

## IMPLICAZIONI CLINICHE DELLE MUTAZIONI DEL GENE CHE CODIFICA PER IL RECETTORE DELL'FSH

Alberto Revelli, Cristina Lussiana, Benedetta Guani e Marco Massobrio

Centro di Medicina della Riproduzione, Dipartimento di Discipline Ginecologiche e Ostetriche, Università di Torino, ASO OIRM-S. Anna, Torino

### Introduzione

L'ormone follicolo stimolante (FSH) è essenziale in entrambi i sessi per la maturazione delle gonadi alla pubertà e per la produzione di gameti durante l'età fertile. L'azione dell'FSH è mediata dal legame col suo recettore specifico, localizzato sulla membrana cellulare delle cellule del Sertoli nel testicolo e delle cellule della granulosa nei follicoli ovarici.

### Il recettore per l'FSH (FSHR)

Il recettore per l'FSH (Figura 1) appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G transmembrana. La porzione dell'FSHR deputata all'interazione con l'FSH si trova verso l'estremo N-terminale ed è in posizione extracellulare; la cinetica di legame è rapida, specifica, saturabile e temperatura-dipendente (1, 2).

Il *dominio extracellulare* dell'FSHR è composto da 349 aminoacidi ed è costituito da 10 ripetizioni di circa 24 aminoacidi con il caratteristico motivo LLR (leucine-rich-repeats). La natura anfipatica delle ripetizioni LLR consente loro di interagire sia con l'ormone che con il dominio transmembrana, che ha la funzione di stabilizzare strutturalmente la molecola del recettore. Il dominio extracellulare ha tre potenziali siti di glicosilazione ai residui 191, 199 e 293: il

pattern di glicosilazione può influenzare la capacità di legare l'FSH. La specificità del legame FSH-FSHR è data invece dai residui Phe165 e His274, ma in realtà quasi due terzi della porzione extracellulare sono coinvolti nel legame con la gonadotropina (1).

Il *dominio transmembrana*, composto da 264 aminoacidi, è formato da 7  $\alpha$ -eliche idrofobiche di 20-25 aminoacidi ciascuna separate le une dalle altre da "loop" intracellulari e extracellulari alternati. Nonostante la capacità di interazione dei "loop" extracellulari con l'FSH, questi non sono fondamentali per il legame con l'ormone, che è compito del dominio extracellulare. Due cisteine in posizione 442 e 517 formano un ponte disolfuro molto importante per la stabilità strutturale del recettore.

Il *dominio intracellulare* C-terminale è costituito dagli aminoacidi 631-695 ed è ricco di residui di serina e treonina; questi rappresentano potenziali siti di fosforilazione da parte delle chinasi intracellulari e svolgono il compito di attivare la trasduzione del segnale originato al momento del legame FSH-FSHR (3).

L'interazione del recettore con l'FSH interessa quindi gran parte del dominio extracellulare. L'attivazione recettoriale avviene mediante un

cambiamento conformazionale del recettore; inoltre, anche la dimerizzazione dell'FSHR è utile per stabilizzare l'avvenuto legame e per facilitare la trasduzione del segnale.

Dopo l'interazione con l'FSH, l'FSHR si accoppia ad una proteina G, che assieme al GTP (cofattore) stimola l'adenilato-ciclastasi di membrana a sintetizzare il secondo messaggero, l'AMP ciclico (cAMP). L'aumento del cAMP nelle cellule della granulosa, così come in quelle del Sertoli nel maschio, è un indice della funzionalità dell'FSHR e del corretto funzionamento dei primi processi che seguono il suo legame all'FSH. Il cAMP a sua volta attiva la proteina chinasi A (PKA) e la stimola a fosforilare alcuni substrati cellulari.

### **Il gene per l'FSHR**

Il primo tentativo di clonaggio e sequenziamento del gene per l'FSHR risale al 1989 (1); attualmente la sua sequenza è conosciuta ed è depositata in GenBank con l'identificativo GenID:2492.

Il gene FSHR è situato sul cromosoma 2 in sede p21-p16. Esso occupa una regione che comprende 10 esoni e 9 introni (3). Il promotore del gene FSHR, che dà inizio alla sua trascrizione, è probabilmente situato tra la posizione -225 e -1 rispetto al codone di partenza. Nel promoter sono stati individuati due "response elements": la sequenza CACATG, che lega una famiglia di fattori trascrizionali detti "basic helix-loop-helix", e la regione Inr, spesso associata a promoters di geni cosiddetti "housekeeping" (3).

La presenza di mutazioni sulla sequenza di basi del gene FSHR comporta ripercussioni impor-

tanti sulla struttura aminoacidica del recettore, a loro volta rilevanti per l'espressione recettoriale a livello della membrana cellulare, per la capacità del recettore di interagire con l'FSH ed anche per la corretta trasduzione del segnale dato dall'FSH.

Esiste inoltre la possibilità di uno "splicing" alternativo del gene FSHR, che può originare differenti isoforme del recettore (4) aventi diverse proprietà di cinetica di legame con l'FSH.

