

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Scuola di dottorato di Biotecnologie applicate alle Scienze
Mediche
XXV ciclo



Tesi di dottorato di ricerca

CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEI
MUTANTI DEL RECETTORE PER LA
TIREOTROPINA (TSH)
(MED13)

Giulia Gelmini
Matricola Nr: R08635

Relatore: Chiar.mo Prof. Luca PERSANI
Coordinatore del corso di dottorato: Chiar.mo Prof. Enrico Ginelli

Anno Accademico 2011-2012

A Diego, Lorenzo e Tommaso

Indice

INTRODUZIONE

1. La tiroide	1
1.1 Anatomia e Fisiologia	1
1.2 Sintesi degli ormoni tiroidei	2
1.3 Trasporto e meccanismo d'azione degli ormoni tiroidei	4
1.4 Regolazione della funzione tiroidea	7
2. Patologia della tiroide	9
2.1 Ipertiroidismo	9
2.2 Ipotiroidismo	12
3. Il TSH	15
3.1 Il TSH: chimica e biologia molecolare	15
4. Il TSH recettore	
4.1 Il gene TSHR	17
4.2 Ruolo del TSHR nello sviluppo della tiroide	17
4.3 Struttura primaria del TSHR	19
4.4 Struttura secondaria del TSHR	21
4.4.1 Il dominio Extracellulare	23
4.4.2 Il dominio transmembrana e le anse intra ed extra cellulari	27
4.5 Modificazioni post-traduzionali del TSHR	30
4.6 Meccanismo di attivazione e trasduzione del segnale del TSHR	35
4.7 Desensibilizzazione del recettore	37
4.8 Le Mutazioni a carico del TSHR	40
4.8.1 Mutazioni Loss of Function (LOF)	40

<i>SCOPO DELLO STUDIO</i>	46
----------------------------------	----

MATERIALI E METODI

1. Casi clinici	48
2. Analisi genetica	49
2.1 Estrazione del DNA	49
2.2 Amplificazione genica	49
2.3 DHPLC	52
2.4 Sequenziamento diretto	57
2.4.1 Elettroforesi su gel di agarosio	57
2.4.2 Purificazione da gel	57

2.4.3 Quantizzazione	58
2.4.4 Reazione di sequenza	58
2.4.5 Il sequenziatore e l'analisi delle sequenze	59
3. Studi Funzionali e Molecolari	61
3.1 Mutagenesi	62
3.2 Trasformazione delle cellule batteriche	64
3.3 Subclonaggio	65
3.4 Colture cellulari	66
3.5 Trasfezione con DEAE-destrano	66
3.6 Analisi di citofluorimetria a flusso	68
3.7 Dosaggio radioimmunologico del cAMP	69
3.8 Dosaggio degli IP ₃	72
<i>RISULTATI</i>	
Varianti del gene TSHR	74
Varianti frameshift e introne-esone	78
Variante p. Q33pfsX46	78
Variante intronica g. IVS4+2 A>G	79
Varianti missenso	79
Variante P162L	80
Variante Y466C	82
Variante I583T	84
Variante T607I	86
Variante R609Q	88
Variante intronica g. IVS4+1 T>G	90
Variante L57P	91
Variante P162S	94
Variante S745C	97
Variante P668L	100
<i>DISCUSSIONE e CONCLUSIONI</i>	103
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	111

INTRODUZIONE

1. LA TIROIDE

La **tiroide** è una ghiandola endocrina in grado di secernere e sintetizzare due ormoni quali *tiroxina* (T₄) e *triiodotironina* (T₃) che controllano numerose funzioni metaboliche, agiscono sullo sviluppo del sistema nervoso centrale e consentono l'accrescimento dell'organismo.

1.1 Anatomia e istologia della tiroide

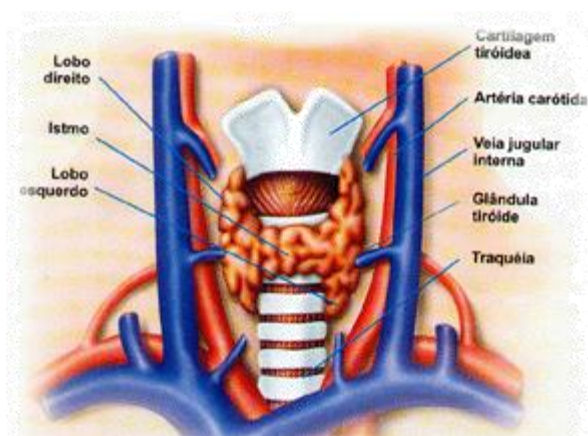


Figura 1 Localizzazione anatomica e vascolarizzazione della tiroide

La tiroide è costituita da due *lobi* connessi da un *istmo* ed è situata nel collo tra il secondo e il terzo anello tracheale, posteriormente ai muscoli sternoioideo e sternotiroideo, e inferiormente alla cartilagine tiroidea.

La vascolarizzazione è sostenuta dalle arterie tiroidee superiori ed inferiori originate dalla carotide interna e dalla succlavia, mentre il drenaggio venoso confluisce nelle vene giugulari interne e succlavie (Fig.1).

Entrambe le branche del sistema nervoso autonomo, ortosimpatica e parasimpatica, innervano la tiroide mediante terminazioni nervose distribuite sulle pareti vasali. Una sottile capsula fibrosa ricca di fibre elastiche riveste la tiroide e la suddivide in *lobuli* di dimensioni irregolari a loro volta costituiti da *follicoli*, strutture sferoidali di dimensioni variabili.

I follicoli rappresentano l'unità funzionale della tiroide e sono formati da un monostrato di *tireociti* (o cellule follicolari) che delimitano una cavità centrale. Il lume follicolare contiene una sostanza gelatinosa, *la colloide*, che è costituita principalmente da tireoglobulina (Tg) secreta dalle cellule tiroidee. La Tg è una glicoproteina caratterizzata dalla presenza di residui tirosinici che possono venir iodati dopo ossidazione dello ioduro e condensati a formare gli ormoni tiroidei.

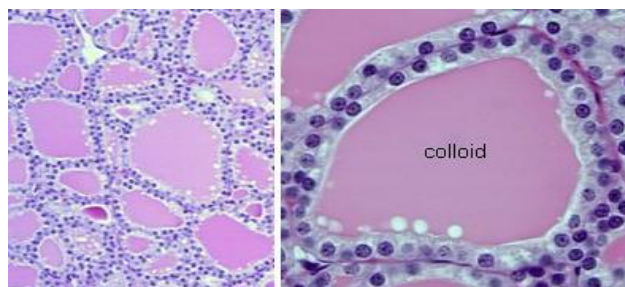


Figura 2 Istologia del follicolo tiroideo

I tireociti sono cellule con netta polarità: il polo basale è adagiato sulla membrana basale, mentre il polo apicale delimita il lume follicolare in maniera irregolare per la presenza di numerosi microvilli. La stimolazione alla secrezione di ormoni tiroidei induce variazioni nella forma e nell'attività dei tireociti: dalla forma appiattita tipica della cellula quiescente, viene assunto un aspetto colonnare e dalla membrana apicale si dipartono estroflessioni pseudopodiche che inglobano la colloide permettendone il riassorbimento tramite pinocitosi. Adiacenti alle cellule follicolari, vi sono rare *cellule parafollicolari* o *cellule C* che secernono *calcitonina*.

1.2 Sintesi degli ormoni tiroidei

La sintesi degli ormoni tiroidei è scandita in tre fasi.

- **Captazione dello iodio.** La captazione di iodio dal plasma mediata da cellule tiroidee follicolari è il primo passo della sintesi di ormoni tiroidei. L'assorbimento di iodio avviene attraverso un meccanismo di trasporto attivo guidato da un gradiente elettrochimico di sodio e mediato dalla proteina **NIS**, che si trova nella membrana basolaterale delle cellule follicolari. Come risultato di questo trasporto attivo la concentrazione di ioduro nei tireociti aumenta di 20 a 50 volte rispetto al plasma. (Fig. 3)
- **Sintesi della tireoglobulina.** La Tg sintetizzata nel reticolo endoplasmico viene trasferita nell'apparato di Golgi dove viene glicosilata, indi immagazzinata in vescicole esocitotiche e liberata nella cavità del follicolo. Sulla membrana apicale

della cellula, dove è pervenuto lo iodio, avvengono l'organificazione dello ioduro e la condensazione delle iodotirosine.

- **Organificazione dello ioduro e condensazione delle iodotirosine.** Tale processo prevede numerose reazioni catalizzate dall'ossidasi tiroidea (TPO). La TPO è un enzima contenente un gruppo *eme* grazie al quale ossida lo iodio captato dalle cellule follicolari. Lo iodio così attivato sostituisce l'idrogeno in posizione 3 o in posizione 3 e 5 dell'anello fenolico della tirosina, dando luogo alla formazione rispettivamente di monoiodotirosina (MIT) o diiodotirosina (DIT). La conseguente condensazione, sempre catalizzata da TPO, di una molecola di MIT con una di DIT determina la formazione di 3,5,3'-triiodotironina (T_3), mentre la condensazione di due molecole di DIT determina la formazione di 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina, T_4).

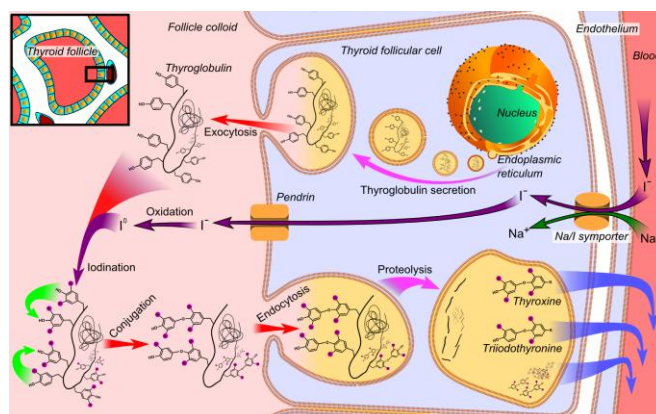


Figura 3 Pathway di sintesi degli ormoni tiroidei

1.3 Trasporto e meccanismo d'azione degli ormoni tiroidei

La T_3 e la T_4 sono secrete in seguito all'idrolisi della Tg e veicolate dagli organi bersaglio. La T_4 presente in circolo deriva esclusivamente dalla tiroide, mentre la maggior parte della T_3 circolante è di origine extratiroidea, derivando dalla desiodazione della T_4 nei tessuti periferici. Nel plasma i due ormoni circolano in gran parte legate a proteine di trasporto degli ormoni tiroidei: la **TBG**, una globulina specifica (*Thyroid Hormone Binding globulin*), la **TBPA** (*thyroxin binding prealbumin*) e l'**albumina**. La TBG è una glicoproteina presente in quantità scarse nel plasma e ha un unico sito di legame per la T_4 o per la T_3 ma presenta un alto grado di affinità per entrambe gli ormoni. La TBPA è presente in concentrazioni medie, non lega in maniera apprezzabile la T_3 , mentre lega circa il 15% della T_4 per la quale ha una bassa affinità. L'albumina ha una scarsa affinità per gli ormoni tiroidei e nonostante ciò lega circa il 40% della concentrazione totale di T_3 e T_4 . Il legame tra ormone e proteina di trasporto avviene secondo la legge di azione di massa e in quanto tale è reversibile. Ne deriva che un aumento delle proteine di trasporto determina all'inizio una diminuzione transitoria della quota libera, e in seguito, da una fase di ripristino dei suoi livelli originari. Solo la frazione libera degli ormoni tiroidei è biologicamente attiva in quanto può penetrare nella cellula bersaglio. La T_4 libera, previa desiodazione a T_3 , oppure direttamente la T_3 libera, interagendo con il recettore nucleare esplicano il loro effetto biologico e vengono quindi metabolizzate.

Benché gli ormoni tiroidei siano altamente liposolubili, il loro passaggio nel compartimento citoplasmatico della cellula bersaglio avviene con un

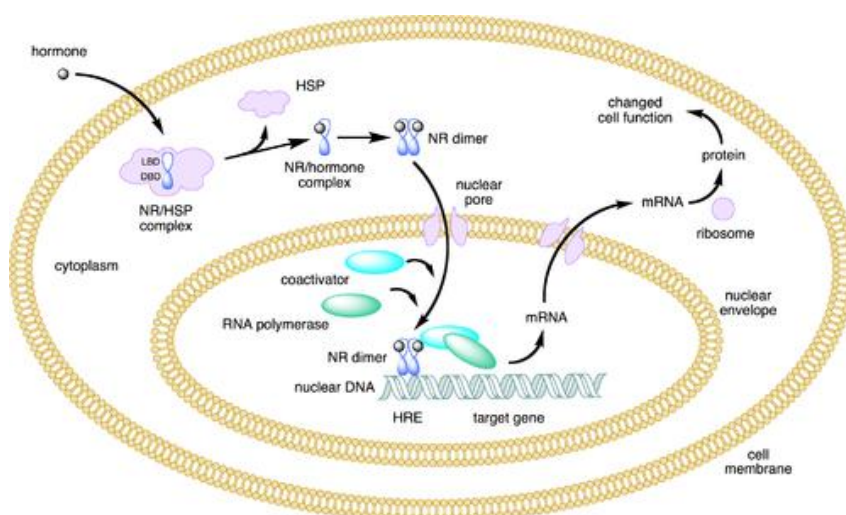


Figura 4 Endocitosi degli ormoni tiroidei e interazione con i recettori nucleari

meccanismo probabilmente più complesso della semplice diffusione. L'effetto biologico degli

ormoni tiroidei è mediato dall'attivazione di un recettore nucleare con affinità per la T_3 . Nell'uomo esistono due geni, posti in cromosomi diversi, che codificano due classi differenti di recettori nucleari (α e β) che includono almeno quattro tipi di isorecettori. Gli isorecettori $\alpha 1$ e $\beta 1$ legano la T_3 con alta affinità. I meccanismi attraverso i quali il complesso T_3 -recettore nucleare modula la trascrizione genica sono solo in parte sconosciuti. In generale, i recettori nucleari appartengono ad una superfamiglia di piccole proteine costituita da tre principali domini cellulari localizzati in tratti distinti della catena proteica. La sequenza centrale, che è altamente conservata in tutti i recettori nucleari, è deputata al legame con il DNA (DNA *binding domain*). Questa regione è ricca di cisteine che costituiscono due formazioni digitiformi ciascuna stabilizzata da un atomo zinco, gli *zinc fingers*, necessari a riconoscere le sequenze di DNA specifiche per l'attivazione dei geni regolati (*hormone response elements, HRE*) e a stabilizzarne il legame. La regione C-terminale che è responsabile del legame con l'ormone (*hormone binding domain*) contiene molti aminoacidi idrofobici che nella conformazione terziaria formano una tasca idrofobica in cui si impegna l'ormone. La regione N-terminale, che dimostra un basso grado di omologia e viene quindi definita come ipervariabile, sembra essere principalmente coinvolta nell'attivazione dei meccanismi di trascrizione. In seguito a presentazione dell'ormone glicoproteico, i recettori nucleari tendono a dimerizzare legandosi ad un singolo *HRE* (Fig. 4). Le sequenze specifiche del DNA che costituiscono le HRE sono generalmente localizzate su segmenti che precedono dal lato 5' il promotore della RNA polimerasi del gene inducibile dagli ormoni. Queste sequenze vengono considerate enhancers in quanto in grado di aumentare l'attività trascrizionale del gene in questione.

Gli ormoni tiroidei intervengono quindi generando

- *effetti sullo sviluppo neuronale e scheletrico fetale*: sebbene gli ormoni tiroidei siano in grado di attraversare la barriera placentare mediante i trasportatori MCT8 e MCT10 (Loubière, 2010), la tiroide fetale deve provvedere alla sintesi degli ormoni stessi per un corretto bilancio ormonale. Questo processo inizia sin dalla 11^a settimana di gestazione. Il difetto di T_3 nella vita fetale porta al quadro di cretinismo;
- *effetti sul consumo di ossigeno*: il livello di ossigeno a riposo è aumentato in presenza di elevati livelli di ormoni tiroidei e viceversa;

- *effetti sul sistema cardiovascolare*: gli ormoni tiroidei hanno un effetto cronotropo e inotropo sul cuore. Questo fenomeno può in parte essere attribuito al fatto che alti livelli di ormoni provocano un aumento dei recettori β -adrenergici nel muscolo cardiaco;
- *effetti emopoietici*: gli ormoni tiroidei causano un aumento dell'eritropoiesi probabilmente collegato all'aumento del consumo di ossigeno;
- *effetti sul sistema endocrino*: in carenza di ormoni tiroidei si assiste ad un aumento dei livelli di prolattina e una ridotta risposta al GH. Altresì un aumento di ormoni tiroidei causa in generale un aumento del metabolismo e un aumento della clearance di ormoni in generale e di farmaci;
- *effetti sull'osso e sul muscolo*: gli ormoni tiroidei hanno un ruolo di stimolo sul turnover del tessuto osseo.

1.4 Regolazione della funzione tiroidea

Sintesi e secrezione degli ormoni tiroidei sono regolate da *fattori extratiroidei* che agiscono

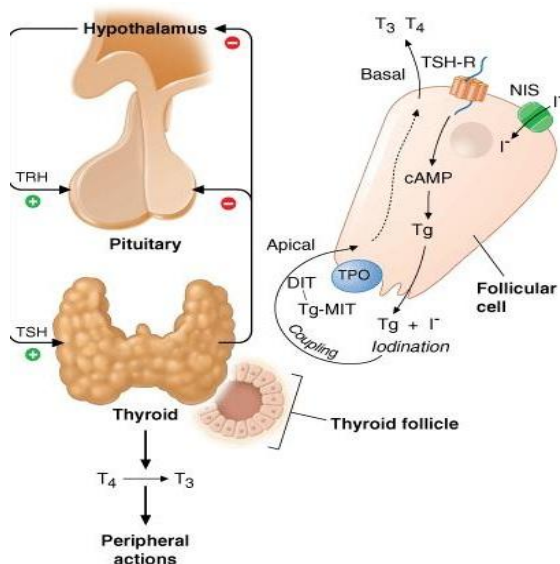


Figura 5 Asse ipotalamo-ipofisi-tiroide

sui processi secondo un meccanismo a *feedback- negativo* e *fattori intratiroidei* di autoregolazione dipendenti dall'apporto iodico.

- *Asse ipotalamo-ipofisi*

Il sistema nervoso e il sistema endocrino sono strettamente interconnessi: numerose funzioni endocrine sono regolate dal sistema nervoso che a sua volta è influenzato dall'attività di numerosi ormoni. Sia la cellula nervosa che

quella endocrina producono numerosi messaggeri chimici che generano risposte biologiche da parte di cellule bersaglio. Le influenze del sistema nervoso sulle funzioni endocrine sono esercitate anche dalle innervazioni anatomiche delle singole ghiandole endocrine ma la più importante area di interconnessione tra sistema nervoso e sistema endocrino è costituito dal sottosistema *ipotalamo-ipofisi* (Fig.5). La riduzione degli ormoni tiroidei in circolo determina un aumento mediato da *tireoliberina* (TRH), prodotto dall'ipotalamo, di tirotropina (TSH), prodotto dall'ipofisi e il loro aumento causa la soppressione della secrezione di quest'ultimo. La retroazione si svolge tanto a livello delle cellule tireotrope da parte della T_3 generata localmente dalla T_4 , quanto a livello dei neuroni parvi-cellulari del nucleo paraventricolare secernenti TRH. Nelle cellule tiroidee il TSH svolge, con un meccanismo cAMP/IP3-mediato, un ampio spettro di azioni che convergono nel determinare un aumento della secrezione di ormoni tiroidei. Il TSH, inoltre, modifica il trasporto di iodio in maniera bifasica. In una prima fase determina una diminuzione della captazione con una riduzione del rapporto iodico tiroide/siero probabilmente secondaria ad un aumentato efflusso di iodio. Successivamente il trasporto iodico e, di conseguenza il rapporto iodico tiroide/siero, aumentano. Il TSH stimola

l'incorporazione dello iodio nei residui tirosinici della Tg in quanto aumenta la produzione di H_2O_2 . Inoltre, il TSH stimola l'esocitosi della Tg nel lume follicolare, la formazione di pseudopodi al polo apicale dei tireociti, l'endocitosi della colloide e quindi la secrezione di ormoni tiroidei.

- *Meccanismi di autoregolazione*

La tiroide è in grado di regolare la captazione dello iodio e la sintesi di ormoni tiroidei con meccanismi intratiroidei, indipendenti dal controllo ipofisario. Questi meccanismi di autoregolazione vengono generalmente attivati da modificazione, in eccesso o in difetto, dell'apporto iodico. Se la concentrazione intratiroidea dello iodio inorganico supera una determinata soglia, si determina un blocco dell'organificazione dello iodio e della sintesi ormonale. La tiroide normale è in grado di sottrarsi rapidamente a questo blocco, grazie ad un fenomeno di autoregolazione con il quale viene inibito il trasporto dello iodio, quando presente in eccesso. Benché in questo modo venga ridotta la captazione di iodio dal compartimento extracellulare, questo meccanismo garantisce la funzione ormonosintetica nonostante il carico iodico.

2. ***PATOLOGIA DELLA TIROIDE***

Le malattie della tiroide comprendono sia patologie benigne, che dal punto di vista funzionale sono riconducibili a forme normo- ipo- e iperfunzionanti (a seconda della quantità di ormoni tiroidei prodotti), sia patologie infiammatorie e patologie neoplastiche.

2.1 ***L'ipertiroidismo***

Con il termine di **ipertiroidismo** si intende una situazione clinica caratterizzata da un aumento di ormoni tiroidei T_3 e T_4 in circolo. Poiché gli ormoni tiroidei sono i principali regolatori del metabolismo, questa condizione determina un aumento di molte reazioni metaboliche. Uno degli effetti primari negli ipertiroidici è la stimolazione della *calorigenesi*, come aumento del metabolismo basale. A livello del mitocondrio, arrivano $NADH^+$ e $FADH_2$, che devono essere riossidati per poter essere nuovamente utilizzati. La riossidazione degli enzimi avviene con il trasporto di elettroni che prevede il passaggio di cariche negative (elettroni) dal $NADH^+$ fino all'ossigeno O_2 che viene ridotto a O^- con formazione di acqua, che rilasciata promuove la generazione di energia sotto forma di ATP. L'accumulo di T_3 e T_4 per iper-produzione comporta che si attivi l'attività disaccoppiante di questi ultimi. Quest'evento porta alla produzione di una proteina che si chiama *termogenina*, la quale forma un canale che fa rientrare i protoni nella matrice mitocondriale, così che l'energia liberata non è convertita in ATP ma dissipata sotto forma di calore.

I sintomi comuni della patologia ipertiroidica includono perdita di peso, nervosismo, irritabilità, intolleranza ai climi caldi, eccessiva sudorazione, tremori e debolezza muscolare. Altri segni includono tachicardia, palpitazioni, ipereccitabilità emozionale, apprensione, insonnia, perdita di grasso e di massa muscolare, aumento di volume della tiroide (gozzo), perdita di capelli e amenorrea. Circa il 50% dei pazienti presenta oftalmopatia.

L'ipertiroidismo può avere diverse cause di cui le più frequenti sono:

- **Morbo di Basedow**, è una malattia autoimmune, cioè causata da autoanticorpi rivolti contro i recettori del TSH. Questi causano una continua stimolazione della tiroide a produrre ormoni. La tiroide, inoltre, non è soltanto l'organo bersaglio, ma è

sede di cloni linfocitari helper/inducer capaci di stimolare la produzione, da parte dei linfociti B e dei macrofagi, di anticorpi stimolanti il TSHR.

- **Gozzo nodulare tossico** può essere *uni* o *plurinodulare*. Il primo, detto anche *Morbo di Plummer*, è dovuto ad un adenoma della tiroide che produce ormoni tiroidei in maniera svincolata dal normale controllo ipotalamico-ipofisario, determinando spesso l'inibizione funzionale del restante parenchima tiroideo che a questo controllo continua ad essere soggetto. E' fornito di una propria capsula relativamente spessa e ben definita e circondata da parenchima tiroideo normale. Alla scintigrafia si presenta come un nodulo unico, "caldo", cioè con un'elevata captazione di ormoni.

Nel *gozzo tossico plurinodulare* invece il nodulo iperfunzionante è uno dei tanti noduli di iperplasia presenti all'interno della tiroide che, inizialmente normofunzionante, si svincola dal controllo ipotalamo-ipofisario cominciando a produrre ormoni tiroidei in quantità eccessiva. Il nodulo non è fornito di una capsula propria ma di una pseudocapsula ed alla scintigrafia appare anch'esso come un nodulo "caldo", ma insieme ad altri noduli "freddi" o normocaptanti.

Tra le cause meno frequenti di ipotiroidismo si elencano:

- **adenoma ipofisario TSH secernente;**
- **carcinomi tiroidei;**
- **mola idatiforme;**
- **resistenza ipofisaria agli ormoni tiroidei;**
- **somministrazione esogena di ormoni tiroidei;**
- **struma ovarii;**
- **tiroidite di Hashimoto:** è una delle patologie tiroidee più diffuse al mondo, soprattutto in quelle aree in cui l'apporto iodico è particolarmente elevato. È più comune nel sesso femminile e la sua incidenza aumenta all'aumentare dell'età. La tiroidite di Hashimoto è una patologia autoimmune. Questa forma di tiroidite tende a evolvere verso l'ipotiroidismo. La sintomatologia di tale patologia è caratterizzata da una certa variabilità che è legata all'evoluzione clinica della malattia, all'età in cui essa insorge e all'eventuale contemporanea presenza di altre patologie;
- **tiroidite subacuta** (tiroidite di De Quervain) e un'inflammatione della ghiandola tiroidea di probabile origine virale. L'inflammatione provoca un eccesso di ormoni

tiroidei in circolo e si manifesta con i sintomi propri dell'ipertiroidismo; le manifestazioni sono comunque lievi e di breve durata. La tiroide è lievemente ingrandita e dolente. Alla fase di tireotossicosi spesso subentra una temporanea condizione di ipotiroidismo;

- ***ipertiroidismo gestazionale*** (1-3% delle gravidanze): associato a soppressione dell'ormone TSH ed aumento della concentrazione FT4. Questo quadro clinico risulta essere limitato alla prima metà della gravidanza, in assenza di autoimmunità tiroidea. Tale condizione è dovuta all'effetto degli elevati livelli di *gonadotropina corionica* (hCG) stimolano la tiroide legandosi al recettore per il TSH posto sulla membrana dei tireociti. In seguito alla riduzione dell'ormone hCG, che si verifica mediamente intorno alla 20^a settimana di gestazione, il soggetto reverte alla condizione eutiroidea;
- ***tiroidite post-partum*** è stata descritta la prima volta nel 1948. È una forma di tiroidite le cui cause sono tuttora sconosciute. Molti autori ipotizzano che possa trattarsi di una variante di tiroidite di tipo autoimmune. Questo tipo di tiroidite si manifesta nei primi dodici mesi dopo il parto in donne eutiroidee durante il periodo della gravidanza. Tipicamente il decorso della tiroidite post-partum si caratterizza per una fase di ipertiroidismo seguita da una fase di ipotiroidismo. Il ritorno allo stato eutiroideo avviene entro un anno dal parto.

2.2 L'ipotiroidismo

È una sindrome clinica dovuta ad un'insufficiente azione degli ormoni tiroidei a livello tissutale e determina un rallentamento di tutti i processi metabolici. L'ipotiroidismo che si sviluppa durante la vita fetale e/o neonatale, determina una riduzione importante e spesso permanente dei processi accrescitivi e di sviluppo neurologico, mentre l'ipotiroidismo nell'adulto, che ha una frequenza elevata (20.6-20.8%), con maggior frequenza nel sesso femminile, nell'età avanzata e, nella maggior parte dei casi, è conseguente alla patologia autoimmune, determina un rallentamento generalizzato dei processi metabolici.

Si possono identificare tre forme principali di ipotiroidismo:

- ❖ **ipotiroidismo primitivo** è caratterizzato da una ridotta massa e/o funzione del tessuto tiroideo. Si distingue in :
 - ✓ **ipotiroidismo primitivo congenito**: è una patologia permanente ed è dovuta ad anomalie nello sviluppo della ghiandola tiroidea (disgenesia o agenesia) oppure ad una ormonogenesi tiroidea insufficiente. Meno comunemente, l'alterata funzionalità tiroidea neonatale è transiente, essendo dovuta al passaggio di farmaci assunti durante la gravidanza dalla madre al feto, al passaggio transplacentare di anticorpi bloccanti anti-TSHR oppure alla carenza o all'eccesso di iodio. Raramente, l'ipotiroidismo congenito deriva da anomalie pituitarie o ipotalamiche (ipotiroidismo centrale o secondario e terziario).(*Gruters, 2003; Persani, 2011,2012*).

Nonostante l'importanza critica degli ormoni tiroidei per lo sviluppo di numerosi organi e sistemi, in particolare il sistema nervoso, molti neonati ipotiroidei appaiono normali alla nascita, grazie all'apporto di ormoni materni avvenuto durante la gestazione e all'efficiente accumulo di T₄ e conversione in T₃ nel tessuto nervoso. Questo permette, a patto di istituire rapidamente un'opportuna terapia, lo sviluppo pressochè normale delle funzioni cognitive del neonato. Tuttavia, in caso di ipotiroidismo sia materno sia fetale lo sviluppo neuronale è irrimediabilmente compromesso, nonostante il ricorso tempestivo alla terapia (*Update of Newborn Screening and Therapy for Congenital Hypothyroidism, Pediatrics, 2006*).

L'ipotiroidismo congenito ha un'incidenza pari a un caso ogni 6000 – 8000 nati vivi (Corbetta, 2008; Persani, 2012) e le cause possono essere molteplici:

- Passaggio transplacentare di anticorpi materni antitiroide (5%)
- Disormonogenesi (10%)
- Disgenesia della Tiroide, comprendente l'(emi)agenesia, la presenza di tessuto tiroideo ectopico, l'ipoplasia (85%).

✓ *ipotiroidismo primitivo acquisito* in cui la ridotta massa e/o funzione ghiandolare può dipendere da processi autoimmuni come nella ***tiroidite di Hashimoto***, caratterizzata morfologicamente da una cronica infiltrazione linfocitaria che genera un gozzo diffuso e da frequente evoluzione verso l'ipotiroidismo. La positività degli autoanticorpi circolanti, anti-tireoperossidasi (anti-TPO) e anti-tireoglobulina (anti-TG), sottende la patogenesi autoimmune e, al tempo stesso, ha un fondamentale significato diagnostico. I meccanismi del danno d'organo sono complessi e comprendono la partecipazione dell'immunità umorale e di quella cellulo-mediata. La seconda variante morfologica e clinica dell'ipotiroidismo primitivo acquisito è il ***mixedema idiopatico***, che si manifesta con ipotiroidismo conclamato, in assenza di gozzo, con anticorpi che possono essere anche negativi. L'ipotiroidismo infine può derivare da una grave carenza dell'apporto iodico con l'alimentazione e si associa quindi a gozzo per iperplasia compensatoria della ghiandola secondaria all'iperstimolazione tireotropinica.

❖ ***Ipotiroidismo centrale*** relativo ad un'insufficiente stimolazione della ghiandola tiroidea, intrinsecamente normale, da parte del TSH. Questo deficit comprende sia il deficit di TSH da lesione ipofisaria (definito anche ***ipotiroidismo secondario***) sia quello da disregolazione ipotalamica (definito anche ***ipotiroidismo terziario***). In entrambe le condizioni sono compresi casi nei quali l'ipotiroidismo è dovuto alla secrezione di TSH con ridotta attività biologica, per la presenza di mutazioni puntiformi della β -subunità del TSH che ne impediscono l'assemblaggio con l' α -subunità o il suo legame al recettore.

❖ **Resistenza al TSH** : è una malattia genetica caratterizzata da un'elevata concentrazione di TSH nel siero e una normale o ridotta concentrazione di ormoni tiroidei che sono associati a ghiandola in sede con dimensioni normali o leggermente ridotte e in assenza di autoanticorpi (Refetoff, 2003. Beck-Peccoz et al, 2006a, b, Persani, 2010). Questa condizione individuata per la prima volta più di 40 anni fa in un paziente affetto da ipotiroidismo congenito con volume tiroideo normale ed un'assenza di captazione tiroidea di iodio¹²¹ dopo somministrazione esogena di TSH (Stanbury., 1968). La resistenza al TSH è generalmente dovuta a mutazioni nel TSHR che risultano parzialmente o completamente inattivanti.

