Iraqi Journal of Biotechnology, 2014, Vol. 13, No.2 ,34-46

Diagnosisof Mutations in Thyroid Stimulating Hormone Receptorgene (TSHR) of Thyroid Disorders Patients in Basra Province

Faizah A.W. Ahmed[1],Asaad Y. Ayied[2],Khalid Tobal[3],Fulla A. AL-Satar[1]

[1]Department of Biology,College of Education

[2]Department ofAnimal Resource,College of Agriculture,University of Basra

[3]King's College,London , UK

Received: September 16,2014/ Accepted: September21,2014

Abstract: The study was conducted on 90 blood samples divided into 35 samples Hypothyroidism 35 samples hyperthyroidism (group of patients) and 20samples from healthy people (control group). DNA of two groups was extracted and exon 10 was amplified by using PCR. Mutations were diagnosed and analyzed byusing Sequencing. The present study found seven novel mutations in exon 10, divided into five mutations amonghypothyroidism patients compared to control (who did not appear to have any type of mutations diagnosed). All mutations diagnosed weresubstitution included transition or transversion depending on the nature of the mutant base, three missense mutation in three hypothyroidism patients with a proportion of 20% each. They are as follows c.1330 T>C, Y444H; c.1424 T>C, L475P and c.1435 T>C, S479P and two silent mutation in two hypothyroidism patients (c.1338G>A,L446L and c.2300 G>A Untranscrib).While the result showed two mutation in hyperthyroidism, one was missense mutation (c.1832 C>A, P610Q) and the other silent mutation (c.2103 C>A, R701R).
The current study pointedout the occurrence of the disease linked with mutations in specific areas of linkingstimulating hormone and the interaction between the protein receptor and α-subunit for G-protein.

Key words: Thyroid disorders, *TSHR* gene, Mutation.

تشخيص طفرات جين الهرمون المحفز للغدة الدرقية TSHRلدى مرضى الغدة الدرقية في محافظة البصرة

فائزة عبد الوهاب[1]، اسعد يحيى عايد[2]،خالد توبال[3] ، فله عبد الستار عبد[1]

[1]قسم علوم الحياة،كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة البصرة
[2]قسم الثروة الحيوانية،كلية الزراعة، جامعة البصرة
[3]كلية الملك، لندن، المملكة المتحدة

الإستلام: 16 أيلول 2014/القبول: 21 أيلول 2014

الخلاصة:استخدمت الدراسة الحالية 90 عينة دم مقسمة إلى 35عينة من مصابين بحالة القصور في نشاط الغدة و35 عينة من مرضى فرط نشاط الغدة ومثلت بمجموعة المرضى (Patients Group) و20 عينة من أشخاص أصحاء تمثلت بمجموعة السيطرة (Control Group). استخلص DNA للمجموعتين وضخمت المنطقة المشفرة العاشرة (Exons 10) لجين TSHR باستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) بعدها تم تشخيص الطفرات وتحليلها بطريقة التتابع Sequencing. وجدت الدراسة الحاليةسبعة طفرات جديدة Novel Mutations في المنطقة المشفرة موزعة الى خمسة طفرات لدى مصابين بحالة القصور مقارنة

بمجموعة السيطرة (الذين لم تظهر لديهم أي نوع من الطفرات المشخصة) وان جميع الطفرات المشخصة هي طفرات نقطية تعويضية استبدالية Substitutionأما من نوع Transition أو Transversion اعتمادا على طبيعة القاعدة الطافره ثلاثمنها Missense Mutations في ثلاث مصابين بحالة القصورنسبة كل منها 20%وهي كالتالي c.1330 T>C , Y444H ; c.1424 T>C ,L475P and c.1435 T>C , S479Pو طفرتين صامتتينSilent Mutationsفي اثنينمن مرضى بحالة القصور (c.1338 G>A, L446L and c.2300 G>A , Untranscribt). بينما سجلت النتائج وجود طفرتين فقط في حالة الفرط في نشاط الغدة بنسبة 5.71%احدهما Missense (c.1832 C>A, P610Q) والأخرى صامته (c.2103 C>A ,R701R). أشارت الدراسة الحالية إلى احتمالية ارتباط الطفرات بحدوث المرض وذلك من خلال موقع الطفرات في المناطق الخاصة للارتباط بالهرمون المحفز ومنطقة التفاعل بين البروتين المستقبل و الوحدة الثانوية ألفا لكوانين- بروتين (G-protein).

المقدمــــــــــة

اضطرابات الغدة الدرقية (Thyroiddisorders) مصطلح عام يمثل عدة أمراض مختلفة تتضمنها هرمونات الغدة والتي فصلت إلى فئتين رئيسيتين هي زيادة نشاط الغدة (Hyperthyroidism) وقصور نشاط الغدة (Hypothyroidism) اعتمادا على اختبار مستويات هرمونات الغدة (T3 , T4) والهرمون المحفز للغدة الدرقية (TSH) من ناحية الزيادة أو النقصان(1). تصنــــــع وتفـــــــــرز الغــــــــدة الدرقيــــة اثنـين من الهرمونات الحيويه الرئيســــــية هما هرمون الثايروكســــين (Thyroxin T4) وهرمــــون الثـالث ايودو الثايرونين (Tri-iodothyroninT3) وتعتمد في تصنيعهما على كمية اليود المأخوذ من الطعام وعلى تحفيز الغدة من قبل الهرمون المحفز للغدة الدرقية (Thyroid Stimulating Hormone TSH) المفرز من قبل الغدة النخامية (2)، وبذلك تكون وظيفة البروتين المستقبل للهرمون المحفز للغدة الدرقية هي تنظيم تصنيع وافراز هرمون الثايرويد من خلايا الثايرويد الجريبية ليلعب دور مهم في السيطرة على نمو وتطور الغدة الدرقية (3).