Dal 1990 sono state scoperte e depositate in GenBank numerose sequenze attribuite al gene FSHR, tra le quali alcune differiscono per mutazioni puntiformi o sono esiti di "splicing" alternativi del gene.

### **Strategie di indagine per lo studio del gene FSHR e della proteina FSHR**

Le tecniche di indagine utilizzate per studiare il recettore per l'FSH ed il suo gene sono diverse a seconda che si indaghi la sequenza genica e le sue varianti oppure la struttura e la funzione della proteina recettoriale codificata da tali varianti. L'approccio di indagine sul gene (genotipo) è spesso seguito o condotto in parallelo all'indagine sulla proteina recettoriale (fenotipo). Diversi gruppi di ricerca hanno messo a punto tecniche basate sulla "polymerase chain reaction" (PCR), che permette di amplificare l'intero gene dell'FSHR o parti di questo. Numerosi studi si rifanno alle metodiche utilizzate originariamente da Gromoll, autore dei primer e dei protocolli per 16 procedure di PCR che amplificano l'intero gene FSHR (5). La maggior parte dei primer impiegati in questi studi hanno come sequenza target l'esone 10 perché esso codifi-

ca ben 410 dei 695 aminoacidi che compongono l'FSHR.

L'identificazione di alcuni polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs) all'interno degli esoni del gene ha consentito la messa a punto di diverse metodiche di PCR-RFLP (6, 7, 8, 9, 10, 11), mediante le quali tramite una semplice digestione enzimatica seguita da corsa elettroforetica su gel di agarosio è possibile distinguere tra individui omozigoti e eterozigoti per ogni mutazione puntiforme del gene FSHR che si intenda esaminare.

Se la PCR rappresenta il primo approccio per studiare il gene per l'FSHR, sono numerose le tecniche che ad essa conseguono. Una volta ottenuto il DNA amplificato, questo può essere sottoposto a sequenziamento o può essere utilizzato per alcune analisi (SSCP o DDGE) finalizzate ad identificare la natura delle mutazioni puntiformi.

Talvolta la PCR amplifica regioni geniche che vengono trasferite mediante transfezione del DNA all'interno di cellule ospiti al fine di studiare le differenze di espressione e legame con l'FSH tra il recettore "wild-type" e il recettore codificato dalla sequenza genica mutata. Nel corso degli anni sono stati utilizzati come accettori di queste procedure di transfezione numerosi tipi cellulari, ad esempio le cellule COS-7 (12, 13, 14, 15, 9, 16), 293-T (6) e MSC-1 (9). Una volta ottenuta una linea cellulare transfettata che esprime in modo stabile il recettore mutato, si può procedere a studi di cinetica del legame con l'FSH oppure si può studiare come le mutazioni indotte nel gene determinino una variazione della risposta

cellulare in termini di sintesi di cAMP o di altri secondi messaggeri.

### **Mutazioni del gene per l'FSHR**

Il database del National Centre for Biotechnology Information include 731 mutazioni puntiformi del gene per l'FSHR. Dal momento che la ricerca di queste mutazioni avviene studiando pazienti con alterazioni della funzione riproduttiva, le mutazioni sono classificate come attivanti, inattivanti o neutre, a seconda del funzionamento dell'FSHR nel fenotipo manifestato.

#### Mutazioni neutre

Un esempio di mutazione neutra è quella situata sul promoter del gene nella posizione -29, ed è rappresentata da una sostituzione G→A su un potenziale sito di legame per il fattore di trascrizione c-ETS (17). Studi di transfezione di questa variante mutata nelle cellule COS-7 hanno rilevato che le cellule che esprimono il recettore mutato non mostrano differenze di attività recettoriale rispetto alle cellule con l'FSHR "wild-type" (3).

#### Mutazioni attivanti

Nella regione del gene FSHR codificante la proteina recettoriale sono state identificate cinque mutazioni, che si riflettono in altrettante variazioni aminoacidiche sull'FSHR: tre di esse non sono state indagate a fondo, mentre due sono oggetto di numerosi studi (Ala307→Thr e Ser680→Asn). Il residuo aminoacidico in posizione 307 è cruciale per l'interazione tra FSH e FSHR e non è comune a tutti i recettori per le gonadotropine, ma è specifico per ciascuna

gonadotropina. Il residuo aminoacidico 680 si trova invece all'interno del dominio intracellulare del recettore, in una regione anch'essa altamente specifica.

I due tratti del gene FSHR che codificano per gli aminoacidi in posizione 307 e 680 del FSHR sono in "linkage disequilibrium" tra loro e originano due varianti alleliche: la variante Ala307-Ser680 (detta AS) e la variante Thr307-Asn680 (detta TN), la cui presenza è stata riscontrata in differenti gruppi etnici utilizzando la PCR-RFLP (9). La variante allelica TN è più frequente della variante AS, riscontrandosi nel 60% dei soggetti presi in esame (4, 6, 18); esistono anche altre due varianti molto più rare (AN e TS), che vengono ritrovate solo sporadicamente all'interno di alcuni gruppi etnici. E' stata studiata la relazione esistente tra la presenza dell'una o dell'altra variante allelica AS e TN e taluni markers di riserva ovarica (livelli basali di FSH, estradiolo e inibina A, numero di follicoli antrali, volume ovarico), sia in donne normali, sia in pazienti con ovaio policistico (PCOS). Sono anche state studiate donne sottoposte a stimolazione ovarica controllata con gonadotropine per fecondazione in vitro (FIVET), pazienti che sviluppavano una sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS) e donne affette da esaurimento ovarico precoce (POF) (19, 20, 21).

