

Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”



Tesi di Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare
Ciclo XXIV

Screening genetico dell'ipertireotropinemia in età pediatrica

Responsabile del Corso:
Prof. Umberto Dianzani

Responsabile Scientifico:
Prof. Gianni Bona

Dottoranda:
Dott.ssa Stefania Moia

Sommario parte 1

1. INTRODUZIONE.....	5
Asse ipotalamo-ipofisario.....	5
Ipotiroidismo subclinico.....	7
Il recettore del TSH (TSHR).....	8
Signaling cellulare del TSHR.....	10
Mutazioni note presenti nel gene del TSHR.....	12
2. SCOPO DEL LAVORO.....	15
3. MATERIALI E METODI.....	16
Selezione dei pazienti.....	16
Analisi molecolare del gene TSHR.....	17
Mutagenesi sito-diretta.....	18
Colture cellulari.....	19
Immunofluorescenza: microscopia confocale.....	19
Saggio di vitalità cellulare.....	20
Dosaggio secondi messaggeri: cAMP.....	21
Dosaggio secondi messaggeri: IP.....	21
Analisi statistica.....	22
4. RISULTATI.....	23
Analisi molecolare del gene del TSHR.....	23
Nuove variazioni identificate nel gene del TSHR.....	25
Studi funzionali W520X: microscopia confocale.....	26
Studi funzionali W520X: test di vitalità cellulare.....	27
Studi funzionali W520X : dosaggio cAMP e IP.....	28
5. DISCUSSIONE.....	30
6. BIBLIOGRAFIA.....	34

Sommario parte 2

1. INTRODUZIONE.....	41
Resistenza all'azione degli ormoni tiroidei (RTH).....	41
Recettore dell'ormone tiroideo (TR β).....	42
Mutazioni note presenti nel gene del THRB.....	46
2. SCOPO DEL LAVORO.....	49
3. MATERIALI E METODI.....	51
Selezione dei pazienti.....	51
Analisi molecolare del gene del THRB.....	51
4. RISULTATI.....	53
Analisi molecolare del gene THRB.....	53
Nuova variazione identificata: I276N.....	55
5. DISCUSSIONE.....	57
6. BIBLIOGRAFIA.....	60
ALLEGATI E PUBBLICAZIONI.....	64

**Parte 1: ANALISI MOLECOLARE DEL GENE TSHR IN
PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA IPOTIROIDISMO
SUBCLINICO**

1. Introduzione

Asse ipotalamo-ipofisario

La tiroide è una ghiandola endocrina, di tipo follicolare ed è localizzata nella regione anteriore del collo; essa produce due ormoni, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), che agiscono come regolatori della crescita e del metabolismo, e secerne inoltre un altro ormone, la calcitonina, la quale è coinvolta 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.

L'ipofisi produce la tireotropina, nota anche con la sigla TSH (thyroid-stimulating hormone), la quale esercitando un'azione trofica sulle cellule follicolari della tiroide incrementa la produzione degli ormoni T3 e T4. 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).

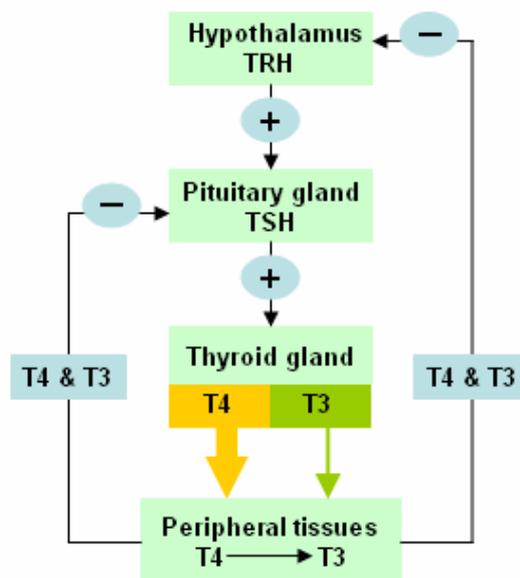


Figura 1. Asse ipotalamo-ipofisario e sua regolazione.

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 (T_3) mentre due residui di DIT daranno origine ad una molecola di tiroxina (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 (3).

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, cioè 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% mentre i dati sulla prevalenza in età pediatrica sono limitati e spesso discordanti (4,5,6).

Sebbene nella maggior parte dei casi la patologia rimanga stabile nel tempo (70-80% a 10 anni), è ormai noto che in una piccola percentuale di casi l'ipotiroidismo può regredire; spesso l'ipotiroidismo subclinico può purtroppo però anche evolvere in ipotiroidismo conclamato, anche se tale complicazione 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; 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 (8).

In letteratura è stato ampiamente dimostrato il coinvolgimento di una componente genetica responsabile dell'insorgenza dell'ipotiroidismo subclinico; in particolare 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 (TSHR) 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 (9).

Il recettore è composto da due subunità, denominate α e β , codificate dallo stesso gene e unite da ponti disolfuro; la subunità α comprende il dominio extracellulare mentre la subunità β contiene la porzione di recettore ancorata alla membrana e il dominio intracellulare (figura 2) (10). L'instaurarsi di interazioni intramolecolari tra il dominio extracellulare e i loop del dominio transmembrana mantengono il recettore in una conformazione chiusa e quindi inattiva.

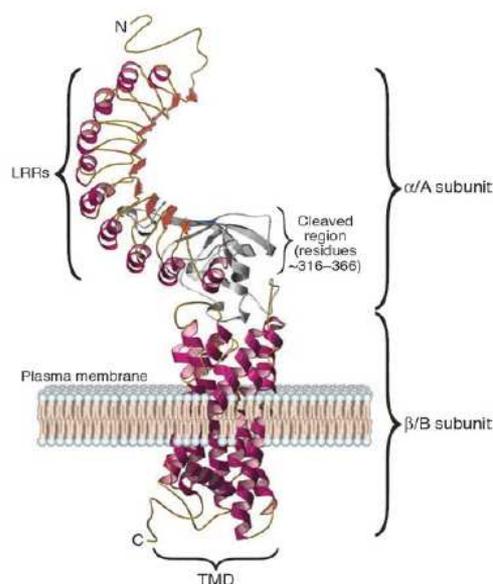


Figura 2. Modello strutturale del TSHR con evidenziate le due subunità α e β .

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 recettore nelle sue due subunità, grazie alla rimozione di un segmento polipeptidico di 50 aminoacidi che si estende dal residuo 316 al residuo 366 (Figura 2); i ponti disolfuro sono ridotti grazie a proteine disolfuro isomerasi che portano al rilascio della subunità α 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. E' noto inoltre 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-tiroidei; la presenza dell'RNA messaggero del TSHR è stata rilevata anche in fibroblasti, adipociti, linfociti, specifiche regioni del cervello, ghiandola surrenale, cardiomiociti, fegato e timo, anche se gli studi a riguardo sono ancora limitati (14,15).

E' ormai noto che 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 α , β e γ : la dissociazione della subunità α dal complesso $\beta\gamma$ e la conversione delle molecole di GDP in GTP porta alla trasduzione del segnale e infine alla risposta cellulare (Figura 3).

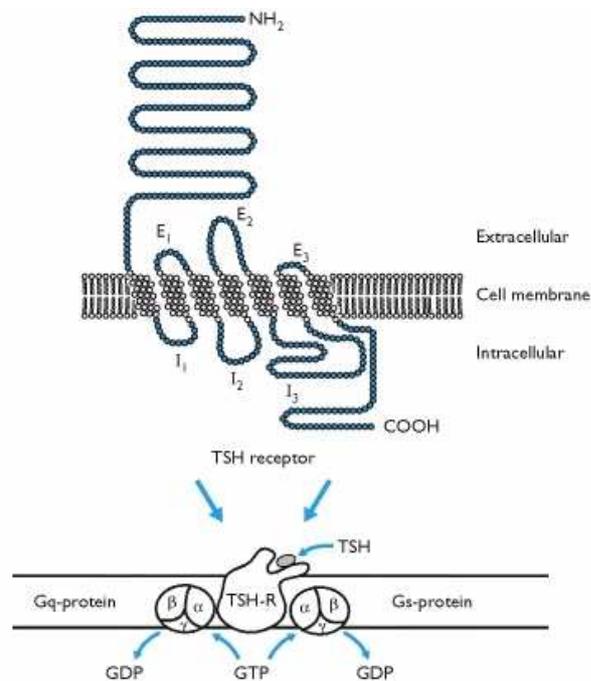


Figura 3. Meccanismo d'azione del TSHR: il legame dell'ormone attiva le proteine G associate al recettore e stimola la conversione del GDP in GTP

E' stato dimostrato che il recettore del TSH è in grado di legare due tipi di proteine G, quelle contenenti la subunità di tipo α_s oppure quelle legate alla subunità $\alpha_{q/11}$ (Figura 4) (17).

Le proteine G associate alla subunità α_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 (PIP₂) in inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG). Il conseguente rilascio di Ca²⁺ 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).

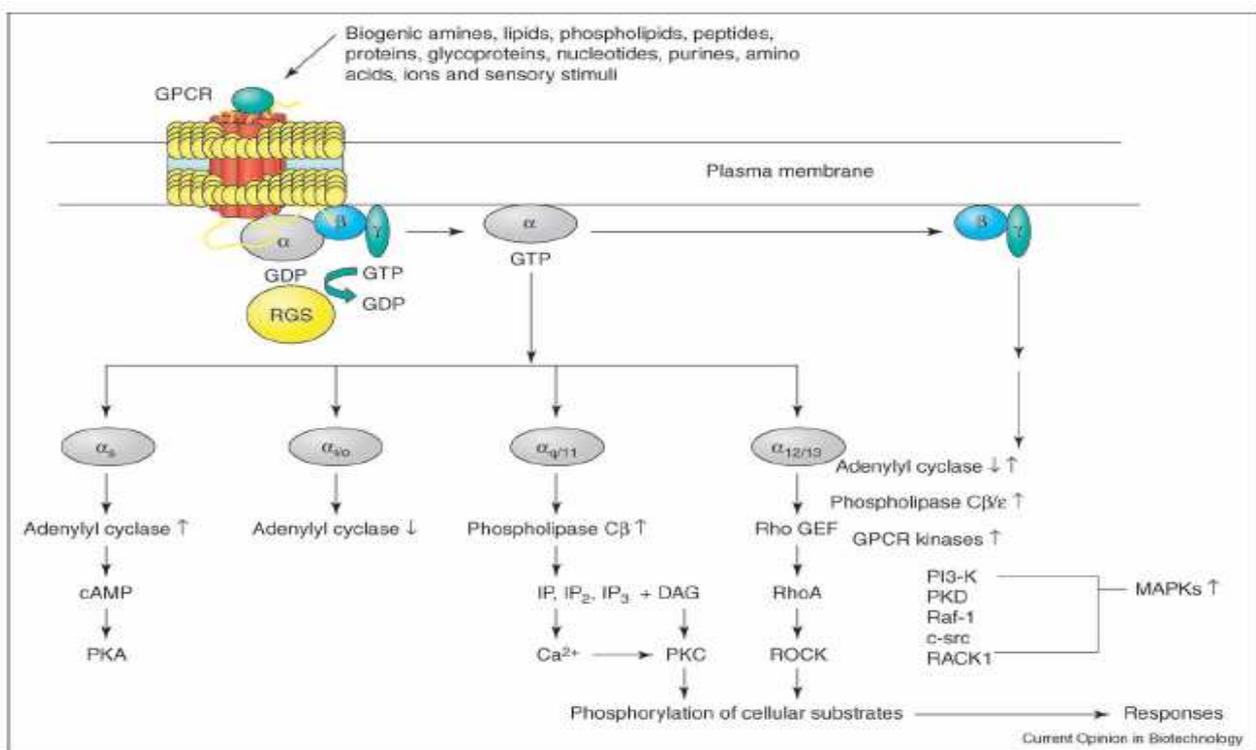


Figura 4. TSHR lega due tipi di proteine G, quelle contenenti la subunità di tipo α_s oppure quelle legate alla subunità $\alpha_{q/11}$

La formazione di cAMP Gas-mediata è stata in passato descritta come il principale meccanismo di signaling intracellulare che media l'azione del TSHR. Recentemente Kero e collaboratori (18) hanno però dimostrato che il pathway Gaq/11-mediato è necessario nell'adulto per il rilascio e la sintesi degli ormoni tiroidei TSH-indotta, e che inoltre un suo deficit può causare la comparsa di

una condizione di ipotiroidismo.

Un'addizionale conferma dell'essenziale ruolo fisiologico delle proteine Gq/11 è stata dimostrata attraverso l'osservazione che le mutazioni germinali localizzate nel gene TSHR coinvolgono in modo preferenziale il pathway dell'inositolo fosfato (19).

Mutazioni note presenti nel gene del TSHR

Nell'uomo sono state identificate numerose mutazioni localizzate nelle regioni codificanti del gene del TSHR, suddivisibili in due categorie, germinali oppure somatiche.

Le mutazioni germinali di tipo "gain of function" possono essere causa di ipertiroidismo congenito, in quanto incrementano l'attività basale del recettore e lo rendono costitutivamente attivo anche in assenza del ligando (11). Le mutazioni germinali di tipo "loss of function" interferiscono invece negativamente con la normale funzionalità recettoriale e sono così associabili alla resistenza al TSH e all'ipotiroidismo congenito (20).

Le mutazioni di tipo somatico 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 oggetto del nostro studio è solitamente causata dalla presenza di mutazioni di tipo "loss of function" ugualmente distribuite lungo l'intera sequenza del gene TSHR (Figura 5). In letteratura sono state descritte varie tipologie di 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 le mutazioni missenso localizzate nel dominio extracellulare possono causare una ridotta o assente capacità di legare l'ormone; la maggior parte delle mutazioni riportate in questa regione causano inoltre una ridotta espressione del recettore sulla superficie cellulare; ciò può essere dovuto ad un "misfolding" del recettore incompatibile con la sua esportazione dal reticolo endoplasmatico e con la successiva 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 (21,22).

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 (23), 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 (24).

Come è ormai noto per molti altri recettori accoppiati a proteine G, le forme mutate oppure "misfolding" vengono ritenute e degradate nel reticolo endoplasmatico attraverso il pathway del proteasoma; 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 (25).

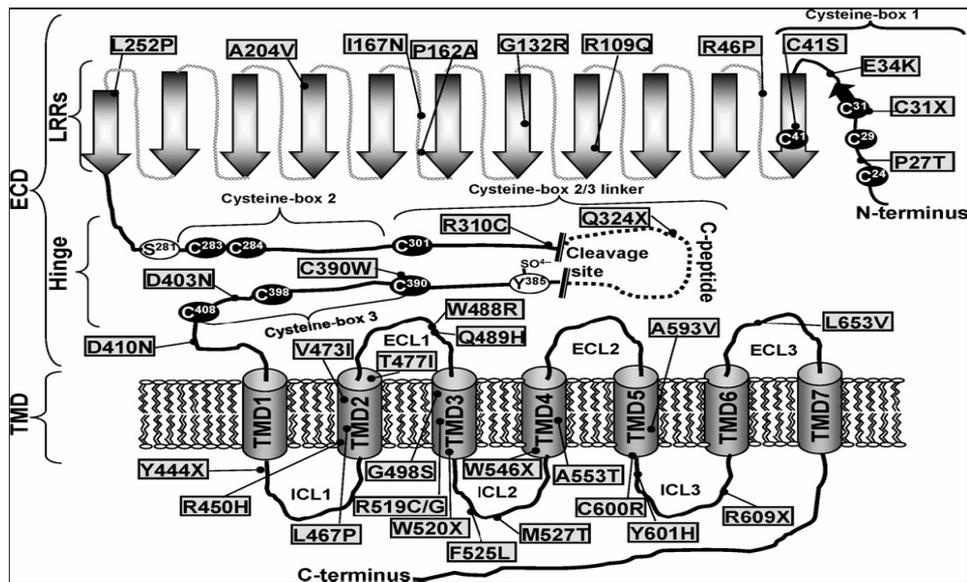


Figura 5. Rappresentazione schematica della struttura del TSHR; sono state indicate alcune tra le numerose mutazioni di tipo loss of function note

2. Scopo del lavoro

Scopo del presente studio è l'analisi molecolare del gene TSHR in un gruppo di bambini e adolescenti di età compresa tra 1 e 18 anni affetti da ipotiroidismo subclinico.

Tutti i pazienti inclusi nello studio possiedono le seguenti caratteristiche: elevati valori di TSH in almeno due misurazioni, ormoni tiroidei nella norma e assenza di autoimmunità tiroidea.

La diagnosi molecolare è stata inoltre condotta su di un gruppo selezionato di soggetti sani da utilizzare come gruppo di controllo.

In una paziente e nella madre è stata identificata la nuova mutazione W520X. Al fine di valutare l'effetto di tale variazione sul signaling recettoriale sono stati eseguiti gli studi funzionali in vitro; in considerazione del fatto che la mutazione è di tipo nonsense e introduce un prematuro codone di stop nella sequenza del TSHR, è stata inizialmente valutata la corretta espressione del recettore in membrana attraverso esperimenti di immunofluorescenza.

Successivamente è stata studiata la funzionalità recettoriale, intesa come produzione di secondi messaggeri; attraverso dei saggi ELISA sono stati dosati sia AMP ciclico (cAMP) che inositolo fosfato (IP) per valutare così l'effetto della nuova mutazione sul signaling cellulare.

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.

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 e volume tiroideo. I parametri biochimici analizzati includevano invece i valori di TSH, fT3 e fT4. 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 μ 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.

L'analisi molecolare è stata condotta inoltre su 112 soggetti sani di controllo. 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 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 (Polymerase Chain Reaction). La sequenza dei primers utilizzati e le temperature dei protocolli di PCR sono mostrati in tabella 1.

