

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



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

*Ciclo XXIV*

*RELAZIONE 3° anno*

*Candidato:*  
**Stefania Moia**

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

# ANALISI MOLECOLARE E SIGNIFICATO FUNZIONALE DI MUTAZIONI DEL GENE TSHR IN PAZIENTI PEDIATRICI

## SEZIONE 1

### Risultati scientifici

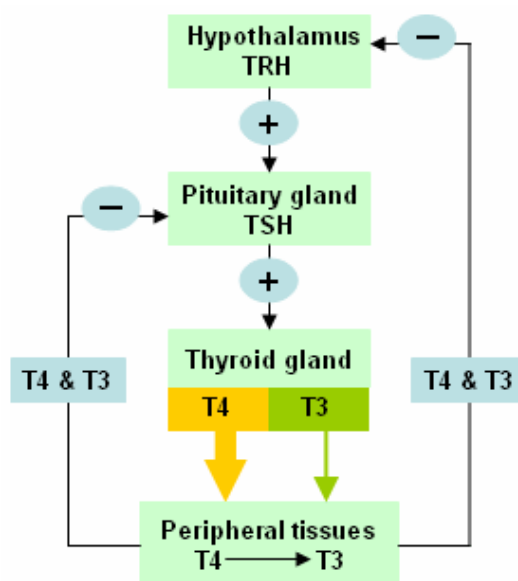
## 1. Introduzione

### 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 e sua regolazione.

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 variabile in età pediatrica (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.

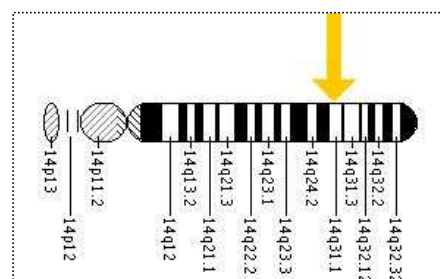
La diagnosi di ipotiroidismo subclinico è determinata solitamente da analisi effettuate in laboratorio in quanto in genere i pazienti sono asintomatici e non manifestano segni o sintomi di disfunzionalità tiroidea. Il principale segno clinico rilevabile nei pazienti è il gozzo, doppiamente frequente 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 (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.

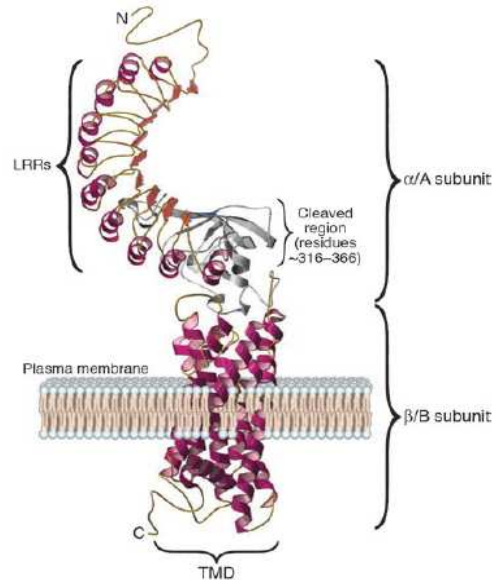
### Il recettore del TSH (TSHR)

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 aminotermine 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

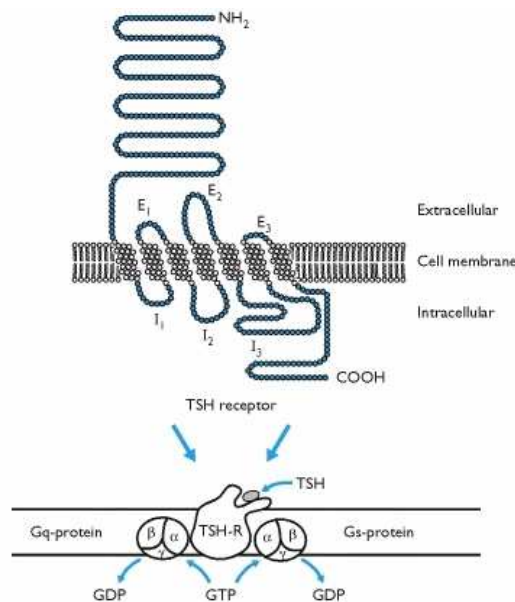
legano ormoni glicoproteici. La presenza dei ponti disolfuro è necessaria non solo per il corretto folding recettoriale ma anche per la formazione di strutture dimeriche funzionalmente attive del TSHR.

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).

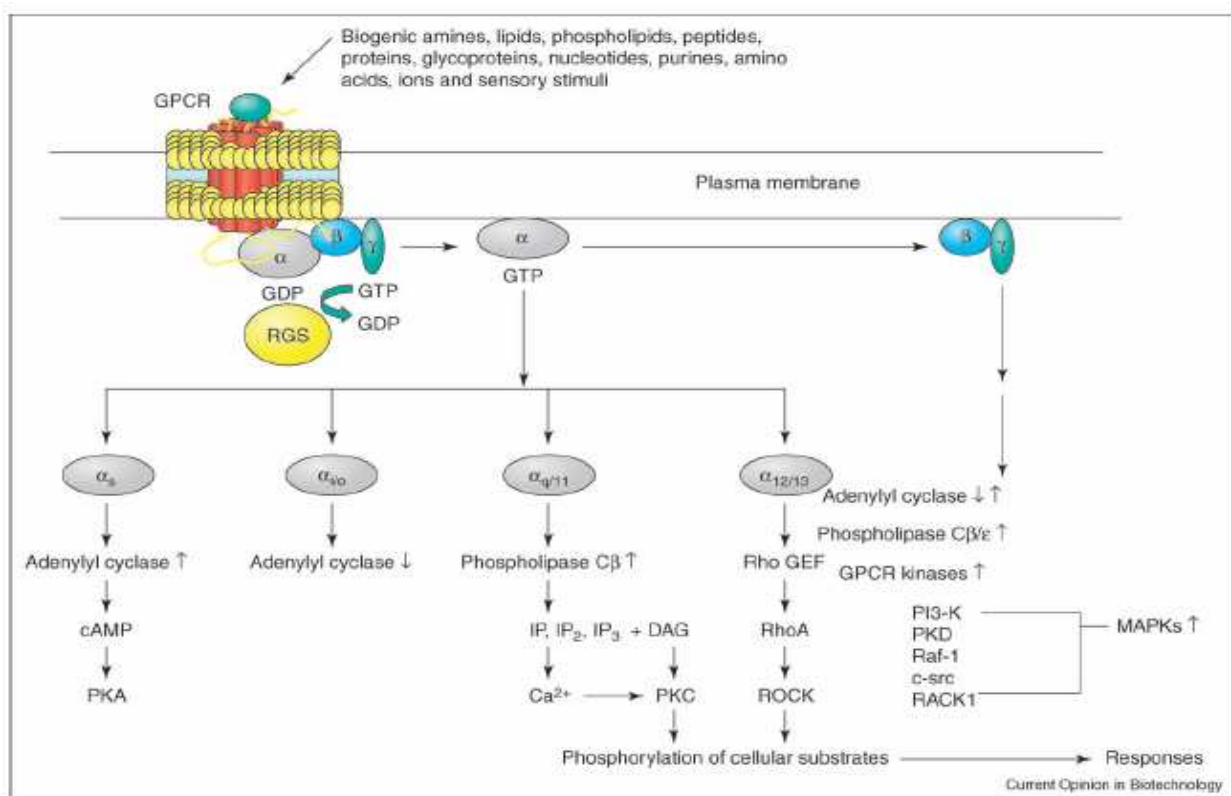


**Figura 4.** Meccanismo d'azione del TSHR: il legame dell'ormone attiva le proteine G associate al recettore e stimola la conversione del GDP in GTP

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).