E' descritta una differente risposta alla stimolazione ovarica con FSH in donne che presentano varianti in posizione 680 (7, 8, 11, 20, 21). Una buona risposta all'FSH esogeno è più frequentemente riscontrabile nelle donne con la variante Ser680→Asn, mentre in donne che presentano una risposta insufficiente alla gonadotropina

(resistenza all'FSH) si ritrova la serina in posizione 680. La struttura recettoriale Ser680 è anche associata a livelli basali di FSH più elevati (19), oltre alla necessità di ricevere dosi maggiori di FSH per ottenere una buona risposta in termini di crescita follicolare se la paziente viene sottoposta a induzione della superovulazione per FIVET (6, 7, 11). A causa della maggior resistenza ovarica all'FSH esogeno, nel corso della stimolazione ovarica i livelli di estradiolo delle pazienti Ser680 sono generalmente più bassi della media, a meno che non si aumenti la dose di FSH fino a quella massimale (20).

In uno studio condotto su donne giapponesi, la percentuale di gravidanza clinica per transfer embrionario appare significativamente più alta nei sottogruppi di pazienti con variante Ser680→Asn dell' FSHR rispetto ai soggetti con variante Ser680 (8). In questo studio, come in altri (7), la percentuale di donne sottoposte a FIVET che presentava un FSH basale inferiore a 6.5 IU/L era maggiore nel sottogruppo Ser680→Asn, che infatti dimostrava una risposta ovarica più vivace all'FSH esogeno, una produzione di ovociti più abbondante e un outcome migliore della terapia (8). E' interessante rimarcare che anche le pazienti con variante Ser680→Asn hanno una risposta modesta alla superovulazione nel caso siano in età avanzata ed abbiano FSH basale elevato (21): quando la riserva ovarica follicolare è ridotta anche le pazienti Ser680→Asn hanno una prognosi riproduttiva modesta nonostante questo polimorfismo fenotipico conferisca loro un vantaggio in termini di responsività ovarica all'FSH esogeno.

Le pazienti eterozigoti per il tratto di gene che porta la mutazione codificante per la variante Ser680→Asn sono quelle che rispondono in maniera più equilibrata all'iperstimolazione ovarica controllata con FSH ed hanno una frequenza di ipo- e iper-risposte inferiore rispetto alle pazienti omozigoti per una delle due varianti alleliche Ser680 e Ser680→Asn (11). Le pazienti omozigoti per l'asparagina in posizione 680 (variante Ser680→Asn in omozigosi) sono soggetti a rischio per la sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS): sono particolarmente responsive all'FSH, tendono a reclutare numerosi follicoli contemporaneamente e i livelli circolanti di estradiolo in corso di stimolazione risultano particolarmente elevati (20). I polimorfismi in posizione 680 e 307 del FSHR sembrano essere correlati anche con il grado di severità della OHSS iatrogena. Le varianti con Ala307 e Ser680 risultano più frequenti in donne che sviluppano OHSS di grado lieve, mentre le varianti Ala307→Thr e Ser680→Asn sono presenti più spesso in donne che sviluppano OHSS di grado severo (3, 23). Daelemans (22) concorda sul fatto che la conoscenza dei residui aminoacidici in posizione 680 del FSHR non può predire l'insorgenza o meno di OHSS, ma nel caso la sindrome si sviluppi può essere utile per prevedere anticipatamente la gravità.

Vi sono altre mutazioni attivanti identificate sul gene FSHR e appartengono tutte all'esone 10 (20). La prima mutazione attivante sul gene FSHR è stata identificata in un paziente di sesso maschile ipofisectomizzato (24). Il sequenziamento del gene FSHR ha rilevato la sostituzione di un'adenina con una guanina in posizione nu-

cleotidica 1700. A livello aminoacidico questo significa una transizione da Asp a Gly nel residuo 567 (Asp567→Gly). La transfezione del recettore mutato in cellule COS-7 ha rilevato che la mutazione comporta un'attivazione costitutiva del recettore e un conseguente aumento dei livelli di cAMP intracellulare pari a tre volte rispetto alle cellule COS-7 esprimenti il recettore "wild-type", anche in assenza di FSH nell'ambiente extracellulare (1, 24). In topi transgenici esprimenti stabilmente il recettore per l'FSH mutato Asp567→Gly è stato dimostrato come il processo di spermatogenesi possa avere luogo anche in assenza di FSH: questi topi, infatti, sono fertili e ciò indica che l'attivazione costitutiva del recettore mutato può sostituire completamente l'azione che su di esso esercita l'FSH (25).