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

ESONE	Sequenza dei primers (5' → 3')	Dimensione prodotto di PCR (bp)	Temperature di annealing di PCR (°C)
1	F-cctcttttccccttctcca R-ccagagatcaaggcatctgcag	400	60-50 (TD)
2	F-tggttctttggtatgtttgtga R-acttgcatataatcaatggcag	344	51
3	F-gcagaatccatgagggtgt R-caatgggagctggtttct	301	51
4	F-ggtaccctgtggcgtaaatg R-atggtgtatagcctgggtcg	330	51
5	F-ttgtcttcagaacctatgctt R-cactggcatgaagtaaggca	335	60-50 (TD)
6	F-ctgctgcagaaggaaagcat R-tccaagagccatactgcctt	227	60-50 (TD)
7	F-gcaccactctcaccagtea R-tctccctggtgtgtgtgtgtgtgt	352	51
8	F-gtgctcaagccagaagaaga R-gttgctgtctcgggtaaagg	357	51
9	F-tcatctcccaattaacctcagg R-gtggagaggaaattggaagc	410	60-50 (TD)
10A	F-gcctggcactgactcttttc R-tcctgagaattgtggtgtggt	419	51
10B	F-gttcaaccctgtgaagaca R-gtttctgctcttctctcteg	446	60-50 (TD)
10C	F-ctggtatgcatcaccttctg R-agcaactccaaaatcttctg	433	60-50 (TD)
10D	F-tctgaacaagcctctcatca R-gacacccccaacacatagct	447	60-50 (TD)

L'esone 10, in quanto molto esteso, è stato suddiviso in 4 frammenti fiancheggiati per poterlo amplificare completamente (denominati A,B,C e D). 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).

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 sono stati confrontati con la sequenza di riferimento wild type (NM_000369) e poi allineati utilizzando software disponibili in rete (Multiple Sequence Alignment CLUSTALW sito internet: www.genome.jp/tools/clustalw/).

Mutagenesi sito-diretta

Il vettore pSVL (4896 bp) contenente il cDNA wild-type del TSHR è stato gentilmente donato dal Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo dell'Università di Pisa (Figura 6).

70 µl di cellule competenti DH101F' sono state trasformate con 1 µl (concentrazione 10 ng/µl) di vettore pSVL-TSHR e cresciute overnight a 37°C in piastre di LB/Agar Ampicillina⁺ 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 (Qiagen).

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.

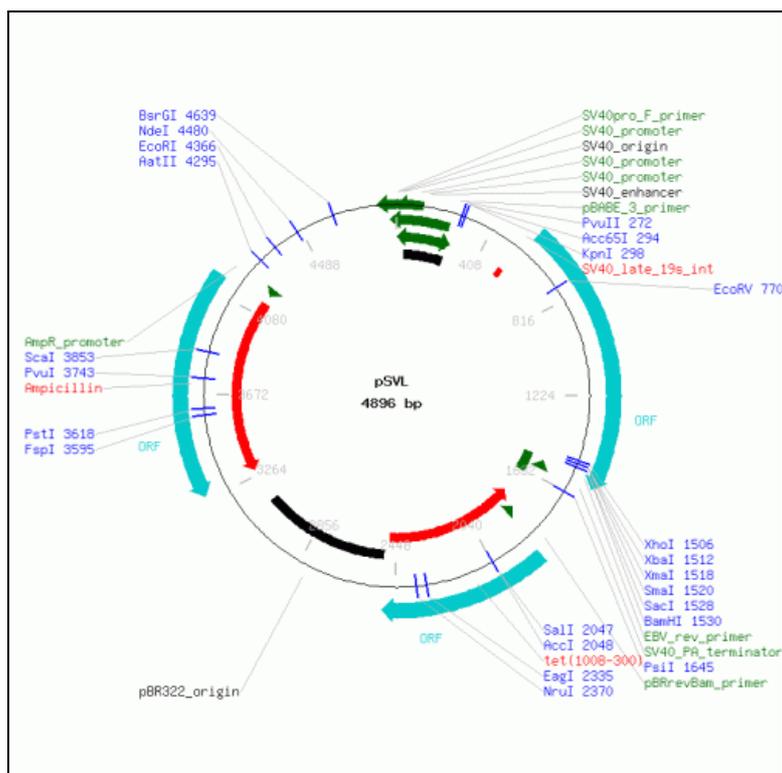


Figura 6. Struttura ed elenco dei siti di restrizione presenti all'interno del vettore pSVL

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 CO₂ 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 /steptomycin) (Sigma Aldrich).

Immunofluorescenza: microscopia confocale

Circa 6 x 10⁴ 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.

Sono state studiate due diverse condizioni cellulari:

- 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 FITC-coniugato (Sigma Aldrich), 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 FITC-coniugato (Sigma Aldrich), 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

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 5×10^3 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

mM). 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 5, 16 e 24 ore dall'aggiunta del reagente.

Dosaggio secondi messaggeri: cAMP

In una piastra da 6 pozzetti sono state piastrate circa 15×10^4 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 IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, 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 1 ora con varie concentrazioni di TSH ricombinante diluito in buffer di stimolazione addizionato di LiCl 50 mM; l'attivazione dei recettori accoppiati a proteine G porta al rilascio di D-myoinositolo 1,4,5 trifosfato (IP3), e quindi al transiente incremento di calcio intracellulare. La vita media dell'IP3 è estremamente breve (meno

di 30 secondi) prima che esso sia trasformato in IP2 e IP. La presenza di LiCl nel medium di coltura è necessaria per prevenire l'immediata degradazione dell'IP e consentire il suo accumulo nella cellula e quindi la successiva quantificazione.

Dopo la stimolazione le cellule sono state poi lisate con un reagente di lisi per 30 minuti a 37°C 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 del gene TSHR è stata condotta su 108 pazienti pediatriche affette da ipotiroidismo subclinico e 112 soggetti sani di controllo.

Nella nostra serie di pazienti sono state identificate tre mutazioni missenso già riportate in letteratura: P162A, D410N e T477I. Queste mutazioni sono state identificate in eterozigosi in sette pazienti (frequenza di mutazione $7/108=6.48\%$).

La mutazione P162A è stata identificata in 3 soggetti tra loro indipendenti, è di tipo loss of function ed è localizzata nell'esone 6 del gene TSHR. Studi in vitro hanno dimostrato che l'introduzione del residuo di alanina in sostituzione dell'aminoacido prolina nella porzione extracellulare del TSHR causa una riduzione dell'espressione del recettore in membrana; non sono presenti invece effetti sulla produzione di secondi messaggeri. Il residuo di prolina in posizione 162 appartiene ad un sito putativo di legame con l'ormone TSH, localizzato nella regione N-terminale, ed è localizzato adiacente alla porzione della molecola ricca di "leucine repeat motifs"; è stato ipotizzato che la rimozione di questo residuo di prolina alteri le capacità di binding del recettore, senza però alterarne la struttura (26,27).

La mutazione D410N è localizzata nell'esone 10 del gene, nella regione cerniera extracellulare adiacente al primo loop del dominio transmembrana; la mutazione D410N ha mostrato una trasmissione familiare essendo presente sia nella paziente, che nel padre e nella zia paterna. Dal punto di vista funzionale studi precedenti hanno dimostrato che il risultante recettore mutato mantiene normali capacità di legame al TSH, nonostante una ridotta capacità di trasdurre il segnale, intesa come ridotta attivazione dell'adenilato ciclasi (23).

La mutazione T477I è localizzata anch'essa nell'esone 10 del gene; consiste nella sostituzione, nel secondo segmento transmembrana del recettore, del residuo altamente conservato di treonina con l'aminoacido isoleucina. La mutazione è stata trovata in eterozigosi in una sola paziente. Studi di

trasfezione in cellule COS-7 hanno dimostrato che il recettore mutato possiede un'espressione in membrana estremamente ridotta e una scarsa capacità di attivazione in presenza di TSH bovino (bTSH); inoltre la produzione di cAMP osservata in presenza della mutazione T477I era del tutto paragonabile a quella delle cellule trasfettate con il solo vettore vuoto, suggerendo un mancato legame del recettore alle proteine $G\alpha_s$ (28).

In considerazione dei risultati prodotti dagli studi funzionali eseguiti sulle tre mutazioni missenso identificate, P162A, D410N e T477I, possiamo concludere che tali mutazioni siano da considerarsi come la causa della comparsa dell'ipotiroidismo subclinico osservato nei nostri pazienti. Nessuna mutazione è stata trovata invece nel nostro gruppo di soggetti di controllo (n=112).

Il gene TSHR è dimostrato essere altamente polimorfico; infatti l'analisi molecolare ha mostrato la presenza di 8 polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs) noti nella nostra serie di pazienti (tabella 2) e di 6 SNPs nel gruppo di controllo (tabella 3).

SNP	Allele 1	Allele 2
P52T (rs2234919)	A 91,2	C 8,8
E34K (rs45499704)	G 99,5	A 0,5
IVS1-80 (rs17111401)	T 86,1	A 13,9
IVS3-35bp (rs77924349)	C 99,5	T 0,5
IVS6+13 (rs2241119)	A 88	G 12
N187N (rs2075179)	T 87,5	C 12,5
A459A (rs113951800)	G 98,6	A 1,4
D727E (rs1991517)	C 95,8	G 4,2

Tabella 2. Frequenza dei polimorfismi presenti nella nostra serie di pazienti dove l'allele 1 indica l'allele più frequente nella popolazione, mentre l'allele 2 quello meno frequente.

SNP	Allele 1	Allele 2
D36H (rs61747482)	G 99,1	C 0,9
P52T (rs2234919)	C 97,3	A 2,7
IVS1-80bp (rs17111401)	T 87,5	A 12,5
IVS6+13 (rs2241119)	A 92	G 8
N187N (rs2075179)	T 81,5	C 8,5
D727E (rs1991517)	C 98,2	G 1,8

Tabella 3. Frequenza dei polimorfismi presenti nella nostra serie di controlli dove l'allele 1 indica l'allele più frequente nella popolazione, mentre l'allele 2 quello meno frequente.

Nuove variazioni identificate nel gene del TSHR

In una paziente di 6 anni, nata da genitori non consanguinei, 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. L'elettroferogramma della mutazione W520X è mostrato in figura 7.

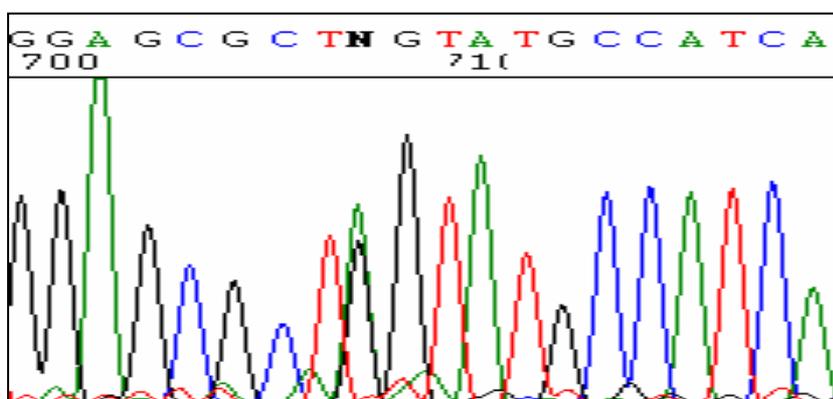


Figura 7. Elettroferogramma della nuova mutazione W520X identificata nell'esone 10 del gene TSHR. Sia la paziente che la madre sono eterozigote per la mutazione

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.

Allo screening neonatale la paziente presentava un livello di TSH pari a 9.8 μ IU/ml; alle successive analisi il valore medio di TSH era di 8,9 μ UI/ml, i valori degli ormoni tiroidei erano nei limiti o solo leggermente elevati (fT3 4.7 pg/ml, normal range 2.3-4.2; fT4 1.05 ng/dl, normal range 0.89-1.76) e la tiroide era ecograficamente in sede e normale. Gli anticorpi anti-tireoglobulina e anti-TSH erano negativi escludendo così 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'effetto della mutazione W520X sul signaling recettoriale è stato oggetto di successivi studi funzionali in vitro.

L'analisi molecolare dei soggetti con ipotiroidismo subclinico ha portato inoltre all'identificazione di tre nuove variazioni nel gene TSHR: IVS2 -84bp C>G, IVS9 +3bp A>G e A673D.

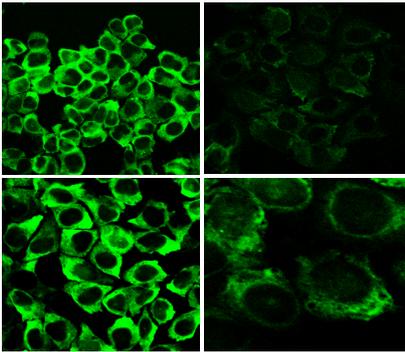
Tutte sono state trovate in condizione di eterozigosi. Si tratta di due variazioni introniche e di una sostituzione missenso che causa la sostituzione dell'aminoacido alanina in posizione 673 con un residuo di acido aspartico. E' localizzata nel settimo loop transmembrana del recettore di legame alle proteine G. L'effetto delle tre nuove variazioni sulla patogenesi dell'ipotiroidismo subclinico sarà oggetto di successivi studi funzionali.

Studi funzionali W520X: microscopia confocale

L'espressione sulla superficie cellulare del TSHR è stata studiata tramite esperimenti di immunofluorescenza (Figure 7a e 7b). Le cellule sono state trasfettate con la sequenza wild-type del

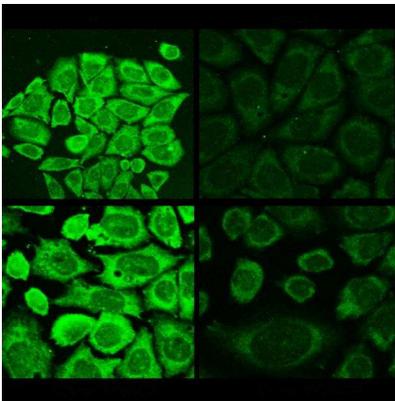
recettore (in alto a sinistra) e successivamente con la sequenza contenente la mutazione W520X, ricreando in vitro sia la condizione di eterozigosi (in basso a sinistra) che di omozigosi (in basso a destra) per la mutazione. Come controllo negativo sono state usate cellule CHO trasfettate con il solo vettore vuoto (in alto a destra).

7a) 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.



In aggiunta alla colorazione visibile sulla superficie cellulare, è possibile osservare un'addizionale 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

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 (dati non mostrati).

Studi funzionali W520X : dosaggio cAMP e IP

Le cellule CHO sono state trasfettate alternativamente con la sequenza wild-type 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 ($p > 0.05$).

Le cellule trasfettate con la forma omozigote hanno mostrato una produzione ridotta di cAMP rispetto al wild-type (3.7 ± 0.5 vs 12.5 ± 1.6 pmol/ml; $p < 0,01$), mentre l'eterozigote ha mostrato una produzione intermedia (8.6 ± 1.2 pmol/ml) (Figura 8A). 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 wild-type. Come atteso la presenza della mutazione W520X in omozigosi ha mostrato una marcata riduzione nella produzione di IP in risposta all'agonista paragonata al wild-type (3.8 ± 0.9 vs 19.3 ± 2.1 nM; $p < 0,01$); la condizione eterozigote ha mostrato una produzione intermedia ($9.2 \pm 0,8$ nM) (Figura 8B). 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 8A. Produzione di cAMP

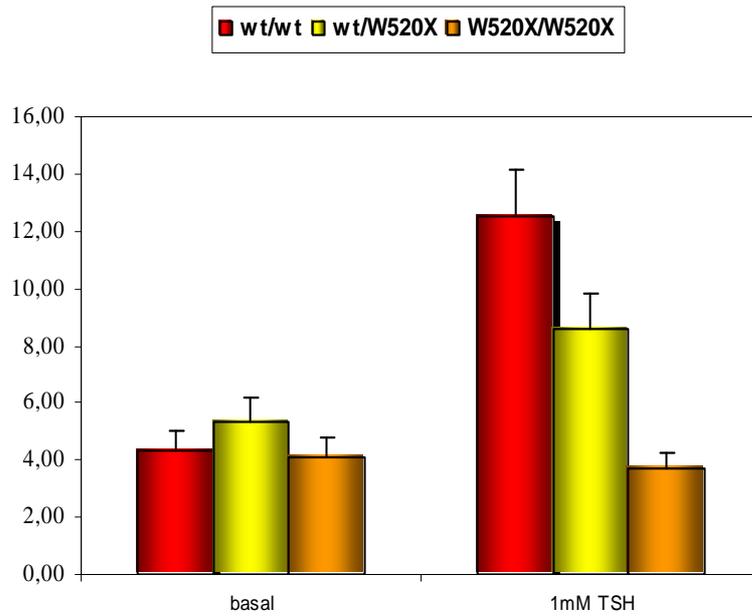
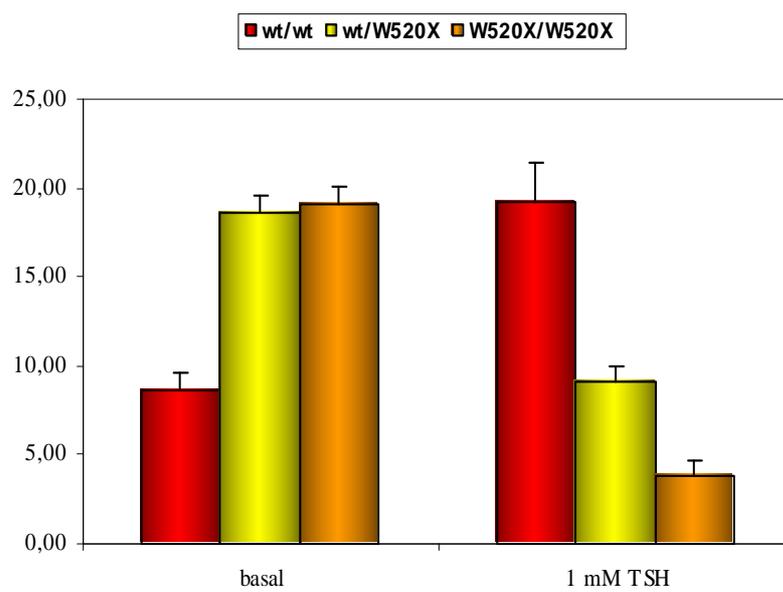


Figura 8B. Produzione di IP



5. Discussione

Nella popolazione pediatrica i dati riguardanti la prevalenza delle mutazioni localizzate nel gene TSHR e l'insorgenza di ipotiroidismo subclinico sono ad oggi limitati e spesso discordanti, variando dall' 11 al 40% (6, 29, 30, 31).