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

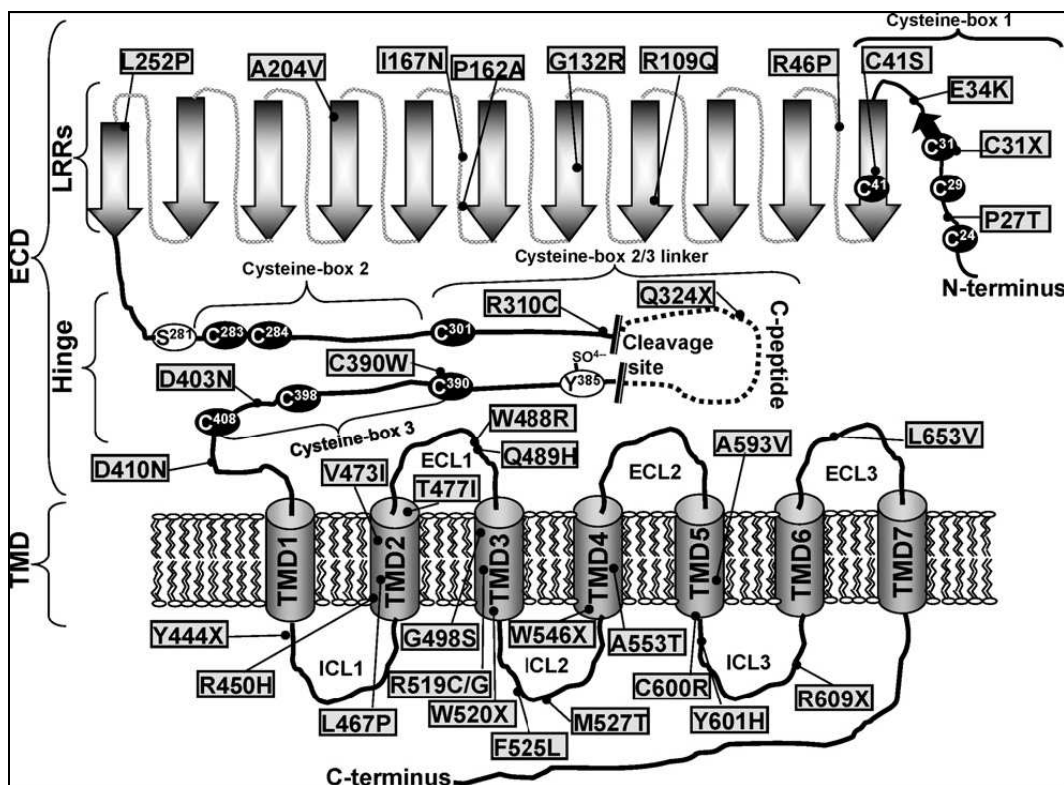


che coinvolgono i domini transmembrana sono anche caratterizzate da una significativa riduzione dell'espressione cellulare.

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 (IP).

## 3. Materiali e metodi

### Selezione dei pazienti

Sono stati reclutati 96 pazienti (52 maschi e 44 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:

- 0,45 - 3,5  $\mu$ 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). 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%.

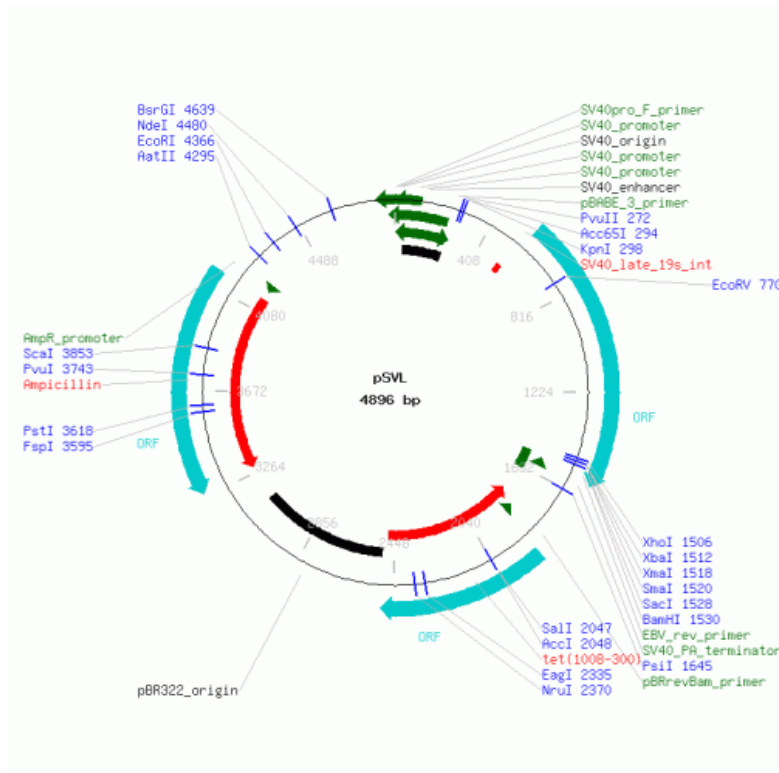
I campioni sono stati poi analizzati tramite sequenziamento diretto utilizzando il kit di reazione di sequenza Big-Dye Terminator Cycle (Applied Biosystem, Foster City, CA) e un sequenziatore automatico ABI 3100. Gli elettroferogrammi ottenuti saranno confrontati con le sequenze di riferimento wild type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

### 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  $\mu$ l di cellule competenti DH101F<sup>+</sup> sono state trasformate con 1  $\mu$ l (concentrazione 10 ng/ $\mu$ l) 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, St Louis, MO); il terreno è stato addizionato del 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% di glutammina e 1% di antibiotici (penicillina /septomomicina) (Sigma Aldrich, St Louis, MO).

## 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 Madison, WI). 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 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany).

### 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 (Thyrogen,

Genzyme) 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 un kit di immunoassay (cAMP Enzyme ImmunoAssay Kit, 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. I risultati sono espressi in pmol/ml.

### Dosaggio secondi messaggeri: IP

72 ore dopo la trasfezione le cellule sono state stimulate per 60 minuti con varie concentrazioni di TSH ricombinante; l'ormone è stato diluito in un buffer di stimolazione addizionato di LiCl 50 mM, necessario per prevenire la degradazione dell'IP e consentire il suo accumulo nella cellula. Le cellule sono state poi lisate e la produzione di IP è stata quantificata utilizzando un kit commerciale (IP-One Assay Kit, Cisbio Bioassay). La lettura della piastra è stata effettuata a 450 nm. I risultati sono espressi in nM.

### Analisi statistica

I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. Per le variabili continue sono stati utilizzati i test non parametrici Wilcoxon e Mann-Whitney. La significatività statistica è stata assunta come  $p < 0.05$ . Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il programma SPSS per Windows versione 17.0 (SPSS INC; Chicago, IL, USA).

## **4. Risultati**

### Analisi molecolare del gene del TSHR

L'analisi molecolare è stata condotta su 96 pazienti affetti da ipotiroidismo subclinico e 112 soggetti sani di controllo. Nella nostra serie di pazienti sono state identificate due mutazioni missenso già riportate in letteratura: P162A e D410N. Entrambe le mutazioni sono state trovate in condizione di eterozigosi e sono localizzate rispettivamente nell'esone 6 e 10 del gene TSHR. La mutazione P162A è stata identificata in 3 soggetti indipendenti, mentre D410N è stata riscontrata in un'intera famiglia essendo presente nella paziente, nel padre e nella zia paterna. L'effetto inibitorio sulla normale attività recettoriale e sul signaling cellulare del TSHR di queste mutazioni era già

noto in quanto è stato precedentemente descritto in studi funzionali disponibili in letteratura (25).

Nessuna mutazione è stata invece trovata nel gruppo di soggetti di controllo.

L'analisi molecolare ha mostrato inoltre la presenza nella nostra serie di pazienti di 7 polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs) noti, e di 6 SNPs nel gruppo di controllo. Il numero di pazienti e di controlli (%) portatori dei polimorfismi sono riassunti in tabella 1 e 2.

**Tabella 1.** Numero di pazienti (%) portatori dei polimorfismi già noti nel nostro studio (n=96)

wt/wt = soggetti omozigoti per l'allele wild-type; wt/var = soggetti eterozigoti per la variazione; var/var = soggetti omozigoti per la variazione.

<b>Polimorfismi</b>		wt/wt	wt/var	var/var
P52T C>A	(rs 2234919)	78 (81,3)	18 (18,7)	0
IVS1-80bp T>A	(rs 17111401)	72 (75)	21 (21,9)	3 (3,1)
IVS3-35bp C>T	(rs77924349)	95 (99)	1(1)	0
IVS6+13bp A>G	(rs 2241119)	75 (78,1)	20 (20,8)	1 (1)
N187N C>T	(rs 2075179)	74 (77,1)	21 (21,9)	1 (1)
A459A G>A	(rs 113951800)	93 (96,9)	3 (3,1)	0
D727E C>G	(rs 1991517)	90 (93,7)	6 (6,3)	0

**Tabella 2.** Numero di controlli (%) portatori dei polimorfismi già noti nel nostro studio (n=112)

<b>Polimorfismi</b>		wt/wt	wt/var	var/var
D36H G>C	(rs 61747482)	110 (98,2)	2 (1,8)	0
P52T C>A	(rs 2234919)	106 (94,6)	6 (5,4)	0
IVS1-80bp T>A	(rs 17111401)	84 (75)	26 (23,2)	2 (1,8)
IVS6+13bp A>G	(rs 2241119)	94 ( 83,9)	18 (16,1)	0
N187N C>T	(rs 2075179)	93 (83)	19 (17)	0
D727E C>G	(rs 1991517)	108 (96,4)	4 (3,6)	0

## Nuove variazioni identificate nel gene del TSHR

In una paziente di 5 anni è stata trovata la sostituzione G>A in posizione 1559 nell'esone 10 (TGG→TAG) del gene TSHR. L'aminoacido triptofano in posizione 520 viene così sostituito da un codone di stop (W520X). 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.

