



## The posttranslational modification of thyrotropin receptor and thyroid diseases

**Grażyna Adler**

*Department of Biochemistry, Medical Center of Postgraduate Education, Warszawa*

### Abstract

The thyrotropin receptor (TSHR), lutropin receptor, and follitropin receptor are related members of the superfamily of leucine-rich repeats containing adenylate cyclase stimulating receptors. The unique posttranslational modification of the TSHR leads to the transformation of its monomeric form to the subunit structure where the subunits A and B are connected by disulphide bonds. This natural processing occurs with the release from the receptor of a short peptide C, and is followed by the release of the subunit A. Both monomeric and dimeric forms of the receptor are stimulated by TSH, so no clear functional significance of TSHR modifications have been found. We can speculate that the processing of TSHR with the release of its large fragments contributes to the development of autoimmune diseases and production anti-TSH receptor autoantibodies. The extrathyroidal manifestations of Graves disease may also

be related to metastasis of the autoimmune reaction to extrathyroidal sites via the released A subunit. The TSHR processing may, to some extent, be connected to the hyperthyroidism since the release of the subunit A from the receptor augmented the adenylate cyclase activity in the absence of TSH. According to the recent model of receptors action the TSHR is in equilibrium between the inactive (closed) and active (opened) conformations. In opened conformation it can associate with Gs protein and trigger the intracellular signal. TSH and stimulating autoantibodies preferentially bind to opened receptors and stabilizes them.

*(Pol J Endocrinol 2005; 1(56): 72-77)*

**Key words:** thyrotropin receptor, subunits, thyroid diseases, autoimmunity

## Posttranslacyjne modyfikacje receptora tyreotropiny a choroby tarczycy

**Grażyna Adler**

*Zakład Biochemii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa*

### Streszczenie

Receptor TSH należy do rodziny receptorów hormonów glikoproteinowych, jednak w odróżnieniu od pozostałych receptorów tej rodziny, receptorów FSH i LH/hCG, jest posttranslacyjnie modyfikowany. Około 75% monomerycznego, błonowego receptora ulega proteolizie. Proteoliza zachodzi co najmniej w dwóch punktach i w jej wyniku uwalniany jest tak zwany peptyd C, natomiast powstałe podjednostki A i B połączone są mostkami dwusiarczkowymi. Obie formy receptora, monomeryczna i dimeryczna aktywnie wiążą TSH. Następnym etapem modyfikacji receptora jest uwalnianie podjednostki A. Receptor pozbawiony tej podjednostki cechuje zdolność słabej aktywacji komórki w nieobecności TSH. Znaczenie fizjologiczne zmian w receptorze nie jest wyjaśnione, być może wiążą się z nimi predyspozycje do chorób autoimmunizacyjnych, w których powstają autooprzeciwciała właśnie przeciwko receptorowi TSH, a także występowanie w przebiegu tych chorób

charakterystycznych, pozatarczycowych objawów. W błonach tarczycy receptor TSH występuje w stanie równowagi pomiędzy konformacją nieaktywną, i konformacją aktywną, zdolną do oddziaływania z białkiem Gs, przy czym równowaga przesunięta jest w stronę konformacji nieaktywnej. Zarówno TSH jak i autooprzeciwciała stymulujące wiążą się z formą aktywną receptora i ją stabilizują.

*(Endokrynol Pol 2005; 1(56): 72-77)*

**Słowa kluczowe:** receptor tyreotropiny, podjednostki, choroby tarczycy, autoimmunizacja



Dr hab. Grażyna Adler prof. w CMKP  
Zakład Biochemii Klinicznej,  
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,  
Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

