



**UNIMORE**  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI  
MODENA E REGGIO EMILIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche

## **Confronto delle cross-interazioni di LH e hCG con il recettore del TSH**

### ***Relatore***

*Prof. Livio Casarini*

### ***Co-Relatori***

*Dott.ssa Carmela Perri*

*Dott.ssa Clara Lazzaretti*

### ***Laureando***

*Ninfa Valentina Lo Sciuto*

**ANNO ACCADEMICO 2025/2026**

## INDICE

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.ABSTRACT                                                                                                                      | 4  |
| 2.INTRODUZIONE                                                                                                                  | 6  |
| 2.1 Omeostasi e fisiologia della tiroide in gravidanza                                                                          | 6  |
| 2.2 Tireotossicosi gestazionale                                                                                                 | 6  |
| 2.3 HCG e ormone luteinizzante (LH)                                                                                             | 7  |
| 2.4 Il recettore del TSH (TSHR)                                                                                                 | 8  |
| 3.SCOPO                                                                                                                         | 11 |
| 4.MATERIALI E METODI                                                                                                            | 12 |
| 4.1 Ormoni Ricombinati                                                                                                          | 12 |
| 4.2 Colture cellulari                                                                                                           | 12 |
| 4.2.1 Split cellulare                                                                                                           | 12 |
| 4.3 Protocolli di trasfezione                                                                                                   | 12 |
| 4.3.1 Trasfezione in sospensione di cellule COS-7 per la valutazione dei livelli intracellulari di cAMP mediante metodica BRET. | 12 |
| 4.3.2 Trasfezione in sospensione di cellule COS-7 per la valutazione dei livelli intracellulari di IP1 mediante il saggio HTRF  | 13 |
| 4.3.4 Trasfezione in adesione di cellule COS-7 per la valutazione dell'attività di <i>CRE</i>                                   | 13 |
| 4.4 Metodica BRET                                                                                                               | 13 |
| 4.4.1 Valutazione accumulo intracellulare di cAMP con TSHR                                                                      | 14 |
| 4.5 Allestimento di sferoidi tiroidei                                                                                           | 14 |
| 4.5.1 Digestione del tessuto tiroideo                                                                                           | 14 |
| 4.5.2 Preparazione degli sferoidi                                                                                               | 15 |
| 4.6 Metodica HTRF                                                                                                               | 15 |
| 4.6.1 Valutazione dei livelli intracellulari di IP1 mediante HTRF                                                               | 16 |
| 4.6.2 Valutazione dei livelli intracellulari di cAMP mediante HTRF                                                              | 17 |
| 4.7 Valutazione dell'attività di <i>CRE</i>                                                                                     | 17 |
| 4.8 Analisi statistica                                                                                                          | 17 |
| 5. RISULTATI                                                                                                                    | 19 |
| 5.1 Analisi dell'accumulo intracellulare di cAMP                                                                                | 19 |
| 5.2 Analisi dell'attività di <i>CRE</i>                                                                                         | 22 |
| 5.3 Analisi dei livelli intracellulari di IP1                                                                                   | 23 |
| 5.4 Formazione colture 3D di tireociti e analisi livelli intracellulari cAMP                                                    | 26 |

|                |    |
|----------------|----|
| 6. DISCUSSIONE | 29 |
| 7. CONCLUSIONI | 31 |
| 8.BIBLIOGRAFIA | 32 |

## 1.ABSTRACT

La gonadotropina corionica umana (hCG) e l'ormone luteinizzante (LH) sono ormoni glicoproteici che condividono il medesimo recettore (LHCGR). Nonostante l'elevata identità di sequenza, evidenze recenti suggeriscono che hCG e LH possano attivare vie di trasduzione del segnale intracellulare differenti. Le gonadotropine presentano una significativa somiglianza strutturale con l'ormone tireostimolante (TSH) ed è noto che, durante la gravidanza, hCG possa indurre una transitoria iperattività tiroidea attraverso l'interazione con il recettore del TSH (TSHR). Non è chiaro se anche LH sia in grado di interagire con il TSHR e quali siano gli eventuali effetti funzionali di tale interazione.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è confrontare in vitro la cross-interazione di hCG vs LH con TSHR, valutandone l'attivazione delle principali vie di trasduzione del segnale mediate dalle proteine G $\alpha$ s e G $\alpha$ q. A tale scopo, la linea cellulare COS-7 è stata trasfettata con un plasmide contenente il cDNA codificante per TSHR. Le cellule sono quindi state trattate con concentrazioni crescenti di hCG e LH nell'intervallo nanomolare-micromolare. La produzione di inositolo monofosfato (IP1), adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e l'attività di cAMP response element (*CRE*) è stata valutata mediante *bioluminescence resonance energy transfer* (BRET), *homogeneous time-resolved fluorescence* (HTRF) e *luciferase assay*, rispettivamente. I dati raccolti sono stati confermati in modelli di colture cellulari tridimensionali, ossia sferoidi sviluppati utilizzando frammenti di biopsie tiroidee.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che hCG induce un incremento significativo e dose-dipendente dei livelli intracellulari di cAMP e dell'attività trascrizionale *CRE*-dipendente, confermando l'attivazione selettiva della via TSHR/G $\alpha$ s. Al contrario, LH ha indotto l'inibizione di cAMP e *CRE* mediate da TSHR, quando l'ormone è stato somministrato a concentrazioni micromolari dimostrando il comportamento antagonista nei confronti del recettore. Né hCG né LH hanno indotto l'attivazione della via G $\alpha$ q/IP1. Tuttavia, concentrazioni micromolari di LH hanno svolto azione antagonista nei confronti dell'attivazione di IP1 TSH-dipendente. Negli sferoidi di tiroide, hCG è in grado di mimare l'azione del TSH, poiché entrambe le molecole hanno indotto l'organizzazione tridimensionale dei tireociti, mentre LH non ha mostrato alcun effetto.

I risultati di questo studio suggeriscono che hCG sia in grado di cross-interagire selettivamente con il TSHR, innescando esclusivamente l'attivazione della via di trasduzione del segnale G $\alpha$ s/cAMP e la conseguente attivazione trascrizionale mediata da *CRE*. Ciò suggerisce l'esistenza

di un meccanismo molecolare alla base dei fenomeni di iperattività tiroidea, talvolta associata a tireotossicosi gestazionale. I risultati identificano in LH un potenziale modulatore negativo dell'attività del TSHR, suggerendo per la prima volta un possibile ruolo antagonista di questa gonadotropina nei confronti delle vie di trasduzione del segnale mediate dalle proteine *Gas* e *Gαq*. Tali evidenze ampliano la comprensione della promiscuità del sistema ormoni-recettori glicoproteici. Questi risultati indicano che il TSHR potrebbe essere un partner delle gonadotropine, aprendo nuove prospettive nello studio della fisiopatologia tiroidea.

## **2.INTRODUZIONE**

### **2.1 Omeostasi e fisiologia della tiroide in gravidanza**

Durante la gestazione, il controllo endocrino della tiroide materna subisce mutamenti guidati da cambiamenti dei livelli di ormoni steroidei e glicoproteici necessari a garantire lo sviluppo fetale. Tra le modificazioni anatomiche e funzionali più significative si può riscontrare l'incremento del volume ghiandolare compreso tra il 10% e il 40%. Inoltre, si si potrebbe riscontrare l'incremento dei livelli sierici degli ormoni tiroidei, triiodotironina (T<sub>3</sub>) e tiroxina (T<sub>4</sub>), il quale può andare oltre il 50% rispetto ai livelli pre-gravidici. L'aumento dei livelli di T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> è concomitante con l'aumento dei livelli sierici della gonadotropina corionica umana (hCG), un ormone glicoproteico necessario a sostenere la produzione di progesterone nel primo trimestre di gravidanza. Pertanto, si ritiene che hCG potrebbe essere coinvolta nella regolazione delle funzioni tiroidee (Hershman, 2004).

### **2.2 Tireotossicosi gestazionale**

Nel primo trimestre della gravidanza, l'iperattività tiroidea può essere associata a tireotossicosi, condizione che viene diagnosticata nell'1%-3% delle gravidanze. La tireotossicosi è una condizione clinica caratterizzata da eccesso nei livelli sierici degli ormoni tiroidei. Tra le principali manifestazioni cliniche si riscontrano astenia, ridotta capacità di concentrazione, complicanze cardiovascolari e intolleranza al calore (Franklyn & Boelaert, 2012). Dal punto di vista eziologico, la tireotossicosi è riconducibile a una maggiore stimolazione del recettore dell'ormone tireostimolante (TSHR) o a processi infiammatori, come le tiroiditi, che provocano la distruzione delle cellule follicolari tiroidee e conseguente rilascio di ormoni tiroidei (Andersen & Knøsgaard, 2020). Durante la gravidanza è noto che l'aumento delle concentrazioni sieriche di hCG possa esercitare un effetto tireotropo attraverso l'attivazione del recettore del TSH espresso dai tireociti, determinando l'incremento delle concentrazioni circolanti di T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> e conseguente riduzione dei livelli sierici di TSH. Tali eventi raggiungono la massima intensità intorno alla decima settimana di gestazione, in corrispondenza del picco dei livelli sierici di hCG. Successivamente, la concentrazione di hCG diminuisce progressivamente e si mantiene relativamente stabile fino al termine della gravidanza (Kobaly & Mandel, 2019), determinando un miglioramento della sintomatologia associata a tireotossicosi.