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.

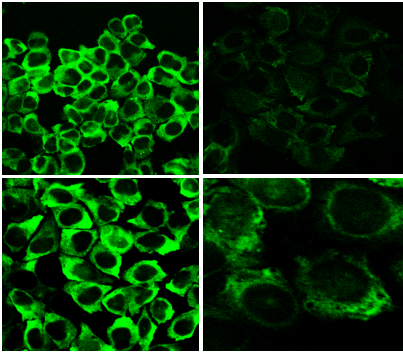
Si è proceduto successivamente all'analisi molecolare dei genitori della paziente; la madre è risultata portatrice della stessa mutazione sempre in condizione di eterozigosi, il padre è risultato invece omozigote per l'allele wt. Purtroppo non sono ancora disponibili i dati clinici e le informazioni sullo stato di funzionalità tiroidea della madre.

L'analisi molecolare dei soggetti con ipotiroidismo subclinico ha portato inoltre all'identificazione di tre nuove variazioni nel gene del TSHR: IVS2-84bp C>G, IVS9 +3bp A>G e A673D. Tutte sono state trovate in condizione di eterozigosi. Il loro effetto sulla patogenesi dell'ipotiroidismo subclinico sarà oggetto di successivi studi funzionali in vitro.

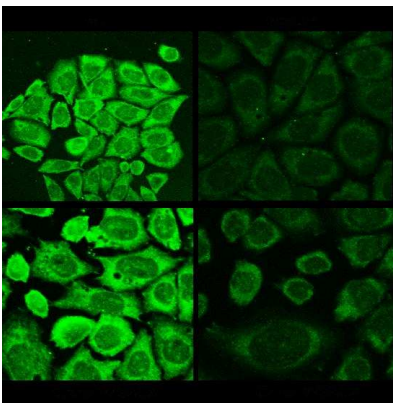
## Studi funzionali W520X: microscopia confocale

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. La trasfezione con la sequenza TSHR-WT produce una intensa colorazione sulla superficie cellulare. 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 WT.



**8b)** cellule CHO permeabilizzate. E' possibile osservare un'aggiuntiva colorazione perinucleare. 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 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, Genzyme). 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 e IP

Le cellule CHO sono state trasfettate alternativamente con la sequenza WT e mutata del TSHR ed è stata quantificata la produzione di secondi messaggeri sia basale che dopo stimolazione con TSH. Sono state ricreate le vitro le condizioni di eterozigosi e di omozigosi per la mutazione W520X. Si è potuto osservare che la trasfezione con il vettore pSVL/TSHR induce una produzione basale di

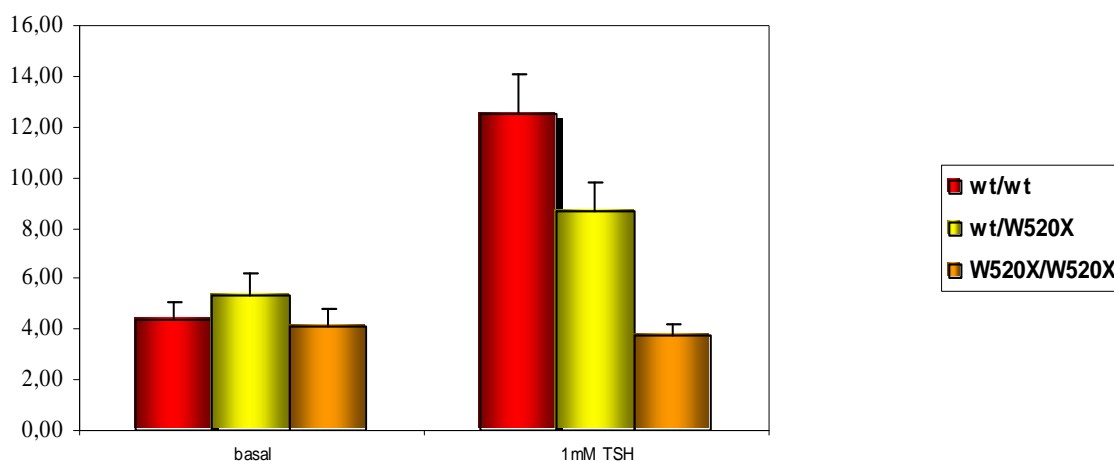
cAMP in assenza dell'agonista, indicando un'attivazione costitutiva del recettore.

Una produzione triplicata di cAMP si ottiene invece dopo stimolazione con TSH 1 mM. Le cellule trasfettate con la forma omozigote hanno mostrato una produzione ridotta di cAMP rispetto al WT ( $3.7 \pm 0.5$  vs  $12.5 \pm 1.6$  pmol/ml;  $p < 0,01$ ), mentre l'eterozigote ha mostrato una produzione intermedia ( $8.6 \pm 1.2$  pmol/ml) (Figura 9A). In particolare la produzione di cAMP osservabile in conseguenza dell'attività basale del recettore è paragonabile alla produzione della forma omozigote W520X.

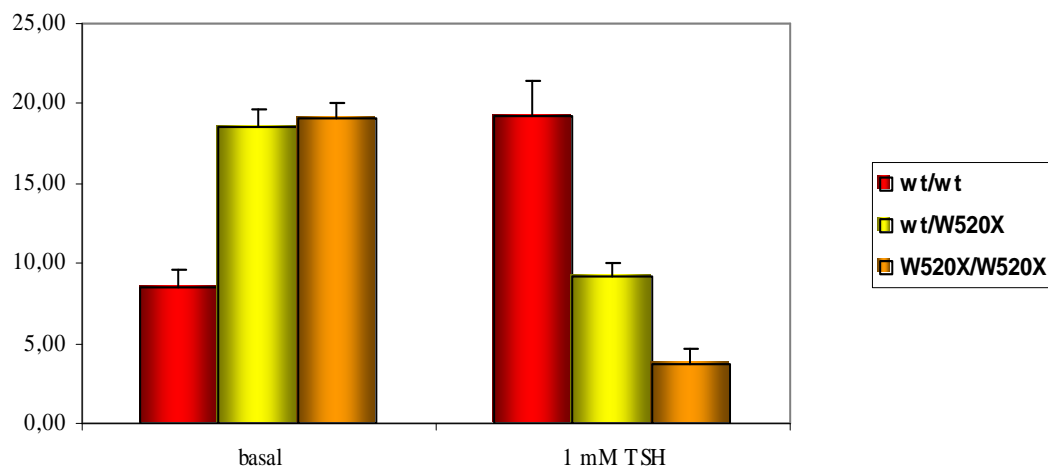
Successivamente sono stati analizzati gli effetti sul signaling inositolo fosfato- diacilglicerolo. Una produzione raddoppiata di IP è stata misurata dopo stimolazione con TSH 1 mM nelle cellule trasfettate con la sequenza WT. Come atteso la presenza della mutazione W520X in omozigosi ha mostrato una marcata riduzione nella produzione di IP in risposta all'agonista paragonata al WT ( $3.8 \pm 0.9$  vs  $19.3 \pm 2.1$  nM;  $p < 0,01$ ); la condizione eterozigote ha mostrato una produzione intermedia ( $9.2 \pm 0,8$  nM) (Figura 9B). Inoltre è stato possibile dimostrare che la considerevole produzione di IP osservata grazie all'attività basale è completamente abolita in presenza dei costrutti mutati.

La stimolazione delle cellule CHO con concentrazioni più elevate di TSH (10, 50 and 100 mM) ha prodotto dati analoghi per entrambi i pathways.

**Figura 9A.** Produzione di cAMP



**Figura 9B.** Produzione di IP



## 5. Discussione

Nella popolazione pediatrica i dati riguardanti la prevalenza delle mutazioni nel gene TSHR e l'insorgenza di ipotiroidismo subclinico sono ad oggi limitati e spesso discordanti. Inoltre la grande variabilità fenotipica osservabile in pazienti portatori della stessa variazione rende 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 il meccanismo alla base di questo aspetto rimane difficile da chiarire (6).

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 2 missenso mutazioni di tipo loss of function note: P162A e D410N, entrambe trovate in condizione di eterozigosi e dimostrate da precedenti studi in vitro essere responsabili di una ridotta funzionalità recettoriale (25, 21, 26, 27).

E' ipotizzabile che la presenza di una singola mutazione influenzi solo parzialmente la funzionalità recettoriale, e i pazienti mostrino una ridotta ma non assente trasduzione del segnale TSH-mediata; i soggetti con ipotiroidismo conclamato sarebbero 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 (26).