La grande variabilità fenotipica osservabile in pazienti portatori della stessa variazione rende inoltre ancora più difficile la classificazione clinica. Infatti 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).

Nel presente studio sono stati valutati il pattern di distribuzione e il coinvolgimento di determinate caratteristiche cliniche e parametri biochimici nella patogenesi dell'ipotiroidismo subclinico.

Si è potuto osservare che nei pazienti da noi analizzati i livelli di TSH erano significativamente più elevati nei soggetti sovrappeso oppure obesi rispetto a quelli normopeso. La prevalenza della condizione di sovrappeso ed obesità nella nostra popolazione era simile a quella riportata in letteratura nei bambini italiani sani in età scolastica (32). Questi dati sono confermati da studi disponibili in letteratura (33,34).

Sono stati ipotizzati diversi meccanismi che possono spiegare l'innalzamento dei livelli di TSH nell'obesità; questi includono l'aumento della produzione di pro-TRH leptina-mediato (35), un feedback alterato dovuto a un minor numero di recettori T3 nell'ipotalamo (36) oppure una diminuzione nell'attività periferica della deiodinasi (37).

La scoperta che i livelli di TSH sono più elevati nell'obesità e che la successiva perdita di peso porta a una diminuzione di questi valori, supporta l'ipotesi che l'aumento di TSH sia un fenomeno reversibile e sia una conseguenza piuttosto che una causa dell'obesità (33).

Nella nostra serie di pazienti è stata trovata inoltre una prevalenza di basse stature idiopatiche superiore a quella normalmente riportata in età pediatrica (38). Molto probabilmente ciò può essere dovuto ad un bias di selezione visto che tutti i pazienti da noi analizzati sono stati reclutati da unità

di Endocrinologia italiane dove i bambini afferiscono spesso per difetti di crescita. Nonostante ciò non è stata trovata alcuna associazione tra la presenza di bassa statura idiopatica e l'aumento dei valori di TSH.

Tutti i soggetti sono stati analizzati dal punto di vista molecolare per verificare l'eventuale presenza di variazioni genetiche nel gene TSHR. Queste mutazioni mostrano una trasmissione di tipo autosomico dominante, senza evidenze di penetranza incompleta ma con espressività variabile (20).

Nella nostra serie di pazienti affetti da ipotiroidismo subclinico sono state identificate tre mutazioni missenso già note: P162A, D410N e T477I; sette pazienti erano portatori delle tre mutazioni in eterozigosi, e studi funzionali in vitro hanno dimostrato che tutte e tre le mutazioni sono responsabili di una ridotta funzionalità recettoriale (23, 26, 27 e 28).

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, oppure coinvolgenti grandi regioni alleliche del TSHR, con inibizione totale del recettore (30).

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 (25). 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 di queste mutazioni (8). 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 (29).

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 (29,30,31). 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.

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 (39) e per il β 2-adrenoceptor (40); 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 wild-type. 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 (41).

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

In una elevata percentuale di pazienti ipotiroidici, 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 (42,43).

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

In conclusione i nostri dati dimostrano che la presenza di mutazioni nel gene TSHR potrebbe essere una possibile causa dell'insorgenza della condizione di ipotiroidismo subclinico.

Inoltre abbiamo verificato che il prematuro codone di stop introdotto dalla mutazione W520X causa una riduzione dell'espressione del TSHR sulla superficie cellulare. La conseguenza è una riduzione del signaling pathway recettoriale; questi dati supportano l'ipotesi che la mutazione W520X potrebbe essere la causa del pattern ormonale osservato nella nostra paziente.

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-Bellarbarba 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. Kero J, Ahmed K, Wettschureck N, Tunaru S, Wintermantel T, Greiner E, Schütz G, Offermanns S. (2007) Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J Clin Invest.* **9**:2399-2407.
19. Grasberger H, Van Sande J, Hag-Dahood Mahameed A, Tenenbaum-Rakover Y, Refetoff S.

- (2007) A familial thyrotropin (TSH) receptor mutation provides in vivo evidence that the inositol phosphates/Ca²⁺ cascade mediates TSH action on thyroid hormone synthesis. *J Clin Endocrinol Metab.* **7**:2816-2820.
20. Grasberger H, Mimouni-Bloch A, Vantyghem 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Tonacchera M, Agretti P, De Marco G, Perri A, Pinchera A, Vitti P, Chiovato L (2001) Thyroid resistance to TSH complicated by autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* **9**:4543-4546.

27. Costagliola S, Sunthorntepvarakul T, Migeotte I, Van Sande J, Kajava AM, Refetoff S, Vassart G. (1999) Structure-function relationships of two loss-of-function mutations of the thyrotropin receptor gene. *Thyroid* **10**:995-1000.
28. Tonacchera M, Agretti P, Pinchera A, Rosellini A, Perri A, Collecchi P, Vitti P, Chiovato L (2000) Congenital Hypothyroidism with Impaired Thyroid Response to Thyrotropin (TSH) and Absent Circulating Thyroglobulin: Evidence for a New Inactivating Mutation of the TSH Receptor Gene *J Clin Endocrinol Metab.* **3**: 1001-1008.
29. Alberti L, Proverbio MC, Costagliola S, Romoli R, Boldrighini B, Vigone MC, Weber G, Chiumello G, Beck-Peccoz P, Persani L (2002) Germline mutations of TSH receptor gene as cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* **6**:2549-2555.
30. 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.
31. 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.
32. Maffeis C, Banzato C, Talamini G, Obesity Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. (2008) Waist-to-height ratio, a useful index to identify high metabolic risk in overweight children. *J Pediatr* **152**:207
33. Reinehr T, de Sousa G, Andler W. (2006) Hyperthyrotropinemia in obese children is reversible after weight loss and is not related to lipids. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:3088-3089.
34. Radetti G, Kleon W, Buzi F, Crivellaro C, Pappalardo L, di Iorgi N, Maghnie M. (2008) Thyroid Function and Structure Are Affected in Childhood Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **93**:4749-4754.

35. Nillni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbak C, Flier JS. (2000) Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem* **275**:36124-36133.
36. Burman KD, Latham KR, Djuh YY, Smallridge RC, Tseng YC, Lukes YG, Maunder R, Wartofsky L. (1980) Solubilized nuclear thyroid hormone receptors in circulating human mononuclear cells. *J Clin Endocrinol Metab* **51**:106-116.
37. Krotkiewski M. (2002) Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* **440**:85-98.
38. Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, Savage MO, Saenger PH, Cohen P. (2008) Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res* **18**:89-110.
39. Koski G, Streaty RA, Klee WA (1982) Modulation of sodium-sensitive GTPase by partial opiate agonist. An explanation for the dual requirement for Na⁺ and GTP in inhibitory regulation of adenylate cyclase. *J Biol Chem* **257**:14035-14040.
40. Cerione RA, Codina J, Benovic JL, Lefkowitz RJ, Birnbaumer L, Caron MG 1984 The mammalian β 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.
41. 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
42. 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
43. 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.

44. 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.

**Parte 2: NUOVA VARIAZIONE FAMILIARE DEL GENE
THRB (I276N) RESPONSABILE DI SINDROME DA
RESISTENZA AGLI ORMONI TIROIDEI (RTH)**

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 un disordine endocrinologico caratterizzato da una ridotta risposta dell'ipofisi e dei tessuti periferici all'ormone tiroideo (TH) (1). Diretta conseguenza è che si rendono necessarie concentrazioni più elevate di ormone tiroideo per produrre una risposta metabolica da parte dei tessuti target e per sopprimere la secrezione ipofisaria di TSH (2).

La resistenza agli ormoni tiroidei può essere “generalizzata” (forma eu-ipotiroidica), cioè a carico delle cellule di più organi, oppure soltanto “ipofisaria” (forma ipertiroidica), cioè a carico esclusivamente (o quasi) delle cellule ipofisarie.

Nel caso di resistenza generalizzata agli ormoni tiroidei (90% dei casi), il soggetto, pur avendo concentrazioni sieriche elevate sia di ormoni tiroidei che di TSH, non lamenta alcuna sintomatologia da ipertiroidismo perché i tessuti periferici sono insensibili all'azione degli ormoni tiroidei. Nel caso invece della resistenza ipofisaria agli ormoni tiroidei (8% dei casi), i soggetti manifestano, sin dall'età pediatrica, i sintomi ed i segni tipici dell'ipertiroidismo. La resistenza parziale solo periferica è ancor più rara (< del 2%).

I pazienti affetti da RTH sono caratterizzati da elevati livelli sierici di tiroxina (fT3) e di triiodotironina (fT4), in presenza di livelli normali o solo leggermente elevati di TSH.

Il risultante fenotipo clinico è estremamente eterogeneo, possono essere presenti segni o sintomi tipici dell'ipo o dell'ipertiroidismo, tra cui i più comuni sono gozzo e tachicardia (2). Sintomi frequentemente riscontrati nei pazienti sono inoltre deficit dell'attenzione con iperattività (ADHD), quoziente intellettivo inferiore a 85, difetti del linguaggio e bassa statura (2,3).

In alcuni pazienti sono stati descritti inoltre sintomi meno comuni tra cui infezioni delle vie aeree superiori, basso rapporto peso/altezza, perdita dell'udito ed anomalie cardiache. E' stato dimostrato inoltre che il genotipo, l'età, la presenza di familiarità materna per patologie tiroidee e il genere

influenzano il fenotipo. La resistenza da parte dei tessuti bersaglio è variabile da paziente a paziente e coinvolge, in ordine decrescente, ghiandola ipofisaria, cervello, osso, fegato e cuore (4).

La diagnosi di RTH è basata sull'osservazione dei sintomi presenti, oppure può essere laboratoristica, e quando possibile, confermata da studi genetici. La terapia delle sindromi da resistenza agli ormoni tiroidei non è necessaria nei pazienti eutiroidei. Nei pazienti con ipotiroidismo la terapia si basa invece sulla somministrazione di ormoni tiroidei (L-T4 o L-T3 o in combinazione T4/T3) con dosi che devono essere calibrate e individualizzate sul singolo paziente sulla base principalmente della risposta clinica e sul grado di resistenza ormonale.

Ad oggi questa sindrome è stata descritta in quasi 2000 pazienti appartenenti a 372 famiglie, con un'incidenza di 1:40000 nati; nonostante la maggior parte delle patologie tiroidee siano più frequenti nel genere femminile, la sindrome RTH è presente con uguale frequenza nei due sessi (5,6).

Dal punto di vista genetico è stata ampiamente dimostrata l'associazione esistente tra la presenza di mutazioni localizzate nell'isoforma β del gene per il recettore dell'ormone tiroideo (THRB) e l'insorgenza di RTH. Nel 75-80% dei casi la trasmissione si presenta in forma ereditaria-familiare con trasmissione autosomica dominante (solo in una famiglia si è evidenziata una trasmissione autosomica recessiva) (7).

Recettore dell'ormone tiroideo (TR β)

Nell'uomo esistono due geni differenti che codificano per il recettore dell'ormone tiroideo (TR) chiamati rispettivamente THRA e THRB, e localizzati rispettivamente sui cromosomi 17 e 3 (7,8).

Il primo codifica per l'isoforma alpha (TR α) mentre il secondo per l'isoforma beta (TR β) del recettore.

Sebbene entrambi i geni abbiano espressione ubiquitaria, è noto che TR α è espresso prevalentemente in cuore, osso e cervello; TR β -1 è molto abbondante in fegato, rene e tiroide mentre TR β -2 è espresso solo nell'ipofisi anteriore e in specifiche aree dell'ipotalamo; le due

isoforme β differiscono solo nella loro regione N-terminale (9,10).

Il 90% dei pazienti affetti da RTH è caratterizzato dalla presenza di mutazioni localizzate nel gene *THRB*, e ad oggi ne sono state descritte in letteratura più di 100. Solo in una famiglia è stata osservata la delezione completa del gene, in tutti gli altri casi si tratta di minori alterazioni a livello del DNA, quali mutazioni puntiformi (11).

Il gene *THRB* (locus 3p24.2) codifica per l'isoforma beta del 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) (12). $TR\beta$ 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 anche 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 nuovi farmaci (13).

$TR\beta$ agisce come fattore di trascrizione regolato dal ligando: lega sia l'ormone T3 che sequenze di DNA denominate TH-Response Elements (TREs), localizzate nella regione del promotore dei geni target. E' composto da 10 esoni ed è suddivisibile in 3 domini funzionali: un dominio N-terminale di transattivazione, un dominio di legame al DNA (DBD) e un dominio C-terminale di legame all'ormone e sito inoltre 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 (13) (Figura 1).

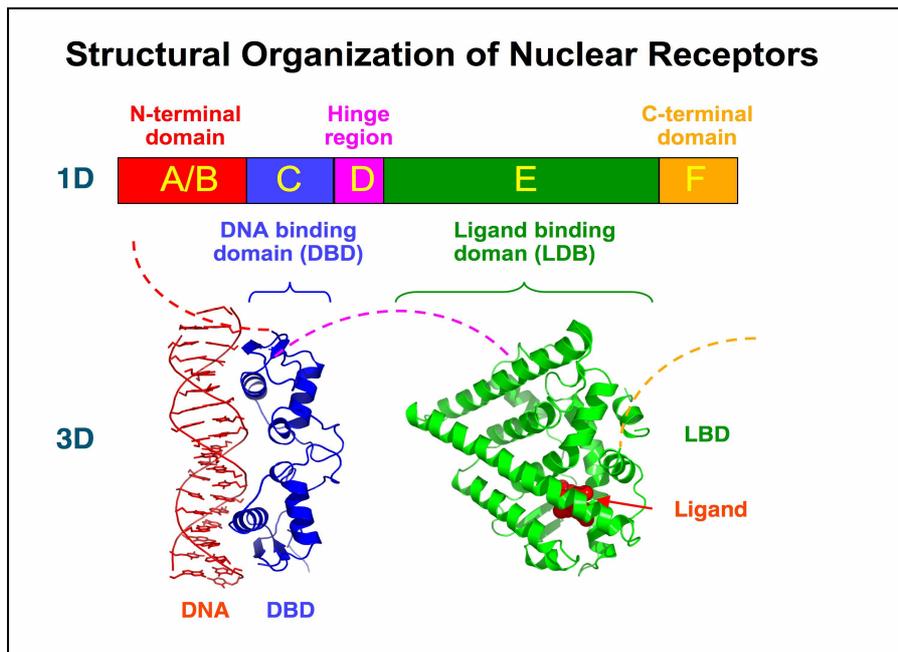


Figura 1. Struttura schematica dei recettori nucleari

E' stato dimostrato che TR β è in grado di dimerizzare con il recettore dei retinoidi (RXR) anche se in particolari contesti è in grado di agire anche come monomero; in assenza del ligando però questi omodimeri ed eterodimeri sono associati a corepressori che ne silenziano la trascrizione genica. Il successivo legame dell'ormone T3 causa il rilascio dei corepressori e induce invece il reclutamento di coattivatori, stimolando così la trascrizione genica (14).

Recentemente è stata meglio caratterizzata una famiglia di proteine con funzione di corepressori nucleari chiamati NCoR e SMRT. NCoR è un corepressore generico di tutti i 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 ed espressi quindi in tutti i tessuti dei vertebrati, ma è noto che interagiscono diversamente in base al tipo di recettore nucleare che legano. Entrambi sono in grado di silenziare la trascrizione promuovendo una conformazione chiusa della cromatina attraverso la deacetilazione degli istoni (15); le istone deacetilasi (HDAC), infatti, formano un complesso con altri repressori, tra cui Sin3, e giocano così un ruolo chiave nella repressione basale della trascrizione in assenza del ligando.

Successivamente al legame dell'ormone sono reclutate in modo ligando-dipendente delle proteine

chiamate coattivatori, che al contrario promuovono l'attività trascrizionale. Al momento la funzione di molte di esse resta però sconosciuta.

Sono stati isolati due complessi che in misura maggiore sono coinvolti nell'attività trascrizionale: SRC (steroid receptor co-attivator complex) e DRIP-TRAP (vitamin D receptor interacting protein-TR associated protein complex). Le SRCs (SRC-1, -2 e -3) sono proteine di 160 kDa, che si associano con vari recettori nucleari ormonali, tra cui TR β , incrementando la loro attività trascrizionale ligando-dipendente. E' stata osservata inoltre un'interazione con CBP (CREB-binding protein), il coattivatore per la trascrizione stimolata da cAMP, e con le proteine p300 che interagiscono invece con il coattivatore virale E1A. Studi recenti hanno dimostrato che il complesso CBP/p300 può interagire inoltre con P/CAF (p300/CBP-associated factor), l'omologo nei mammiferi dell'attivatore dei lieviti GCN5 (general control non-repressed protein 5) (15).

Similarmente a GCN5, P/CAF possiede un'intrinseca attività di istone acetiltransferasi (HAT). P/CAF e CBP interagiscono rispettivamente con i TAFs (TBP associated factors) e con la RNA polimerasi II; quindi P/CAF e CBP sono dotati di doppia attività, agiscono sia come adattatori dei recettori nucleari per il meccanismo di trascrizione basale, che come enzimi in grado di modificare la struttura della cromatina (attività HAT) (Figura 2) (15).