Gli ormoni tiroidei materni sono essenziali per il corretto sviluppo delle cellule fetali, in particolare le cellule del sistema nervoso. Infatti, durante il primo trimestre di gestazione la

ghiandola tiroidea fetale non è autonoma da un punto di vista funzionale e non è in grado di sintetizzare ormoni propri. Quindi, lo sviluppo delle cellule neuronali dipende unicamente dall'apporto materno di  $T_3$  e  $T_4$  (Lazarus, 2011). Il trasferimento transplacentare di questi ormoni non avviene per diffusione passiva, ma è regolato a livello della barriera placentare (Vulsma et al., 1989). La tireotossicosi gestazionale si associa frequentemente all'iperemesi gravidica, condizione che può implicare l'ospedalizzazione della paziente, rischio di aborto e che si risolve con il calo dei livelli sierici di hCG. Tuttavia, l'ampia variabilità del quadro clinico suggerisce il coinvolgimento di meccanismi patogenetici multifattoriali e implica la possibilità che non esista una reale causa-effetto tra hCG e l'iperemesi gravidica (Goodwin et al., 1992; Hershman, 2004).

### **2.3 HCG e ormone luteinizzante (LH)**

HCG e l'ormone luteinizzante (LH) appartengono, insieme all'ormone follicolo-stimolante (FSH) e all'ormone tireostimolante (TSH), alla famiglia degli ormoni glicoproteici. Questi ormoni svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione di numerosi processi fisiologici, in particolare delle funzioni riproduttive e del metabolismo. LH è un ormone secreto dall'adenoipofisi, regola la sintesi di androgeni da parte delle gonadi e supporta la gametogenesi in entrambi i sessi. HCG è prodotta durante la gravidanza dalle cellule del sinciziotrofoblasto e promuove il mantenimento del corpo luteo e la secrezione di progesterone (Casarini et al., 2018). Le concentrazioni sieriche di hCG raggiungono il picco intorno alla decima settimana di gestazione, per poi diminuire e stabilizzarsi fino al termine della gravidanza (Cole, 2010). Dal punto di vista strutturale, questi ormoni sono eterodimeri costituiti da una subunità  $\alpha$  e da una subunità  $\beta$  associate mediante interazioni non covalenti. La subunità  $\alpha$  è comune a LH, hCG, FSH e TSH, ed è codificata dal gene *CGA*, localizzato sul cromosoma 6q14-q21, ed è costituita da 92 residui amminoacidici (Nagirnaja et al., 2010). La subunità  $\beta$ , invece, conferisce la specificità biologica dell'ormone, determinandone il legame con il rispettivo recettore. Le subunità  $\beta$  di LH e hCG hanno un'identità di sequenza pari all'80-85% e sono appartenenti allo stesso cluster genico, localizzato sul cromosoma 19q13.3 (Nagirnaja et al., 2010). Tuttavia, la subunità  $\beta$  dell'hCG presenta un'estensione C-terminale (CTP, C-terminal peptide) di 24 residui amminoacidici, assente nell'LH. Inoltre, le due molecole differiscono per il profilo delle modificazioni post-traduzionali. In particolare, esse differiscono per il numero di siti di glicosilazione, che sono tre per LH e otto per hCG, nonché per la qualità in termini di sialilazione e solfatazione, caratteristiche che influenzano la loro stabilità e l'emivita plasmatica (Casarini et al., 2018). L'elevato grado di glicosilazione di hCG ne riduce la clearance renale,

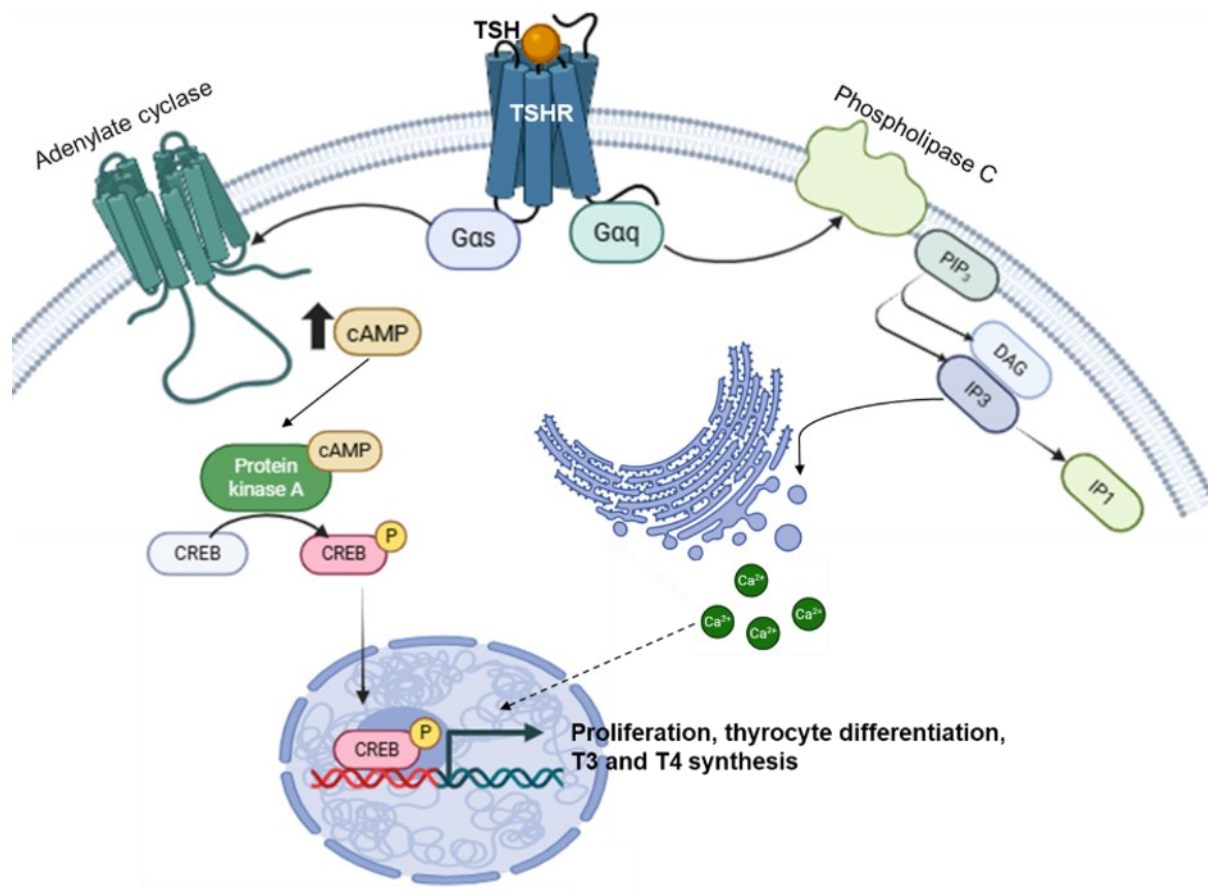
prolungandone l'emivita fino a 24-36 ore, mentre l'emivita di LH è di circa 90 minuti (Cole, 2010).

## 2.4 Il recettore del TSH (TSHR)

TSHR è codificato da un gene localizzato sul cromosoma 14q13 (Davies et al., 2002) e appartiene alla classe A dei recettori accoppiati a proteine G (GPCRs), comprendente anche il recettore di LH e hCG (LHCGR) e il recettore di FSH (FSHR). Tali recettori sono costituiti da un ampio dominio extracellulare N-terminale (ECD), responsabile del legame con il ligando, da una regione "cerniera", da un dominio transmembrana formato da sette  $\alpha$ -eliche (TMD) e da un dominio intracellulare C-terminale (ICD) (Jiang X et al., 2014). Il legame con il ligando induce un cambiamento conformazionale del recettore che promuove l'attivazione delle proteine G eterotrimeriche, costituite dalle subunità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . L'attivazione provoca la dissociazione della subunità  $\alpha$  e del dimero  $\beta\gamma$  che a loro volta modulano l'attività di diversi effettori intracellulari, tra cui l'adenilato ciclasi (AC) e la fosfolipasi C $\beta$  (PLC $\beta$ ), in funzione del sottotipo di proteina G coinvolto. Le proteine G $\alpha$  vengono classificate in differenti famiglie, tra le quali Gs, Gi, Gq e G12/13, così classificate sulla base della loro sequenza primaria e delle rispettive proprietà funzionali (Laugwitz et al., 1996). Gli effettori attivati catalizzano la produzione di secondi messaggeri, responsabili della propagazione e dell'amplificazione del segnale intracellulare (Jain et al., 2018). L'attivazione della proteina G $\alpha$ s stimola l'adenilato ciclasi, che converte l'adenosina trifosfato in adenosina monofosfato ciclico (cAMP). Le molecole di cAMP legano le subunità regolatorie della protein chinasi A (PKA) determinando il rilascio delle subunità catalitiche attive. La PKA fosforila il fattore di trascrizione *cAMP-response element binding-protein* (CREB), il quale lega le sequenze regolatorie note come *cAMP response elements* (CRE), promuovendo l'attivazione della trascrizione genica. La proteina G $\alpha$ q, invece, attiva la PLC $\beta$  che catalizza l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP2), generando diacilglicerolo (DAG) e inositolo-3-fosfato (IP3). Quest'ultimo induce il rilascio di Ca<sup>2+</sup> dai depositi intracellulari ed è successivamente metabolizzato fino a inositolo monofosfato (IP1) (Laurent et al., 1987).

