | F-tcatctcccaattaacctcagg<br>R-gtggagaggaaattggaagc  | 410   | 60-50 (TD)                                      | 58.8<br>56.8                              |
| 10A          | F-gcctggcactgactcttttc<br>R-tcctgagaattgtggtgtggt   | 419   | 51  | 58.7<br>56.7                              |
| 10B          | F-gttcaacctgtgtgaagaca<br>R-gtttgctgcttccttctcg     | 446   | 60-50 (TD)                                      | 60.9<br>58.9                              |
| 10C          | F-ctggtatgccatcaccttcg<br>R-agcaactccaaaatcttgcgt   | 433   | 60-50 (TD)                                      | 59.2<br>57.2                              |
| 10D          | F-tctgaacaagcctctcatca<br>R-gacacccccaacacatagct    | 447   | 60-50 (TD)                                      | 56.9<br>54.9                              |

## Mutagenesi sito-diretta

Il vettore pSVL (4896 bp) contenente il cDNA wild-type del recettore del TSH è stato gentilmente donato dal Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo dell'Università di Pisa (Figura 7).

70 µl di cellule competenti DH101F' sono state trasformate con 1 µl (concentrazione 10 ng/µl) di vettore contenente il cDNA wild-type del recettore e cresciute overnight a 37°C in piastre di LB/Agar Ampicillina<sup>+</sup> per selezionare solo le colonie che hanno incorporato il plasmide con la resistenza all'antibiotico. Il DNA plasmidico è stato successivamente amplificato ed estratto utilizzando il Qiagen Plasmid Maxi Kits.

La mutazione è stata introdotta nella sequenza wild-type del cDNA del TSHR usando il kit di mutagenesi Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Il corretto inserimento della mutazione W520X è stato verificato tramite sequenziamento diretto dell'intero cDNA del TSHR.



**Figura 7.** Struttura ed elenco dei siti di restrizione del vettore pSVL

## Colture cellulari

Per tutti gli esperimenti è stata usata la linea cellulare CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary). Le cellule sono state cresciute a 37°C in atmosfera umidificata con 5% di CO<sub>2</sub> in terreno Ham's F12 (Sigma Aldrich); il terreno è stato addizionato del 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% di glutammina e 1% di antibiotici (penicillina /steptomomicina).

## Immunofluorescenza: microscopia confocale

Circa  $6 \times 10^4$  cellule sono state fatte crescere per 24 ore a 37°C facendole aderire a vetrini da immunofluorescenza da 12 mm; il giorno successivo sono state trasfettate in modo transiente con 1 µg di DNA utilizzando il reagente di trasfezione TransIT-LT1 (Mirus Bio Corporation).

Dopo 48 ore le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% e, qualora necessario, permeabilizzate con Triton.

### 1) Cellule permeabilizzate:

Le cellule sono state permeabilizzate con una soluzione di PBS/Triton allo 0,2% e incubate overnight a 4°C con un anticorpo goat policlonale denominato C-20, che riconosce la porzione C-terminale del TSHR umano (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Dopo 16 ore è stato aggiunto l'anticorpo secondario anti-goat coniugato FITC, incubando le cellule al buio per 1h e 30' a temperatura ambiente.

### 2) Cellule non permeabilizzate:

Le cellule sono state incubate overnight a 4°C con un anticorpo mouse monoclonale denominato 3B12, che riconosce gli aminoacidi 1-415 presenti nella porzione N-terminale del TSHR umano (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Dopo 16 ore è stato aggiunto l'anticorpo secondario anti-mouse coniugato FITC, incubando le cellule al buio per 1h e 30' a temperatura ambiente.

In entrambe le condizioni i vetrini sono stati poi conservati al buio e a 4°C fino al momento dell'acquisizione delle immagini utilizzando un microscopio confocale di tipo Leica TCS SP2.

## Saggio di vitalità cellulare con Alamar Blue

Per verificare che la concentrazione di TSH ricombinante somministrata alle cellule non fosse tossica è stato eseguito un test di vitalità cellulare con Alamar Blue.

Il saggio è basato su una reazione di ossido-riduzione colorimetrica dell'Alamar Blue: più i pozzetti diventano di colore rosa, più è elevata la percentuale di Alamar Blue ridotta e quindi maggiore è l'attività metabolica delle cellule.

In una piastra da 96 pozzetti sono state piastrate circa  $5 \times 10^3$  cellule/pozzetto in 100 µl di terreno Ham's F12 e sono state lasciate crescere a 37°C per 24 ore.

Il giorno successivo la piastra è stata incubata a 37°C per 24 ore con diverse concentrazioni di TSH ricombinante (0,5, 1, 10, 50 e 100 nM). In ogni pozzetto sono stati poi aggiunti 10 µl di Alamar Blue, e la piastra è stata incubata per 1 ora al buio a 37°C.

La lettura è stata effettuata a 570 nm dopo 24 ore dall'aggiunta del reagente.

### Dosaggio secondi messaggeri: cAMP

In una piastra da 6 pozzetti sono state piastrate circa  $15 \times 10^4$  cellule/pozzetto e dopo 24 ore sono state trasfettate in modo transiente con 2,5 µl di DNA usando il reagente di trasfezione TransIT-LT1 (Mirus Bio Corporation).

Dopo 72 ore le cellule sono state pre-incubate per 30 minuti a 37°C con 0,5 mM di 3-isobutyl-1-methylxanthine o IBMX (Sigma Aldrich), un inibitore non specifico delle fosfodiesterasi.