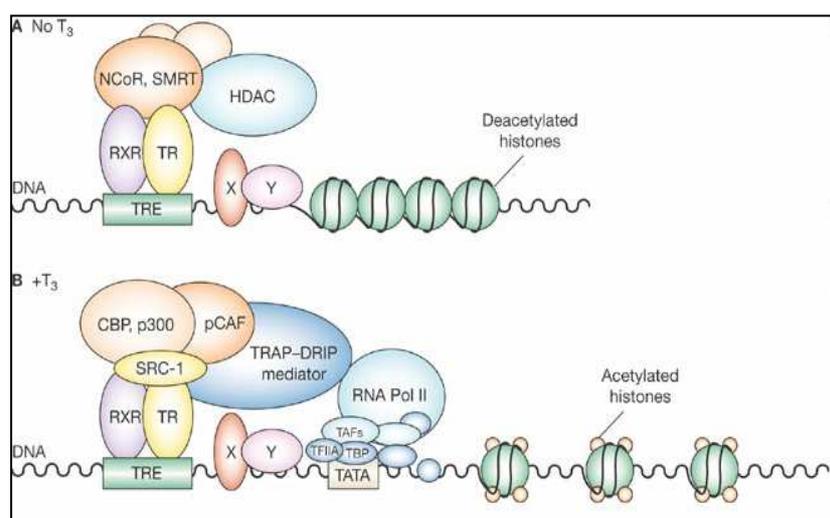


Figura 2. L'interazione alternativa del recettore TR β con corepressori e coattivatori regola la trascrizione genica

Mutazioni note presenti nel gene del THRβ

Dal punto di vista genetico è ormai noto che, nella maggior parte dei casi, la sindrome RTH mostra una trasmissione di tipo autosomico dominante. Gli individui che esprimono un singolo allele wild-type a causa di una delezione sono quindi 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 THRβ (15) (Figura 3).

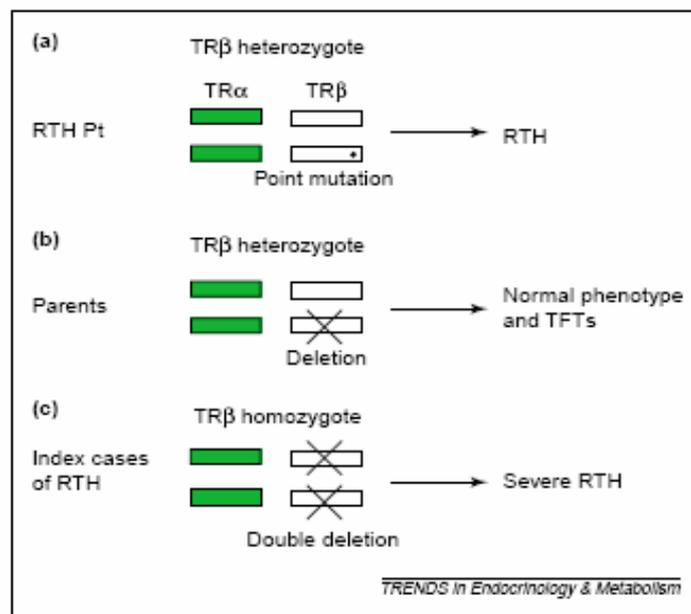


Figura 3. Effetto dominante negativo delle mutazioni

Tutte le mutazioni note sono state identificate nel dominio di legame del ligando, e in particolare nei residui 310–353 (cluster 1), 429–461 (cluster 2), e 234–282 (cluster 3).

E' stato dimostrato che le mutazioni localizzate 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 un difettivo rilascio dei corepressori (14-18).

Il fenomeno dell'effetto dominante negativo necessita della preservazione dell'instaurarsi del legame al DNA e della possibilità del recettore di formare eterodimeri, ed è per questo motivo che nessuna mutazione è mai stata identificata nella regione di legame al DNA. Tutte le mutazioni note sono infatti localizzate negli ultimi 4 esoni del gene e cioè nel sito di legame dell'ormone (19).

Dal punto di vista clinico il fenotipo conseguente alla presenza di RTH è variabile, sia in famiglie diverse affette dalla stessa mutazione che in membri della stessa famiglia con la stessa mutazione. La maggior parte delle mutazioni inoltre è presente in eterozigosi e i sintomi clinici sono quindi piuttosto lievi.

In letteratura un solo paziente nato da genitori consanguinei è stato descritto come portatore di una mutazione in omozigosi ed è morto all'età di 7 presentando un quadro clinico complesso e valori decisamente elevati sia di ormoni tiroidei che di TSH (20). Esiste un altro caso descritto in letteratura con severa RTH a causa della presenza di una mutazione nel gene *THRB*, in combinazione alla completa delezione del secondo allele. Il fenotipo risultante è piuttosto grave e comprende scarso sviluppo intellettuale, tachicardia, e difetti sia visivi che uditivi, probabilmente dovuti all'effetto dominante negativo della mutazione I280S, e all'assenza di un recettore funzionale (21).

Solo nel 10% dei casi i pazienti con quadro clinico tipico dell'RTH non presentano mutazioni nel gene *THRB*. Il fenotipo clinico risultante è indistinguibile da quello dei portatori di mutazioni; fattore distintivo è tuttavia un'aumentata incidenza della patologia nel genere femminile rispetto ai maschi (2.5:1), e l'elevata prevalenza inoltre di casi sporadici. Ipotesi accreditata è che possano essere coinvolti dei difetti a livello dei corepressori, dei coattivatori, o nelle proteine di trasporto degli ormoni tiroidei, oppure che la mancata regolazione dei loro prodotti sia responsabile del fenotipo osservato. In supporto di questa teoria sono stati studiati topi knock-out per il coattivatore *SRC-1* e si è potuto osservare che questi topi presentavano una forma moderata di RTH (22).

Ad oggi una sola mutazione è stata identificata nell'uomo nell'isoforma alpha del recettore per l'ormone tiroideo. In una bambina di 6 anni di origine europea, è stata infatti identificata la mutazione de novo E403X in eterozigosi, la cui presenza inibisce l'azione del recettore wild-type in modo dominante negativo; la paziente presentava i classici segni di ipotiroidismo, quali ritardo di crescita, ritardo di sviluppo, displasia dello scheletro e una severa costipazione. Questi dati confermano l'esistenza anche di una forma di resistenza all'ormone tiroideo THRA-mediata, e che l'ormone svolge la sua azione tramite diversi sottotipi di recettori in base al differente tessuto target (23).

2. Scopo del lavoro

Lo scopo del presente studio è stato analizzare un gruppo di pazienti caratterizzati da elevati valori di ormoni tiroidei (fT3 e fT4), in presenza di valori normali o solo leggermente elevati di TSH; questo caratteristico pattern ormonale suggeriva la presenza di sindrome di resistenza all'azione degli ormoni tiroidei (RTH).

Aspetto da sottolineare è che la maggior parte dei pazienti è afferita presso l'Ambulatorio di Endocrinologia per altre patologie, quali scarsa velocità di crescita, eccesso ponderale oppure per la presenza di un nodo tiroideo.

In considerazione poi dell'elevata incidenza di disturbi cognitivi e del linguaggio che sono stati in letteratura associati all'RTH abbiamo inoltre selezionato inoltre un gruppo di pazienti affetti da dislessia per valutare la relazione esistente tra ormoni tiroidei e tale patologia.

La dislessia (developmental dyslexia o DD) è un disturbo specifico dell'apprendimento (DSA); studi di linkage hanno permesso di identificare numerosi loci localizzati all'interno del genoma umano candidati come possibili geni di suscettibilità per questa patologia.

La principale caratteristica di questo disturbo è che interessa uno specifico dominio di abilità come lettura, scrittura oppure calcolo, lasciando intatto il funzionamento intellettuale generale. Ciò significa che per avere una diagnosi di dislessia, il bambino non deve presentare: deficit di intelligenza, problemi ambientali o psicologici, deficit sensoriali o neurologici.

Tale disturbo è determinato da un'alterazione neurobiologica che caratterizza i disturbi dell'apprendimento, cioè da una disfunzione nel funzionamento di alcune cellule deputate al riconoscimento delle lettere, delle parole e del loro significato. Purtroppo in Italia la dislessia è poco conosciuta, benché si calcoli che riguardi il 5% della popolazione scolastica.

In caso di diagnosi di sindrome da resistenza agli ormoni tiroidei in presenza di dislessia, sarebbe ipotizzabile un tentativo terapeutico con ormone tiroideo, che potrebbe avere effetti positivi sulla dislessia stessa, come suggerito da studi precedenti condotti su soggetti affetti contemporaneamente da sindrome da resistenza agli ormoni tiroidei e disturbo da iperattività e deficit di attenzione, in cui

la liotironina (L-T3) ad alto dosaggio ha avuto effetti benefici sugli aspetti dell'iperattività e dell'impulsività.

In tutti i pazienti con sospetto di RTH reclutati è stata condotta la diagnosi molecolare volta ad individuare la presenza di variazioni genetiche nel gene del recettore dell'ormone tiroideo (THRB), riconosciuta come la causa più frequente dell'insorgenza della sindrome RTH.

L'analisi si è concentrata sul dominio di legame all'ormone tiroideo (LBD), codificato dagli esoni 7-10 del gene. La presenza di eventuali mutazioni nel gene THRB potrebbe quindi spiegare gli elevati livelli di T3 osservati nei nostri pazienti.

3. Materiali e metodi

Selezione dei pazienti

Per il nostro studio sono stati reclutati 38 pazienti (21 maschi / 17 femmine), provenienti da diversi centri italiani e che presentavano valori persistentemente elevati di ormoni tiroidei, nonostante valori normo-elevati di TSH. I range di normalità considerati nel nostro studio sono i seguenti:

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

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

E' interessante notare che la maggior parte dei 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 mentre in un altro caso è stato possibile osservare la presenza di ritardo cognitivo in combinazione con epilessia. Ad oggi siamo riusciti ad includere nel nostro studio inoltre 12 pazienti affetti da dislessia. Prospettiva futura sarà comunque l'ampliamento di questa casistica.

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 μ l 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. Le sequenze dei primers utilizzati e le dimensioni dei frammenti di PCR sono mostrate in tabella 1.

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 la sequenza di riferimento wild-type (NM_000461) e poi allineati utilizzando software disponibili in rete.

Esone	Sequenza dei primers (5' → 3')	Dimensione del prodotto di PCR (bp)
7	CAGTGGTCCCCTCCTGAGGC CCAGTGTTTTCTACCTCAATT	358
8	G TTCAGAAGATGATTTTCTGC CAGTTTCCAGGAATACTGGGT	309
9	CACAGAAGGTTATTCCTATTGC GTTAGTGGGCATCCAAAGAG	395
10	AGGCCTGGAATTGGACAAAGC ACTGACTGAATTCATTCTCATAATTCC	344

Tabella 1. Sequenza dei primers e dimensione dei frammenti di PCR utilizzati per l'analisi molecolare.

4. Risultati

Analisi molecolare del gene THRB

Tutti i soggetti (n=38) inclusi nello studio sono stati sottoposti ad analisi molecolare del gene THRB. Sono stati identificati nei nostri pazienti tre polimorfismi di singolo nucleotide (SNP) noti le cui frequenze sono riportate in tabella 2:

SNP	Allele 1	Allele 2
F245F (rs3752874)	C 85,5	T 14,5
IVS8-65bp (rs2278802)	A 88,1	T 11,9
IVS9+9bp (rs13063628)	G 96,1	A 3,9

Tabella 2. SNP presenti nella nostra serie di pazienti dove l'allele 1 indica l'allele più frequente nella popolazione, mentre l'allele 2 quello meno frequente.

Nel gene THRB sono state identificate tre mutazioni missenso già note: A234T, R438H e P453A. Tutte le mutazioni sono state trovate in condizione di eterozigosi e sono localizzate nella regione C-terminale del recettore, rispettivamente nel cluster 3 e 2 del dominio di legame del ligando (LBD). Studi precedenti hanno dimostrato l'associazione esistente tra le mutazioni A234T, R438H e P453A e l'insorgenza della forma generalizzata di resistenza agli ormoni tiroidei; infatti queste varianti causano un difettivo rilascio dei corepressori, senza interferire però con il legame dell'ormone al recettore.

La mutazione A234T è stata identificata in due pazienti, 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. Le forme recettoriali mutate hanno mantenuto in vitro la capacità di legare ad alta affinità numerosi TH-response elements (TREs). L'affinità per l'ormone T3 è però tre volte ridotta, indicando che la regione cerniera del recettore è fondamentale per il riconoscimento del ligando (24)

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). E' stato dimostrato che le forme mutanti mantengono inalterata la loro capacità di legare il corepressore NCoR; la sua successiva dissociazione e il reclutamento invece del coattivatore SRC-1 sono però inibiti dalla presenza della mutazione; è stato possibile osservare inoltre che le forme mutanti legano in quantità ridotta l'ormone tiroideo in presenza del complesso recettore-DNA, nonostante la normale attività di binding dimostrata in soluzione. Altri studi hanno constatato anche una difettiva transattivazione del recettore con i TREs, se non a concentrazioni di ormone veramente elevate (25).

In una paziente è stata trovata la sostituzione C1357G (CCT→GCT) nell'esone 10 del gene, che causa la comparsa di un residuo di alanina in posizione 453 in sostituzione di un residuo di prolina (P453A). La presenza di questa mutazione riduce l'affinità del recettore per l'ormone T3 del 17% rispetto alla forma wild-type (26).

Tutti questi studi in vitro confermano che le mutazioni A234T, R438H e P453A sono quindi causali della presenza della RTH nei nostri pazienti.

Nessuna mutazione è stata per ora identificata nei pazienti affetti da dislessia; in un soggetto era presente il polimorfismo rs3752874 che causa la sostituzione sinonima F245F, mentre in due soggetti era presente il polimorfismo rs13063628 nell'introne 9. E' da sottolineare che è necessario un ampliamento della nostra casistica di pazienti dislessici per valutare l'effettivo coinvolgimento del gene THRB in questa patologia. Tutti i soggetti affetti da dislessia presentavano invece positività per gli autoanticorpi tiroidei ed anche tale aspetto necessiterà di ampliamento della casistica.

Nuova variazione identificata: I276N

Una bambina di 3 anni è giunta all'osservazione per scarso accrescimento. La paziente era nata pretermine a 35 settimane di gestazione da genitori non consanguinei; alla nascita il peso e l'altezza erano appropriati per l'età gestazionale, il valore di TSH era nei limiti allo screening neonatale. e nessun ingrossamento della ghiandola tiroidea era visibile. Dai primi mesi di vita mostrava però scarsa crescita staturale-ponderale.

Alla prima visita la bambina 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 µUI/ml; range di normalità 0,450-3,500 µUI/ml) con fT3 e fT4 aumentati (7.10 pg/ml e 2.32 ng/dl; range di normalità 2.3-4.2 pg/ml e 0.89-1.76 ng/dl, rispettivamente). Gli anticorpi anti-tiroglobulina e anti-TSH erano negativi, con solo leggermente elevati livelli di anticorpi anti-tireoperossidasi (70IU/ml, range di normalità 0-60 IU/ml). La valutazione neuropsichiatrica ha mostrato un normale sviluppo cognitivo e del linguaggio e un adeguato livello di attenzione e concentrazione.

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 di 42 anni presentava da anni una storia di alterata funzione tiroidea senza chiara definizione diagnostica; dall'età di 25 anni erano presenti sintomi di ipertiroidismo quali tachicardia, diarrea, gozzo, valori di fT3 e di fT4 aumentati (5.5 pg/ml e 1.90 ng/dl, rispettivamente) nonostante valori di TSH nella norma (3,470 µIU/ml).

E' interessante notare nella madre la presenza di positività per quanto riguarda gli anticorpi anti-tireoperossidasi e anti-tireoglobulina (890 e 334 IU/ml rispettivamente), mentre i livelli di anticorpi anti-TSH erano invece nella norma. Il quadro ecografico e citologico era suggestivo per tiroidite linfocitaria e la paziente era stata trattata con metimazolo per un breve periodo senza trarne però

particolari benefici clinici.

In seguito alla precedente diagnosi nella bambina, anche la madre è stata sottoposta ad indagine genetica con riscontro della presenza della stessa variazione I276N in eterozigosi.

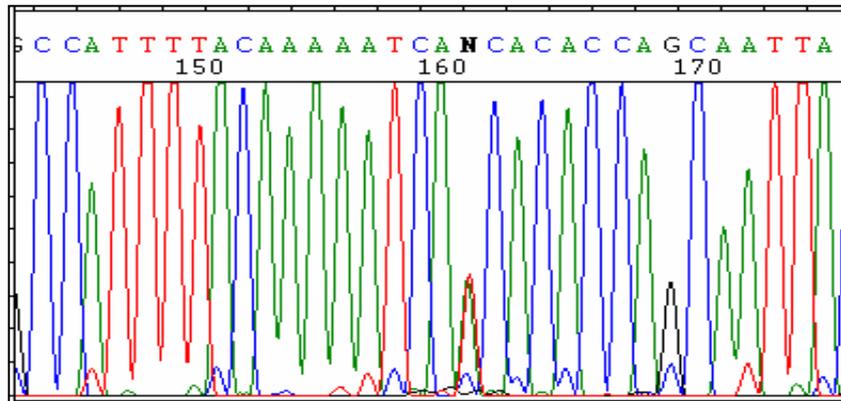


Figura 4. Elettroferogramma della nuova variazione identificata I276N nell'esone 8 del gene THRB. Sia la paziente che la madre sono eterozigote per la mutazione

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.

Dai risultati prodotti attraverso l'analisi informatica è emerso che l'introduzione dell'aminoacido asparagina al posto del residuo di isoleucina è deleterio e non tollerata dalla struttura del recettore; il reale coinvolgimento nella patogenesi della RTH sarà oggetto di successivi studi funzionali in vitro al fine di caratterizzare l'effetto della mutazione I276N sull'interazione con le proteine con funzione di corepressori e/o coattivatori.