يقع الجين المشفر لهذا البروتين على الذراع الطويل لكروموسوم 14في الحزمة 31 (14q31) ويتكون من عشرة مناطق مشفره. يشفر هذا الجين الى بروتين مكون من 764 حامض اميني ويتالف من سلسلة مفردة من الببتيد مكونه من 21 حامض اميني ثم الوحدة الثانوية الفا الخارجية الكبيرة المشفره من قبل تسعة اكسونات وتبدا بنهاية امينية مكونه من 394 حامض أميني اما المنطقة العاشرة الكبيرة فتشفر الى 349 حامض اميني والذي يمثل السبعقطع الممتدة عبر الغشاءوالنهاية الكاربوكسيلية وبذلك تمثل الوحدة الثانوية الداخلية بيتا subunit (βendo-cellular) وعدد الأحماض الامينية للنهاية الكاربوكسيلية 50 حامض أميني. وتعبير هذا الجين يكون على الغشاء البلازمي لخلايا الثايرويد بحيث يكون ارتباط هرمون المحفز للغدة الدرقية (TSH) بالجزء الخارجي من مستقبل (α) على الغشاء القاعدي من خلايا الجريبية الثايرويد يقود إلى تحفيز طريق الرسول الثاني (CAMPCyclicAdenosine Mono Phosphate) الذي يستخدم لنقل الإشارة داخل الخلية عندها سوف تنشط كل العمليات المطلوبة لصنع هرمون الثايرويد من اخذ اليود وتصنيع أنزيم Tyrosine peroxide oxidase-TPO وبروتين الثايروكلوبيولين Thiroglobulin-TG ثم تصنيع هرمون الثايرويد وخزنه وتحريره (4,5).

اما الطفرات التي تحدث في جين *TSHR*فتكون على نوعين اما طفرة نقطية تحدث في الخلايا الجرثوميه تسمى طفرات جرثومية Germinal mutation ينتج عنها اما طفرات فعالة تعمل على اكتساب وظيفة (Gain-of-function) فتسبب حالة فرط نشاط الغدة مــع ظــهور تضـخم بالغدة (Goiter) (6) او ينتج عنها طفرة تؤدي إلى فقدان المستقبل لوظيفته (Loss-of-function) تجعل المستقبل مقاوم للهرمون المحفز للغدة الدرقية فتسبب حالة قصور نشاط الغدة ويقدر عدد هذا النوع من الطفرات بحوالي 50 طفرة مختلفة ومعظم هذه الطفرات تكون غير فعاله وتعمل علــى اختزال ســعة الارتبـــاط او تناقص تعــبير المستقبل على سطح غشاء الخلية (7). او طفرة نقطية تحدث في الخلايا الجسمية Somatic mutation تسبب أمراض المناعة الذاتية مثل حالة جريفز وتكون طفرات فعالة. وان كلا" من الطفرات الجرثومية والطفرات الجسمية تحدث في القطع الممتدة عبر الغشاء والحلقات الداخلية والخارجية ولكن النقطة الساخنة (Hot spot) لحدوث الطفرات في القطع الممتدة عبر الغشاء و الحلقات الداخلية الثلاثة هي منطقة تفاعل المستقبل مع-proteinsG .أما الحلقات الخارجية ضمن السايتوبلازم فلها دور مساعد في تركيب بروتين المستقبل وتفعليه (8) .

تهدف الدراسة إلى تشخيص الخلل الوراثي لاضطرابات الغدة الدرقية التي تشمل القصور و

فرط في نشاط الغدة Hypothyroidism and (Hyperthyroidism) عن طريق معرفة الطفرات في الجين المشفر للبروتين المستقبل للهرمون المحفز للغدة الدرقية (Thyroid Stimulating Hormone Receptor TSHR).

المـــــــواد وطـــــــرائق العمل

1- العينات

جمعت 90 عينة دم بواقع 35 عينة دم لمرضى قصور في نشاط الغدة و 35 عينة دم لمرضى فرط نشاط الغدة الدرقية من مراكز الغدد الصم والسكري من مستشفيات الموانئ والفيحاء والقرنة لمدة ستة أشهر مثلت مجموعة المرضى و أما مجموعة السيطرة فكان عدد عيناتها20جمعت من تدريسيات قسم علوم الحياة / كلية التربية-جامعة البصره . كما تم جمع بعض البيانات الشخصية لكل فرد من المجموعتين شملت العمر وتاريخ المرض و مستويات الهرمونات.

2- استخلاص الحامض النووي DNA

استخلص الحامض النووي من عينات المجموعتين باستخدام عدة DNeasy Blood & Tissue Kit (69504) مجهزة من قبل شركة Qia gen .

3- طريقة عمل الـ PCR

درست الطفرات في الاكسون العاشر المكون من خمسة أجزاء باستخدام البادئات في جدول (1) لعمل PCR.