TSHR è espresso nelle cellule follicolari tiroidee. L'interazione tra TSH e TSHR determina l'attivazione delle proteine Gs e Gq (Laugwitz et al., 1996). Questi eventi si traducono in risposte di tipo anti-apoptotico, di sopravvivenza e di produzione e rilascio degli ormoni T3 e T4 (Carvalho & Dupuy, 2017). TSHR condivide con FSHR e LHCGR un'elevata identità di sequenza, pari a circa il 70% nel dominio transmembrana. Nel dominio extracellulare, l'identità

di sequenza è pari a circa il 39% con FSHR e al 45% con LHCGR (Kopp, 2001). Questa elevata conservazione strutturale contribuisce a spiegare la parziale sovrapposizione delle proprietà di legame tra i recettori della stessa famiglia. Sebbene il ligando fisiologico del TSHR sia TSH, secreto dall'adenoipofisi per regolare la crescita e la funzione della ghiandola tiroidea (Szkudlinski et al., 2002), in particolari condizioni fisiologiche, come la gravidanza, il recettore potrebbe essere attivato anche dalla gonadotropina corionica umana (hCG). Quando le concentrazioni di hCG raggiungono concentrazioni sieriche elevate, ad esempio nel range  $\mu\text{M}$ -mM, come nel primo trimestre di gravidanza, si verifica cross-attivazione del TSHR, con conseguente aumento della sintesi e della secrezione degli ormoni tiroidei T3 e T4 e soppressione della secrezione ipofisaria di TSH. Questo meccanismo è considerato uno dei principali fattori responsabili dell'ipertiroidismo gestazionale transitorio (Hershman, 2004).



**Figura 1. Rappresentazione schematica delle vie di trasduzione del segnale intracellulare attivate da TSHR.** Il legame del TSH al recettore induce l'attivazione di due principali vie di trasduzione del segnale mediate dalle proteine G. A sinistra, la via associata alla proteina  $G_{\alpha s}$  stimola l'adenilato ciclasi (AC), determinando un aumento dei livelli intracellulari di adenosina monofosfato ciclico (cAMP). Il cAMP attiva la protein chinasi A (PKA), che fosforila il fattore di trascrizione CREB, promuovendo l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi degli ormoni tiroidei T3 e T4. A destra, la via associata alla proteina  $G_{\alpha q}$  attiva la fosfolipasi  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), che catalizza l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-bifosfato (PIP2) in diacilglicerolo (DAG) e inositolo-1,4,5-trifosfato (IP3). IP3 induce il rilascio di  $Ca^{2+}$  dal reticolo endoplasmatico ed è successivamente metabolizzato a inositolo monofosfato (IP1). Entrambe le vie contribuiscono in modo coordinato alla regolazione della funzione dei tireociti e della sintesi e secrezione degli ormoni tiroidei T3 e T4 (Laugwitz et al., 1996).

### **3.SCOPO**

È noto che le elevate concentrazioni di hCG durante il primo trimestre di gravidanza siano associate allo sviluppo di ipertiroidismo gestazionale transitorio, in conseguenza della cross-attivazione di TSHR.

Considerata la stretta correlazione strutturale e funzionale tra hCG e LH, il presente lavoro di tesi si propone di valutare in vitro la capacità di hCG e LH di attivare TSHR, confrontandone gli effetti sulle principali vie di trasduzione del segnale mediate dalle proteine Gas e Gαq.

## **4. MATERIALI E METODI**

### **4.1 Ormoni Ricombinati**

Per gli esperimenti descritti in questo studio sono stati utilizzati TSH (Thyrogen; Genzyme, una affiliata di Sanofi S.A., Parigi, Francia), hCG (Ovitrelle; Merck KGaA, Darmstadt, Germania) e LH (Luveris, Merck KGaA), prodotti tramite la tecnologia del DNA ricombinante.

### **4.2 Colture cellulari**

La linea cellulare COS-7, una linea immortalizzata derivata da cellule renali di scimmia verde africana, è stata impiegata come modello sperimentale per l'analisi delle risposte cellulari analizzate in questo progetto di tesi. Le cellule sono state mantenute in coltura in *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM) addizionato di siero fetale bovino (FBS) al 10%, streptomicina 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e L-glutammina 2 mM. Le cellule sono state coltivate in piastre Petri 92 x 16 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Germania), mantenute in incubatore a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. Raggiunta una confluenza cellulare del 70% è stata eseguita la procedura di *split* cellulare.

#### **4.2.1 Split cellulare**

Il terreno di coltura è stato rimosso mediante l'utilizzo di una pompa a vuoto ed è stato eseguito un lavaggio con *phosphate buffer saline* (PBS) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germania). Le cellule sono state incubate con 2 ml di tripsina (Sigma-Aldrich) per 2 minuti a 37°C al fine di degradare le proteine coinvolte nelle adesioni cellulari. Ciò consente di staccare le cellule dal fondo della piastra e dissociare gli aggregati cellulari. Conclusi i 2 minuti, l'effetto della tripsina è stato neutralizzato con 4,5 ml di terreno contenente FBS e le cellule sono state raccolte in un tubo da 15 ml e centrifugate a 25°C a 600 xg per 8 minuti. Dopo la centrifugazione è stato rimosso il surnatante, e le cellule sono state risospese con 1 ml di terreno contenente FBS e riseminate in piastre Petri.

### **4.3 Protocolli di trasfezione**

#### **4.3.1 Trasfezione in sospensione di cellule COS-7 per la valutazione dei livelli intracellulari di cAMP mediante metodica BRET.**

In una piastra multi-well da 96 pozzetti sono state seminate  $2 \times 10^4$  cellule per pozzetto in 200 µl/well di terreno privo di *phenol red* e contenente FBS. È stata preparata una miscela di trasfezione con 50 ng/well di plasmide contenente il cDNA codificante TSHR di diversi

vertebrati, quali *Homo sapiens*, cane, gatto, topo e ratto, e 15 ng/well di plasmide contenente il cDNA codificante il biosensore Nluc-EPAC-VV, utilizzato per la misurazione dei livelli intracellulari di cAMP. Il biosensore è costituito da una variante mutata della proteina umana *exchange protein directly activated by cAMP* (EPAC), fusa a un dominio *NanoLuc* (Nluc) all'estremità ammino-terminale e a due domini *Venus* all'estremità carbossi-terminale. Nella soluzione è stata aggiunta una miscela contenente 0,5 µl di Metafectene Pro (Biontex Laboratories GmbH) per pozzetto, diluito in DMEM. Trascorsi 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente, sono stati dispensati 50 µl di soluzione di trasfezione in ogni pozzetto e la piastra è stata incubata per 48 ore a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>.

#### **4.3.2 Trasfezione in sospensione di cellule COS-7 per la valutazione dei livelli intracellulari di IP1 mediante il saggio HTRF**

Sono state seminate, in una piastra *multi-well* da 96 pozzetti,  $2 \times 10^4$  cellule in 200 µl/well di terreno per pozzetto. È stata preparata una miscela di trasfezione contenente 50 ng/well di plasmide codificante per TSHR, alla quale è stato aggiunto un volume di 0,5 µl/well di Metafectene Pro, diluito in DMEM. Dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 50 µl di soluzione di trasfezione in ogni pozzetto. Infine, le cellule sono state incubate a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 48 ore.

#### **4.3.4 Trasfezione in adesione di cellule COS-7 per la valutazione dell'attività di CRE**

In un volume di 27,3 µl/well di terreno sono state seminate  $3,03 \times 10^3$  cells/well in una piastra *multi-well* da 384 pozzetti e successivamente le cellule sono state incubate 24 ore a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. È stata preparata una soluzione di trasfezione, in terreno DMEM, con 15,1 ng/well di plasmide contenente il cDNA codificante TSHR, 30,3 ng/well di plasmide contenente il cDNA codificante la luciferasi *firefly* sotto controllo trascrizionale della sequenza CRE. Ad essa sono stati aggiunti 0,15 µl/well di Metafectene Pro, diluito in terreno DMEM. Infine, le cellule sono state incubate a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore.

#### **4.4 Metodica BRET**

La tecnologia *bioluminescence resonance energy transfer* (BRET) è un metodo utilizzato per identificare le interazioni proteina-proteina in cellule vive e in tempo reale. È una tecnica che si basa sul trasferimento di energia di risonanza da un enzima definito donatore ad un fluorocromo definito accettore. Questo fenomeno si verifica quando l'enzima luciferasi ossida il proprio substrato, determinando un'emissione di energia che può essere trasferita, mediante

risonanza, alla molecola accettrice. Le proteine di interesse sono fuse con una molecola donatrice, generalmente l'enzima luciferasi, o con una molecola accettrice, un fluoroforo, ossia una molecola che assorbe energia luminosa ad una lunghezza d'onda specifica e la riemette ad una lunghezza d'onda maggiore. Affinché il trasferimento di energia avvenga devono verificarsi due condizioni: lo spettro di emissione del donatore deve corrispondere con lo spettro di eccitazione dell'accettore e le due proteine devono trovarsi ad una distanza inferiore a 10 nm (Bacart et al., 2008).

#### **4.4.1 Valutazione accumulo intracellulare di cAMP con TSHR**

Trascorse 48 ore di incubazione dopo la trasfezione, il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule, overesprimenti TSHR umano, sono state incubate 20 minuti a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> con 50 µl/well di una soluzione contenente PBS, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX; Sigma-Aldrich) 500 µM e HEPES 1 mM (Thermo Fisher Scientific). IBMX è un inibitore competitivo non specifico delle fosfodiesterasi che impedisce la degradazione del cAMP (Wang et al., 2004). Conclusi i 20 minuti, la soluzione è stata rimossa e le cellule sono state trattate con 30 µl/well di hCG somministrata in dosi crescenti (62,5 nM – 5 µM), così come LH (62,5 nM – 5 µM), mentre il TSH è stato somministrato alle concentrazioni 150 e 300 nM, e forskolina 50 µM (Tocris Bioscience, Bristol, Regno Unito). Tali trattamenti sono stati effettuati per 30 minuti a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule trattate con forskolina sono state utilizzate come controllo positivo in quanto questa molecola è in grado di attivare direttamente l'enzima adenilato ciclasi. Tutti i trattamenti sono stati diluiti in una soluzione di PBS, IBMX 500 µM e HEPES 1 mM. Terminati i 30 minuti del trattamento sono stati aggiunti 10 µl/well di *coelenterazine* H 5 µM (Thermo Fisher Scientific) e le emissioni sono state misurate mediante lettore di piastre "Spark" (Tecan, Männedorf, Svizzera) per 10 cicli di lettura.

