

CENTRO: CENTRO INTERUNIVERSITARIO DI GENOMICA IN ENDOCRINOLOGIA
PEDIATRICA (CIGEP)

PRESIDENTE PROF. GIANNI BONA

ATTIVITÀ SVOLTA NELL' ANNO 2008

Obiettivi della ricerca

Analisi molecolare dei geni SOCS2 e GH-R in pazienti con Bassa Statura Idiopatica

Risultati ottenuti

I soggetti con bassa statura (BS) idiopatica possono mostrare un certo grado di insensibilità al GH dovuto sia a difetti a carico del recettore del GH (GH-R) sia ad alterazioni nella trasduzione del segnale di tale recettore. Recentemente è stato identificato un meccanismo di attenuazione del segnale del GH che coinvolge membri di una famiglia di proteine denominate “soppressori del segnale delle citochine” (SOCS).

Inizialmente lo scopo di questo lavoro è stato quello di ricercare mutazioni del gene *SOCS2*, mediante DHPLC e sequenziamento diretto, in un gruppo di 102 soggetti (56M/46F) con bassa statura, 87 prepuberi e 15 puberi, che mostravano un range di altezza: 3°-10° percentile, range di velocità di crescita: 25°-75° centile, ed età mediana pari a 10,4 anni (range: 3,1-14,3). In tutti i soggetti, sia la secrezione di GH sia di IGF-I risultavano nella norma.

Si è riscontrata la presenza di due SNPs già noti dalla letteratura: rs2200160 C→T ed rs1498708 C→T, in condizione sia di eterozigosi che di omozigosi, nel primo esone non codificante del gene. Inoltre, un nuovo SNP C→G in condizione di eterozigosi, in posizione -172 dal primo codone tradotto, è stato riscontrato in 3 soggetti. Le frequenze alleliche di tali SNPs sono risultate del tutto sovrapponibili a quelle trovate in un gruppo di 80 soggetti di controllo di statura normale e paragonabili per età, sesso e stadio puberale, essendo la frequenza di T per lo SNP rs2200160 pari a 0,13 e 0,15 e per lo SNP rs1498708 pari a 0,27 e 0,22, rispettivamente nelle BS e nei controlli. Anche la frequenza di G in -172 da ATG è sovrapponibile tra BS e controlli, essendo rispettivamente pari a 0,015 e 0,01. In conclusione, le variazioni riscontrate non mostrano un'associazione significativa con la condizione di bassa statura; *SOCS2*, quindi, non sembra essere coinvolto nella patogenesi della BSI.

Successivamente, abbiamo eseguito l'analisi molecolare del gene *GH-R* in un gruppo di 45 soggetti con BSI (24M/21F), che presentavano livelli di IGF1 inferiori ai limiti di norma per l'età e con scarsa risposta alla terapia con GH.

In sintesi è stato possibile riscontrare la presenza di 5 polimorfismi (SNPs) già descritti, rs6179 (A/G) nell'esone 6; rs6176 (C/T), rs6180 (A/C) e rs6182 (G/T) nell'esone 10, tutti in condizioni sia di eterozigosi che di omozigosi; in cinque soggetti è stata trovata la delezione dell'esone 3. Le frequenze alleliche di questi SNPs risultano sovrapponibili a quelle trovate nel gruppo di controllo. Inoltre in 30 soggetti è stata identificata una nuova delezione di una G nell'IVS7 del gene, in posizione -58 dall'ATG dell'esone 8, sia in eterozigosi che in omozigosi, con una frequenza per l'allele G di 0,53 e 0,58 rispettivamente nei pazienti e nei controlli.

In quattro soggetti è stata trovata la mutazione R179C in condizioni di eterozigosi, in posizione 535 nella regione codificante dell'esone 6. Questa singola mutazione non-sinonima determina una

sostituzione aminoacidica Arg→Cys (CGC>TGC) in posizione 179 della proteina, a livello del dominio extracellulare del recettore; tale mutazione non è stata trovata nel gruppo di controllo. L'aggiunta di una cisteina potrebbe determinare un cambiamento della struttura tridimensionale del recettore con conseguenze fenotipiche. Per verificare gli effetti di tale mutazione sulla struttura e sulla funzione del GH-R, e stabilirne la potenziale associazione alla BSI, sono in corso studi funzionali *in vitro*.