Successivamente sono state stimulate con varie concentrazioni di TSH ricombinante per 1 ora a 37°C. Sono state poi lisate con HCl 0,1 M e il surnatante è stato raccolto dopo centrifugazione a 600 g per 10 minuti.

Il dosaggio è stato effettuato utilizzando il kit cAMP Enzyme Immunoassay (Assay Designs), un elisa competitivo per la determinazione quantitativa dell'cAMP nei fluidi biologici.

Il kit, utilizza un anticorpo policlonale anti-cAMP, e permette di ottenere un'intensità di colore giallo inversamente proporzionale alla concentrazione di cAMP nel campione; l'eventuale acetilazione dei campioni e degli standard permette di aumentare la sensibilità delle letture.

La lettura della piastra è stata effettuata a 405 nm.

## **4. Risultati**

### Analisi molecolare del gene del TSHR

I 10 esoni codificanti del gene del TSHR e le regioni introniche fiancheggianti sono stati analizzati per la ricerca di nuove variazioni tramite dHPLC e/o sequenziamento diretto.

L'analisi molecolare è stata condotta su 108 pazienti affetti da ipotiroidismo subclinico e 112 soggetti sani di controllo. Nei 108 pazienti sono state identificate un totale di 18 variazioni note riportate in letteratura: 6 mutazioni missenso, 3 mutazioni sinonime, una inserzione, una delezione e 7 polimorfismi. Tutte le mutazioni sono state trovate in condizione di eterozigosi.

Le 8 mutazioni di tipo loss of function erano in realtà presenti in 10 dei 108 soggetti analizzati, in quanto la mutazione C41S era presente in tre fratelli.

Il numero di soggetti (%) portatori di ogni singola variazione è riportato in tabella 2.

**Tabella 2.** Numero di pazienti (%) portatori di mutazioni note o polimorfismi nel nostro studio (n = 108).

wt/wt = soggetti omozigoti per l'allele wild-type;

wt/var = soggetti eterozigoti per la variazione;

var/var = soggetti omozigoti per la variazione.

| <b>VARIAZIONE</b>                | <b>wt/wt</b>            | <b>wt/var</b> | <b>var/var</b> |
|----------------------------------|-------------------------|---------------|----------------|
| <b><i>Mutazioni missenso</i></b> |                         |               |                |
| C41S                             | 105 (97.2)              | 3 (2.8)       | 0              |
| R109Q                            | 107 (99.1)              | 1 (0.9)       | 0              |
| P162A                            | 106 (98.1)              | 2 (1.9)       | 0              |
| D403N                            | 107 (99.1)              | 1 (0.9)       | 0              |
| W488R                            | 107 (99.1)              | 1 (0.9)       | 0              |
| M527T                            | 107 (99.1)              | 1 (0.9)       | 0              |
| <b><i>Frame-shift</i></b>        |                         |               |                |
| 123-124 insTGCA                  | 107 (99.1)              | 1 (0.9)       | 0              |
| 555-561 delTATTCTT               | 107 (99.1)              | 1 (0.9)       | 0              |
| <b><i>Mutazioni sinonime</i></b> |                         |               |                |
| P119P                            | 107 (99.1)              | 1 (0.9)       | 0              |
| G245G                            | 106 (98.1)              | 2 (1.9)       | 0              |
| A459A                            | 107 (99.1)              | 1 (0.9)       | 0              |
| <b><i>Polimorfismi</i></b>       |                         |               |                |
| P27T                             | 107 (99.1)              | 1 (0.9)       | 0              |
| P52T                             | (rs 2234919) 93 (86.1)  | 15 (13.9)     | 0              |
| IVS1-80                          | (rs 17111401) 99 (91.7) | 9 (8.3)       | 0              |
| IVS6+13                          | (rs 2241119) 90 (83.7)  | 18 (16.7)     | 0              |
| N187N                            | (rs 2075179) 90 (83.7)  | 18 (16.7)     | 0              |
| [CT] <sub>n</sub> microsatellite | (rs 10651555) 41 (38)   | 36 (33.3)     | 31 (28.7)      |
| D727E                            | (rs 1991517) 93 (86.1)  | 15 (13.9)     | 0              |

L'effetto inibitorio sulla normale attività recettoriale e sul signaling cellulare del TSHR di tutte queste mutazioni era già noto in quanto è stato precedentemente descritto in studi funzionali disponibili in letteratura.

Le mutazioni sinonime non sono state oggetto invece di studi in vitro in quanto non comportano sostituzioni aminoacidiche e quindi non alterano né la sequenza, né la funzionalità del recettore.



La variante P27T, anche se trovata in un solo paziente, è stato dimostrato che non esercita alcun ruolo inibitorio sull'azione del TSHR e può quindi essere considerata come una rara variante polimorfica.

La frequenza allelica di ogni polimorfismo trovato nei nostri pazienti è riportata in tabella 3.