جدول(1) البادئات المستخدمة في الدراسة

Gene*TSHR*Exon 10		Primer sequences	Length	Tm	TA	Product size-pb
TSHR1	*F	GTCATGAGCCACTGCGCC	18	60	55	352
	*R	GGTTGAACTCATCGGACTTGG	21	64	59	
TSHR2	F	CCCAGGAAGAGACTCTACAAGCT	23	70	65	338
	R	GAAACCAGCCGTGTTGCAC	19	60	55	
TSHR3	F	CCATCGACTGGCAGACAGG	19	62	57	336
	R	CGGATTTCGGACTGTGATGT	20	60	55	
TSHR4	F	ACATAGTTGCCTTCGTCATCGT	22	64	59	381
	R	GCTGTTCTTTGGAGGAACCC	20	62	57	
TSHR5	F	GCCTTCCAGAGGGATGTGTTC	21	66	61	338
	R	CCATGAAACATTGAAACATCGC	22	62	57	

MT: Melting temperature, TA: Annealing Temperature, * F: Forward, * R: Reverse.

أجريت طريقة العمل بحجم 20 مايكروليتر كما هو موضح في الجدول (2).

الجدول (2) المواد الكيماوية لخليط التفاعل وحجومها

Chemicals	Volume
Master Mix (hot star)	10 µl
Premier Forward	0.7µl
Premier Reverse	
DNA	3 µl
D.W.	6.3 µl

بعد اتمام جميع الاضافات طردت العينات بجهاز الطرد المركزي لمدة نصف دقيقة لضمان تجانس جميع المواد، ثم وضعت العينات بجهاز Thermal Cycler وشغل الجهاز حسب البرنامج الموضح في جدول (3).

الجدول (3) برنامج PCR

NO. of Steps	Steps	Temperature	Time	No. of Cycle
1	Denaturation 1	95 °C	10 min	1 Cycle
2	Denaturation 2	95 °C	30 sec.	50 Cycles
3	Annealing	58°C	30 sec.	
4	Extension	72°C	30 sec.	
5	Final Extension	72°C	5 min	1 cycle

4- الترحيل الكهربائي Electrophoresis

رحلت العينات(نواتج الـ PCR) كهربائيا وحسب طريقة(9) باستخدام هلام الاكاروز بتركيز2% معصبغة الـ Ethidium Bromideوكشفت الحزم بعدها بجهاز الأشعة فوق البنفسجية (UVLight).

5- قراءة تتابع القواعد النتروجينية Sequencing

بعد التأكد من وجود الحزم الخاصة بجينات الدراسة عن طريق الترحيل الكهربائي تمتتنقية ناتج التضخيمPCRباستخدام عدة Charge Switch Clean-up Kit.وبعد ذلك عمل PCR Sequencing باستخدام ABI big dye Applied Biosystems, USAوالجدول (4) يوضح المواد المستخدمة في عمل PCRSequencing.

جدول (4) المواد المستخدمة فيSequencing Master Mix

Reagent	Volume (µl) x1
5x buffer	2 µl
Big dye	0.6 µl
Primers	1 µl(10pmol)
Sterile H2O	3.4 µl
DNA template(cleaned PCR product)	3µl
Total	10 µl

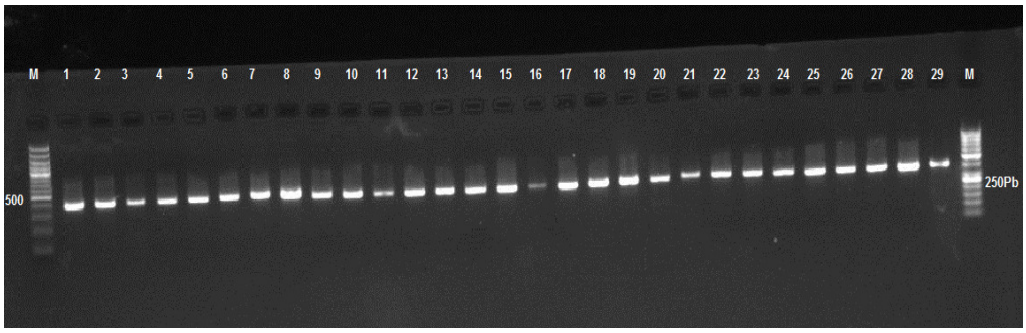
النتا

بعد الانتهاء من عمل Sequencing PCR تمتالتنقية الثانية باستخدام Agencourtclean SEQ kit المصنع من قبل شركة Backman Coulterفي المملكة المتحدة. وضعت العينات بعدها في صفيحة جهاز القراءة(Plate 96 well sequencer) ثم وضعت بجهاز قراءة التتابع Applied Biosystem Sequencer model ABI 3730. بعد انتهاء عمل الجهاز تم تحليل العينات بمقارنتها مع Reference Gene حسببرنامج The Mutation Surveyor Software v5.2.

ئـــــج و المناقشـــة
جين *TSHR* و اضطرابات الغدة الدرقية

تم تحميل تتابع الجين TSHR و تتابع الحامض النووي الرايبوزي الرسول mRNAمن القاعدة 1-192514 للإنسان من موقع (http://asia.ensembl.org/index.html). كمـــا تـــم تحليـــل تتـــابع المنطقـــة المشـــــــــــــفرة لجين TSHR باعتبارهاالمنطقة التيتتضمن النقاط الساخنة Hotspot لحدوث الطفرات ولأنهاتشفر إلى الجزئين

المهمين لبروتين المستقبل الجزء الممتد عبر غشاء الخلية والنهاية الكاربوكسيلية داخل الخلية و بسبب حدوثالطفرات بهما بواسطة جهاز Sequencer ABI 3730.ثم قورنت النتائج لـ (70 عينة مريض و 20 عينةطبيعية) مباشرة مع Reference gene TSHR – بواسطة برنامج Themutation survey softwarev5.2(شكل1).



