

1. Record Nr.	TD17002810
Autore	BASSI, IVAN
Titolo	A MULTIDISCIPLINARY APPROACH TO CHARACTERIZE THE ROLE OF PROKINETICIN RECEPTOR 2 (PROKR2) IN CONGENITAL HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM (CHH) [Tesi di dottorato]
Editore	Università degli Studi di Milano, 2017-04-21
Lingua di pubblicazione	Inglese
Formato	Tesi di dottorato
Livello bibliografico	Monografia
Note	diritti: info:eu-repo/semantics/openAccess In relazione con info:eu-repo/semantics/altIdentifier/hdl/2434/489203
Sommario	<p>L'ipogonadismo ipogonadotropo congenito (CHH) è una malattia rara ed eterogenea con una importante componente genetica. Sono descritte tutte le forme di ereditarietà possibili, sia autosomica che X-linked. Dal punto di vista clinico i soggetti con CHH presentano sia delle alterazioni a carico del sistema riproduttivo ma anche dei fenotipi non riproduttivi. Dal punto di vista riproduttivo possiamo avere tratti quali il criptorchidismo e/o il micropene e/o l'ipospadia nei maschi già in epoca neonatale, oppure, in entrambi i sessi, uno sviluppo puberale assente o parziale in epoca adolescenziale e infertilità in età adulta. Per quanto riguarda i fenotipi non riproduttivi, quello più caratteristico è rappresentato dai difetti olfattivi, quali ipo- o anosmia. L'associazione di difetto olfattivo e CHH viene identificato come sindrome di Kallmann (KS), mentre le forme di CHH senza difetti olfattivi sono denominate CHH normosmico (nCHH). Altri fenotipi non riproduttivi associati possono essere la presenza di sincinesie bimanuali, difetti della linea mediana (come labio e/o palatoschisi), difetti renali (agenesia o disgenesia), difetti uditivi (sordità neurosensoriale), difetti dentali (agenesia dentale), daltonismo, nistagmo. A causa della ridotta/assente fertilità spontanea di questi soggetti, prevalgono i casi sporadici rispetto ai</p>

casi famigliari anche se il progressivo perfezionamento delle tecniche di procreazione medicalmente assistita sta sempre più cambiando questa realtà. Proprio grazie alla presenza dei casi famigliari, agli studi su modelli animali e alle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione siamo oggi in grado di associare 25 geni candidati alle forme di CHH. Va tuttavia segnalato che l'espressività e/o la penetranza di questi difetti genetici è estremamente variabile. Questo è in parte giustificato dall'evidenza che questa malattia non sia di fatto monogenica, come si pensava inizialmente, ma invece oligogenica. D'altro canto però, è anche possibile che vi siano meccanismi genetici e/o epigenetici aggiuntivi che restano ancora da descrivere. Con lo scopo di comprendere meglio la componente genetica del CHH, nella prima parte del lavoro presentato in questa tesi è stato condotto uno screening genetico dei principali geni coinvolti in CHH sulla più grande coorte di pazienti italiani (n=512). Questa operazione ha permesso l'identificazione di un totale di 204 varianti nel 32,2% dei casi clinici esaminati. L'analisi delle varianti ha evidenziato una componente oligogenica nel 4,6% dei pazienti. Tra i geni più frequentemente coinvolti nella nostra coorte un ruolo sicuramente importante è quello del gene PROKR2 che presenta varianti nel 7,5% dei casi. Lo screening genetico ha infatti permesso di individuare ben 17 varianti alleliche in questo gene di cui quattro mai state descritte in letteratura (p.G70S, p.D99N, p.C208S, p.M278K). PROKR2 è un gene noto per avere un ruolo importante, benchè non pienamente compreso, durante il processo di migrazione dei neuroni GnRH. E' noto che mutazioni di questo gene nell'uomo possono causare sia la KS che il nCHH e che siano associate a un'estrema variabilità fenotipica sia intra che inter-familiare. A seguito dei risultati ottenuti, abbiamo deciso di focalizzare la seconda parte di questo lavoro sulla caratterizzazione di queste varianti in vitro e in vivo allo scopo di meglio chiarire il ruolo del recettore della prochineticina 2 durante il processo di migrazione dei neuroni GnRH e, di conseguenza, nel CHH. In particolare abbiamo caratterizzato dal punto di vista farmacologico le 4 varianti di nuova identificazione (p.G70S, p.D99N, p.C208S, p.M278K) unitamente ad altre 4 varianti già note in letteratura (p.R47W, p.M64V, p.R85H, p.P290S) ma ancora prive di caratterizzazione funzionale. Gli studi funzionali condotti hanno rivelato come queste varianti alleliche missenso possano influire in modo differente e indipendente sia sui meccanismi di trasporto in membrana del recettore PROKR2 che sulle vie di trasduzione del segnale intracellulari (Gs e Gq) da quest'ultimo mediate. In particolare, le varianti alleliche p.G70S, p.C208S e p.P290S producono una grave compromissione sia del meccanismo di trasporto in membrana che dell'attivazione delle vie Gs e Gq, mentre le mutazioni p.R47W, p.M64V e p.R85H colpiscono principalmente il trasporto in membrana. E' inoltre interessante notare come le varianti p.M278K e p.D99N, in seguito a stimolazione, hanno mostrato una quasi assente attivazione della via Gs in presenza di una buona conservazione nella funzionalità della via Gq. Questi risultati sottolineano la necessità di valutare l'integrità di entrambi i meccanismi mediati da PROKR2: produzione di cAMP attraverso la via Gq e accumulo intracellulare di inositolo fosfato (IP) attraverso la via Gs, per una corretta valutazione dell'impatto funzionale delle varianti alleliche ritrovate. La parte finale di questo lavoro è stata incentrata sulla generazione di un modello in vivo per studiare il ruolo di PROKR2 nella migrazione dei neuroni GnRH utilizzando il modello animale di zebrafish (ZF). Pochi dati sono attualmente disponibili in letteratura sui recettori delle prochineticine in zebrafish.