**Tabella 3.** Frequenza allelica dei 7 polimorfismi trovati nei nostri pazienti.

wt = wild-type indica l'allele più frequente nella popolazione;  
var = indica l'allele meno frequente nella popolazione.

| <b>POLIMORFISMO</b>   | <b>wt (%)</b>                 | <b>var (%)</b>                  |                                 |
|---|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>P27T</b>   | <b>C</b><br>99.5              | <b>A</b><br>0.5                 |                                 |
| <b>P52T</b><br>(rs 2234919)                                       | <b>A</b><br>93.1              | <b>C</b><br>6.9                 |                                 |
| <b>IVS1-80</b><br>(rs 17111401)                                   | <b>T</b><br>95.8              | <b>A</b><br>4.2                 |                                 |
| <b>IVS6+13</b><br>(rs 2241119)                                    | <b>A</b><br>91.7              | <b>G</b><br>8.3                 |                                 |
| <b>N187N</b><br>(rs 2075179)                                      | <b>T</b><br>91.7              | <b>C</b><br>8.3                 |                                 |
| <b>[CT]<sub>n</sub></b><br><b>microsatellite</b><br>(rs 10651555) | <b>[CT]<sub>8</sub></b><br>38 | <b>[CT]<sub>7</sub></b><br>33.3 | <b>[CT]<sub>6</sub></b><br>28.7 |
| <b>D727E</b><br>(rs 1991517)                                      | <b>C</b><br>93.1              | <b>G</b><br>6.9                 |                                 |

L'analisi molecolare effettuata sui 112 individui sani di controllo ha evidenziato la presenza di 6 polimorfismi già noti. Cinque tra questi erano presenti anche nel gruppo di pazienti ipotiroidici.

Il polimorfismo rs 61747482, che comporta la sostituzione dell'acido aspartico in posizione 36 con un residuo di istidina, è stato trovato in condizione di eterozigosi solo in 2 controlli sani; questa variante non era presente nel nostro gruppo di pazienti.

Il numero di soggetti di controllo (%) portatori dei polimorfismi sono riassunti in tabella 4.

**Tabella 4.** Numero di controlli (%) portatori dei 6 polimorfismi già noti nel nostro studio (n = 112).

wt/wt = soggetti omozigoti per l'allele wild-type;

wt/var = soggetti eterozigoti per la variazione;

var/var = soggetti omozigoti per la variazione.

| <i>Polimorfismi</i> |               | <i>wt/wt</i> | <i>wt/var</i> | <i>var/var</i> |
|---------------------|---------------|--------------|---------------|----------------|
| D36H                | (rs 61747482) | 110 (98.2)   | 2 (1.8)       | 0              |
| P52T                | (rs 2234919)  | 106 (94.6)   | 6 (5.4)       | 0              |
| IVS1-80             | (rs 17111401) | 84 (75)      | 26 (23.2)     | 2 (1.8)        |
| IVS6+13             | (rs 2241119)  | 94 (83.9)    | 18 (16.1)     | 0              |
| N187N               | (rs 2075179)  | 93 (83)      | 19 (17)       | 0              |
| D727E               | (rs 1991517)  | 108 (96.4)   | 4 (3.6)       | 0              |

### Nuove variazioni identificate nel gene del TSHR

Nel gene del TSHR sono state trovate tre nuove variazioni non ancora descritte in letteratura.

In una paziente di 5 anni è stata trovata la sostituzione G/A in posizione 1559 nell'esone 10 (TGG→TAG). L'aminoacido triptofano in posizione 520 viene così sostituito da un codone di stop.

Tale mutazione è stata trovata in condizione di eterozigosi.

La nuova variazione è localizzata nel terzo dominio transmembrana del TSHR e coinvolge un aminoacido altamente conservato tra specie diverse; porta ad una prematura interruzione nella sintesi dell'mRNA del recettore e quindi ad una sua forma tronca priva di buona parte della porzione C-terminale. L'effetto di questa nuova mutazione è stato oggetto di successivi studi funzionali in vitro.

Dall'analisi genetica sono stati individuati nella paziente anche due polimorfismi: rs 2234919 in condizione di eterozigosi nell'esone 1 che comporta la sostituzione della prolina in posizione 52 con un residuo di treonina, e rs 10651555 in condizione di omozigosi che causa l'inserzione di 4bp (TCTC) nell'introne 7.

La paziente presentava un valore medio di TSH di 8,9 µUI/ml, valori di ormoni tiroidei nei limiti e tiroide ecograficamente in sede e normale. Sono state inoltre escluse le possibili cause autoimmuni della patologia e anche lo sviluppo neuromotorio e l'accrescimento somatoponderale erano nella norma.

Si è proceduto successivamente all'analisi molecolare dei genitori della paziente; la madre è risultata portatrice della stessa mutazione sempre in condizione di eterozigosi, il padre è risultato

invece omozigote per l'allele wt. Purtroppo non sono ancora disponibili i dati clinici e le informazioni sullo stato di funzionalità tiroidea della madre.

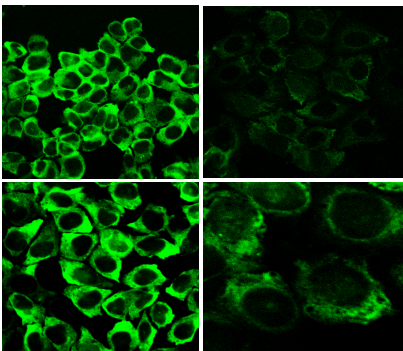
L'analisi molecolare dei 108 soggetti con ipotiroidismo subclinico ha portato inoltre all'identificazione di due nuove variazioni nell'esone 9 del gene del TSHR:

- In un paziente di 1 anno è stata trovata la sostituzione A/G in eterozigosi in posizione +3 bp nell'introne 9; tale variazione è intronica e non coinvolge nucleotidi critici, per cui si presuppone non possa inattivare il recettore.
- In un paziente di 18 anni è stata invece trovata la variazione sinonima D232D a causa della sostituzione C/T in posizione 696 (GAT→GAC). La sequenza aminoacidica del TSHR rimane quindi inalterata.