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 è priva 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, tachicardia, deficit dell'attenzione (ADHD), IQ inferiore a 85, difetti del linguaggio e bassa statura (4).

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. Il quadro clinico di RTH può variare in base al tipo o alla localizzazione della mutazione, ai livelli di espressione tissutale delle isoforme recettoriali oppure in base alla possibile presenza di meccanismi compensatori o altri difetti genetici presenti (7).

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 (15).

Le mutazioni descritte in letteratura sono localizzate nel dominio del recettore deputato al legame all'ormone e sono in grado di alterare la normale funzionalità recettoriale tramite vari meccanismi: inibendo il legame di T3 o dei coattivatori, inibendo la formazione di eterodimeri oppure agiscono indirettamente attraverso un difettivo rilascio dei corepressori (14-18).

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. Inoltre è stato osservato che tale sostituzione causa anche una debole diminuzione del legame di T3 al recettore (24). Dal punto di vista neurologico il primo soggetto è risultato essere affetto inoltre da sindrome da deficit dell'attenzione con iperattività (ADHD) in combinazione 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 (4).

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 (25). 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.

La terza mutazione già nota, P453A, è stata trovata in una paziente con sospetto di RTH; anche questa paziente era portatrice della variazione in eterozigosi ma al momento non si hanno informazioni sulla presenza o meno di disturbi cognitivi. Studi precedenti hanno dimostrato che la presenza della mutazione P453A riduce significativamente l'affinità del recettore per l'ormone T3 (26).

Tutti questi studi in vitro confermano che le mutazioni A234T, R438H e P453A, identificate nei nostri paziente possano essere effettivamente causali della presenza della RTH nei nostri pazienti.

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 dall'età di 25 anni una storia di alterata funzione tiroidea, con tachicardia, diarrea e gozzo (non presenti nella bambina), fT3 ed fT4 aumentati, TSH nella norma, anticorpi anti-tireoglobulina e anti-tireoperossidasi positivi, quadro ecografico e citologico suggestivo per tiroidite linfocitaria. La madre era stata trattata in passato con metimazolo e sottoposta ad un esame scintigrafico nel dubbio di una hashitossicosi. Dal punto di vista genetico la madre presentava la stessa variazione I276N in eterozigosi.

L'associazione tra RTH e tiroidite autoimmune è già stata descritta precedentemente (27). 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 (28).

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 i nostri dati dimostrano che la presenza di mutazioni nel gene THRB potrebbe essere una possibile causa dell'insorgenza della condizione di resistenza all'azione degli ormoni tiroidei (RTH).

Si suggerisce inoltre di valutare la diagnosi di RTH in presenza di ormoni tiroidei aumentati e TSH non soppresso, anche in assenza di segni o sintomi specifici di ipo- o iper-funzione tiroidea o in presenza di tiroidite cronica. La valutazione genetica può coadiuvare nella diagnosi, in particolare in casi con pregressi errori diagnostici. Il fenotipo può variare con l'età e tra i soggetti.

Bibliografia

1. Refetoff S, DeWind LT, DeGroot LJ. (1967) Familial syndrome combining deaf-mutism, stuppled 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. 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
5. Weiss RE, Refetoff S, (2000) Resistance to thyroid hormone. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **1**: 97–1086.
6. 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.
7. Yen, P.M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. rev.* **81**:1097–1142.
8. Zhang J, Lazar MA. (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* **62**: 439–466.
9. 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.
10. Wondisford FE. (2003) Thyroid hormone action: insight from transgenic mouse models. *J. Investig. Med.* **51**: 215–220.

11. 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- β gene. *J Clin Endocrinol Metab.* **74**:49-55.
12. Sakurai A, Nakai A, De Groot LJ. (1990) Structural analyses of human thyroid receptor b gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **71**: 83–91.
13. 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.
14. Koenig RJ (1998) Thyroid hormone receptor coactivators and corepressors. *Thyroid* **8**:703–713.
15. Yen PM (2003) Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* **14**:327-333
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. 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.
21. Frank-Raue K, Lorenz A, Haag C, Höppner W, Boll HU, Knorr D, Hentze S, Raue F. (2004) Severe form of thyroid hormone resistance in a patient with homozygous/hemizygous mutation of T3 receptor gene. *Eur J endocrinol* **6**:819-823.
22. 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
23. Bochukova E, Schoenmakers N, Agostini M, Schoenmakers E, Rajanayagam O, Keogh JM, Henning E, Reinemund J, Gevers E, Sarri M, Downes K, Offiah A, Albanese A, Halsall D, Schwabe J.W.R., Bain M, Lindley K, Muntoni F, Vargha Khadem F, Dattani M, Farooqi S, Gurnell M, and Chatterjee K. (2011) A Mutation in the Thyroid Hormone Receptor Alpha Gene *N Engl J Med.* [Epub ahead of print]
24. Behr M, Loos U. (1992) A point mutation (Ala229 to Thr) in the hinge domain of the c-erbA beta thyroid hormone receptor gene in a family with generalized thyroid hormone resistance. *Mol Endocrinol.* **7**:1119-1126.
25. Boothroyd CV, Teh BT, Hayward NK, Hickman PE, Ward GJ, Cameron DP. (1991) Single base mutation in the hormone binding domain of the thyroid hormone receptor beta gene in generalised thyroid hormone resistance demonstrated by single stranded conformation polymorphism analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* **2**:606-612.
26. Aksoy DY, Gurlek A, Ringkananont U, Weiss RE, Refetoff S. (2005) Resistance to thyroid hormone associated with autoimmune thyroid disease in a Turkish family. *J Endocrinol Invest.* **4**:379-383.
27. Robinson DB, Michaelis RD, Shakir KMM. (1993) Autoimmune hypothyroidism in a patient with generalized resistance to thyroid hormone. *South Med J* **86**: 1395-1397.

28. Gavin C, Meggison H, Ooi TC. (2008) Proposing a causal link between thyroid hormone resistance and primary autoimmune hypothyroidism. *Med Hypotheses* **70**:1024-1028.

ALLEGATI E PUBBLICAZIONI

Subclinical Hypothyroidism in Children and Adolescents: A Wide Range of Clinical, Biochemical, and Genetic Factors Involved

Anna Rapa, Alice Monzani, Stefania Moia, Daniela Vivenza, Simonetta Bellone, Antonella Petri, Francesca Teofoli, Alessandra Cassio, Graziano Cesaretti, Andrea Corrias, Vincenzo de Sanctis, Salvatore Di Maio, Cecilia Volta, Malgorzata Wasniewska, Luciano Tatò, and Gianni Bona

Division of Paediatrics (A.R., A.M., S.M., D.V., S.B., A.P., G.B.), Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, 28100 Novara, Italy; Division of Pediatrics (F.T., L.T.), University of Verona, 37134 Verona, Italy; Department of Gynecologic, Obstetric, and Pediatric Sciences (A.C.), University of Bologna, 40138 Bologna, Italy; Department of Pediatrics (G.C.), University of Pisa, 56126 Pisa, Italy; Department of Pediatrics (A.C.), University of Torino, 10126 Torino, Italy; Division of Pediatrics (V.d.S.), University Hospital of Ferrara, 44100 Ferrara, Italy; Department of Paediatrics (S.D.M.), Santobono-Pausilipon Hospital, 80129 Napoli, Italy; Department of Paediatrics (C.V.), University of Parma, 43100 Parma, Italy; and Department of Pediatrics (M.W.), University of Messina, 98122 Messina, Italy

Objective: The aim of the study was to examine clinical characteristics, biochemical parameters, and TSH-R gene variations in children and adolescents with subclinical hypothyroidism (SH) in order to evaluate their pattern of distribution in SH.

Patients: We enrolled 88 patients, each having at least two TSH measurements above the upper limit of the reference range with normal free thyroid hormones and negative thyroid autoantibodies.

Main Outcome Measures: Clinical characteristics included height, weight, family history of thyroid diseases, thyroid volume, and echogenicity at ultrasonography. Biochemical parameters included TSH, free thyroid hormones, thyroid autoantibodies, and adjusted daily urinary iodine excretion (UIE). Genetic variations in the TSH-R gene were assessed.

Results: The prevalence of overweight/obesity, positive family history of thyroid diseases, and thyroid hypoechogenicity was 28.4, 45.5, and 22.7%, respectively. Median TSH was higher in overweight/obese patients than in normal-weight ones (7.4 vs. 5.7 μ U/ml; $P = 0.04$) and in overweight/obese patients with hypoechogenicity than in those with normal ultrasound pattern (8.5 vs. 6.8 μ U/ml; $P = 0.04$). Adjusted daily UIE was lower in subjects without than in those with a positive family history of thyroid diseases (81 vs. 120 μ g/d; $P = 0.001$). The prevalence of a positive family history of thyroid diseases was 1.9-fold higher in patients with nonsynonymous mutations in the TSH-R gene than in patients without any mutation (80 vs. 42%; $P = 0.03$). A novel mutation at position 1559 in exon 10 (W520X) was detected in one child.

Conclusions: Overweight/obesity, thyroid hypoechogenicity, and nonsynonymous mutations in the TSH-R gene are characterizing features of a large portion of SH children. (*J Clin Endocrinol Metab* 94: 2414–2420, 2009)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2009 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2009-0375 Received February 18, 2009. Accepted April 23, 2009.

First Published Online May 5, 2009

Abbreviations: BMI, Body mass index; CI, confidence interval; dHPLC, denaturing HPLC; fT3, free T₃; fT4, free T₄; IQR, interquartile range; SDS, sd score; SH, subclinical hypothyroidism; Tg-Ab, thyroglobulin antibodies; TPO-Ab, thyroperoxidase antibodies; TSH-R, TSH receptor; UIE, urinary iodine excretion; US, ultrasonography; wt, wild-type.

Subclinical hypothyroidism (SH) is defined as a serum TSH concentration above the statistically defined upper limit of the reference range when serum free T₄ (fT₄) concentration is within its reference range (1). SH is a common disorder with a prevalence of 1–10% in the adult population in most community-based studies (2). For the pediatric population, SH prevalence seems to be slightly lower than 2%, although epidemiological studies concerning childhood and adolescence are lacking (3, 4).

The diagnosis of SH is determined mainly by laboratory evaluations because it has been observed that most patients exhibit few or no signs or symptoms of thyroid dysfunction. Many studies suggest that some patients do indeed have clinical, biochemical, or functional manifestations of mild thyroid failure that are more frequent than in age-matched controls (5). The most common clinical sign is goiter, reported to be twice as prevalent as observed in the general population (6). The abnormalities most frequently associated in the pediatric population are weight gain, increased cholesterol levels, impaired growth velocity, anemia, sleepiness, weakness, and impaired psychomotor and cognitive development (4, 7). Many thyroidal and nonthyroidal diseases have been shown to be also associated with the pathogenesis of SH; often, however, no overt causes are detected to define a condition of idiopathic SH (8). Among the thyroidal causes, the most frequent are iodine deficiency, Hashimoto's thyroiditis, and the overtreatment of Graves' disease. Nonthyroidal causes include diabetes mellitus, cystic fibrosis, celiac disease, and chronic renal failure (6).

Mutations in genes encoding proteins involved in the TSH pathway have been demonstrated to be responsible of SH (9–13). TSH exerts its activity by binding to the extracellular domain of TSH receptor (TSH-R), a G protein-coupled seven-transmembrane domain receptor located in the basolateral membrane of thyroid follicular cells. Some loss of function mutations, which may interfere with the normal receptor function leading to SH, have been identified in the TSH-R gene. The human TSH-R gene is located on chromosome 14q31 and encodes a protein of 764 amino acids. The gene is comprised of 10 exons, with the first nine encoding the extracellular domain and the large exon 10 encoding the transmembrane domain and the cytoplasmic tail (10).

In the present study, we evaluated a series of children and adolescents with a slight to moderate elevation of circulating TSH, normal free thyroid hormone levels, and negative thyroid autoantibodies. In these children, we examined clinical characteristics, biochemical parameters, and TSH-R gene variations to evaluate their pattern of distribution and involvement in SH.

Subjects and Methods

Study subjects

Between January 2007 and June 2008 we evaluated children and adolescents referred to the Endocrinology Units of 20 Italian Pediatric Departments for SH. Eighty-eight children and adolescents (45 males, 43 females; median age, 8.2 yr; range, 1–18 yr), each having at least two TSH measurements above the upper limit of the reference range with normal free T₃ (fT₃) and fT₄ levels and whose parents consented to the study,

were enrolled. Of the 88 patients, 28 were preschool age (1–5.9 yr) and 60 were school age (6–18 yr). Exclusion criteria were: positivity for thyroperoxidase antibodies (TPO-Ab) or thyroglobulin antibodies (Tg-Ab), false positivity to neonatal screening for hypothyroidism, thyroid-related diseases, and any chronic nonthyroidal illness.

Clinical characteristics and biochemical parameters were recorded for each child. Clinical characteristics included sex, age, height, weight, pubertal status, family history of thyroid diseases, presence of goiter at palpation, and thyroid volume and echogenicity at ultrasonography (US). Biochemical parameters included TSH, fT₃, fT₄, and adjusted daily urinary iodine excretion (UIE).

The study protocol was approved by each local ethical committee, and an informed consent was obtained from all patients' parents.

Clinical characteristics

Height was measured with a standard laboratory stadiometer (Holtain, Wales, UK) to the nearest 0.5 cm during maximal expiration. To allow the comparison between different ages and genders, height was expressed as SD score (SDS) according to Italian cross-sectional 2006 growth charts (14). Idiopathic short stature is defined auxologically by a height below -2 SDS without findings of disease as evident from a complete evaluation of a pediatric endocrinologist, including stimulated-GH levels. Weight was measured to the nearest 100 g on electronic scales with subjects wearing light indoor clothing. Overweight and obesity were defined by body mass index (BMI) according to Italian cross-sectional 2006 growth charts. Age- and gender-specific values of median, coefficient of variation, and skewness of the curve distribution of BMI in Box-Cox power transformation were used to calculate BMI z-score for each subject (14). Pubertal stages were determined by visual inspection using Tanner's criteria.

Thyroid volume and morphology

At palpation, goiter was defined according to the World Health Organization criteria. At US, thyroid size and morphology were evaluated using a high-resolution 7.5-MHz linear transducer, with the subjects sitting and their necks slightly extended.

The volume (milliliters) of each lobe of the thyroid gland was calculated using the formula: $0.479 \times \text{depth} \times \text{length} \times \text{width}$. Thyroid volume was defined as enlarged according to the reference values for sex and body surface area (15). Body surface area (square meters) was calculated by using the formula: $\text{weight}^{0.425} \times \text{height}^{0.725} \times 71.84 \times 10^{-4}$.

Thyroid tissue echogenicity was evaluated in a longitudinal scan of the thyroid lobes by a standardized comparison with the echogenicity of the adjacent muscles: sternohyoideus, sternothyroideus, and sternocleidomastoideus. Echogenicity was categorized as normal, decreased, or increased when compared with muscles.

Biochemical parameters

Thyroid dysfunction was assessed by measuring serum concentrations of TSH, fT₃, and fT₄. Thyroid autoimmune status was evaluated through TPO-Ab and Tg-Ab antibody measurements. Serum TSH, fT₃, fT₄, TPO-Ab, and Tg-Ab levels were assessed by direct chemiluminescent technology with acridinium ester as a label and paramagnetic particles as a solid phase (Advia Centaur CP Immunoassay System; Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL). Sensitivity was 0.019 μ IU/ml for TSH, 0.2 pg/ml for fT₃, 0.1 ng/dl for fT₄, 25 IU/ml for TPO-Ab, and 30 IU/ml for Tg-Ab assay. Reference values for TSH were 0.35–4.5 μ IU/ml, for fT₃ they were 2.3–4.2 pg/ml, and for fT₄ they were 0.89–1.76 ng/dl. TPO-Ab and Tg-Ab titers higher than 60 IU/ml were considered positive. For each child having at least two TSH measurements above the upper limit of the reference range, TSH levels were reported as the mean of all measurements performed in the same patient on different occasions.

In 59 of 88 subjects, spot morning urine samples were collected for the determination of UIE and creatinine. UIE was determined by Sandell-Kolthoff method after perchloric acid digestion with a sensitivity of 5 μ g/liter. Urinary creatinine was determined by Jaffe method using Advia 2400 Chemistry System (Siemens Healthcare Diagnostics), and its ref-

TABLE 1. Primer sequence of each PCR fragment with corresponding size, annealing temperatures, and dHPLC partial denaturing temperatures

Exon	Primer sequence (5' → 3')	PCR product size (bp)	PCR annealing temperature (C)	dHPLC temperature (C)
1	F-cctcttttccccttcca	400	60-50 (TD)	62.1
	R-ccagagatcaaggcatctgcag			60.1
2	F-tgggtcttggatgtttgga	344	51	53.4
	R-actgcataaatcaatggcag			51.4
3	F-gcagaatccatgagggtgt	301	51	56.1
	R-caatggagctgtttct			54.1
4	F-ggtaccctgtggcgtaaatg	330	51	56.2
	R-atgggtatagcctgggtcg			54.2
5	F-tgtcttcagaaccatgctt	335	60-50 (TD)	54.7
	R-cactggcatgaagtaaggca			52.7
6	F-ctgctgcagaaggaaagcat	227	60-50 (TD)	57.1
	R-tccaagagccatactgcctt			55.1
7	F-gcaccacttctaccagta	352	51	58.8
	R-tctccctgggtgtgtgtgtgtgt			56.8
8	F-gtgctcaagccagaagaaga	357	51	54.3
	R-gttgctgtctcgggtaaaagg			52.3
9	F-tcatctcccaattaaccagc	410	60-50 (TD)	58.8
	R-gtggagagaaattggaagc			56.8
10A	F-gcctggcactgactctttc	419	51	58.7
	R-tcctgagaattgtgtgtgtgt			56.7
10B	F-gttcaaccctgtggaagaca	446	60-50 (TD)	60.9
	R-gtttctgcttctctctcg			58.9
10C	F-ctggatgccatcacctctg	433	60-50 (TD)	59.2
	R-agcaactccaaatcttgctg			57.2
10D	F-tctgaacaacgctctcatca	447	60-50 (TD)	56.9
	R-gaaccccccaacacatagct			54.9

F, Forward primer; R, reverse primer; TD, touchdown PCR.

erence values were 25–300 mg/dl. UIE in casual urine samples does not give a precise measure of iodine excretion in single individuals due to the large interindividual variations in daily urinary volume, with 24-h urine samples difficult to collect particularly in young children. Therefore, we used age- and sex-adjusted UIE/creatinine ratios, which come closer to the true 24-h iodine excretion if nutrition is adequate (16). Daily iodine excretion from age- and sex-adjusted iodine/creatinine ratio was calculated for each subject using the following formula: adjusted daily UIE = UIE ($\mu\text{g/liter}$)/[creatinine (g/liter)/expected daily creatinine excretion (g/d)] (16).