Grado di resistenza	Alleli mutanti	Trasmissione	Livello di TSH	Livello di T4-Libera	Morfologia della tiroide
Completo	Due	Recessiva	↑↑↑	Basso	Ipoplasia severa
Parziale (Moderata)	Uno	Recessiva	↑↑	Normale	Ipoplasia lieve-Normale
Parziale (Lieve)	Uno	Dominante	↑	Normale	Normale

Tabella 1. Le mutazioni inattivanti del TSHR sono associate a diversi fenotipi clinici e biochimici, a seconda del grado di compromissione della funzione recettoriale (riprodotto da Beck-Peccoz, 2006)

Questa condizione è caratterizzata da un ampio spettro di alterazioni biochimiche, cliniche e morfologiche, la cui entità è determinata, oltre che dalla natura della mutazione e dai suoi effetti sulla funzionalità del recettore, anche dalla condizione di omozigosi o eterozigosi (Beck-Peccoz, 2006, tabella 1; Persani, 2010). La resistenza al TSH può essere distinta in *resistenza completa* in cui la refrattarietà della ghiandola tiroidea all'azione TSH può essere associata ad una ridotta produzione degli ormoni tiroidei e una ridotta crescita, e *resistenza parziale* quando la sensibilità del tessuto tiroideo al TSH stimolazione è parzialmente conservato in quanto l'aumento dei livelli di TSH può compensare il difetto del recettore.

3. Il TSH

La storia del TSH inizia quando nel 1926 Eduard Uhlenthuth dimostrò che la parte anteriore della ghiandola pituitaria era in grado di secernere una molecola in grado di stimolare l'attività tiroidea (Uhlenthuth, 1927).

Nei primi anni '70 la determinazione della struttura primaria delle subunità dell'ormone glicoproteico (Manger., 1990; Persani, 1991) e il clonaggio dei geni codificanti rispettivamente per la subunità α e β hanno permesso di studiare l'espressione, la regolazione e l'attività della tireotropina (Wondisford., 1988). Dopo aver identificato tramite cristallografia un'omologia con l'ormone hCG (Wu., 1994), si è constatato che il TSH espleta il suo effetto biologico legandosi ad una proteina posta sulla membrana plasmatica dei tireociti: il *TSH recettore* (Pastan., 1966).

3.1 TSH: chimica e biologia molecolare

TSH è una glicoproteina di 28 aminoacidi (30-kDa) sintetizzata e secreta dalle cellule tirotrope dell'ipofisi anteriore. Appartiene alla superfamiglia degli ormoni glicoproteici (GpH) eterodimerici costituiti da una comune α -subunità e una β -subunità che conferisce specificità all'ormone stesso. Fanno parte di questa famiglia anche l'ormone follicolo-stimolante (FSH), l'LH e l'hCG (Pierce., 1991).

L' α -subunità e la β -subunità sono codificate da geni localizzati rispettivamente sul cromosoma 6 e 1 (Dracopoli, 1986).

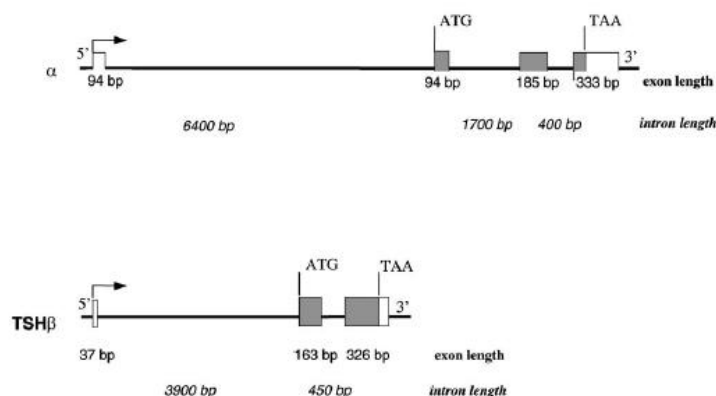


Figura 6 Geni codificanti TSH α e TSH β

Il gene codificante per l' α -subunità è costituito da 4 esoni e 3 introni ed è lungo 9.4 Kb mentre il gene codificante la β -subunità è costituito da 3 esoni e 2 introni e risulta essere circa la metà di quello codificante la subunità comune (4.9 Kb). Il primo esone è breve in entrambi i casi, non viene tradotto ed è separato dalla regione codificante da introne molto grande (Fig 6).

A differenza dell' α -subunità che presenta un'espressione più generale essendo comune a diversi ormoni glicoproteici, la β -subunità presenta un'espressione specifica solo al livello dell'ipofisi anteriore .

4. IL TSH RECETTORE

4.1 Il gene TSHR

Sfruttando l'elevata omologia tra i domini trans membrana dei GpHR, è stato possibile clonare il gene codificante per il TSHR nel 1989 (*Nagayama, 1991*). Il gene del TSHR è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 14 (14q31) (*Libert, 1992*), si estende per oltre 60 Kb ed è costituito da 10 esoni (*Gross, 1991*). Il gene codifica per una proteina costituita da 764 aminoacidi, costituita da un peptide segnale di 21 residui aminoacidici, un dominio extracellulare glicosilato formato da 394 residui e un dominio composto da 349 residui che costituiscono la porzione a sette domini trans membrana (7TMD), tipica dei GPCR (G protein coupled receptor), ed una corta coda citoplasmatica.

La struttura del gene è in stretta correlazione con quella della proteina: il dominio extracellulare, che costituisce la metà N-terminale del recettore, è codificato dai primi nove esoni, ciascuno dei quali codifica per uno o per un numero intero di motivi. La metà C-terminale del recettore, invece, contenente l'intero dominio trans membrana e la coda citoplasmatica, è codificata interamente dal decimo esone. Quest'ultimo sembra derivare da una vasta porzione priva di introni del gene codificante per gli altri GPCR. Da questa osservazione nasce l'ipotesi secondo la quale un gene codificante per l'antenato comune dei recettori per gli ormoni glicoproteici ipofisari sia stato originato dalla fusione di un gene, privo di introni, fortemente correlato agli altri GPCR, con un gene appartenente alla famiglia dei geni codificanti per proteine ricche di motivi a leucina. In seguito i geni di TSHR, LH/hCGR ed FSHR sarebbero risultati dalla triplicazione dell'antenato comune, seguita dalla dispersione su cromosomi differenti e dalla ulteriore evoluzione (*Gross, 1991*).

L'espressione del gene del TSHR non è limitata esclusivamente alla tiroide: il mRNA e/o la proteina stessa sono stati individuati in numerosi tessuti e cellule (Tab. 2) quali linfociti, adipociti, fibroblasti retrooculari, cellule neuronali ed astrociti (*Crisanti, 2001; Mengistu, 1994; Davies, 2005*), tuttavia il significato fisiologico o patofisiologico di tale espressione extratiroidea non è ancora chiaro, benchè alcuni studi suggeriscano la possibilità di un ruolo

di regolazione autocrina o paracrina del TSH sui linfociti (Davies, 1994) e un'azione di controllo negativo sulla formazione di osteoblasti ed osteoclasti.

Tessuto	Livello del mRNA	Livello della Proteina
Linfociti	+	+
Timo	+	+
Ipofisi	+	+
Testicolo	+	+
Rene	+	N.R.
Cervello	+	+
Adipociti e fibroblasti	+	+
Osso	+	+

Tabella 2 Espressione extratiroidea del gene TSHR (Davies, 2005)

4.2 Ruolo del TSHR nello sviluppo della tiroide

La formazione della ghiandola tiroidea fetale comincia durante il periodo compreso tra la settima e la nona settimana di gravidanza, per concludersi alla dodicesima.

Le cellule follicolari provengono da un gruppo di cellule endodermiche appartenenti al pavimento della faringe primitiva (*De Felice 2004*), mentre le cellule parafollicolari derivano dalla cresta neurale dei corpi ultimobranchiali. Entrambe queste popolazioni cellulari migrano dalle loro posizioni iniziali alla propria sede definitiva davanti alla trachea, dove, in seguito ai processi di proliferazione dei precursori, differenziamento e ulteriore proliferazione delle cellule differenziate andranno a costituire la ghiandola tiroidea definitiva. Ciascuno di questi processi è contraddistinto e guidato dall'espressione di diversi geni (fig. 7).

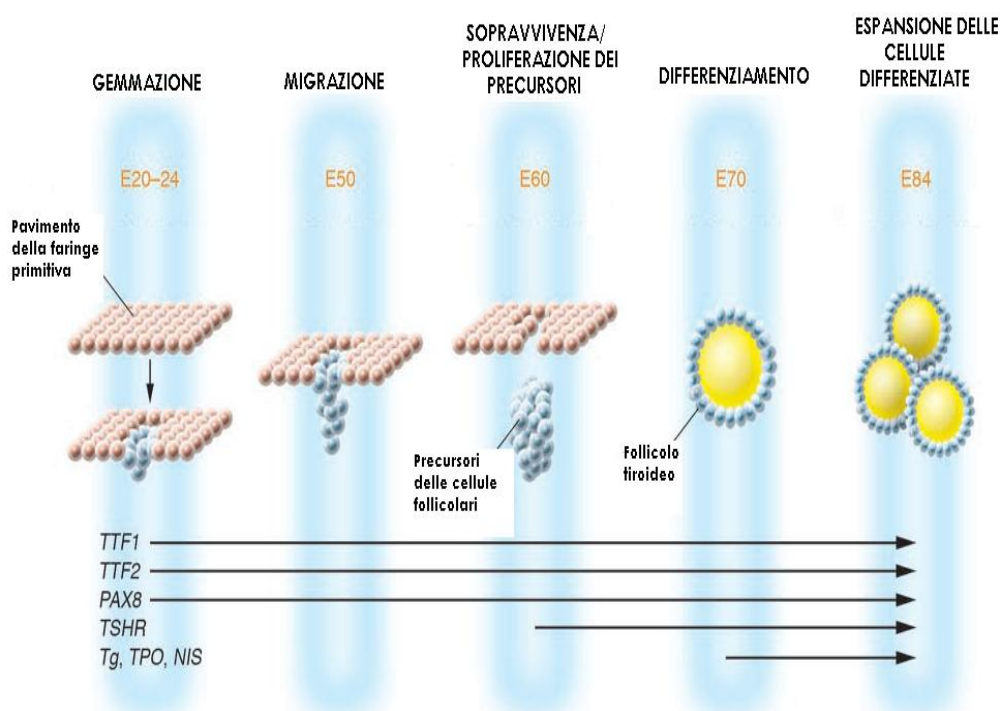


Figura 7 Tappe della tiroidogenesi. Tra i giorni E20-24 i progenitori delle cellule follicolari cominciano a separarsi dal pavimento della faringe primitiva (gemmazione) ed esprimono i fattori di trascrizione PAX8 – necessario per l'attivazione del promotore dei geni per TPO (Tireoperossidasi), Tg (Tireoglobulina) e NIS (Na-I synporter); TTF1 e TTF2 –fattori di trascrizione responsabili della morfogenesi tiroidea ed il mantenimento del differenziamento. In E50 i precursori iniziano la migrazione verso la sede definitiva. A partire da E60, i precursori delle cellule follicolari esprimono il TSHR, necessario alla sopravvivenza, al differenziamento ed alla proliferazione cellulare. Le proteine necessarie per la sintesi ormonale Tg, TPO e NIS vengono sintetizzate, a partire da E70, dalle cellule tiroidee differenziate. (Van Vliet, 2003)

Il TSHR riveste un ruolo importante nel processo della tiroidogenesi, in particolare esso è responsabile della proliferazione e del differenziamento dei precursori e della successiva crescita e proliferazione dei tireociti. Topi caratterizzati da un TSHR non funzionante (Tshrhit/ Tshrhit) o KO per il gene del TSHR si presentano con una tiroide decisamente ipoplastica caratterizzata da un numero di follicoli inferiore al normale e con un livello di espressione dei geni di TPO e NIS fortemente ridotto.

Dato l'importante ruolo nello sviluppo e nella fisiologia tiroidea, il TSHR risulta coinvolto nell'eziologia di diverse patologie come bersaglio di autoanticorpi stimolatori o inibitori della trasduzione del segnale oppure a causa di mutazioni germinali o somatiche, che ne modificano l'attività, la stabilità o l'espressione in membrana (Davies, 2005).

Come è stato precedentemente descritto, la tiroide di mammifero è costituita da due tipi di cellule endocrine, le cellule follicolari della tiroide che producono gli ormoni tiroidei T3 e T4 e le cellule C che producono calcitonina.

L'organizzazione follicolare delle cellule follicolari della tiroide è considerata essere il presupposto per un'efficiente biosintesi degli ormoni tiroidei. È stato dimostrato che NKX2-1 (Kimura, 1996) e PAX8 (Mansouri, 1998) sono di vitale importanza per la sopravvivenza, il differenziamento e il funzionamento della tiroide durante l'organogenesi e nel tessuto tiroideo maturo.

Durante l'organogenesi della tiroide, la co-espressione NKX2-1 (Lazzaro, 1991) e PAX8 (Plachov, 2002) in un piccolo gruppo di cellule ventrali del foglietto endodermico rappresenta il primo marcatore molecolare della specificazione delle cellule verso un destino tiroideo. Sebbene NKX2-1 e PAX8 siano espressi singolarmente in una varietà di tessuti e tipi di cellule, la loro co-espressione è ristretta alle cellule impegnate al differenziamento tiroideo.

Di rilevante importanza sono i dati pubblicati nel 2012 da Antonica *et al.* il quale ha dimostrato come la sovra-espressione transiente dei fattori di trascrizione NKX2-1 e PAX8 in cellule staminali embrionali murine è sufficiente per il differenziamento in cellule follicolari della tiroide che successivamente si auto-organizzano strutture follicolari tridimensionali se trattate con tireotropina.

I follicoli generati in vitro presentano un'apprezzabile organizzazione dello ioduro con conseguente variazione dei livelli plasmatici degli ormoni tiroidei con promozione del recupero sintomatico. e se innestate in modelli murini a-tiroidei.

4.3 Struttura primaria del TSHR

La struttura primaria del recettore, dedotta dal cDNA, conferma la sua appartenenza alla superfamiglia dei GPCR. Esso contiene sette segmenti con idrofobicità e lunghezza compatibili con quelle di segmenti trans membrana, inoltre alcuni di essi, in particolare il II ed il VII, hanno una forte omologia di sequenza con i corrispondenti segmenti di altri GPCR. Il TSHR mostra alcune importanti differenze funzionali che lo contraddistinguono dagli altri recettori per gli ormoni glicoproteici (GpHR):

- sono presenti due segmenti (residui 38 – 45 e 316 – 366), che non hanno una controparte nei recettori per FSH o LH/hCG, localizzati nel dominio extracellulare (Davies, 2005). Il primo è fondamentale per il legame con il TSH e per l'interazione con anticorpi stimolanti il recettore, mentre il secondo è compreso tra due siti di taglio che danno origine a recettori dimerici. Alcuni recettori maturi, espressi sulla membrana cellulare, subiscono un taglio proteolitico, dando origine a due subunità, A e B, tenute insieme da ponti disolfuro, a livello del segmento 316 – 366 (Rapoport, 1998);
- analogamente al recettore per l'LH, la parziale degradazione proteolitica o piccole delezioni a carico del dominio extracellulare del TSHR ne determinano l'attivazione (Van Sande, 1996; Zhang, 1995). Il TSHR è, tuttavia, maggiormente soggetto a questo tipo di attivazione;
- l'affinità di legame per il TSH non viene diminuita dalla presenza di analoghi non idrolizzabili del GTP (Akamizu, 1994);

Dal confronto della struttura primaria dei diversi GpHR, emerge che il dominio extracellulare mostra un'omologia di sequenza che raggiunge circa il 40%, mentre a livello del dominio trans membrana l'omologia è del 70% circa (Vassart, 2004). Questo pattern di omologia suggerisce che il legame specifico con l'ormone avviene a livello del segmento extracellulare, mentre il dominio contenente i sette segmenti trans membrana è responsabile della trasduzione del segnale tramite l'attivazione di proteine G_s o G_q .

Molti GPCR contengono residui di Serina o Treonina quali siti putativi di fosforilazione a livello delle anse citoplasmatiche (in particolare la III) o della corta coda citoplasmatica C-

terminale (*Collins, 1991*). Tali siti sono implicati nella desensitizzazione del recettore in seguito all'esposizione al ligando. Il TSHR, al contrario, presenta pochi residui di Serina potenzialmente fosforilabili, spiegando la limitata desensitizzazione del recettore osservata in seguito alla stimolazione dei tireociti con TSH.

Studi recenti suggeriscono ulteriori meccanismi di trasduzione del segnale basati sulla β -arrestina, sulla GRK (G-protein-coupled receptor kinase) e sulle RGS (Regulators of G-protein Signaling) che, benché coinvolti primariamente nei meccanismi di desensitizzazione ed internalizzazione del recettore, sembrano responsabili della trasmissione del segnale dal recettore alla cascata delle MAPK (Mitogen-Activating Protein Kinase) (*Kursawe, 2007*).

4.4 Struttura secondaria del TSHR

4.4.1 Il dominio extracellulare

Il dominio extracellulare del TSHR, responsabile del legame ad alta affinità del TSH, si compone di diverse strutture, tra le quali la più voluminosa è un cluster formato da 9 motivi ricchi di Leucina, le *Leucine-Rich Repeats (LRRs)* caratteristico dei GpHR (Fig. 8)

Le LRRs sono comprese tra due domini ricchi in Cisteina denominati *Cysteine-rich Flanking Region (CFRs)*, importanti non solo per il legame con l'ormone ma anche per le successive modificazioni conformazionali che determinano l'attivazione del recettore (Farid, 2004).

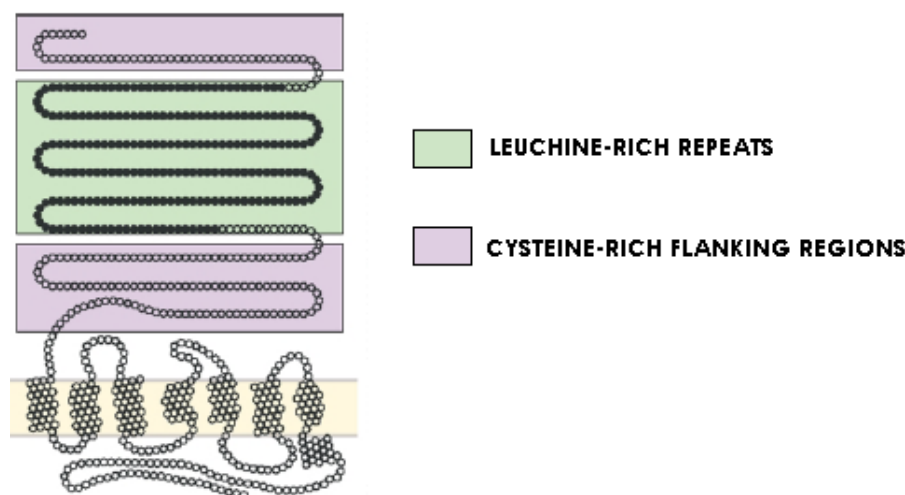


Figura 8 Rappresentazione bidimensionale della distribuzione di LRR e CFR all'interno del TSHR

L'ECD è, inoltre, composto anche da un linker strutturale (circa di circa 130 residui) tra le LRRs e il TMD, la cosiddetta "regione cerniera". Recenti studi hanno dimostrato che tale regione presenta non solo un ruolo strutturale, ma anche un ruolo funzionale nella attivazione dei GpHR. (Costagliola et al, 2002; Bonomi et al, 2006; Nurwakagari et al, 2007; Mueller et al, 2008; Kleinau e Krause, 2009).

LEUCINE-RICH REPEATS (LRR): i dati resi disponibili per l'elaborazione di un modello tridimensionale sono stati ottenuti dallo studio dell'inibitore della ribonucleasi, la prima proteina contenente LRRs ad essere stata cristallizzata (Kobe et al., 1993).

I LRRs sono motivi proteici costituiti da 20 – 25 aminoacidi, organizzati a formare un foglietto β e un' α -elica connessi da un'ansa. I nove LRRs presenti nel dominio extracellulare del TSHR sono disposti in modo sequenziale e formano una struttura a forma di ferro di

cavallo, in cui i foglietti β delimitano la superficie interna concava responsabile del legame con il ligando (Fig. 9).

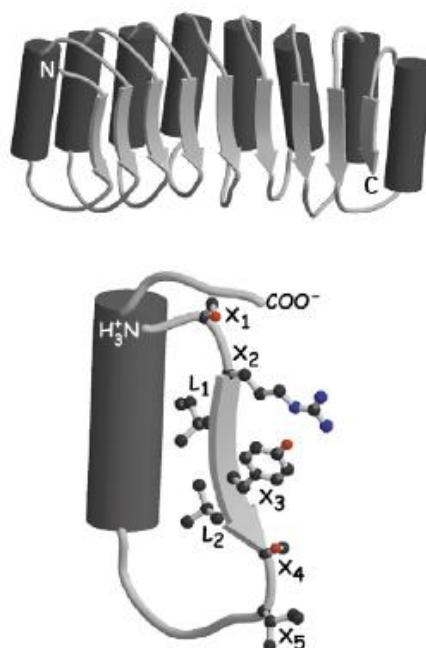


Figura 9 Le LRR sono costituite da 20-24 amminoacidi che formano un foglietto β seguito da un' α -elica. Il dominio ha la forma di un ferro di cavallo con i foglietti B che compongono una superficie concava. Ciascun foglietto β è costituito da residui amminoacidici i cui gruppi laterali sporgono all'interno della cavità mentre i residui di Leucina (L1 ed L2), idrofobici, sono importanti per la corretta conformazione proteica. [da Vassart, 2004]

Alcuni residui non leucinici, proiettati verso la cavità, sono responsabili della specificità di legame per l'ormone. Essi determinano una superficie che, mediante forze elettrostatiche attrattive e repulsive, è in grado di riconoscere specificatamente uno solo degli ormoni glicoproteici (TSH, LH/hCG o FSH) con alta affinità, impedendo in tal modo la stimolazione inappropriata del recettore.

A sostegno di questo modello sono stati condotti studi in cui, tramite mutagenesi sito-diretta, i residui non leucinici delle LRRs appartenenti al TSHR o al FSHR venivano sostituiti. I recettori mutanti mostravano la capacità di legare la hGC con un'affinità paragonabile a quella del recettore per l'LH/hCG, pur continuando a mantenere la capacità di riconoscere il proprio ligando naturale. Infatti, la sostituzione delle prime cinque LRRs del TSHR (aa 9-165) con la regione corrispondente del LHR non ha mostrato alcun effetto sulla capacità del recettore di legare il TSH, indicando che le prime cinque LRRs non determinano la specificità di legame (Wonerow, 2001). Nel caso del TSHR è risultato necessario effettuare dodici

ulteriori sostituzioni amminoacidiche per ottenere un recettore in grado di riconoscere e legare con alta specificità esclusivamente l' LH/hCG (*Smits, 2003*).

È inoltre nota una mutazione spontanea a carico della Lisina 183 (K183R), appartenente alla quinta LRR del TSHR, che determina un aumento della sensibilità del TSHR alla hCG. Questa causa una condizione di severo ipertiroidismo durante la gravidanza, quando, soprattutto durante il primo trimestre, i livelli di hCG sierici sono estremamente elevati (*Rodien, 1998*).

In aggiunta alle interazioni ormono-specifiche geneticamente codificate nella struttura primaria dei ligandi e delle LRRs dei recettori, è stata messa in evidenza anche l'importanza delle interazioni ioniche non ormono-specifiche che coinvolgono i residui tirosinici presenti nel dominio extracellulare del TSHR: la solfatazione del recettore a livello di alcune tirosine, e, probabilmente, i gruppi solfatati delle catene di carboidrati e di acido sialico, contribuiscono all'affinità di legame per l'ormone senza interferire con la specificità, tramite un' interazione diretta con il ligando o il mantenimento della forma funzionale del dominio extracellulare (*Bhowmick, 1996*).

CYSTEINE-RICH FLANKING REGIONS (CFR): benchè la struttura tridimensionale dei due domini non sia stata completamente determinata, è noto che entrambi sono coinvolti nel legame del TSH al dominio extracellulare del recettore. Si ipotizza che le CFR comprendano quattro α -eliche che formano una struttura compatta stabilizzata da interazioni non covalenti, con diversi segmenti che sporgono tra la seconda e la terza α -elica.

Una volta ancorato alla CFR, il TSH induce una serie di cambiamenti conformazionali che portano all'attivazione del recettore e delle vie di signaling o che aumentano l'accessibilità delle proteasi ai siti di taglio o delle cellule immunocompetenti alle regioni riconosciute come epitopi (*Kackzur, 2002*).

In aggiunta, i residui di cisteina distribuiti sulle estremità N- e C-terminali del dominio extracellulare e a livello delle anse extracellulari sono molto importanti sia per l'assunzione ed il mantenimento del corretto folding proteico sia per l'attivazione del recettore.

Ci sono ben undici cisteine nel dominio extracellulare, che occupano le posizioni 24, 29, 31, 41, 176, 283, 284, 301, 390, 398 e 408, che potrebbero formare legami disolfuro necessari per la struttura terziaria del TSHR (*Farid, Szkudlinski 2004*). Ad esempio, la Cys41, appartenente al segmento 38 – 45 esclusivo del TSHR e rilevante nel legame con il TSH e con autoanticorpi stimolatori, è un residuo chiave per l'assunzione, da parte del TSHR, del

corretto folding proteico in fase di sintesi e, quindi, dell'espressione in membrana del recettore, tramite la formazione di un legame disolfuro con Cys29 o Cys31 (*Farid, 2004*). Inoltre la formazione di tale legame comporta la formazione di un epitopo riconosciuto dagli autoanticorpi (*Song, 2001*).

4.4.2 Il dominio transmembrana e le anse intra ed extra cellulari

Il dominio transmembrana e le anse intra- ed extracellulari sono responsabili della conversione dello stimolo in un segnale intracellulare, tramite il reclutamento e l'attivazione di proteine G.

Benchè il TSHR umano possa associarsi con tutte le tipologie di proteina G (Gs, Gi, Gq/11, G12/13), l'attivazione della sola proteina Gs e, in minor grado, della proteina Gq/11, sembra necessaria per la regolazione della crescita e del differenziamento della tiroide e per l'induzione della sintesi ormonale (Vassart, 1992). Questo dato è basato sull'osservazione del rapido accumulo di cAMP intracellulare in seguito allo stimolo con una quantità di TSH da cinque a dieci volte minore di quella necessaria per attivare la via dell'inositolo trifosfato (Van Sande, 199; Van Sande, 1995).

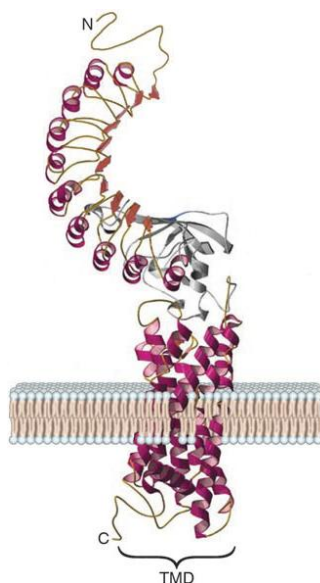


Figura 10 Struttura tridimensionale del TSHR [da Davies, 2005]

ANSE EXTRACELLULARI sono tre e sono implicate sia nel legame con l'ormone sia nella trasduzione del segnale all'interno dei tireociti. Sono stati individuati alcuni aminoacidi-chiave per entrambe queste funzioni.

A livello della seconda e della terza ansa extracellulare sono presenti, rispettivamente, due residui di cisteina nelle posizioni 494 e 569, conservati in diversi GPCR: la formazione di un

ponte disolfuro che mantenga le due anse posizionate correttamente è necessario perché il recettore sia in grado di trasdurre il segnale (*Gustavsson, 1994*).

L'Asp 474 nella prima ansa extracellulare è necessario per la normale capacità di trasduzione del segnale da parte del recettore, mentre la sostituzione della Ile 486 con un residuo di Phe o Met (mutazioni attivanti) genera un recettore costitutivamente attivo, in grado di stimolare sia la via del cAMP, sia quella dell'IP3.

Altre tre mutazioni attivanti sono state descritte a livello della terza ansa extracellulare (Asn650Tyr, Val656Ala e una delezione di tre aminoacidi nel tratto di connessione tra la terza ansa ed il settimo segmento transmembrana –TM7): i loro effetti proattivanti sulla funzione recettoriale sono dovuti proprio alla stretta vicinanza e all'influenza sulla conformazione del sesto e del settimo segmento transmembrana, responsabili del mantenimento della forma inattiva del recettore.

SEGMENTI TRANSMEMBRANA (TMD). La porzione transmembrana del TSHR è importante per la stabilizzazione della conformazione inattiva del recettore, attraverso le interazioni che coinvolgono i residui amminoacidici dei vari TMD. Una sequenza consenso, altamente conservata fra i GPCR, è localizzata nel sesto segmento transmembrana (TM6) e contiene i residui amminoacidici che interagiscono con la terza ansa citoplasmatica del recettore.

Altre importanti interazioni coinvolgono il TM6 e il TM5 ed anche il TM6 e il TM7. La sostituzione dell'Asp 633, appartenente al TM6, rappresenta, infatti, la mutazione attivante del TSHR più frequente. Questo aminoacido forma un legame a idrogeno con l'Asn 674, appartenente al TM7, stabilizzando il recettore allo stato inattivo (*Neumann, 2001*).

La natura debole di queste interazioni spiega la maggiore attività basale del TSHR rispetto a quella degli altri GPCR: l'isomerizzazione del recettore in una conformazione attiva necessita, probabilmente, di variazioni conformazionali minime (*Wonerow, 2001*).

ANSE CITOPLASMATICHE. Le tre anse citoplasmatiche sono coinvolte nell'associazione del recettore con le proteine G e nell'attivazione delle vie di trasduzione del segnale (*Chazenbalk, 1991*), in particolare la seconda ansa citoplasmatica sembra coinvolta nel reclutamento delle proteine G, mentre la terza è responsabile dell'attivazione ottimale delle proteine G (*Wess, 1998*).

Benchè siano note mutazioni puntiformi, che determinano l'attivazione costitutiva delle vie di trasduzione del segnale, a carico di alcuni aminoacidi compresi nella prima o nella seconda ansa citoplasmatica, è stato osservato che, per quanto riguarda la terza ansa, è la lunghezza di questa a determinare l'attivazione o meno delle proteine G. Infatti, le mutazioni attivanti che coinvolgono la terza ansa citoplasmatica sono delezioni a carico del segmento C-terminale di quest'ultima: la lunghezza dell'ansa influisce sulla conformazione del TM6 che, a sua volta, rende conto dell'attivazione delle proteine G associate (*Wonerow, 1998*).

Sono stati condotti studi, tuttavia, che hanno messo in luce l'importanza, anche nella terza ansa citoplasmatica, di alcuni residui amminoacidici chiave non solo nella stabilizzazione della forma inattiva del recettore, ma anche nell'espressione in membrana e nell'efficienza di accoppiamento alle varie tipologie di proteine G.

4.5 Modificazioni post-traduzionali del TSHR

Le modificazioni post-traduzionali del TSHR sono necessarie per il folding, il trafficking, la capacità di legare l'ormone e di attivare le vie di trasduzione del segnale attraverso le proteine G. Le modificazioni postraduzionali che riguardano il TSHR sono riassunte nella Tabella 3.

Ponti Disolfuro	Folding e formazione di dimeri/tetrameri
Taglio Proteolitico	Attivazione
Palmitoilazione	Formazione di una quarta ansa citoplasmatica
	Regolazione della desensitizzazione
	Espressione in membrana (lipid rafts)
Solfatazione	Capacità di legare il TSH con alta affinità
	Attivazione
Glicosilazione	Corretto Folding
	Espressione in membrana
	Legame del TSH al dominio extracellulare
Sializzazione	Incremento dell'espressione in membrana
	Aumento dell'emivita
Fosforilazione	Desensitizzazione
	Internalizzazione

Tabella 3. Principali modificazioni post-traduzionali del TSHR e loro effetti (da Kursawe, 2007)

Un processo estremamente importante per qui è necessario una descrizione più dettagliata, è il processo di *dimerizzazione*.

Il concetto ‘classico’ secondo cui i GPCR funzionano come entità monomeriche è stato recentemente modificato a seguito di molti studi che hanno dimostrato che i GPCR possono funzionare sia come monomeri che come dimeri e oligomeri. I complessi tra GPCR sono stati poi distinti in omodimeri/omooligomeri se implicano l’associazione tra recettori identici, ed eterodimeri/eterooligomeri se avviene l’associazione tra recettori diversi.

In alcuni casi i complessi eterorecettoriali mostrano caratteristiche diverse rispetto a quelle riscontrate nei recettori analizzati singolarmente, in termini di affinità di legame per l’agonista, d’interazione con le proteine G e di modalità di desensibilizzazione e internalizzazione (Angers *et al.* 2004).