Per quanto riguarda la valutazione dell'accumulo intracellulare di cAMP nelle cellule COS-7 overesprimenti TSHR canino, felino, murino e di ratto, i trattamenti sono stati eseguiti nelle condizioni precedentemente descritte selezionando tre dosi di hCG e LH (5 pM, 5 nM, 5 µM).

#### **4.5 Allestimento di sferoidi tiroidei**

##### **4.5.1 Digestione del tessuto tiroideo**

Le biopsie di tessuto tiroideo sono state fornite dall'Unità di Anatomia Patologica dell'Arcispedale Santa Maria Nuova di Reggio Emilia, Italia (dott.ssa Simonetta Piana), sotto consenso informato dei donatori e con approvazione del Comitato Etico locale. Dai tessuti sono

state rimosse le porzioni necrotiche e fibrotiche, e i campioni trasferiti all'interno di una piastra Petri contenente 10 ml di Hanks' *balanced salt solution* (HBSS), quindi frammentati tramite l'uso di un bisturi sterile. Le porzioni di tessuto sono state poste all'interno di un tubo da 15 ml contenente 5 ml di enzima Collagenasi IV (1 mg/ml) diluita in HBSS e poste per due ore in incubatore. La digestione enzimatica è stata coadiuvata da un'azione meccanica consistente nell'agitazione periodica del tubo contenente i frammenti biotici. Al termine dell'incubazione il contenuto del tubo è stato filtrato con il sistema Corning® 100 µm Cell Strainer, raccolto in un tubo da 50 ml e centrifugato a 1200 xg 5 minuti. Il pellet di cellule è stato risospeso e piastrato in terreno Humanized 7 *homeostatic additives* (h7H) medium.

#### **4.5.2 Preparazione degli sferoidi**

Le cellule primarie sono state coltivate fino al raggiungimento dell'80% di confluenza. Le cellule sono state staccate dalla piastra mediante trattamento con TrypLE™ Express Enzyme (Thermo Fisher Scientific) e contate per determinarne il numero da utilizzare per gli esperimenti. Per la preparazione del mezzo di coltura destinato alla formazione degli organoidi, il Geltrex™ (Thermo Fisher Scientific) è stato preventivamente disciolto in una quota di terreno h7H e aggiunto al mezzo finale a una concentrazione del 3%. La formazione degli sferoidi è stata effettuata utilizzando piastre Nunclon™ Sphera™ a 96 pozzetti con fondo a U, seminandovi 10.000 cellule per pozzetto in un volume finale di 100 µL di terreno. Dopo la semina, le piastre sono state centrifugate a 120 xg 5 minuti per favorire la sedimentazione e l'aggregazione cellulare sul fondo del pozzetto, promuovendo l'organizzazione in sferoidi tridimensionali.

Durante il periodo di coltura, il terreno è stato sostituito parzialmente ogni 48 ore con mezzo fresco contenente dosi crescenti di hCG (0-1 µM).

#### **4.6 Metodica HTRF**

L'HTRF è una tecnologia che combina il legame anticorpo-antigene con la *fluorescent resonance energy transfer* (FRET) al fine di rilevare interazioni molecolari. La FRET si basa sul trasferimento di energia di risonanza da un fluoroforo donatore a un fluoroforo accettore quando questi sono in stretta vicinanza (Degorce, 2009). Il donatore più usato nella metodica HTRF è una molecola di europio criptato, che ha uno spettro di eccitazione con picco a 337 nm e uno spettro di emissione a lunga durata con picco a 620 nm; mentre l'accettore più usato è una molecola prodotta a partire dall'alloficocianina (d2), che ha uno spettro di eccitazione con picco a 620 nm e uno spettro di emissione a lunga durata con a picco a 665 nm. In questo

studio, la tecnologia HTRF è stata applicata per la quantificazione dei secondi messaggeri IP1 e cAMP mediante utilizzando dei kit specifici (Revvity, Waltham, MA, USA). Il campione da analizzare è stato unito ad una soluzione contenente IP1/cAMP marcati con un fluoroforo accettore (d2) e ad un reagente contenente anticorpi anti-IP1/cAMP marcati con un fluoroforo donatore (K). Le molecole IP1 o cAMP marcate competono con gli analiti per il legame all'anticorpo. Dopo l'eccitazione del fluoroforo donatore, somministrata mediante un laser, viene rilevato trasferimento di energia luminosa per risonanza nel caso in cui l'anticorpo abbia legato IP1/cAMP marcato. Il segnale FRET registrato sarà inversamente proporzionale alla concentrazione intracellulare di IP1/cAMP presente nel campione.

#### **4.6.1 Valutazione dei livelli intracellulari di IP1 mediante HTRF**

Il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state incubate due ore a 37 °C con 5% di CO<sub>2</sub> in 50 µl/well di terreno di *starvation*, costituito da DMEM, penicillina 100 U/ml, streptomycin 50 µg/ml e L-glutamina 2 mM. Il terreno di *starvation* è stato rimosso e sono stati aggiunti 40 µl/well di una soluzione composta da terreno di *starvation* e 2 mg/ml di litio cloruro (LiCl; Sigma-Aldrich), il quale inibisce l'enzima myo-inositolo-fosfatasi/IMPasi che converte IP1 in myo-inositolo. La piastra è stata posta in incubatore 20 minuti a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state trattate 2 ore a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub> in 30 µl/well contenente dosi crescenti di ormone oppure taspigargina 1 µM (Tocris, Bristol, Regno Unito). Le cellule trattate con taspigargina, inibitore della pompa ATPasica del Ca<sup>2+</sup> del reticolo endoplasmatico, sono state usate come controllo positivo. Tutti i trattamenti sono stati diluiti nella soluzione di *starvation* e 2 mg/mL di LiCl. Trascorse le 2 ore di incubazione, i terreni sono stati rimossi e la piastra è stata congelata a -80°C per lisare le cellule. I lisati cellulari sono stati raccolti in 30 µl/well di *stimulation buffer*, fornito dal venditore, e i valori di IP1 sono stati misurati mediante l'uso di *IP-One-Gq KIT* (CisBio Bioassays, Bagnol sur Cèze, Francia). In una piastra multi-well da 384 pozzetti (Greiner Bio-One) sono quindi stati dispensati 14 µl/well di lisato cellulare, 3 µl/well di "reagente D" e 3 µl/well di "reagente K", entrambi diluiti in *lysis buffer*. Dopo 1 ora di incubazione al buio a temperatura ambiente, il segnale luminoso è stato misurato attraverso l'uso dello strumento "Spark", tramite il quale sono stati rilevati i segnali di emissione alle lunghezze d'onda di 620 nm e 665 nm. I rapporti dei valori di emissione tra accettore e donatore sono stati interpolati sulla curva *standard*, determinata seguendo le indicazioni del produttore del kit.

#### 4.6.2 Valutazione dei livelli intracellulari di cAMP mediante HTRF

Dopo dieci giorni dall'allestimento degli sferoidi, è stato eliminato il terreno coltura, sostituito con 50 µl/well di terreno di *starvation* e posto in incubatore a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub> 2 ore. Le cellule sono state incubate con terreno di *starvation* addizionato di IBMX 500 µM per 20 minuti, terminati i quali le colture 3D sono state trattate con TSH 150 nM e forskolina 50 µM per 2 ore. Tutti i trattamenti sono stati diluiti in terreno di *starvation* e IBMX 500 µM. Trascorse le due ore di incubazione, gli sferoidi sono stati raccolti in tubi da 1,5 ml e centrifugati a 600 xg un minuto. Questo passaggio consente la precipitazione degli sferoidi e la rimozione del terreno di coltura. Quindi, sono stati aggiunti 300 µl di PBS e la procedura è stata ripetuta. Le provette sono state poste a -80 °C per indurre, tramite il congelamento, la lisi cellulare. Successivamente, sono stati aggiunti ai campioni 30 µL di PBS e gli sferoidi sono stati sfaldati meccanicamente. La concentrazione intracellulare di cAMP è stata determinata tramite l'utilizzo del kit *cAMP dynamic 2 assay* (CisBio Bioassays). In una piastra multi-well da 384 pozzetti (Greiner Bio-One) sono quindi stati dispensati 10 µl/well di lisato cellulare, 5 µl/well di "reagente D" e 5 µl/well di "reagente K", entrambi diluiti in *lysis buffer*, fornito dal kit.

Dopo 1 ora di incubazione al buio a temperatura ambiente, il segnale luminoso è stato rilevato attraverso l'uso dello strumento "Spark", come precedentemente descritto.

#### 4.7 Valutazione dell'attività di CRE

Terminate le 24 ore di incubazione, le cellule sono state trattate cinque ore a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub>, con dosi crescenti di hCG e LH (62,5 nM – 5 µM), TSH 150 nM e forskolina 50 µM. Anche in questo caso, le cellule trattate con forskolina sono state utilizzate come controllo positivo. Tutti i trattamenti sono stati diluiti in terreno DMEM. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti alle cellule 30 µl del substrato ONE-Glo *luciferase* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), e i valori delle emissioni di lunghezza d'onda di 580 nm, derivanti dalla reazione di bioluminescenza, sono stati misurati utilizzando lo strumento Spark effettuando 10 cicli di lettura.

#### 4.8 Analisi statistica

L'analisi statistica e l'elaborazione grafica dei dati sono state effettuate utilizzando il software GraphPad Prism 6.0 (Dotmatics, Boston, MA, USA). Le differenze tra i risultati sono state valutate mediante Kruskal-Wallis test e Dunn's post test ( $p < 0,05$ ). I valori sono

stati graficati come medie  $\pm$  errore standard (SEM).