شكل (1):الترحيل الكهربائي لناتج الـ PCR على هلام الاكاروز بتركيز 2% الخطين (M) تمثل DNA Marker 100, 50 pb أما الخطوط (1-29) تشير إلى الأجزاء الخمسة لمنطقة المشفرة العاشرة

تحليل طفرات جين *TSHR*

ان الطفرات التي تحدث في جين TSHR ينتج عنها حالتين من اضطرابات الغدة وذلك اعتمادا على موقع الطفرة حيث شخصت نتائج الدراسة وجود خمس طفرات جديدة (Novel Mutation) جميعها طفرات نقطية تعويضية (استبدالية) substitution في حالة القصور في نشاط الغدة ومن نوع Transition اعتمادا على نوع القاعدة الطافره في خمسة مرضى وبنسبة 14.29% من 35 مريض وطفرتين نقطية تعويضية جديدتين في حالة فرط نشاط الغدة من نوع Transversion في مريضين بنسبة 5.71% من بين35 مريض. شملت الحالة خمسة طفرات لم تذكر سابقا و كل طفرة شخصت بمريض واحد وبنسبة (20%) ثلاثة منها كانت من نوع (Missense) واثنان منها طفرات صامته (Silent) في حالة القصور في نشاط الغدة. وتحول القاعدة الثايمين (T) الى القاعدة السايتوسن (C) في ثلاثة مواقع لقاعدة (T)عند موقع القاعدة 1330 مما اعطت تغاير في الحامض الاميني من التايروسين (Tyrosine Y) إلى الحامض الاميني الهستدين (Histidine H) عند موقع الحامض الاميني 444. وعند الموقع 1435 ينتج عنها استبدال الحامض الاميني السيرين (Serine S) الى الحامض برولين (Proline P) عند موقع الحامض 469. وعند الموقع 1424 ينتج عنها استبدال الحامض الاميني ليوسين (Lucien L) الى الحامض برولين (Proline P) عند موقع الحامض 475. وتحول القاعدة الكوانين (G) الى القاعدة الادينين (A) في موقع القاعدة 1338 مما لم ينتج عنها تغاير في الحامض الاميني ليوسين (Leucine L) عند موقع الحامض 446. وتحول القاعدة الادينين (A) الى القاعدة الكوانين (G) في موقع القاعدة 2300ويقع هذا التغير في القاعدة للمنطقة غير المشفرة.

اما في حالة الفرط في نشاط الغدة Hyperthyroidism،فقد سجلت هذه الحالة طفرتين فقط وبنسبة 5.71% من مجموع 35 مريض شخصت كل طفرتين بمريض واحد وبنسبة 20% الطفرة الأولى من نوع Missense و الثانية طفرة صامته Silent. اذ تحولت القاعدة السايتوسين (C) الى القاعدة الادينين (A) في موقعين للقاعدة (C)عند موقع القاعدة 1832 مما ينتج عنها تغير في الحامض الاميني برولين (Proline P) الى الحامض الاميني كلوتاميك (Glutamic acid Q) عند موقع الحامض 610. وعند الموقع 2103 لم تسبب تغاير في الحامض الاميني الارجنين (Arginine R) عند موقع الحامض 701 (الجدولان 5 و 6 و شكل 2).

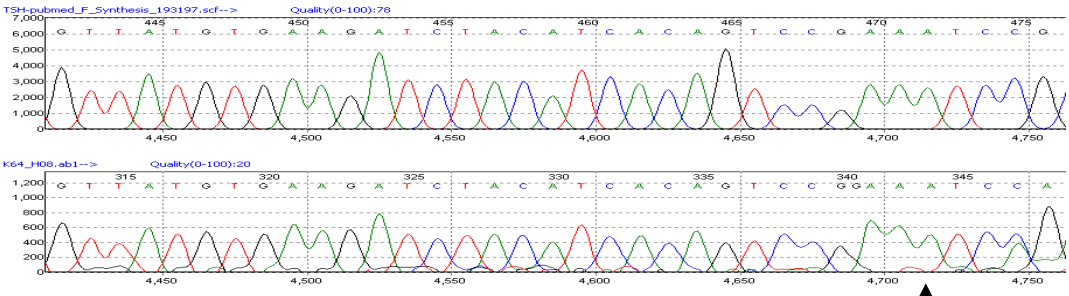
جدول (5) تحليل تتابع المنطقة المشفرة 10 لجين TSHR

نوع الطفرة	موقع القاعدة الطافره	الشفره الطافره Mutation	الشفره الطبيعي Wild type	الحالة
Substitution (Transition)	c.1330	CAC	TAC	قصور نشاط الغدة Hypothyroidism
Substitution (Transition)	c.1338	CTA	CTG	
Substitution (Transition)	c.1424	CCC	CTC	
Substitution (Transition)	c.1435	CCT	TCT	
Substitution (Transition)	c.2300	TGA	TAA	
Substitution (Transversion)	c.1832	CAG	CCG	فرط نشاط الغدة Hyperthyroidism
Substitution (Transversion)	c.2103	CGA	CGC	