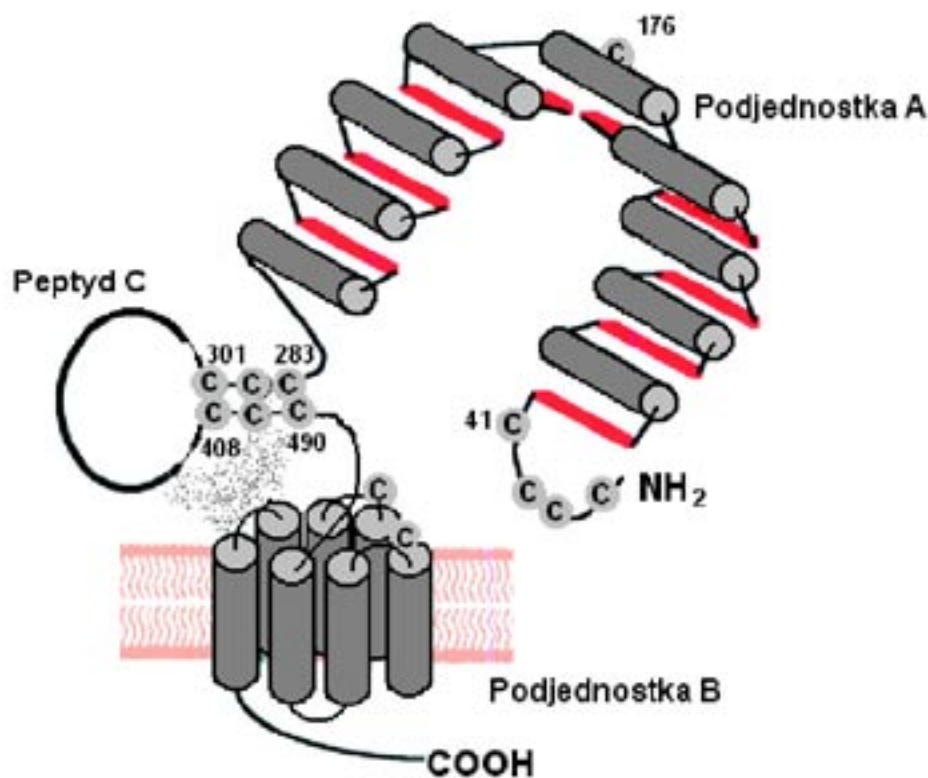
Obecny w błonach tarczycy receptor hormonu tyreotropowego (RTSH) należy do rodziny receptorów współdziałających z Białkiem G, bogatych w powtarzające się sekwencje zawierające leucynę. Ich wspólną cechą jest obecność domeny transbłonowej o siedmiu odcinkach helikalnych przebijających dwuwarstwę lipidową. Domena ta jest w wysokim stopniu konserwatywna; zgodność sekwencji aminokwasów wynosi około 70%. Podrodziną tych receptorów są, obok receptora TSH, receptory pozostałych hormonów glikoproteinowych, folitropiny (FSH) oraz hormonu luteinizującego (LH) i gonadotropiny kosmówkowej (hCG). N-końcową część receptorów tych hormonów stanowi zlokalizowana na powierzchni komórek ektodomena wykazująca około 40% analogii. Wewnątrzkomórkowa, C-końcowa część receptorów jest stosunkowo krótka [1]. Receptor TSH, kodowany jest przez jeden gen i syntetyzowany w formie monomerycznej. Jednak w przeciwieństwie do receptorów pozostałych hormonów glikoproteinowych, monomeryczny, przetransportowany na błonę tyrocytów receptor TSH ulega postranslacyjnej modyfikacji. Pierwszym etapem modyfikacji jest proteoliza przez metaloproteazę o właściwościach zbliżonych do konwertazy czynnika martwicy nowotworów [2]. Zidentyfikowano dwa podstawowe miejsca proteolizy: w obrębie aminokwasów 304-316 (I miejsce cięcia) i aminokwasów 366-369 (II miejsce cięcia) ektodomeny receptora [3].

Po proteolizie w cząsteczce receptora można wyróżnić podjednostkę A, odpowiadającą większemu fragmentowi ektodomeny i podjed-