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 è stato dimostrato che 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 (6). 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; numerosi polimorfismi sono stati trovati anche nel nostro gruppo di pazienti e le frequenze osservate erano del tutto sovrapponibili a quelle riportate in letteratura (28,29,30). Anche nei 112 individui sani di controllo sono stati trovati vari polimorfismi già noti. La frequenza dei polimorfismi osservata era paragonabile a quella dei pazienti, se non addirittura più elevata.

In una paziente e nella madre è stata identificata la 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. In considerazione del fatto che la porzione N-terminale del recettore non viene modificata dalla presenza della nuova variazione, abbiamo ipotizzato che il legame con l'ormone TSH non dovesse essere inibito. L'effetto di questa nuova mutazione sul signaling recettoriale è stato oggetto di studi funzionali in vitro.

Visto che 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 analizzata tramite esperimenti di microscopia confocale. E' 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 confermano che, come riportato in altre pubblicazioni, probabilmente un singolo allele normale sia sufficiente per la normale funzionalità tiroidea (21).

Successivamente abbiamo investigato gli effetti della mutazione sulla produzione di secondi messaggeri. E' stato possibile osservare una riduzione della produzione di cAMP e di IP della forma eterozigote e, in misura ancora maggiore della forma omozigote.

Caratteristica da sottolineare è che il TSHR ha mostrato un'attività basale costitutiva anche in assenza dell'agonista TSH. Questa è una caratteristica tipica dei recettori accoppiati a proteine G, i quali riescono ad adottare una conformazione attiva anche in assenza del ligando. La prima evidenza di attivazione costitutiva è stata osservata per il recettore degli oppioidi (31) e per il  $\beta_2$ -adrenoceptor (32); durante gli ultimi anni sono state identificate molte patologie in cui i recettori

accoppiati a proteine G coinvolti mostravano un' aumentata attività costitutiva paragonata al WT. Le mutazioni coinvolte in questi disordini sono spesso localizzate nel terzo dominio citoplasmatico del recettore. E' stato ipotizzato che possano esistere siti addizionali coinvolti nel mantenimento del TSHR in conformazione inattiva oppure, alternativamente, che i livelli di attività basale siano influenzati dal vettore e/o dal sistema cellulare (33).

Nella nostra serie di pazienti sono state identificate anche tre nuove variazioni: IVS2-84bp C>G, IVS9 +3bp A>G e A673D. Il loro significato sarà oggetto di successivi studi funzionali.

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 (30).

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

## 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-Bellabarba 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. 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**:4187-4194.
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**:1972-1983.
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**: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**: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**: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, Vantuyghem 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**: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**: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**: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. 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.
26. 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.

27. 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.
28. 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
29. 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.
30. Nagasaki K, Narumi S, Asami T, Kikuchi T, Hasegawa T, Uchiyama M. (2008) Mutation of a gene for thyroid transcription factor-1 (TITF1) in a patient with clinical features of resistance to thyrotropin. *Endocr J* **55**:875-878.
31. Koski G, Streaty RA, Klee WA (1982) Modulation of sodium-sensitive GTPase by partial opiate agonist. An explanation for the dual requirement for Na<sup>+</sup> and GTP in inhibitory regulation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* **257**:14035-14040.
32. Cerione RA, Codina J, Benovic JL, Lefkowitz RJ, Birnbaumer L, Caron MG 1984 The mammalian  $\beta$ 2-adrenergic receptor: reconstitution of functional interactions between pure receptor and pure stimulatory nucleotide binding protein of the adenylate cyclase system. *Biochemistry* **23**:4519-4525.
33. Mueller S, Gozu HI, Bircan R, Jaeschke H, Eszlinger M, Lueblinghoff J, Krohn K, Paschke R 2009 Cases of borderline in vitro constitutive thyrotropin receptor activity: how to decide whether a thyrotropin receptor mutation is constitutively active or not? *Thyroid* **19**:765-773
34. 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, Prinzi 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.



# *NUOVA VARIAZIONE FAMILIARE DEL GENE THRB (I276N) RESPONSABILE DI SINDROME DA RESISTENZA AGLI ORMONI TIROIDEI*

## **1. Introduzione**

### Resistenza all'azione degli ormoni tiroidei (RTH)

La resistenza all'azione degli ormoni tiroidei (Resistance to Thyroid Hormone, RTH), descritta per la prima volta nel 1967 da Samuel Refetoff, è una sindrome caratterizzata da una ridotta risposta dell'ipofisi e dai tessuti periferici all'ormone tiroideo (1).

I pazienti affetti da RTH sono caratterizzati da elevati livelli sierici di fT3 e fT4 in presenza di livelli normali o solo leggermente elevati di TSH. Il fenotipo clinico è molto eterogeneo, possono essere presenti alcuni tra i segni tipici dell'ipo o dell'ipertiroidismo, anche se la maggior parte dei pazienti resta comunque asintomatica (2).

Caratteristiche cliniche spesso riscontrate tuttavia nei soggetti affetti da RTH sono: deficit dell'attenzione con iperattività (attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD), ridotto quoziente intellettivo (QI), difetti di crescita, difetti del linguaggio, scarsa età ossea, bassa statura, gozzo e tachicardia (2,3).

Ad oggi questa sindrome è stata descritta in quasi 2000 pazienti appartenenti a 372 famiglie con un'incidenza di 1:40000 nati (4,5).

Dal punto di vista genetico è stata ampiamente dimostrata l'associazione esistente tra la presenza di mutazioni localizzate nell'isoforma  $\beta$  del gene per il recettore dell'ormone tiroideo (THRB) e l'insorgenza di RTH (6).

### Recettore dell'ormone tiroideo (TR $\beta$ )

Nell'uomo esistono due geni differenti che codificano per il recettore dell'ormone tiroideo (TR) chiamati rispettivamente THRA (isoforma  $\alpha$ ) e THRB (isoforma  $\beta$ ), localizzati rispettivamente sui cromosomi 17 e 3 (6,7). Mutazioni nel gene THRB sono state identificate nel 90% dei pazienti con RTH e, al momento, ne sono state descritte in letteratura più di 100.

Sebbene entrambi i geni siano ubiquitari, TR $\alpha$  è espresso prevalentemente in cuore, osso e cervello; TR $\beta$ -1 è molto abbondante in fegato, rene e tiroide mentre TR $\beta$ -2 è espresso solo nell'ipofisi anteriore e in specifiche aree dell'ipotalamo; le due isoforme  $\beta$  differiscono solo nella loro regione N-terminale (8,9).

Il gene THRB (locus 3p24.2) codifica per il recettore nucleare per l'ormone tiroideo (TR $\beta$ ), una proteina di 52.8 kDa composta da 461 aminoacidi. Il recettore è stato clonato nel 1986 come

omologo cellulare di v-erbA (avian erythroblastic leukemia oncogene homolog 2) (10).

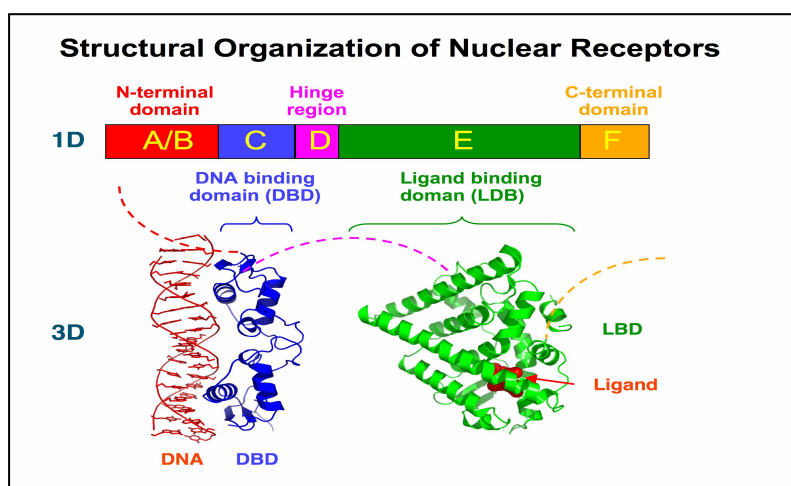
TR $\beta$  appartiene alla superfamiglia di recettori nucleari per fattori di trascrizione che include il recettore per gli ormoni steroidei, la vitamina D, l'acido retinoico, gli acidi grassi e alcuni recettori orfani di cui è ancora ignoto il ligando. Questi recettori giocano vari ruoli nello sviluppo, nell'omeostasi, e nell'insorgenza di patologie e, di conseguenza, sono il principale bersaglio dello sviluppo di farmaci (11).

TR $\beta$  agisce come fattore di trascrizione regolato dal ligando: lega sia l'ormone T<sub>3</sub> che sequenze di DNA denominate TH-Response Elements (TREs), localizzate nel promotore dei geni target.