Obiettivi della ricerca:

Caratterizzazione clinica e genotipica di pazienti affetti da ipopituitarismo isolato o multiplo e ricerca delle correlazioni tra genotipo e fenotipo

Risultati ottenuti

Il presente studio è finalizzato all'identificazione delle basi molecolari dei difetti ipofisari su un'ampia casistica di soggetti con IGHD e CPHD, familiari e sporadici, non organici.

Tra i geni coinvolti nei difetti ipofisari e deputati all'organogenesi dell'adenoipofisi ed alle strutture della linea mediana (PIT1, PROP1, LHX4, LHX3 ed HESX1), oltre allo studio di HESX1 ed LHX4 già riportato precedentemente, è stato analizzato il gene LHX3.

Sino ad oggi la letteratura riporta complessivamente 13 mutazioni a carico del gene HESX1, sia a carattere dominante sia recessivo, 7 mutazioni in LHX3 a carattere recessivo e 5 mutazioni in LHX4 a carattere dominante.

La casistica considerata per l'analisi molecolare, eseguita tramite sequenziamento diretto e DHPLC, era costituita da 198 soggetti IGHD (125M/73F) e 114 soggetti CPHD (68M/46F), di cui l'80% era di tipo sporadico ed il 20% era di tipo familiare.

Per il gene HESX1, analizzato sia nei CPHD sia negli IGHD, tra le variazioni già riportate (Gln6His, Ala46Val e Val129Ile) ed i polimorfismi noti (Asn125Ser e His61His), è stato condotto uno studio funzionale sulla sostituzione nucleotidica c357 +3G>A in IVS2 in condizione di eterozigosi, trovata in un bambino affetto da IGHD e senza alterazioni ipofisarie. Lo studio *in vitro* per verificare i meccanismi di splicing del gene, ha messo in luce la presenza di due trascritti alternativi oltre a quello che porta alla produzione della proteina corretta costituita da 185 aminoacidi. La variazione c357 +3G>A in IVS2, invece, renderebbe il sito donatore GT più protetto per il corretto splicing e non permetterebbe la formazione di uno dei due trascritti alternativi.

Per il gene LHX4, analizzato nei CPHD, restano invariati i dati precedenti, in cui sono state riscontrate 2 variazioni sinonime: Gly21Gly nell'esone 1 e Asp128Asp nell'esone 3, ed il polimorfismo noto Asp328Ser nell'esone 6 (rs7536561).

Per il gene LHX3 sono stati analizzati 98 (...M/...F) soggetti affetti da CPHD. Fino ad ora non sono state trovate mutazioni causali, ma solo polimorfismi già noti da GenBank, nell'esone 1b (Ala27Ala - rs2274116) e nell'IVS1 (C>T in +19 - rs2275115) oppure variazioni non ancora riportate, quali la mutazione sinonima Pro273Pro in 1 paziente e la sostituzione aminoacidica Arg315Pro in 2 pazienti, la cui frequenza allelica (allele con la variazione: 1%) è del tutto sovrapponibile a quella trovata in un gruppo di controlli sani (0,5%).

Saranno necessari ulteriori studi di tipo funzionale per stabilire se le variazioni che provocano una sostituzione aminoacidica abbiano un effetto negativo sulla funzionalità proteica, e quindi siano causali della malattia.

Obiettivi della ricerca:

Analisi molecolare e studio di funzione del gene del recettore del TSH (TSH-R) in soggetti con ipotiroidismo subclinico

Risultati ottenuti

L'ipotiroidismo subclinico è una condizione in cui si riscontra un innalzamento dei livelli sierici di TSH associato a livelli di ormoni tiroidei nella norma. Nel bambino l'ipotiroidismo subclinico è condizione rara, la sua prevalenza non è nota ed eziologia e strategie terapeutiche sono in parte

diverse rispetto all'adulto; i soggetti affetti presentano tiroide in sede, di dimensioni normali, con caratteristiche ecografiche nella norma, in assenza di segni ecografici e biomorali di autoimmunità tiroidea.