L’esistenza dei dimeri di GPCR ha aperto la strada a numerosi interrogativi riguardanti le implicazioni funzionali di tale associazione nel ciclo vitale dei GPCR. Negli ultimi anni, quindi, è diventato fondamentale analizzare il ruolo biologico che la dimerizzazione assume nei diversi processi che coinvolgono i GPCR come:

- ❖ **Maturazione:** la dimerizzazione di molti GPCR è costitutiva e avviene durante il processo biosintetico a livello del reticolo endoplasmatico (Bulenger *et al.* 2005). Un esempio significativo di come la dimerizzazione possa intervenire nella maturazione dei GPCR viene dalla dimerizzazione dei recettori adrenergici α_{1d} e α_{1b} . Il recettore α_{1d} non viene trasportato efficientemente alla membrana, se espresso da solo in cellule eterologhe ma viene trattenuto nel reticolo endoplasmatico. Quando, invece, viene coespresso con il recettore α_{1b} ne risulta un eterodimero efficientemente espresso in membrana (Uberti *et al.*, 2003). Questo risultato fa supporre che la dimerizzazione sia un passaggio fondamentale per una piena maturazione di numerosi GPCR.
- ❖ **Regolazione promossa da ligando:** una serie di studi dimostrano che la dimerizzazione può essere promossa o inibita dal legame tra ligando e recettore. Il trattamento con l’agonista promuove la stabilizzazione e induce un incremento dei livelli dei dimeri del recettore β_2 adrenergico (Anger *et al.* 2000). Invece, nel caso del recettore δ -oppioide (Cvejic e Devi, 1997) l’agonista inibisce la formazione dei complessi dimerici. In altri casi si è visto, invece, che la presenza del ligando riduce i livelli dei dimeri dei recettori per l’ossitocina e per la vasopressina V_1 e V_2 (Terrillon *et al.*, 2003).
- ❖ **Diversità farmacologica:** la formazione di eterodimeri di GPCR può alterare il profilo farmacologico dei due recettori associati. Studi di binding con ligandi radiomarcati su cellule trasfettate con i singoli recettori GABA_{B1} e GABA_{B2} mostrano che questi hanno

una debole affinità per l'agonista, mentre in cellule cotrasfettate con entrambi i recettori l'affinità per il ligando aumenta di circa 10 volte, supportando l'ipotesi che la dimerizzazione sia fondamentale per il legame con l'agonista (Kuner *et al.*, 1999). Altri studi riportano che in alcuni casi, la dimerizzazione non influisce in modo significativo sulla farmacologia del recettore. Ad esempio, le proprietà di legame di cellule esprimenti eterodimeri dei recettori δ -oppioide/ β_2 adrenergico e κ -oppioide/ β_2 adrenergico non sono in alcun modo alterate (Jordan *et al.* 2001). Poiché i GPCR sono i bersagli molecolari di numerosi farmaci, la diversificazione farmacologica degli eterodimeri potrebbe avere importanti applicazioni cliniche nello sviluppo di nuove molecole dirette selettivamente contro i complessi dimerici.

- ❖ **Trasduzione del segnale:** uno degli aspetti più interessanti dell'eterodimerizzazione è l'acquisizione di una diversa selettività d'accoppiamento con le proteine G da parte dei due recettori co-espressi. Nella concezione "monomerica", la trasduzione del segnale avviene per attivazione di una proteina G eterotrimerica da parte di un singolo GPCR. La struttura cristallografica della rodopsina ha rivelato che la sua porzione citoplasmatica è troppo piccola per offrire contemporaneamente i punti di legame sia con la sua unità α che $\beta\gamma$ della proteina G eterotrimerica, ipotizzando la necessità di due molecole recettoriali per far fronte a quest'interazione (Hamm, 2001; Liang *et al.*, 2003). Alla luce di questi studi si sta affermando sempre più l'idea di una stechiometria 2:1 tra GPCR e proteina G.
- ❖ **Internalizzazione:** recenti studi di espressione di eterodimeri in sistemi cellulari eterologhi hanno dimostrato che l'eterodimerizzazione influenza l'endocitosi promossa da agonista. Per molti eterodimeri la stimolazione di uno dei due recettori è sufficiente a promuovere la co-internalizzazione di entrambi. Un esempio rilevante è quello dell'eterodimero δ -oppioide/ β_2 adrenergico (Jordan *et al.*, 2001). In alcuni casi i recettori che non sono suscettibili all'endocitosi agonista-dipendente agiscono come dominante negativo all'interno dell'eterodimero. Jordan e Devi nel 1999 hanno dimostrato che l'internalizzazione del recettore δ -oppioide diminuisce se questo viene co-espresso con il recettore κ -oppioide indicando che il recettore δ -oppioide è trattenuto sulla superficie cellulare come risultato dell'etero-dimerizzazione. Altre volte è il recettore che viene internalizzato ad assumere il ruolo di dominante positivo come nel caso del recettore per la somatostatina SSTR₁ che non internalizza da solo ma solo quando viene coespresso con SSTR₅ (Rocheville *et al.*, 2000).

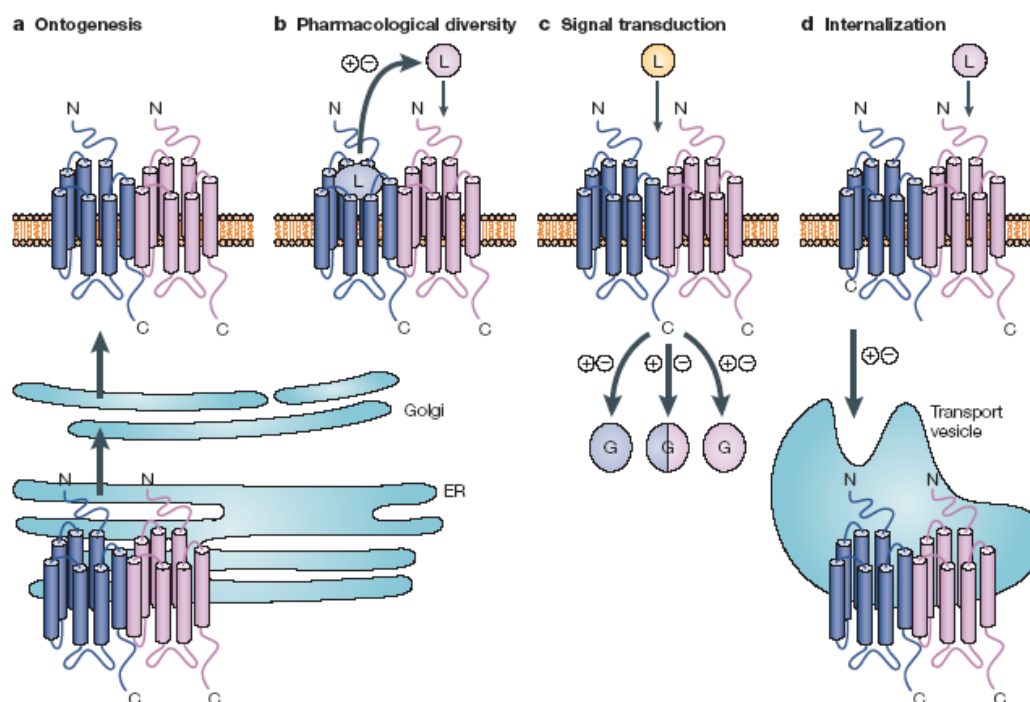


Figura 11 principali funzioni del processo di dimerizzazione

Nel 2001 il gruppo di *Latif* utilizzando tecniche di microscopia a fluorescenza ha dimostrato che anche il TSHR in vivo forma dei dimeri o degli oligomeri. Tuttavia l'esistenza di oligomeri è stata descritta nella cellula intera, senza un'analisi dettagliata a livello dei compartimenti subcellulari e di membrana. Pertanto, non è chiaro se la formazione di dimeri/oligomeri sia importante per il legame con il ligando, l'attivazione, la traduzione del segnale o per la maturazione/espressione sulla membrana cellulare dei recettori per gli ormoni glicoproteici (*Lee et al., 2003*). L'interesse per l'oligomerizzazione del TSHR deriva dall'identificazione di alcuni casi familiari di refrattarietà al TSH endogeno (resistenza al TSH) causati da mutazioni inattivanti del TSHR (*Alberti et al., 2001*).

In un caso particolare, la mutazione C41S, difetto ereditato come tratto dominante, ha portato ad ipotizzare l'esistenza di un fenomeno di dominanza negativa. Recentemente, questa ipotesi è stata valutata in vitro mediante approcci funzionali e biofisici e mediante "bioimaging" (*Calebiro et al., 2005*). La co-trasfezione del recettore wild-type e dei mutante associati a resistenza al TSH ha dimostrato una risultata in una riduzione della produzione di cAMP rispetto a quanto osservato con il solo TSHR wild-type. L'effetto negativo dei recettori mutati è associato alla dose di stimolo e alla riduzione della produzione massima di cAMP, aspetto suggestivo della riduzione del numero di recettori in membrana. Tali dati sono stati poi

convalidati generato una serie di TSHR fusi a ECFP o EYFP. Studi di colocalizzazione, Western Blot e FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) hanno dimostrato che i mutanti recettoriali localizzavano principalmente nel reticolo endoplasmico (ER) e causavano ritenzione intracellulare del TSHR wild-type. La presenza nell'ER di etero-oligomeri formati da recettori wild-type e mutati, ha permesso di giustificare la ritenzione intracellulare e la ridotta attività funzionale del TSHR wild-type in presenza dei mutanti. La presenza del TSHR in forma oligomerica in compartimenti intracellulari indica che l'oligomerizzazione è un evento precoce e che probabilmente avviene prima della fine della maturazione, come suggerito altresì dalla modificazione della glicosilazione del recettore wild-type in presenza dei mutanti (*Calebiro, 2005*). Tuttavia, numerosi aspetti riguardanti i meccanismi ed il ruolo funzionale dell'oligomerizzazione del TSHR devono ancora essere chiariti.

La scoperta che mutazioni naturali dei GPCR possono avere un effetto di dominanza negativa suggerisce che la formazione di dimeri può avere un simile ruolo nel caso più generale della omo-dimerizzazione. Ciononostante, non esiste ad oggi alcuna evidenza diretta che l'omo-dimerizzazione sia necessaria per l'uscita dall'ER e il raggiungimento della membrana plasmatica (*Urizar, 2005*).

L'oligomerizzazione precoce a livello dell'ER non è un fenomeno limitato ai GPCR, ma sembra essere un meccanismo generale usato dai sistemi di controllo della qualità per assicurare che solo le proteine assemblate correttamente possano raggiungere il loro sito d'azione.

4.6 Meccanismo di attivazione e trasduzione del segnale del TSHR

In seguito all'osservazione che il TSHR mostra un'attività basale piuttosto elevata e che parziali degradazioni del dominio extracellulare determinano l'attivazione del recettore, è stato ipotizzato che il dominio extracellulare abbia un effetto inibitorio sul dominio transmembrana, responsabile dell'attivazione delle vie di trasduzione del segnale, tramite interazioni elettrostatiche che coinvolgono le anse extracellulari (Van Sande, 1996; Davies, 2005). Questo tipo d'interazione sembra di importanza critica per il mantenimento di uno stato (relativamente) inattivo, o "chiuso", del recettore (Costagliola, 2012). Quando, invece, l'interazione dominio extracellulare-anse extracellulari viene meno a causa del legame con il ligando o di mutazioni che interessano gli aminoacidi responsabili, il TSHR assume una conformazione "aperta". Secondo questo modello di "attivazione a due stadi" del recettore, il dominio extracellulare si comporta come un agonista inverso nei confronti del dominio transmembrana fintanto che non è legato all'ormone.

In seguito al riconoscimento e all'interazione con il TSH, il dominio extracellulare assume una conformazione tale da comportarsi come un agonista pieno del dominio transmembrana, innescando e potenziando le reazioni a cascata della trasduzione del segnale (Vlaeminck-guillem, 2002; Vassart, 2004).

Il TSHR essendo un GPCR durante la cascata di trasduzione del segnale, attivata dall'interazione con il ligando, interagisce con le proteine G. Queste proteine sono degli eterotrimeri composti da tre subunità:

- α con un peso molecolare compreso tra 40-50 kDa;
- β con un peso molecolare compreso tra 35-36 kDa;
- γ con un peso molecolare compreso tra 7-10 kDa.

La subunità α è in grado di legare con elevata affinità i nucleotidi guanilici di- e trifosfato (GDP e GTP) ed è dotata di attività GTPasica intrinseca.

Esistono differenti proteine G classificate in sottofamiglie in base al tipo di subunità α :

- sottofamiglia α_s : attivano l'adenilato ciclasi provocando un incremento della concentrazione intracellulare di AMPciclico (cAMP);

- sottofamiglia $\alpha_{i/o}$: inibiscono l'adenilato ciclasi e regolano l'attività di canali ionici del potassio e del calcio voltaggio-dipendenti;
- sottofamiglia $\alpha_{q/11}$: attivano la fosfolipasi C inducendo un accumulo intracellulare di inositolo 1,4,5-trisfosfato (IP3), diacilglicerolo (DAG) e calcio;
- sottofamiglia $\alpha_{12/13}$: attivano il signaling mediato dalla proteina Rho.

Il meccanismo di attivazione di un GPCR che segue il legame dell'agonista comporta un cambiamento conformazionale che produce il distacco del GDP dalla subunità α della proteina G (l'eterotrimerico $G\alpha$ -GDP- β - γ è la forma inattiva) e la sua sostituzione da parte del GTP. Lo scambio GDP-GTP porta alla dissociazione del complesso $G\alpha$ -GTP dal dimero $\beta\gamma$. Sia $G\alpha$ -GTP che $\beta\gamma$ sono in grado di regolare l'attività degli effettori a valle, siano essi enzimi (adenilato ciclasi, fosfolipasi C) o canali ionici voltaggio-dipendenti. La regolazione degli effettori termina quando l'attività intrinseca GTP-asi porta all'idrolisi del terzo fosfato del GTP dando origine al GDP e alla ricostituzione del complesso eterotrimerico inattivo così disponibile per un altro ciclo di attivazione (*De Vries et al., 2000*).

4.7 Desensibilizzazione del recettore

La trasmissione dei segnali extracellulari attraverso la membrana plasmatica mediante l'attivazione di recettori è uno dei più importanti meccanismi per la comunicazione tra l'ambiente intracellulare e quello esterno. Un importante processo che regola questo complesso meccanismo è la desensibilizzazione recettoriale, che si manifesta come l'attenuazione della responsività recettoriale.

Distinguiamo due tipi di desensibilizzazione:

- ❖ desensibilizzazione eterologa, in cui il recettore che ha avviato il signaling è diverso da quello che viene fosforilato e disaccoppiato dalla proteina G e dal sistema effettore. Questo meccanismo è mediato dalle proteinchinasi PKA e/o PKC;
- ❖ desensibilizzazione omologa, in cui si verifica il disaccoppiamento del recettore che ha attivato la trasduzione del segnale in seguito al legame dell'agonista dalla proteina G in risposta alla fosforilazione tramite le proteinchinasi GRK, PKA o PKC.

Entrambi i meccanismi possono comportare:

1. perdita di affinità per l'agonista;
2. riduzione del numero dei recettori sulla superficie cellulare;
3. disaccoppiamento del recettore dalle proteine G.

La desensibilizzazione del recettore coinvolge due famiglie di proteine, le proteinchinasi (PKA, PKC, PKG e GRK) e le beta arrestine.

Le PKA sono una famiglia di proteinchinasi attivate dal cAMP. Ciascuna PKA è costituita da due subunità regolatrici (R) e due subunità catalitiche (C). Quando le quattro subunità sono assemblate (R₂C₂), la PKA è inattiva. Il cAMP legandosi alle subunità R dell'enzima induce un cambiamento conformazionale che provoca il rilascio delle subunità C. Queste ultime sono attivate dal distacco e catalizzano la fosforilazione dei residui di serina e treonina delle proteine bersaglio.

Un'altra famiglia di proteinchinasi importanti nella trasduzione del segnale intracellulare sono le PKC. A queste appartengono le proteinchinasi attivate dal calcio, quelle attivate dall'IP₃ e DAG e quelle attivate sia dal calcio che dall'IP₃/DAG. Le PKC nel loro stato inattivo sono localizzate nel citoplasma e vengono reclutate alla membrana una volta attivate. Il DAG fa sì che l'enzima venga incorporato nelle membrane dove forma un complesso attivo.

Le PKG fanno parte di una famiglia di proteine presenti in due isoforme PKG α e PKG β derivanti dallo splicing alternativo del gene codificante e PKGII codificata da un secondo

gene. Queste proteine sono concentrate soprattutto nelle cellule contrattili e la loro attivazione avviene in seguito all'incremento del cGMP in risposta alla produzione dell'ossido nitrico (NO).

La famiglia delle GRK è composta da sette membri con caratteristiche differenti:

- ❖ GRK1 e GRK7: espresse in modo particolare nella retina;
- ❖ GRK4: espressa principalmente nel cervello, nel rene e nel testicolo;
- ❖ GRK3: il cui meccanismo è strettamente legato alla trasduzione del segnale del recettore β 2-adrenergico;
- ❖ GRK5 e GRK6, espresse in modo ubiquitario.

La famiglia delle arrestine è costituita da quattro membri suddivisi in due gruppi:

- ❖ arrestine 1 e 4 presenti esclusivamente nella retina (*Kuhn, 1978*);
- ❖ arrestine 2 e 3, anche conosciute come β -arrestina 1 e β -arrestina 2, espresse ubiquitariamente in tutti i tessuti, .giocano un ruolo importante nella regolazione della trasduzione del segnale di numerosi GPCR (*Attramadal et al., 1992; Reiter e Lefkowitz, 2006*).

Le β -arrestine sono coinvolte in numerosi processi cellulari:

- ❖ desensibilizzazione dei recettori a sette domini transmembrana

I cambiamenti conformazionali indotti dal legame con l'agonista e la fosforilazione mediata da GRK causano il reclutamento della β -arrestina 1 o 2 alla membrana, il legame dell'arrestina al recettore e lo spiazzamento per competizione della proteina G accoppiata (*Krupnick e Benovic, 1998*). In base alla cinetica dell'interazione tra recettore e arrestina si possono differenziare:

- recettori di classe A (es. recettore β 2-adrenergico) in cui la β -arrestina si dissocia in seguito all'internalizzazione del recettore;
- recettori di classe B (es. recettore V2 per la vasopressina) in cui l'interazione con la β -arrestina permane anche dopo l'internalizzazione recettoriale.
- ❖ Endocitosi del recettore: numerosi studi hanno suggerito che la β -arrestina promuove l'interazione del recettore con il complesso proteico che ne induce il reclutamento a particolari regioni della membrana chiamate 'coated pits' dotate di un rivestimento di clatrina sul lato citoplasmatico (*Sheno e Lefkowitz, 2003; Claing, 2002*). Recenti studi dimostrano che le β -arrestine interagiscono anche con altri elementi implicati nell'endocitosi come la proteina adattatrice AP2, la proteina ARF6 (ADP ribosylation factor 6) e il fattore ARNO che ne promuove lo scambio GDP-GTP.

Fino a tempi recenti, si è sostenuto che i GPCR attivano i classici pathway proteina-G-dipendenti solo quando si trovano sulla superficie cellulare sotto stimolo di un agonista che promuove, oltre all'attivazione della cascata del segnale, anche l'internalizzazione del recettore stesso. Tuttavia, Calebiro et al. ha dimostrato recentemente che il TSH recettore, il recettore per il paratormone e i recettori per la sfingosina, durante l'internalizzazione, continuano a segnalare attraverso la via mediata da G_s in un compartimento intracellulare endosomiale. È interessante notare che questo tipo di segnale con la produzione di cAMP intracellulare differisce da quello che si verifica sulla superficie cellulare in quanto è persistente e conduce apparentemente specifiche conseguenze. Ancora non è chiaro quale sia il ruolo fisiologico e le eventuali conseguenze patologiche qualora questo sistema venisse danneggiato. È, comunque, possibile prevedere che i difetti che interessano questo aspetto funzionale del TSHR potrebbero anche essere una conseguenza di mutazioni LOF (loss of function). Infine è chiaro che gli endosomi, che sono sempre stati indicati come sistemi atti a veicolare i recettori passivi verso i lisosomi o verso il compartimento di riciclo, oggi, appaiono come piattaforme intracellulari specializzate per la segnalazione dei GPCR internalizzati.

4.8 Le mutazioni a carico del TSHR

Alterazioni a livello strutturale e delle vie di trasduzione del segnale del recettore per l'ormone glicoproteico TSH sono state implicate nell'eziopatologia della tiroide (Farfel, 1999). Le **varianti attivanti** a carico del recettore o della Gs sono in grado di causare iperfunzione ghiandolare, iperplasia e tumori. Tra le mutazioni attivanti, sono state identificate alterazioni germinali in casi di ipertiroidismo autosomico dominante non autoimmune e alterazioni somatiche in adenomi tossici e in un raro carcinoma differenziato della tiroide associato a iperfunzione. È stato, inoltre, dimostrato che nei casi in cui si verifica una attivazione costitutiva della via cAMP conseguente ad una mutazione attivante, si instaura un meccanismo contro-regolatorio basato sulla induzione dell'attività fosfodiesterasica (in grado di trasformare l'AMP ciclico in 5' AMP inattivo (in modo particolare di tratta di fosfodieterasi di tipo 4 e fosfodiesterasi specifiche di tipo 8) in grado di condizionare in maniera consistente l'espressione fenotipica della variante inattivanti si associano a ipofunzione e ipoplasia ghiandolare.

Le **varianti inattivanti** a carico del gene codificante il TSH recettore si associano a ipofunzione e ipoplasia ghiandolare. Infine sono state identificate delle **varianti modificanti la specificità del recettore**, associate all'ipotiroidismo che insorge durante la gravidanza

4.8.1 Mutazioni loss of function (LOF)

Focalizzando la nostra attenzione sul fenotipo ipotiroideo, particolare attenzione va alle mutazioni inattivanti (LOF). Ad oggi sono state identificate e documentate numerose varianti LOF a carico del gene TSHR associate a resistenza al TSH((Fig. 12).

Tra queste distinguiamo:

- **Varianti Missenso** che apportano cambio amminoacidico, ad esempio nella variante P162A una Prolina in posizione 162 è stata sostituita con un'Alanina;
- **Varianti non senso** che portano alla generazione prematura di un codone di STOP generando dal punto di vista proteico una molecola tronca come la variante W546X in

cui il Triptofano in posizione 546 è stato sostituito con uno STOP generando una proteina di soli 546 amminoacidi;

- **Delezioni o inserzioni** che portano ad un conseguente cambio del modulo di lettura dell'RNA polimerasi (frameshift) che spesso generano un segmento variante della proteina generata a causa di un arresto prematuro di traduzione;
- **Alterazioni introne-esone** che si verificano nelle zone di confine tra un introne e un esone o viceversa. Queste varianti ad esempio inducono errori nel processo di splicing portando alla fusione di un esone con una parte di introne alterando così il frame di traduzione della proteina.

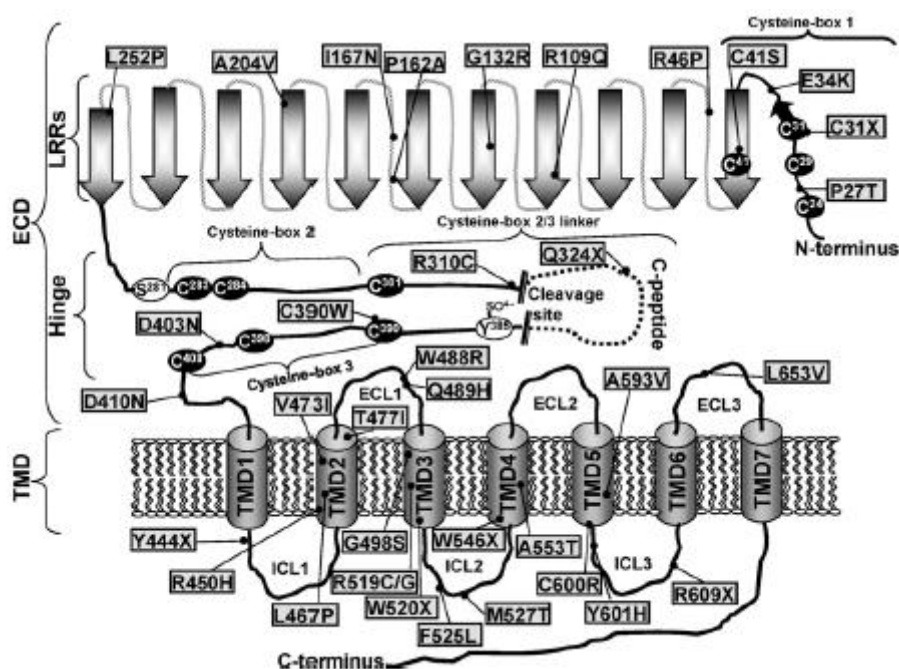


Figura 12 Rappresentazione schematica delle mutazioni LOF identificate a carico del TSHR (Persani, 2010).

I meccanismi molecolari responsabili della perdita di funzionalità recettoriale sono molteplici. Il TSHR riduce la sua attività quando presenta un'espressione ridotta o assente sulla membrana plasmatica dei tireociti o quando, a causa di un non corretto folding proteico del dominio extracellulare, viene compromesso il legame con il TSH. Infine il funzionamento del recettore è alterato quando sono presenti delle alterazioni al livello di struttura che impediscono l'attivazione della cascata del segnale mediata dall'interazione dello stesso con la proteina G eterotrimerica. Le mutazioni che portano alla sintesi di un recettore tronco sono

generalmente correlate ad una riduzione dell'espressione del recettore sulla membrana. Un esempio è quello relativo alla variante T655X (delAC) descritta da Gagnè et al. e da Alberti et al., associato a fenotipo di resistenza al TSH a trasmissione dominante. Questa variante frameshift porta alla produzione di un recettore che manca dell'intero TM7 e del C-terminale. Studi di espressione in cellule Cos-7 e HEK293T transfettate transientemente con il mutante, hanno mostrato una ridotta espressione di superficie in membrana del recettore stesso. Questo genera di conseguenza una riduzione dell'attività basale (in termini di cAMP prodotto) e dell'attività sotto stimolo. Risultati simili sono stati osservati per la variante W546X (*Clifton-Bligh, 1997*) che introduce un arresto prematuro TM4.

Facendo riferimento alla cristallografica del recettore, si pensava che mutazioni missenso a carico dell'ECD potessero alterare il legame con il ligando. Tuttavia, la maggior parte delle mutazioni riportate in questa regione sono anche caratterizzate da una ridotta espressione sulla superficie cellulare.

Questo è probabilmente la conseguenza di misfolding del recettore che rimarrebbe intrappolato all'interno del reticolo endoplasmatico della cellula e non riuscirebbe a raggiungere la localizzazione target. Questo può essere previsto per varianti genetiche che colpiscono residui che svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento della struttura dell'ECD stesso. Il residuo C41 si pensa possa formare ponti disolfuro con residui di cisteina localizzati nell'N-terminale della regione LRR adiacente. La variante C41S è associata alla ritenzione intracellulare del recettore (*Alberti, 2002*; *Calebiro, 2005*). Un fenomeno simile è stato anche mostrato per la mutazione C390W (*de Roux, 1996, Biebermann., 1997, Calaciura., 2002, Nicoletti., 2009*). Tuttavia, questo mutante risulta essere parzialmente ritenuto. Studi di binding hanno anche suggerito una riduzione rilevante dell'affinità e quindi del legame con il TSH (*Clifton-Bligh, 1997*). Sorprendentemente, lo stesso mutante presenta un aumento di attività basale costitutiva ligando-indipendente così come la variante R310C (*Russo, 2000*). Infine, per quanto riguarda le varianti che rendono il recettore inabile a trasdurre il segnale attivato dal legame con l'ormone glicoproteico de Roux descrive la mutazione D410N che colpisce un amminoacido della regione cerniera che lega l'ECD con il TM1. Questa regione è stata dimostrata essere implicata nella trasduzione del segnale tra l'ECD e il dominio a serpentina (*Kleinau., 2004.*; *Mueller., 2006*).

Varianti missenso a carico dei segmenti TM e delle anse extra ed intracellulari possono interferire con l'attivazione del recettore o con l'accoppiamento dello stesso alla proteina G. Tuttavia, le mutazioni LOF che interessano il dominio a serpentina generalmente sono anche

caratterizzate da una significativa riduzione dell'espressione sulla superficie cellulare. Sulla base di quanto detto fino ad ora, sembrerebbe che il difetto di targeting che porta alla ridotta espressione in membrana del recettore sia la causa maggiore per un'alterata funzionalità. Tuttavia, la variante R450H (Nagashima., 2001, Kanda., 2006, Shibayama, 2005, Tsunekawa., 2006, Narumi., 2009) e la variante V473I (Tsunekawa., 2006) presentano un'espressione sulla membrana plasmatica conservata ma una ridotta attività di trasduzione del segnale segnalazione ridotta, suggerendo, così, un rilevante ruolo dei domini 450 e 473 appartenenti al TM2 nel signalling TSH mediato.

Sempre come esempio di un'alterazione della via di trasduzione del segnale, è stata descritta la variante Y601H in cui viene alterato selettivamente il signalling mediato da G_q che porta alla produzione di IP_3 senza interferire con la sintesi di cAMP TSH-mediata (Biebermann., 1998). Uno studio di allineamento multiplo tra specie mostra come il residuo di tirosina 601, appartenente alla regione TM5, sia altamente conservato suggerendone un ruolo importante per l'accoppiamento del recettore con la proteina G_q .

Un'altra variante LOF localizzata nel TM5 è la L653V che presenta una corretta espressione sulla membrana plasmatica e un'alterazione della via mediata da G_q e da G_s con conseguente riduzione di cAMP e IP_3 intracellulare (Grasberger., 2007) suggerisce che una corretta ed efficiente trasduzione TSH-mediata necessita dell'integrità di entrambe i pathway del segnale. Il meccanismo di resistenza al TSH in pazienti con mutazioni in eterozigosi presenta un fenotipo meno evidente rispetto a pazienti arrecanti mutazioni in omozigosi e potrebbe essere dovuto o ad un diverso dosaggio genico (aploinsufficienza) rispetto ad un soggetto sano o ad un effetto di dominanza negativa esercitato dal mutante per il TSHR nei confronti del wild-type.

Studi in vitro condotti su cellule Cos 7 dimostrano la presenza di un effetto di dominanza negativa esercitato da alcuni mutanti come C41S, L467P, C600R (Calebiro., 2005). In dettaglio, la co-transfezione del wild-type con i mutanti comporta la riduzione sia dell'attività basale (in termini di cAMP), sia l'attività in seguito a stimolo con bTSH rispetto a cellule transfettate solo con il DNA codificante per il recettore wild-type. Inoltre, la co-espressione dei mutanti con il wild-type causa una ritenzione del TSHR non mutato al livello del reticolo endoplasmatico (RE). Attraverso esperimenti di Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) e di co-immunoprecipitazione, è stato possibile evidenziare l'esistenza di una interazione fisica tra i recettori wild-type e mutante. Sulla base di questi dati, si può attribuire il fenotipo lieve di resistenza al TSH di in pazienti arrecanti mutazioni in eterozigosi, alla

dominanza negativa che il mutante esercita sul recettore originario e quindi alla riduzione del numero di recettori wild-type che, a causa del processo di oligo-dimerizzazione, rimangono ritenuti nel RE insieme al mutante (Calebiro, 2005.; Persani., 2007). In conclusione, qualunque sia il meccanismo coinvolto - sia esso associato ad una riduzione dell'espressione del recettore sulla membrana plasmatica o associato ad una ridotta affinità per il ligando o ad un'alterata attivazione della cascata di trasduzione del segnale - è certo che vi è una correlazione tra l'alterazione della funzionalità del recettore valutata in vitro e il fenotipo clinico (Kimura., 2001).

Come suggerito precedentemente, un altro fattore che influenza la gravità del fenotipo è correlato al numero di alleli mutati. In realtà, nelle forme dominanti in cui è mutato un solo allele presentano un fenotipo mite, mentre la presenza di due alleli mutati è associata ad un fenotipo generalmente grave.

Per questo motivo, la resistenza al TSH è stata originariamente descritta come una malattia recessiva (Sunthornthepvarakull, 1995.; De Felice e Di Lauro, 2004). La correlazione tra gravità del fenotipo e il dosaggio genico può essere osservata già da un'attenta esame del pedigree familiare resistenza completa al TSH in cui gli individui affetti presentano un fenotipo chiaro e grave hanno ereditato due alleli mutati; famiglie i cui membri affetti presentano varianti in eterozigosi manifestano un fenotipo di resistenza al TSH più lieve (Alberti., 2002).