Il recettore è composto da 10 esoni ed è suddivisibile in 3 domini funzionali:

1. un dominio N-terminale di transattivazione;
2. un dominio di legame al DNA (DBD);
3. un dominio C-terminale di legame all'ormone e sito di dimerizzazione (LBD).

Il dominio LBD è composto da circa 250 residui ed è la regione maggiormente conservata tra i vari membri della famiglia dei recettori nucleari. Il dominio N-terminale è invece quello che più diversifica i vari recettori e può presentare varie dimensioni, comprese tra 24 (recettore per la vitamina D) e 600 residui (recettore per i mineralcorticoidi). Il dominio DBD è in genere formato da circa 70 residui, responsabili del riconoscimento dei DNA response elements (11) (Figura 1).



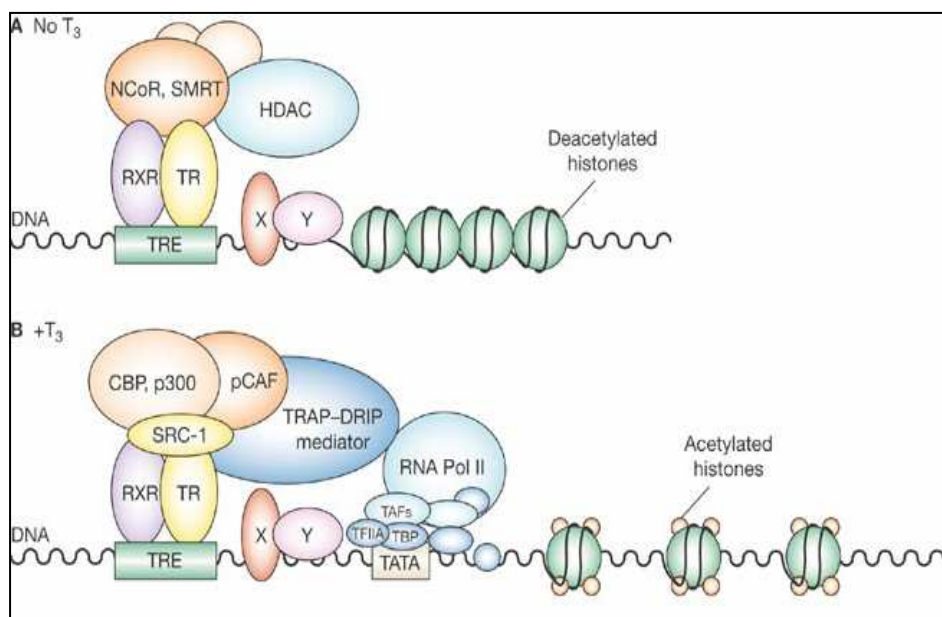
**Figura 1.** Struttura schematica dei recettori nucleari

TR $\beta$  è in grado di dimerizzare con il recettore dei retinoidi (RXR); in assenza del ligando questi omodimeri ed eterodimeri sono però associati a corepressori che silenziano la trascrizione genica. Il

successivo legame di  $T_3$  causa il rilascio dei corepressori e induce il reclutamento di coattivatori, stimolando così la trascrizione genica (12).

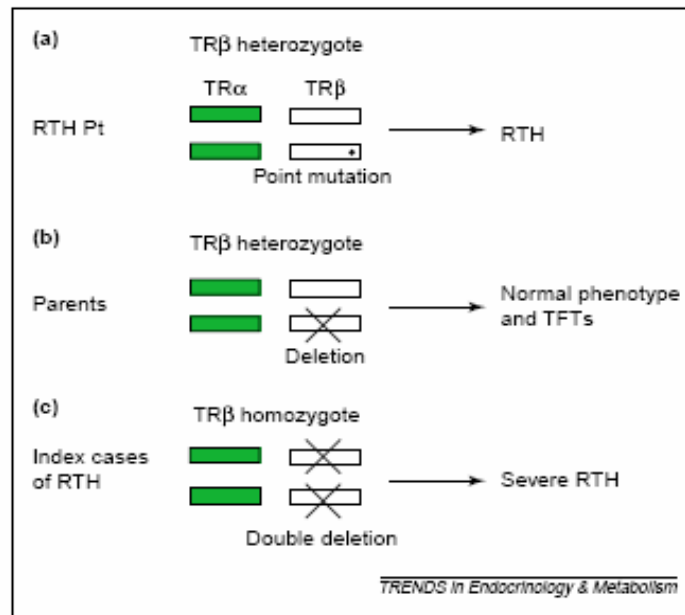
Recentemente è stata meglio caratterizzata una famiglia di proteine con funzione di corepressori nucleari chiamati NCoR e SMRT. NCoR è considerato il corepressore dei recettori nucleari e SMRT è invece il mediatore per il silenziamento da parte del recettore per l'ormone tiroideo e per i retinoidi. Questi fattori sono ubiquitari, sono espressi in tutti i tessuti dei vertebrati ma interagiscono diversamente in base al tipo di recettore nucleare. Entrambi sono in grado di silenziare la trascrizione promuovendo una conformazione chiusa della cromatina attraverso la deacetilazione degli istoni (13).

Successivamente proteine chiamate coattivatori sono reclutate in modo ligando dipendente. Sono state isolate molte di queste proteine e comprendono: SRC-1, (ERAP 160, p160), RIP 160, ERAP 140 (p140), RIP140, TIF1, TIF2 (GRIP1), TRIP1 (SUG-1), RAP 46, hRPF 1, ARA 70 (RFG), CBP (p300), p/CAF, P120, ACTR (AIB1, TRAM-1, pCIP), and GRIP 170 (13) (Figura 2).



**Figura 2.** L'interazione del recettore  $TR\beta$  con corepressori e coattivatori regola la trascrizione genica

Nella maggior parte dei casi la sindrome RTH è trasmessa in modo autosomico dominante. Gli individui che esprimono un singolo allele WT a causa di una delezione sono normali, mentre quelli che esprimono un allele mutato manifestano RTH. La presenza di una mutazione interferisce infatti con la normale funzionalità recettoriale, un fenomeno conosciuto come effetto dominante negativo. Questo spiega perché la trasmissione della sindrome è dominante se dovuta alla presenza di mutazioni e recessiva nei soggetti con una delezione del gene *THRB* (14) (Figura 3).



**Figura 3.** Effetto dominante negativo delle mutazioni

La maggior parte delle mutazioni associate all'RTH sono localizzate nell'LBD, e in particolare nei residui 310–353 (cluster 1), 429–461 (cluster 2), e 234–282 (cluster 3). E' stato dimostrato che le mutazioni nei clusters 1 e 2 impediscono il legame dell'ormone tiroideo direttamente: aumentano la dissociazione di T3 dal suo sito di legame, inibiscono la formazione di eterodimeri o, selettivamente, inibiscono il legame dei coattivatori. Le mutazioni nel cluster 3, invece, alterano la funzionalità recettoriale indirettamente attraverso il difettivo rilascio dei corepressori (13,15).

Dato che il fenomeno dell'effetto dominante negativo necessita però dell'instaurarsi del legame al DNA e della possibilità del recettore di formare eterodimeri, nessuna mutazione è mai stata identificata nella regione DBD. Tutte le mutazioni note sono infatti localizzate negli ultimi 4 esoni del gene e cioè nel sito di legame dell'ormone (16).

Il fenotipo clinico dovuto alla presenza di RTH varia sia in diverse famiglie affette dalla stessa mutazione che in membri diversi della stessa famiglia con la stessa mutazione. La maggior parte dei pazienti inoltre è eterozigote e i sintomi visibili sono quindi piuttosto lievi. Ad oggi solo un paziente è stato descritto come portatore di una mutazione in omozigosi ed è morto in giovane età presentando un quadro clinico complesso e valori molto elevati di ormoni tiroidei e di TSH (17).

Solo nel 10% dei casi sono state riscontrate le caratteristiche tipiche della RTH ma i soggetti non presentavano mutazioni nel gene *THRB*. Probabilmente sono coinvolti dei difetti a livello dei cofattori, oppure la mancata regolazione dei loro prodotti è responsabile del fenotipo osservato. In supporto di questa ipotesi sono stati studiati topi knock-out per il coattivatore *SRC-1*; si è potuto osservare che questi topi presentavano una forma moderata di RTH (18).

## **2. Scopo del lavoro**

Lo scopo del presente studio è stato analizzare un gruppo di pazienti di età compresa tra 1 e 18 anni con queste caratteristiche: elevati valori di ormoni tiroidei (fT3 e fT4), valori normali o leggermente elevati di TSH. In tutti i soggetti è stata inoltre condotta la diagnosi molecolare volta ad individuare la presenza di variazioni genetiche nel gene del recettore dell'ormone tiroideo (THRB).