The expected daily creatinine excretion of each subject was calculated as a function of age, sex, race, and morphometry by the “smoothed” set of equations suggested by Mage *et al.* (17).

Molecular analysis of TSH-R gene

The 10 TSH-R coding exons and their flanking intronic regions were amplified by PCR from genomic DNA extracted from peripheral blood leukocytes using the salting-out method. Exon 10 was subdivided into four overlapping fragments that encompassed the entire length. The PCR amplification was performed in 30 μl final volume with 100 ng of genomic DNA and AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primer sequences and PCR temperatures are shown in Table 1. The resulting PCR products were visualized on a 2% agarose gel before denaturing HPLC (dHPLC) analysis. The dHPLC analysis of each amplified sample was performed using a wave DNA fragment analysis system (Transgenomic, Omaha, NE) at two different temperatures (Table 1). A total of 10 μl of each amplified sample was mixed with an equal volume of wild-type (wt) sample that was obtained using the same conditions of amplification. Positive samples obtained by dHPLC analysis were used as the template for direct sequencing via the Big-Dye terminator cycle sequencing reaction kit (Applied Biosystems) and ABI 3100 automated sequencer.

Statistical analysis

Because the clinical and biochemical variables analyzed were not normally distributed (*i.e.* all values were skewed toward low values, except for fT3 and fT4 levels being skewed toward high values), all analyses were performed by nonparametric tests, and their values were expressed as median and interquartile range (IQR). Comparisons between groups were performed using the χ^2 test, Fisher test, Mann-Whitney *U* test, and Kruskal-Wallis ANOVA test, where appropriate. Relationships between continuous variables were evaluated by Spearman rank order correlation. TSH cutoff in overweight/obesity status was identified by receiver operating characteristic curve and Youden index. Multiple regression models were used to determine the independent contribution of each potential predictive variable on TSH and adjusted daily UIE levels, as determined from univariate analysis. For this purpose, two different general stepwise regression models were applied, using the first TSH values as the dependent variable and age and overweight/obesity status as independent variables. In the second, adjusted daily UIE values were applied as the dependent variable and age and positive family history of thyroid diseases as independent variables. The β coefficient [95% confidence interval (CI)] for each significant independent variable was reported according to sigma-restricted parameterization. Statistical analysis was performed with STATISTICA software v.6.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK).

Results

Clinical characteristics and biochemical parameters

Clinical characteristics and biochemical parameters of 88 children and adolescents with SH are summarized in Table 2. In our series of patients, 10 were overweight (11.4%) and 15 obese (17%), accounting for a prevalence of overweight/obesity of 28.4%. Seventeen patients showed idiopathic short stature

TABLE 2. Clinical characteristics and biochemical parameters in our series (n = 88)

	Median	IQR	Range	Normal range
Clinical characteristics				
BMI z-score	0.15	−0.66–0.90	−2.21–2.54	
Height SDS	0.20	−1.45–1.11	−3.78–3.39	
Biochemical parameters				
TSH (μIU/ml)	6.1	5.2–7.8	4.6–20.3	0.35–4.5
FT3 (pg/ml)	3.6	3.5–3.9	3.1–4.1	2.3–4.2
FT4 (ng/dl)	1.3	1.1–1.4	0.9–1.6	0.89–1.76
Adjusted daily UIE (μg/d) ^a	98	66–137	19–542	

^a Adjusted daily UIE was determined in 59 of 88 children (67%).

(19.3%). Almost half of the patients had a positive family history of thyroid diseases within the second degree of relationship (45.5%). US diagnosed eight patients with a reduced thyroid volume and eight with a thyroid enlargement, with five of the latter (62.5%) presenting goiter at palpation, too. The extent of thyroid enlargement at US was 5–20% of the normal value upper limit. At US examination, a hypoechogenic pattern was found in 20 patients (22.7%), all the others displaying a normal echopattern. The prevalence of hypoechogenic pattern was higher in overweight/obese children than in normal-weight children, although not significantly (32 vs. 19%; $P = 0.3$).

In all subjects, median (IQR) TSH levels were 6.1 (5.2–7.8) μIU/ml, with higher values in preschool-age children than school-age children [7.1 (5.5–8.6) vs. 5.9 (5.2–7.4) μIU/ml; $P = 0.04$]. Median TSH was significantly higher in overweight/obese patients than in normal-weight ones [7.4 (6.0–8.3) vs. 5.7 (5.2–7.7) μIU/ml; $P = 0.04$]. In 56% of overweight/obese and in 30% of normal-weight patients, TSH levels were higher than 7 μIU/ml ($P = 0.04$; χ^2 test). TSH levels did not vary according to the presence of idiopathic short stature or to a positive family history of thyroid diseases. No difference in TSH values was found

among subjects with reduced, normal, or enlarged thyroid volume at US. On the contrary, median TSH levels tended to be higher in patients with hypoechogenicity at thyroid US than in those with normal ultrasound pattern [7.6 (5.5–8.9) vs. 6.0 (5.2–7.4) μIU/ml; $P = 0.06$] (Fig. 1). This increase in TSH values was statistically significant when we analyzed only overweight/obese patients [8.5 (6.8–9.2) vs. 6.8 (6.0–7.4) μIU/ml; $P = 0.04$]. Multiple regression analysis showed that both younger age ($\beta = -0.30$; 95% CI = $-0.51/-0.08$; $P = 0.008$) and overweight/obesity status ($\beta = 0.22$; 95% CI = $0.06/0.37$; $P = 0.01$) independently contributed to increased TSH levels (multiple R = 0.31; $P = 0.02$).

Median adjusted daily UIE was 98 (66–137) μg/d, with no difference between normal-weight and overweight/obese patients. Adjusted daily UIE was positively correlated with age ($r = 0.30$; $P = 0.02$), whereas no correlation was found with TSH values. Adjusted daily UIE did not vary according to the presence of thyroid enlargement and hypoechogenicity at US. On the contrary, adjusted daily UIE was significantly lower in subjects without than in those with a positive family history of thyroid diseases [81 (50–106) vs. 120 (84–164) μg/d; $P = 0.001$]. Multiple regression analysis showed that only a negative family history of thyroid diseases ($\beta = 0.35$; 95% CI = $0.09/0.60$; $P = 0.001$) contributed to decreased adjusted daily UIE values, whereas age did not (multiple R = 0.41; $P = 0.006$).

Puberty was present in 19 adolescents (21.6%) and did not influence either TSH or adjusted daily UIE values.

Molecular analysis of TSH-R gene

Known variations

In our series of subjects, we identified in the TSH-R gene a total of 19 known variations using direct sequencing: six missense and three synonymous mutations, one insertion, one deletion, and eight polymorphisms. The number of subjects (%) carrying each variation is shown in Table 3. On the whole, we found 10 subjects carrying eight nonsynonymous mutations where the effect on TSH-R signaling pathway had previously been explained by functional studies. Each mutation was found in heterozygous state, with C41S present in three siblings. Allelic frequencies of each polymorphism are shown in Table 4.

The prevalence of positive family history of thyroid diseases was 1.9-fold higher in patients with a nonsynonymous mutation in the TSH-R gene than in patients without any detected mutation (80 vs. 42%; $P = 0.03$, Fisher test). No relationship was found between the presence of nonsynonymous mutations or polymorphisms and adjusted daily UIE.

Novel TSH-R mutation

Sequencing of the complete coding region of the TSH-R gene revealed the presence of a novel mutation (TGG → TAG) at position 1559 in exon 10 in one child (Fig. 2). Both the

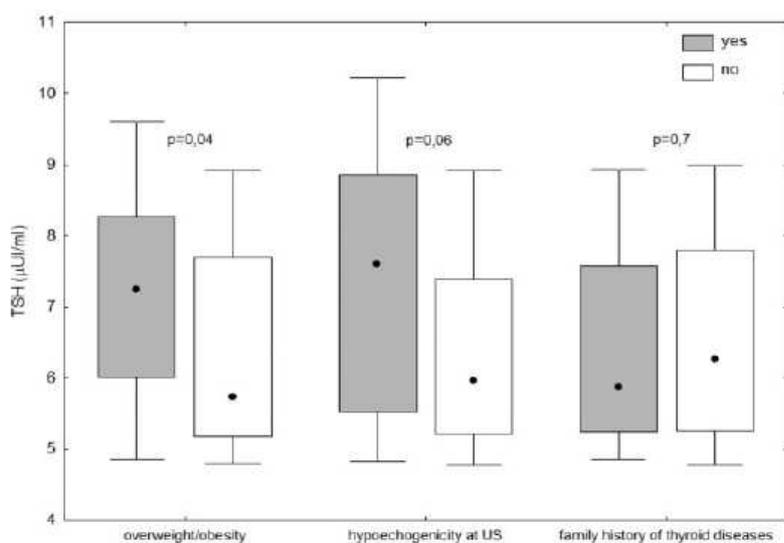


FIG. 1. TSH levels according to the presence of overweight/obesity, positive family history of thyroid diseases, and hypoechogenicity at thyroid US. Data are represented as median (point), interquartile range (box), and 10th–90th percentiles (whiskers).

TABLE 3. Number of children (%) with known mutations or polymorphisms in our series (n = 88)

Variations	wt/wt	wt/var	var/var
Missense mutations			
C41S	85 (96.6)	3 (3.4)	0
R109Q	87 (98.9)	1 (1.1)	0
P162A	87 (98.9)	1 (1.1)	0
D403N	87 (98.9)	1 (1.1)	0
W488R	87 (98.9)	1 (1.1)	0
M527T	87 (98.9)	1 (1.1)	0
Frameshift mutations			
123-124 insTGCA	87 (98.9)	1 (1.1)	0
555-561 delTATTCTT	87 (98.9)	1 (1.1)	0
Synonymous mutations			
P119P	87 (98.9)	1 (1.1)	0
G245G	86 (97.7)	2 (2.3)	0
A459A	87 (98.9)	1 (1.1)	0
Polymorphisms			
P27T ^a	87 (98.9)	1 (1.1)	0
P52T (rs 2234919)	81 (92)	7 (8)	0
IVS1 + 63 (rs 2239610)	68 (77.3)	19 (21.6)	1 (1.1)
IVS1-80 (rs 17111401)	83 (94.3)	5 (5.7)	0
IVS6 + 13 (rs 2241119)	74 (84)	14 (16)	0
N187N (rs 2075179)	74 (84)	14 (16)	0
[CT] _n microsatellite (rs 10651555)	40 (45.5)	30 (34)	18 (20.5)
D727E (rs 1991517)	74 (84)	14 (16)	0

wt/wt, Children homozygous for the wt allele; wt/var, children heterozygous for the variation; var/var, children homozygous for the variation.

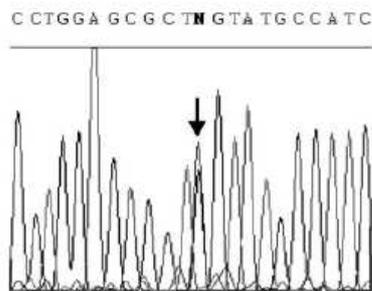
^a The P27T variant was considered a polymorphism because it was reported not to play a functional role in SH (23).

proband and her mother were heterozygous for the mutation, whereas her father was homozygous for the wt allele. In the proband, mean TSH was 8.9 μ IU/ml. At present, no data are available regarding the thyroid function of her mother. The mutation resulted in the substitution of tryptophan to a stop codon (W520X) and is located in the third transmembrane domain of the TSH-R. W520X led to a premature truncation of TSH-R mRNA synthesis and is proposed to be a nonsynonymous mu-

TABLE 4. Allelic frequencies of polymorphisms in our series

Polymorphisms	wt (%)	var (%)
P27T	C 99.4	A 0.6
P52T (rs 2234919)	A 96.0	C 4.0
IVS1 + 63 (rs 2239610)	G 88.1	C 11.9
IVS1-80 (rs 17111401)	T 97.2	A 2.8
IVS6 + 13 (rs 2241119)	A 92.0	G 8.0
N187N (rs 2075179)	T 92.0	C 8.0
[CT] _n microsatellite (rs 10651555)	[CT] ₆ 62.5	[CT] ₇ and [CT] ₈ 0.6 and 36.9
D727E (rs 1991517)	C 92.0	G 8.0

wt, Wild-type allele stands for the more frequent allele; var, variant allele stands for the less frequent allele.

**FIG. 2.** Direct sequencing of the TSH-R gene showing a novel mutation 1559 G \rightarrow A at position 520 in exon 10. The proband and her mother were heterozygous for the mutation.

tation, with its potential SH-causing role to be assessed in future functional studies.

Discussion

In the present study, we analyzed clinical characteristics, biochemical parameters, and TSH-R gene variations in a series of children and adolescents with a slight to moderate elevation of circulating TSH, normal free thyroid hormone levels, and negative thyroid autoantibodies to evaluate their pattern of distribution and involvement in SH.

Clinical and biochemical factors

The prevalence of overweight/obesity in our population was similar to that reported in healthy Italian school-age children (18). In our SH patients, TSH levels were significantly higher in overweight/obese subjects than in normal-weight ones. These data are widely confirmed by many studies performed in obese, overweight, and normal-weight children (19, 20). Several mechanisms leading to increased TSH levels in obesity have been hypothesized, including increased leptin-mediated production of pro-TRH (21), impaired feedback due to a lowered number of T₃ receptors in the hypothalamus (22), and a decrease in peripheral deiodinase activity (23). Despite the uncertainty regarding the underlying mechanism, the findings that TSH levels are increased in obese subjects and that weight loss leads to decreased TSH levels support the hypothesis that a TSH increase in obese subjects is reversible and seems to be a consequence rather than a cause of obesity (19).

In our series of subjects, we found a higher prevalence of idiopathic short stature than that reported for pediatric age (24). This is most likely due to a selection bias because all subjects enrolled were recruited in Endocrinology Units where patients are often referred for growth impairment. We found no association between the presence of idiopathic short stature and the degree of the increase in serum TSH levels or the presence of increased thyroid volume and hypoechogenicity at US. The relationship between thyroid failure and growth is still controversial: overt hypothyroidism is certainly known to be one of the potential causes of short stature in children, but only a preliminary study investigated the effect of SH on growth, showing an increased growth velocity in L-thyroxine-treated children (25).

The increased thyroid volume observed by US in eight patients may be the result of compensatory hyperplasia secondary to the increased TSH level. On the other hand, the reduced volume in eight patients may be a sign of mild congenital hypoplasia, resulting in slightly lower thyroid hormone production, with a chronic stimulation of TSH secretion. However, no correlation was found between thyroid volume and TSH levels, suggesting that volume variations are not necessarily associated to an increase in TSH. In five of the eight patients with enlarged thyroid volume, the enlargement was also detectable at palpation. The rate of detectability of goiter at palpation was low (62.5%), suggesting that this technique is not reliable for the diagnosis of thyroid enlargement in children.

Our analysis of thyroid pattern at US showed that TSH levels tended to be higher in the 20 patients with hypoechogenicity. The association between decreased thyroid echogenicity and overt hypothyroidism is well known. Hypoechogenicity has also been demonstrated in SH, where TSH elevation may be an early sign of thyroid failure (26). Indeed, a 3-yr follow-up study examining apparently healthy subjects belonging to the hospital staff found that none of the subjects who developed thyroid dysfunction had a normal thyroid echogenicity at enrollment (27). This suggests that hypoechogenicity may be an early marker of thyroid impairment. In particular, it could be hypothesized that the hypoechogenic and irregular US pattern we observed in 20 patients may be the early result of a seronegative thyroiditis, where ultrasound alterations precede the generation of antithyroid antibodies, as reported in previous studies (27, 28). Moreover, a possible explanation for thyroid hypoechogenicity at US observed in 32% of our overweight/obese SH children could be the existence of a low-grade inflammation, a known characteristic of obesity (29). In obesity, it is well recognized that adipose tissue secretes inflammatory cytokines and that some of these, like TNF- α , IL-1, and IL-6 are secreted into the general circulation associating to systemic symptoms (30). These cytokines have been proven to inhibit sodium iodide symporter mRNA expression and iodide uptake activity in human and FRTL-5 rat thyroid cells (31), playing a role in the compensatory raise in TSH levels observed in obese subjects. Moreover, inflammatory cytokines may induce vasodilatation and increase permeability of thyroid vessels with subsequent plasma exudation and parenchyma imbibition that might explain hypoechogenicity at ultrasound. However, a limitation of our study is that fine-needle aspiration cytology was not performed in our patients, and therefore cytological evidence of signs of local inflammation could not be assessed.

The link between SH and iodine deficiency is well-known, and UIE determination is an established indicator of iodine intake, where a median daily UIE lower than 100 μg is suggestive of iodine deficiency (32). In our series, median adjusted daily UIE was 81 μg in children with a negative family history of thyroid diseases, standing for mild iodine deficiency, whereas it was 120 μg in children with a positive family history of thyroid diseases, standing for sufficient iodine intake. Therefore, mild iodine deficiency may be observed in SH children, especially in the absence of a genetic background of thyroid diseases, even if the exact significance of this association remains to be clarified.