تعتبر المنطقة المشفرة العاشرة (Exon 10)من جين *TSHR*الأكبر واهم منطقة في هذا الجين لانهاتشفر الى جزء من الجزء الخارجي (الوحدة الثانوية الفا (sub unit α المسؤول عن ارتباط الهرمون المحفز(TSH) والى الجزء الكامل من الوحدة الثانويه بيتا والمتضمن القطع السبعة الممتدة عبر الغشاء (Seven TransMembrane7TM) والمتمثلة ايضا بالحلقات الخارجية والداخلية الثلاثة والنهاية الكاربوكسيلية المسؤولة عن اشارة التحفيز الى داخل الخلية بتفاعلها مع G-Proteinكما ان الطفرات التي تسبب الزيادة او الفقدان لوظيفة الجين المشفر لبروتين المستقبل تقع أساسا في هذا المنطقة المشفرة (10,11).

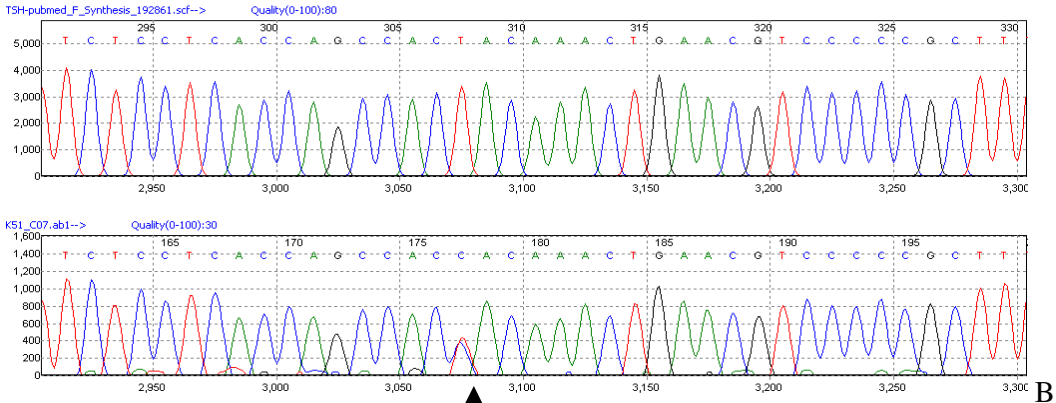
جدول (6) تأثير الطفرة على الجين TSHR

عدد المرضى الحاملين للطفرة (%)	تغير الحامض الاميني	تأثيرها على الترجمة	الطفرة	الحالة
1(20)	Y 444 H Try 444 His	Missense	c.1330 T>C	قصور نشاط الغدة Hypothyroidism
1(20)	L 446 L Leu 446 Leu	Silent	c.1338 G>A	
1(20)	L 475 P Leu 475 Pro	Missense	c.1424 T>C	
1(20)	S 479 P Ser 479 Pro	Missense	c.1435 T>C	
1(20)	Untranscribt	Silent	c.2300 A>G	
1(20)	P 610 Q Pro 610 Gln	Missense	c.1832 C>A	فرط نشاط الغدة Hyperthyroidism
1(20)	R 701 R Arg 701 Arg	Silent	c.2103 C>A	