Concludendo, il numero di alleli mutati, la compromissione della funzionalità del TSH recettore causata da mutazioni specifiche e, probabilmente, la loro capacità o meno di interferire attraverso un meccanismo di dominanza negativa sulla la funzionalità del recettore wild-type sono determinanti importanti per l'espressione fenotipica della gravità della malattia. Tuttavia, i test di funzionalità tiroidea possono variare considerevolmente tra diversi individui affetti con la stessa mutazione o tra membri della stessa famiglia.

In aggiunta, fluttuazioni dei livelli di TSH possono essere osservati anche nello stesso individuo. Questi risultati suggeriscono che i fattori ambientali (ad esempio la richiesta di ormoni tiroidei e l'apporto alimentare di ioduro) e i fattori genetici, di cui alcuni ancora sconosciuti, possono svolgere un ruolo nell'eziologia della resistenza al TSH.

SCOPO DELLO STUDIO

L'ipotiroidismo è una sindrome clinica dovuta ad un'insufficiente azione degli ormoni tiroidei a livello tissutale e determina un rallentamento di tutti i processi metabolici. L'ipotiroidismo che si sviluppa durante la vita fetale e/o neonatale, determina una riduzione importante e spesso permanente dei processi accrescitivi e di sviluppo neurologico, mentre l'ipotiroidismo nell'adulto, che ha una frequenza elevata (20.6-20.8%), con maggior frequenza nel sesso femminile, nell'età avanzata e, nella maggior parte dei casi, è conseguente alla patologia autoimmune, determina un rallentamento generalizzato dei processi metabolici.

Delle tre principali forme di ipotiroidismo nel seguente studio abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla condizione che viene definita *resistenza al TSH*, una malattia genetica, caratterizzata da un'elevata concentrazione di TSH nel siero e una normale o ridotta concentrazione di ormoni tiroidei che sono associati a ghiandola in sede con dimensioni normali o leggermente ridotte e in assenza di autoanticorpi (Refetoff, 2003. Beck-Peccoz et al, 2006 a, b, Persani, 2010). La resistenza al TSH è generalmente dovuta a mutazioni nel TSHR che risultano parzialmente o completamente inattivanti.

Il recettore TSHR per la tireotropina (TSH) appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR) di classe A. Strutturalmente è caratterizzato da due unità funzionalmente distinte: un dominio extra-cellulare (ECD) di grandi dimensioni, responsabile del legame con l'ormone glicoproteico e un dominio transmembrana (TMD), responsabile della trasduzione del segnale all'interno della cellula.

L'ECD è composto da cosiddetti "leucine rich repeats" (LRRs), che mediano le interazioni proteina-proteina, e da due domini ricchi in cisteine "CYSTEINE-RICH FLANKING REGIONS" (CFR).

Il TMD è caratterizzato da sette motivi transmembrana tra loro collegati per mezzo di "loop" intra- o extra-cellulari.

Il TSHR, in seguito al legame con il ligando, attiva la via preferenziale dell'adenilato-ciclasasi/AMP ciclico mediata dalla G_s .

In seguito alla clonazione del gene TSHR (localizzato sul cromosoma 14) è stato possibile identificare, attraverso il sequenziamento dello stesso, una serie di varianti patogenetiche loss of function (LOF).

Ad oggi sono state identificate e documentate numerose varianti LOF a carico del gene TSHR associate a resistenza al TSH

Tra queste distinguiamo:

- **Varianti Missenso** che apportano cambio amminoacidico;
- **Varianti non senso** che portano alla generazione prematura di un codone di STOP generando dal punto di vista proteico una molecola tronca ;
- **Delezioni o inserzioni** che portano ad un conseguente cambio del modulo di lettura dell'RNA polimerasi (frameshift) che spesso generano un segmento variante della proteina generata a causa di un arresto prematuro di traduzione;
- **Alterazioni introne-esone che** si verificano nelle zone di confine tra un introne e un esone o viceversa. Queste varianti ad esempio inducono errori nel processo di splicing portando alla fusione di un esone con una parte di introne alterando così il frame di traduzione della proteina.

Avendo a disposizione la più grande coorte (n = 153 + n=131) di pazienti pediatrici affetti da ipertirotropinemia non autoimmune isolata fino ad oggi studiata, è stato possibile, analizzando a fini diagnostici il DNA dei pazienti, individuare varianti in eterozigosi, di cui dodici mai descritte prima.

La ricerca descritta è stata condotta con lo scopo di caratterizzare funzionalmente le varianti individuate in modo da attribuire ad esse un ruolo patogenetico nella resistenza al TSH. Inoltre, essendoci una diatriba letteraria caratterizzata da dati dissimili sull'attività di G_q nel signalling del TSH recettore, intendiamo chiarire la rilevanza fisiologica della trasduzione del segnale mediata dalla suddetta proteina eterotrimerica. Infine, ma non meno importante, avendo a disposizione una casistica molto ampia, è nostro obiettivo fornire un valore di frequenza di presenza di variante genetica associata a resistenza al TSH quanto più rappresentativo per la popolazione italiana.

MATERIALI E METODI

1. CASI CLINICI

La casistica oggetto del nostro studio è composta da 284 pazienti, 161 maschi e 123 femmine divisa in due sotto casistiche rispettivamente composte da 153 pazienti (83 maschi e 70 femmine) e 131 pazienti (78 maschi e 53 femmine) provenienti da diversi centri collaboranti. I criteri utilizzati per la selezione dei casi clinici sono stati i seguenti:

- Età: 0 - 18 anni
- Assenza di anticorpi anti-tiroide (anti-TPO, anti-Tg)
- Volume e struttura della ghiandola tiroidea nella norma
- Assenza di grandi difetti congeniti associati quali difetti cardiaci congeniti o note alterazioni cromosomiche
- Livelli di TSH sierico: 4 - 20 mU/L (v.n. : 0.27 – 4.2 mU/L)
- Livelli di T4 libera nella norma.

È stata eseguita l'analisi genetica, tramite screening basato su DHPLC e successivo sequenziamento del gene del TSHR.

È stata inoltre effettuata l'analisi dei familiari dei pazienti in cui è stata riscontrata la mutazione del gene TSHR tramite sequenziamento diretto. Lo studio è stato approvato dai comitati etici locali, e dei genitori dei pazienti che hanno sottoscritto un consenso informato.

2. ANALISI GENETICA

2.1 Estrazione del DNA

Il DNA dei pazienti è stato ottenuto da 3 ml di sangue periferico conservato in EDTA utilizzando il kit di estrazione “Puregene DNA Purification Kit” (GENTRA Systems) oppure è stato inviato già estratto e purificato dai diversi centri afferenti allo studio.

Il protocollo di purificazione prevede una prima fase di lisi cellulare, seguita da una fase di deproteinizzazione per precipitazione e infine una fase di precipitazione del DNA con isopropanolo 100% e lavaggio con etanolo al 70%.

Il DNA ottenuto viene quindi risospeso in un volume adeguato di H₂O bidistillata, incubato una notte a temperatura ambiente in modo che si scioglia completamente e infine quantizzato allo spettrofotometro e controllato su un gel d'agarosio all'1% in TAE 1X (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M).

2.2 Amplificazione genica

Il primo passaggio per l'analisi del gene del TSHR nella casistica descritta è stato amplificare i frammenti genici d'interesse; successivamente i frammenti amplificati sono stati analizzati mediante DHPLC o sequenziamento automatico .

L'amplificazione genica è stata eseguita mediante PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizzando il DNA genomico estratto come template (50 -200 ng), 10 pmoli/μl di oligonucleotidi specifici (primers) senso (F, Forward) e antisenso (R, Reverse), diverse concentrazioni di Magnesio, Taq-DNA Polimerasi specifiche con il proprio tampone e 200 μM di nucleotidi trifosfato (dNTPs) per ogni base, in un volume finale di 50 μl.

La reazione consiste in:

- Un ciclo di denaturazione a 95 °C di 3'
- Un ciclo ripetuto 35 – 40 volte di amplificazione esponenziale dei frammenti genici costituito da tre step:
 - Denaturazione a 95 °C per 30''
 - Ibridazione dei primers alla temperatura di “annealing” (T_a), specifica per ogni reazione, per 30''

- Estensione a 72 °C per 40''
- Un ciclo di estensione finale a 72 °C di 5'.

La sequenza codificante del gene del TSHR, comprese le regioni di giunzione introne-esone, è stata suddivisa in 15 frammenti per l'analisi degli esoni 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; in particolare è stato suddiviso in 6 frammenti l'esone 10 (10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6) a causa della elevata lunghezza.

In tabella sono riportate le condizioni di PCR utilizzate nelle analisi genetiche.

Esone	Forward Primer (5'→ 3')	Reverse Primer (5'→ 3')	T _a (°C)	Dimensioni prodotto di PCR (bp)
1	GAG GAT GGA GAA ATA GCC CCG AG	CAC TAC TTC GGG CTG TTA TTG AG	64	302
2	TAA GGT GAA TTA TTA GAA AAG C	CTT GAT AGA ACA CGT TTA GAG AA	50	205
3	ATG ATC TGG GAA GCG CAT AA	TCA AGA AAC CAG CTC CCA TT	55	304
4	ACC CTG TGG CGT AAA TGC ATA T	CCC GAC CCA GGC TAT ACA CCA TT	50	329
5	TTG TCT TCA GAA CCC ATG CTT	TCA TTG CTT ACT CCT TGA AAC AA	50	291
6	TAT TGT GTC CTG TTA TTT AAG TGC ATA T	GTA CTC TAT AGA GTA TAT ATG ATA AGG	48	293
7	TGG GAT ACA TAT GTG GGA CCT G	TGT TGG TCA CAC TAA CTC TGG	58	324
8	TGA AAT CAG TCA ATA CTA TGG TCA CA	GCA ACA TTT TCT ACC CTT GAA CA	54	272
9	TCA TCT CCCAAT TAA CCT CAG G	GCT TCC AAT TTC CTC TCC AC	54	408
10.1	TGG CAC TGA CTC TTT TCT GT	GGG TTG AAC TCA TCG GAC TT	48	370

10.2	CCC AGG AAG AGA CTC TAC AAG	TGC AAA GAC AGT GAA GAA ACC A	58	395
10.3	CTG GCC TTT GCG GAT TTC TGC	TTG TCC CCT GGG TTG TAC TGC G	64	488
10.4	GGC ACG CAT GTG CCA TCA TGG TTG GGG GCT	CCT CTG GAA GGC CTT GGT GAA	62	456
10.5	CGC AGT ACA ACC CAG GGG ACA A	GTT CCC CTA CCA TTG TGA G	56	495
10.6	GAA GCA AGG CCA AAT CTC	GTG TCA TGG GAT TGG AAT GC	50	122

Tabella 1. Condizioni di reazione per l'amplificazione del gene del TSHR

Le reazioni di PCR degli esoni 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10.1, 10.2, 10.3, 10.6 sono state allestite utilizzando 50-100 ng di DNA genomico, estratto come descritto in precedenza, e la Taq DNA-polimerasi OPTIMASE (Transgenomic), avente attività 3'→5' esonucleasica con il suo tampone 10X e concentrazioni di MgSO₄ determinate mediante tentativi successivi per stabilire quelle ottimali per la reazione di amplificazione. Le PCR degli esoni 10.4 e 10.5, invece, sono state allestite utilizzando 200 ng di DNA genomico come template e la Taq DNA-polimerasi AmpliTaqGOLD (Applied Biosystems), una hot-start Taq dotata anch'essa di attività 3'→5' esonucleasica, con il suo tampone 10X e concentrazioni di MgCl₂ ottimali per la reazione di amplificazione. La reazione di PCR dell'esone 8, infine, è stata condotta mediante l'utilizzo di 200 ng di DNA genomico e della Taq DNA-polimerasi Promega con il proprio tampone 5X.

2.3 DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*)

La DHPLC è una tecnica separativa in grado di risolvere i componenti di una miscela di molecole di DNA, quali i prodotti di PCR, sulla base della differente velocità di migrazione degli *eteroduplex* rispetto agli *omoduplex* all'interno di una colonna cromatografica in condizioni parzialmente denaturanti.

I *duplex* si formano quando i frammenti di DNA amplificati con PCR vengono denaturati termicamente e lasciati ri-appaiare. In un soggetto eterozigote si ha la formazione degli *eteroduplex*, prodotti dalla combinazione di due singole eliche non perfettamente complementari con formazione di mismatch nel sito di mutazione (Fig. 1).

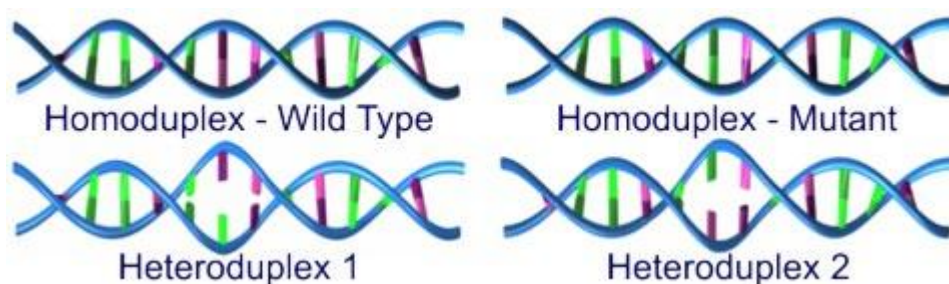


Figura 5 Rappresentazione schematica della formazione di homoduplex o eteroduplex

La DHPLC è in grado di discriminare l' *eteroduplex*, che alla temperatura indicata come “temperatura di parziale denaturazione” presenta una parziale denaturazione in corrispondenza del “misappaiamento”, dall' *omoduplex*, che alla stessa temperatura è ancora sotto forma di doppia elica.

La separazione di molecole di DNA si basa sulla tecnica della ripartizione in fase inversa per accoppiamento ionico: uno ione anfipatico, il TEAA (Trietilammonio Acetato), contenuto nella fase liquida (Buffer A), viene assorbito dalla fase stazionaria idrofobica (particelle di polistirene-divinilbenzene alchilato non poroso) e al tempo stesso genera una superficie carica positivamente per l'interazione con le cariche negative dei gruppi fosfato del DNA (Fig.2). L'eluizione avviene attraverso un solvente organico (Buffer B), contenente TEAA ed Acetonitrile, che spiazza il legame tra la resina ed il complesso TEA-DNA.

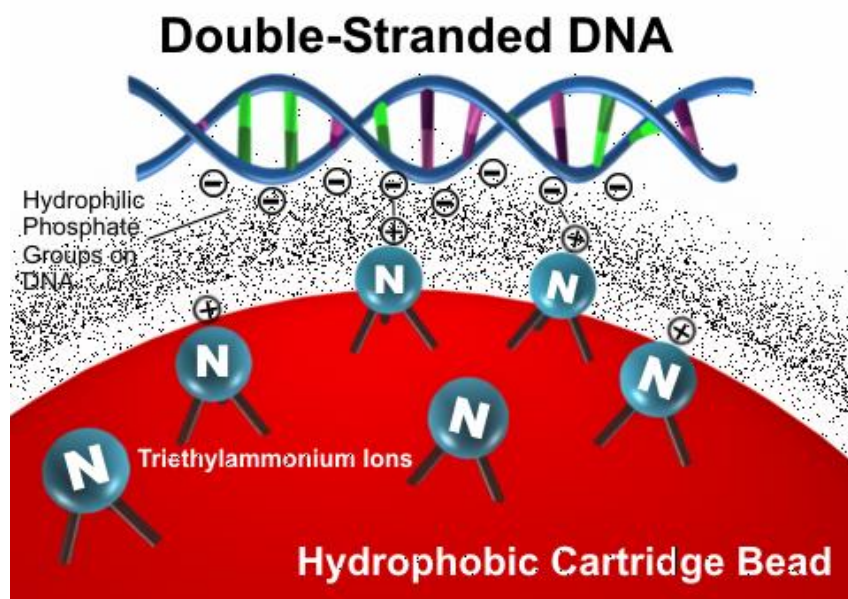


Figura 6 Schematizzazione del legame chimico tra il gruppo fosfato della catena di DNA e la matrice di trietilammonio acetato del DHPLC

Le caratteristiche steriche dei *duplex* determinano il loro comportamento cromatografico. Gli *eteroduplex*, alla “temperatura di parziale denaturazione”, espongono nel mismatch gruppi ossidrilici e fosfato risultando più polari e quindi meno propensi alla formazione di interazioni idrofobiche con la colonna. Questa condizione di instabilità determina un’eluizione precoce rispetto agli *omoduplex*, cioè in presenza di una minore concentrazione di solvente organico. Pochi microlitri del campione da analizzare vengono prelevati dall’autocampionatore e iniettati nella colonna.

Inizialmente i due eluenti vengono pompati con la stessa concentrazione, in seguito, attraverso un gradiente crescente di concentrazione del buffer B si ottiene via via l’eluizione dei frammenti di DNA, dal più polare al meno polare. I frammenti eluiti fluiscono nel sistema rivelatore, uno spettrofotometro che legge a 260 nm, la lunghezza d’onda alla quale si ha il picco di assorbimento degli acidi nucleici. Un software provvede quindi alla raccolta dei dati provenienti dallo spettrofotometro e alla loro rappresentazione in tempo reale attraverso un cromatogramma.

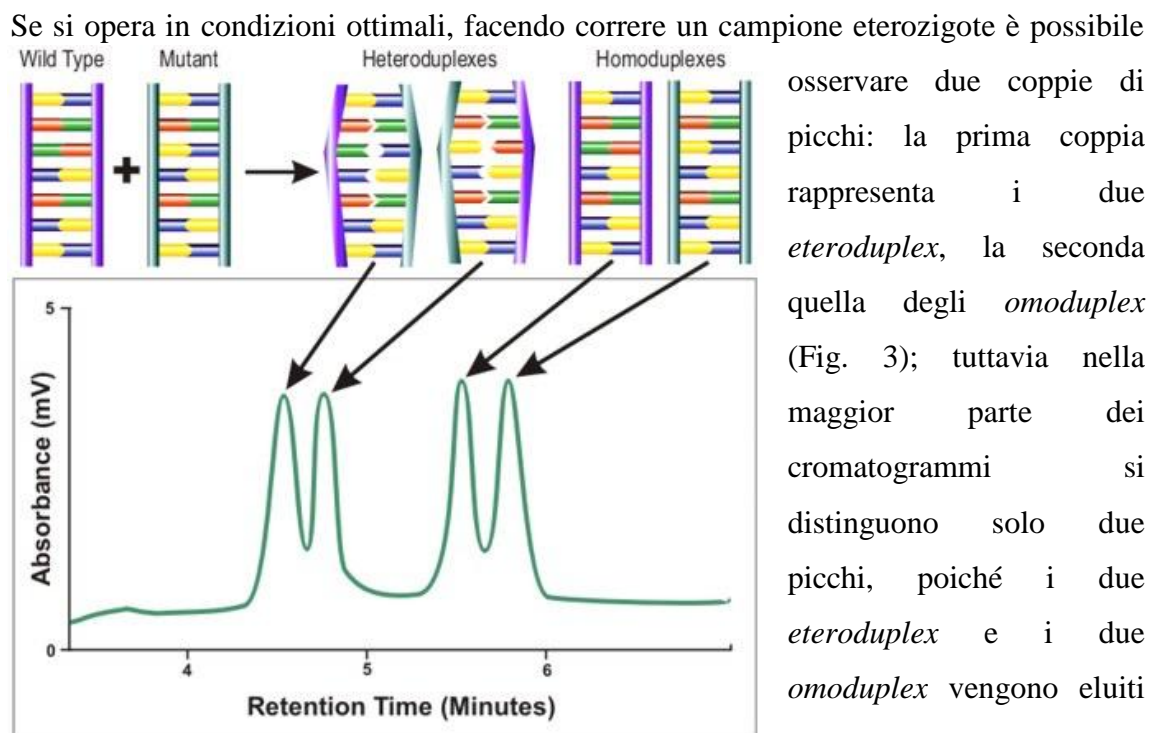


Figura 7 Cromatogramma di un soggetto eterozigote

campione omozigote (wt o mutato) si osserva invece solo il picco degli *omoduplex*.

I fattori sperimentali determinanti sono quindi:

- La “temperatura di parziale denaturazione”, (determina il grado di denaturazione della molecola di DNA a seconda della presenza o meno di mismatches);
- La composizione nucleotidica della sequenza di DNA, (sequenze ricche in A/T necessitano di temperature di parziale denaturazione minori rispetto alle sequenze ricche di G/C)
- La concentrazione del TEAA nei buffer, (a concentrazioni maggiori deve corrispondere un aumento della temperatura per ottenere un buon livello di denaturazione e, di conseguenza, di separazione degli *omo-* ed *etero-duplex*).

I frammenti genici amplificati sono stati sottoposti a DHPLC e analizzati mediante il software WAVEMAKER™ (Transgenomic) per la predizione del dominio di melting di ciascuno e la scelta delle relative temperature di parziale denaturazione per l’analisi (3 temperature per ciascun frammento genico) (Tab. 3)

<i>Esone</i>	<i>Temp. 1</i> (°C)	<i>Temp. 2</i> (°C)	<i>Temp. 3</i> (°C)
1	61.5	62.5	64
2	54	55	56
3	55	56.5	58.5
4	56.2	57.2	58.2
5	54.5	55.5	56
6	56.5	57.5	58.5
7	58	59	60
8	54	55.5	56.5
9	58.5	59.5	61
10.1	57.8	58.8	59.8
10.2	59.5	60.5	61.5
10.3	59.5	60.5	62
10.4	58.5	59.5	60.5
10.5	57.5	58.5	59.5
10.6	52	54	55

Tabella 3. Temperature di denaturazione parziale per ogni esone del gene TSHR

L'analisi con DHPLC prevede, oltre all'amplificazione dei frammenti genici di interesse di ogni paziente, anche l'amplificazione dello stesso frammento con sequenza wild-type (precedentemente determinata). I prodotti della reazione vengono miscelati in rapporto 1:5, denaturati per 5' a 95 °C e lasciati rinaturare lentamente a temperatura ambiente per consentire la formazione di eteroduplex.

Questa metodica consente il riconoscimento della presenza di sostituzioni nucleotidiche, piccole inserzioni e delezioni nel 98-99% dei casi.

I campioni che presentano un profilo di eluizione diverso dal controllo wild-type vengono riamplicati a partire dal DNA genomico e i prodotti di PCR ottenuti vengono sottoposti a sequenziamento automatico, come descritto in seguito.

2.4 Sequenziamento diretto

Per arrivare a determinare la sequenza genica del frammento amplificato sono necessari 5 passaggi:

1. elettroforesi su gel d'agarosio del prodotto della reazione di PCR
2. purificazione dal gel della banda di amplificazione ottenuta
3. quantizzazione della banda purificata
4. reazione di sequenza
5. analisi al sequenziatore

2.4.1 Elettroforesi su gel di agarosio

Il prodotto di ogni reazione di amplificazione viene controllato su un gel d'agarosio ad una percentuale adeguata alla dimensione dei frammenti d'interesse; nel nostro caso sono sempre stati utilizzati gel al 3% che separano adeguatamente bande dalle dimensioni comprese tra 100 e 1000 paia di basi (bp).

Il gel viene preparato in un adeguato volume di TAE 1X e addizionato con bromuro d'etidio concentrato 1µg/µl. Il campione viene caricato su gel miscelato a un gel-loading buffer (0.25% blu di bromofenolo e 40% saccarosio in H₂O) che rende il campione più pesante, in modo che non fuoriesca dal pozzetto durante il caricamento e i primi minuti di corsa, ed evidenzia il fronte di corsa. L'elettroforesi del campione caricato su gel viene eseguita applicando una differenza di potenziale variabile dai 90 ai 100mV; dopo circa 30' si visualizza il gel al transilluminatore e si verifica che sia presente l'amplificato del frammento d'interesse confrontandone le dimensioni con il marker di riferimento quindi, nel caso in cui si voglia effettuare la sequenza, si taglia la banda da purificare.

2.4.2 Purificazione da gel

Questo passaggio viene effettuato utilizzando un prodotto specifico commercializzato da Amersham Biosciences, GFXTM PCR – DNA and Gel Band Purification Kit: in questa fase vengono rimossi i sali, gli enzimi, i nucleotidi non utilizzati e gli oligonucleotidi presenti nella reazione che interferirebbero poi con il sequenziamento.

2.4.3 Quantizzazione

Questa fase permette di determinare la quantità di frammento che si è amplificata e purificata dal gel.

La metodica si basa sull'utilizzo di un marker specifico, "Bio Marker[®] Low", che contiene bande di DNA lineare a doppio filamento di 1000, 700, 525, 500, 400, 300, 200, 100 e 50 paia di basi e la concentrazione di ogni banda è di 50ng/5µl; le bande da 500 e 525 bp appaiono come un'unica banda e quindi di intensità doppia.

La quantificazione della banda viene eseguita con una elettroforesi su gel di agarosio in cui viene caricato lo stesso volume di marker e di ciascuna banda e il successivo confronto dell'intensità di ogni campione con la banda del marker di peso molecolare più vicino.

2.4.4 Reazione di sequenza

Questo passaggio consiste in una reazione di PCR che contiene la banda da sequenziare, l'oligonucleotide specifico, senso o antisense, da cui partirà il sequenziamento, il buffer 5X e una mix "Big Dye Terminator" versione 3.1, fornita dalla Perkin Elmer, contenente deossinucleotidi trifosfati, AmpliTaq DNA Polimerasi, magnesio, tampone e terminatori, cioè dideossinucleotidi legati ad un fluorocromo diverso in funzione del tipo di nucleotide legato che sarà quindi visualizzato con un colore differente (A: "HEK" verde, C: "FAM" blu, G: "NED" nero e T: "ROX" rosso).

La AmpliTaq DNA Polimerasi utilizzata è caratterizzata da due mutazioni: una nel sito attivo, che le permette di incorporare anche i dideossinucleotidi (terminatori), e una nel dominio N-terminale che elimina l'attività 3'-5' esonucleasica.

I particolari del protocollo sono i seguenti:

- la reazione ha un volume finale di 20 µl;
- ogni reazione deve contenere una quantità di banda purificata pari a 10 ng ogni 100 bp del frammento da sequenziale, 10 pmoli di primer senso o antisense, 4 µl di buffer 5X, 3 µl di "mix" (Big Dye Terminator v3.1) e H₂O bidistillata sterile per raggiungere il volume finale;
- la reazione consiste di 25 cicli:
 - 95°C 15"
 - 55°C 15"

- 60°C 2'

Le reazioni di sequenza dei frammenti genici sono state eseguite, per ciascuno di questi, con il primer senso e con quello antisense, in modo da risolverne l'intera lunghezza.

Il prodotto della reazione di sequenza deve quindi essere purificato dall'eccesso di dideossinucleotidi e di sali e poi può essere analizzato dal sequenziatore automatico.

La purificazione viene effettuata con specifiche colonne "CENTRI-SEP Spin Column" commercializzate dalla Princeton Separations; il protocollo prevede che le colonne vengano idratate con 700 µl di H₂O sterile circa 30' prima dell'utilizzo, quindi posizionate nell'apposito tubo, centrifugate per 7' a 3000 × rpm per permettere la ricostituzione della resina. Dopo la centrifugazione si trasferisce la colonna in una provetta da 1.5 ml; si applica la reazione di sequenza al centro della resina e si centrifuga nuovamente a 3000 × rpm per 4'.

Si trasferisce parte dell'eluato in una piastra MicroAmp[®] (Applied Biosystem) e vi si aggiungono 10 µl di formamide che favoriscono la denaturazione del template.

A questo punto, dopo una breve denaturazione a 95°C (1' circa), la sequenza è pronta per essere caricata sul sequenziatore.

2.4.5 Il sequenziatore e l'analisi delle sequenze

La reazione di sequenza produce frammenti di diversa lunghezza della regione da sequenziare a causa della presenza dei terminatori: quando la polimerasi incorpora un dideossinucleotide, legato al fluorocromo specifico per una delle quattro basi nucleotidiche, non è più in grado di continuare la reazione di polimerizzazione ed il prodotto risulta troncato. Durante l'elettroforesi capillare, che è il principio di funzionamento del sequenziatore, i frammenti di minori dimensioni vengono assorbiti sulla colonna cromatografica più velocemente rispetto ai frammenti di dimensioni maggiori, per cui vengono eccitati per primi dal laser che irradia attraverso una finestra definita i frammenti che percorrono il capillare. A seconda della base con cui termina il frammento e, di conseguenza, del fluorocromo associato, il sequenziatore rileva un segnale di fluorescenza diverso.

L'analisi dei segnali rilevati viene eseguita dal programma ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystem, Foster City, USA) e l'analisi di sequenza è eseguita con il programma Sequencing Analysis Navigator (Perkin Elmer Applied

Biosystem, Foster City, USA): la risultante è un profilo a picchi di diversa altezza e colore che identificano le quattro basi del DNA (elettroferogramma).

Nel caso in cui si confermasse la presenza dell'anomalia nella sequenza, l'intero procedimento viene ripetuto partendo da una nuova estrazione di DNA. In caso di ulteriore conferma, ci si deve assicurare che non si tratti di un polimorfismo (SNPs): prima verificando che l'alterazione non sia presente nel SNPs Database (Genebank) e successivamente sequenziando la regione d'interesse in controlli "normali".

Se nessuno dei controlli ha l'alterazione, presumibilmente non si tratta di un polimorfismo e si può quindi pensare di effettuare studi funzionali in vitro per definire se e come questa mutazione possa modificare la funzione del prodotto genico.

3 STUDI FUNZIONALI E MOLECOLARI

In prospettiva degli studi funzionali, le varianti del gene del TSHR, identificate attraverso l'analisi genetica della nostra casistica, sono state inserite per mutagenesi in vettori di espressione pTARGET™ Mammalian Expression Vector System (Promega Corporation, Fig. 4) già clonati con il gene wild type “in frame”.

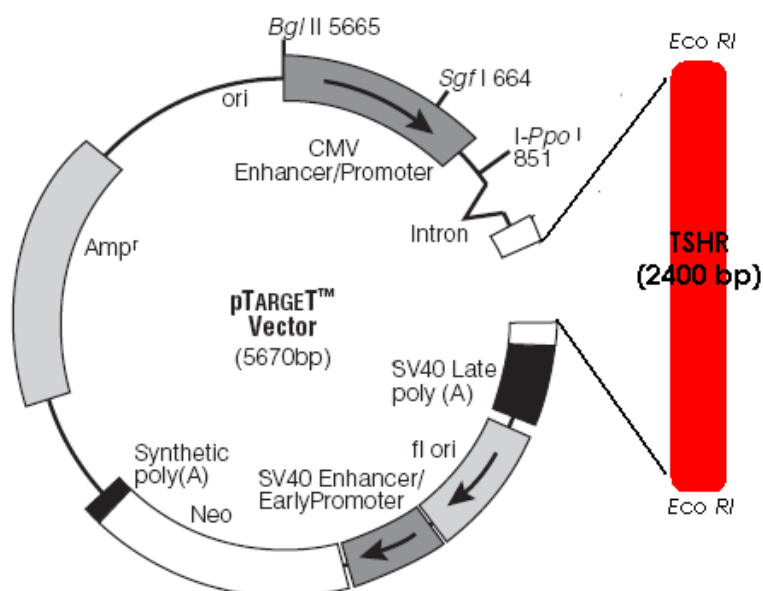


Figura 4 Rappresentazione schematica del vettore di clonaggio pTarget (Promega)

Successivamente i costrutti sono stati amplificati in batteri e introdotti in cellule di mammifero (COS-7) per consentire l'espressione del recettore mutante e la valutazione degli effetti delle mutazioni sul livello di espressione in membrana e sulla produzione di cAMP in seguito a stimolazione.

3.1 Mutagenesi

Il plasmide pTARGET™ Mammalian Expression Vector System è stato mutagenizzato per ciascuna variante con il kit Stratagene (QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit), utilizzando la *Pfu ultra*® DNA polimerasi che amplifica entrambi i filamenti del plasmide a partire da due oligonucleotidi sintetici contenenti la mutazione di interesse (Tabella 4). Le coppie di primers per ogni variante sono complementari e si appaiano ai filamenti senso e antisense del plasmide, hanno una lunghezza compresa tra 25 e 45 basi, una $T_m \leq 78^\circ\text{C}$ e sono progettate in modo da portare nel centro la mutazione da inserire.

Tabella 4. Oligonucleotidi utilizzati per la reazione di mutagenesi del gene del TSHR.