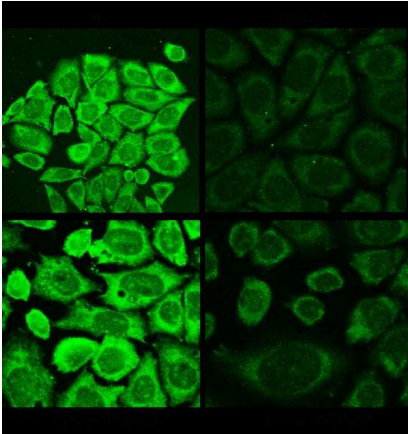
I due pazienti non presentavano familiarità per patologie tiroidee ed entrambe le variazioni trovate nell'esone 9 non erano presenti dall'analisi dei soggetti di controllo.

### Studi funzionali W520X: microscopia confocale

L'espressione sulla superficie cellulare del TSHR è stata studiata tramite esperimenti di immunofluorescenza (Figure 8a e 8b). Le cellule sono state trasfettate con la sequenza wild-type del recettore (in alto a sinistra) e successivamente con la sequenza contenente la mutazione W520X, ricreando in vitro sia la condizione di eterozigosi (in basso a sinistra) che di omozigosi (in basso a destra) per la mutazione. Come controllo negativo sono state usate cellule CHO trasfettate con il solo vettore vuoto (in alto a destra).



**8a)** cellule CHO non permeabilizzate (anticorpo N-terminale 3B12)  
La presenza della mutazione W520X in condizione di omozigosi riduce notevolmente l'espressione del recettore sulla superficie cellulare, mentre la condizione di eterozigosi è del tutto paragonabile alla forma wild-type.



### **8b) cellule CHO permeabilizzate (anticorpo C-terminale C-20)**

La presenza della mutazione W520X in condizione di eterozigosi non influenza il legame dell'anticorpo alla porzione C-terminale del recettore; la forma omozigote è invece del tutto paragonabile al controllo negativo trasfettato con il solo vettore vuoto, indicando che il legame dell'anticorpo al recettore è completamente inibito.

### Studi funzionali W520X: test di vitalità cellulare con Alamar Blue

Al fine di quantificare la produzione di secondi messaggeri da parte del TSHR si è reso necessario stimolare le cellule utilizzando TSH ricombinante (Thyrogen). Ogni flaconcino di ormone contiene 0,9 mg/ml di tireotropina alfa.

Per verificare che la concentrazione di TSH somministrata alle cellule non fosse tossica è stato eseguito un test di vitalità cellulare con Alamar Blue. Questo test è infatti in grado di mostrare l'attività metabolica delle cellule sfruttando una reazione colorimetrica.

Le cellule sono state incubate con TSH 0.5, 1, 10, 50 e 100 mM e successivamente in ogni pozzetto è stato aggiunto l'Alamar Blue; si è potuto osservare che, sebbene tutte e cinque le concentrazioni non siano letali per le cellule, quella 1 mM e 0.5 mM garantivano la migliore sopravvivenza cellulare.

### Studi funzionali W520X : dosaggio cAMP

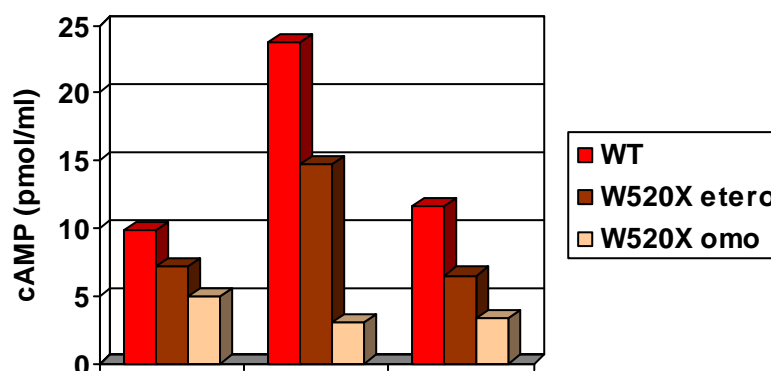
La nuova mutazione identificata introduce un prematuro codone di stop nella sequenza del TSHR, con perdita della porzione transmembrana e intracellulare del recettore; questa regione è stato dimostrato essere necessaria per il legame alle proteine G e per la conseguente trasduzione del segnale a carico del recettore.

Per valutare quindi l'effetto della mutazione sulla produzione di secondi messaggeri è stato effettuato inizialmente il dosaggio di cAMP utilizzando il cAMP Enzyme Immunoassay kit, un elisa competitivo per la determinazione quantitativa dell'cAMP nei fluidi biologici. I campioni e gli standard sono stati acetilati al fine di aumentare la sensibilità delle letture.

Le cellule sono state trasfettate con la sequenza del TSHR wild-type e con quella mutata, ricreando in vitro sia la condizione di omozigosi che di eterozigosi, e successivamente stimulate con varie concentrazioni di TSH ricombinante.

L'esperimento è stato eseguito in triplicato e i livelli di cAMP sono espressi come pmol/ml.