nostkę B obejmującą domenę wewnątrzbłonową, transbłonową oraz C-końcową część ektodomeny. Fragment cząsteczki pomiędzy I i II miejscem cięcia został nazwany peptydem C. Podjednostki A i B pozostają połączone mostkami dwusiarczkowymi. Mechanizm i stopień proteolizy receptora nie jest dokładnie zbadany. Izolowany, zredukowany, receptor charakteryzowano elektroforetycznie z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Na podstawie porównania ciężarów cząsteczkowych produktów proteolizy barwionych przeciwciałami przeciwko podjednostce A i B stwierdzano, że w tarczycy ludzkiej i w transfekowanych komórkach jajowych chomika chińskiego (CHO) wytwarzających receptor cięcia zachodzi najczęściej w obu miejscach z wytworzeniem podjednostki A i podjednostki B [4, 5, 6]; może też zachodzić tylko w I miejscu z wytworzeniem podjednostki A i „dużej” podjednostki B [5, 7, 8]. Być może istnieją więcej niż dwa miejsca proteolizy czego odbiciem jest obserwowane zróżnicowanie ciężaru cząsteczkowego podjednostki B [7, 8]. W transfekowanych receptorom komórkach CHO i komórkach leukemicznej linii K562 wykazano dodatkowo możliwość cięcia tylko w II miejscu z wytworzeniem „dużej” podjednostki A [5, 9]. Wolnego peptydu C wyciętego w wyniku proteolizy nie udało się odnaleźć ani w pożywce ani na błonie hodowanych tyrocytów ludzkich [4] ani też w hodowli transfekowanych mysich komórek L lub komórek CHO [10, 7]. Schemat budowy receptora TSH przedstawia rysunek 1.

**Rysunek 1.** Budowa monomerycznej cząsteczki receptora TSH w nieaktywnej, „zamkniętej” konformacji (wg 25, zmieniony). Oddziaływania elektrostatyczne utrzymujące receptor w formie zamkniętej zaznaczono drobnymi kropkami. Podano też położenie reszt cysteinowych i numerację niektórych z tych reszt. Cienka linia na elipsie pokazuje miejsca cięcia receptora przez metaloproteazę.

**Figure 1.** The monomeric TSH receptor in the inactive, „closed” conformation (25 with modifications). The area of electrostatic interactions are marked by points. Places of metalloprotease action are marked by the fine lines.



Metodą ELISA, stosując przeciwciała przeciwko podjednostce B i peptydowi C wykazano, że w tarczycy ludzkiej około 75% cząsteczek receptora ulega proteolizie i występuje w formie dimerycznej [7]. W różnych wytwarzających receptor TSH transfekowanych komórkach stopień proteolizy receptora jest znacznie mniejszy [10, 11]. Obie formy receptora, monomeryczna i dimeryczna stymulowane są przez TSH [12]. Obserwacja Ciullo i wsp. [13] wskazująca na aktywność receptora wyłącznie w formie dimerycznej być może wynika ze słabej prezentacji monomerycznego receptora na powierzchni błon [14].

Różne są opinie odnośnie regulacji przez TSH procesu proteolizy receptora. Formę dimeryczną wykrywano w hodowli komórek transfekowanych, które nigdy nie miały styczności z receptorem co wyklucza udział TSH w stymulacji rozpadu receptora [11, 15]. Metodą cytometryczną również nie stwierdzono wpływu TSH na proces proteolizy [16]. Przeciwnie wyniki uzyskali Ando i wsp., którzy wykazali, że w komórkach CHO aktywacja receptora przez TSH w przeciwieństwie do aktywacji przez stymulujące przeciwciała monoklonalne zwiększa proteolizę receptora [17]. Ta ciekawa obserwacja może przyczynić się do poznania różnic w aktywacji receptora przez TSH i autoprzeciwciała.

Receptor TSH występujący na błonach tyrocytów w formie dimerycznej może ulegać dalszej modyfikacji. Pod wpływem błonowej, białkowej izomerazy dwusiarczków może dojść do redukcji mostków dwusiarczkowych utrzymujących strukturę receptora i do uwolnienia podjednostki A. W błonach komórek tarczycy podjednostka B receptora występuje w ponad dwukrotnym nadmiarze w stosunku do podjednostki A [4]. W warunkach fizjologicznych dalsze losy uwolnionej z błon komórek tarczycy podjednostki A nie są znane. Na obecność receptora w formie rozpuszczalnej w tarczycy ludzkiej wskazywały co prawda prace z lat 80-tych [18], jednakże wyniki te nie zostały potwierdzone [4]. Również w surowicy krwi obwodowej nie stwierdzono obecności rozpuszczalnej formy receptora [19]. In vitro wolną podjednostkę A wykrywano w pożywkach w których hodowano tyrocyty, transfekowane komórki L, komórki nerki małpy lub komórki CHO i stwierdzano, że podjednostka ta wiąże TSH [20]. Prawdopodobnie jednak wiązanie to nie jest maksymalne, wykazano bowiem, że w silnym wiązaniu TSH biorą udział nie tylko określone rejony w podjednostce A lecz także określone rejony w podjednostce B. I tak delecja lub mutacje w rejonie podjednostki B (aminokwasy 387-395) znacznie obniżają wiązanie TSH w transfekowanych komórkach COS-7 [21] a przeciwciała przeciwko resztom 381-384 hamują wiązanie TSH [22]. Wykazano też, że do uzyskania wiązania o