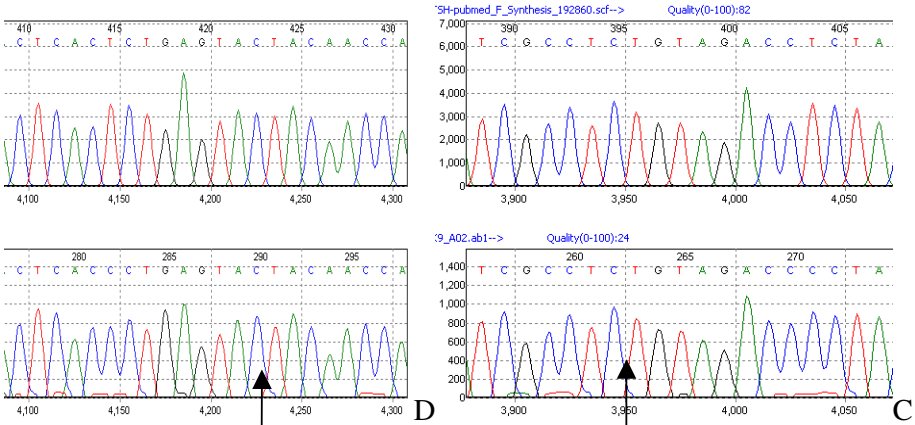
A

c.1832 C>A, P610Q



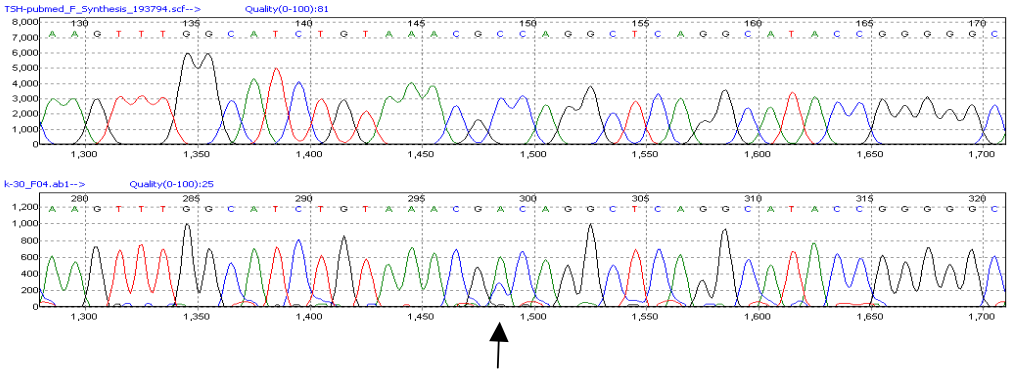
B

c.1330 C>T , Y444H



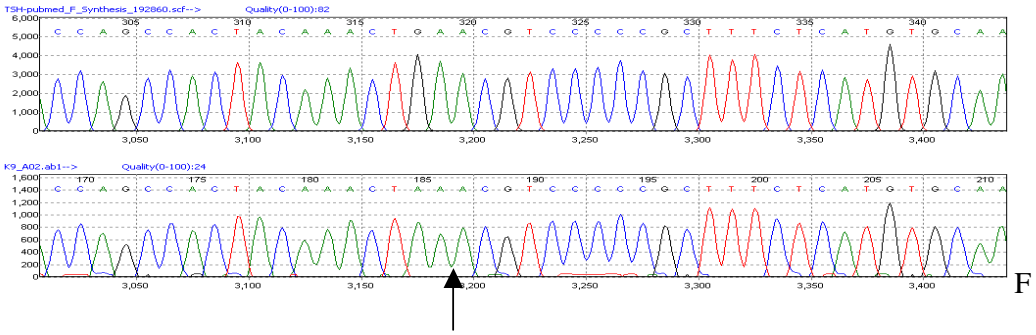
D C

c.1424 C>T , L475P c.1435C>T, S479P



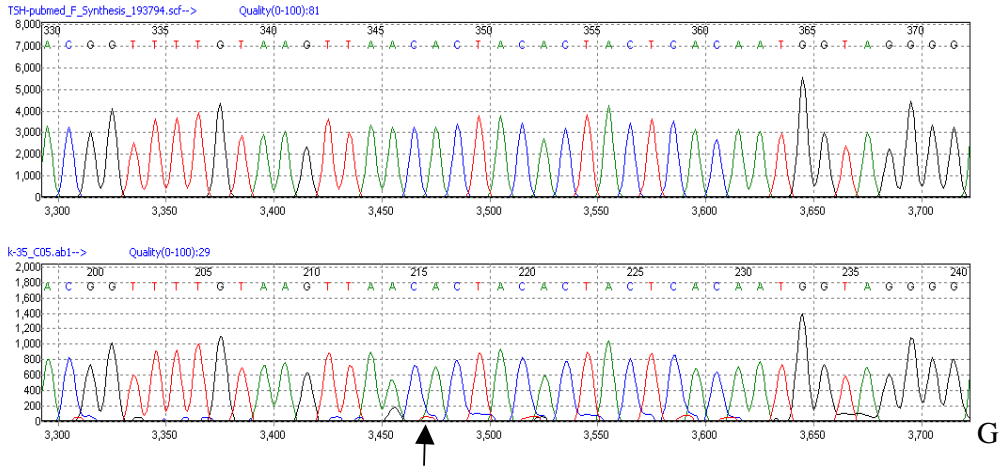
E

c.2103 C>A , R701R



F

c.1338 G>A , L446L



G

c.2300 A>G, Untranscrib

شكل (2): الطفرات الجديدة (Novel mutation) في جين TSHR. الجزء الاعلى من كل شكل يمثل بـالتتابع الطبيعي للجين أما الجزء الأسفل والمؤشر بالاسهم يشير الى موقع حدوث الطفره او تغير بالقاعدة بمقارنة مع الجزء الأعلى من الشكل . (A) الطفرة Missense و (E) طفرة الصامته (Silent) لحالة الفرط في نشاط الغدة Hyperthyroidism، (B, C and D) الطفرات Missense و (F and G) الطفرات الصامتة (Silent) لحالة القصور في نشاط الغدة Hypothyroidism