In tutti e tre gli esperimenti si è potuta osservare una riduzione della produzione di cAMP della forma eterozigote e, in misura ancora maggiore della forma omozigote; inoltre la produzione di cAMP della forma omozigote per la mutazione era sempre inferiore alle 5 pmol/ml. (Figura 9).



**Figura 9.** Determinazione quantitativa dei livelli di cAMP prodotti.

## 5. Discussione

Nella popolazione pediatrica i dati riguardanti la prevalenza delle mutazioni nel gene del TSHR e l'insorgenza di ipotiroidismo subclinico sono ad oggi pochi e spesso discordanti. La grande variabilità fenotipica osservabile in pazienti portatori della stessa variazione rende inoltre ancora più difficile la classificazione clinica.

E' noto poi che per alcune mutazioni viene a mancare la correlazione tra dati clinici e risultati dei relativi studi funzionali, in quanto non tutte le variazioni risultano essere effettivamente responsabili dell'inattivazione del recettore, anche se questo aspetto rimane difficile da chiarire (25).

E' stato tuttavia ampiamente dimostrato da studi in letteratura, che la presenza di mutazioni germinali di tipo loss of function nel gene del TSHR siano associabili alla resistenza al TSH e all'ipotiroidismo. Queste mutazioni mostrano una trasmissione di tipo autosomico dominante, senza evidenze di penetranza incompleta ma con espressività variabile (19).

Nella nostra serie di pazienti sono state identificate 8 mutazioni di tipo loss of function note: 6 mutazioni missenso (C41S, R109Q, P162A, D403N, W488R e M527T), una inserzione (123-124insTGCA) e una delezione (555-561delTATTCTT); tutte queste variazioni sono state trovate in condizione di eterozigosi e sono state dimostrate da precedenti studi in vitro essere responsabili di una ridotta funzionalità recettoriale (26, 21, 27, 28).

Probabilmente è ipotizzabile che i soggetti portatori di una singola mutazione, che influenzi solo parzialmente la funzionalità recettoriale, mostrino una ridotta ma non assente trasduzione del segnale TSH-mediata; i pazienti con ipotiroidismo conclamato sono invece il risultato di mutazioni loss of function in omozigosi che coinvolgono grandi regioni alleliche del TSHR, quali delezioni, inserzioni o mutazioni non senso, che inibiscono totalmente il recettore (27).

Un'ipotesi molto accreditata è che la formazione di complessi tra le forme wild-type e mutate del recettore sia responsabile della parziale resistenza al TSH nei pazienti eterozigoti (24).

Inoltre l'intrappolamento intracellulare del TSHR wild-type, dovuto alla formazione di oligomeri con le forme mutate del recettore, causa un effetto dominante negativo delle mutazioni (25).

Queste considerazioni portano alla conclusione che la ridotta espressione del TSHR, osservabile nei pazienti con ipotiroidismo, sia quindi parzialmente compensata dall'aumento dei valori di TSH (28).

Il gene del TSHR è noto essere altamente polimorfico; 7 polimorfismi tra quelli descritti in letteratura sono stati trovati anche nel nostro gruppo di pazienti e le frequenze osservate erano del tutto sovrapponibili a quelle riportate in letteratura (29,30).

La variante P27T localizzata nel dominio extracellulare e trovata in eterozigosi in un solo paziente, è già stata analizzata precedentemente e si è potuto osservare che non esercita alcun ruolo funzionale sull'attività del TSHR; anche se presente in un solo soggetto e assente nel gruppo di controllo può essere considerata come una rara variante polimorfica (29).

Il polimorfismo rs 10651555, invece, è un microsatellite [CT]<sub>n</sub>, localizzato nell'introne 7, in posizione -3 dal sito accettore di splicing; non è quindi da escludere che possa causare per questo motivo segnali aberranti di splicing (30); tuttavia il microsatellite ha tre alleli ugualmente frequenti nella popolazione: [CT]<sub>6</sub>, [CT]<sub>7</sub> e [CT]<sub>8</sub> e per questo motivo è stato ritenuto superfluo ricercarlo nei soggetti di controllo.

L'analisi molecolare effettuata sui 112 individui sani di controllo ha evidenziato la presenza di 6 polimorfismi già noti. Cinque tra questi erano presenti anche nel gruppo di pazienti. La frequenza dei polimorfismi era paragonabile a quella dei pazienti, se non addirittura più elevata.

Il polimorfismo rs 61747482, che comporta la sostituzione dell'acido aspartico in posizione 36 con un residuo di istidina, è stato trovato in condizione di eterozigosi in 2 controlli sani; questa variante

non era invece presente nel nostro gruppo di pazienti. Tutti questi dati sono la conferma che il TSHR è un gene altamente polimorfico.

In una paziente e nella madre è stata identificata la nuova mutazione W520X in condizione di eterozigosi; l'introduzione di un codone di stop porta ad una prematura interruzione nella sintesi dell'mRNA del recettore e quindi ad una sua forma tronca priva di buona parte della porzione C-terminale. La mutazione è localizzata nel terzo dominio transmembrana del TSHR e coinvolge un aminoacido altamente conservato tra specie diverse. L'effetto di questa nuova mutazione sul signaling recettoriale è stata oggetto di studi funzionali in vitro.