wysokim powinowactwie konieczna jest obecność sulfonowanej reszty tyrozynowej na C końcu podjednostki B [23]. Zaproponowana ostatnio przez Jeffreysa i wsp. [24] „kieszka” wiążąca TSH w cząsteczce receptora obejmuje sekwencje na podjednostce A (277-296 i 246-260) oraz na C-końcu podjednostki B (381-385). Tak więc receptor w formie dimerycznej aktywnie wiąże TSH, a uwolniona podjednostka A najprawdopodobniej nie pełni żadnej funkcji regulatorowej.

Z cięciem receptora TSH, a w szczególności z uwalnianiem podjednostki A może mieć związek patogeneza autoimmunizacyjnych chorób tarczycy. Sugeruje to przede wszystkim zbieżność zachowań; receptor TSH jest jedynym receptorem z grupy receptorów hormonów glikoproteinowych podatnym na proteolizę a jednocześnie jedynym receptorem o charakterze immunogennym, przeciwko któremu powstają przeciwciała prowadzące do choroby autoimmunizacyjnej. Znaczna część epitopów dla autoprzeciwciał stymulujących tarczycę zlokalizowana jest na podjednostce A. Przeciwciała preferencyjnie rozpoznają wolną, a nie związaną z częścią transbłonową podjednostkę A [25]. Na modelu zwierzęcym choroby Gravesa-Basedowa Chen i wsp. [26] wykazali, że zwierzęta chorują częściej, jeżeli immunizowane są adenowirusem powodującym wytwarzanie wolnej podjednostki A receptora niż adenowirusem kodującym cały receptor w formie monomerycznej. Uwolniona podjednostka może więc indukować lub zwiększać odpowiedź odpornościową.

W najnowszej pracy przeglądowej [14] Vassard i Costegliola wysuwają hipotezę, że pozatarczycowe manifestacje choroby Gravesa Basedowa mogą wynikać z przeniesienia reakcji autoimmunologicznej do innych narządów przez uwolnioną podjednostkę A.

Intrygująca jest aktywność peptydu C w odpowiedzi autoimmunizacyjnej chorych. Stwierdzono, że w obrębie tego peptydu nie ma reszt uczestniczących w wiązaniu TSH, jak również w stymulacji komórki przez TSH [21, 27, 28]. Delecja tego peptydu nie zmniejsza aktywności autoprzeciwciał stymulujących [21, 28]. Jednocześnie peptyd C obejmuje rejon „peptydu immunogenego” odpowiadającego aminokwasom 352-367, który rozpoznają autoprzeciwciała od ponad 80% chorych na chorobę Gravesa-Basedowa [21, 29]. Autoprzeciwciała chorych rozpoznają też inne peptydy występujące w obrębie peptydu C [30]. Syntetyczny peptyd odpowiadający sekwencjom w peptydzie C hamuje wiązanie autoprzeciwciał [31]. Immunizując kurczęta lub króliki otrzymano przeciwciała skierowane przeciwko takim peptydom i stwierdzono, że neutralizują one wiązanie TSH [32] lub wiązanie autoprzeciwciał [30, 33, 34], wykazują więc aktywność blokującą.

Podstawowe pytania, które się nasuwają w związku z powyższymi obserwacjami dotyczą dwóch problemów; pierwszym jest aktywności immunogenna peptydu C. Jeżeli w błonach tarczycy większość cząsteczek receptora ulega szybkiej proteolizie z uwalnianiem całego peptydu C lub jego fragmentów, to wydaje się prawdopodobne, że właśnie uwolniony peptyd C jest immunogenem. Niemożliwość wykrycia we krwi całego uwolnionego peptydu C czy też całej podjednostki A może sugerować, że są one w całości lub też po dalszej proteolizie wychwytywane natychmiast przez komórki immunokompetentne filtrujące gruczoł tarczowy i uruchamiana jest odpowiedź obronna organizmu. Być może szczególna wrażliwość receptora na proteolizę powoduje, że może on stać się autoantygenem. Byłoby to zgodne z jedną z koncepcji próbującej wytłumaczyć dlaczego określone cząsteczki białkowe stanowiące zaledwie około 1 procent wszystkich białek ludzkich mogą być obiektem autoagresji. Dla szeregu autoantygenów zaobserwowano, że właśnie ich podatność na proteolizę przez granzyme B i podatność na inne modyfikacje są cechą odróżniającą je od innych białek [35].