## **3. Materiali e metodi**

### Selezione dei pazienti

Sono stati reclutati 9 pazienti (6 maschi e 3 femmine) che presentavano valori persistentemente elevati di ormoni tiroidei. Le caratteristiche cliniche analizzate includevano sesso, età, peso, altezza, stato puberale, familiarità per patologie tiroidee, presenza di gozzo alla palpazione e volume tiroideo. I parametri biochimici analizzati includevano invece i valori di TSH, fT3 e fT4 e anticorpi. 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 THRB

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) e gli esoni 7-10 del gene THRB e le regioni introniche fiancheggianti sono state amplificate tramite PCR.

La reazione è stata eseguita in un volume finale di 30 µl utilizzando 100 ng di DNA genomico e la polimerasi AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le condizioni di reazione sono le seguenti: denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti, 35 cicli con 95°C per 30", annealing a 55°C per 30" ed estensione a 72°C per 30", seguiti da un'estensione finale di 5 minuti a 72°C.

Il prodotto di amplificazione è stato visualizzato su gel di agarosio al 2% e i campioni sono stati poi analizzati tramite 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.

## 4. Risultati

### Caratteristiche cliniche dei pazienti

Le caratteristiche cliniche dei pazienti analizzati sono riassunte in tabella 1.

E' interessante notare che tutti i soggetti sono stati reclutati dal nostro ambulatorio per motivi differenti dal sospetto di sindrome RTH: 3 soggetti sono stati visitati per scarso accrescimento, 2 per eccesso ponderale e 3 per la presenza di nodo tiroideo. In particolare in due pazienti con nodo tiroideo è stata rilevata anche la presenza di timo ectopico.

Dal punto di vista neurocognitivo la sindrome da deficit di attenzione con iperattività (ADHD) è stata riscontrata in 3 soggetti; in un soggetto è stata diagnostica dislessia mentre in un altro caso è stato possibile osservare la presenza di ritardo cognitivo in combinazione con epilessia.

**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche dei pazienti in studio (n=9)

<b>Paziente</b>	<b>Motivo visita</b>	<b>ECO</b>	<b>NPI</b>
1	Scarso accrescimento	Normale	ADHD / dislessia
2	Scarso accrescimento	Normale	ADHD
3	Scarso accrescimento	Normale	
4	Eccesso ponderale	Normale	ADHD
5	Familiarità / Eccesso ponderale	Normale	
6	Nodo tiroideo/ familiarità	Timo ectopico	
7	Nodo tiroideo	Timo ectopico	Scarso rendimento scolastico
8	Nodo tiroideo	Normale	
9	Familiarità	Normale	Ritardo cognitivo / epilessia

I valori di fT3, fT4 e TSH dei pazienti sono riassunti in tabella 2. Come si può osservare l'ormone TSH era superiore al range di normalità in solo due soggetti.

I range di normalità considerati nel nostro studio sono i seguenti:

- TSH 0,450-3,500  $\mu$ UI/ml
- fT3 2.3-4.2 pg/ml
- fT4 0.89-1.76 ng/dl

**Tabella 2.** Valutazione ormonale dei pazienti analizzati

<b>Paziente</b>	<b>TSH (<math>\mu</math>UI/ml)</b>	<b>fT4 (pg/ml)</b>	<b>fT3 (ng/dl)</b>
1	2.11	22.2	9.17
2	10.08	1.47	7.4
3	3.33	3.34	7.1
4	3.11	1.26	4.4
5	-	-	-
6	2.83	1.03	5
7	5.82	2.25	8.7
8	3.07	2.12	7.3
9	1.93	19.7	5.02

### Analisi molecolare del gene THRB

Tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati sottoposti ad analisi molecolare del gene THRB; per escludere inoltre la presenza di ipotiroidismo è stato inoltre analizzato anche il gene TSHR, ma come atteso nessuna mutazione è stata trovata in questo gene.

Nella nostra serie di pazienti nel gene THRB sono stati identificati due polimorfismi di singolo nucleotide (SNP): rs3752874 per la sostituzione C>T nell'esone 7 che causa la variazione sinonima F245F (5/9 = 55.5%) e rs2278802 in posizione IVS8 -65bp A>T (5/9 = 55.5%).

Sono state inoltre identificate due mutazioni missenso già note: A234T e R438H. Entrambe le mutazioni sono state trovate in condizione di eterozigosi e sono correlate con l'insorgenza della RTH . Sono localizzate nella regione C-terminale del recettore, rispettivamente nel cluster 3 e 2 del dominio di legame del ligando (LBD).

La mutazione A234T è stata identificata in due pazienti non correlati tra loro, ed è causata dalla sostituzione G700A (GCC→ACC) nell'esone 7 del gene; l'aminoacido alanina in posizione 234 viene così sostituito da un residuo di treonina.

In due fratelli è stata invece identificata la sostituzione G1313A (CGC→CAC) nell'esone 10, che causa la presenza di un residuo di arginina in posizione 438 al posto di un residuo di istidina (R438H).

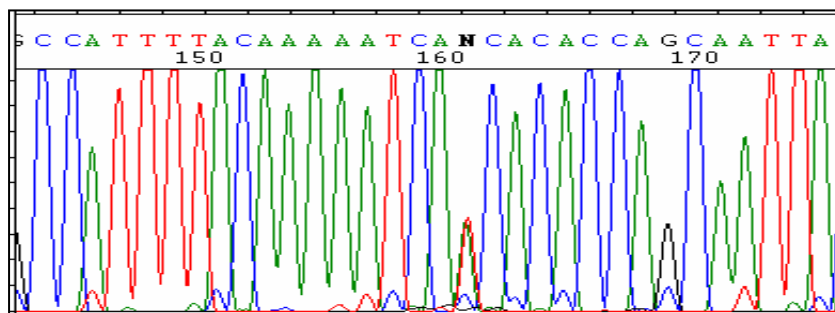
### Nuova variazione identificata: I276N

Una bambina di 3 anni giungeva all'osservazione per scarso accrescimento. Nata pretermine, AGA (Appropriate Gestational Age), con TSH nei limiti allo screening neonatale, dai primi mesi di vita mostrava scarsa crescita staturo-ponderale. Alla prima visita presentava peso e statura sul 6° percentile, -1.7 DS rispetto al target parentale e tiroide non palpabile. Il TSH era nei limiti (3.335  $\mu$ UI/ml) con fT3 e fT4 aumentati (rispettivamente 7.10 pg/ml e 2.32 ng/dl). I restanti esami ematochimici, l'esame obiettivo e la valutazione neuropsichiatrica erano nella norma.

Nel sospetto di RTH è stata eseguita l'analisi molecolare del gene THRB, che ha evidenziato la presenza di una nuova variazione missenso in eterozigosi nell'esone 8 (I276N). La transizione T827A (ATC→AAC) comporta la sostituzione di un residuo di isoleucina con un residuo di asparagina in posizione 276 (I276N). L'elettroferogramma della nuova mutazione è rappresentato in figura 4.

Dall'anamnesi familiare è emerso che la madre presentava da anni una storia di alterata funzione tiroidea; sintomi presenti erano tachicardia, diarrea, gozzo e fT3 ed fT4 erano aumentati. Il TSH era nella norma, il quadro ecografico e citologico era suggestivo per tiroidite linfocitaria.

Una caratteristica non frequente era la presenza, sia nella madre che nella bambina, di anticorpi stimolanti la tiroide (tiroidite autoimmune). In seguito alla precedente diagnosi, anche la madre è stata sottoposta ad indagine genetica con riscontro della stessa variazione I276N in eterozigosi.



**Figura 4.** Elettroferogramma della nuova variazione identificata: I276N

La variazione I276N è localizzata nel cluster 3 del dominio di legame all'ormone tiroideo e per ipotizzare gli effetti della variazione sulla funzionalità e sulla struttura proteica sono stati usati dei software informatici:

1) SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) calcola la probabilità che il cambiamento sia deleterio attraverso l'analisi di similarità di sequenze proteiche tra diverse specie e attraverso lo studio delle caratteristiche idrofobiche dei singoli aminoacidi;



2) PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) considera invece alcuni parametri e la struttura tridimensionale delle proteine.

Dall'analisi informatica è emerso che la variante I276N causa la distruzione del sito di legame del recettore. Il suo reale coinvolgimento nella patogenesi della RTH sarà oggetto di successivi studi funzionali.

## 5. Discussione

La sindrome da resistenza all'azione degli ormoni tiroidei (RTH) è caratterizzata da elevati livelli di ormoni tiroidei in presenza di valori normo-elevati di TSH; si rendono quindi necessarie concentrazioni più elevate di ormone tiroideo per produrre una risposta metabolica da parte dei tessuti periferici, e per ottenere la soppressione della secrezione di TSH da parte dell'ipofisi (2,3).