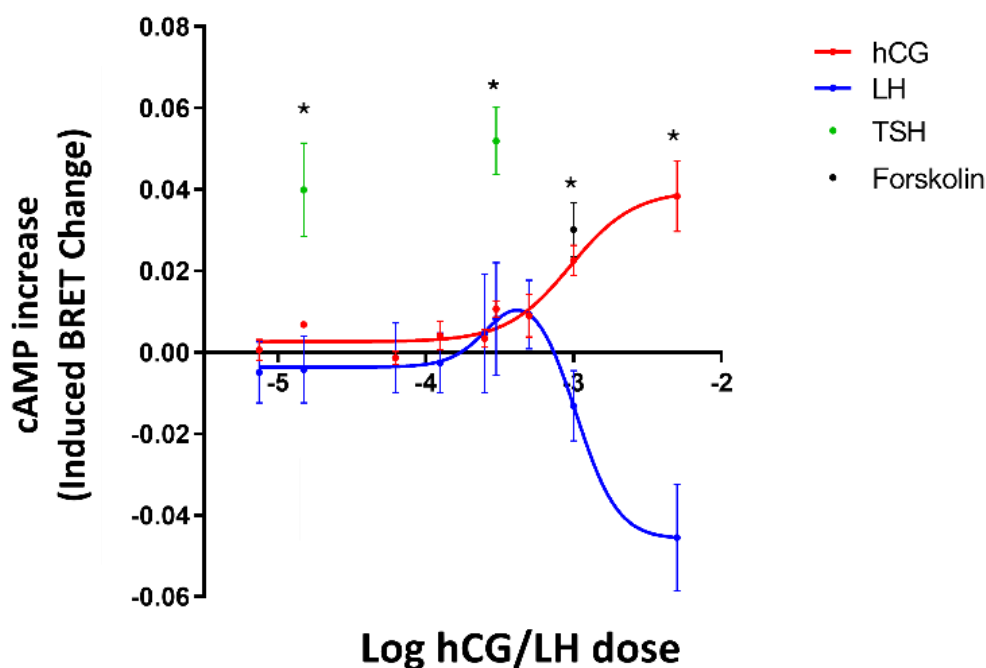
## 5. RISULTATI

### 5.1 Analisi dell'accumulo intracellulare di cAMP

L'analisi dell'attivazione di cAMP mediata da LH/hCG è stata eseguita in cellule COS-7 esprimenti TSHR mediante BRET. Il recettore attiva la via di trasduzione del segnale associata alla proteina G $\alpha$ s e determina accumulo intracellulare di cAMP. Le cellule sono state trattate con dosi crescenti di hCG e LH (62,5 nM – 5  $\mu$ M), oppure TSH 300 e 150 nM, e forskolina 50  $\mu$ M. Le curve dose-risposta sono state ottenute rappresentando i valori come rapporto tra la media dei valori dell'accettore e la media dei valori del donatore (*induced BRET change*), sottraendo la media dei valori ottenuti nelle cellule non trattate. I dati sono stati rappresentati graficamente riportando sull'asse delle ascisse i diversi trattamenti e le concentrazioni utilizzate, e sull'asse delle ordinate la media  $\pm$  SEM dei valori normalizzati.

Il trattamento con TSH induce incremento dei livelli intracellulari di cAMP (Kruskal-Wallis test and Dunn's post test;  $p < 0.05$ ;  $n=6$ ), ad entrambe le dosi testate. Questo dato è coerente con l'attivazione del recettore. Il trattamento con 1 e 5  $\mu$ M hCG (curva rossa, Figura 2) determina incremento di cAMP con andamento dose-dipendente (Kruskal-Wallis test and Dunn's post test;  $p < 0.05$ ;  $n=6$ ). Al contrario, il trattamento con LH (curva blu, Figura 2) mostra un profilo differente, caratterizzato da riduzione del segnale BRET alle concentrazioni più elevate di ligando. Tale andamento suggerisce la possibile modulazione negativa della *pathway* G $\alpha$ s/cAMP. In cellule trattate con forskolina viene rilevato aumento di cAMP, validando il sistema sperimentale e la funzionalità del biosensore BRET utilizzato.

I dati ottenuti nel modello cellulare utilizzato evidenziano attivazione della via del cAMP mediata dal recettore TSHR in risposta a TSH e hCG, suggerendo un comportamento da agonista di quest'ultimo nel sistema sperimentale. Al contrario, LH non induce un incremento del segnale di cAMP e mostra un profilo funzionale distinto, compatibile con il comportamento da ligando agonista inverso.

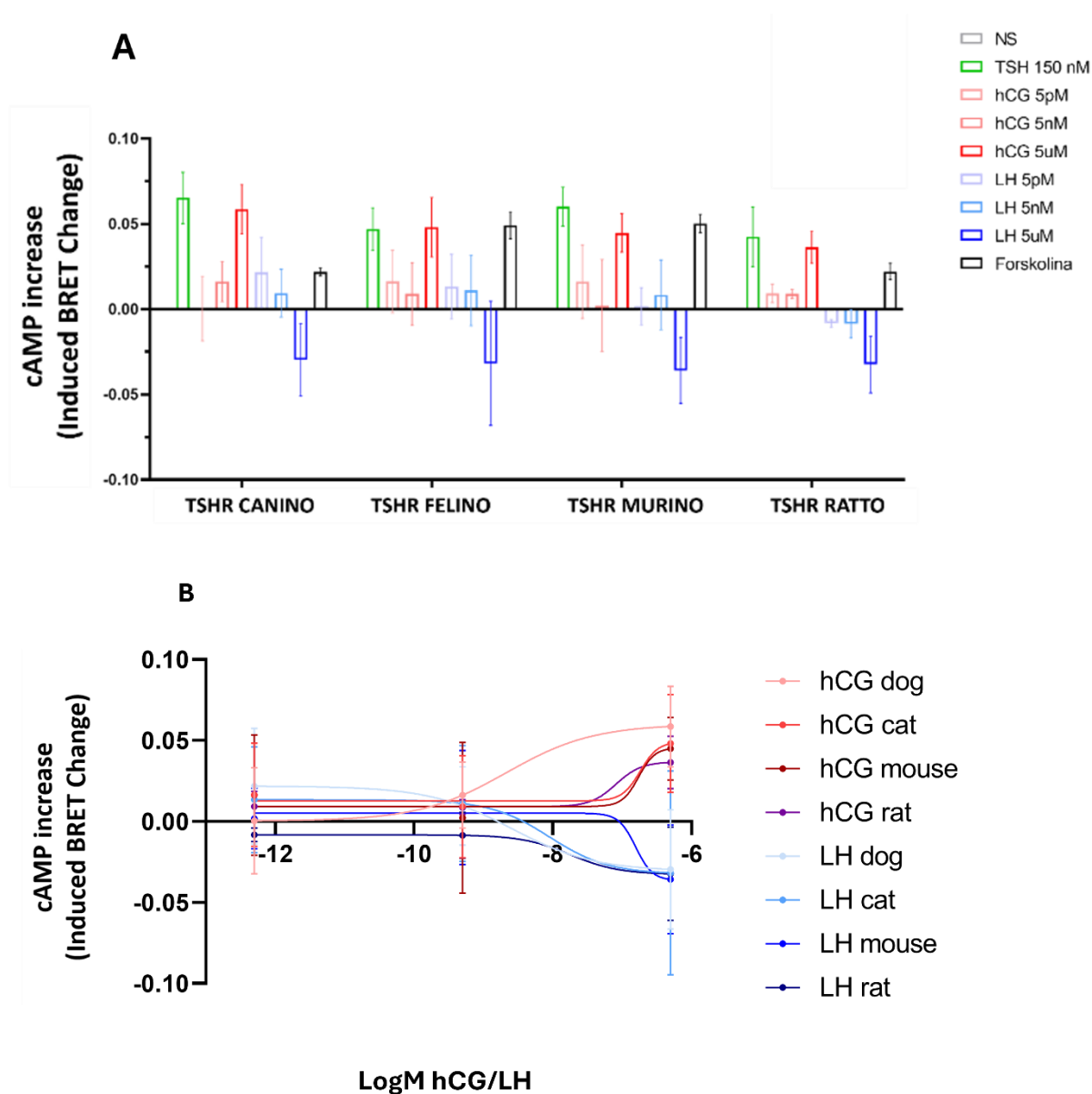


**Figura 2. Valutazione dell'incremento di cAMP indotto da LH e hCG via TSHR.** Cellule COS-7 sono state trasfettate transientemente con plasmide codificante TSHR. Le cellule sono state trattate con diverse dosi di hCG, LH, TSH e forskolina (50  $\mu$ M). La risposta è espressa come variazione del segnale BRET (*“induced BRET change”*), calcolata come differenza rispetto al campione utilizzato come controllo, non trattato. Le curve dose–risposta per hCG (rosso) e LH (blu) sono riportate in scala logaritmica della concentrazione, mentre i punti verdi indicano le risposte a TSH. Le cellule trattate con forskolina (nero) rappresentano il controllo positivo per l'aumento di cAMP indipendente dall'attivazione recettoriale. I dati sono rappresentati come media  $\pm$  SEM, mentre gli asterischi indicano differenze statisticamente significative rispetto ai dati ottenuti in cellule non trattate (\*= differenza significativa rispetto al controllo; Kruskal-Wallis test and Dunn's post test; n=6; p<0.05).

Utilizzando la medesima metodica, è stato valutato l'accumulo intracellulare di cAMP in cellule COS-7 trasfettate transientemente con plasmidi contenenti il cDNA codificante per TSHR canino, felino, murino e di ratto, e successivamente stimulate con TSH (150 nM), forskolina (controllo positivo) e dosi crescenti di hCG o LH (5 pM, 5 nM e 5  $\mu$ M).