Drugie pytanie dotyczy funkcji autoprzeciwciał rozpoznających peptyd C. Jeżeli reszty aminokwasów wchodzących w skład peptydu nie biorą udziału w wiązaniu TSH a jednocześnie przeciwciała wiążące ten peptyd blokują wiązanie, to należy przypuszczać, że obecność peptydu C przyczynia się do utrzymania takiej konformacji receptora, jaka jest aktywna podczas reakcji z TSH.

Następną cechą odróżniającą stymulację komórek z udziałem receptora TSH od stymulacji przez pokrewne receptory LH/hCG i FSH jest znaczna aktywność konstytutywna błonowej cyklazy adenylanowej współdziałającej z tym receptorem. Aktywność ta jest aktywnością podstawową, obserwowaną w nieobecności odpowiedniego, stymulującego, hormonu. Znaczny wzrost aktywności konstytutywniej cyklazy adenylanowej prowadzi do nadczynności tarczycy niekontrolowanej przez oś podwzgórzowo-przysadkową. U chorych z nadczynnymi guzkami autonomicznymi i z wrodzoną nieautoimmunizacyjną nadczynnością tarczycy opisano szereg spontanicznych mutacji prowadzących do zwiększenia aktywności konstytutywniej. Duża ilość miejsc (ponad 20) tych mutacji zarejestrowanych w receptorach tarczyc od kolejnych chorych i ich różnorodne rozmieszczenie (głównie w siódmym fragmencie transbłonowym receptora), sugerują, że konstytutywnie aktywowany receptor może przyjmować różne aktywne konformacje [36, 37]. Badano, czy fizjologiczne, zachodzące na błonach tyrocytów, posttranslacyjne modyfikacje receptora TSH zmieniają aktywność konstytutywną cyklazy adenylanowej. W tym celu w układach modelowych porównywano aktywność

receptora dimerycznego z aktywnością receptora monomerycznego uzyskanego przez wprowadzenie do komórek wektora kodującego receptor nie podlegający proteolizie. Uzyskiwano to stosując chimeryczny receptor w którym niektóre sekwencje receptora TSH zastąpiono sekwencjami występującymi w receptorze LH/hCG [12], wprowadzając punktowe delecje lub mutacje w miejscach wycinania peptydu C (38) lub modyfikując receptor w inny sposób (39). Stwierdzono, że sam proces proteolizy nie zmienia aktywności konstytutywniej. Natomiast uwolnienie podjednostki A w transfekowanych komórkach CHO prowadzi do wzrostu tej aktywności [41]. Wykazano następnie, że funkcję regulatorową pełni tu koniec karboksylowy podjednostki A w obrębie aminokwasów 281-293. Uwolnienie reszt 287-293 przez łagodne traktowanie trypsyną zwiększa aktywność konstytutywną [41]. Zwiększoną aktywność konstytutywną wykazywały też mutanty z punktowymi zmianami aminokwasów 281, 283 i 284 [42], mutant z delecją aminokwasów 337-367 a więc delecją w obrębie peptydu C [27] oraz transfekowane komórki COS-7 prezentujące zarówno „dużą” podjednostkę B jak i typową podjednostkę B receptora [38]. Tej ostatniej obserwacji nie potwierdzono badając komórki CHO z wbudowaną do błon podjednostką B [13]. Tak więc zgodne są opinie dotyczące roli podjednostki A w wyciszaniu aktywności konstytutywniej cyklazy adenylanowej natomiast udział reszt karboksylowego końca ektodomeny w tej regulacji nie jest do końca wyjaśniony.

Cząsteczka receptora TSH, całkowicie pozbawiona części pozakomórkowej (ektodomeny) jest też całkowicie pozbawiona aktywności biologicznej [13, 38].