وجد (12) أنه بسبب تحول قاعدة السايتوسن (C) في الشفره (TAC) الى الكوانين (G) اعطت الشفره (TAG) من نوع (Transversion) وسببت استبدال الحامض الاميني الأصلي التايروسين (Y) عند موقع الحامض الاميني 444 بشفرة الإنهاء (Ter) في الحلقة الأولى الداخلية مما نتج عنها بروتين مقطوع غير فعال على سطح الخلية وعندها نشأت حالة القصور في نشاط الغدة في حين وجدت الدراسة الحالية أيضا طفرة من نوع (Transition)في نفس الموقع في حالة القصور في نشاط الغدة ولكن القاعدة الطافره الثايمين (T) في الشفره(TAC) للحامضالاميني الأصلي التايروسين (Y) الى القاعدة السايتوسن (C) اعطت الشفره (CAC) بذلك الحامض الاميني الجديد الهستدين (H) وربما سبب هذا التغير في الحامض الاميني خلل في تركيب بروتين المستقبل مما يقود إلى ضعف في تعبيره على سطح الخلية بذلك قد تنشا حالة القصور في نشاط الغدة . ووجد (13,14)ان الطفرة L467P متوارثة لدى مرضى القصور في نشاط الغدة بشكل متباينة الزيجة و الناتجة من تحول قاعدة الثايمين (T) الى السايتوسين (C)لتعطي تغيرا" في الحامض الاميني من ليوسين (L) إلى برولين (P)عند موقع الحامض (467) في القطعة الثانية عبر الغشاء مما تسبب ضعفا" في تعبير بروتين المستقبل ناتجا" عن مقاومة جزئية للهرمونالمحفز و أشار(13) أن استبدال الحامض الاميني ليوسين بالحامض الاميني برولين يسبب كسرا" للبروتين من المنطقة الثانية عبر الغشاء. وقد تم الحصول في الدراسة على طفرة مماثلة ولكن في موقع الحامض الاميني 475 (L475P) وفي المنطقة الثانية ايضا عبر الغشاء لدى مرض القصور في نشاط الغدة ولكن متوارثة بشكل متماثلة العوامل ربما قد تسبب مقاومة كاملة للهرمون المحفز مما ادى الى عدم استجابة البروتين المستقبل للهرمون المحفز TSH وكذلك من المحتمل ان تؤدي الى كسر في البروتين في المنطقة الثانية من الغشاء.

تأثير الطفرة Effect of Mutation

تؤثر الطفرات على الوظيفة البايولوجية للبروتين المستقبل *TSHR*في ناحيتين أما انها تسبب زيادة وظيفة المستقبل (Gain-offunction)واما بسبب طفرات جرثومية او جسمية وكلاهما تقع في القطع السبعة الممتدة عبر الغشاء والحلقات الخارجية والداخلية ولكن الطفرات التي تسبب اكبر تأثير تحدث في الحلقات الداخلية الثلاثة في منطقة التفاعل مع بروتين G عندها تسبب حالة فرط نشاط الغدة الدرقية، أو تسبب خسارة (فقدان) لوظيفة البروتينالمستقبل (LOF(Loss-of function نتيجة مقاومة البروتين المستقبل للهرمون المحفز لغدة TSH جزئيا اوكليا وتحدث هذه الطفرات في الجزء الخارجي والقطع عبر الغشاء من بروتين المستقبل عندها تنشأ حالة قصور في نشاط الغدة (8,4).

ويعتقد ان التفاعل بين هرمون TSH وبروتين *TSHR*يسبب تغيرا" في تركيب الجزء الداخلي من بروتين المستقبل وهذا التغير يؤدي الى تفعيل الوحدة الثانوية الفا لبروتين G الواقع بالقرب من الحلقات الداخلية لبروتين المستقبل (اي على السطح الداخلي من الغشاء البلازمي لخلايا الغدة) والاخير ينشط انزيم اديناليت سايكليس AdenylateCyclase (AC) الواقع بالجانب الداخلي للغشاء البلازمي لخلايا الغدة الذي يقود الى توليد cAMP (cyclic Adenosine Mono Phosphate)الذي يعمل على نقل الإشارة إلى داخل الخلية لبدء عملية تصنيع هرمونات الغدة وبذلك يعتبر كمنظم داخلي خلوي (5,3). وان الطفرات Missenses الجسمية و الجرثومية التي وجدت في هذا الجين تسبب زيادة في تنشيط أنزيم Adenylate Cyclase (AC) مما يزيد من مستوى cAMP داخل الخلية والذي ينتج عنه حالة فرط نشاط الغدة (16,15).

تناولت معظم الدراسات حالة فرط نشاط الغدة التي تسببها طفرات Missenses الجسمية أو الجرثومية باختلاف مواقعها في الحلقات الداخلية و الخارجية الثلاثة و القطع السبعة عبر الغشاء التي تسبب زيادة في تفعيل انزيم اديناليت سايكليس (AC) مما يقود إلى زيادة تركيز cAMP داخل الخلية و يحث كل الفعاليات المسؤولة عن تصنيع هرمونات الغدة الدرقية (17).

اما الطفرات الجرثومية فتسبب فقدان الوظيفة وتؤدي الى خلل في وظيفة بروتين المستقبلTSHRباليات جزيئية مختلفة ينتج عنها حالة القصور في نشاط الغدة فهي تسبب خللا" في تصنيع البروتين المستقبل او تدهور تصنيع البروتين (18). وكما يعتقد ان طفرات Missenses الواقعة في الجزء الخارجي من بروتين المستقبل تؤثر على فعالية المستقبل من خلال تناقص ألفة ارتباط الهرمون المحفزTSH بالبروتين المستقبل *TSHR*وينتج عنها مقاومة البروتين المستقبل للهرمون المحفز جزئيا اعتمادا على توارث طبيعة الطفرات ان كانت متباينة الزيجة او مقاومة كاملة ان كانت الطفرات المتوارثة متماثلة الزيجة او مركبة متباينة الزيجة compound heterozygosis (19).

وتسبب الطفرات الواقعة في القطع عبر الغشاء خلل في نقل أشارة المحفز مما ينتج عنها ضعف في تعبير البروتين المستقبل على سطح الخلية او ربما يسبب استبدال الحامض الاميني بحامض أميني آخر يغير من صفاتهالكيميائية وبذلك يؤثر على انطواء البروتين الصحيح على سطح الخلية (20).