In considerazione del fatto che la porzione N-terminale del recettore non viene modificata dalla presenza della nuova variazione, è stato ipotizzato che il legame con l'ormone non dovesse essere inibito.

In letteratura sono state descritte molte mutazioni che impediscono l'espressione sulla superficie cellulare dei recettori accoppiati a proteine G; la corretta espressione in membrana del TSHR mutato è stata quindi analizzata tramite microscopia confocale; è stato possibile osservare che solo la condizione omozigote della mutazione interferiva con la localizzazione del recettore sulla superficie cellulare, mentre l'eterozigote era del tutto paragonabile alla forma wild-type.

Questi dati suggeriscono che, come riportato in altre pubblicazioni, probabilmente un singolo allele normale sia sufficiente per la normale funzionalità tiroidea (21).

Nei tireociti umani il pathway  $G_s$ /cAMP controlla positivamente la proliferazione cellulare, l'uptake di iodio e la secrezione di ormoni tiroidei. Visto che la mutazione W520X causa la perdita della regione transmembrana e intracellulare del recettore ci aspettiamo un'inibizione di questa via di trasduzione del segnale.

È stato possibile osservare in tutti e tre gli esperimenti una riduzione della produzione di cAMP della forma eterozigote e, in misura ancora maggiore della forma omozigote; inoltre la produzione di cAMP della forma omozigote per la mutazione era sempre inferiore alle 5 pmol/ml.

Nella nostra serie di pazienti sono state identificate anche due nuove variazioni, entrambe nell'esone 9; trattandosi di una variazione intronica e di una mutazione sinonima è ipotizzabile che la loro presenza non vada ad influenzare la normale funzionalità recettoriale.

In una elevata percentuale di pazienti ipotiroidei, tuttavia, non è stata trovata nessuna chiara spiegazione degli elevati valori di TSH osservati; è però ipotizzabile che possano essere influenzati da mutazioni o polimorfismi in altri geni non ancora presi in considerazione nel nostro laboratorio.

Potrebbe essere interessante effettuare la ricerca di mutazioni nei fattori di trascrizione tiroidei come TITF-1, PAX-8 e FOXE1, tutti coinvolti nell'espressione del TSHR (31).

Mutazioni che possono influenzare i livelli di TSH possono essere inoltre localizzate nel gene chiamato PDE-8B, il quale codifica per una fosfodiesterasi ad alta affinità per il cAMP coinvolta nel signaling cellulare del TSHR (32).

L'eventuale analisi molecolare di questi geni nei nostri soggetti con causa ignota di ipotiroidismo subclinico potrebbe spiegare i loro elevati livelli di TSH.

Prospettiva futura dello studio sarà il completamento dell'analisi funzionale della nuova mutazione W520X. Verrà analizzata la seconda via di trasduzione del segnale del TSHR, e cioè il pathway  $G\alpha_{q/11}$ /inositolo fosfato al fine di valutare se anche la produzione di questo secondo messaggero viene ridotta dalla presenza della forma tronca del TSHR.



## Bibliografia

1. Kopp P. (2001) The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol Life Sci* **58**:1301-1322.
2. Setian N. (2007) Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. *J Pediatr* **83**: S209-216.
3. Cooper DS. (2001) Clinical practice. Subclinical hypothyroidism. *N Engl J Med* **345**:260–265.
4. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. (2000) The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* **160**:526–534.
5. Paoli-Valeri M, Maman-Alvarado D, Jiménez-Lopez V, Arias-Ferreira A, Bianchi G, Arata-Bellarba G. (2003) Frequency of subclinical hypothyroidism among healthy children and those with neurological conditions in the state of Mérida, Venezuela. *Invest Clin* **44**:209–218.
6. Wu T, Flowers JW, Tudiver F, Wilson JL, Punyasavatsut N. (2006) Subclinical thyroid disorders and cognitive performance among adolescents in the United States. *BMC Pediatr* **6**:12.
7. Aijaz NJ, Flaherty EM, Preston T, Bracken SS, Lane AH, Wilson TA. (2006) Neurocognitive function in children with compensated hypothyroidism: lack of short term effects on or off thyroxin. *BMC Endocr Disord* **6**:2.
8. Arrigo T, Wasniewska M, Crisafulli G, Lombardo F, Messina MF, Rulli I, Salzano G, Valenzise M, Zirilli G, De Luca F. (2008) Subclinical hypothyroidism: the state of the art. *J Endocrinol Invest* **31**:79–84.
9. Vassart, G. & Dumont, J.E. (1992) The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* **13**:596–611.
10. Davies TF, Ando T, Lin RY, Tomer Y, Latif R. (2005) Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J Clin Invest* **115**(8):1972-83.
11. Duprez L, Parma J, Van Sande J, Rodien P, Dumont JE, Vassart G, Abramowicz M. (1998) TSH receptor mutations and thyroid disease. *Trends Endocrinol Metab* **9**:133–140.
12. Davies T, Marians R, Latif R. (2002) The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest* **110**:161-164
13. Kursawe R, Paschke R. (2007) Modulation of TSHR signaling by posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab* **18**:199-207
14. Dutton CM, Joba W, Spitzweg C, Heufelder AE, Bahn RS. (1997) Thyrotropin receptor expression in adrenal, kidney and thymus. *Thyroid* **7**(6):879-884.