Przytoczone obserwacje dotyczące wpływu spontanicznych i zaplanowanych punktowych mutacji, delecji i podstawień na aktywację komórki przez receptor TSH pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu jego działania.

Zgodnie z obecnie przyjętym modelem w komórkach tarczycy receptor TSH występuje w stanie równowagi pomiędzy konformacją nieaktywną, „zamkniętą” i aktywną, zdolną do oddziaływania z białkiem Gs i cyklazą adenylanową konformację „otwartą” przy czym równowaga przesunięta jest w stronę konformacji nieaktywnej. W utrzymaniu formy nieaktywnej uczestniczą siły elektrostatyczne wiążące aminokwasy błonowej części podjednostki B i karboksylowego końca podjednostki A receptora w obrębie reszt 281-293, a być może też części błonowej i N-końca tej samej podjednostki B. Receptor może przyjmować różne konformacje powodujące wzrost aktywności konstytutywniej cyklazy, a równowaga pomiędzy aktywną i nieaktywną konformacją przechodzi przez szereg form pośrednich. TSH preferencyjnie wiąże się z receptorem „otwartym” i stabilizuje formę

aktywną receptora [36]. Zgodnie z powyższym modelem działanie przeciwciał stymulujących polega, podobnie jak działanie TSH, na stabilizacji formy „otwartej”, zaś działanie przeciwciał blokujących na utrzymaniu sił elektrostatycznych pomiędzy podjednostkami A i B a być może też peptydem C i stabilizacji formy „zamkniętej” receptora. Powyższy model określa jako rzeczywistego agonistę dla części błonowej receptora TSH nie tyle cząsteczkę hormonu co ektodomę receptora w aktywnej, „otwartej”, konformacji [43].

Proces aktywacji komórki z udziałem receptorów błonowych kończy ich endocytoza nazwana internalizacją. W przypadku receptora TSH internalizacji ulega 30% cząsteczek receptora [44]. Quelleri i wsp [38] z użyciem transfekowanych komórek COS-7 wykazali, że proteoliza receptora i uwolnienie podjednostki A zwiększa internalizację pozostałej podjednostki B.

W oparciu o przytoczone dane wydaje się, że podatność cząsteczki receptora TSH na proteolizę i dalsze modyfikacje nie jest korzystna dla organizmu gdyż zwiększa prawdopodobieństwo rozwinięcia się choroby autoimmunizacyjnej, a być może przyczynia się do nadmiernej, niekontrolowanej, stymulacji tarczycy. Aby zbadać, czy tak jest w rzeczywistości Vassart i Costagliola proponują wprowadzenie u myszy zmian genetycznych umożliwiających syntezę wyłącznie niewrażliwych na proteolizę cząsteczek receptora TSH a więc receptora w formie monomerycznej a następnie dokładne prześledzenie zachowań i stanu zdrowia tych myszy [14].