Una seconda mutazione attivante a carico del tratto del gene FSHR che codifica per il residuo aminoacidico 567 è stata trovata in donne con sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS) sia spontanea che iatrogena (15). In queste donne, portatrici della variante Asp567→Asn, i livelli di cAMP intracellulare delle cellule COS-7 transfettate con il gene mutato e incubate con diverse concentrazioni di hCG mostrano una sensibilità dose-dipendente all'hCG, fattore endocrino scatenante l'OHSS, molto più elevata rispetto alle cellule col recettore "wild-type". È stato proposto un modello molecolare secondo il quale l'Asn in posizione 567 causa un aumento della sensibilità dell'FSHR sia all'FSH che all'hCG e può spiegare la maggior facilità di sviluppo della OHSS iatrogena (29).

La terza mutazione attivante identificata si riflette nella sostituzione di una treonina con una isoleucina o con un'alanina in posizione 449 (varianti Thr449→Ile e Thr449→Ala), una porzione del recettore comune a tutti i recettori per gli ormoni glicoproteici (13, 26). La mutazione di questo tratto del gene non comporta la sintesi di un recettore con differenze funzionali significative in termini di cAMP basale (attivazione costitutiva), di sintesi di cAMP in risposta all'FSH o di cinetica di legame, ma conferisce al recettore la capacità di rispondere a basse concentrazioni di hCG, mentre il recettore "wild-type" risponde solo ad alti livelli di hCG (13). Questa mutazione sembra causare dunque un cambiamento conformazionale del recettore ed è causa della perdita di specificità nei confronti dell'FSH (13). L'acquisita responsività all'hCG comporta il fatto che questa mutazione è considerata un fattore predisponente per lo sviluppo della OHSS nelle donne sottoposte a iperstimolazione ovarica controllata e dell'OHSS spontanea (13, 26).

Recentemente una sostituzione in eterozigosi di una timidina con una citosina nel codone 545 del gene dell'FSHR, cui corrisponde la mutazione Ile545→Thr in eterozigosi nella molecola dell'FSHR, è stata identificata in una paziente coreana con OHSS (14). Le cellule COS-7 transfettate con il gene FSHR mutato in questa posizione nucleotidica dimostrano un aumento dose-dipendente delle concentrazioni intracellulari di cAMP in risposta all'hCG di entità particolarmente significativa, il che spiega la presenza di OHSS nella portatrice eterozigote. È interessante segnalare che una risposta particolarmente vivace in termini di sintesi di cAMP si osserva

nelle cellule con recettore mutato anche in seguito a somministrazione di TSH, il che suggerirebbe che in presenza di questa mutazione l'ipotiroidismo con TSH elevato potrebbe rappresentare una concausa dell'OHSS (27).

Le mutazioni Thr449→Ile, Thr449→Ala e Asp567→Asn del FSHR sono state recentemente segnalate anche in donne con iperstimolazione ovarica spontanea (sOHSS) (26). L'OHSS ad insorgenza spontanea, ossia in assenza di stimolazione ormonale della crescita follicolare, è assai rara; si manifesta con un quadro clinico del tutto simile a quello della OHSS iatrogena, ma manca il dato anamnestico di una stimolazione ovarica recente con gonadotropine e della somministrazione di hCG esogena. La sOHSS può riconoscere come causa la presenza di elevati livelli circolanti di hCG endogeno o di TSH: nel primo caso si associa alla presenza di una mola idatiforme o di una gravidanza plurima; l'aumento del TSH è invece tipico dell'ipotiroidismo (14). Recentemente, tuttavia, sono stati descritti casi isolati in cui la causa della sOHSS pare sia da ascrivere alla presenza delle suddette tre mutazioni dell'FSHR, che pur in presenza di livelli normali di TSH e di hCG aumenterebbero di molto la sensibilità recettoriale dei follicoli ovarici al punto da causarne la degenerazione cistica con comparsa del quadro clinico della sOHSS.

#### Mutazioni inattivanti (Figura I)

La mutazione genica che si riverbera nella sintesi di un FSHR con sostituzione Ala189→Val è stata trovata per la prima volta nel 1995 in pazienti di origine finlandese: studi di genetica di

popolazione hanno dimostrato che questa mutazione si trasmette in modo autosomico recessivo ed è spesso associata ad esaurimento follicolare precoce (POF) (9). La variante Ala189→Val è frequente nelle regioni nord-orientali dell'Europa, a causa del cosiddetto "effetto del fondatore" (Figura 1) (29): tutta la popolazione discende da un piccolo gruppo di "fondatori" fortemente incrociati tra loro; ne risulta che gli eterozigoti per la mutazione sono numerosi nella popolazione che discende dai fondatori e che la probabilità che due eterozigoti fenotipicamente sani si accoppino generando un individuo affetto omozigote risulta particolarmente elevata. Il recettore mutato è stato studiato in vitro per valutare le differenze di cinetica di legame e di funzionalità recettoriale rispetto alla proteina codificata dal gene "wild-type". Le cellule MSC-1 sono state transfettate con i due tipi di recettore, mutato e "wild-type": in seguito a incubazione con dosi crescenti di FSH, le cellule esprimenti sulla membrana il recettore mutato hanno mostrato una produzione di cAMP molto inferiore a quella riscontrabile nelle cellule col recettore "wild-type" ed addirittura paragonabile alle cellule del tutto prive di FSHR. Anche le concentrazioni di fosfatidil-inositolo trifosfato (IP3) in risposta all'FSH sono risultate nettamente inferiori nelle cellule esprimenti il recettore mutato rispetto a quelle col recettore "wild-type". È interessante notare che la cinetica di legame con l'FSH è invece simile nelle cellule con FSHR Ala189→Val e in quelle con recettore "wild-type" (16, 28). Infatti la sostituzione amminoacidica di Ala con Val è localizzata in un dominio che non fa parte del sito di legame con