Il fenotipo clinico può essere molto eterogeneo e variare dal subclinico al sintomatico. La maggior parte dei pazienti sono privi di anomalie cliniche, visto che la resistenza osservata è compensata dagli elevati livelli di ormoni tiroidei. In alcuni soggetti i sintomi dell'eccesso di ormone tiroideo possono comunque variare in relazione al grado variabile di coinvolgimento dei differenti tessuti (2).

Studi precedenti hanno dimostrato che nei pazienti affetti da RTH è possibile osservare una maggiore incidenza di gozzo (65%), ADHD (60%), IQ inferiore a 85 (38%), difetti del linguaggio (35%), e bassa statura (18%). Sintomi frequentemente associati sono anche scarso rapporto peso/altezza e tachicardia (19,20).

E' ormai noto che nel 90% dei casi i pazienti affetti da RTH presentano mutazioni nell'isoforma  $\beta$  del gene che codifica per il recettore dell'ormone tiroideo (THRB), localizzato sul cromosoma 3 (6). Nessuna mutazione nell'isoforma  $\alpha$  è invece mai stata trovata nell'uomo (21).

Il quadro clinico dell'RTH può variare in base al tipo di mutazione, alla sua localizzazione, ai livelli di espressione tissutale delle isoforme recettoriali oppure in base alla possibile presenza di meccanismi compensatori o altri difetti genetici presenti (6).

Tranne in rare eccezioni la sindrome è ereditata come autosomica dominante; la presenza di un allele mutato interferisce tuttavia con la funzionalità dell'allele wild-type, un fenomeno conosciuto come effetto dominante negativo. Gli individui con delezione di un allele sono infatti normali, mentre quelli portatori di un singolo allele mutato presentano RTH (14).

E' stato dimostrato che le mutazioni possono compromettere la funzionalità recettoriale creando una ridotta affinità per T3, oppure alterando l'interazione con i cofattori coinvolti nella trascrizione genica.

In due dei nostri pazienti è stata trovata la mutazione già descritta in letteratura A234T. Entrambi i

soggetti sono portatori della variazione in eterozigosi. La mutazione è localizzata nel cluster 3 del dominio di legame del ligando (LBD) del recettore. Studi funzionali precedenti hanno dimostrato che in presenza di questa variazione sono necessarie concentrazioni più elevati di ormone, rispetto al wild-type, per ottenere il rilascio dei corepressori ed attivare così la trascrizione genica (15). Inoltre è stato osservato che tale sostituzione causa anche una debole diminuzione del legame di T3 al recettore (16).

Dal punto di vista neurologico il primo soggetto è risultato essere affetto inoltre da sindrome da deficit dell'attenzione con iperattività (ADHD) combinata con dislessia, mentre il secondo soggetto presentava ritardo cognitivo ed epilessia. Questi dati confermano il quadro di grande variabilità fenotipica a cui è associata l'RTH (20).

Un'altra mutazione già descritta in letteratura, R438H, è stata identificata in due fratelli. La mutazione è localizzata anch'essa nella regione LBD del recettore, ed in particolare nel cluster 2, e la sostituzione aminoacidica introdotta crea una diversa carica e diversa idrofobicità nel recettore; dal punto di vista funzionale studi precedenti hanno dimostrato che il recettore mutato non è più in grado di legare l'ormone e non riesce a dimerizzare correttamente con il recettore per l'acido retinoico. Fenotipicamente uno dei due fratelli era inoltre caratterizzato da scarso rendimento scolastico e dalla presenza di timo ectopico; è interessante notare che per entrambi il motivo della prima visita era la presenza di un nodo tiroideo, riscontrato peraltro anche in un altro fratello privo di mutazioni nel gene *THRB*, ma con timo ectopico. Questi dati confermano la grande variabilità fenotipica riscontrabile anche all'interno della stessa famiglia.

In una bambina e nella madre è stata identificata la nuova variazione I276N nell'esone 8 del gene. La bambina è stata visitata la prima volta per scarso accrescimento, ma dal punto di vista biochimico erano presenti valori elevati di fT3 e fT4. Dall'anamnesi familiare è emerso che la madre presentava da anni una storia di alterata funzione tiroidea ed è stata scoperta la presenza, sia nella madre che nella bambina, di anticorpi stimolanti la tiroide indicativi di tiroidite autoimmune.

L'associazione tra RTH e tiroidite autoimmune è già stata descritta precedentemente (22).

Ipotesi accreditata è che la stimolazione cronica tipica dell'RTH attivi i linfociti intra-tiroidei a produrre citochine pro-infiammatorie come TNF-alpha, le quali portano alla distruzione delle cellule tiroidee attraverso il legame al loro recettore nei tireociti; si potrebbe inoltre avere un effetto indiretto attraverso il potenziamento della formazione di anticorpi o di linfociti T citotossici (23).

Anche l'associazione con malattie autoimmuni tiroidee potrebbe portare alla diagnosi di RTH.

La presenza di tiroiditi autoimmuni e il conseguente danno alla ghiandola tiroidea potrebbero inoltre ridurre i livelli sierici di ormoni tiroidei, mascherando così i tratti tipici della sindrome RTH.

In conclusione si suggerisce di sottoporre a valutazione genetica i soggetti con livelli normali o

aumentati di TSH, e valori elevati di ormoni tiroidei, anche in assenza di segni specifici di ipo- o iperfunzione tiroidea o in presenza di tiroidite cronica.

## Bibliografia

1. Refetoff S, DeWind LT, DeGroot LJ. (1967) Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **27**:279-294.
2. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ.(1993) The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev* **14**:348-399.
3. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ, Hayashi Y. (1994) The syndromes of resistance to thyroid hormone: update. *Endocrine Rev.* **3**:336-343.
4. Weiss RE, Refetoff S, (2000) Resistance to thyroid hormone. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **1**: 97–1086.
5. LaFranchi SH, Snyder DB, Sesser DE, Skeels MR, Singh N, Brent GA, Nelson JC. (2003) Follow-up of newborns with elevated screening T4 concentrations. *J. Pediatr.* **143**: 296–301.
6. Yen, P.M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. rev.* **81**:1097–1142.
7. Zhang J, Lazar MA. (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* **62**: 439–466.
8. O'Shea PJ, Harvey CB, Suzuki H, Kaneshige M, Kaneshige K, Cheng SY, Williams GR. (2003) A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Mol. Endocrinol.* **17**: 1410–1424.
9. Wondisford FE. (2003) Thyroid hormone action: insight from transgenic mouse models. *J. Investig. Med.* **51**: 215–220.
10. Sakurai A, Nakai A, De Groot LJ. (1990) Structural analyses of human thyroid receptor b gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **71**: 83–91.
11. Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ (1995) A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor *Nature* **378**: 690-697.
12. Koenig RJ (1998) Thyroid hormone receptor coactivators and corepressors. *Thyroid* **8**:703–713.
13. Safer JD, Cohen RN, Hollenberg AN, Wondisford FE. (1998) Defective Release of Corepressor by Hinge Mutants of the Thyroid Hormone Receptor Found in Patients with Resistance to Thyroid Hormone *The Journal Of Biological Chemistry* **273**: 30175-30182.
14. Takeda K, Sakurai A, DeGroot LJ, Refetoff S. (1992) Recessive inheritance of thyroid hormone resistance caused by complete deletion of the protein-coding region of the thyroid hormone receptor-beta gene. *J Clin Endocrinol Metab.* **74**: 49-55.

15. Huber BR, Desclozeaux M, West BL, Cunha-Lima ST, Nguyen HT, Baxter JD, Ingraham HA, Fletterick RJ. (2003) Thyroid hormone receptor-beta mutations conferring hormone resistance and reduced corepressor release exhibit decreased stability in the N-terminal ligand-binding domain. *Mol Endocrinol* **17**:107–116.
16. Collingwood TN, Wagner R, Matthews CH, Clifton-Bligh RJ, Gurnell M, Rajanayagam O, Agostini M, Fletterick RJ, Beck-Peccoz P, Reinhardt W, Binder G, Ranke MB, Hermus A, Hesch RD, Lazarus J, Newrick P, Parfitt V, Raggatt P, de Zegher F, Chatterjee VK. (1998) A role for helix 3 of the TRbeta ligand-binding domain in coactivator recruitment identified by characterization of a third cluster of mutations in resistance to thyroid hormone. *EMBO J* **17**:4760–4770.
17. Usala SJ, Menke JB, Watson TL, Wondisford FE, Weintraub BD, Bérard J, Bradley WE, Ono S, Mueller OT, Bercu BB. (1991) A homozygous deletion in the c-erbA b thyroid hormone receptor gene in a patient with generalized thyroid hormone resistance: isolation and characterization of the mutant receptor. *Mol. Endocrinol.* **5**: 327–335.
18. Weiss RE, Xu J, Ning G, Pohlenz J, O'Malley BW, Refetoff S. (1999) Mice deficient in the steroid receptor coactivator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *EMBO J.* **18**:1900–1904
19. Usala SJ, Tennyson GE, Bale AE, Lash RW, Gesundheit N, Wondisford FE, Accili D, Hauser P, Weintraub BD. (1990) A base mutation of the C-erbA beta thyroid hormone receptor in a kindred with generalized thyroid hormone resistance. Molecular heterogeneity in two other kindreds. *J Clin Invest* **85**:93–100.
20. Brucker-Davis F, Skarulis MC, Grace MB, Benichou J, Hauser P, Wiggs E, Weintraub BD (1995) Genetic and clinical features of 42 kindreds with resistance to thyroid hormone. *Ann Intern Med.* **123**:572-583
21. Yen PM (2003) Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* **14**:327-333
22. Robinson DB, Michaelis RD, Shakir KMM. (1993) Autoimmune hypothyroidism in a patient with generalized resistance to thyroid hormone. *South Med J* **86**: 1395-1397.
23. Gavin C, Meggison H, Ooi TC. (2008) Proposing a causal link between thyroid hormone resistance and primary autoimmune hypothyroidism. *Med Hypotheses* **70**:1024-1028.

