



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

PRESIDENTE PROF. GIANNI BONA

ATTIVITÀ SVOLTA NELL' ANNO 2010

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 un disordine caratterizzato da un'elevata concentrazione sierica di TSH associata a valori di ormoni tiroidei nella norma; tra le possibili cause vi è la presenza di mutazioni del gene del recettore del TSH (TSHR). Il TSHR è un classico recettore accoppiato a proteine G, formato da sette eliche transmembrana e presente sulla membrana basolaterale delle cellule follicolari della tiroide.

I cambiamenti strutturali nel TSHR, prodotti dall'interazione con l'ormone TSH, attivano le proteine G accoppiate al recettore; le proteine G associate alla subunità α_s stimolano la via di trasduzione del segnale legata all'adenilato ciclasi, che porta alla produzione del secondo messaggero AMP ciclico (cAMP) e all'attivazione successiva della proteina chinasi A (PKA). Le proteine G contenenti la subunità $\alpha_{q/11}$ stimolano invece la via della fosfolipasi C (PLC) che porta alla conversione dell'inositolo 4,5-bifosfato (PIP₂) in inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG). Il conseguente rilascio di Ca²⁺ intracellulare attiva la proteina chinasi C (PKC). L'effetto finale è il mantenimento della crescita e della funzionalità delle cellule della tiroide.

Nel nostro studio sono stati reclutati 116 pazienti (M/F:58/58, range: 1-18 anni) affetti da ipotiroidismo subclinico; tutti i soggetti presentavano inoltre tiroide in sede e di dimensioni normali e non presentavano invece auto-anticorpi oppure patologie correlabili alla tiroide.

Per l'analisi molecolare i dieci esoni del gene del TSH-R sono stati amplificati, visualizzati su gel di agarosio e sottoposti a sequenziamento diretto. Nel nostro gruppo di pazienti sono state identificate 7 mutazioni missenso note (C41S, R109Q, P162A, D403N, D410N, W488R e M527T), una delezione (555-561delTATTCTT), una inserzione (123-124insTGCA) e tre variazioni sinonime (P119P, G245G and A459A). Sono state identificate inoltre due nuove variazioni: A/G in posizione IVS9 +3 bp e una mutazione di stop W520X. Tutte queste variazioni sono state individuate in condizione di eterozigosi.

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 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. E' stato ipotizzato che la probabile formazione di complessi tra forme wild-type e mutate del recettore sia responsabile della parziale resistenza al TSH nei pazienti eterozigoti. Inoltre si è potuta osservare una riduzione della produzione di secondi messaggeri quali cAMP e inositolo fosfato (IP) indicando che la mutazione W520X inibisce entrambe le vie di trasduzione del segnale.

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 (BS) idiopatica possono mostrare un certo grado di insensibilità al GH dovuto sia a difetti a carico del recettore del GH (GHR) sia ad alterazioni nella trasduzione del segnale di tale recettore.

Abbiamo eseguito l'analisi molecolare del gene *GHR* 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 GHR, e stabilirne la potenziale associazione alla BSI, sono in corso studi funzionali *in vitro*.

Mediante trasfezione transiente abbiamo inserito il GHR, sia wild-type che mutato, in cellule CHO. Dall'analisi al microscopio confocale risulta che il recettore del GH, sia nella forma wild-type che in quella mutata, viene espresso correttamente in membrana, suggerendo che tale mutazione non altera le caratteristiche strutturali del GHR; l'analisi con western blotting conferma questo risultato.

Successivi saggi di binding saranno utili per verificare se tale mutazione altera l'affinità del recettore per il ligando e di conseguenza la trasduzione del segnale.

Obiettivi della ricerca: Analisi proteomica degli effetti sistemici derivanti da bassi livelli di Vitamina D in bambini obesi

Risultati ottenuti

Il ruolo emergente della Vitamina D nella suscettibilità allo sviluppo di obesità, insulinoresistenza e diabete mellito di tipo 2 è supportato da dati del nostro gruppo che hanno esaminato i livelli di

vitamina D in un ampio gruppo di soggetti obesi in età pediatrica, dimostrando che la prevalenza di deficit di vitamina D supera il 50% dei casi e che i livelli di vitamina D sono associati all'incremento della insulinoresistenza ed una riduzione della insulino-sensibilità (Prodham *et al.*, unpublished data).