Dall'analisi è emerso l'incremento dei livelli intracellulari di cAMP in risposta a TSH e hCG rispetto alle cellule non trattate. In particolare, hCG determina aumento del segnale compatibile con l'attivazione della via G $\alpha$ s/cAMP nei diversi recettori ortologi analizzati. Al contrario, il

trattamento con LH, alle concentrazioni più alte, induce riduzione del segnale, suggerendo un effetto da agonista inverso sulla produzione di cAMP. La significatività statistica non è stata calcolata a causa del numero relativamente basso di replicati sperimentali.



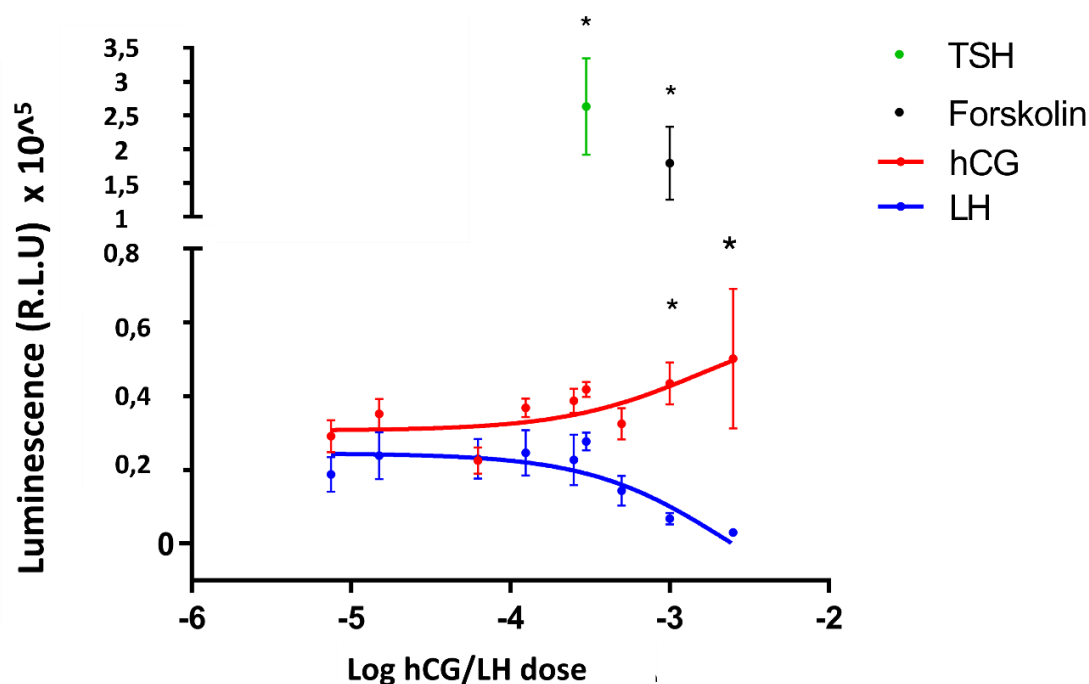
**Figura 3. Valutazione dell'accumulo intracellulare di cAMP mediato da TSHR ortologi.**

Cellule COS-7 esprimenti TSHR di mammiferi non-umani sono state trattate con TSH (150 nM), forskolina (50  $\mu$ M, controllo positivo) e concentrazioni crescenti di hCG o LH (5 pM–5  $\mu$ M). (A) Grafici a barre con induced BRET change, i quali vengono espressi come media  $\pm$  SEM. (B) Curve dose-risposta rappresentate in scala logaritmica della concentrazione. N=3.

## 5.2 Analisi dell'attività di CRE

Il fattore di trascrizione CREB fosforilato lega la sequenza promotoriale CREB *responsive element* (CRE) determinando una risposta trascrizionale. Per misurare l'attivazione dell'elemento di risposta CRE, a seguito del trattamento con TSH e hCG/LH, la linea cellulare COS-7 è stata trasfettata con il plasmide contenente il cDNA codificante la luciferasi *firefly* sotto il controllo trascrizionale della sequenza CRE e con il plasmide contenente in cDNA codificante TSHR. Le cellule sono state trattate con dosi crescenti di hCG o LH (62,5 nM – 5 µM), TSH 300 nM. Le cellule trattate con forskolina 50 µM sono state utilizzate come controllo positivo. I valori di bioluminescenza sono stati rilevati in seguito a somministrazione del substrato *One-Glow*, per un totale di 10 cicli di lettura, e rappresentati in un grafico come media  $\pm$  SEM.

Il trattamento con TSH induce aumento della trascrizione della luciferasi *firefly*, dipendente dall'attivazione dell'elemento di risposta CRE, ad entrambe le dosi testate. Il trattamento con hCG (curva rossa, Figura 4) determina incremento dell'attivazione di CRE in maniera dose-dipendente. Ciò è coerente con i risultati ottenuti dall'analisi del cAMP e configura un quadro di attivazione della via Gas/cAMP da parte di hCG. Al contrario, il trattamento con LH (curva blu, Figura 4) mostra un profilo differente, caratterizzato da riduzione del segnale di luminescenza alle concentrazioni più elevate, compatibile con il comportamento da agonista inverso. Nelle cellule trattate con forskolina, utilizzate come controllo positivo, si verifica aumento dell'attività di CRE, indipendente dall'attivazione recettoriale, validando il sistema sperimentale utilizzato.



**Figura 4. *CRE*-luciferasi assay.** Cellule COS-7 esprimenti TSHR e luciferasi, quest'ultima sotto il controllo del promotore *CRE*, sono state trattate con diverse concentrazioni di hCG e LH (\*=diverso da LH; Kruskal-Wallis test and Dunn's post test; n=6 p<0.05).

### 5.3 Analisi dei livelli intracellulari di IP1

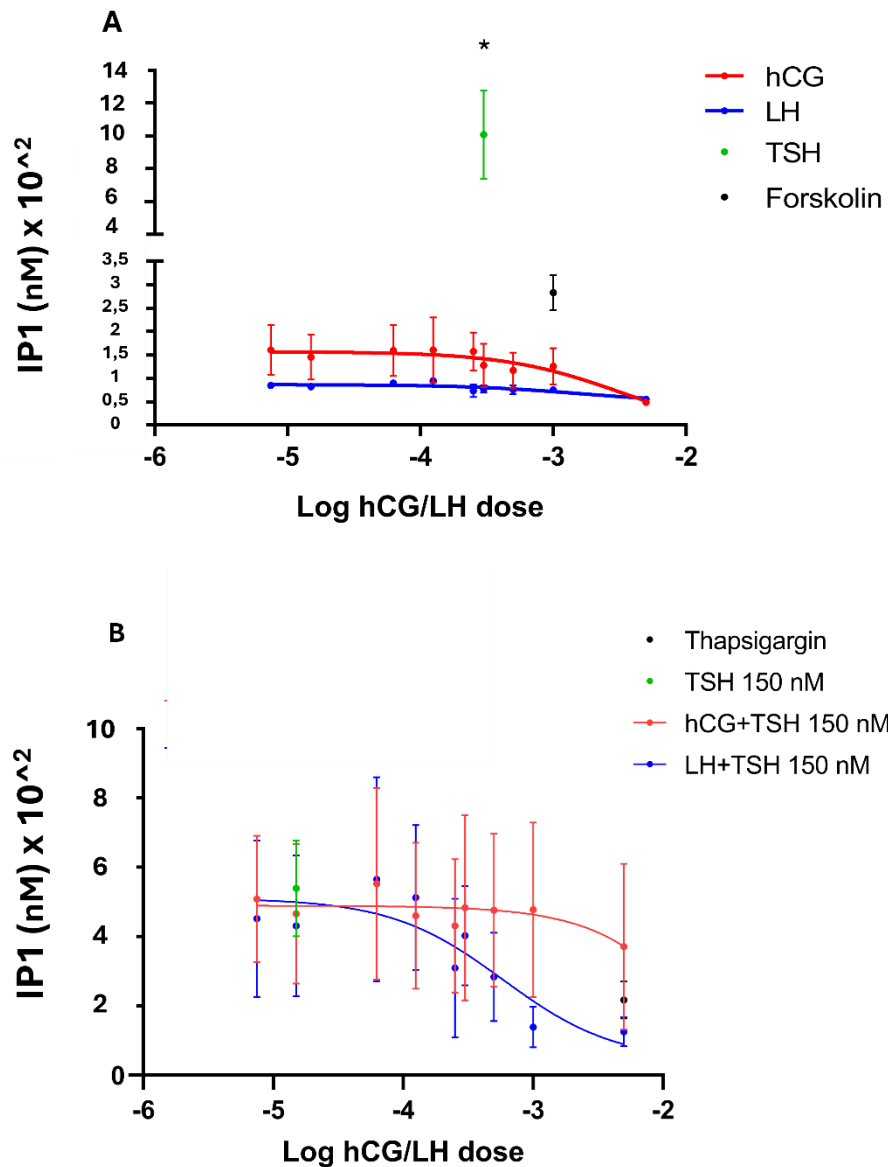
L'attivazione di TSHR può determinare produzione di inositolo trifosfato (IP3). Poiché IP3 viene rapidamente metabolizzato a inositolo monofosfato (IP1), quest'ultimo è stato quantificato mediante metodica HTRF come indice dell'attivazione della via Gαq/PLC. L'analisi è stata condotta trasfettando transientemente le cellule COS-7 esprimenti TSHR e trattate con hCG, LH, TSH e taspigargina 1 μM, utilizzata come controllo positivo. Le emissioni del donatore e dell'accettore sono state registrate mediante lo strumento Spark e i valori di IP1 sono stati rappresentati in grafico X-Y (media ± SEM). Sono stati eseguiti 6 replicati sperimentali e l'analisi statistica è stata eseguita mediante Kruskal-Wallis test and Dunn's post test (p<0,05).