15. Sellitti DF, Akamizu T, Doi SQ, Kim GH, Kariyil JT, Kopchik JJ, Koshiyama H. (2000) Renal expression of two 'thyroid-specific' genes: thyrotropin receptor and thyroglobulin. *Exp Nephrol* **8**(4-5):235-243.
16. Akamizu T, Ikuyama S, Saji M, Kosugi S, Kozac C, McBride OW, Kohn LD. (1990) Cloning, chromosomal assignment and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:5677-5681.
17. Allgeier A, Offermanns S, Van Sande J, Spicher K, Schultz G, Dumont JE. (1994) The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *J Biol Chem* **269**(19):13733-13735.
18. Thomsen W, Frazer J, Unett D. (2005) Functional assays for screening GPCR targets. *Curr Opin Biotechnol* **16**:655-665.
19. Grasberger H, Mimouni-Bloch A, Vantighem MC, van Vliet G, Abramowicz M, Metzger DL, Abdullatif H, Rydlewski C, Macchia PE, Scherberg NH, van Sande J, Mimouni M, Weiss RE, Vassart G, Refetoff S. (2005) Autosomal dominant resistance to thyrotropin as a distinct entity in five multigenerational kindreds: clinical characterization and exclusion of candidate loci. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:4025-4034.
20. Wadsworth, H.L, Chazenbalk GD, Nagayama Y, Russo D, Rapoport B. (1990) An insertion in the human thyrotropin receptor critical for high affinity hormone binding. *Science* **249**:1423-1425.
21. Clifton-Bligh RJ, Gregory JW, Ludgate M, John R, Persani L, Asteria C, Beck-Peccoz P, Chatterjee VK. (1997) Two novel mutations in the thyrotropin (TSH) receptor gene in a child with resistance to TSH. *J Clin Endocrinol Metab.* **82**(4):1094-1100.
22. de Roux N, Misrahi M, Brauner R, Houang M, Carel JC, Granier M, Le Bouc Y, Ghinea N, Boumedienne A, Toublanc JE, Milgrom E. (1996) Four families with loss of function mutations of the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* **81**(12):4229-4235.
23. Jordan N, Williams N, Gregory JW, Evans C, Owen M, Ludgate M. (2003) The W546X mutation of the thyrotropin receptor gene: potential major contributor to thyroid dysfunction in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* **88**(3):1002-1005.
24. Calebiro D, de Filippis T, Lucchi S, Covino C, Panigone S, Beck-Peccoz P, Dunlap D, Persani L. (2005) Intracellular entrapment of wild-type TSH receptor by oligomerization with mutants linked to dominant TSH resistance. *Hum Mol Genet* **14**:2991-3002.
25. Nicoletti A, Bal M, De Marco G, Baldazzi L, Agretti P, Menabò S, Ballerini E, Cicognani A, Tonacchera M, Cassio A. (2009) Thyrotropin-Stimulating Hormone Receptor Gene Analysis in Pediatric Patients with Non Autoimmune Subclinical Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **94** (11):4187-4194.
26. Tonacchera M, Di Cosmo C, De Marco G, Agretti P, Banco M, Perri A, Gianetti E, Montanelli L, Vitti P, Pinchera A. (2007) Identification of TSH receptor mutations in three families with resistance to TSH. *Clin Endocrinol (Oxf)* **67**:712-718.

27. Camilot M, Teofoli F, Gandini A, Franceschi R, Rapa A, Corrias A, Bona G, Radetti G, Tatò L. (2005) Thyrotropin receptor gene mutations and TSH resistance: variable expressivity in the heterozygotes. *Clin Endocrinol (Oxf)* **63**: 146-151.
28. De Marco G, Agretti P, Camilot M, Teofoli F, Tatò L, Vitti P, Pinchera A, Tonacchera M. (2009) Functional studies of new thyrotropin receptor (TSHr) mutations identified in patients affected by hypothyroidism or isolated hyperthyrotropinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* **70**:335-338.
29. Teofoli F, Camilot M, Tatò L. (2007) Lack of association between thyrotropin receptor gene polymorphisms and subclinical hypothyroidism in children. *J Endocrinol Invest* **30**:163-166.
30. Esperante SA, Rivolta CM, Caputo M, González-Sarmiento R, Targovnik HM. (2008) Identification and characterization of new variants of three associated SNPs and a microsatellite in the TSH receptor gene which are useful for genetic studies. *Mol Cell Probes* **22**:281-286.
31. Nagasaki K, Narumi S, Asami T, Kikuchi T, Hasegawa T, Uchiyama M. (2008) Mutation of a gene for thyroid transcription factor-1 (TTF1) in a patient with clinical features of resistance to thyrotropin. *Endocr J* **55**:875-878.
32. Arnaud-Lopez L, Usala G, Ceresini G, Mitchell BD, Pilia MG, Piras MG, Sestu N, Maschio A, Busonero F, Albai G, Dei M, Lai S, Mulas A, Crisponi L, Tanaka T, Bandinelli S, Guralnik JM, Loi A, Balaci L, Sole G, Prinzis A, Mariotti S, Shuldiner AR, Cao A, Schlessinger D, Uda M, Abecasis GR, Nagaraja R, Sanna S, Naitza S. (2008) Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *Am J Hum Genet* **82**:1270-1280.