L57P	F: 5'-GCCAGTACGCAGACTCCGAAGCTTATTGAGACTC-3'
	R: 5'-GAGTCTCAATAAGCTTCGGAGTCTGCGTACTGGGC-3'
P162L	F: 5'-CTTGAAATTACAGACAACCTTTACATGACGTCAATC CCTGTG-3'
	R: 5'-CACAGGGATTGACGTCATGTAAAGGTTGTCTGTAAT TTCAAG-3'
P162S	F: 5'-ATACTTGAAATTACAGACAACCTTTACATGACGTCA ATCCCTG-3'
	F: 5'-CAGGGATTGACGTCATGTAAAGAGTTGTCTGTAATTT CAAGTAT-3'
Y466C	F: 5'-CGGATTTCTGCATGGGGATGTGCCTGCTCCTCA-3'
	R: 5'-GCCTAAAGACGTACCCCTACACGGACGAGGAGT-3'
I583T	F: 5'-TCTTGCTCTGGCATATACTGTTTTTGTCTGACG-3'
	R: 5'-CGTCAGAACAAAAACAGTATATGCCAGAGCAAGA-3'
T607I	F: 5'-TATGTGAAGATCTACATCATAGTCCGAAATCCGCAG TAC-3'
	R: 5'-GTACTGCGGATTTCCGGACTATGATGTAGATCTTCAC ATA-3'
R609Q	F: 5'-AGATCTACATCACAGTCCAAAATCCGCAGTACAAC-3'
	R: 5'-GTTGTACTGCGGATTTGGACTGTGATGTAGATCT-3'
S745C	F: 5'-GATGTCTATGAACTGATTGAAAAC TGCCATCTA ACCCCAA-3'

	R:5'-CTTTGGGGTTAGATGGCAGTTTTCAATCAGTTC ATAGACATC-3'
P668L	F:5'-GCTGGTACTCTTCTATCTACTTAACTCCTATGCC-3'
	R: 5'-GGCACAGGAGTTAAGTAGATAGAAGAGTACCAG C-3'

In dettaglio, la reazione di mutagenesi viene eseguita in un volume finale di 50 µl e contiene:

- 5 µl di tampone 10X (100 mM KCl, 100 mM (NH₄)SO₄, 200 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM MgSO₄, 1% Triton[®] X-100, 1 mg/ml BSA)
- 50 ng di DNA template
- 125 ng di ogni primer
- 1 µl di nucleotidi trifosfato 10 mM
- 2.5 U di Pfu ultra DNA Polimerasi

Il programma della reazione di mutagenesi prevede un ciclo di 30" a 95°C seguito da 12-16 cicli, a seconda del tipo di mutazione introdotta (12 per le mutazioni puntiformi, 16 per l'inserzione amminoacidica), costituiti da:

- 30" di denaturazione a 95°C
- 1' di appaiamento dei primers a 55°C
- 16' di estensione (2 minuti per ogni Kb di lunghezza del plasmide) a 68°C.

Al termine della reazione di amplificazione, il prodotto viene trattato per un'ora a 37°C con 10 U di *DpnI*, un'endonucleasi specifica per il DNA metilato ed emimetilato, che digerisce il DNA parentale (il DNA estratto da *E. Coli* è infatti metilato) e seleziona il DNA neosintetizzato contenente la mutazione, che viene utilizzato per trasformare le cellule batteriche competenti chimicamente.

3.2 Trasformazione delle cellule batteriche

Un'aliquota del prodotto della reazione di mutagenesi (5 µl), conservato a -20°C fino al momento della trasformazione, viene aggiunta a 50 µl di cellule batteriche chimicamente competenti DH5α (Invitrogen), si incuba in ghiaccio per 30', quindi si sottopongono le cellule ad uno shock termico a 42°C per 45" e si aggiunge 1 ml di S.O.C. medium (in 100 ml: 2 g di Bacto[®] Tryptone, 0.5 g di Bacto[®] Yeast Extract, 1 ml di NaCl 1M, 0.25 ml di KCl 1M, 1 ml di glucosio 2M e 1 ml di stock Mg²⁺ 2mM - 1M MgCl₂·6H₂O + 1M MgSO₄·7H₂O – Invitrogen). Si incuba per un'ora in agitazione a 37°C, quindi si piastrano 1/5 delle cellule e la restante parte su piastre di terreno solido LB (in 1l: 10 g di Bacto[®] Tryptone, 5 g di Bacto[®] Yeast Extract, 5 g di NaCl) addizionato di ampicillina 1000X. Le cellule vengono lasciate crescere per una notte a 37°C, quindi i cloni ottenuti, che hanno incorporato il plasmide e, con esso, la resistenza all'ampicillina, vengono sequenziati per verificare che la mutazione sia stata introdotta e che la restante parte della sequenza sia normale.

Per la reazione di sequenza, il DNA plasmidico viene estratto dalle colture dei cloni utilizzando il kit "QIAprep[®] miniprep" (QIAGEN) basato su una modificazione del metodo della lisi alcalina. Il protocollo prevede tre passaggi principali: la lisi delle cellule batteriche in condizioni alcaline e successiva neutralizzazione della reazione, la rimozione dei detriti cellulari e purificazione su una resina di silice che lega selettivamente il DNA plasmidico e, infine, lavaggio ed eluizione del DNA dalla resina con acqua sterile. Analogo è il protocollo del kit "QIAprep[®] maxiprep" (QIAGEN) che è stato utilizzato per estrarre quantità maggiori di DNA plasmidico e con maggiore purezza per effettuare gli studi funzionali mediante trasfezione: il principio sfruttato è sempre quello della lisi alcalina, variano i volumi della coltura batterica di partenza e dei reagenti utilizzati, nonché la capacità della resina.

3.3 Subclonaggio

L'inserto mutagenizzato per la variante d'interesse del gene del TSHR è stato exciso per essere subclonato in un nuovo vettore pTARGET™. L'excisione avviene utilizzando l'enzima di restrizione Eco RI che taglia alle due estremità dell'inserto. Contemporaneamente viene digerito anche il vettore vuoto con lo stesso enzima, che taglia all'interno del polilinker. In questo modo si producono estremità coesive in grado di legare tra loro le due molecole. Il DNA dell'inserto e del plasmide vengono incubati a 37°C per una notte con l'enzima Eco RI nel proprio buffer e acqua sterile in un volume finale di 100 µl. Il prodotto della reazione di digestione viene quindi precipitato con 10% del volume di NaAc 3M pH 5.2 e 3 volumi di EtOH 100%, incubato per 30' a -80°C e centrifugato per 30' a 13000×rpm a 4°C. Eliminato il surnatante, il pellet viene lavato con EtOH 70% e centrifugato nuovamente per 15'. Quindi il pellet viene lasciato asciugare, risospeso in 20 µl di acqua sterile e caricato su gel al 1% per purificare le bande dell'inserto e del plasmide.

Le bande purificate, una volta quantizzate su gel d'agarosio al 3%, vengono ligate mediante incubazione in presenza dell'enzima ligasi: il protocollo prevede l'utilizzo di 100 ng di vettore e 300 ng di inserto (in rapporto 1:3), 1 U di T4 DNA Ligasi (Invitrogen), tampone 5X (250 mM Tris-HCl pH 7.6, MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5mM, 25% PEG 8000) e acqua sterile in un volume finale di 20 µl; la reazione viene incubata per una notte a 14°C.

Il prodotto della reazione di ligazione viene quindi utilizzato per trasformare le cellule competenti DH5α, come descritto in precedenza.

Il controllo dei cloni positivi viene effettuato mediante PCR e con digestione enzimatica.

I cloni positivi a tutti i controlli vengono messi in coltura per una notte a 37°C in 10 ml di terreno LB e quindi congelati in una soluzione al 50% di glicerolo e conservati a -80°C.

3.4 Colture cellulari

Per l'esecuzione di studi funzionali *in vitro*, i costrutti mutati e wild type sono stati inseriti mediante un protocollo di transfezione transiente all'interno di una linea cellulare scelta come sistema per far produrre la proteina d'interesse con un'alta efficienza. La linea cellulare impiegata è rappresentata dalle cellule COS-7, cellule renali di scimmia *African green* trasformate con SV40 contenente un'origine di replicazione difettiva. La transfezione delle cellule COS-7 con plasmidi ricombinanti contenenti un'origine di SV40 e un'unità trascrizionale funzionale permette un'efficiente amplificazione del DNA trasfettato e un aumento dei livelli di espressione transienti del segmento clonato.

Sono state seminate 300.000 cellule in piastre da 3,5 cm (Smits et al, 2003), mantenute in coltura *overnight* in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) addizionato con glucosio 4500 mg/l, 10% FBS (*fetal bovine serum*, siero bovino fetale, Gibco), 1% L-Glutammina 100X (Gibco), 1% di antibiotici (Penicillina/Streptomycina, Sigma), 1% Fungizone (Gibco). Le cellule sono state mantenute a 37 °C e 5% CO₂.

Il giorno successivo le cellule sono state trasfettate con un metodo che impiega il DEAE-destrano (dietilaminoetil-destrano) seguito da uno "shock" con DMSO (dimetil solfossido) che perturbando le condizioni osmotiche e facilitando l'endocitosi aumenta l'efficienza di transfezione di ~50 volte.

3.5 Transfezione con DEAE-destrano

La transfezione è una tecnica che consente di introdurre DNA plasmidico in cellule eucariotiche al fine di indurre tali cellule ad esprimere la proteina codificata dal DNA esogeno. Nel caso della transfezione transiente il DNA non viene integrato nel genoma cellulare, ma rimane in forma episomale: la sequenza codificante per la proteina d'interesse viene trascritta e tradotta e dopo 48 o 72 ore dalla transfezione le cellule possono essere trattate per l'esperimento voluto.

La manipolazione si divide in due tempi: la prima parte prevede l'incubazione delle cellule con lo specifico DNA (durante le tre ore d'incubazione il DNA aderisce alla membrana cellulare, grazie al DEAE-destrano, e in parte inizia ad entrare nella cellula); la seconda parte prevede l'incubazione delle cellule per 2 minuti con DMSO 10% in

DMEM che permette l'apertura di pori nel doppio strato fosfolipidico della membrana e quindi l'ingresso più efficiente del DNA all'interno della cellula. Per eliminare il DMSO, tossico per le cellule, esse vengono lavate due volte con 1 mL di DMEM puro e mantenute in coltura con il medium specifico. Sono stati transfettati 500 ng totali di DNA in petri da 3,5 cm.

Il giorno successivo è stato cambiato il medium di coltura e il terzo giorno dopo la transfezione le cellule sono state utilizzate per la determinazione del cAMP prodotto dopo stimolazione con TSH e per studi di espressione mediante analisi al FACS. Ogni esperimento è stato condotto in duplicato ed è stato ripetuto almeno due volte. Le cellule transfettate con il vettore vuoto sono state impiegate come controllo negativo.

3.6 Analisi di citofluotimetria a flusso

L'acronimo FACS sta per *Fluorescent-activated cell sorter*: le cellule in sospensione monodispersa scorrono in singola fila attraverso un punto d'interrogazione illuminato da un raggio laser, dove riflettono luce ed emettono fluorescenze che vengono raccolte, filtrate e convertite in segnali digitali che vengono elaborati e memorizzati.

Le cellule COS-7 transfettate transientemente con i diversi DNA d'interesse sono state preparate secondo la modalità descritta in precedenza. Dopo essere state staccate dalla piastre con EDTA-EGTA 5mM in PBS e passate in tubi di plastica, sono state centrifugate a 500 x g per 3 minuti a +4 °C e il sovrantante scartato. Si è proceduto quindi all'incubazione con l'anticorpo primario BA8 diretto contro un epitopo della porzione N-terminale del dominio extracellulare del TSHR. L'anticorpo è stato diluito 1:4 in PBS-BSA (0,1% BSA in buffer fosfato salino) e l'incubazione è stata condotta a temperatura ambiente per 30 minuti in un volume totale di 100µl. Le cellule sono state poi lavate con 2 ml di PBS-BSA 0,1% e centrifugate come in precedenza. Sono state poi incubate in ghiaccio e al buio per 30 minuti, con un "*fluoresceine-coniugated γ chain-specific goat-anti mouse IgG*" (Sigma Chemical CO) nello stesso buffer. Al fine di escludere dall'analisi le cellule non vitali insieme all'anticorpo secondario abbiamo aggiunto anche il propidio ioduro (10 µg/ml). Le cellule sono poi state lavate come in precedenza e risospese in 250µl di PBS-BSA 0,1%. Le cellule sono state mantenute in ghiaccio fino al momento della lettura. E' stata valutata la fluorescenza di 10000 cellule per tubo mediante citofluorimetro FACScalibur™ (Becton Dickinson).

3.7 Stimolazione delle cellule per la determinazione del cAMP intracellulare accumulato

Le cellule trasfettate vengono stimolate con la tireotropina bovina (bTSH) a dosi crescenti e in seguito viene dosato l'AMP ciclico (cAMP) intracellulare accumulato a seguito della stimolazione.

Per la determinazione della produzione di cAMP da parte delle cellule trasfettate sono state condotte delle classiche curve concentrazione-effetto al fine di poter definire il profilo farmacologico dei costrutti generati.

Il medium di coltura è stato rimosso dalle cellule in coltura 48 ore dopo la trasfezione ed è stato sostituito con Krebs-Ringer-Hepes buffer (KRH); le cellule vengono incubate in KRH per 30 minuti a 37 °C a bagnomaria. Passato questo tempo le cellule vengono incubate per altri 60 minuti in KHR fresco addizionato con 25µM dell'inibitore delle fosfodiesterasi Rolipram (Sigma), al fine di bloccare la degradazione del cAMP accumulato, e concentrazioni crescenti dello stimolo altamente purificato bTSH (Sigma). Al termine dell'ora d'incubazione si rimuove il medium e si aggiunge HCl 0,1M. Questo passaggio consente la lisi cellulare e il rilascio del cAMP intracellulare accumulato. Gli estratti cellulari sono stati seccati in un concentratore a vuoto, risospesi in acqua e diluiti in modo appropriato per la valutazione del cAMP.

3.7.1 Dosaggio radioimmunologico del cAMP

Si tratta di un metodo radioimmunometrico che si basa sulla competizione tra il cAMP contenuto nei campioni da dosare e un cAMP marcato con ^{125}I per il legame con un anticorpo commerciale specifico anti cAMP. Il metodo è stato messo a punto nei laboratori della Université Libre de Bruxelles (ULB) in Belgio e si basa sul metodo di Brooker (Brooker et al, 1979).

Il dosaggio si articola in quattro passaggi.

1. PREPARAZIONE DELLA CURVA STANDARD

La curva standard è stata preparata diluendo una piccola quantità di cAMP commerciale (1M) in H_2O .

STD:	0	1	2	3	4	5	6	7	8
	Zero	$5 \cdot 10^{-11}\text{M}$	10^{-10}M	$2.5 \cdot 10^{-10}\text{M}$	$5 \cdot 10^{-10}\text{M}$	10^{-9}M	$2.5 \cdot 10^{-9}\text{M}$	$5 \cdot 10^{-9}\text{M}$	10^{-8}M

2. DILUIZIONE DEI CAMPIONI DA DOSARE

I campioni risospesi in acqua vengono diluiti opportunamente perchè risultino nella parte di massima pendenza della curva standard.

3. ACETILAZIONE

L'acetilazione dei campioni e degli standard è in grado di aumentare l'affinità per l'anticorpo anti-cAMP di 40-100 volte. Richiede solo pochi secondi. Ai campioni sono stati aggiunti in sequenza KOH 2N (20 μl) e l'anidride acetica (5 μl) (MERK) e sono stati mantenuti a temperatura ambiente per 30 minuti.

4. SAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO

Trascorsi i 30 minuti necessari per l'acetilazione, si aggiungono ai campioni e allo standard 200 μl di Tampone Imidazolo (Imidazolo 100mM, Acetato pH=7, 1mM EDTA). Ciascun campione viene quindi passato in doppio in tubi di plastica 12x75 e ivi si aggiungono, in sequenza, la soluzione con il cAMP radiomarcato ($\text{I}^{125}\text{cAMP}$ circa

15000 cpm/tubo, BSA 0,01%, Tp acetato) e la soluzione contenente l'anticorpo (Rabbit anti-cAMP, Calbiochem) (Ab α -cAMP ; BSA 0,01%, γ IgG 0,1% in Tp acetato). Per permettere la reazione di legame i tubi sono mantenuti a +4°C *overnight*. Il giorno successivo si precipitano i complessi formati aggiungendo isopropanolo freddo e centrifugando per 30 minuti a +4°C. I tubi sono stati decantati e analizzati al γ -counter (Cobra™ II, Packard).

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. I risultati sono stati espressi in picomoli di cAMP/ml. Le curve concentrazione-effetto sono state elaborate con il programma informatico Prism®(GraphPad Software) ed è stata determinata l'EC₅₀ (*Effective Concentration*).

3.8 Stimolazione delle cellule per la determinazione degli IP_3 accumulati

Le cellule transfettate con quattro costrutti (pTraget, TSHR-pTarget, pRL renilla luciferase reporter vector e pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro] Vector (Fig. 5)) vengono stimulate con la tireotropina bovina (bTSH) a dosi crescenti per 6 ore in OptiMEM® (Life Technologies).

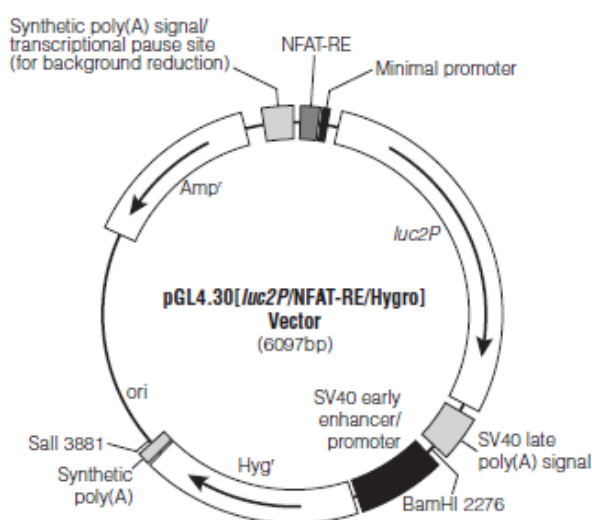


Figura 5 Rappresentazione schematica del reporter pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro]

Per misurare l'attività del gene reporter, indicativo del quantitativo di IP_3 accumulati, è stato utilizzato il kit "Dual-Luciferase® Reporter (DLR) Assay System" (Promega) seguendo le istruzioni del produttore.

Vengono utilizzati contemporaneamente due reporter, la "firefly" luciferasi, sotto il controllo della sequenza con ipotetica funzione promotrice (pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro] Vector, Fig. 5), e la "Renilla" luciferasi, sotto il controllo del promotore virale TK (timidino kinasi). In questo modo si minimizza la variabilità, dovuta a differenze di vitalità cellulare o a errori di trasfezione, così come l'errore sperimentale. Le letture della attività dei geni reporter sono state effettuate utilizzando il luminometro Fluoroskan Ascent FL (Thermo Lab Systems) in modalità DLR.

3.8.1 Analisi statistica

Tutti i risultati sono stati espressi come media \pm errore standard, per l'analisi statistica, è stato applicato il test one-way ANOVA seguito da un test di Bonferroni per dati appaiati. Le differenze tra i dati sono assunte come statisticamente significative quando $p \leq 0.05$.

RISULTATI

Varianti del gene TSHR

È stata condotta l'analisi genetica di 153 giovani pazienti con resistenza al TSH, ipertireotropinemia con livelli di T4 normali, ghiandola tiroidea nella norma ed assenza di anticorpi anti-tiroide.

L'analisi è stata condotta mediante un primo screening basato sulla tecnica del DHPLC dei dieci esoni che compongono il gene TSHR e successivo sequenziamento degli esoni caratterizzati da un profilo di eluzione anomalo, per la corretta determinazione dell'anomalia genetica presente.

L'analisi genetica del gene TSHR ha rivelato la presenza di varianti non polimorfiche in eterozigosi in 18 pazienti su un totale di 153 soggetti affetti da ipertireotropinemia non autoimmune (NAHT). Questi dati corrispondono ad una frequenza dell' 11,8% (Tab.1). Sono state individuate un totale di dodici diverse alterazioni a carico della sequenza codificante. Nove di queste sono considerate come varianti missenso che portano alla sostituzione di un aminoacido nella struttura primaria del recettore per il TSH; due delezioni, p.Q33PfsX46 e p.T655CfsX656 già nota come T655X (del AC), provocano la formazione di un codone di STOP prematuro che genera una proteina tronca non funzionante, e una sostituzione nel sito donatore di splicing dell'introne 4 (g.IVS4 2 A> G).

Quattro delle nove varianti missenso sono state precedentemente descritte (p.C41S, p.P68S, p.P162A, p.T655CfsX656) (Alberti L. et al., 2002; Tonacchera M. et al., 2004; Rapa A. et al., 2009; Nicoletti A., 2009; Camilot M., 2005; Costagliola S., 2008; de Roux N.,1996; Sunthornthepvarakui T.,1995; Tonacchera M., 2001; Tonacchera M., 2007), mentre 7 vengono considerate come nuove. Inoltre queste ultime non sono presenti in 300 alleli di controllo appartenenti alla popolazione generale indicando che non sono comuni polimorfismi (SNPs).

Sette dei 13 probandi portatori di una variante non polimorfica del gene TSHR hanno almeno un parente di primo grado affetto da NAHT. In sei casi è stato possibile raccogliere il DNA e campioni di siero di altri membri della famiglia per definire la modalità di trasmissione della patologia. In cinque di queste famiglie, le variazioni genetiche p.R609Q, p.T655X, p.Q33PfsX46 e g.IVS4 +2 A> G chiaramente co-segrega

con la presenza di livelli di TSH moderatamente elevati avvalorando il ruolo patogenetico della mutazione.

Mutazioni note/Nuove varianti	N (n pts.=153)
<i>a. Missenso</i>	
p.C41S	4
p.P68S	2
p.P162A	3
p.P162L	1
p.R450H	1
p.Y466C	1
p.I583T	1
p.T607I	1
p.R609Q	1
<i>b. Frameshift</i>	
p.Q33PfsX46 (c.97del44nt)	1
p.T655Cfs566X (p.T655X or delAC)	1
<i>c. Introniche</i>	
IVS4+2A>G	1
Totale dei casi con varianti a carico del gene TSHR	18
	(11.8%)

Tabella 3. Frequenza di varianti non polimorfiche del gene TSHR in pazienti pediatriche affetti da ipertiropinemia non autoimmune

In seguito alla pubblicazione del lavoro “*Frequent TSH Receptor Genetic Alterations with Variable Signaling Impairment in a Large Series of Children with Nonautoimmune*

Isolated Hyperthyrotropinemia” (Calebiro et al., 2012), il continuo screening a fini diagnostici sul DNA di giovani pazienti con diagnosi di ipertirotropinemia ha permesso di individuare nuove varianti mai descritte a carico del gene TSHR.

Ad oggi sono stati analizzati altri 131 giovani pazienti con resistenza al TSH, ipertireotropinemia con livelli di T4 normali, ghiandola tiroidea nella norma ed assenza di anticorpi anti-tiroide.

L'analisi genetica del gene TSHR ha rivelato la presenza di varianti non polimorfiche in eterozigosi in 16 pazienti su un totale di 131 soggetti affetti da ipertirotropinemia non autoimmune (NAHT). Questi dati corrispondono ad una frequenza dell' 12,2% (Tab.2).

Delle 11 diverse varianti a carico della sequenza codificante 10 di queste sono considerate come varianti missenso che portano alla sostituzione di un aminoacido nella struttura primaria del recettore per il TSH e una è una sostituzione nel sito donatore di splicing dell'introne 4 (g.IVS4 +1 T>G).

Sei delle 10 varianti missenso sono state precedentemente descritte (p.C41S, p.P68S, p.P162A, p.R450H, p.V597F, p.E124D) (Alberti L. et al., 2001, 2002; Tonacchera M. et al., 2004; Rapa A. et al., 2009; Nicoletti A., 2009; Camilot M., 2005; Costagliola S., 2008; de Marco G.; 2009; Sunthornthepvarakui T., 1995; Tonacchera M., 2001; Tonacchera M., 2007), mentre cinque sono considerate come nuove. Inoltre queste ultime non sono presenti in 300 alleli di controllo appartenenti alla popolazione generale indicando che non sono comuni polimorfismi (SNPs).

Tre dei cinque probandi portatori di una variante non polimorfica del gene TSHR hanno almeno un parente di primo grado affetto da NAHT. In tutti questi casi è stato possibile raccogliere il DNA e, a volte, campioni di siero di altri membri della famiglia per definire la modalità di trasmissione della patologia. In queste famiglie, le variazioni genetiche p.L57P, p.P162S, p.S745C chiaramente co-segregano con la presenza di livelli di TSH moderatamente elevati avvalorando il ruolo patogenetico della mutazione.

Mutazioni note/Nuove varianti	N (n pts.=131)
<i>a. Missenso</i>	
p.C41S	2
p.P68S	2
p.P162A	4
p.P162S	1
p.R450H	1
p.L57P	1
p.P668L	1
p.E124D	1
p.V597F	1
p.S745C	1
<i>b. Introniche</i>	
IVS4-1T>G	1
Totale dei casi con varianti a carico del gene TSHR	16
	(12,2%)

Tabella 4 Frequenza di varianti non polimorfiche del gene TSHR in pazienti pediatriche affetti da ipertirotropinemia non autoimmune

Varianti Frameshift e Introne-Esone

Variante p.Q33PfsX46

La variante *Q33PfsX46* è dovuta ad una delezione di 44 nucleotidi a carico dell'esone 1, codificante per parte dell'ECD, del gene TSHR (c.97del44nt); tale delezione provoca lo spostamento del modulo di lettura del mRNA (frameshift) e la formazione di un codone di STOP prematuro in posizione 46 dell'esone 2 (Fig.1).

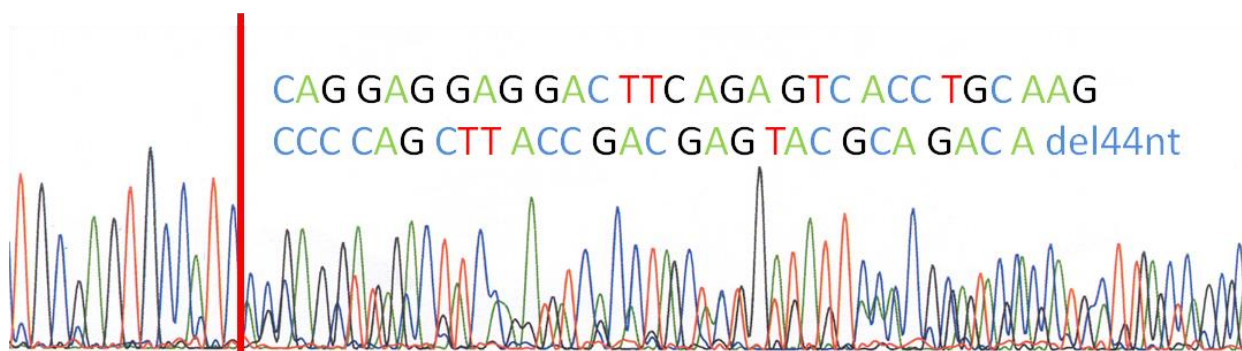


Figura 8 Elettroferogramma della variante Q33PfsX46

L'estensione dell'analisi anche nei familiari ha permesso di individuare la stessa alterazione nel padre del probando (Fig.2).

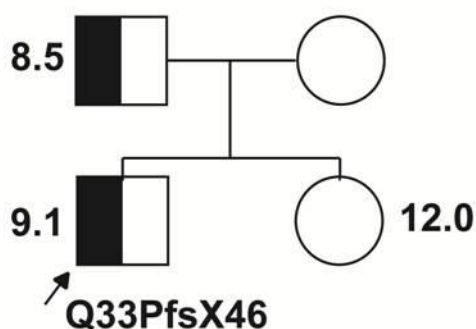


Figura 9 Pedigree del probando portatore della variante Q33PfsX46

Variante intronica g.IVS4 +2 A>G

La variante *IVS4 +2 A>G* è dovuta ad una sostituzione del nucleotide *Adenina*

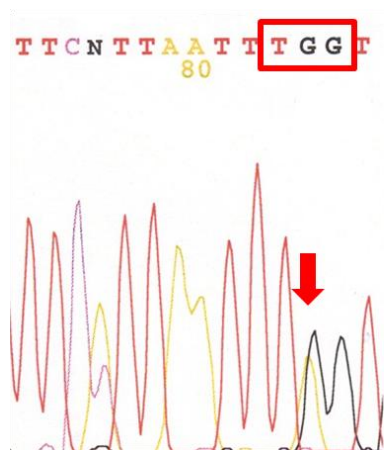


Figura 10 Elettroferogramma della variante *IVS4 +2 A>G*

localizzato nel sito donatore di splicing dell'introne 4 con un il nucleotide *Guanina* modificando la tripletta TAG in TGG. Studi in silico che mimano il processo di *splicing* sottolineano che la tripletta in questione è un sito importante per il meccanismo suddetto e quindi un'alterazione a carico del codone localizzato nel sito donatore di splicing potrebbe annullare il processo. Questo comporterebbe l'unione di un esone con l'introne successivo, provocando a sua volta uno

spostamento del modulo di lettura che porta alla formazione di uno stop prematuro e quindi ad una proteina tronca non funzionante (Fig.3).

Tale variante è stata riscontrata in una paziente pervenuta alla nostra attenzione all'età di diciassette anni con volume ed eco struttura tiroidei normali e ipertirotropinemia (TSH pari a 6.7 mU/L). L'indagine genetica condotta sul DNA dei genitori e sulla sorella della probanda ha permesso di riscontrare la variante anche nella mamma la quale presenta ipertirotropinemia lieve (TSH pari a 5.9) (Fig.4).

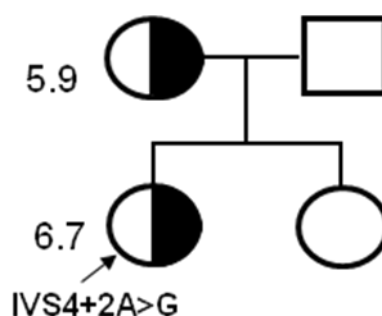


Figura 11 Pedigree del probando portatore della variante *IVS4+2A>G*

Varianti missenso

Variante p. P162L

La variante P162L consiste in una mutazione puntiforme, di nuova identificazione, che determina la sostituzione del residuo di *Prolina* (CCT) 162, localizzato nella regione LLR del dominio extracellulare, con un residuo di *Lisina* (CTT) (Fig. 5).

Tale mutazione è stata riscontrata in un paziente di 16 anni, i cui DNA dei familiari non sono pervenuti per l'analisi genetica.

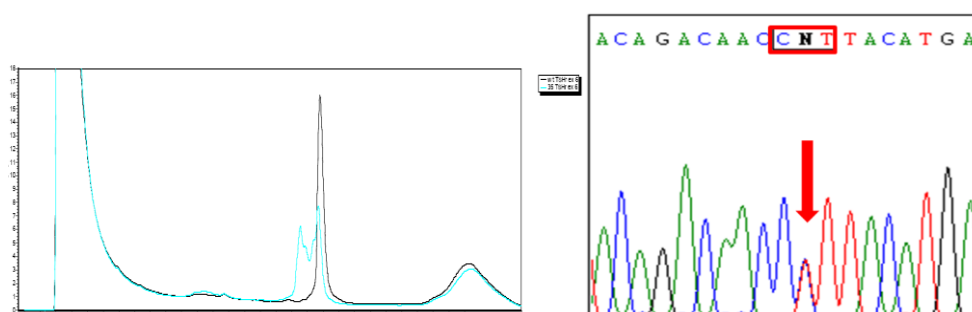


Figura 12 Diagramma di eluizione ed elettroferogramma della variante P162L

Per valutare l'attività funzionale della variante P162L, è stato generato un costrutto pTarget-TSHR P162L. Tale plasmide è stato transfettato transientemente in cellule COS-7 le quali sono state processate per valutare l'espressione in membrana, l'attività del recettore in termini di cAMP prodotto e di IP₃ accumulati. L'analisi di citofluorimetria è stata effettuata utilizzando un anticorpo (BA8) contro l'ECD del recettore per il TSH e ha rivelato che la variante P162L presenta un'espressione in membrana ridotta in modo statisticamente significativo ($p < 0.01$) rispetto al WT (Fig.6).

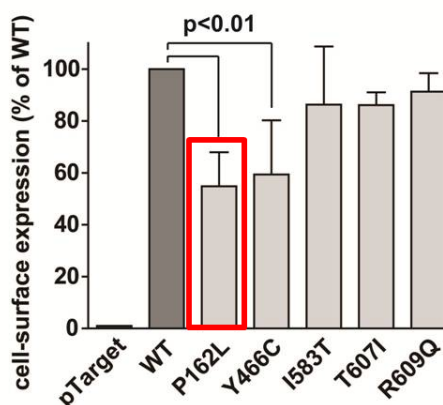


Figura 6 Espressione di membrana del recettore P162L

Il cAMP accumulato nelle cellule in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH è stato dosato attraverso il dosaggio radioimmunologico (RIA). La curva dose-risposta, generata con i valori ottenuti dalla misurazione, presenta un' E_{max} ridotta ($88,2 \pm 9,4\%$ rispetto al WT). Questo dato è concordante con la ridotta espressione sulla superficie cellulare del mutante stesso (Fig.7).