l'ormone: la mutazione nel residuo 189 non può dunque interferire con la formazione del complesso recettore-ligando, ma piuttosto può alterare la trasduzione del segnale che esso origina. Si ritiene anche che la mutazione Ala189→Val produca il sequestro intracellulare del FSHR, diminuendone la possibilità di ricircolo intracellulare e di espressione a livello della membrana plasmatica. Ciò comporta la pressoché totale abolizione della capacità del recettore, posseduta solo se sito sul plasmalemma, di evocare la sintesi di secondi messaggeri (cAMP, IP3) in risposta all'FSH (28).

La mutazione inattivante Ala189→Val, se presente sul gene in omozigosi, è stata trovata come causa di amenorrea primaria ipergonadotropica con blocco della maturazione follicolare nelle donne e soppressione della spermatogenesi negli uomini. Le donne omozigoti per la valina in posizione 189 manifestano una crescita follicolare assai incompleta e scarsa apoptosi (tipica delle popolazioni cellulari in attiva proliferazione) nelle cellule della granulosa; in queste cellule l'espressione dell'aromatasi è diminuita, con conseguente carenza estrogenica intrafollicolare e tendenza all'atresia (28). La mutazione Ala189→Val presente invece in eterozigosi provoca nella maggioranza dei casi amenorrea secondaria pur mantenendosi normali dimensioni ovariche, dal momento che il recettore non viene abolito del tutto e la popolazione follicolare sul piano numerico è discretamente conservata (30).

In letteratura (31) viene riportato il caso di una donna di origine finlandese con la mutazione Ala189→Val in eterozigosi associata a un'altra

mutazione comportante un'ulteriore sostituzione aminoacidica sulla proteina, Ala419→Thr. Gli studi in vitro associano il recettore per l'FSH mutato in posizione 419 con bassi livelli di sintesi di cAMP e una totale abolizione della via di trasduzione del segnale mediata dalla PKA. L'espressione del FSHR nella membrana e la formazione del complesso ligando-recettore sono invece inalterati (31).

Vicino all'alanina in posizione 189 è presente un'asparagina che in seguito a mutazione del gene dell'FSHR può essere sostituita da un'isoleucina (variante Asn191→Ile). Questa mutazione, quando presente sul gene in eterozigoti, è associata a una più bassa risposta all'FSH in termini di sintesi di cAMP ed è stata trovata in una donna eumenorrea e fertile (35). E' verosimile che si tratti di una mutazione in grado di dare segni clinici solo se presente in omozigosi.

Un'altra mutazione inattivante sul gene dell'FSHR è rappresentata dalla trasversione nucleotidica C→G in posizione 1042, riscontrata in una paziente affetta da amenorrea primaria e POF (10). A livello aminoacidico nella proteina recettoriale si ha la sostituzione di una prolina con un'arginina nel residuo 348 (variante Pro348→Arg) (10). Le cellule transfettate con il gene per il recettore mutato mostrano una completa assenza dell'attività dell'FSHR. La sostituzione di un aminoacido idrofobico (Pro) con uno idrofilico (Arg) comporta l'incapacità totale del recettore di legare l'ormone. La completa perdita della funzionalità recettoriale porta a un mancato sviluppo dei caratteri sessuali secondari, amenorrea primaria, bassi livelli di estradiolo ed

elevati livelli di FSH in circolo. Le donne eterozigoti per questa mutazione manifestano alterazioni meno gravi, in genere lievi anomalie a carico delle strutture derivate dai dotti di Müller (salpingi, cervice, utero) (10).

La presenza contemporanea di due mutazioni inattivanti sul gene FSHR e' stata associata ad amenorrea secondaria e ad elevati livelli ematici di gonadotropine in una donna di origini armene, che sorprendentemente aveva ovaie di normali dimensioni e con numerosi piccoli follicoli antrali (12). Le mutazioni in questione si esprimono nelle sostituzioni aminoacidiche Ile160→Thr e Arg573→Cys. Il residuo 160 del FSHR si trova nel dominio extracellulare in una regione importante per il legame con il ligando; il residuo 573 invece prende contatto con la proteina G per la trasduzione del segnale; in altre parole, Ile160→Thr condiziona l'espressione del recettore sulla superficie della cellula, mentre Arg573→Cys altera la trasduzione del segnale in risposta all'FSH (12). Gli studi in vitro hanno dimostrato che le cellule COS-7 transfettate con geni mutati per una delle due mutazioni esprimono rispettivamente bassi livelli del recettore per l'FSH sulla membrana e bassi livelli intracellulari di cAMP in risposta a dosi crescenti di FSH (12). L'FSH è necessario per la crescita follicolare solo dopo la prima fase di reclutamento: infatti, anche pazienti con mutazioni inattivanti dell'FSHR, specie se eterozigoti, hanno spesso un numero normale di piccoli follicoli antrali ecograficamente rilevabili, derivati dal reclutamento primario gonadotropino-indipendente e dalle prime fasi dello sviluppo follicolare.



