



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

PRESIDENTE PROF. GIANNI BONA

ATTIVITÀ SVOLTA NELL' ANNO 2009

Obiettivi della ricerca: Analisi molecolare del gene GH-R in soggetti con bassa statura idiopatica e parziale insensibilità al GH

Risultati ottenuti

I soggetti con bassa statura idiopatica (BSI) 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.

E' stata eseguita l'analisi molecolare del gene GH-R in un gruppo di 45 soggetti (24M/21F) con bassa statura idiopatica che presentavano livelli di IGF1 inferiori ai limiti di norma per l'età e con scarsa risposta alla terapia con GH.

Nei nostri pazienti abbiamo riscontrato la presenza di 5 polimorfismi (SNPs) già descritti in letteratura: il primo è localizzato nell'esone 6 (rs6179 A/G), gli altri tre sono localizzati nell'esone 10 del gene, rs6176 (C/T), rs6180 (A/C) e rs6182 (G/T) e in cinque soggetti è stata inoltre trovata la delezione dell'esone 3. Tutti i polimorfismi sono stati trovati sia in condizioni di eterozigosi che di omozigosi. Le frequenze alleliche dei polimorfismi trovati risultano sovrapponibili a quelle trovate nel gruppo di controllo.

In 30 soggetti è stata identificata una nuova delezione nell'introne 7 del gene, che causa la perdita di una G in posizione -58 dall'ATG dell'esone 8; la delezione è stata trovata 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 inoltre trovata la mutazione R179C in condizioni di eterozigosi, localizzata 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. E' ipotizzabile che l'aggiunta di un residuo di cisteina nella sequenza del recettore potrebbe determinare un cambiamento della struttura tridimensionale del recettore con possibili conseguenze fenotipiche.

Per verificare gli effetti di tale mutazione sulla struttura e sulla funzione del GH-R, e stabilirne la potenziale associazione con la bassa statura idiopatica, sono in corso gli studi funzionali *in vitro*. Mediante trasfezione transiente abbiamo inserito la sequenza del GH-R, sia wild-type che mutata, in cellule CHO. Dall'analisi al microscopio confocale è risultato che il recettore, sia nella forma wild-

type che mutata, viene espresso correttamente in membrana, suggerendo che tale mutazione non altera le caratteristiche strutturali del recettore.

Successivi saggi di binding saranno utili per verificare se tale mutazione altera invece l'affinità del recettore per il ligando GH e valutare i conseguenti effetti sulla trasduzione del segnale.

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

Si definiscono come difetti ipofisari i disordini endocrini e/o neuroanatomici che coinvolgono uno o più ormoni secreti dall'adenoipofisi. In particolare si distinguono in deficit isolati di GH (IGHD) e in deficit ipofisari combinati (CPHD) che comprendono un difetto di produzione di almeno due tra gli ormoni secreti dall'ipofisi anteriore (GH, TSH, ACTH, PRL, LH e FSH) fino al deficit totale di tutti gli ormoni. Il presente studio è finalizzato all'identificazione delle basi molecolari dei difetti ipofisari su un'ampia casistica di soggetti con IGHD e CPHD sia familiari che sporadici.

E' ormai noto che una possibile causa di insorgenza di difetti ipofisari è la presenza di mutazioni nei fattori di trascrizione come PIT1, PROP1, LHX4, LHX3 ed HESX1, i quali dirigono lo sviluppo e la differenziazione della ghiandola ipofisaria.

In questo studio sono stati analizzati i geni HESX1, LHX3 e LHX4. Sino ad oggi in letteratura sono riportate 12 mutazioni a carico del gene HESX1, 9 mutazioni in LHX3 e 7 mutazioni nel gene LHX4 .

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.

Il gene HESX1 è stato analizzato sia nei soggetti CPHD che IGHD. Sono state trovate tre variazioni (Gln6His, Ala46Val e Val129Ile) e due polimorfismi (Asn125Ser e His61His), tutti già noti in letteratura. Nei 10 nuovi pazienti analizzati non è stata trovata alcuna variazione.

E' stato inoltre dimostrato il significato funzionale della sostituzione nucleotidica c357 +3G>A nell'introne 2, trovata in condizione di eterozigosi 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 trovata rende il sito donatore GT più protetto per il corretto splicing e non permette la formazione di uno dei due trascritti alternativi.

Il gene LHX4 è stato analizzato solo nei soggetti CPHD. Sono stati analizzati 29 nuovi pazienti; nella nostra intera casistica di pazienti abbiamo trovato 2 variazioni sinonime: Gly21Gly nell'esone 1 e Asp128Asp nell'esone 3; sono stati trovati tre polimorfismi noti: rs3806302 nell'introne 5, rs2764449 nell'introne 3 e rs7536561 nell'esone 6 (Asp328Ser).

Il gene LHX3 è stato analizzato solo nei soggetti CPHD. Sono stati analizzati 23 nuovi pazienti; nella nostra intera casistica non sono state trovate mutazioni causali. Sono state trovate due nuove variazioni non ancora riportate in letteratura, quali la variazione 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%). Nel gene sono stati trovati anche tre polimorfismi noti: rs2274116 nell'esone 1b (Ala27Ala), rs2274115 nell'introne 1 e rs3215774 nell'introne 5.