## **SEZIONE 2**

### **Attività formativa**

#### **Corsi frequentati:**

Journal Club in lingua inglese –Prof.ssa Mara Giordano

#### **Partecipazione a seminari interni al Dipartimento di Scienze Mediche:**

Regolazione del metabolismo del ferro: nuove acquisizioni  
Prof. Camaschella (14 Ottobre 2009)

Naproxcinod, un nuovo anti-infiammatorio con elevata tollerabilità cardiovascolare  
Dott. Ongini (4 Novembre 2009)

Alk e tumorigenesi  
Prof. Inghirami (17 Novembre 2009)

Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression  
Prof. Mermod (30 Novembre 2009)

Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare  
Fabio Grassi (14 Dicembre 2009)

LSD1, Lysine Specific Demethylase 1: insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation  
Dr. Battaglioli (20 Gennaio 2010)

Dal difetto genetico all'infiammazione  
Luigi Maiuri (28 Gennaio 2010)

R&D of magnetic-nanoparticles and carriers for drugs  
Dott. Baldi (9 Febbraio 2010)

A novel antiviral mechanism mediated by the chemokine receptor CCR6  
Prof. Garzino-Demo (11 Febbraio 2010)

Computational analysis of protein-protein interactions  
Prof. Pieraccini (17 Febbraio 2010)

Basi genetiche del diabete di tipo 1 e della sclerosi multipla: l'esempio della popolazione sarda  
Prof. Cucca (3 Marzo 2010)

Alterazioni endocrino-metaboliche in età pediatrica: prevalenza della sindrome metabolica e regolazione del sistema ghrelinergico  
Dott. Prodam (29 Aprile 2010)

Prediction of RNA-RNA interaction  
Dr. Tafer (26 Maggio 2010)

Functional nanocomposite for pharmaceutical application from physicochemical viewpoints  
Prof. Senna (4 Giugno 2010)

Fenotipo e cellule staminali tumorali nei gliomi maligni  
Prof. Schiffer, Dott.ssa Mellai, Dott.ssa Cardera (14 Giugno 2010)

Nuove strategie anticancro: i microRNA come agenti differenziativi per i tumori solidi  
Prof. Ponzetto (15 Giugno 2010)

Combating Bioterrorism: new antidotes for an old poison  
Dr. Ellis (17 Giugno 2010)

Insufficienza venosa cerebrospinale cronica: una nuova prospettiva per la sclerosi multipla?  
Prof. Zamboni (28 Giugno 2010)

Le cellule staminali mesenchimali: potenziale terapeutico nelle malattie del motoneurone e della mielina  
Prof. Fagioli (28 Giugno 2010)

Identificazione di antigeni per la diagnosi e la terapia del carcinoma pancreatico mediante l'analisi sierologica del proteoma  
Franco Novelli (30 Giugno 2010)

Role of membrane lipids in neuronal synapses organization  
Paola Camoletto (5 Luglio 2010)

Prevention and cure of autochthonous mammary carcinomas in her2 transgenic mice  
Federica Cavallo (17 Settembre 2010)

### Congressi frequentati (elenco completo: denominazione congresso, sede e data):

Le obesità genetiche: dalla fisiopatologia alla clinica  
Istituto Auxologico Italiano Villa Caramora- Verbania 02 Ottobre 2009

Trattamento con IGF-1 ricombinant: aspetti fisiopatologicie clinici  
Istituto Auxologico Italiano Villa Caramora- Verbania 09 Ottobre 2009

XVII Congresso Nazionale Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica (SIEDP)  
Napoli, 5-7 Novembre 2009

49th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE)  
Prague- Czech Republic 22-25 September 2010

## Comunicazioni a congressi:

A) comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

B) Altre comunicazioni

Poster:

Riccomagno S, **Moia S**, Bellona S, Petri A, Vivenza D, Godi M, Prodam F, Corneli G, Valenzise M, Giordano M, Momigliano-Richiardi P, Bona G. "Role of SOCS2 in regulating GH signaling: screening of variations associated with idiopathic short stature, preliminary data".

47<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) Istanbul, Turkey, September 20-23 2008

Poster:

Riccomagno S, **Moia S**, Bellone S, Petri A, Trovato L, Prodam F, Walker GE, Salerno M, Valenzise M, Bona G. "Molecular analysis of GH-R gene in children with idiopathic short stature and partial GH insensitivity".

91<sup>st</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society (ENDO) Washington DC, June 10-13 2009

Poster:

Riccomagno S, **Moia S**, Bellone S, Petri A, Trovato L, Prodam F, Walker G.E, Salerno M, Valenzise M.C, Bona G. "Analisi molecolare del gene GH-R in bambini con bassa statura idiopatica e parziale insensibilità al GH"

XVII Congresso Nazionale SIEDP Napoli, 5-7 novembre 2009

Presentazione orale:

Trovato L, Bellone S, Prodam F, De Rienzo F, Genoni G, **Moia S**, Riccomagno S, Walker G, Bona G. "Valutazione del profilo genico del signaling Jak/Stat in bambini ISS, GHD e SGA"

XVII Congresso Nazionale SIEDP Napoli, 5-7 novembre 2009

## Articoli scientifici pubblicati nel corso del dottorato:

Rapa A, Monzani A, **Moia S**, Vivenza D, Bellone S, Petri A, Teofoli F, Cassio A, Cesaretti G, Corrias A, de Sanctis V, Di Maio S, Volta C, Wasniewska M, Tatò L, Bona G. (2009) Subclinical Hypothyroidism in Children and Adolescent: A Wide Range of Clinical, Biochemical and Genetic Factors Involved. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(7):2414-2420.