Recentemente sono state descritte due nuove mutazioni inattivanti sul gene FSHR in una donna che presentava resistenza parziale all'FSH (30). Le due mutazioni comportano nella proteina recettoriale le sostituzioni Asp224→Val e Leu601→Val. La paziente, eterozigote per le mutazioni descritte, era affetta da amenorrea primaria nonostante vi fosse un normale sviluppo puberale; gli esami ormonali hanno evidenziato un livello elevato di FSH in fase follicolare precoce, pur in presenza di numerosi follicoli visibili con ecografia transvaginale.

Un'altra mutazione inattivante, associata alla variante recettoriale Pro519→Thr, quando presente in omozigosi è stata associata ad amenorrea primaria, elevati livelli di FSH basale e ovaie di dimensioni ridotte (16). In presenza di omozigosi per questa mutazione i livelli di cAMP nelle cellule COS-7 transfettate sono pressoché indosabili anche dopo stimolazione con dosi crescenti di FSH. A livello istologico la corticale ovarica non contiene follicoli antrali o secondari, osservazione che indica la presenza di un blocco completo della crescita follicolare nelle pazienti omozigoti (16).

Una mutazione sul gene FSHR in posizione nucleotidica 1777 (sostituzione di una timidina con una citosina) comporta nella proteina recettoriale la presenza di una serina al posto di una fenilalanina nel residuo 591 (Phe591→Ser) (33). Questa mutazione abolisce qualsiasi produzione di cAMP intracellulare nelle cellule COS-7 esprimenti il recettore mutato. Le pazienti portatrici di questa mutazione in eterozigosi possono sviluppare un tumore dei cordoni sessuali, ma l'associazione tra il genotipo e il fenotipo tumo-

rale deve essere ancora provata definitivamente (32, 34).

Per completezza di trattazione occorre segnalare che non tutti gli autori hanno ottenuto dati che mettono in relazione la presenza di mutazioni attivanti o inattivanti del gene FSHR con le patologie a carico dell'apparato riproduttivo (23, 36). Il gene FSHR è stato sequenziato in alcune donne con PCOS ed in pazienti che hanno sviluppato una OHSS in seguito a stimolazione ormonale dell'ovaio; le sequenze geniche sono state confrontate con quelle di un gruppo di controllo composto da donne con ovaio normale o che in seguito a induzione della superovulazione non hanno sviluppato l'OHSS. Non è stata riscontrata alcuna correlazione statisticamente significativa tra la presenza di mutazioni FSHR e l'insorgenza di PCOS o OHSS iatrogena. Tuttavia entrambi gli studi hanno esaminato un gruppo molto ristretto di soggetti e senza sufficiente omogeneità etnica, due fattori che verosimilmente hanno influito in maniera decisiva sul risultato delle osservazioni.

### Conclusioni

Una mutazione nella regione del cromosoma 2 contenente il gene che codifica per l'FSHR condiziona una variazione nella sequenza aminoacidica del recettore e spesso anche una modifica delle sue proprietà funzionali. Naturalmente se la mutazione è presente su entrambi gli alleli (omozigosi) tutte le molecole di FSHR conterranno la sostituzione aminoacidica, mentre se la mutazione è in eterozigosi solo parte di esse ne sarà condizionata ed il riflesso clinico sul fun-

zionamento della risposta all'FSH sarà di portata inferiore.