## Piśmiennictwo

- Vassart G, Pardo L, Costagliola S.A Molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem Sci* 2004;29:119-125
- Couet J, deBernard S, Loosfelt H, Saunier B, Milgrom E, Misrahi M. Cell surface protein disulfide isomerase is involved in the shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. *Biochemistry* 1996;35:14800-14805
- Tanaka K, Chazenbalk GD, Rapoport B, McLachlan SM. Reassessment of the location of the thyrotropin receptor 50 amino acid insertion provides evidence in favor of a second downstream cleavage site. *Thyroid* 2001;11:111-114
- Loosfelt H, Pichon C, Jolivet A, Misrahi M, Caillou B, Jamous M, Vannier B, Milgrom E. Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3765-3769
- Oda Y, Sanders J, Evans M, Kiddie A, Munkley A, James C, Richards T, Wills J, Furmaniak J, Rees Smith B. Epitope analysis of the human thyrotropin (TSH) receptor using monoclonal antibodies. *Thyroid* 2000;10:1051-1059
- Chazenbalk GD, Tanaka K, Nagayama Y, Kakinuma A, Jaume JC, McLachlan S, Rapoport B. Evidence that thyrotropin receptor ectodomain contains not one but two cleavage sites. *Endocrinology* 1997;138:2893-2899
- Debernard S, Misrahi M, Huet JC, Beau I, Desroches A, Loosfelt H, Pichon C, Pernollet JC, Milgrom E. Sequential cleavage and excision of a segment of the thyrotropin receptor ectodomain. *J Biol Chem* 1999;274:101-107
- Graves P, Protsker A, Davies TF. Posttranslational processing of the natural human thyrotropin receptor: demonstration of more than two cleavage sites. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2177-2181
- Siffroi-Fernandez S, Costagliola S, Paumel S, Giraud A, Banga JP, Franc JL. Role of complex asparagina-linked oligosaccharides in the expression of a functional thyrotropin receptor. *Biochem J* 2001;354:331-336
- Tanaka K, Chazenbalk GD, McLachlan S, Rapoport B. Subunit structure of thyrotropin receptor expressed on the cell surface. *J Biol Chem* 1999;274:33979-33984
- Russo D, Chazenbalk GD, Nagayama Y, Watsworth HL, Seto P, Rapoport B A. New structural model of the thyrotropin receptor as determined by covalent cross-linking of TSH to the recombinant receptor in intact cells: evidence for a single polypeptide chain. *Molecular Endocrinol* 1991;5:1607-1612
- Chazenbalk GD, McLachlan S, Nagayama Y, Rapoport B. Is receptor cleavage into two subunits necessary for thyrotropin action? *Biochim Biophys Res Commun* 1996;225:479-484
- Ciullo I, Latif R, Graves P, Davies TF. Functional assessment of the thyrotropin receptor beta subunit. *Endocrinology* 2003;144:3176-3181
- Vassart G, Costagliola S.A. A physiological role for the posttranslational cleavage of the thyrotropin receptor? *Endocrinology* 2004;145:1-3
- Misrahi M, Ghinea N, Sar S, Saunier B, Jolivet A, Loosfelt H, Cerutti M, Devauchelle G, Milgrom E. Processing of the human thyroid stimulating hormone receptor in various eucariotic cells. *European J Biochem* 1994;222:711-719
- Chazenbalk GD, Chen CR, McLachlan S, Rapoport B. Does thyrotropin cleavage its cognate receptor? *Endocrinology* 2004;145:4-10
- Ando T, Latif R, Moran T, Nagayama Y, Davies TF. A monoclonal thyroid stimulating antibody. *J Clin Invest* 2002;110:1667-1674
- Buckland PR, Howells RD, Rickards CR, Rees Smith B. Affinity labeling of the thyrotropin receptor. *Biochem J* 1985;225:753-760
- Piotrowska U, Adler G, Gardas A, Gietka-Czernel M, Kaniewski M, Banga JP. Cross-reactivity of a monoclonal antibody to the amino terminal region of thyrotropin receptor with the serum protein alpha1- antitrypsin. *Thyroid* 2002;12:559-566
- Couet J, Sar S, Jolivet A, Vu Hai MT, Milgrom E, Misrahi M. Shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. *J Biol Chem* 1996;271:4545-4552
- Kosugi S, Akamizu T, Takai O, Prabhakar BS, Kohn LD. The extracellular domain of the TSH receptor has an immunogenic epitope reactive with Graves' IgG but unrelated to receptor function as well as determinants having different roles for high affinity TSH binding and the activity of thyroid stimulating autoantibodies. *Thyroid* 1991;1:321-330
- Shepherd PS, Dacosta CR, Cridland JC, Gilmore KS, Johnstone AP. Identification of an important thyrotropin binding site on the human thyrotropin receptor using monoclonal antibodies. *Mol Cellulr Endocrinol* 1999;149:197-206
- Costagliola S, Panneels V, Bonomi M, Koch J, Many MC, Vassart G. Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glucoprotein hormone receptors *EMBO J* 2002;21:504-513
- Jeffreys J, Depraetere H, Sanders J, Oda Y, Evans M, Kiddie A, Richards T, Furmaniak J, Rees Smith B. Characterization of the thyrotropin binding pocket. *Thyroid* 2002;12:1051-1061
- Chazenbalk GD, Pichurin P, Chen CR, Latrofa F, Johnstone AP, McLachlan SM, Rapoport B. Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor. *J Clin Invest* 2002;110:209-217
- Chen CR, Pichurin P, Nagayama Y, Latrofa F, Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim. *J Clin Invest* 2003;111:1897-1904
- Zhang ML, Sugawa H, Kosugi S, Mori T. Constitutive activation of the thyrotropin receptor by deletion of a portion