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 (Subclinical Hypothyroidism o SH) è una condizione in cui si riscontra un innalzamento dei livelli sierici di TSH associato a livelli di ormoni tiroidei nella norma. I soggetti affetti presentano tiroide in sede, di dimensioni normali, con caratteristiche ecografiche nella norma e assenza di autoimmunità tiroidea.

Il TSH è un ormone prodotto dall'ipofisi anteriore e il suo ruolo è sostanzialmente quello di regolare la proliferazione delle cellule della tiroide e regolare quindi la produzione degli ormoni tiroidei. Il TSH esercita la sua azione legandosi al dominio extracellulare del TSH-R, un classico recettore accoppiato a proteine G, formato da sette eliche transmembrana e presente sulla membrana basolaterale delle cellule follicolari della tiroide. In letteratura è stata ampiamente dimostrata la relazione esistente tra la presenza di mutazioni localizzate nei geni codificanti per proteine coinvolte nel signaling del TSH e del suo recettore (TSH-R) e la patogenesi di ipotiroidismo subclinico.

Nel nostro studio sono stati reclutati 99 pazienti di età compresa tra 1 e 18 anni affetti da ipotiroidismo subclinico; tutti i soggetti mostravano in almeno due diverse misurazioni valori di TSH superiori ai limiti di normalità e valori normali di ormoni tiroidei.

Per l'analisi molecolare i dieci esoni del gene del TSH-R sono stati amplificati, visualizzati su gel di agarosio e successivamente sottoposti ad analisi dHPLC e sequenziamento diretto.

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 mutazioni sono state individuate in condizione di eterozigosi.

L'analisi molecolare ha rivelato la presenza di una nuova mutazione nel gene del TSHR. In una paziente di 4 anni è stata trovata la sostituzione G→A in posizione 1559 nell'esone 10. L'aminoacido triptofano in posizione 520 viene così sostituito da un codone di stop (TGG→TAG). Tale mutazione denominata W520X è stata trovata in condizione di eterozigosi. Si è proceduto successivamente all'analisi molecolare dei genitori della paziente; la madre è risultata portatrice della stessa mutazione in condizione di eterozigosi, il padre è risultato invece omozigote per l'allele wt. La mutazione W520X è localizzata nel terzo dominio transmembrana del TSHR e coinvolge un aminoacido altamente conservato tra specie diverse; porta ad una prematura interruzione nella sintesi dell'mRNA del recettore e quindi ad una sua forma tronca priva di buona parte della porzione C-terminale.

Per verificare gli effetti di tale mutazione sulla funzionalità del TSH-R sono in corso gli studi funzionali *in vitro*. Cellule CHO sono state trasfettate con il vettore pSVL contenente la sequenza del recettore sia wild-type che mutata. Dall'analisi al microscopio confocale è risultato che solo la forma mutata in condizione di omozigosi del recettore viene espressa in quantità inferiore in membrana; il recettore mutato in eterozigosi arriva in membrana in quantità paragonabile alla forma wild-type. Probabilmente la formazione di complessi tra forme wild-type e mutate del recettore è responsabile della parziale resistenza al TSH nei pazienti eterozigoti.

Successivamente verranno analizzati gli effetti della mutazione sulla trasduzione del segnale, cioè l'effetto sulla produzione di secondi messaggeri come cAMP e inositolo fosfato.

Lavori pubblicati

1) [Subclinical hypothyroidism in children and adolescents: a wide range of clinical, biochemical, and genetic factors involved.](#)

Rapa A, Monzani A, Moia S, Vivenza D, Bellone S, Petri A, Teofoli F, Cassio A, Cesaretti G, Corrias A, de Sanctis V, Di Maio S, Volta C, Wasniewska M, Tatò L, Bona G.

J Clin Endocrinol Metab. 2009 Jul; 94(7):2414-20.

Epub 2009 May 5.PMID: 19417038 [PubMed - indexed for MEDLINE]

2) [A recurrent signal peptide mutation in the growth hormone releasing hormone receptor with defective translocation to the cell surface and isolated growth hormone deficiency.](#)

Godi M, Mellone S, Petri A, Arrigo T, Bardelli C, Corrado L, Bellone S, Prodam F, Momigliano-Richiardi P, Bona G, Giordano M.

J Clin Endocrinol Metab. 2009 Oct; 94(10):3939-47.

Epub 2009 Jul 21.PMID: 19622623 [PubMed - indexed for MEDLINE]

3) [A novel recessive splicing mutation in the POU1F1 gene causing combined pituitary hormone deficiency.](#)

Carlomagno Y, Salerno M, Vivenza D, Capalbo D, Godi M, Mellone S, Tiradani L, Corneli G, Momigliano-Richiardi P, Bona G, Giordano M.

J Endocrinol Invest. 2009 Sep; 32(8):653-8.

Epub 2009 May 12.PMID: 19498317 [PubMed - indexed for MEDLINE]

IL PRESIDENTE DEL CENTRO
PROF. GIANNI BONA