Genetic factors

Loss of function mutations interfere with normal receptor function and can affect a variety of loci in the TSH-R gene (10). Inheritance of TSH-R resistance follows an autosomal dominant pattern without evidence for incomplete penetrance, yet expressivity is variable (33). The recent finding that TSHR, like other G protein-coupled receptors, can oligomerize in living cells led to the hypothesis that the formation of complexes between wild-type and mutant receptors may be responsible for partial TSH resistance in patients with heterozygous TSH-R mutations (34). In our series of subjects, we detected eight known nonsynonymous mutations in the heterozygous state, which was previously demonstrated to lead to a loss of function of the TSH-R (11–13, 35). The P27T variant, found in only one child, was not reported to play a functional role and was considered a polymorphism (35). In one child and her mother, we identified the novel variation W520X in the heterozygous state. Its functional significance will be assessed in further investigations, although its causative role in TSH resistance may be proposed because W520X leads to a premature stop-codon in exon 10 resulting in a TSH-R mRNA truncation. In TSH-R gene, many polymorphisms have been described, eight of which were identified in our SH patients with a frequency similar to that reported in previous studies (36, 37). The TSH levels may also be influenced by mutations and polymorphisms in other genes, such as thyroid transcription factors TTF-1, PAX-8, and FOXE1, which reduce the expression of TSH-R (38), or PDE-8B, which encodes a high-affinity cAMP-specific phosphodiesterase involved in TSH-R signaling pathway (39). Studies of these genes in our SH children and adolescents may further elucidate the increase in their TSH levels.

Conclusions

In summary, in the analysis of the distribution of clinical characteristics, biochemical parameters, and TSH-R gene variations in our series of SH children and adolescents, we found that overweight/obese status, hypoechogenicity at US, and nonsynonymous mutations in TSH-R gene are characterizing features of a large portion of SH children. Moreover, reduced adjusted daily UIE levels were observed in the absence of a positive family history of thyroid diseases. Further investigations involving fine-needle aspiration cytology for the detection of seronegative autoimmune thyroiditis, UIE determination on multiple 24-h urine samples for a more accurate assessment of individual iodine intake, and the molecular analysis of alternate genes involved in the modulation of TSH levels may better clarify the pathogenesis of SH in childhood.

Acknowledgments

The authors thank all the members of the Study Group for Thyroid Diseases of the Italian Society for Pediatric Endocrinology and Diabetology (SIEDP/ISPED) who contributed to the study by patient recruitment and acquisition of data.

Address all correspondence and requests for reprints to: Anna Rapa, Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of

Piemonte Orientale, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy. E-mail: anna.rapa@med.unipmn.it.

This study was supported by University of Piemonte Orientale for sample analysis.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Surks MI, Ortiz E, Daniels GH, Sawin CT, Col NF, Cobin RH, Franklyn JA, Hershman JM, Burman KD, Denke MA, Gorman C, Cooper RS, Weissman NJ 2004 Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *JAMA* 291:228–238
2. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC 2000 The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* 160:526–534
3. 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
4. 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
5. Zulewski H, Müller B, Exer P, Miserez AR, Staub JJ 1997 Estimation of tissue hypothyroidism by a new clinical score: evaluation of patients with various grades of hypothyroidism and controls. *J Clin Endocrinol Metab* 82:771–776
6. Cooper DS 2001 Clinical practice. Subclinical hypothyroidism. *N Engl J Med* 345:260–265
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 thyroxine. *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. Alberti L, Proverbio MC, Costagliola S, Romoli R, Boldrighini B, Vigone MC, Weber G, Chiumello G, Beck-Peccoz P, Persani L 2002 Germline mutations of TSH receptor gene as cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2549–2555
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. Cacciari E, Milani S, Balsamo A, Spada E, Bona G, Cavallo L, Cerutti F, Gargantini L, Greggio N, Tonini G, Cicognani A 2006 Italian cross-sectional growth charts for height, weight and BMI (2 to 20 yr). *J Endocrinol Invest* 29:581–593
15. Zimmermann MB, Hess SY, Molinari L, De Benoist B, Delange F, Braverman LE, Fujieda K, Ito Y, Jooste PL, Moosa K, Pearce EN, Pretell EA, Shishiba Y 2004 New reference values for thyroid volume by ultrasound in iodine-sufficient schoolchildren: a World Health Organization/Nutrition for Health and Development Iodine Deficiency Study Group Report. *Am J Clin Nutr* 79:231–237
16. Knudsen N, Christiansen E, Brandt-Christensen M, Nygaard B, Perrild H 2000 Age- and sex-adjusted iodine/creatinine ratio. A new standard in epidemiological surveys? Evaluation of three different estimates of iodine excretion based on casual urine samples and comparison to 24 h values. *Eur J Clin Nutr* 54:361–363
17. Mage DT, Allen RH, Kodali A 2008 Creatinine corrections for estimating children's and adult's pesticide intake doses in equilibrium with urinary pesticide and creatinine concentrations. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 18:360–368
18. Maffei C, Banzato C, Talamini G; Obesity Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology 2008 Waist-to-height ratio, a useful index to identify high metabolic risk in overweight children. *J Pediatr* 152:207–213
19. Reinehr T, de Sousa G, Andler W 2006 Hyperthyrotropinemia in obese children is reversible after weight loss and is not related to lipids. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3088–3091
20. Radetti G, Kleon W, Buzi F, Crivellaro C, Pappalardo L, di Iorgi N, Maghnie M 2008 Thyroid function and structure are affected in childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4749–4754
21. Nillni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Björbak C, Flier JS 2000 Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem* 275:36124–36133
22. Burman KD, Latham KR, Djuh YY, Smallridge RC, Tseng YC, Lukes YG, Maunder R, Wartofsky L 1980 Solubilized nuclear thyroid hormone receptors in circulating human mononuclear cells. *J Clin Endocrinol Metab* 51:106–116
23. Krotkiewski M 2002 Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* 440:85–98
24. Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, Savage MO, Saenger PH, Cohen P 2008 Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res* 18:89–110
25. Cetinkaya E, Aslan A, Vidinlisan S, Ocal G 2003 Height improvement by L-thyroxine treatment in subclinical hypothyroidism. *Pediatr Int* 45:534–537
26. Loy M, Cianchetti ME, Cardia F, Melis A, Boi F, Mariotti S 2004 Correlation of computerized grey-scale sonographic findings with thyroid function and thyroid autoimmune activity in patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Ultrasound* 32:136–140
27. Rago T, Chiovato L, Grasso L, Pinchera A, Vitti P 2001 Thyroid ultrasonography as a tool for detecting thyroid autoimmune diseases and predicting thyroid dysfunction in apparently healthy subjects. *J Endocrinol Invest* 24:763–769
28. Vejbjerg P, Knudsen N, Perrild H, Laurberg P, Pedersen IB, Rasmussen LB, Ovesen L, Jørgensen T 2006 The association between hypoechoogenicity or irregular echo pattern at thyroid ultrasonography and thyroid function in the general population. *Eur J Endocrinol* 155:547–552
29. Kershaw EE, Flier JS 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548–2556
30. Chrousos GP 1995 The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332:1351–1362
31. Pekary AE, Hershman JM 1998 Tumor necrosis factor, ceramide, transforming growth factor- β 1, and aging reduce Na⁺/I⁻ symporter messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 139:703–712
32. World Health Organization, UNICEF, ICCIDD 2008 Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. A guide for programme managers. http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/iodine_deficiency/9789241595827/en/index.html
33. Grasberger H, Mimouni-Bloch A, Vantýghem 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
34. 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
35. De Marco G, Agretti P, Camilot M, Teofoli F, Tatò L, Vitti P, Pinchera A, Tonacchera M 2009 Functional studies of new TSH receptor (TSHr) mutations identified in patients affected by hypothyroidism or isolated hyperthyropinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 70:335–338
36. 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
37. 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
38. 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
39. 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

A novel familial variation of the thyroid hormone receptor beta gene (I276N) associated with resistance to thyroid hormone and autoimmune thyroiditis.

Journal:	<i>Thyroid</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Patients with remarkable features or rare disorders
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Monzani, Alice; Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale moia, stefania; Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale Prodam, Flavia; Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale Walker, Gillian; Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale Bellone, Simonetta; Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale Petri, Antonella; Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale bona, gianni; Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale
Keyword:	Pathology-Thyroid, Thyroid Autoimmunity-Clinical, Thyroid Hormone Resistance-Clinical, Thyroid and Development, Hormone Receptors
Abstract:	<p>Background: Resistance to thyroid hormone (RTH) is a dominantly inherited syndrome characterized by reduced organ responsiveness to thyroid hormone, with elevated thyroid hormone levels and unsuppressed TSH concentrations, and a widely variable clinical phenotype. RTH is most frequently caused by point mutations in the thyroid hormone receptor beta gene (THRB). We report the case of a child and her mother with different clinical signs in presence of high thyroid hormone and normal TSH levels with positive anti-thyroid antibodies, both carrying a novel variation of THRB.</p> <p>Patient findings: A 3-year-old girl presented to our Pediatric Endocrinology Unit with statural and ponderal growth retardation since the first months of life and biochemical findings of elevated thyroid hormone levels with unsuppressed TSH, in presence of an unusual positivity to anti-thyroperoxidase antibodies for age. Molecular analysis of THRB gene identified a novel missense variation in exon 8 in the heterozygous state (I276N). The child's mother, a 42-year-old women, reported from 25-years of age a history of tachycardia, high stool frequency and goiter, elevated fT3 and fT4 with normal TSH, increased levels of anti-thyroperoxidase and anti-thyroglobulin antibodies and a thyroid ultrasound and cytological pattern suggestive for lymphocytic thyroiditis. The same THRB variation</p>

	<p>was identified also in the mother in the heterozygous state. Summary: We described the case of a child and her mother affected by RTH presenting with different clinical phenotype even if they carried an identical novel THRB missense variation. In both of them RTH was associated with the presence of anti-thyroid antibodies. Conclusions: RTH should be suspected every time elevated thyroid hormones and unsuppressed TSH are found, independently of the clinical phenotype, even in association with an autoimmune thyroiditis.</p>

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

1 **A novel familial variation of the thyroid hormone receptor beta gene (I276N) associated with**
2 **resistance to thyroid hormone and autoimmune thyroiditis.**

3

4 Alice Monzani¹, MD, Stefania Moia¹, PhD, Flavia Prodam¹, MD, Gillian Elisabeth Walker¹, PhD,
5 Simonetta Bellone¹, MD, Antonella Petri¹, MD and Gianni Bona¹, MD

6

7 ¹Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences; University of Piemonte Orientale,
8 Novara, Italy

9

10 **Running title:** THRB gene variation and autoimmune thyroiditis.

11

12 **Key words:** resistance to thyroid hormone, autoimmune thyroiditis, THRB gene, growth
13 impairment, hyperthyroidism, phenotype

14

15

16

1 **Abstract**

2 **Background:** Resistance to thyroid hormone (RTH) is a dominantly inherited syndrome
3 characterized by reduced organ responsiveness to thyroid hormone, with elevated thyroid hormone
4 levels and unsuppressed TSH concentrations, and a widely variable clinical phenotype. RTH is
5 most frequently caused by point mutations in the thyroid hormone receptor beta gene (THRB). We
6 report the case of a child and her mother with different clinical signs in presence of high thyroid
7 hormone and normal TSH levels with positive anti-thyroid antibodies, both carrying a novel
8 variation of THRB.

9 **Patient findings:** A 3-year-old girl presented to our Pediatric Endocrinology Unit with statural and
10 ponderal growth retardation since the first months of life and biochemical findings of elevated
11 thyroid hormone levels with unsuppressed TSH, in presence of an unusual positivity to anti-
12 thyroperoxidase antibodies for age. Molecular analysis of THRB gene identified a novel missense
13 variation in exon 8 in the heterozygous state (I276N). The child's mother, a 42-year-old women,
14 reported from 25-years of age a history of tachycardia, high stool frequency and goiter, elevated fT3
15 and fT4 with normal TSH, increased levels of anti-thyroperoxidase and anti-thyroglobulin
16 antibodies and a thyroid ultrasound and cytological pattern suggestive for lymphocytic thyroiditis.
17 The same THRB variation was identified also in the mother in the heterozygous state.

18 **Summary:** We described the case of a child and her mother affected by RTH presenting with
19 different clinical phenotype even if they carried an identical novel THRB missense variation. In
20 both of them RTH was associated with the presence of anti-thyroid antibodies.

21 **Conclusions:** RTH should be suspected every time elevated thyroid hormones and unsuppressed
22 TSH are found, independently of the clinical phenotype, even in association with an autoimmune
23 thyroiditis.

24

1 **Introduction**

2 Resistance to thyroid hormone (RTH) or, broadly speaking a reduced sensitivity to thyroid
3 hormone, is a syndrome characterized by reduced organ responsiveness to thyroid hormone, first
4 identified in 1967 by Samuel Refetoff (1). This syndrome has been described up to now in
5 approximately 2,000 patients belonging to 372 families with an estimated incidence of 1:40,000 live
6 births (2-4).

7 The first recognized and most frequent defect which causes RTH involves the thyroid hormone
8 receptor beta gene (THRB) located on chromosome 3 (5). Thyroid hormone receptor (TR) is a
9 member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily, that regulates the expression of many
10 target genes through its ability to bind to thyroid hormone response elements. It is composed of 3
11 functional domains, an amino-terminal transactivation domain, a DNA binding domain and a
12 carboxyl-terminal ligand-binding and dimerization domain (6). Up until now, over 100 mutations of
13 the THRB have been identified (7), most of them clustering in the ligand-binding domain of the
14 receptor (8). In the majority of families, the syndrome is transmitted in an autosomal dominant
15 manner. Hormonal findings vary widely in patients with RTH, with the most typical pattern being
16 an elevated serum free T4 (fT4) concentration in association with non-suppressed TSH, usually
17 accompanied by high serum levels of free T3 (fT3). Characteristic of the RTH syndrome is the
18 paucity of specific clinical manifestations with considerable inter-individual variation and
19 heterogeneous phenotype (2,3). Presenting symptoms and signs are reported to be goiter,
20 hyperactive behaviour, speech impediment, developmental delay, an IQ less than 85, short stature
21 and growth retardation, hearing loss and sinus tachycardia (9).

22

23 **Methods**

24 *Molecular analysis of THRB gene*

25 Informed consent to perform genetic testing was obtained. Genomic DNA from the patients was
26 isolated from peripheral blood using a commercial kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden,

3

1 Germany). Exons 7 through 10 and their flanking intronic regions were amplified by PCR using
2 specific primer sequences flanking all coding exons (10). The PCR amplification was performed in
3 30 μ l final volume with 100 ng of genomic DNA and AmpliTaq Gold (Applied BioSystems, Foster
4 City, U.S.A.). The reaction conditions were an initial denaturation at 95°C for 10 min, 35 cycles for
5 30s at 95°C, annealing at 55°C for 30s and an extension at 72°C for 30s, followed by terminal
6 extension at 72°C for 5 min. The resulting PCR products were visualized on a 2% agarose gel prior
7 to direct sequencing using the Big-Dye terminator cycle sequencing reaction kit (Applied
8 BioSystems, Foster City, CA).

9

10 **Patients**

11 *Patient 1*

12 In January 2011 a 3-year old female was referred to our Pediatric Endocrinology Unit for an
13 evaluation of growth impairment. She was born preterm, at 35 weeks gestation, from unrelated
14 parents. At birth her weight and length were appropriate for gestational age. No enlargement of the
15 thyroid gland was noted at birth. She had normal TSH levels at the newborn screening. Following
16 the first months of life she showed statural and ponderal growth retardation. The parents reported
17 no appetite loss, no stool frequency anomalies, no abdominal pain. At first auxological and
18 endocrinological evaluation, her weight and height were on the 6th percentile for sex and age, -1.7
19 SD her target according to her parents height. She was prepubertal. No thyroid enlargement was
20 detected by palpation. Her general physical examination was normal. Her blood pressure was
21 100/65 mmHg (83rd and 93rd centile for age and height, respectively) and pulse rate was 110 bpm,
22 appropriate for age. She had negative serology for celiac disease, normal creatinine value, no
23 anomalies at hemocrome and urine analyses, no glycemetic disorders and normal IGF-1 levels. Her
24 thyroid hormone profile showed normal TSH levels (3.335 μ IU/ml, normal range 0.450-3.500) with
25 elevated fT3 (7.10 pg/ml, normal range 2.3-4.2) and fT4 levels (2.32 ng/dl, normal range 0.89-
26 1.76). Anti-thyroglobulin antibodies and anti-TSH antibodies were negative, with slightly elevated

4

1 anti-thyropoxidase antibodies (70 IU/ml, normal range 0-60). The same thyroid hormone profile
2 was confirmed at a further determination one month later. Ultrasonographic examination showed no
3 alteration of the thyroid gland. The child underwent a neuropsychiatric evaluation showing normal
4 cognitive development, good speech abilities, adequate attention and concentration power. With the
5 hypothesis being RTH syndrome, a molecular analysis for THRB gene mutation was performed.
6 We identified a novel missense variation in exon 8 in the heterozygous state, for the transition T to
7 A at nucleotide 827 resulting in a Isoleucine to Asparagine substitution at codon 276 (I276N; figure
8 1).

10 *Patient 2*

11 The second patient was the child's mother, a 42-year old woman, who reported during the
12 daughter's evaluation a personal history of altered thyroid function with no previous clear
13 diagnostic definition. From 25-years of age, she reported signs of hyperthyroidism such as
14 tachycardia and high stool frequency, goiter, elevated fT3 and fT4 with normal TSH, increased
15 levels of anti-thyropoxidase and anti-thyroglobulin antibodies with normal anti-TSH antibody
16 levels. A thyroid ultrasound and cytological pattern suggestive for lymphocytic thyroiditis was
17 reported and treated with metimazole for short periods with partial clinical benefits.