Il trattamento con TSH induce incremento dei livelli intracellulari di IP1 ad entrambe le concentrazioni testate (p<0,05). Invece, i trattamenti con hCG e LH non risultano nell'aumento della produzione di IP1 alle concentrazioni analizzate. Nelle cellule trattate con taspigargina, utilizzata come controllo positivo, si osserva aumento dei livelli di IP1 (p<0,05), confermando la corretta funzionalità del sistema sperimentale. Nel complesso, questi risultati indicano che,

nel modello cellulare utilizzato, la via *Gαq/PLC* è attivata esclusivamente dal ligando endogeno TSH, mentre né hCG né LH risultano in grado di attivare questa *pathway* attraverso TSHR.

L'esperimento descritto sopra è stato eseguito assieme ad un secondo, utilizzando il medesimo modello cellulare. Tale esperimento è servito per valutare la capacità di LH e hCG di competere con TSH per il legame con TSHR. Pertanto, cellule COS-7 esprimenti TSHR sono state co-trattate con concentrazione fissa di TSH (300 nM) e con dosi crescenti di hCG o LH (62,5 nM–5 μM). I livelli di IP1 sono stati graficati come media ± SEM.

Il co-trattamento con hCG non mostra variazioni evidenti della risposta indotta da TSH. Al contrario, le concentrazioni più elevate di LH inducono riduzione dei livelli di IP1, rispetto al trattamento con il solo TSH, suggerendo l'esistenza di modulazione negativa della risposta TSH-dipendente. Tuttavia, a causa dell'esiguo numero di replicati sperimentali, non è stato possibile effettuare l'analisi statistica e tali osservazioni dovranno essere confermate da ulteriori esperimenti.



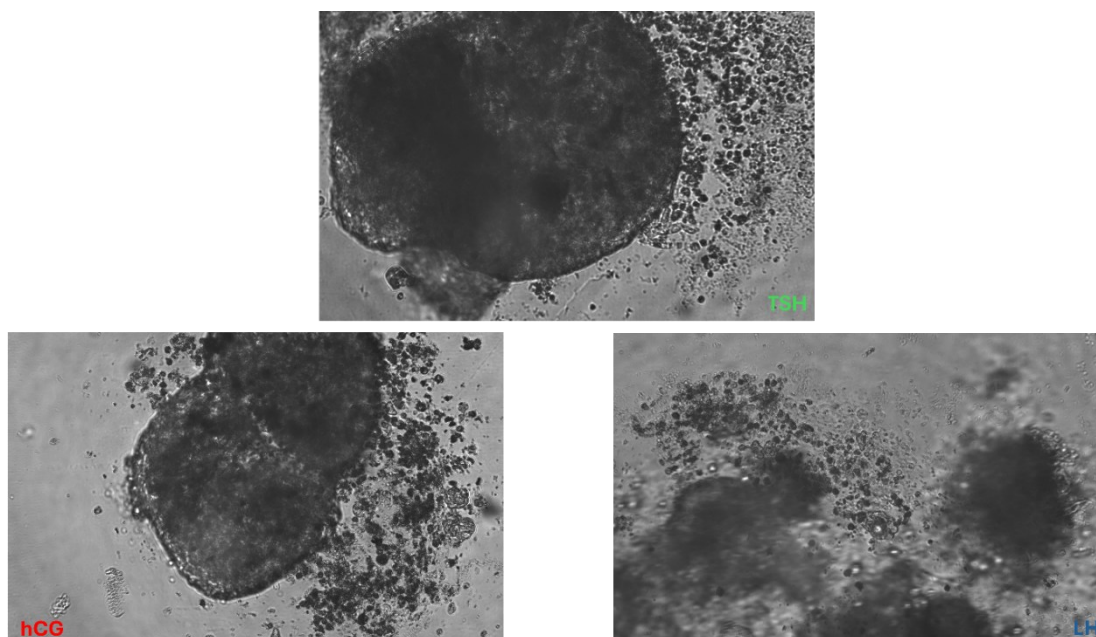
**Figura 5. Valutazione dell'accumulo intracellulare di IP1 mediante metodica HTRF.** Cellule COS-7 esprimenti TSHR sono state trattate con dosi crescenti di hCG/LH (62,5 nM–5  $\mu$ M), in assenza (A) o in presenza (B) di TSH 300 nM. Cellule trattate con thapsigargina 1  $\mu$ M sono state utilizzate come controllo positivo. I livelli intracellulari di IP1 sono stati quantificati mediante metodica HTRF e rappresentati come media  $\pm$  SEM. (A) Curve dose–risposta per hCG (rosso) e LH (blu) sono riportate in scala logaritmica della concentrazione, mentre i punti verdi indicano le risposte a TSH. Le cellule trattate con thapsigargina (nero) rappresentano il controllo positivo (\*= differenza significativa rispetto al controllo; Kruskal-Wallis test and Dunn's post test; n=6; p<0.05). (B) Cellule co-trattate con concentrazione fissa di TSH (150 nM), e dosi crescenti di hCG o LH (62,5 nM–5  $\mu$ M).

#### **5.4 Formazione colture 3D di tireociti e analisi livelli intracellulari cAMP**

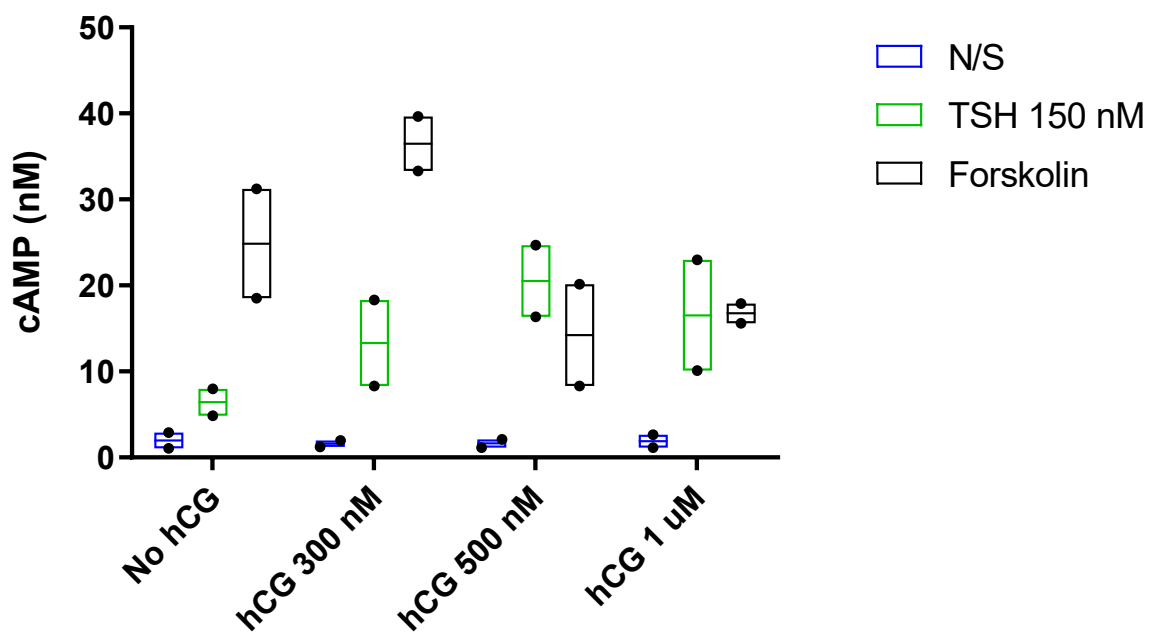
Al fine di valutare l'effetto dell'esposizione prolungata a hCG e LH sulla formazione di colture tridimensionali di tireociti umani e sulla funzionalità del recettore TSHR, sono stati allestiti sferoidi a partire da tireociti primari umani, ottenuti da due pazienti. Durante i dieci giorni di coltura, il terreno è stato sostituito ogni 48 ore con terreno fresco contenente concentrazioni crescenti di hCG o LH. Al termine del periodo di coltura è stata valutata la morfologia degli aggregati cellulari mediante osservazione microscopica.

Le colture mantenute in presenza di hCG hanno conservato una corretta organizzazione tridimensionale, con formazione di sferoidi compatti e ben definiti allo stesso modo di quanto osservato in colture ottenute in presenza di TSH. Al contrario, nelle colture esposte a LH è stata osservata perdita dell'architettura tridimensionale, con disgregazione degli aggregati cellulari, suggerendo un effetto negativo di LH sul mantenimento della struttura 3D degli sferoidi (Figura 6).

Gli sferoidi mantenuti in presenza di hCG sono stati utilizzati per valutare la funzionalità del TSHR mediante quantificazione dei livelli intracellulari di cAMP. Dopo dieci giorni di coltura, gli sferoidi sono stati trattati con TSH (150 nM) o forskolina (50  $\mu$ M) per 2 ore in terreno di starvation contenente IBMX (500  $\mu$ M). I livelli intracellulari di cAMP sono stati determinati mediante metodica HTRF. Il trattamento con TSH ha determinato incremento dei livelli intracellulari di cAMP rispetto ai campioni non trattati, mentre la forskolina, utilizzata come controllo positivo, ha indotto un marcato aumento del segnale, confermando la funzionalità del sistema sperimentale. Questi risultati indicano che gli sferoidi mantenuti in presenza di hCG conservano la capacità di rispondere alla stimolazione con TSH attraverso l'attivazione della via *Gas*/adenilato ciclasi. A causa del limitato numero di campioni analizzati ( $n = 2$  pazienti), non è stato possibile effettuare un'analisi statistica e i dati devono essere considerati come preliminari.