Negli ultimi anni sono state identificate nell'uomo numerose mutazioni puntiformi localizzate nelle regioni codificanti del gene del recettore dell'ormone tireotropo o TSH (TSH-R) risultate responsabili di vari difetti strutturali nella proteina da esso prodotta. Inoltre sono stati identificati un elevato numero di polimorfismi di un singolo nucleotide (single nucleotide polymorphism SNP) e microsattelliti. In particolare mutazioni germinali causanti perdita di funzione nel gene del TSH-R sono state spesso riconosciute come causa genetica dell'ipotiroidismo subclinico.

Il TSH è prodotto dall'ipofisi anteriore e il suo ruolo è sostanzialmente quello di regolare la proliferazione delle cellule della tiroide e mantenere nei livelli fisiologici la produzione degli ormoni tiroidei. Il recettore è localizzato sulla membrana basolaterale delle cellule follicolari della tiroide, appartiene alla superfamiglia di recettori accoppiati a proteine G e presenta la classica struttura a sette domini transmembrana.

Il gene per il TSH-R è localizzato sul cromosoma 14q31, è composto da 10 esoni e codifica per una proteina di 764 aa; è caratterizzato da un segmento aminoterminale glicosilato responsabile del legame ad alta affinità con l'ormone (esoni 1-9), mentre l'esone 10 codifica per i sette domini transmembrana e la coda citoplasmatica.

Nel nostro studio sono stati reclutati 88 pazienti (M/F:45/43, range: 1-18 anni, età media 8.2) affetti da ipotiroidismo subclinico; tutti i soggetti mostravano in almeno due misurazioni valori di TSH superiori alla norma e valori normali di ormoni tiroidei. I soggetti presentavano inoltre tiroide in sede, di dimensioni normali, con caratteristiche ecografiche nella norma. Sono stati esclusi tutti i pazienti positivi per la presenza di anticorpi diretti contro epitopi tiroidei oppure affetti da patologie correlabili alla tiroide.

Per l'analisi molecolare il campione era costituito da DNA genomico estratto da sangue periferico. I dieci esoni del gene del TSH-R sono stati amplificati, visualizzati su gel di agarosio e successivamente sottoposti ad analisi dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography). Ogni frammento è stato introdotto in colonna a due diverse temperature sia come singolo campione sia miscelato con un riferimento per evidenziare eventuali variazioni nel profilo di eluizione rispetto ad un frammento wild-type precedentemente sequenziato; I campioni che sono risultati positivi al pre-screening dHPLC sono stati sottoposti al sequenziamento automatico.

Nel nostro gruppo di pazienti sono state identificate 19 variazioni note: 3 mutazioni sinonime (**P119P**, **G245G** e **A459A**), 6 mutazioni missenso (**C41S**, **R109Q**, **P162A**, **D403N**, **W488R** e **M527T**), 1 inserzione (**123-124insTGCA**), 1 delezione (**555-561delTATTCTT**) e 8 polimorfismi (**P27T**, **P52T**, **IVS1+63**, **IVS1-80**, **IVS6+13**, **N187N**, **[CT]_n microsatellite** e **D727E**). Tutte le variazioni sono state individuate in condizione di eterozigosi.

E' stata inoltre identificata una nuova mutazione (TGG → TAG) in posizione 1559 nell'esone 10. Essa è localizzata nel terzo dominio transmembrana del recettore e causa la sostituzione dell'aminoacido triptofano con un codone di stop (**W520X**); sia la paziente che la madre sono eterozigote per la mutazione mentre il padre è omozigote per l'allele wild-type. La mutazione causa una prematura interruzione nella sintesi dell'mRNA del TSH-R e il suo effetto sarà pertanto oggetto di successivi studi funzionali.

Novara, 4 marzo 2009

IL PRESIDENTE DEL CENTRO
PROF. GIANNI BONA
F.to Prof. Gianni Bona