18 At the time of her daughter's evaluation at our Pediatric Endocrinology Unit, the mother was not
19 taking any drugs. Her blood pressure was 120/70 mmHg, pulse rate was 125 bpm and regular, body
20 temperature 36.9 °C, weight 70 kg and height 159 cm (body mass index: 27.7 kg/m²). Physical
21 examination revealed a normal thyroid gland volume without palpable nodules and no proptosis.
22 Renal and hepatic function tests, electrolytes, lipid profile, hemocoagulative parameters and
23 electrocardiography were normal. Serum thyroid function tests showed elevated fT3 levels (5.5
24 pg/ml, normal range 2.3-4.2) and slightly elevated fT4 levels (1.90 ng/dl, normal range 0.89-1.76)
25 with an upper normal TSH value (3.470 µIU/mL, normal range 0.450-3.500) and positive anti-
26 thyropoxidase (890 IU/ml, range 0-60) and anti-thyroglobulin antibodies (334 IU/ml, range 0-60).

1 Due to the identification of a novel variation in THRB gene in her daughter, the mother underwent
2 a molecular analysis for THRB gene mutation. The same I276N variation was identified in the
3 mother in the heterozygous state (figure 1).

4

5 **Discussion**

6 RTH is a syndrome characterized by elevated thyroid hormone levels and failure to suppress
7 pituitary TSH secretion with variable refractoriness to hormone action in peripheral tissues resulting
8 in heterogeneous clinical expression, ranging from subclinical to highly symptomatic. Most affected
9 subjects are euthyroid without clinical abnormalities, because RTH is compensated by high thyroid
10 hormone levels. In other patients, signs of thyroid hormone deficiency and excess may coexist
11 depending on the variable degree of involvement and resistance of different tissues (2). The
12 presenting signs from the two patients described herein, confirm the extreme variability of RTH
13 clinical expression. We observed growth retardation from birth in the child and signs of
14 hyperthyroidism such as goiter, tachycardia and diarrhoea, signs which appeared in early adulthood
15 for the mother. A possible explanation for the different phenotype in the child and her mother may
16 be their different age. Indeed, it has been previously reported the presence of a temporal variation in
17 the clinical expression of the same patient, as tissues may change their involvement with time (3,7).
18 Moreover, signs and symptoms may vary in different patients of the same kindred harbouring the
19 same mutation, possibly due to the various levels of expression of wild type and mutant receptors in
20 each person and in each particular tissue (11). In addition, the genetic variability of factors that
21 contribute to the action of thyroid hormone, such as variations in the interactions of the mutant TR
22 with the normal TR-beta, TR-alpha and nuclear stabilization factors (12-14).

23 An infrequent characteristic observed in both the mother and her daughter, was the presence of
24 thyroid-stimulating antibodies. An association of RTH and autoimmune thyroiditis has been
25 previously reported (13,15-25). In a recent report, Chiesa *et al.* described six children from five
26 unrelated families with a molecular diagnosis of RTH and found that thyroid antibodies were

6

1 present initially in two of the subjects and became positive in an additional two subjects during the
2 follow-up (26). Although the association could be coincidental due to the prevalence of
3 autoimmune thyroid disease in the adult population, it is to our knowledge that the presence of
4 thyroid antibodies is extremely rare in children as young as which we have described. In a large
5 cohort of 660 children from iodide-sufficient areas, anti-thyroperoxidase antibodies were found in
6 22 subjects with a median age 12 years, with one being 2 years of age and all the others 7 years or
7 older (27). Moreover, it has been reported that thyroid antibody positivity in children is
8 significantly associated with maternal autoimmunity but its development in girls usually emerges at
9 puberty (28). Therefore, in our patients more than a casual association between RTH and
10 autoimmune thyroiditis may be proposed. Gavin *et al.* (20) suggested that chronic TSH stimulation
11 in RTH activates intra-thyroidal lymphocytes to produce the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha,
12 leading to thyroid cell destruction by binding to its receptors on thyrocytes, or indirectly by
13 potentiating antibody formation or cytotoxic T lymphocyte production. Recently Barkof *et al.* (21)
14 demonstrated a role for autoimmunity in RTH, involving the stimulation of the immune system at
15 the level of TR-alpha.

16 In our two patients, the diagnosis of RTH was supported by the identification of a novel
17 heterozygous variation at residue 276 (I276N) in exon 8 of the *THRB* gene. It is well known that
18 about 90% of RTH patients carry *THRB* gene mutations (29) mainly inherited in an autosomal
19 dominant manner. Most recognized mutations exhibit a dominant-negative effect as the presence of
20 a defective allele interferes with the function of the wild type receptor. Therefore, individuals
21 expressing a single wild type allele due to the deletion of one allele are normal, whereas those
22 expressing a mutant allele have RTH. This explains why inheritance of RTH is dominant when
23 caused by a mutant allele and recessive in subjects with a *THRB* gene deletion (30). Our I276N
24 variation is located in cluster 3 (residue 234–282) of the ligand-binding domain and could impair
25 receptor function indirectly by defective corepressor release (31). Most of the disease-causing
26 mutations are clustered in the ligand-binding domain of the receptor (32) because a dominant-

1 negative effect requires the preservation of DNA-binding and heterodimerization functions in
2 mutant receptors (33). We used bioinformatics tools (SIFT <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>,
3 PolyPhen <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) to predict I276N substitution effects on protein
4 structure and function and it resulted in the possible disruption of the ligand binding domain of the
5 receptor. Its actual RTH-causing role will be assessed in future investigations.
6 In conclusion, an association with an autoimmune thyroid disease may delay a RTH diagnosis.
7 However, RTH has to be suspected every time elevated thyroid hormone levels are found with un-
8 suppressed TSH, even in presence of thyroid antibodies. In such patients, molecular analyses should
9 be performed to identify the presence of THRB gene variations, thus confirming an RTH diagnosis
10 and avoiding useless and potentially harmful treatments.

11

1 **Author Disclosure Statement:**

2 No competing financial interests exist.

3

4 **Corresponding author:**

5 Stefania Moia

6 Via Solaroli 17 – 28100 Novara (Italy)

7 Tel. +39-0321-660647

8 Fax +39-0321-3733598

9 e-mail: stefania.moia@med.unipmn.it

10

1 **References**

- 2 1. Refetoff S, DeWind LT, DeGroot LJ 1967 Familial syndrome combining deaf-mutism,
3 stippled epiphyses, goiter, and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid
4 hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **27**:279–294.
- 5 2. Refetoff S, Weiss R, Usala S 1993 The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr*
6 *Rev* **14**:348–399.
- 7 3. Beck-Peccoz P, Chatterjee VKK 1994 The variable clinical phenotype in thyroid hormone
8 resistance syndrome. *Thyroid* **4**:225–232.
- 9 4. Weiss RE, Refetoff S 2000 Resistance to thyroid hormone. *Rev Endocr Metab Disord* **1**:97–
10 108.
- 11 5. Sakurai A, Takeda K, Ain K, Ceccarelli P, Nakai A, Seino S, Bell GI, Refetoff S, DeGroot
12 LJ 1989 Generalized resistance to thyroid hormone associated with a mutation in the ligand-binding
13 domain of the human thyroid hormone receptor b. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:8977-8981.
- 14 6. Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ 1995 A
15 structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* **378**:690-697.
- 16 7. Refetoff S, Dumitrescu AM 2007 Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone:
17 genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best Pract Res Clin*
18 *Endocrinol Metab* **21**:277-305.
- 19 8. Lam CW, On-Kei Chan A, Tong SF, Shek CC, Cheung Tiu S 2005 DNA-based diagnosis of
20 thyroid hormone resistance syndrome: a novel THRB mutation associated with mild resistance to
21 thyroid hormone. *Clin Chim Acta* **358**:55-59.
- 22 9. Brucker-Davis F, Skarulis MC, Grace MB, Benichou J, Hauser P, Wiggs E, Weintraub BD
23 1995 Genetic and clinical features of 42 kindreds with resistance to thyroid hormone. The National
24 Institutes of Health Prospective Study. *Ann Intern Med* **123**:572-583.
- 25 10. Adams M, Matthews C, Collingwood TN, Tone Y, Beck-Peccoz P, Chatterjee KK 1994
26 Genetic analysis of 29 kindreds with generalized and pituitary resistance to thyroid hormone.

- 1 Identification of thirteen novel mutations in the thyroid hormone receptor beta gene. *J Clin Invest*
2 **94**:506-515.
- 3 11. Mixon AJ, Hauser P, Tennyson G, Renault JC, Bodenner DL, Weintraub BD 1993
4 Differential expression of mutant and normal beta T3 receptor alleles in kindreds with generalized
5 resistance to thyroid hormone. *Clin Invest* **91**:2296-2300.
- 6 12. Hayashi Y, Janssen OE, Weiss RE, Murata Y, Seo H, Refetoff S 1993 The relative
7 expression of mutant and normal thyroid hormone receptor genes in patients with generalized
8 resistance to thyroid hormone determined by estimation of their specific messenger ribonucleic acid
9 products. *Clin Endocrinol Metab* **76**:64-69.
- 10 13. Weiss RE, Marcocci C, Bruno-Bossio G, Refetoff S 1993 Multiple genetic factors in the
11 heterogeneity of thyroid hormone resistance. *Clin Endocrinol Metab* **76**:257-259.
- 12 14. Weiss RE, Weinberg M, Refetoff S 1993 Identical mutations in unrelated families with
13 generalized resistance to thyroid hormone occur in cytosine-guanine-rich areas of the thyroid
14 hormone receptor beta gene. *J Clin Invest* **91**:2408-2415.
- 15 15. Robinson DB, Michaelis RD, Shakir KMM 1993 Autoimmune hypothyroidism in a patient
16 with generalized resistance to thyroid hormone. *South Med J* **86**:1395-1397.
- 17 16. Lamberg BA, Rosengård S, Liwendahl K, Säärinen P, Evered DC 1978 Familial partial
18 peripheral resistance to thyroid hormones. *Acta Endocrinol* **87**:303-312.
- 19 17. Refetoff S, Tunca H, Wilansky DL, Mussey VC, Weiss RE 1996 A mutation in the thyroid
20 hormone receptor (TR) β gene (M313T) not previously reported in two unrelated families with
21 resistance to thyroid hormone (RTH). *Thyroid* **6**:571-573.
- 22 18. Weiss RE, Chyna B, Duell PB, Hayashi Y, Sunthorntheprarakul T, Refetoff S 1994 A new
23 point mutation (C446R) in the thyroid hormone receptor- β gene of a family with resistance to
24 thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **78**:1253-1256.
- 25 19. Kourides IA, Pekonen F, Weintraub BD 1980 Absence of thyroid-binding immunoglobulins
26 in patients with thyrotropin-mediated hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **51**:271-274.

- 1 20. Gavin C, Meggison H, Ooi TC 2008 Proposing a causal link between thyroid hormone
2 resistance and primary autoimmune hypothyroidism. *Med Hypotheses* **70**:1024–1028.
- 3 21. Barkoff MS, Kocherginsky M, Anselmo J, Weiss RE, Refetoff S 2010 Autoimmunity in
4 patients with resistance to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* **95**:3189–3193.
- 5 22. Aksoy DY, Gurlek A, Ringkananont U, Weiss RE, Refetoff S 2005 Resistance to thyroid
6 hormone associated with autoimmune thyroid disease in a Turkish family. *J Endocrinol Invest*
7 **28**:379-383.
- 8 23. Fukata S, Brent GA, Sugawara M 2005 Resistance to thyroid hormone in Hashimoto's
9 thyroiditis. *N Engl J Med* **352**:517–518.
- 10 24. Sato H, Sakai H 2006 A family showing resistance to thyroid hormone associated with
11 chronic thyroiditis and its clinical features: a case report. *Endocr J* **53**:421–425.
- 12 25. Tran HA 2006 Difficulties in diagnosing and managing coexisting primary hypothyroidism
13 and resistance to thyroid hormone. *Endocr Pract* **12**:288–293.
- 14 26. Chiesa A, Olcese MC, Papendieck P, Martinez A, Vieites A, Bengolea S, Targovnik HM,
15 Rivolta CM, Gruñeiro-Papendieck L 2011 Variable clinical presentation and outcome in pediatric
16 patients with resistance to thyroid hormone (RTH). *Endocrine* [Epub ahead of print] PubMed
17 PMID: 21870171.
- 18 27. Kabelitz M, Liesenkötter KP, Stach B, Willgerodt H, Stäblein W, Singendonk W, Jäger-
19 Roman E, Litzenbörger H, Ehnert B, Grüters A 2003 The prevalence of anti-thyroid peroxidase
20 antibodies and autoimmune thyroiditis in children and adolescents in an iodine replete area. *Eur J*
21 *Endocrinol* **148**:301-307.
- 22 28. Kaloumenou I, Mastorakos G, Alevizaki M, Duntas LH, Mantzou E, Ladopoulos C,
23 Antoniou A, Chiotis D, Papassotiriou I, Chrousos GP, Dacou-Voutetakis C 2008 Thyroid
24 autoimmunity in schoolchildren in an area with long-standing iodine sufficiency: correlation with
25 gender, pubertal stage, and maternal thyroid autoimmunity. *Thyroid* **18**:747-754.

- 1 29. Usala SJ, Tennyson GE, Bale AE, Lash RW, Gesundheit N, Wondisford FE, Accili D,
2 Hauser P, Weintraub BD 1990 A base mutation of the C-erbA beta thyroid hormone receptor in a
3 kindred with generalized thyroid hormone resistance. Molecular heterogeneity in two other
4 kindreds. *J Clin Invest* **85**:93–100.
- 5 30. Takeda K, Sakurai A, DeGroot LJ, Refetoff S 1992 Recessive inheritance of thyroid
6 hormone resistance caused by complete deletion of the protein-coding region of the thyroid
7 hormone receptor- β gene. *J Clin Endocrinol Metab* **74**:49–55.
- 8 31. Safer JD, Cohen RN, Hollenberg AN, Wondisford FE 1998 Defective release of corepressor
9 by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid
10 hormone. *J Biol Chem* **273**:30175– 30182.
- 11 32. Collingwood TN, Wagner R, Matthews CH, Clifton-Bligh RJ, Gurnell M, Rajanayagam O,
12 Agostini M, Fletterick RJ, Beck-Peccoz P, Reinhardt W, Binder G, Ranke MB, Hermus A, Hesch
13 RD, Lazarus J, Newrick P, Parfitt V, Raggatt P, de Zegher F, Chatterjee VK 1998 A role for helix 3
14 of the TRbeta ligand-binding domain in coactivator recruitment identified by characterization of a
15 third cluster of mutations in resistance to thyroid hormone. *EMBO J* **17**:4760–4770.
- 16 33. Collingwood TN, Adams M, Tone Y, Chatterjee VKK 1994 Spectrum of transcriptional,
17 dimerization and dominant negative properties of twenty different mutant thyroid hormone b-
18 receptors in thyroid hormone resistance syndrome. *Mol Endocrinol* **8**:1262–1277.
- 19

1 **Figure legend**

- 2 **Figure 1.** Direct sequencing of the THRB gene showing a novel variation 827 T→A at position 276
3 in exon 8. The proband and her mother were heterozygous for the variation.

For Peer Review

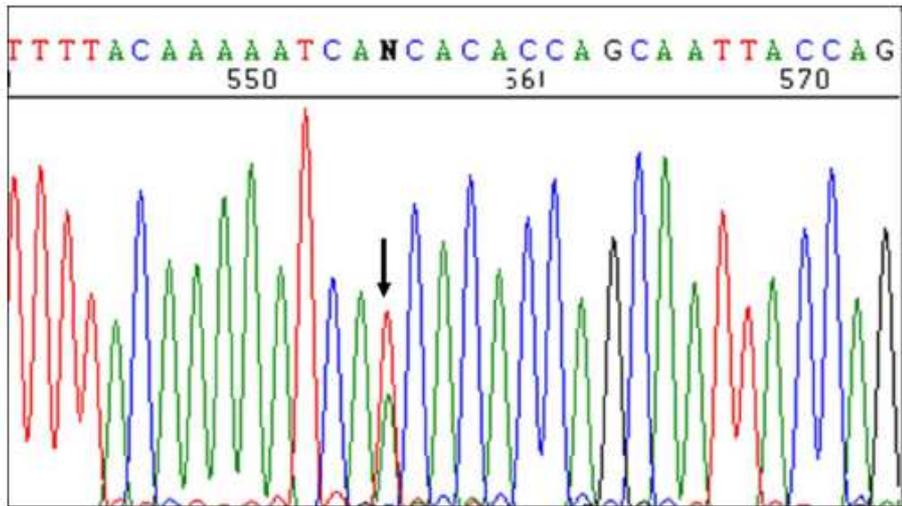


Figure 1. Direct sequencing of the THR8 gene showing a novel variation 827 T→A at position 276 in exon 8. The proband and her mother were heterozygous for the variation.
176x100mm (150 x 150 DPI)

Publicazioni:

- 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Trovato L, Riccomagno S, Prodam F, Genoni G, Walker GE, **Moia S**, Bellone S, Bona G. (2011) Isolated GHD: investigation and implication of JAK/STAT related genes before and after rhGH treatment. *Pituitary*. [Epub ahead of print]

Articoli in corso di pubblicazione:

1) Alice Monzani, **Stefania Moia**, Flavia Prodam, Gillian Elisabeth Walker, Simonetta Bellone, Antonella Petri and Gianni Bona. A novel familial variation of the thyroid hormone receptor beta gene (I276N) associated with resistance to thyroid hormone and autoimmune thyroiditis. *Thyroid* [article submitted]

2) **Stefania Moia**, Michela Godi, Gillian Elisabeth Walker, Stefania Riccomagno, Patrizia Agretti, Massimo Tonacchera, Rosario Berardi, Simonetta Bellone, Flavia Prodam and Gianni Bona. Characterization of a non-sense TSHR gene mutation (W520X) in a child affected by subclinical hypothyroidism [article on writing]