References

1- Shabsigh, R.; Arver, S.; Channer, K. S.; Eardley, I.; Fabbri, A.; Gooren (2008).The triad of erectile dysfunction, hypogonadism and the metabolic syndrome. Int. J. Clin.Pract.,62:791–798.

2- Musa , M. ; Harun, F. and Junit , S. M. (2008) . An investigation into the D727E polymorphism in the TSH receptor gene. Molecular Biology and Biotechnology, 16 (3):65-69.

3- Vassart G. and Dumont J. E.(1992). The thyrotropin receptor and theregulation of thyrocyte function and growth. Endocr. Rev 13:596-611.

4- Davies, T. F.; Ando, T.; Lin, R.Y.; Tomer, Y. and Latif, R.(2005).Thyrotropin receptor–associated diseases: from adenomata to Graves' disease. J. of Clinical Investigation, 115 (8): :1972–1983.

5- de Lloyd , A. ; Bursell , J. ; Gregory , J.W.;Rees , D.A. and Ludgate , M.(2010). TSH receptor activation and body composition. J. of Endocrinology, 204:13-20.

6- Van Sande, J.; Parma, J.; Tonacchera, M.; Swillens, S.; Dumont, J. &Vassart, G. (1995). Somatic and germline mutations of the TSH receptor gene in thyroid diseases. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 80 (9): 2577-2585.

7- Tenenbaum-Rakover, Y. (2012). The Clinical Spectrum of ThyrotropinReceptor Gene (TSHR) Mutations.INTECH,978-953-51-0021-8.

8- Kohn , B. ; Grasberger , H. ; Lam , L.L. ; Ferrara, A. M, and Refetoff , S. (2009). A Somatic Gain-of-Function mutation in the thyrotropin Receptor Gene Producing a Toxic Adenoma in aninfant.Thyroid Vol. 19 (2) DOI: 10.1089

9- Sambrook, J.; Fitsch, E. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloninga laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring HarborLaboratoryPress.Cold Spring Harbor.

10- Cassio, A.; Nicoletti, A.; Rizzello, A.; Zazzetta, E.; Bal, M. and Baldazzi,L. (2013). Current Loss-of-Function Mutations in the Thyrotropin Receptor Gene: When to Investigate, Clinical Effects and Treatment J. Clin. Res.Pediatr. Endocrinology. 5(Suppl. 1):29-39.

11- Nakamura , A. ; Morikawa , S. ; Aoyagi , H.; Ishizu , K. and Tajima , T. (2014). A Japanese family with nonautoimmune hyperthyroidism caused by a novel heterozygous thyrotropin receptor gene mutation. Pediatric Research 75:749-735.

12- Jeziorowska A1, Pniewska-Siark B, Brzeziańska E, Pastuszak-Lewandoska D and Lewiński A. (2006). A novel mutation in the thyrotropin (thyroid-stimulating hormone) receptor gene in a case of congenital hypothyroidism. Thyroid, 16(12):1303-1309. .

13- Alberti, L., Proverbio, M. C., Costagliola, S.,Romoli, R.,Boldrighini, B.,Vigone, M. C., Weber, G., Chiumello, G.,Beck-Peccoz, P. and Persani, L. (2002). Germ-line Mutations of TSH Receptor Gene as Cause of Non-autoimmune SubclinicalHypothyroidism J. of Clinical Endocrinology andMetabolism. 87(6): 2549-2555.

14- Calebiro, D.; de Filippis, T.; Lucchi, S. ; Covino , C. ; Panigone , S. ; Beck-Peccoz , P. ; Dunlap , D. and Persani , L. (2005). Intracellular entrapment of wild-type TSH receptor by oligomerization with mutants linked to dominant TSH resistance. Human Molecular Genetics Vol. 14 (20):2991-3002.

15- Frauman, A. (2013).TSH receptor: Review Article. UCSD Mdcule Pages Vol. 2 Issue 1.

16- Sema , A. ; Doga , T. ; Carolyn , T. ; Sian , E. ; Anne , D-L . ; Gilbert, V. and Sabine, C. (2008) .A family with a novel TSH receptor activating germline mutation (p.Ala485Val) J. of Pediatrics, 167.Issue 11.

17- Kosugi, S.; Hai, N.; OKamoto, H.; Sugawa, H. and Mori, T. (2000). Anovel activating mutation in the thyrotropin receptor gene in anautonomously functioning thyroid nodule developed by a Japanese patient. J. of Endocrinology 143: 471-477.

18- Gagne, N., Parma, J., Deal, C., Vassart, G. and Van Vliet, G.(1998). Apparent congenital athyreosiscontrasting with normalplasma thyroglobulin levels and associated withinactivating mutations in the thyrotropin receptor gene: Are athyreosis and ectopic thyroid distinct entities? J. Clin. Endocr.Metab. 83: 1771-1775.
19- Beck-Peccoz, P. (2004). Syndromes of hormone resistance on theHypothalamic-Pituitary–ThyroidAxis .e-Book ISBN: 1-4020- 7852- 8, Kluwer Academic Publisher. pp. 200.
20- Nagashima , T. ; Murakami , M. ; Onigata , K. ; Morimura, T. ; Nagashima , K. ; Mori, M. andMorikawa,A. (2001).Novel InactivatingMissense Mutations in the Thyrotropin Receptor Gene inJapanese Childrenwith Resistance to Thyrotropin.Thyroid. Vol. 11(6):551-559.