- of the extracellular domain. *Biochim Biophys Res Commun* 1995;211:205-210
28. Kosugi S, Akamizu T, Takai O, Praphakar BS, Kohn LD. The extracellular domain of the thyrotropin receptor has an immunogenic epitope reactive with Graves' IgG but unrelated to receptor function as well as determinants having different roles for high affinity TSH binding and the activity of thyroid stimulating autoantibodies. *Thyroid* 1991;1:321-30
  29. Nagy EV, Burch HB, Mahoney K, Lukes Y, Morris JC, Burman KD. Graves' IgG recognizes linear epitopes in the human thyrotropin receptor. *Biochim Biophys Res Commun* 1992;188:28-33
  30. Ueda Y, Sugawa H, Akamizu T, Okuda J, Ueda M, Kosugi S, Ohta C, Kihou Y, Mori T. Thyroid stimulating antibodies in sera from patients with Graves' disease are heterogenous in epitope recognition. *Eur J Endocrinol* 1995;132:62-68
  31. Sugawa H, Akamizu T, Kosugi S, Ueda Y, Ohta C, Okuda J, Mori T. Presence of heterogenous thyroid stimulating antibodies in sera from individual Graves' patients as shown by synthesized thyrotropin receptor peptide application. *Eur J Endocrinol* 1995;133:283-293
  32. Vlasse H, Nakashima M, Graves PN, Tomer Y, Morris JC, Davies TF. Defining the major antibody epitopes on the human thyrotropin receptor in immunized mice: evidence for intramolecular epitope spreading. *Endocrinology* 1995;136:4415-4423
  33. Ohmori M, Endo T, Onaya T. Development of chicken antibodies toward the human thyrotropin receptor peptides and their bioactivities. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:399-403
  34. Desai RK, Dallas JS, Gupta MK, Seetharamaiah GS, Fan JL, Tahara K, Kohn LD, Prabhakar BS. Dual mechanism of perturbation of thyrotropin mediated activation of thyroid cells by antibodies to the thyrotropin receptor and TSHR-derived peptides. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:658-663
  35. Plotz PH. The autoantibody repertoire: searching for order. *Nature Rev Immunol* 2003;3:73-78
  36. Szkudliński MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD. Thyroid stimulating hormone and thyroid stimulating hormone receptor structure-function relationship. *Physiol Rev* 2002;82:473-502
  37. Duprez L, Parma J, Costagliola S, Hermans J, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Constitutive activation of the TSH receptor by spontaneous mutations affecting the N-terminal extracellular domain. *FEBS Lett* 1997;409:469-474
  38. Quellari M, Desroches A, Beau I, Beaudaux E, Misrahi M. Role of cleavage and shedding in human thyrotropin receptor function and trafficking. *Eur J Biochem* 2003;270: 3486-3497
  39. Chazenbalk GD, Tanaka K, McLachlan S, Rapoport B. On the functional importance of thyrotropin receptor intramolecular cleavage. *Endocrinology* 1999;140:4516-4520
  40. Chen CR, Chazenbalk GD, McLachlan S, Rapoport B. Targeted restoration of cleavage in a noncleaving thyrotropin receptor demonstrates that cleavage is insufficient to enhance ligand independent activity. *Endocrinology* 2003;144:1324-1330
  41. Chen CR, Chazenbalk GD, McLachlan S, Rapoport B. Evidence that the C-terminus of the A subunit suppress thyrotropin receptor constitutive activity. *Endocrinology* 2003;144:3821-3827
  42. Ho SC, Van Sande J, Lefort A, Vassart G, Costagliola S. Effects of mutations involving the highly conserved S281HCC motif in the extracellular domain of the thyrotropin (TSH) receptor on TSH binding and constitutive activity. *Endocrinology* 2001;142:2760-2767
  43. Vlaeminck-Guillem V, Ho SC, Rodien P, Vassart G, Costagliola S. Activation of the cAMP pathway by the TSH receptor involves switching of the ectodomain from tethered inverse agonist to an agonist. *Molecular Endocrinol* 2002;16: 736-746
  44. Baratti-Elbaz C, Ghinea N, Lahuna O, Loosfelt H, Pihon C, Milgrom E. Internalization and recycling pathway of the thyrotropin receptor. *Molecular Endocrinol* 1999;13:1751-1765