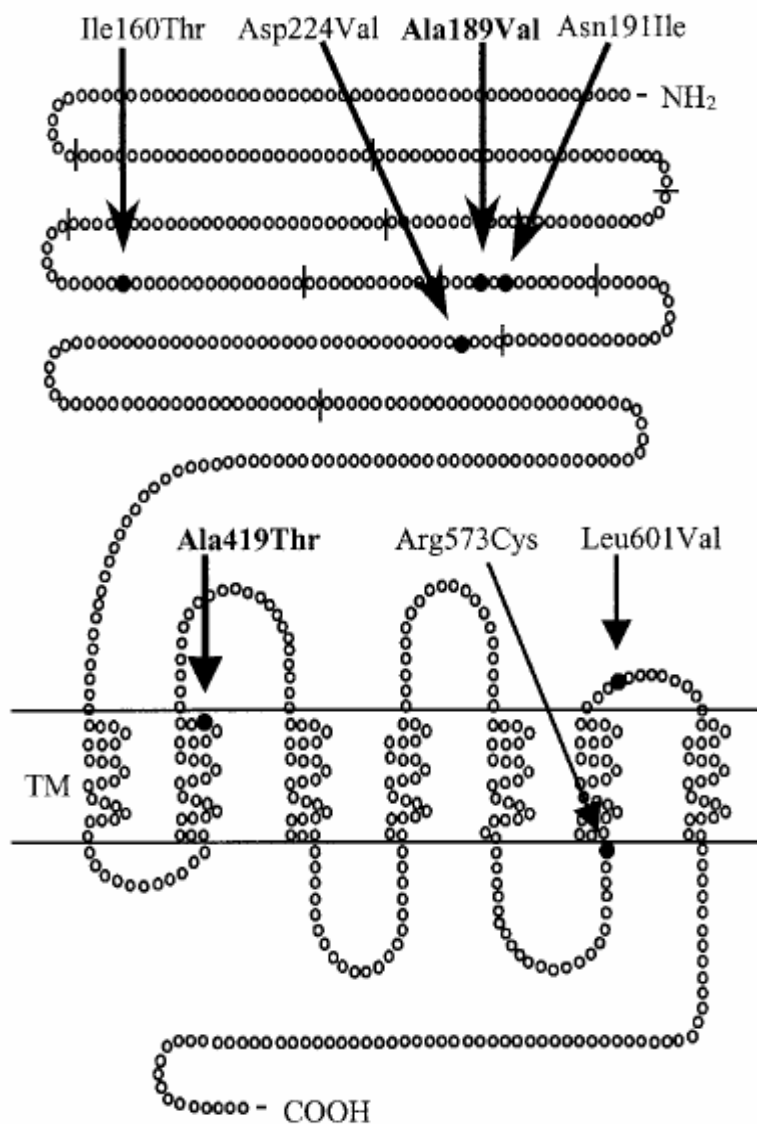
Le mutazioni inattivanti del gene FSHR comportano una riduzione della funzionalità del recettore che può arrivare fino al blocco totale. Se la mutazione comporta una sostituzione aminoacidica nella parte extracellulare del recettore verrà alterata la formazione del complesso recettore-ligando. Nel caso in cui, invece, venga coinvolta la porzione intracellulare del recettore, che interviene nella trasduzione del segnale e nella sintesi di secondi messaggeri come il cAMP e l'IP3, sarà la trasduzione del segnale a subire variazioni anche importanti.

Alcuni residui aminoacidici per i quali sono descritte mutazioni attivanti (545, 567 e 449) appartengono al dominio transmembrana del recettore e sono vicini tra loro. La loro mutazione causa un cambiamento conformazionale a seguito del quale l'FSHR acquisisce sensibilità anche nei confronti delle altre gonadotropine (es. l'hCG) o stabilizza la sua posizione nel doppio strato fosfolipidico risultando costitutivamente attivo, ossia in grado di stimolare la sintesi di cAMP anche in assenza dell'FSH.

L'ipotesi che il genotipo dell'FSHR possa influenzare l'insorgenza o la gravità di determinate patologie è assai suggestiva, ma deve essere ulteriormente convalidata da nuovi studi.

Indubbiamente se il legame tra mutazioni del gene dell'FSHR e patologie come la POF o l'OHSS venisse confermato si aprirebbero scenari interessanti per l'impiego del sequenziamento genico nell'ambito della prevenzione di tali condizioni patologiche.

**Figura I:** Sostituzioni aminoacidiche del recettore dell' FSH derivanti da mutazioni inattivanti sul gene FSHR (in grassetto, da ref. 29)



## Bibliografia

1. Simoni M., Gromoll J., Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology and pathophysiology. *Endocr Rev* 1997; 18:739-773.
2. Gromoll J., Pekel E., Nieschlag E. The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene. *Genomics* 1996; 35:308-311.
3. Gromoll J., Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16:368-373.
4. Simoni M., Gromoll J., Hoppner W., Kamischke A., Krafft T., Stahle D., Nieschlag E. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:751-755.
5. Gromoll J., Brocker M., Derwahl M., Hoëppner W. Detection of mutations in glycoprotein hormone receptors. *Methods* 2000; 21:83-97.
6. Sudo S., Kudo M., Wada S., Sato O., Hsueh A., Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:893-899.
7. Perez Mayorga M., Gromoll J., Behre H.M., Grassner C., Nieschlag E., Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 85:3365-3369.
8. Jun J.K., Joon J.S., Ku S.Y., Min Choi Y., Hwang K.R., Park S.Y., Hoon Lee G., Don Lee W., Hyun Kim S., Gu Kim J., Young Moon S. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Hum Genet* 2006; 51:665-670.
9. Aittomaki K., Lucena J.L.D., Pakarinen P., Sistonen P., Tapaniainen J., Gromoll J., Kaskikari R., Sankila E.M., Lehvaslaiho H., Engel A.R., Nieschlag E., Huhtaniemi I., de la Chapelle A. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995; 82:959-968.
10. Allen L.A., Achermann J.C., Pakarinen P., Kotlar T.J., Huhtaniemi I.T., Jameson J.L., Cheetham T.D., Ball S.G. A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotropic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. *Hum Reprod* 2003; 18:251-256.
11. Loutradis D., Patsoula E., Minas V., Koussidis G.A., Antsaklis A., Michalas S., Makrigiannakis A. FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. *J Assist Reprod Gen* 2006; 23:177-184.