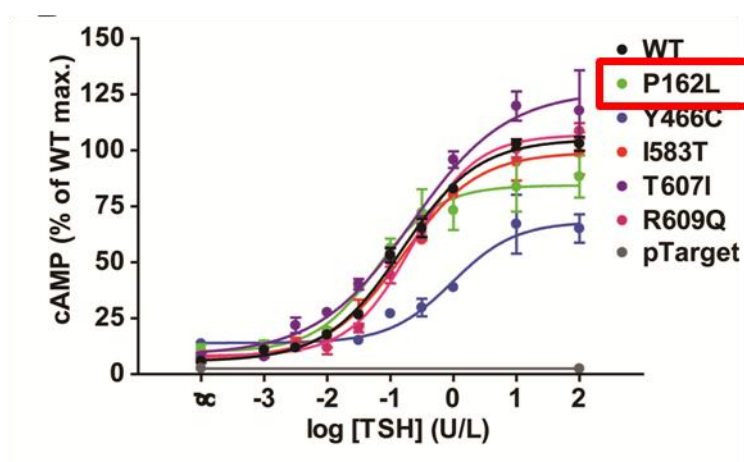


Figura 7 Curva dose-risposta del cAMP accumulato in condizioni basali e dopo stimolo con bTSH per la variante P162L

La capacità del mutante P162L di trasdurre il segnale attraverso la via mediata $G_{q/11}$ è stata valutata utilizzando il test NFAT reporter della luciferasi. Nonostante valori basali simili al WT, la variante è associata ad una ridotta risposta al bTSH (Fig. 8).

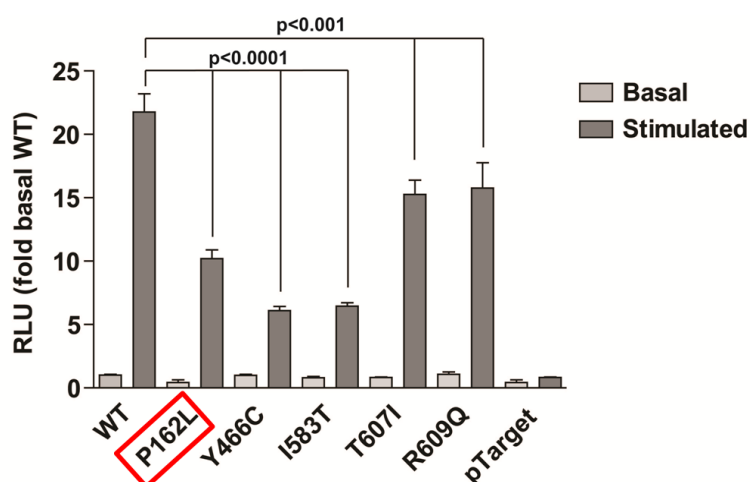


Figura 8 IP_3 accumulati nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con bTSH 100 mU/L del recettore nella variante P162L

Variante p.Y466C

La variante **Y466C**, mai descritta in precedenza, è presente nell'esone 10 del gene TSHR. È caratterizzata da una sostituzione del residuo di *Tirosina* (TAT) 466, compreso nella parte terminale del secondo dominio transmembrana, con un residuo di *Cisteina* (TCT).

Tale mutazione è stata riscontrata in una paziente pervenuta in Istituto Auxologico Italiano con ghiandola in sede ma ipoplasica e ipertirotropinemia (TSH pari a 7.88 mU/L). I DNA dei familiari non sono pervenuti per l'indagine genetica.

Per valutare l'attività funzionale della variante Y466C, è stato generato un costrutto pTarget-TSHR Y466C. Tale plasmide è stato transfettato transientemente in cellule COS-7 le quali sono state processate per valutare l'espressione in membrana, l'attività del recettore in termini di cAMP prodotto e di IP₃ accumulati. L'analisi di citofluorimetria è stata effettuata utilizzando un anticorpo (BA8) contro il dominio extracellulare (ECD) del recettore per il TSH e ha rivelato che la variante Y466C presenta un'espressione in membrana ridotta in modo statisticamente significativo ($p < 0.01$) rispetto al WT (Fig. 9).

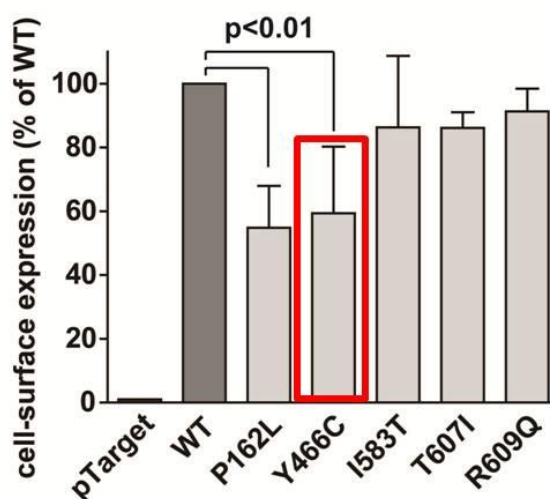


Figura 9 Espressione in membrana del mutante Y466C

Il cAMP accumulato nelle cellule in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH è stato dosato attraverso il dosaggio radioimmunologico (RIA). La curva dose-risposta, generata con i valori ottenuti dalla misurazione, è caratterizzata da un aumento dell' EC_{50} (da $0,15 \pm 0,04$ - $0,95 \pm 0,51$ mU/ L, $P < 0,05$), una ridotta E_{max} ($65 \pm 6,3\%$ del wild-type, $P < 0,05$) e sorprendentemente dei valori basali più alti rispetto al recettore WT (Fig.10).

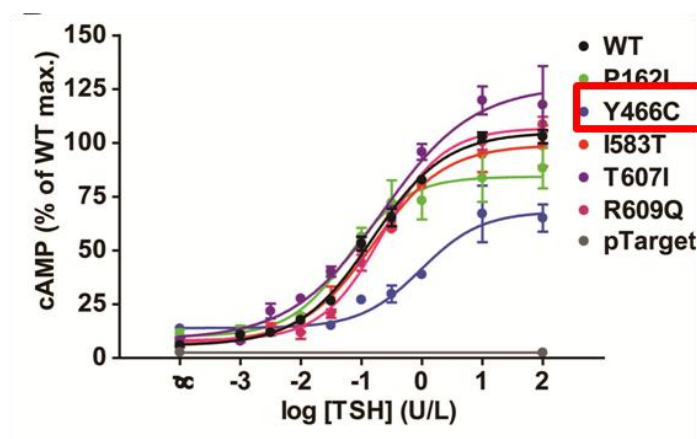


Figura 10 Curva dose-risposta del cAMP accumulato dopo stimolo con bTSH del recettore nella variante Y466C

La capacità del mutante Y466C di trasdurre il segnale attraverso la via mediata $G_{q/11}$ è stata valutata utilizzando il test NFAT reporter della luciferasi. Nonostante valori basali simili rispetto al WT, la variante è associata ad una ridotta risposta al bTSH (Fig.11).

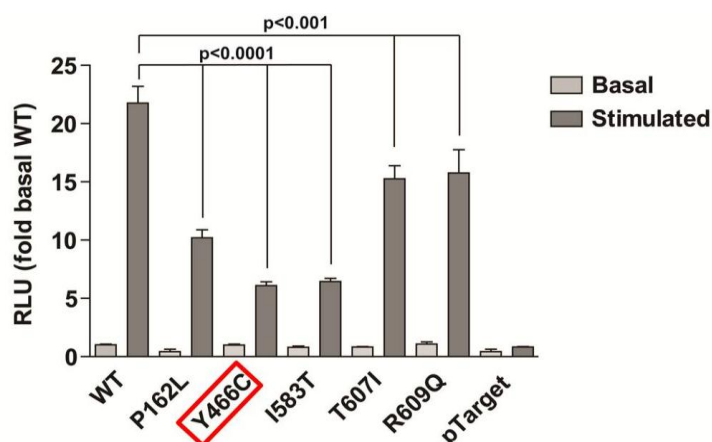


Figura 11 IP_3 accumulati nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con bTSH 100 mU/L del recettore nella variante Y466C

Variante p.I583T

La variante **I583T**, mai descritta in precedenza, è presente nell'esone 10 del TSHR. È caratterizzata da una sostituzione del residuo di *Isoleucina* (ATT) 583, compreso nel quinto dominio transmembrana, con un residuo di *Tirosina* (ACT).

Tale mutazione è stata riscontrata in un paziente giunto in Istituto Auxologico Italiano all'età di sette mesi e mezzo con volume ed ecostruttura tiroidei normali e ipertiropinemia (TSH pari a 7.46 mU/L). I DNA dei familiari non sono pervenuti per l'indagine genetica.

Per valutare l'attività funzionale della variante I583T, è stato generato un costrutto pTarget-TSHR I583T. Tale plasmide è stato transfettato transientemente in cellule COS-7 le quali sono state processate per valutare l'espressione in membrana, l'attività del recettore in termini di cAMP prodotto e di IP₃ accumulati. L'analisi di citofluorimetria è stata effettuata utilizzando un anticorpo (BA8) contro il dominio extracellulare (ECD) del recettore per il TSH e ha rivelato che la variante I583T presenta un'espressione in membrana comparabile a quella del WT (Fig.12).

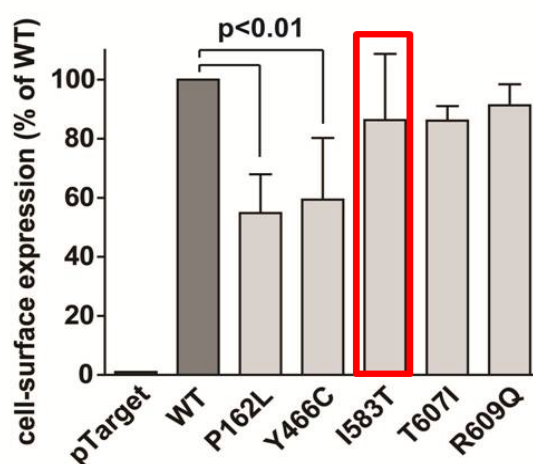


Figura 12 Espressione in membrana del recettore nella variante I583T

Il cAMP prodotto dopo stimolo con bTSH in concentrazioni crescenti e misurato attraverso il dosaggio radioimmunologico (RIA) è paragonabile a quello prodotto dal recettore WT (Fig.13).

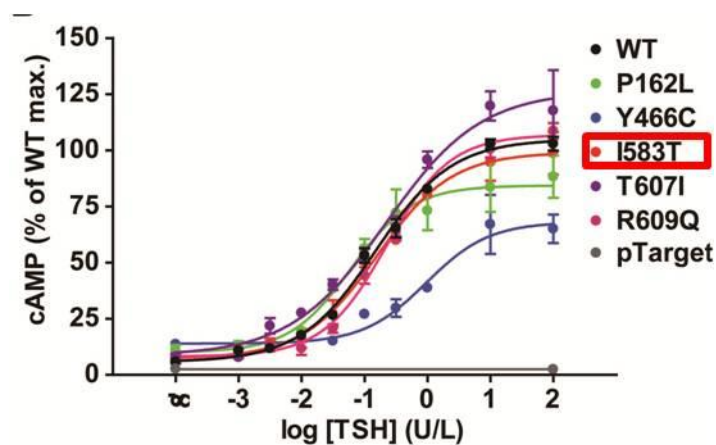


Figura 13 cAMP accumulato nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH della variante I583T

La capacità del mutante I583T di trasdurre il segnale attraverso la via mediata $G_{q/11}$ è stata valutata utilizzando il test NFAT reporter della luciferasi. Nonostante valori basali simili rispetto al WT, la variante è associata ad una ridotta risposta al bTSH (Fig. 14).

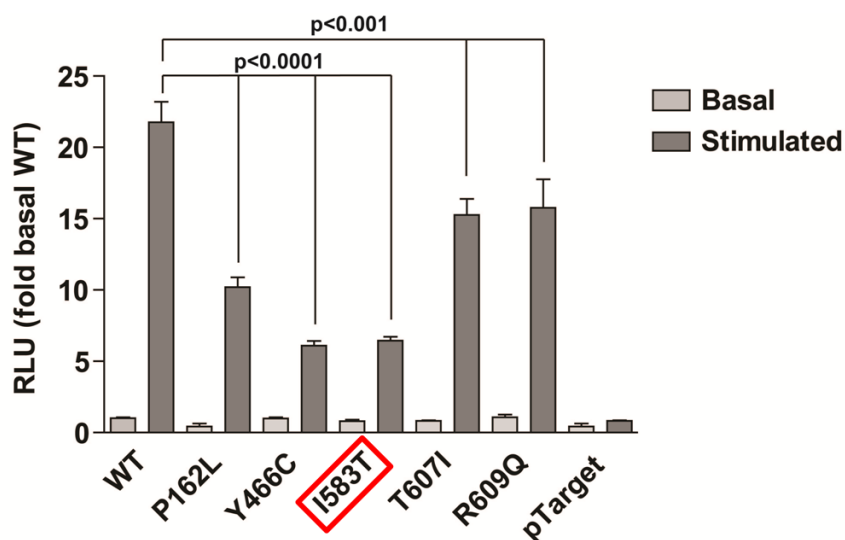


Figura 14 IP₃ accumulati nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con bTSH 100 mU/L del recettore nella variante I583T

Variante p.T607I

La variante **T607I** consiste in una mutazione missenso che determina la sostituzione del residuo di *Treonina* (TGT) 607, situato nella terza ansa citoplasmatica, con un residuo di *Isoleucina* (TAT).

Tale mutazione è stata riscontrata in un paziente giunto in Istituto Auxologico Italiano all'età di due anni, con evidente ritardo mentale, ipoglicemia (20 mg/dl), iperpigmentazione e frequenti episodi di gravi infezioni.

Le analisi cliniche condotte hanno evidenziato alti livelli di cortisolo e ACTH, rispettivamente 20 ng/ml (v.n. 5 – 25 ng/ml) e 3654 pg/ml (v.n. 10 - 90 pg/ml), ipertireotropinemia (TSH pari a 12.4 mU/L) e valori di ormoni tiroidei nella norma.

L'analisi genetica è stata dapprima condotta sul gene del recettore per l'ACTH, evidenziando la presenza della mutazione inattivante R146H in omozigosi. L'estensione dell'analisi ai familiari ha permesso di stabilire che entrambi i genitori sono portatori della stessa alterazione.

Successivamente l'analisi del gene del TSHR ha evidenziato la presenza della mutazione T607I (Fig. 15).

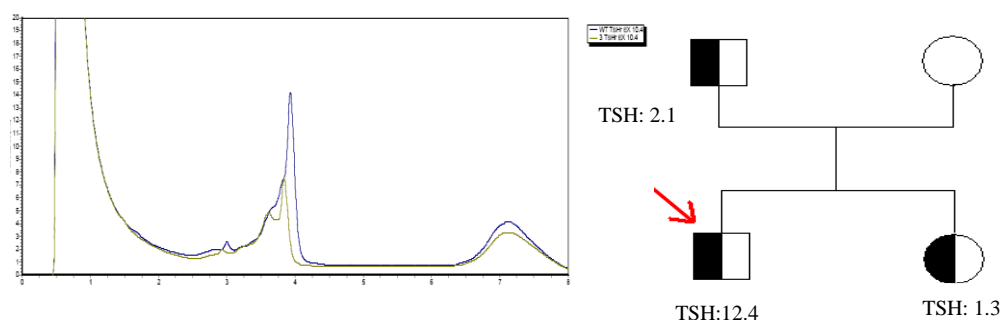


Figura 15 Diagramma di eluizione e pedigree del probando portatore della variante T607I

L'analisi genetica ha permesso di stabilire che l'alterazione è stata ereditata dal

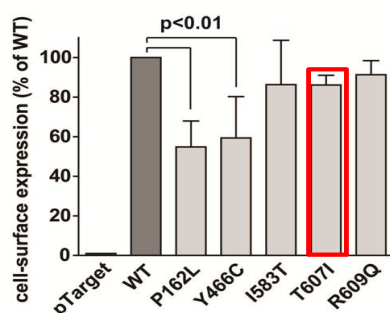


Figura 16 Espressione in membrana della variante T607I

probando per via paterna e che anche la sorella di questi è portatrice della mutazione (Fig.15).

Per valutare l'attività funzionale della variante T607I, è stato generato un costrutto pTarget-TSHR T607I. Tale plasmide è stato transfettato transientemente in cellule COS-7 le quali sono state

processate per valutare l'espressione in membrana, l'attività del recettore in termini di cAMP prodotto e di IP₃ accumulati. L'analisi di citofluorimetria è stata effettuata utilizzando un anticorpo (BA8) contro il dominio extracellulare (ECD) del recettore per il TSH e ha rivelato che la variante T607I presenta un'espressione comparabile a quella del WT (Fig.16).

Il cAMP accumulato nelle cellule in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH è stato dosato attraverso il dosaggio

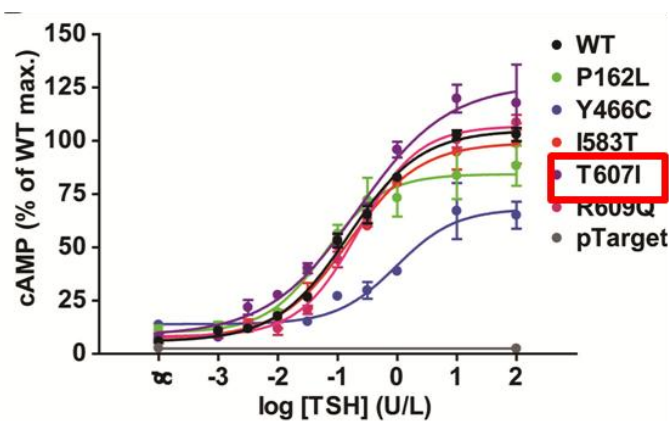


Figura 17 cAMP accumulato nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo in concentrazioni crescenti di bTSH del recettore T607I

radioimmunologico (RIA). La curva dose-risposta, generata con i valori ottenuti dalla misurazione, è caratterizzata da un' E_{max} aumentata ($117,8 \pm 17,9$ rispetto al WT) in modo statisticamente significativo (Fig.17).

La capacità del mutante T607I di trasdurre il segnale attraverso la via mediata $G_{q/11}$ è stata valutata utilizzando il test NFAT reporter della luciferasi. Nonostante valori basali simili rispetto al WT, la variante è associata ad una ridotta risposta al bTSH.

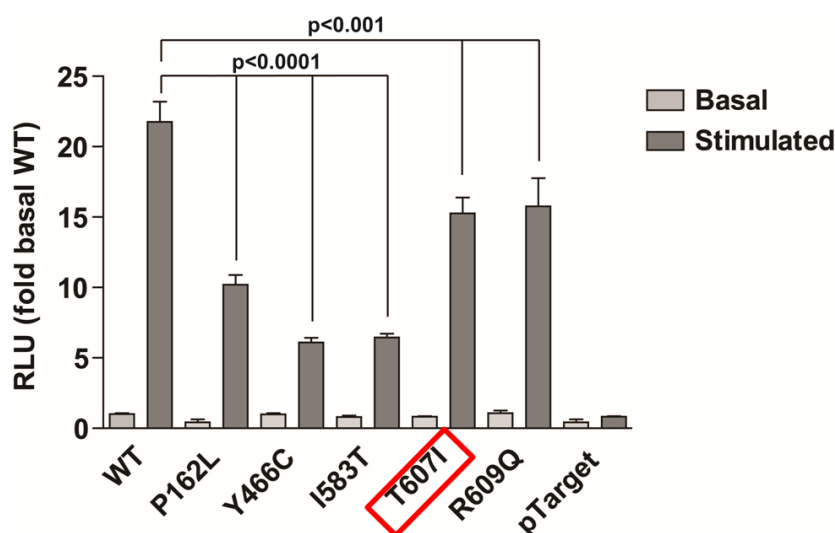


Figura 18 IP₃ accumulati nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con bTSH 100 mU/L del recettore nella variante T607I

Variante p.R609Q

La variante **R609Q**, mai descritta in precedenza, è presente nell'esone 10 del TSHR. È caratterizzata da una sostituzione del residuo di *Arginina* (CGA) 609, compreso nella terza ansa citoplasmatica, con un residuo di *Glutamina* (CAA).

Nella casistica in studio è stata individuata in un solo paziente giunto in Istituto Auxologico Italiano all'età di sette anni e otto mesi, con un lieve difetto di crescita, volume ed eco struttura tiroidei normali, ma senza segni evidenti di ipotiroidismo congenito. È stato possibile estendere l'indagine ai familiari di primo grado dimostrando che la stessa alterazione è presente anche nel DNA nella madre e nella nonna materna del probando, entrambe caratterizzate da lieve ipertireotropinemia (Fig.19). Gli altri familiari analizzati non sono portatori della variante.

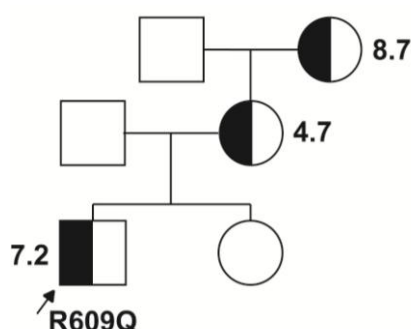


Figura 19 Pedigree del probando portatore della variante R609Q

Per valutare l'attività funzionale della variante R609Q, è stato generato un costrutto pTarget-TSHR R609Q. Tale plasmide è stato transfettato transientemente in cellule COS-7 le quali sono state processate per valutare l'espressione in membrana, l'attività del recettore in termini di cAMP prodotto e di IP₃ accumulati. L'analisi di citofluorimetria è stata effettuata utilizzando un anticorpo (BA8) contro il dominio extracellulare (ECD) del recettore per il TSH e ha rivelato che la variante R609Q presenta un'espressione comparabile a quella del WT (Fig.20).

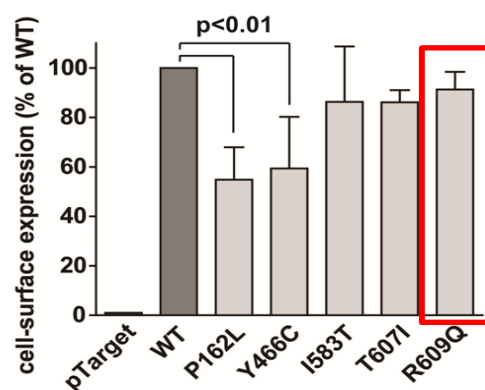


Figura 20 Espressione in membrana del mutante R609Q

Il cAMP prodotto dopo stimolo con bTSH in concentrazioni crescenti misurato attraverso il dosaggio radioimmunologico (RIA) è paragonabile a quello prodotto dal recettore WT (Fig.21).

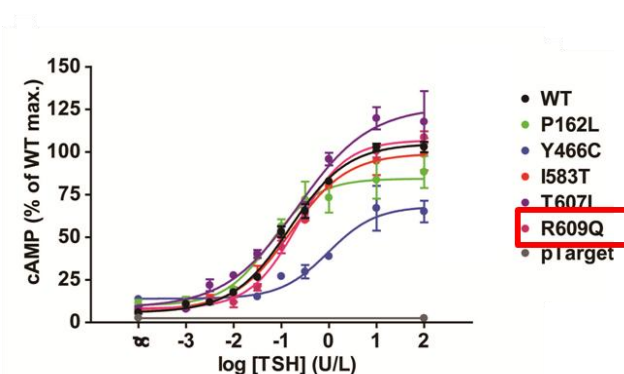


Figura 21 cAMP accumulato nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH della variante R609Q

La capacità del mutante R609Q di trasdurre il segnale attraverso la via mediata $G_{q/11}$ è stata valutata utilizzando il test NFAT reporter della luciferasi. Nonostante valori basali simili rispetto al WT, la variante è associata ad una ridotta risposta al bTSH (Fig.22).

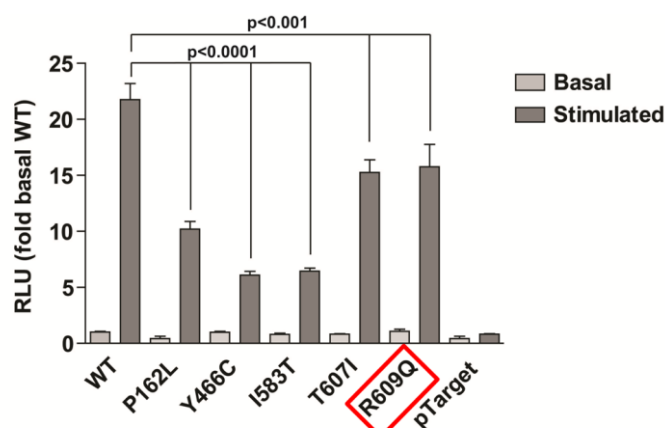


Figura 22 IP_3 accumulati nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con bTSH 100 mU/L del recettore nella variante R609Q

Di seguito verranno indicati i risultati ottenuti dalla caratterizzazione funzionale delle varianti L57P, P162S, S745C, P668L individuate nella nuova casistica costituita da 131 pazienti.

Variante intronica g.IVS4 -1 T>G

La variante *IVS4 -1 T>G* è dovuta ad una sostituzione del nucleotide *Guanina* localizzato nel sito donatore di splicing dell'introne 4 con un il nucleotide *Timina* modificando la tripletta GTA in TTA. Studi in silico che mimano il *processo di splicing* sottolineano che la tripletta in questione è un sito importante per il meccanismo suddetto e quindi un'alterazione a carico del codone localizzato nel sito donatore di splicing potrebbe annullare il processo. Questo comporterebbe l'unione di un esone con l'introne successivo, provocando a sua volta uno spostamento del modulo di lettura che porta alla formazione di uno stop prematuro e quindi ad una proteina tronca non funzionante (Fig.23).

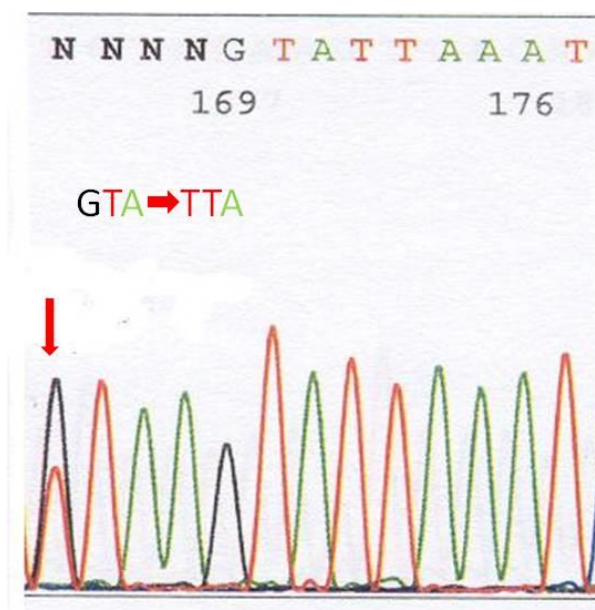


Figura 23 Elettroferogramma della variante IVS4-1G>T

Variante p.L57P

La variante **L57P**, mai descritta in precedenza, è presente nell'ultimo codone dell'esone 1 del TSHR. È caratterizzata da una sostituzione del residuo di *Leucina* (CCG) 57, compreso nell' ECD, con un residuo di *Prolina* (CAG) (Fig.24).

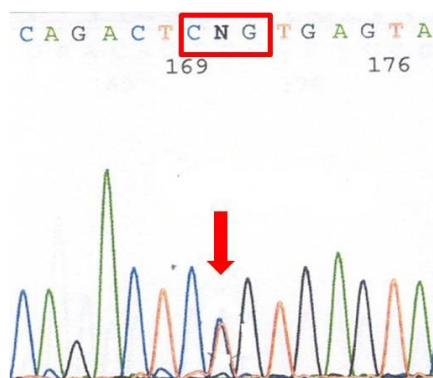


Figura 24 Elettroferogramma della variante L57P

Tale mutazione è stata riscontrata in due pazienti della nostra casistica; una paziente di cui non abbiamo sufficienti dati anamnestici e un paziente pervenuto in Istituto Auxologico Italiano con volume ed eco struttura tiroidei normali e ipertirotropinemia (TSH pari a 9.55 mU/L). L'indagine genetica dei famigliari ha permesso di individuare la variante a carico del DNA della madre e del fratello del probando (Fig.25).

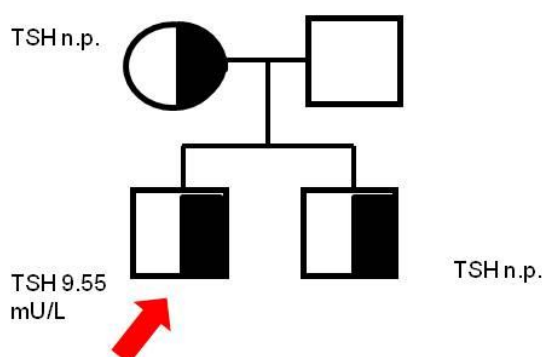


Figura 25 Pedigree del probando portatore della variante L57P

Per valutare l'attività funzionale della variante L57P, è stato generato un costrutto pTarget-TSHR L57P. Tale plasmide è stato transfettato transientemente in cellule COS-7 le quali sono state processate per valutare l'espressione in membrana, l'attività del recettore in termini di cAMP prodotto e di IP₃ accumulati. L'analisi di citofluorimetria è stata effettuata utilizzando un anticorpo (BA8) contro il dominio extracellulare (ECD) del recettore per il TSH e ha rivelato che la variante L57P presenta un'espressione in membrana ridotta in modo statisticamente significativo ($p < 0.001$) rispetto al WT (Fig.26).

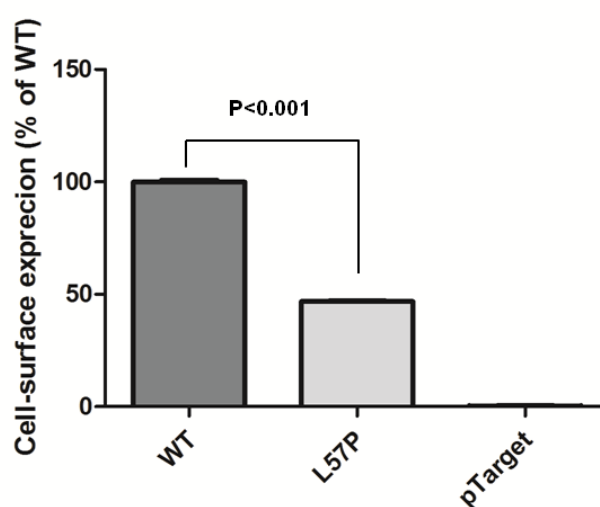


Figura 26 Espressione in membrana del recettore nella variante L57P

Il cAMP prodotto dopo stimolo con bTSH in concentrazioni crescenti, misurato attraverso il dosaggio radioimmunologico (RIA), è paragonabile al plasmide vuoto indicando che questo mutante non trasduce il segnale dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH (Fig. 27)

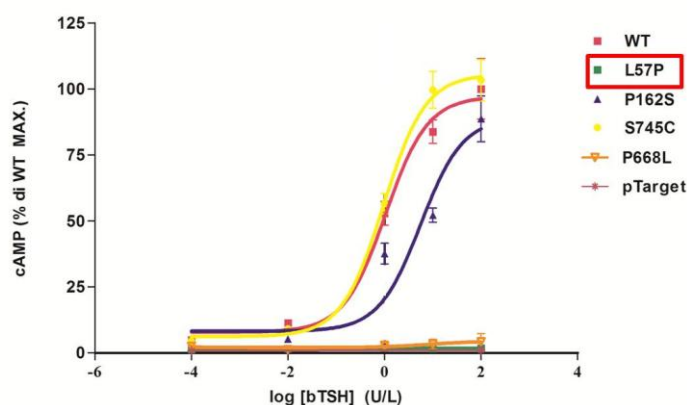


Figura 27 cAMP accumulato nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH della variante L57P

La capacità del mutante L57P di trasdurre il segnale attraverso la via mediata $G_{q/11}$ è stata valutata utilizzando il test NFAT reporter della luciferasi.