Non sono ad oggi note le molecole circolanti che svolgono un ruolo chiave nel legame esistente fra vitamina D e obesità, insulinoresistenza e diabete. In tal senso, lo scopo del nostro studio è stato valutare il profilo proteomico plasmatico in una popolazione obesa pediatrica prepubere e pubere, divisa secondo i livelli di vitamina D. Sulla base dei cut-off standard vigenti, sono stati definiti 3 gruppi: Gruppo 1 (G1) con livelli definiti insufficienti di vitamina D (25OHD3 <14.5 ng/ml; n=18); gruppo 2 (G2) con ipervitaminosi D (25OHD3 >30.0 ng/ml; n=24) e gruppo 3 (G3) con normale vitamina D (25OHD3 >14.5 <30 ng/ml; n=55). Lo studio proteomico è stato finora eseguito per i soggetti di G1 e G2 (n=42), usando l'elettroforesi bidimensionale (2D-electrophoresis) con strip IPG aventi un range di pH fra 3-10, separato in base all'alto peso molecolare (high molecular weight, HMW, >20kDa). Gli spot proteici sono stati analizzati mediante con software PDQuest per ogni soggetto e i risultati sono stati divisi secondo il gruppo. L'analisi su un totale di 51 spots proteici ha messo in evidenza una differenza significativa nell'espressione fra G1 e G2 (p<0.05). In particolare, il 20% di questi spot ha mostrato una forte differenza statistica (p<0.01). Delle 51 proteine, l'espressione di 19 proteine è risultata inferiore nei soggetti con insufficienza di vitamina D e l'utilizzo del database Swiss2D ha permesso di identificare fra queste C1S, isoforme della fetuina-A, apolipoproteina-A1, proteina C-reattiva, alfa-1B glicoproteina e le isoforme dell'aptoglobina β . Delle 32 proteine sovraregolate nei soggetti con insufficienza di vitamina D, sono state identificate clusterin, α -1-antitripsina, vitamin D binding protein, serum amyloid P component, transferrina and isoforme di fibrinogeno- β e $-\alpha$.

Poichè i livelli di vitamina D sono risultati strettamente correlati con l'insulinoresistenza e il diabete, si è scelto di sottoporre la fetuina-A a ulteriori studi, essendo essa una delle due proteine note per legarsi con alta affinità al recettore dell'insulina (l'altra è naturalmente l'insulina). I livelli di fetuina-A sono stati valutati su plasma deprivato di piastrine in soggetti di G1 e G2 mediante ELISA. Non sono emerse differenze significative nei livelli di fetuina-A fra pazienti con insufficienza di vitamina D (307.06 ± 28.65 ug/ml) e ipervitaminosi D (310.79 ± 19.75 ug/ml), né è stata documentata una correlazione fra livelli di vitamina D e fetuina-A.

La fetuina-A è una proteina modificata in fase post-traslazionale, potendo essere sia glicosilata che fosforilata. Esistono numerose isoforme con un range isoelettrico (pI) fra 3 e 6 e un peso molecolare fra 58 e 65 kDa, suggerendo che le differenze fra G1 e G2 possono essere associate a differenze nelle modificazioni post-traslazionali della proteina. Per valutare il pattern delle modifiche post-traslazionali di fetuina-A, abbiamo analizzato il plasma soggetti di G1 (n=8) e G2 (n=7) con 2D-elettroforesi con strip IPG aventi un range di pH fra 3-6. Abbiamo così potuto documentare due distinti patterns di espressione di fetuina-A, arbitrariamente definiti pattern A e B, con l'87% dei soggetti di G1 che esprimeva il pattern A e il 71% dei soggetti di G2 che esprimeva il pattern B. Ciò suggerisce che potrebbe esservi un'alterazione nella modificazione post-traslazionale di fetuina-A fra lo stato di insufficienza e ipervitaminosi D.

L'orientamento degli studi futuri prevede di confermare l'alterata modificazione post-traslazionale fra ipo- e ipervitaminosi D, e identificare se la glicosilazione o la fosforilazione della proteina sia responsabile dell'alterato pattern di espressione fra le due condizioni. In aggiunta, 8 soggetti con insufficienza di vitamina D sono stati sottoposti a una terapia di 1 anno con vitamina D, cui farà seguito la valutazione del profilo proteomico e dell'espressione della fetuina-A, per valutare se la somministrazione di vitamina D possa modificare il pattern di espressione.

Lavori pubblicati

1) MOLECULAR ANALYSIS AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF TSHR GENE MUTATIONS IN PEDIATRIC PATIENTS

Stefania Moia¹, Michela Godi¹, Gillian E. Walker¹, Stefania Riccomagno¹, Patrizia Agretti², Rosario Berardi³, Simonetta Bellone¹, Flavia Prodam¹, **Gianni Bona**¹. [*in corso di stampa*]

¹*Division of Paediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy,*

²*Department of Endocrinology and Metabolism, Excellence Centre AmbiSEN, Univeristy of Pisa, Pisa, Italy,*

³*Department of Pediatrics, University of Siena, Siena, Italy*

2) OBESITY MODIFIES THE EXPRESSION PROFILES OF METABOLIC MARKERS IN SUPERFICIAL AND DEEP SUB-CUTANEOUS ABDOMINAL ADIPOSE TISSUE (SAT) DEPOTS

^{1,2}Gillian E. Walker, ³Paolo Marzullo, ²**Gianni Bona**, ²Francesco Zurleni, ³Antonio Liuzzi, ¹Anna Maria Di Blasio. [*Submitted Int. J. Obesity*]

^{1,2}*Laboratory of Molecular Biology I.R.C.C.S. Istituto Auxologico Italiano, Piancavallo (VB);*

²*Dipartment of Medical Sciences, University of Piedmont Orientale “Amedeo Avogadro”, Novara;*

³*Division of Internal Medicine, I.R.C.C.S. Istituto Auxologico Italiano, Piancavallo (VB);* ⁴*Ospedale di Circolo di Busto Arsizio, Busto Arsizio; Italy.*

IL PRESIDENTE DEL CENTRO
PROF. GIANNI BONA