## **SEZIONE 2**

### **Attività formativa**

#### **Corsi frequentati:**

Journal Club in lingua inglese

Lezioni frontali con Prof. Dianzani, Prof. Albano, Dott.ssa Corrado e Dott. Comi

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

##### **I anno:**

Production of bio-farmaceuticals in plants.

Prof. L. Santi (5 dicembre 08)

Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche.

Prof. A. Uccelli (12 dicembre 08)

La malattia celiaca

Prof. R. Troncone (09 gennaio 09)

Porpora trombocitopenica autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici.

Prof. F. Zaja (13 gennaio 09)

Interazioni geni-ambiente nella eziologia della sclerosi multipla: studi sui gemelli.

Prof. M. Salvetti (27 gennaio 09)

Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica.

Prof. A. Musarò (10 febbraio 09)

When a fine tuner of signaling pathways becomes a dangerous amplifier: the case of the Proliferation-inducing kinase Pin1 in cancer.

Prof. G. Del Sal (20 febbraio 09)

Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica.

Prof. M. Maccarone (26 febbraio 09)

La proteomica: un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine.

Prof. P. Pucci (18 marzo 09)

Le nanotecnologie applicate alla medicina.

Prof. G. Peluso (19 marzo 09)

I bioreattori nella Medicina Rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up.

Dott.ssa S. Mantero (09 aprile 09)

Patologia dei tumori cerebrali. Recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi.

Prof. D. Schiffer (22 aprile 09)

Polarized inflammation in tumor development.

Prof. A. Sica (30 aprile 09)

Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo.

Prof. A. Columbano (05 maggio 09)

Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy.

Dott.ssa B. Palazzo (06 maggio 09)

Transfection Technologies: Mechanism and Optimization.

Prof. B. Gopalakrishnan (11 maggio 09 Discaff)

Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana.

Prof. G. Poli (12 maggio 09)

Neurotossicità delle proteine "misfolded" nelle malattie del motoneurone.

Prof. A. Poletti (12 maggio 09)

Functional Genomics of Brain.

Prof. S. Gustincich (14 maggio 09)

## **II anno:**

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)

### **III anno:**

Biomimetalization and preparation of biomimetic nanoapatites  
Dr. Jaime Gomez Morales (11 novembre 2010)

Characterization of biomimetic nanoapatites  
Dr. Jose Manuel Delgado Lopez (11 novembre 2010)

Le cellule NK: dalla biologia alla terapia di leucemie ad alto rischio  
Dr. Lorenzo Moretta (29 novembre 2010)

Targeting lactate-fueled respiration in cancer: a new therapeutic opportunity?  
Prof. Pierre Sonveaux (01 dicembre 2010)

Precision in the lab - Eppendorf  
PhD Ulrike Gast (20 gennaio 2011)

Fluorescent mesoporous nanoparticles as tracer of the endocytic and exocytic pathway *and*  
Caveolae mediates endocytosis of mesoporous nanoparticle in ovarian cancer cells  
Dr.ssa Maneerat Ekkapongpisit (01 marzo 2011)

Linfomi cutanei primitivi  
Prof. Emilio Berti (02 marzo 2011)

Ferritins: ancient proteins with novel unexpected features  
Dott.ssa Sonia Levi (12 aprile 2011)

Metabolic syndrome: the gastroenterologist point of view  
Dott.ssa Elisabetta Bugianesi (13 aprile 2011)

Fertilità, ormoni e sessualità: Ricerca andrologica a Roma – ultimi due anni e dintorni  
Prof. Andrea Lenzi (28 aprile 2011)

Liver fibrosis in children affected by NASH: how to investigate that  
Dott. Valerio Nobili (29 aprile 2011)

Reverse vaccination in autoimmune diseases  
Dott. Gilberto Filaci (03 maggio 2011)

Innate Immunity and the pathogenicity of inhaled microbial particles  
Dott. Henrik Wolff (09 maggio 2011)

Endocrine disturbances during Thyrosine Kinase Inhibitor treatment  
Prof. Roberto Baldelli (12 maggio 2011)

Mechanisms and Models of TDP-43 Proteinopathies  
Prof. Leonard Petrucci (19 maggio 2011)

Farmacologia dell'aterosclerosi  
Dott. Alberto Corsini (13 maggio 2011)

Iron Management in the Heparin Era  
Dr. Steven R. Ellis (25 maggio 2011)

Molecular pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease  
Prof. Mauro Fasano (17 giugno 2011)

Frontotemporal Dementia: trying to solve a complex disorder  
Dr Jonathan D. Rohrer (24 giugno 2011)

Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis  
Prof. Maurizio Parola (01 luglio 2011)

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 fisiopatologici e 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 settembre 2010

13<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (ECE)  
Rotterdam, The Netherlands 30 Aprile-04 Maggio 2011

35° Congresso Nazionale Società Italiana di Endocrinologia (SIE)  
Montesilvano (Pescara) 18-21 Maggio 2011

Obesità e tiroide: opinioni a confronto. Nuove visioni di una vecchia questione  
Istituto Auxologico Italiano, Villa Caramora-Verbania 18 Giugno 2011

### Comunicazioni a congressi:

#### Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster):

1) **Stefania Moia**, Flavia Prodam, Alice Monzani, Simonetta Bellone, Stefania Riccomagno, Gillian Walker, Letizia Trovato, Marta Roccio, Patrizia Agretti and Gianni Bona

"Molecular analysis and functional significance of TSHR gene mutations in pediatric patients"

13<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (ECE) 30 Aprile-04 Maggio 2011 Rotterdam

2) **Stefania Moia**, Flavia Prodam, Alice Monzani, Simonetta Bellone, Letizia Trovato, Gillian Walker, Stefania Riccomagno, Marta Roccio, Patrizia Agretti e Gianni Bona

"Analisi molecolare e significato funzionale di mutazioni del gene TSHR in pazienti pediatrici"

35° Congresso Società Italiana di Endocrinologia (SIE) 18-21 Maggio 2011 Montesilvano (Pescara)

#### Altre comunicazioni a congressi:

1) Riccomagno S, **Moia S**, Bellone 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) L. Trovato, F. Prodam, G. Genoni, G. Walker, S. **Moia**, S. Riccomagno, S. Bellone, G. Bona

"Coinvolgimento di geni correlati all'infiammazione ed al ciclo cellulare nella condizione di bassa statura idiopatica"

35° Congresso Società Italiana di Endocrinologia (SIE) 18-21 Maggio 2011 Montesilvano (Pescara)

### Articoli scientifici pubblicati nel corso del dottorato:

- 1) 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.
- 2) Vivenza D, Godi M, Faienza MF, Mellone S, **Moia S**, Rapa A, Petri A, Bellone S, Riccomagno S, Cavallo L, Giordano M, Bona G. (2011) A novel HESX1 splice mutation causes isolated GH deficiency by interfering with mRNA processing. *Eur J Endocrinol.* **164**(5):705-713.
- 3) Flavia Prodam, Letizia Trovato, Irene Demarchi, Arianna Busti, Antonella Petri, **Stefania Moia**, Gillian E. Walker, Gianluca Aimaretti, Gianni Bona e Simonetta Bellone (2011) Unacylated, acylated ghrelin and obestatin levels are differently inhibited by oral glucose load in pediatric obesity: association with insulin sensitivity and metabolic alterations. *e-SPEN, The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* **6**(3):109-115.

### Altri articoli scientifici pubblicati:

- 1) Vidali M, Occhino G, Ivaldi A, Serino R, **Moia S**, Alchera E, Carini R, Rigamonti C, Sartori M, Albano E. (2007) Detection of auto-antibodies against cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* **46**(4):605-612.