L'analisi bioinformatica condotta preliminarmente ha rivelato la presenza di due loci ben conservati all'interno del genoma di ZF: uno situato su chr1, denominato prokr1a, e una regione sul chr13, denominata prokr1b. Per valutare la loro espressione durante lo sviluppo di zebrafish, sono stati effettuati esperimenti di qRT-PCR Real-Time e Whole mount In Situ Hybridization (WISH) i quali hanno evidenziato un'espressione del solo gene prokr1b nei territori di migrazione ed espressione del gene GnRH3 (omologo in ZF di GnRH umano). Al fine di comprendere i ruoli funzionali di prokr1a e prokr1b, sono stati successivamente eseguiti esperimenti di knockdown iniettando sequenze oligonucleotidiche sintetiche antisense chiamate morpholino. I risultati hanno mostrato come la downregolazione di prokr1b, ma non prokr1a, colpisca la migrazione dei neuroni GnRH3 suggerendo così che prokr1b sia il gene omologo di PROKR2 umano. Per analizzare ulteriormente l'impatto di prokr1b sulla migrazione dei neuroni GnRH, è stata inoltre generata una linea ZF knockout per il gene prokr1b. L'analisi delle fibre nervose dei neuroni GnRH in questa linea knockout ha mostrato gli stessi difetti di migrazione osservati durante gli esperimenti di downregolazione confermando così il ruolo di prokr1b nella migrazione dei neuroni GnRH. In conclusione, il presente lavoro di dottorato rappresenta l'applicazione di un approccio multidisciplinare per studiare i meccanismi genetici e molecolari coinvolti nel CHH, concentrandosi sul ruolo del gene PROKR2 in questa patologia. Attraverso analisi genetiche è stato infatti possibile identificare nuove varianti genetiche di PROKR2 le quali, attraverso esperimenti in vitro, sono state farmacologicamente caratterizzate permettendo di evidenziare come le varianti possano influenzare in maniera differente la via di trasduzione del segnale intracellulari mediate dal recettore o il meccanismo di traslocazione in membrana. Infine, attraverso esperimenti di knockdown e knockout, è stato identificato in zebrafish il gene ortologo di PROKR2 umano e generato un nuovo modello in vivo, che potrebbe essere importante al fine di svelare il ruolo preciso del pathway prokineticina nella patogenesi di CHH.

Congenital hypogonadotropic hypogonadism (CHH) is a rare disease characterized by delayed/absent puberty and infertility due to an inadequate secretion or action of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH). CHH is genetically heterogeneous but, due to the infertility of affected individuals, most frequently emerges in a sporadic form, though numerous familial cases have also been registered. In around 50-60% of cases, CHH is associated with a variety of non-reproductive abnormalities, most commonly anosmia/hyposmia, which defines Kallmann syndrome (KS) by its presence. Broadly speaking, genetic defects that directly impact on hypothalamic secretion, regulation, or action of GnRH result in a pure neuroendocrine phenotype called normosmic CHH (nCHH), whereas genetic defects that impact of embryonic migration of GnRH neurons to the hypothalamus most commonly result in KS, though nCHH can also arise. CHH represents a difficult unresolved puzzle, although more than 25 genes have been described to be involved in CHH, molecular variants can explain only 35-45% of reported cases. These evidences raise in the last year the idea that CHH is an oligogenic complex genetic disease characterized by variable expressivity and penetrance. With the purpose to better understand the genetic component of CHH, the first part of this work was focused on genetic screening of the principal twelve genes involved in CHH on the largest cohort of Italian patients. Screening of a cohort of 512 CHH patients allows the

identification of 204 total variants in 32.2% of clinical cases. The analysis of variants displays a oligogenicity of 4.6%, confirming the oligogenic nature of CHH. Between the genes that appeared more frequently involved in the identified allelic variant, PROKR2 gene appears in 7.5% of the cases. Indeed we identified a total of 17 PROKR2 allelic variants, being four novel variants (p.G70S, p.D99N, p.C208S, p.M278K). PROKR2 gene is known to have an important and not fully understood role in GnRH neurons migration, and mutations of this gene in humans can cause KS or nCHH syndromes with a phenotypic heterogeneity of reproductive and olfactory defects. Consequently we decided to focus the second part of this work on characterization of these variants in vitro and in vivo with the aim to better elucidate the role of prokineticin receptor 2 in CHH and GnRH neurons migration. PROKR2 GPCR signal transduction pathways functionality was studied in the above

Localizzazioni e accesso

http://memoria.depositolegale.it/*/http://hdl.handle.net/2434/489203