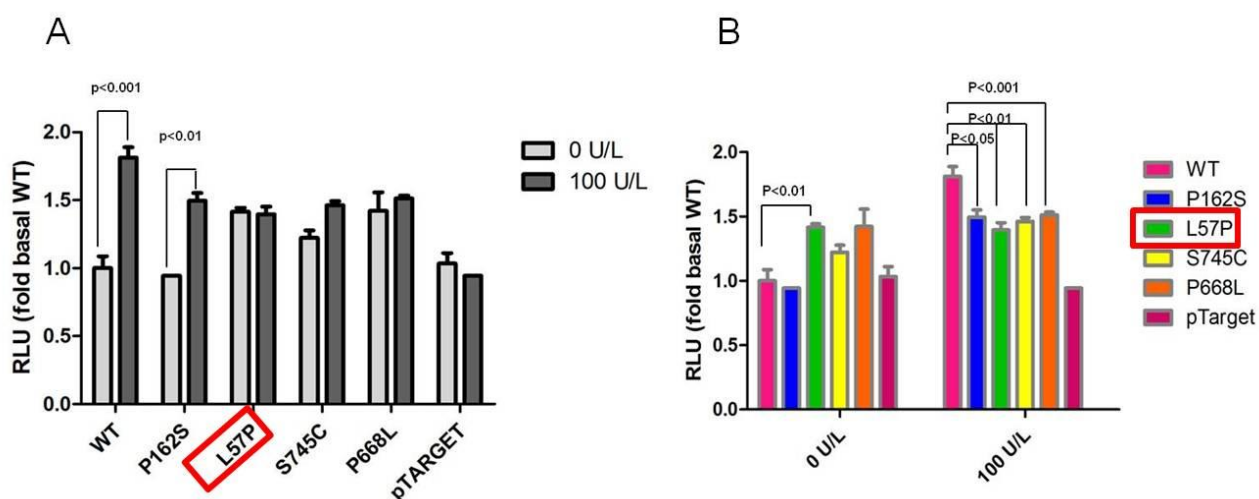


Figura 28 IP_3 accumulati nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con bTSH 100 mU/L del recettore nella variante L57P

Il mutante presenta un'attività basale e stimolata significativamente più alta rispetto al WT ($p < 0.01$) (Fig.28 B). Altresì, se si confronta l'attività basale con l'attività dopo stimolo si osserva che non vi sono differenze (Fig. 28 A) suggerendo che anche in questo caso la variante L57P inattiva il recettore per il TSH.

Variante p.P162S

La variante **P162S** consiste in una mutazione puntiforme, di nuova identificazione, che determina la sostituzione del residuo di *Prolina* (CCT) 162, localizzato nella regione LLR del dominio, con un residuo di *Serina* (TCT) (Fig. 29).

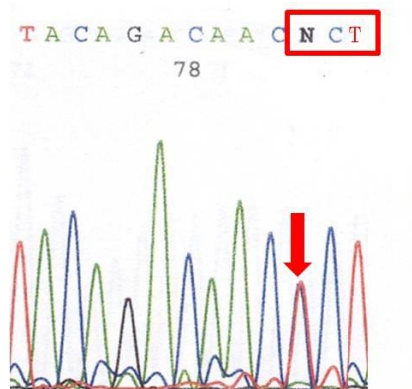


Figura 29 Elettroferogramma della variante P162S

Tale mutazione è stata riscontrata in una paziente pervenuta in Istituto Auxologico Italiano con diagnosi di ipotiroidismo congenito caratterizzato da volume ed eco struttura tiroidei normali e ipertirotropinemia (TSH pari a 12.0 mU/L). L'indagine genetica ha permesso di evidenziare la presenza di una seconda mutazione (R450H, nota) a carico dell'esone 10. Lo screening sul DNA dei genitori e delle sorelle ha permesso di evidenziare la presenza della variante P162S nel DNA del padre e la variante R450H nel DNA della madre. Tutte le sorelle portano entrambe le varianti e, come la probanda, presentano ipertirotropinemia caratterizzati da valori di TSH rispettivamente di 10.8 e 15.8 mU/L (Fig. 30).

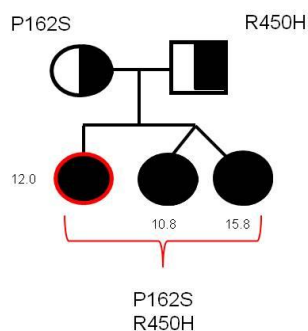


Figura 30 Pedigree del probando portatore della variante P162S

Per valutare l'attività funzionale della variante P162S, è stato generato un costrutto pTarget-TSHR P162S. Tale plasmide è stato transfettato transientemente in cellule COS-7 le quali sono state processate per valutare l'espressione in membrana, l'attività del recettore in termini di cAMP prodotto e di IP₃ accumulati. L'analisi di citofluorimetria è stata effettuata utilizzando un anticorpo (BA8) contro il dominio extracellulare (ECD) del recettore per il TSH e ha rivelato che la variante P162S presenta un'espressione in membrana ridotta in modo statisticamente significativo ($p < 0.01$) rispetto al WT (Fig. 31).

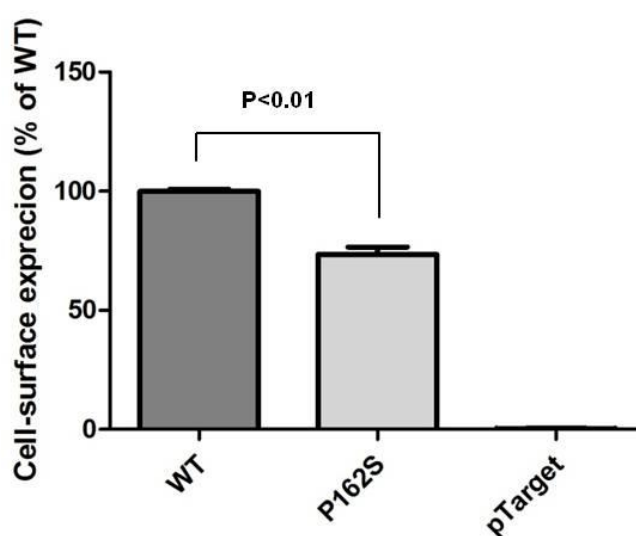


Figura 31 Espressione in membrana del recettore nella variante P162S

Il cAMP accumulato nelle cellule in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH è stato dosato attraverso il dosaggio radioimmunologico (RIA). La curva dose-risposta, generata con i valori ottenuti dalla misurazione, presenta un' E_{max} ridotta ($75.5 \pm 16.35\%$ rispetto al WT). Questo dato è concordante con la ridotta espressione sulla superficie cellulare del mutante stesso. Essendo la curva spostata verso destra rispetto al WT anche il parametro E_{C50} è aumentato ($11.61 \pm 2.693\%$ rispetto al WT) (Fig. 32).

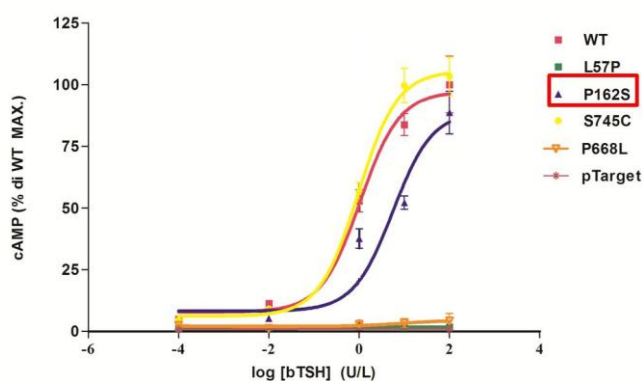


Figura 32 cAMP accumulato nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH della variante P162S

La capacità del mutante P162S di trasdurre il segnale attraverso la via mediata $G_{q/11}$ è stata valutata utilizzando il test NFAT reporter della luciferasi.

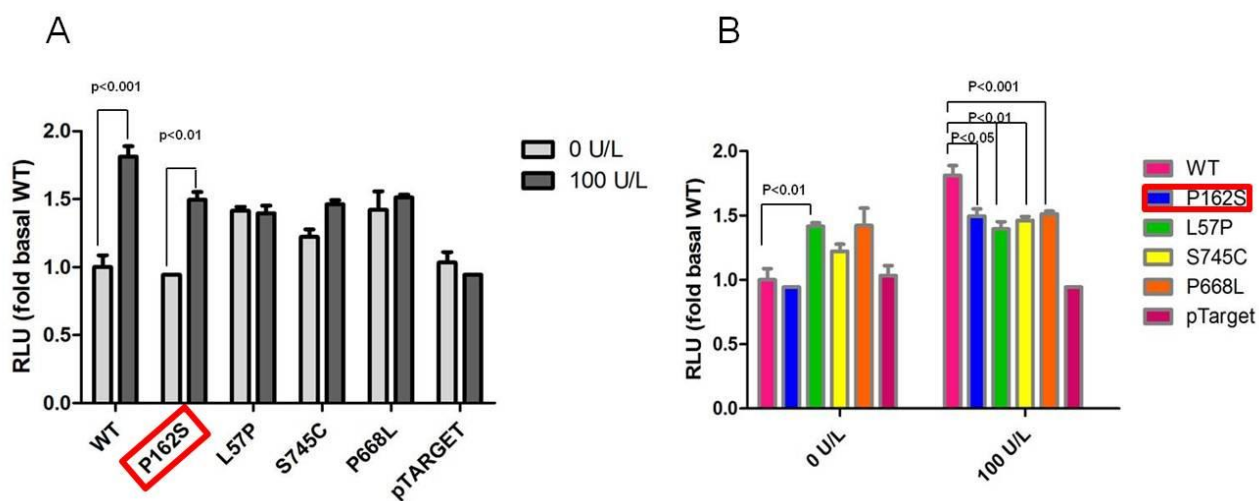


Figura 33 IP_3 accumulati nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con bTSH 100 mU/L del recettore nella variante P162S

Il mutante mostra un'attività basale simile al WT mentre presenta un'attività dopo stimolo ridotta in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$) (Fig. 33 B). La variante P162S non è refrattaria allo stimolo con bTSH in concentrazioni crescenti e presenta un aumento statisticamente significativo ($p < 0.01$) tra l'attività basale e l'attività post-stimolo (Fig. 33 A).

Variante p.S745C

La variante **S745C** consiste in una mutazione puntiforme, di nuova identificazione, che determina la sostituzione del residuo di *Serina* (TGC) 745, localizzato nella coda intracellulare, con un residuo di *Cisteina* (TCC) (Fig. 34).

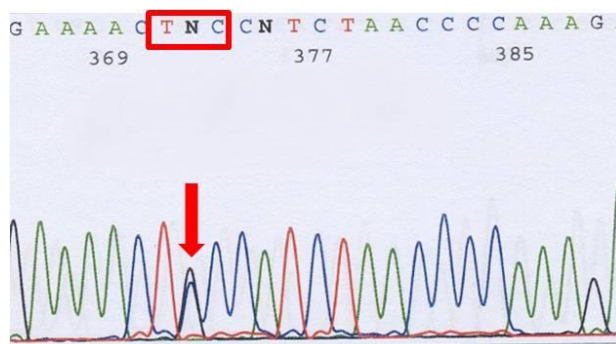


Figura 34 Elettroferogramma della variante S745C

Tale mutazione è stata riscontrata in un paziente pervenuto in Istituto Auxologico Italiano con volume ed eco struttura tiroidei normali e ipertirotropinemia. L'indagine genetica dei famigliari ha permesso di individuare la variante a carico del DNA della madre del probando (Fig. 35).

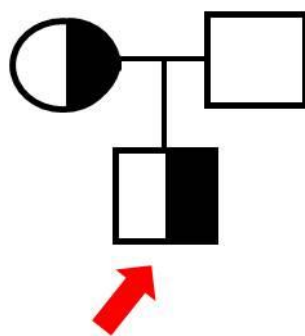


Figura 35 Pedigree del portatore della variante S745C

Per valutare l'attività funzionale della variante S745C, è stato generato un costrutto pTarget-TSHR S745C. Tale plasmide è stato transfettato transientemente in cellule COS-7 le quali sono state processate per valutare l'espressione in membrana, l'attività

del recettore in termini di cAMP prodotto e di IP₃ accumulato. L'analisi di citofluorimetria è stata effettuata utilizzando un anticorpo (BA8) contro il dominio extracellulare (ECD) del recettore per il TSH e ha rivelato che la variante S745C presenta un'espressione in membrana aumentata in modo statisticamente significativo ($p < 0.01$) rispetto al WT (Fig. 36). Questo risultato è apparentemente discordante con il fenotipo di ipotiroidismo.

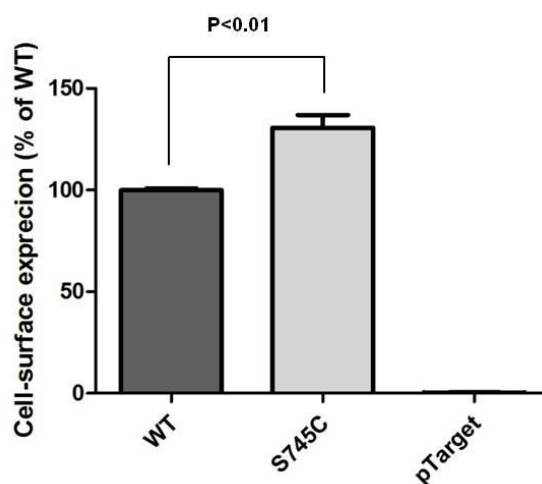


Figura 36 Espressione in membrana del recettore nella variante S745C

Il cAMP accumulato nelle cellule in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH è stato dosato attraverso il dosaggio radioimmunologico (RIA). La curva dose-risposta, generata con i valori ottenuti dalla misurazione, è paragonabile a quella prodotta da recettore WT (Fig.37).

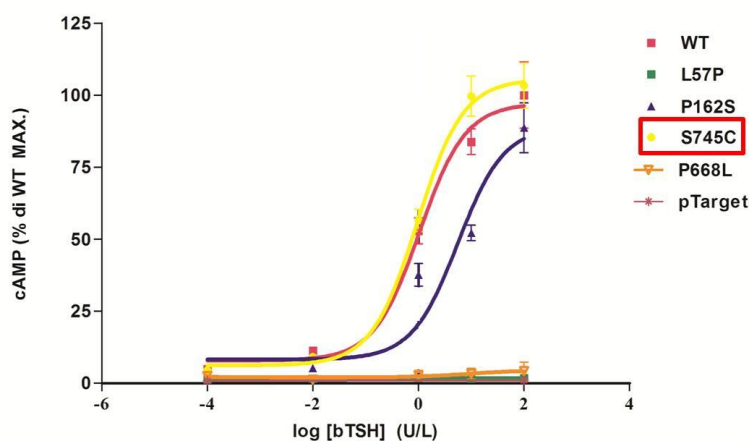


Figura 37 cAMP accumulato nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH della variante S745C

La capacità del mutante S745C di trasdurre il segnale attraverso la via mediata $G_{q/11}$ è stata valutata utilizzando il test NFAT reporter della luciferasi.

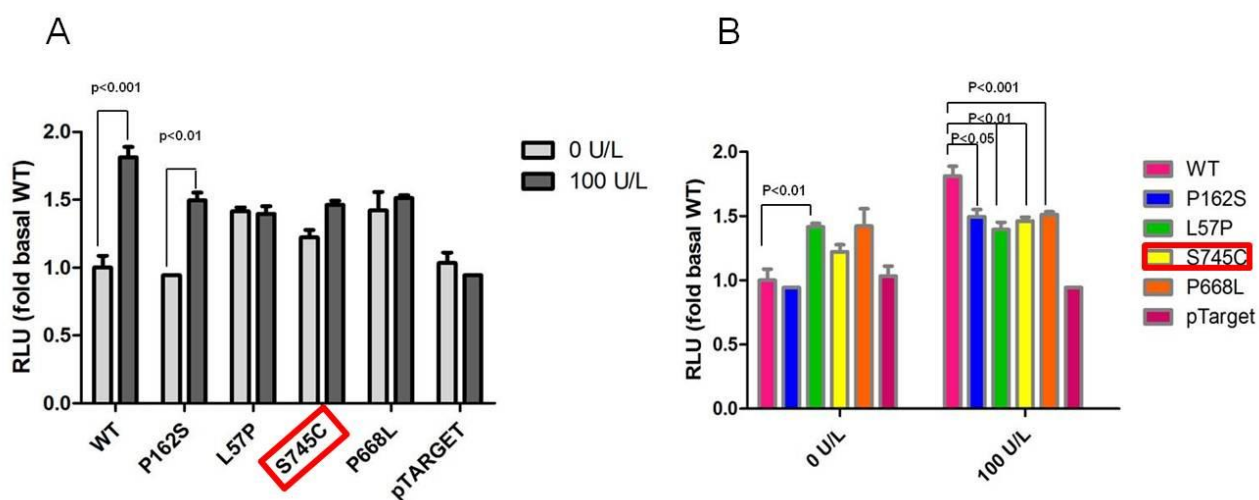


Figura 38 IP_3 accumulati nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con bTSH 100 mU/L del recettore nella variante S745C

Il mutante presenta un'attività basale simile al WT e un'attività dopo stimolo ridotta in modo statisticamente significativo ($p < 0.01$) (Fig. 38 B). Altresì, se si confronta l'attività basale con l'attività dopo stimolo si osserva che non vi sono differenze (Fig. 38 A) suggerendo che la variante S745C è refrattaria al bTSH, impedendo così una corretta trasduzione del segnale.

Variante p.P668L

La variante **P668L** consiste in una mutazione puntiforme, di nuova identificazione, che determina la sostituzione del residuo di *Prolina* (CCA) 668, localizzato alla fine del settimo dominio TM, con un residuo di *Leucina* (CTA) (Fig. 39).

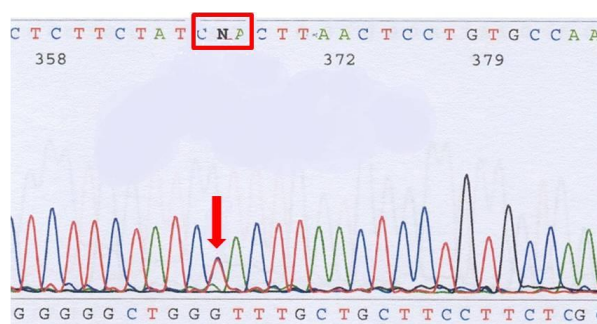


Figura 39 Elettroferogramma della variante P668L

Per valutare l'attività funzionale della variante P668L, è stato generato un costrutto pTarget-TSHR P668L. Tale plasmide è stato transfettato transientemente in cellule COS-7 le quali sono state processate per valutare l'espressione in membrana, l'attività del recettore in termini di cAMP prodotto e di IP₃ accumulati. L'analisi di citofluorimetria è stata effettuata utilizzando un anticorpo (BA8) contro il dominio extracellulare (ECD) del recettore per il TSH e ha rivelato che la variante P668L presenta un'espressione in membrana ridotta in modo statisticamente significativo ($p < 0.01$) rispetto al WT (Fig. 40).

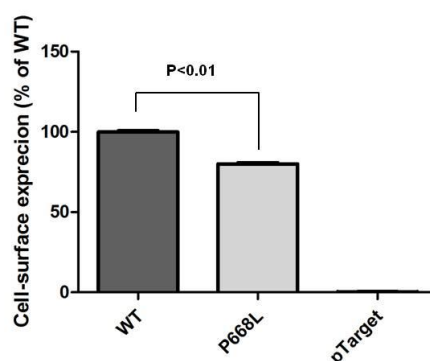


Figura 40 Espressione in membrana del recettore nella variante P668L

Il cAMP prodotto dopo stimolo con bTSH in concentrazioni crescenti misurato attraverso il dosaggio radioimmunologico (RIA) risulta paragonabile al plasmide vuoto indicando che questo mutante non trasduce il segnale dopo stimolo con bTSH in concentrazioni crescenti (Fig. 41).

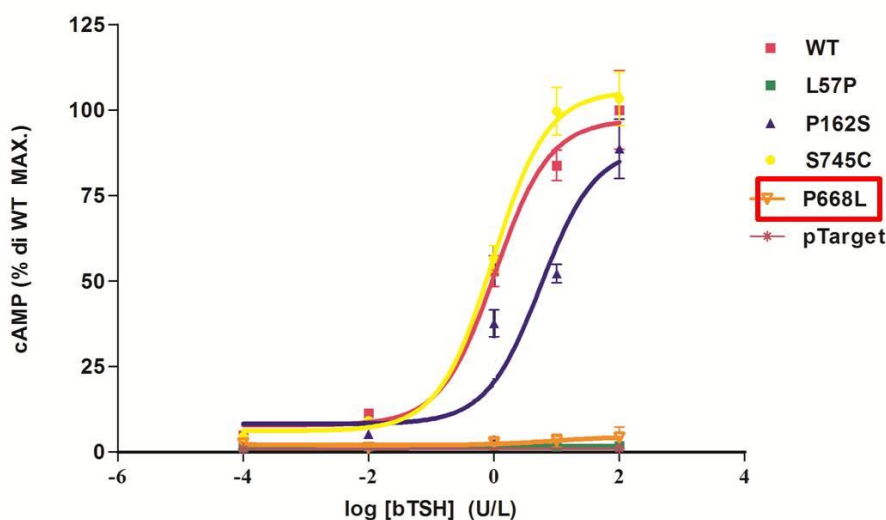


Figura 41 cAMP accumulato nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con concentrazioni crescenti di bTSH della variante P668L

La capacità del mutante P668L di trasdurre il segnale attraverso la via mediata $G_{q/11}$ è stata valutata utilizzando il test NFAT reporter della luciferasi.

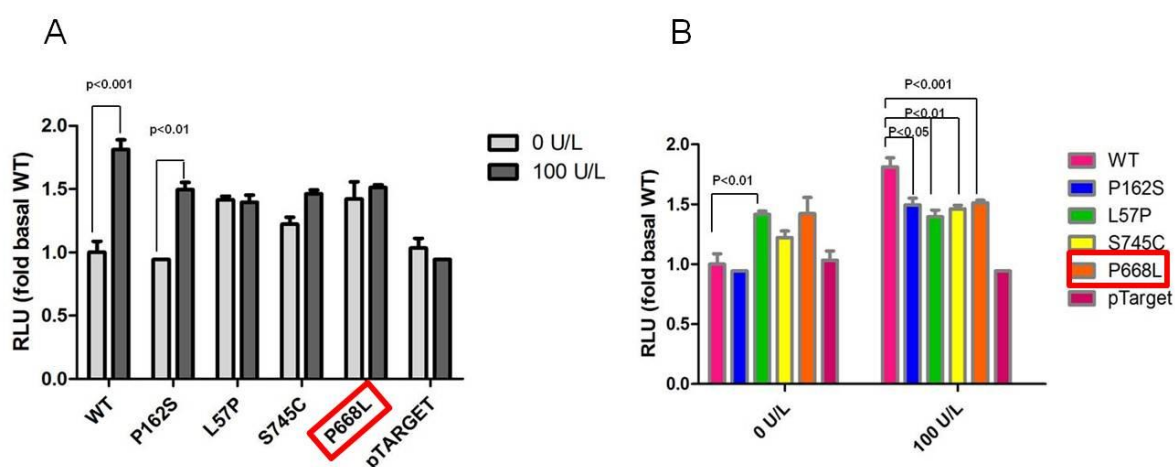


Figura 42 IP_3 accumulati nella cellula in condizioni basali e dopo stimolo con bTSH 100 mU/L del recettore nella variante P668L

Il mutante presenta un'attività basale simile al WT e un'attività dopo stimolo ridotta in modo statisticamente significativo ($p < 0.001$) (Fig.42 B). Altresì, se si confronta l'attività basale con l'attività dopo stimolo si osserva che non vi sono differenze (Fig. 42 A) suggerendo che la variante P668L è refrattaria al bTSH, impedendo così una corretta trasduzione del segnale.

***DISCUSSIONE E
CONCLUSIONI***

L'ipotiroidismo congenito è una patologia con una frequenza pari a 1 caso ogni 6000-8000 nati vivi e pertanto costituisce uno dei disordini endocrini congeniti più comuni (*Corbetta, 2008; Persani, 2012*).

La condizione di ipotiroidismo congenito è dovuta nel 10% dei casi a insufficiente apporto di iodio in gravidanza e nel 5% al passaggio transplacentare di anticorpi anti-tiroide dalla madre al feto. Per il 10-20% dei casi l'ipotiroidismo congenito è causato da alterazioni genetiche che comportano disgenesia della tiroide, che può manifestarsi come agenesia tiroidea, ectopia o ipoplasia (*Porazzi, 2012*), oppure da difetti dei geni coinvolti nell'ormonogenesi (*Park et al. 2005*). Il restante 65% dei casi viene classificato come ipotiroidismo idiopatico, ovvero non associato a eventi eziologici identificati.

Il gene del TSHR costituisce uno dei diversi geni coinvolti nello sviluppo della tiroide fetale e nel mantenimento dell'omeostasi tiroidea: il recettore, infatti, rappresenta il più importante regolatore della funzione tiroidea, in quanto trasduce i segnali necessari alla crescita cellulare e all'avvio della sintesi ormonale (*Vassart, 1992*). Le mutazioni che causano inattivazione del TSHR determinano la condizione nota come "TSH resistenza", che può manifestarsi con diversi gradi di severità che vanno dall'ipotiroidismo severo all'ipertireotropinemia con livelli di ormoni tiroidei nella norma e ghiandola normale o ipoplastica (*Russo, 2000; Nagashima, 2001; Persani, 2011*).

In questo studio abbiamo valutato la presenza di varianti nel gene TSHR nella più grande coorte (n = 153 + n=131) di pazienti pediatriche affette da ipertireotropinemia non autoimmune isolato fino ad oggi studiate. Sono state individuate varianti in eterozigosi, di cui dodici mai descritte prima, con un potenziale ruolo patogenetico in circa il 12% dell'intera casistica.

Precedenti studi che analizzano la presenza di varianti LOF nel gene TSHR di pazienti affetti da ipotiroidismo subclinico riportano frequenze molto dissimili (4-52%) (*Alberti, 2002; Calaciura, 2002 a,b; Tonacchera, 2004; Rapa, 2009; Nicoletti, 2009; Camilot, 2005; Tenenbaum-Rakover, 2009*).

La grande variabilità delle frequenze dipende probabilmente sia dalla scarsa dimensione del campione nella maggior parte degli studi precedenti o dalle differenze nei criteri di selezione dei pazienti coinvolti nello studio. Le frequenze più alte sono state trovate in una popolazione di consanguinei di origine arabo-musulmano (*Tenenbaum-Rakover, 2009*) e nel lavoro condotto da Alberti nel 2002 in cui sono stati analizzati 10 casi non imparentati affetti da ipertireotropinemia non autoimmune isolata. Le frequenze con valori più bassi sono state riportate da Tonacchera et al. - che ha studiato pazienti prevalentemente adulti, nei quali

l'incidenza di negativi agli autoanticorpi tiroidei può essere superiore a quella presente nella casistica pediatrica - e da Calaciura et al. - che ha arruolato esclusivamente pazienti affetti da ipotiroidismo subclinico con screening neonatale positivo (TSH sangue neonatale > 20 mU/L). Un recente studio (Narumi, 2009) mostra una prevalenza del 4,3% (per varianti bialleliche e del 9,4% per varianti monoalleliche in pazienti affetti da ipotiroidismo congenito con TSH superiori a 10 mU / L o compreso tra 5 e 10 mU / L, rispettivamente. I risultati ottenuti con il seguente studio suggeriscono che la resistenza parziale al TSH associata a varianti del gene TSHR in eterozigosi è una causa rilevante di ipertirotropinemia non autoimmune isolata nella popolazione pediatrica .

Durante lo screening dei 284 pazienti arruolati nella casistica di studio, è stato possibile individuare dodici nuove varianti di cui è stata effettuata una caratterizzazione funzionale per correlare eventualmente il genotipo riscontrato al fenotipo patologico.

La variante p.Q33PfsX46 è dovuta ad una delezione di 44 nucleotidi a carico dell'esone 1 codificante per parte dell'ECD del gene TSHR (c.97del44nt); tale delezione provoca lo spostamento del modulo di lettura del mRNA (frameshift) e la formazione di un codone di STOP prematuro in posizione 46 dell'esone 2. La conseguenza dello STOP prematuro potrebbe essere un recettore mancante di gran parte della regione extracellulare e di tutti i domini trans membrana.

Le varianti mai identificate g.IVS4+2 A> G e g. IVS4-1 T>G sono dovute rispettivamente ad

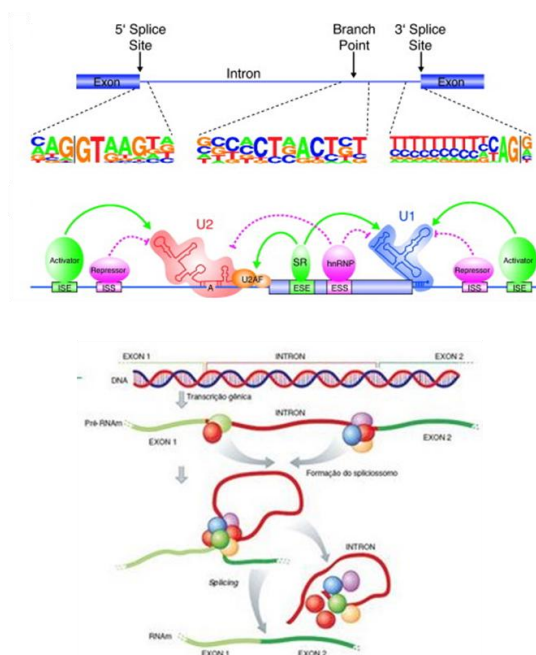


Figura 1 Meccanismo di splicing alternativo

una sostituzione del nucleotide Adenina localizzato nel sito donatore di splicing dell'introne 4 con il nucleotide Guanina modificando la tripletta TAG in TGG e ad una sostituzione del nucleotide Timina con il nucleotide Guanina della stessa tripletta modificandola in GAG. Studi in silico rivelano che il codone in questione è localizzato nel sito donatore di splicing (Fig. 1) e quindi un'alterazione a carico di questa regione potrebbe annullare il processo. In coerenza con il ruolo patogenetico possibile, le variante co-segregano con il fenotipo di ipertirotropinemia in individui consanguinei.

Tra le nuove varianti mai descritte, nove sono missenso. Di queste è stato possibile effettuare una caratterizzazione funzionale in vitro, utilizzando cellule Cos-7 esprimenti transientemente i recettori mutagenizzati, mediante saggi di citofluorimetria per valutare l'espressione in membrana dei mutanti, dosaggi RIA e NFAT-luciferasi per studiare la capacità del recettore di trasdurre il segnale attraverso il pathway mediato da G_s , in termini di cAMP prodotto, e da G_q , in termini di IP_3 accumulato.

La prima variante che abbiamo studiato è stata la **P162L** che determina la sostituzione del residuo di *Prolina* (CCT) 162, localizzato nel dominio extracellulare nella regione LRR, con un residuo di *Lisina* (CTT).

Come indicato precedentemente, questa regione è responsabile della specificità del recettore per il proprio ligando. L'analisi citofluorimetrica ha rivelato che la variante P162L presenta un'espressione in membrana ridotta in modo statisticamente significativo ($p < 0.01$) rispetto al WT. Inoltre, il mutante presenta una curva dose-risposta per il cAMP, caratterizzata da un' E_{max} ridotta ($88,2 \pm 9,4\%$ rispetto al WT) in concordanza con la ridotta espressione sulla superficie cellulare. Anche la capacità di trasdurre il segnale attraverso la via mediata $G_{q/11}$ è associata ad una ridotta risposta al bTSH.

Un'altra variante individuata sempre a carico dello stesso residuo è la **P162S** in cui il residuo di *Prolina* (CCT) 162 è sostituito con un residuo di *Serina* (TCT).

L'analisi di citofluorimetria ha rivelato che la variante P162S presenta un'espressione in membrana ridotta in modo statisticamente significativo ($p < 0.01$) rispetto al WT.

La curva dose-risposta per il cAMP, prodotto dopo stimolo con bTSH è caratterizzata da un' E_{max} ridotta ($75.5 \pm 16.35\%$ rispetto al WT). Questo dato è concordante con la ridotta espressione sulla superficie cellulare del mutante stesso. Inoltre, essendo la curva spostata verso destra rispetto al WT anche il parametro EC_{50} è aumentato ($11.61 \pm 2.693\%$ rispetto al WT). La valutazione della via di trasduzione mediata da G_q ha permesso di evidenziare che il mutante ha ridotta risposta al bTSH.

Sul residuo 162, oltre alle varianti indicate sopra, è stata individuata anche la variante P162A (Alberti, 2002). Da questi dati si evince la possibile presenza di un *hot spot* mutazionale a carico del suddetto residuo. Un'analisi condotta in silico ha dimostrato come il residuo P162 sia evolutivamente conservato ed essenziale per il corretto folding proteico della regione di aggancio del recettore all'ormone (Fig. 2).