12. Beau I., Touraine P., Meduri G., Gougeon A., Desroches A., Matuchansky C., Milgrom E., Kuttenn F., Misrahi M. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 1998; 102:1352-1359.
13. Vasseur C.V., Rodien P., Beau I., Desroches A., Capucine G., de Poncheville L., Chaplot S., Savagner F., Croue A., Mathieu E., Lahlou N., Descamps P., Mishrai M. A chorionic gonadotropin-sensitive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial gestational spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *N Eng J Med* 2003; 349:753-9.
14. De Leener A., Montanelli L., Van Durme J., Chae H., Smits G., Vassart G., Costagliola S. Presence and absence of follicle-stimulating hormone receptor mutation provide some insights into Spontaneous Ovarian Hyperstimulation Syndrome physiopatology. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:555-562.
15. Smits G.S., Olatunbosun O., Delbaere A., Pierson R., Vassart G., Costagliola S. Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. *N Eng J Med*, 2003; 349:760-6.
16. Meduri G., Touraine P., Beau I., Lahuna O., Desroches A., Vacher-Lavenu M.C., Kuttenn F., Mishrai M. Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle-stimulating hormone receptor: clinical, histological, and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3491-3498.
17. Simoni M., Nieschlag E., Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update*, 2002; 8:413–421.
18. Conway G.S., Conway E., Walker C., Hoppner W., Gromoll J., Simoni M. Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1999; 51:97-99.
19. Greb R.R., Grieshaber K., Gromoll J., Sonntag B., Nieschlag E., Kiesel L., Simoni M. A Common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human Follicle Stimulating Hormone Receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4866-4872.
20. Behre H.M., Greb R.R., Mempel M., Sonntag B., Kiesel L., Kaltwaber P., Seliger E., Ropke F., Gromoll J., Nieschlag E., Simoni M. Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: a pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogen Gen* 2005; 15: 451-456.

21. De Koning C.H., Benjamins T., Harms P., Homburg R., van Montfrans J.M., Gromoll J., Simoni M., Lambalk C.B. The distribution of FSH receptor isoforms is related to basal FSH levels in subfertile women with normal menstrual cycles. *Hum Reprod* 2006; 21:443-446.
22. Daelemans C., Smits G., De Maertelaer V., Costagliola S., Englert Y., Vassart G., Delbaere A. Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:6310-6315.
23. Brasil D'Alva C., Serafini P., Motta E., Fonte Kohek M.B., Latronico A.C., Mendonca B.B. Absence of follicle-stimulating hormone receptor activating mutations in women with iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*, 2005; 83:1695-1699.
24. Meng E.C., Bourne H.R. Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol Sci*, 2001; 22: 587-593.
25. Haywood M., Tymchenko N., Spaliviero J., Koch A., Jimenez M., Gromoll J., Simoni M., Nordhoff V., Handelsman D.J., Allan C.M. An activated human Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Receptor stimulates FSH-like activity in gonadotropin-deficient transgenic mice. *Mol Endocrinol* 2002; 16:2582-2591.
26. Montanelli L., Delbaere A., Di Carlo C., Nappi C., Smits G., Vassart G. Costagliola S. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89:1255-1258.
27. Rotmensch S., Scommegna A. Spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome associated with hypothyroidism. *Am J Obstet Gynecol*, 1989; 160:1220-1222.
28. Vaskivuo T.E., Aittomaki K., Anttonen M., Ruokonen A., Herva R., Osawa Y., Heikinheimo M., Huhtaniemi I., Tapanainen J.S. Effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotropin in individuals with an inactivating mutation of the FSH receptor. *Fertil Steril* 2002; 78:108-113.
29. Rannikko A., Pakarinen P., Manna P.R., Beau I., Mishrai M., Aittomaki K., Huhtaniemi I. M., Zorn J.R. Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:311-317.
30. Touraine P., Beau I., Gougeon A., Meduri G., Desroches A., Pichard C., Detoef M., Paniel M., Prieur M., Zorn J.R., Milgrom E., Kuttann F., Mishrai M. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Mol Endocrinol* 1999; 13:1844-1855.

31. Doherty E., Pakarinen P., Tiitinen A., Kiilavuori A., Huhtaniemi I., Forrest S., Aittomaki K. A novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1151-1155.
32. Tapanainen J.S., Vaskivuo T., Aittomaki K., Huhtaniemi I.T. Inactivating FSH receptor mutation and gonadal dysfunction. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145:129-135.
33. Kotlar T.J., Young R.H., Albanese C., Crowley W.F., Scully R.E., Jameson J.L. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor occurs frequently in human ovarian sex cord tumours. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1020-1026.
34. Gromoll J., Simoni M., NIESCHLAG E. An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; 78:119-125.
35. Gromoll J., Simoni M., Nordhoff V., Behre H.M., DE Geyter C., Nieschlag E. Functional and clinical consequences of mutations in the FSH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 125:177-182.
36. Kerkela E.K., Skottman H., Friden B., Bjuresten K., Kere J., Hovatta O. Exclusion of coding-region mutations in luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor genes as the cause of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2007; 87:603-606.