**Figura 6. Effetto del trattamento con hCG e LH sulla formazione di colture tridimensionali di tireociti primari umani.** Tireociti primari umani, ottenuti da due pazienti, sono stati coltivati con terreno contenente TSH, hCG o LH, al fine di valutarne la capacità di indurre la formazione di sferoidi tridimensionali. Le immagini mostrano la morfologia degli aggregati cellulari al termine della coltura. Le colture mantenute in presenza di hCG formano sferoidi compatti e ben organizzati, mentre l'esposizione a LH determina perdita della struttura tridimensionale e la disgregazione degli aggregati cellulari.



**Figura 7. Valutazione dell'accumulo intracellulare di cAMP in sferoidi derivati da tireociti primari umani.** Gli sferoidi derivati da tireociti primari umani, mantenuti per dieci giorni in presenza di hCG, sono stati trattati con TSH (150 nM) o forskolina (50  $\mu$ M), in presenza di IBMX (500  $\mu$ M). I livelli intracellulari di cAMP sono stati quantificati mediante metodica HTRF ed espressi come box and whiskers plot (n = 2 pazienti).

## 6. DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi è stata caratterizzata la cross-interazione tra le gonadotropine hCG e LH con il recettore del TSH. Dai risultati si evince che hCG somministrata a dosi mM, tipiche della gravidanza, fungono da agonista di TSHR, mentre LH a dosi equimolari ha azione di agonista inverso.

TSH, LH, hCG e FSH condividono la medesima subunità  $\alpha$ , mentre LH e hCG presentano circa l'85% di identità di sequenza nella subunità  $\beta$ , differendo principalmente per la presenza del peptide carbossi-terminale (CTP) caratteristico di hCG (Casarini et al., 2018). Tali analogie forniscono un razionale per la possibile interazione tra questi ormoni e TSHR, supportando la possibile attività tireotropica esercitata da hCG durante la gravidanza. Per caratterizzare funzionalmente tale cross-interazione è stata analizzata la via di trasduzione del segnale Gas/adenilato ciclasti/cAMP in cellule COS-7 trasfettate con il plasmide codificante TSHR umano. I risultati ottenuti hanno dimostrato che hCG induce incremento dose-dipendente dei livelli intracellulari di cAMP, accompagnato da analogo aumento dell'attivazione trascrizionale CRE-dipendente, valutata mediante saggio della luciferasi. Questi risultati indicano che, nel modello sperimentale utilizzato, hCG è in grado di attivare TSHR e di promuovere la cascata di segnali intracellulari tipicamente associata a TSH. A differenza di quanto osservato con hCG, le analisi con LH hanno evidenziato riduzione di cAMP e del segnale CRE rispetto ai valori basali. Sebbene il meccanismo molecolare alla base di questo fenomeno richieda ulteriori approfondimenti, tali risultati suggeriscono che LH possa esercitare un'azione agonistica inversa sulla via di trasduzione del segnale mediata dalla proteina Gas. L'analisi di una seconda via di trasduzione del segnale attivata da TSHR, ossia la *Gaq pathway*, è stata valutata attraverso la quantificazione di IP1. Tale indagine ha mostrato che soltanto TSH è in grado di determinare aumento significativo dei livelli intracellulari di IP1, mentre né hCG né LH hanno indotto attivazione della via *Gaq/PLC* alle concentrazioni analizzate. Questi dati indicano che l'attivazione di TSHR da parte di hCG interessa prevalentemente la via Gas, senza coinvolgere in modo evidente la componente *Gaq*. Inoltre, hCG non ha modificato la produzione di IP1 indotta dal TSH, mentre alle concentrazioni più elevate LH ridotto la presenza dell'analita in maniera concentrazione-dipendente. Sebbene il limitato numero di replicati non abbia consentito di effettuare un'analisi statistica, questo andamento riflette quanto osservato sulla cAMP *pathway* e suggerisce una possibile attività modulatoria negativa di LH nei confronti della via di trasduzione del segnale Gq/PLC. Infine, i risultati ottenuti sono stati estesi a un modello biologicamente più rappresentativo costituito da colture tridimensionali derivate da

tireociti primari umani. Gli sferoidi mantenuti in presenza di hCG hanno conservato l'organizzazione tridimensionale tipicamente indotta da TSH. Inoltre, dopo dieci giorni di coltura, i campioni mantenuti in coltura con hCG hanno mantenuto la capacità di rispondere al trattamento con TSH, per quanto riguarda l'incremento dei livelli intracellulari di cAMP. Al contrario, l'esposizione cronica a LH ha compromesso la formazione e il mantenimento della struttura tridimensionale degli aggregati cellulari.

Nel complesso, i risultati di questo studio evidenziano come due ormoni strettamente correlati dal punto di vista strutturale possano esercitare effetti profondamente differenti sul medesimo recettore. Da un lato, hCG si comporta come un agonista funzionale della via  $G_{\alpha s}$  mediata da TSHR, mentre LH mostra un profilo compatibile con il comportamento di agonista inverso. Ulteriori studi saranno necessari per approfondire questi risultati e chiarire il significato biologico.

## **7. CONCLUSIONI**

Questo studio ha dimostrato che LH e hCG possano interagire con TSHR. Dai risultati si evince che hCG funge da agonista di TSHR, mentre LH ha azione di agonista inverso. Tali dati supportano il fatto che hCG possa avere attività tireotropica durante la gravidanza e sono suggestivi del fatto che, nella specie umana, le medesime funzioni non possono essere svolte da LH.

## 8.BIBLIOGRAFIA

- Carvalho, D. P., & Dupuy, C. (2017). Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 458, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.038>
- Goodwin, T. M., Montoro, M., & Mestman, J. H. (1992). Transient hyperthyroidism and hyperemesis gravidarum: Clinical aspects. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 167(3), 648–652. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(11\)91565-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(11)91565-8)
- Hershman, J. M. (2004). Physiological and pathological aspects of the effect of human chorionic gonadotropin on the thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 18(2), 249–265. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2004.03.010>
- Lazarus, J. H. (2011). Thyroid function in pregnancy. *British Medical Bulletin*, 97(1), 137–148. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldq039>
- Nagirnaja, L., Rull, K., Uusküla, L., Hallast, P., Grigorova, M., & Laan, M. (2010). Genomics and genetics of gonadotropin beta-subunit genes: Unique FSHB and duplicated LHB/CGB loci. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 329(1–2), 4–16. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2010.04.024>
- Vulsma, T., Gons, M. H., & de Vijlder, J. J. M. (1989). Maternal-Fetal Transfer of Thyroxine in Congenital Hypothyroidism Due to a Total Organification Defect or Thyroid Agenesis. *New England Journal of Medicine*, 321(1), 13–16. <https://doi.org/10.1056/NEJM198907063210103>
- Andersen, S. L., & Knøsgaard, L. (2020). Management of thyrotoxicosis during pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 34(4), 101414. <https://doi.org/10.1016/J.BEEM.2020.101414>
- Bacart, J., Corbel, C., Jockers, R., Bach, S., & Couturier, C. (2008). The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnology Journal*, 3(3), 311–324. <https://doi.org/10.1002/biot.200700222>
- Cole, L. A. (2010). Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-102>

- Davies, T., Marians, R., & Latif, R. (2002). The TSH receptor reveals itself. *Journal of Clinical Investigation*, 110(2), 161–164. <https://doi.org/10.1172/JCI16234>
- Degorce, F. (2009). HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery - A Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. *Current Chemical Genomics*, 3(1), 22–32. <https://doi.org/10.2174/1875397300903010022>
- Franklyn, J. A., & Boelaert, K. (2012). Thyrotoxicosis. *The Lancet*, 379(9821), 1155–1166. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60782-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60782-4)
- Hershman, J. M. (2004). Physiological and pathological aspects of the effect of human chorionic gonadotropin on the thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 18(2), 249–265. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2004.03.010>
- Jain, R., Watson, U., Vasudevan, L., & Saini, D. K. (2018). ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 338, 79–109. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2018.02.003>
- Jiang X, Dias JA, He X. Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jan 25;382(1):424-451. doi: 10.1016/j.mce.2013.08.021
- Kobaly, K., & Mandel, S. J. (2019). Hyperthyroidism and Pregnancy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 48(3), 533–545. <https://doi.org/10.1016/J.ECL.2019.05.002>
- Kopp, P. (2001). Human Genome and Diseases: Review¶The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(9), 1301–1322. <https://doi.org/10.1007/PL00000941>
- Laugwitz, K. L., Allgeier, A., Offermanns, S., Spicher, K., Van Sande, J., Dumont, J. E., & Schultz, G. (1996). The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(1), 116–120. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.116>
- Laurent, E., Mockel, J., Van Sande, J., Graff, I., & Dumont, J. E. (1987). Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 52(3), 273–278. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(87\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0303-7207(87)90055-4)
- Nagirnaja, L., Rull, K., Uusküla, L., Hallast, P., Grigorova, M., & Laan, M. (2010). Genomics and genetics of gonadotropin beta-subunit genes: Unique FSHB and

duplicated LHB/CGB loci. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 329(1–2), 4–16.  
<https://doi.org/10.1016/J.MCE.2010.04.024>

- Szkudlinski, M. W., Fremont, V., Ronin, C., & Weintraub, B. D. (2002). Thyroid-Stimulating Hormone and Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Structure-Function Relationships. *Physiological Reviews*, 82(2), 473–502.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2001>
- Wang, T., Li, Z., Cvijic, M. E., Zhang, L., & Sum, C. S. (2004). *Measurement of cAMP for Gas- and Gai Protein-Coupled Receptors (GPCRs)*.
- Casarini L, Santi D, Brigante G, Simoni M. Two Hormones for One Receptor: Evolution, Biochemistry, Actions, and Pathophysiology of LH and hCG. *Endocr Rev*. 2018 Oct 1;39(5):549-592. doi: 10.1210/er.2018-00065