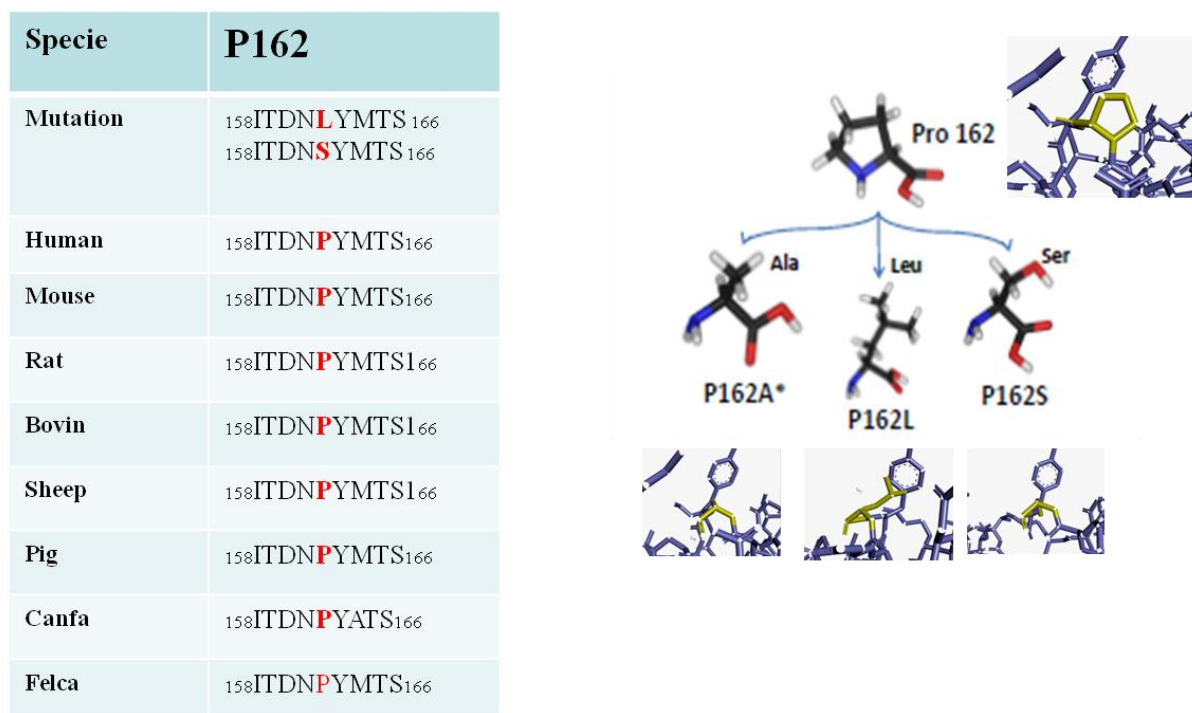


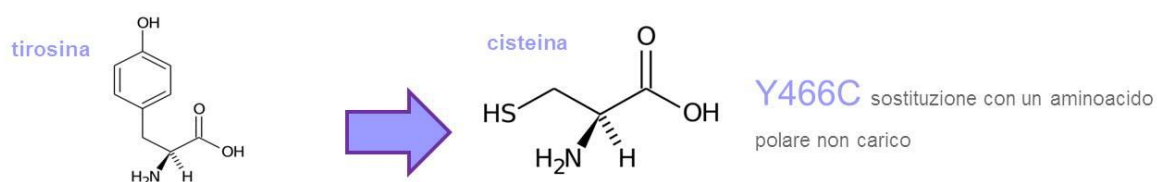
Figura 2 Allineamento e modelling bioinformatico del residuo 162 del TSHR

La minor rigidità del gruppo laterale degli aminoacidi Ala, Leu e Ser provocherebbe un rilassamento dell'ansa del dominio extracellulare giustificando la ridotta funzionalità delle varianti sotto stimolo (TSH).

Gli studi funzionali effettuati sulla variante **Y466C**, il cui il cambio non conservativo coinvolge una *Tirosina* (TAT) altamente conservata, facente parte della seconda elica trans membrana (TM2) del recettore, mostrano una ridotta espressione sulla membrana plasmatica delle cellule COS-7. Inoltre lo stesso mutante presenta un signalling mediato sia da G_s sia da G_q gravemente compromesso. Sorprendente è presente un aumento dell'attività basale in termini di cAMP accumulato rispetto al WT. Come precedentemente descritto per la variante LOF p.R310C (Russo et al.; 2000), che presenta caratteristiche simili alla variante Y466C, sarebbe interessante valutare l'attività dei mutanti sperimentali p.Y466A, p.Y466F e C462Y

(Fig. 3). Questo avvalorerebbe il modello secondo cui le interazioni fisiche tra residui chiave appartenenti alle eliche trans membrana 2 e 3 (TM2 e TM3) sarebbero estremamente rilevanti per la stabilità e l'attività basale del TSH recettore. Il modello bioinformatico del TSHR mostra come la grande catena laterale della *Tirosina* (Y) localizzata in posizione 466 sia in contatto diretto con le catene laterali della *Cisteina* (C) in posizione 462, della *Metionina* (M) in posizione 465 localizzate entrambe nel TM2 e con la *Prolina* in posizione (P) 492 e la *Fenilalanina* (F) in posizione 500 del TM3. Le interazioni che coinvolgono la catena laterale Y466 sono di tipo idrofobico di Van der Waals (Fig.4).

Variante naturale



Varianti sperimentali

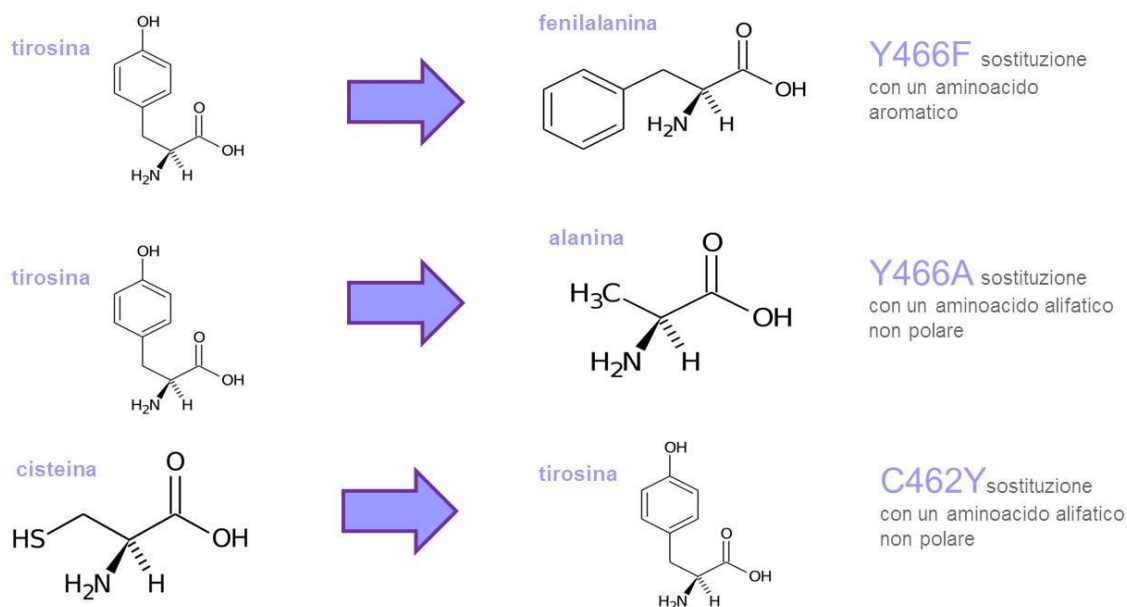


Figura 3 Mutanti sperimentali utilizzati per lo studio della variante Y466C

Poiché tali interazioni contribuiscono alla stabilità complessiva del recettore, calcolando la superficie complessiva e confrontandola con i valori riportanti nelle misurazioni in presenza

di sostituzione Y466C si è visto che nel WT, le catene laterali dei quattro residui in contatto con Y466, hanno una superficie complessiva di 410 \AA^2 mentre nel mutato la superficie è di 356 \AA^2 perdendo così 53 \AA^2 di interazioni favorevoli al folding recettoriale. Tutto questo potrebbe essere ricondotto alla perdita di stabilità della forma inattiva del TSHR e allo spostamento dell'equilibrio verso la forma più attiva, con una conseguente attività costitutiva del recettore.

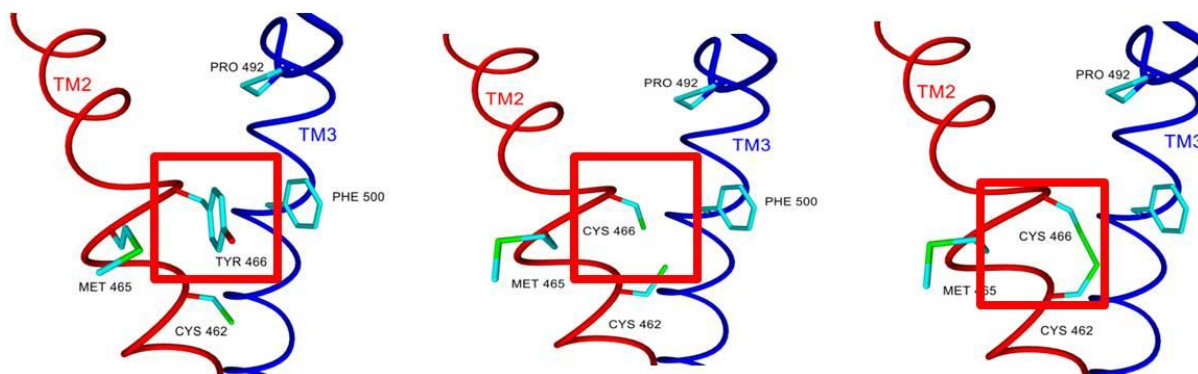


Figura 4 Modelli bioinformatici delle eliche TM2 e TM3 e interazioni tra i residui strettamente conservati

Sorprendentemente, il modello in silico del mutante Y466C mostra una favorevole posizione spaziale, in seguito all'introduzione del residuo C462, per formare un ponte disolfuro intra elica. Questo porta ad ipotizzare che un irrigidimento del secondo dominio trans membrana attraverso un ponte disolfuro potrebbe ostacolare il normale funzionamento del TSH recettore e portare ad un mutante costitutivamente attivo.

Gli studi funzionali effettuati sulla variante **L57P**, in cui il cambio non conservativo coinvolge una *Leucina* (CCG) altamente conservata dell'ECD del recettore, mostrano una espressione sulla membrana plasmatica delle cellule COS 7 ridotta di circa il 50% con significatività pari a $p < 0.001$. Valutando la curva dose-risposta al bTSH relativa all'accumulo di cAMP intracellulare, si evince che il mutante in questione sembra non trasdurre il segnale. Inoltre, se osservano i risultati dell'indagine sulla via di trasduzione del segnale mediata da G_q , si può notare come non vi siano differenze tra l'attività basale del mutante e l'attività post-stimolo suggerendo un'assenza di trasduzione del segnale. Tutto questo potrebbe essere giustificato dall'accentuata riduzione dell'espressione in membrana e da un'eventuale anomalia di legame del recettore mutato con l'ormone glicoproteico. Il residuo 57 è localizzato nel dominio extracellulare in una delle regioni definite Cystein-Rich Flanking Regions (CFRs). Studi preliminari di cristallografia dei domini extra cellulari avevano attribuito a tale regione il

compito di garantire la specificità di legame con l'ormone glicoproteico. Tuttavia, la maggior parte delle mutazioni riportate in questa regione, tra cui anche la L57P di nuova identificazione, sono anche caratterizzate da una ridotta espressione sulla superficie cellulare e, di conseguenza, da una parziale o completa inattività del recettore, come già valutato per la variante C41S (Alberti et al, 2002;. Calebiro et al, 2005).

Questo è probabilmente la conseguenza di misfolding del recettore che rimarrebbe intrappolato all'interno del reticolo endoplasmatico della cellula o addirittura degradato prima che raggiunga la localizzazione target. Prospettivi studi di Western blot, immunofluorescenza indiretta e dominanza negativa, ci permetteranno di chiarire la localizzazione del mutante e la sua attività rispetto al recettore WT.

Una situazione simile si osserva per il mutante **P668L** in cui il residuo di *Prolina* (CCA) 668 è stato sostituito con un residuo di *Leucina* (CTA).

Gli studi funzionali mostrano una lieve riduzione dell'espressione in membrana delle cellule COS 7. Valutando la curva dose-risposta al bTSH relativa all'accumulo di cAMP intracellulare, si evince che il mutante in questione sembra non trasdurre il segnale. Inoltre, se si osservano i risultati dell'indagine sulla via di trasduzione del segnale mediata da G_q, si osserva come il mutante presenti un'attività basale più alta rispetto al WT (p<0.001). Altresì, non vi sono differenze tra l'attività basale e l'attività post-stimolo suggerendo un'assenza di trasduzione del segnale.

Il residuo 668 è localizzato nel C-terminale del TM7. Data la localizzazione intermedia tra il trans membrana e la coda citoplasmatica del recettore, questo residuo sembra essere importante per la stabilizzazione della conformazione inattiva del recettore, attraverso le interazioni che coinvolgono i residui amminoacidici dei vari TMD. Questo potrebbe giustificare come una sostituzione amminoacidica in tale regione apporterebbe una perdita di stabilità della forma inattiva favorendo l'equilibrio verso la forma attiva e quindi un aumento dell'attività basale della via mediata da G_q. Inoltre, l'estrema vicinanza del residuo 668 alla coda intracellulare, responsabile dell'interazione con le proteine G eterotrimeriche fa sì che una variante in questa posizione possa ridurre drasticamente o completamente annullare l'attività di trasduzione del segnale del recettore stesso. È bene sottolineare come in questo caso il processo migrazione del recettore in membrana rimanga quasi inalterato.

La variante **S745C** è la prima mutazione individuata nella coda citoplasmatica del recettore per il TSH. Come indicato precedentemente questa regione è fortemente interattiva con le proteine G eterotrimeriche, consentendo la trasduzione del segnale dalla membrana al

citoplasma. La variante del dominio 745 è caratterizzata da una ridotta attività del recettore nel pathway di G_q avvalorando l'ipotesi che il recettore interagisce con essa soprattutto attraverso la sua regione più distale.

Le varianti missenso **I583T**, **T607I**, **R609Q** non sono caratterizzate da particolari differenze di espressione in membrana rispetto al recettore WT e presentano curve dose-risposta indicative di una via di trasduzione del segnale mediata da G_s funzionante. Di contro, questi mutanti presentano alterazioni nella segnalazione mediata da G_q .

Quest'ultimo risultato può contribuire a chiarire la rilevanza fisiologica, attualmente in discussione, della trasduzione del segnale mediata da G_q del TSH recettore.

In letteratura alcuni dati mostrano che sono necessarie elevate concentrazioni di TSH per attivare una trasduzione mediata da G_q (Van Sande, 1995); in altri lavori invece è stato dimostrato come topi knock-out $Gq/11$ tiroido-specifici presentino un fenotipo di resistenza al TSH o ipotiroidismo generico (Kero, 2007).

Sulla base di quanto indicato nella letteratura recente e nel presente studio, è ormai chiaro che il recettore per il TSH trasduce parte del suo segnale anche attraverso la proteina G_q . Per questo è opportuno che varianti di nuova generazione vengano valutate dal punto di vista funzionale anche sulla suddetta via.

In conclusione, questo studio dimostra che le alterazioni non polimorfiche del gene TSHR sono comunemente associate a ipertitotropinemia non autoimmune isolata nei bambini. Questo giustifica l'efficacia delle indagini genetiche volte a migliorare la gestione clinica di questa condizione. Inoltre con questo lavoro abbiamo aggiunto ulteriori evidenze che oltre alle ben note alterazioni della classica via di trasduzione mediata dalla proteina eterotrimerica G_s , anche difetti di segnalazione nella via trasduzione mediata da G_q possono contribuire alla patogenesi dell'ipertitotropinemia non autoimmune con un frequenza più alta di quanto si pensasse.

BIBLIOGRAFIA

1. Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28; 97(7):3684-9.
2. Akamizu T, Inoue D, Kosugi S, Kohn LD, Mori T. (1994) Further studies of amino acids (268–304) in thyrotropin (TSH)-lutropin/chorionic gonadotropin (LH/CG) receptor chimeras: cysteine-301 is important in TSH binding and receptor tertiary structure. *Thyroid* 4:43–48
3. Alberti L, Proverbio MC, Costagliola S, Romoli R, Boldrighini B, Vigone MC, Weber G, Chiumello G, Beck-Peccoz P, Persani L. Germline mutations of TSH receptor gene as cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2549-55.
4. Alberti L, Proverbio MC, Costagliola S, Weber G, Beck-Peccoz P, Chiumello G, Persani L. A novel germline mutation in the TSH receptor gene causes non-autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism.
5. Alberti L, Proverbio M, Costagliola S, Romoli R, Boldrighini B, Vigone M, Weber G, Chiumello G, Beck-peccoz P, Persani L (2002) Germline mutations of TSH receptor gene as a cause of nonautoimmune subclinical hypothyroidism
6. Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, Iacovino M, Liao XH, Dumitrescu AM, Refetoff S, Peremans K, Manto M, Kyba M, Costagliola S. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):66-71 . *J. Clin. Endo. Metab*. 87(6):2549-2555
7. Arseven OK, Wilkes WP, Jameson JL, Kopp P (2000) Substitutions of tyrosine 601 in the human thyrotropin receptor result in increase or loss of basal activation of the cyclic adenosine monophosphate pathway and disrupt coupling to Gq/11. *Thyroid* 10:3–10
8. Ascoli M (2002) The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr. Rev.* 23, 141–174
9. Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., Kwatra, M. M., Snyder, S. H., Caron M. G. and Lefkowitz, R. J. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J. Biol. Chem.*1992; 267, 17882-17890.

10. Beck-Peccoz P, Mannavola D, Persani L. Syndromes of thyroid hormone resistance. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2005 Jun;66(3):264-9.
11. Beck-Peccoz P, Persani L, Calebiro D, Bonomi M, Mannavola D, Campi I (2006a) Syndromes of hormone resistance in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Clin. Endocr. Metabolism* 20(4):529-546
12. Beck-Peccoz, P., Calebiro, D., Persani, L., 2006b. TSH resistance. *Hot Thyroidol.*, e1. Stanbury, J.B., Rocmans, P., Buhler, U.K., Ochi, Y., 1968. Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin. *N. Engl. J. Med.* 21, 1132–1136
13. Bernal J, Guadano-Ferraz A, Morte B (2003) Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid*.13:1005–1012
14. Biebermann H, Schoneberg T, Krude H, Schultz G, Gudermann T, Gruters A (1997) Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism. *J. Clin. Endo. Metabolism* 82(10):3471-3482
15. Bhowmick, N. (1996) Determination of residues important in hormone binding to the extracellular domain of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by site-directed mutagenesis and modeling. *Mol. Endocrinol.* 10, 1147–1159
16. Bulenger S, Marullo S, Bouvier M. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Mar; 26(3):131-7
17. Calaciuria F, Motta R, Miscio G, Fichera G, Leonardi D, Carta A, Trischitta V Tassi V, Sava L, Vigneri R (2002) Subclinical Hypothyroidism in early childhood: a frequent outcome of transient neonatal hypothyrotropinemia. *J. Clin. Endocr. Metabolism* 87(7) :3209-3214
18. 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. Gen.* 14(20):2991-3002
19. Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, Persani L, Lohse MJ. Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol.* 2009 Aug;7(8):e1000172
20. Calebiro D. Thyroid-stimulating hormone receptor activity after internalization. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2011 Apr;72(2):64-7.

21. Calebiro D, Gelmini G, Cordella D, Bonomi M, Winkler F, Biebermann H, de Marco A, Marelli F, Libri DV, Antonica F, Vigone MC, Cappa M, Mian C, Sartorio A, Beck-Peccoz P, Radetti G, Weber G, Persani L. (2012) Frequent TSH receptor genetic alterations with variable signaling impairment in a large series of children with nonautoimmune isolated hyperthyrotropinemia. *J Clin Endocrinol*
22. Cvejic S, Devi LA. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem.* 1997 Oct 24; 272(43):26959-64.
23. Chazenbalk GD, Nagayama Y, Wadsworth H, Russo D, Rapoport B (1991) Signal transduction by the human thyrotropin receptor: studies on the role of individual amino acid residues in the carboxyl terminal region of the third cytoplasmic loop. *Mol. Endocrinol.* 5:1523–1526
24. Claus M, Neumann S, Kleinau G, Krause G, Paschke (2006) Structural determinants for G-protein activation and specificity in the third intracellular loop of the thyroid-stimulating hormone receptor. *J. Mol. Med.* 84:943-954
25. Collins S, Lohse MJ, O’Dowd B, Caron M, Lefkowitz R (1991) Structure and regulation of G protein-coupled receptors: the beta2 adrenergic receptor as a model. *Vitam. Horm.* 46:1-39
26. Corbetta S, Eller-Vainicher C, Frigerio M, Valaperta R, Costa E, Vicentini L, Baccarelli A, Beck-Peccoz P, Spada A. Analysis of the 206M polymorphic variant of the SLC26A6 gene encoding a Cl⁻ oxalate transporter in patients with primary hyperparathyroidism.
27. Crisanti P, Omri B, Hughes EJ, Meduri G, Hery C, Clauser E, Jacquemin C, Saunier B. (2001) The expression of thyrotropin receptor in the brain. *Endocrinology* 142: 812–822
28. Costagliola S, Sunthornteparakul 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* 9:995–1000
29. Davies TF. (1994) Editorial: The thyrotropin receptors spread themselves around. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79: 1232–1233
30. Davies T, Ando T, Lin R, Torner Y, Latif R (2005) Thyrotropin receptor-associated diseases : from adenomata to Graves disease. *J. Clin. Invest.* 115(8) :1972-1983
31. De Felice M, Di Lauro R (2004) Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanism. *Endocr. Rev.* 25(5):722-746

32. De Vries L, Fischer T, Tronchère H, Brothers GM, Strockbine B, Siderovski DP, Farquhar MG. Activator of G protein signaling 3 is a guanine dissociation inhibitor for G alpha i subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19; 97(26):14364-9.
33. Dias J A, Van Roey P (2001) Structural biology of human follitropin and its receptor. *Arch. Med. Res.* 32, 510–519
34. Dracopoli N.C, Retting W.J., Whitefield. (1986) Assignment of the gene for the beta subunit of thyroid-stimulating hormone to the short arm of human chromosome 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1822–1826
35. Farid N, Szkudlinski M (2004) Structural and functional evolution of thyrotropin receptor. *Endocrinology* 145(9):4048-4057
36. Floyd D, Geva A, Bruinsma S, Overton M, Blumer K, Baranski T (2003) C5a receptor oligomerization. II. Fluorescence resonance energy transfer studies of a human G protein-coupled receptor expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* 278:35354–35361
37. Grasberg H, Van Sande J, Mahamed 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.* ; 92(7) :2816-282025.
38. Gross B, Misrahi M, Sar S, Milgrom E (1991) Composite structure of the human thyrotropin receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177:679-687
39. Gustavsson B, Westermark B, Heldin NE (1994) Point mutations of the thyrotropin receptor determining structural requirements for its ability to bind thyrotropin and to stimulate adenylate cyclase activity. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 199:612–618
40. Jordan BA, Trapaidze N, Gomes I, Nivarthi R, Devi LA. Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 2; 98(1):343-8.
41. Kaczur V, Racz I, Szendroi A, Takacs M, Farid NR 2002 The cysteine-rich C-flanking region of the thyrotropin receptor has very ancient phylogenetic origins: implications from sequence analysis. *J. Endocr. Genet.* 3:46–54
42. Kero J, Ahmed K, Wettschureck N, Tunaru S, Wintermantel T, Greiner E, Schutz G, Offermanns S 2007 Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J Clin Invest* 117:2399-2407
43. Kobe B, Deisenhofer J (1993) Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature* 366, 751–756
44. Kopp P (2001) the TSH receptor and its role in thyroid disease. *CMLS* 58:1302-1322

45. Kuner R, Köhr G, Grünewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC. Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science*. 1999 Jan 1; 283(5398):74-7.
46. Kursawe R, Paschke (2007) Modulation of TSHR signaling by posttranslational modifications. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 18(5):199-207
47. Le PU, Guay G, Altschuler Y, Nabi IR. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2002; 277: 3371–9.
48. Latif R, Graves P, Davies, T (2001) Oligomerization of the human thyrotropin receptor: fluorescent protein-tagged hTSHR reveals post-translational complexes. *J. Biol. Chem*. 276: 45217–45224.
49. Libert F, Passage E, Lefort A, Vassart G, Mattei MG (1990) Localization of human Thyrotropin receptor gene to the q31 band of chromosome 14 by in situ hybridization. *Cyogenet. Cell. Genet*. 54:82-83
50. Liang Y, Fotiadis D, Filipek S, Saperstein DA, Palczewski K, Engel A. Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem*. 2003 Jun 13; 278(24):21655-62.
51. Loubière LS, Vasilopoulou E, Bulmer JN, Taylor PM, Stieger B, Verrey F, McCabe CJ, Franklyn JA, Kilby MD, Chan SY. Expression of thyroid hormone transporters in the human placenta and changes associated with intrauterine growth restriction. *Placenta*. 2010 Apr;31(4):295-304.
52. MAGNER JA. Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology, and bioactivity. *Endocr Rev* 11: 354–385, 1990.
53. Mengistu M, Lukes YG, Nagy EV, Burch HB, Carr FE, Lahiri S, Burman KD. (1994) TSH receptor gene expression in retroocular fibroblasts. *J. Endocrinol. Invest*. 17: 437–441
54. Milligan G (2007) G-protein-coupled receptor dimerisation: molecular basis and relevance to function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768:825-835
55. Nagayama Y, Rapoport (1991) The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insight after its molecular cloning. *Mol. Endo*. 6:145-156
56. Nagashima T, Murakami M, Onigata K, Morimura T, Nagashima K, Mori M, Morikawa A (2001) Novel inactivating missense mutations in the thyrotropin receptor gene in Japanese children with resistance to thyrotropin. *Thyroid*;11:551–9
57. Parmentier, M., Libert, F., Maenhaut, C., Lefort, A., Gérard, C., Perret, J., Van Sande, J., Dumont, J.E., Vassart, G., 1989. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* 246, 1620–1622. function and growth. *Endocr. Rev*. 13, 596–611

58. PASTAN I, ROTH J, AND MACCHIA V. Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action. *Proc Natl Acad Sci USA* 56: 1802–1809, 1966.
59. Persani L, Beck-Peccoz P, Medri G, Conti A, Faglia G. Thyrotropin alpha- and beta-subunit responses to thyrotropin-releasing hormone and domperidone in normal subjects and in patients with microprolactinomas. *Neuroendocrinology*. 1991 Apr;53(4):411-5.
60. Persani L, Calebiro D, Cordella D, Weber G, Gelmini G, Libri D, de Filippis T, Bonomi M.
61. Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Jun 30;322(1-2):72-82
62. Persani L, Gelmini G, Marelli F, Beck-Peccoz P, Bonomi M. Syndromes of resistance to TSH. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2011 Apr;72(2):60-3
63. Persani L. Congenital Hypothyroidism with Gland in situ is More Frequent than Previously Thought. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:18.
64. PIERCE JG AND PARSONS TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50: 465–495, 1981.
65. Porazzi P, Marelli F, Benato F, de Filippis T, Calebiro D, Argenton F, Tiso N, Persani L. Disruptions of global and JAGGED1-mediated notch signaling affect thyroid morphogenesis in the zebrafish. *Endocrinology*. 2012 Nov;153(11):5645-58.
66. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM. (1998) The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr. Rev.* 19: 673–716
67. Refetoff S (2003) Resistance to thyrotropin. *J. Endocrinol. Invest.*; 26: 770-779.
68. Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and b-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17:159–164.
69. Rodien, P. (1998) Familial gestational hyperthyroidism caused by a mutant thyrotropin receptor hypersensitive to human chorionic gonadotropin. *N. Engl. J. Med.* 339, 1823–1826
70. Russo D, Betterle C, Arturi F, Chiefari E, Girelli ME, Filetti S (2000) A novel mutation in the thyrotropin (TSH) receptor gene causing loss of TSH binding but constitutive receptor activation in a family with resistance to TSH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*;85:4238–42.

71. Schulz A, Bruns K, Henklein P, Krause G, Schubert M, Gudermann T, Wray V, Schultz G, Schoneberg T (2000) Requirement of specific intrahelical interactions for stabilizing the inactive conformation of glycoprotein hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 275:37860–37869
72. Smits G, Campillo M, Govaerts C, Janssens V, Richter C, Vassart G, Pardo L, Costagliola S (2003) Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity. *The EMBO Journal* 22(11):2692-2703
73. Song YS, Ji I, Beauchamp J, Isaacs NW, Ji TH (2001) Hormone interactions to the Leu-rich repeats in gonadotropin receptors. II. Analysis of Leu-rich repeat4 of human luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor. *J. Biol. Chem.* 276:3436–3442
74. Szkudlinski M, Fremont V, Ronin C, Weintraub B (2002) Thyroid-stimulating Hormone and Thyroid-stimulating hormone receptor Structure-function relationships. *Physiol. Rev.* 82:473-502
75. Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol.* 2003 Apr; 17(4):677-91.
76. Toublanc J (1992) Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts of the world. *Horm. Res.(Basel)*;38:230–5.
77. Uberti MA, Hall RA, Minneman KP. Subtype-specific dimerization of alpha 1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties. Subtype-specific dimerization of alpha 1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties
78. Update of Newborn Screening and Therapy for Congenital Hypothyroidism. *Pediatrics*, 2006
79. UHLENHUTH E. The anterior lobe of the hypophysis as a control mechanism of the function of the thyroid gland. *Br J Exp Biol* 5:1–5, 1927
80. Urizar E, Montanelli L, Loy T, Bonomi M, Swillens S, Gales C, Bouvier M, Smits G, Vassart G, Costagliola S. Glycoprotein hormone receptors: link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *EMBO J.* 2005 Jun 1;24(11):1954-64
81. Van Vliet G (2003) Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men [review]. *Clin. Genet.* 63:445–455.

82. Van Sande J, Raspé E, Perret J, Lejeune C, Maenhaut C, Vassart G, Dumont JE (1990) Thyrotropin activates both the cyclic AMP and the PIP2 cascades in CHO cells expressing the human cDNA of TSH receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 74:R1–R6
83. Van Sande, J. (1996) Specific activation of the thyrotropin receptor by trypsin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 119, 161–168
84. Van Sande J, Swillens S, Gerard C, Allgeier A, Massart C, Vassart G, Dumont JE (1995) In Chinese hamster ovary K1 cells dog and human thyrotropin receptors activate both the cyclic AMP and the phosphatidylinositol 4:5-bisphosphate cascades in the presence of thyrotropin and the cyclic AMP cascade in its absence. *Eur. J. Biochem.* 229:338–343
85. Van Sande J, Massart C, Costagliola S, Allgeier A, Cetani F, Vassart G, Dumont JE. (1996) Specific activation of the thyrotropin receptor by trypsin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 119: 161–168
86. Vassart G, Dumont JE (1992) The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr. Rev.* 13:596–611
87. Vassart G, Pardo L, Costagliola S (2004) A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends in Biochem. Sciences* 29(3):119-126
88. Vlaeminck-Guillem V, Ho S, Rodien P, Vassart G, Costagliola S (2002) Activation of the cAMP pathway by the TSH receptor involves switching of the ectodomain from a tethered inverse agonist to an agonist. *Mol. Endo.* 16(4):736-746
89. Wess J (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.* 80:231–264
90. Wonerow P, Schoneberg T, Schultz G, Gudermann T, Paschke R (1998) Deletions in the third intracellular loop of the thyrotropin receptor. A new mechanism for constitutive activation. *J. Biol. Chem.* 273:7900–7905
91. Wonerow P, Neumann S, Gudermann T, Paschke R (2001) Thyrotropin receptor mutations as a tool to understand thyrotropin receptor action. *J. Mol. Med.* 79:707-721
92. WONDISFORD FE, USALA SJ, DECHERNEY GS, CASTREN M, RADOVICK S, GYVES PW, TREMPE JP, KERFOOT BP, NIKODEM VM, CARTER BJ, AND WEINTRAUB BD. Cloning of the human thyrotropin beta-subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection. *Mol Endocrinol* 2: 32–39, 1988.
93. WU H, LUSTBADER JW, LIU Y, CANFIELD RE, AND HENDRICKSON WA. Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6 Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Structure* 2:545–558, 1994.

94. Zhang ML, Sugawa H, Kosugi S, Mori T. (1995) Constitutive activation of the thyrotropin receptor by deletion of a portion of the extracellular domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 205–210
95. Zoenen M, Urizar E, Swillens S, Vassart G, Costagliola S. Evidence for activity-regulated hormone-binding cooperativity across glycoprotein hormone receptor homomers. *Nat Commun.* 2012;3:1007

