

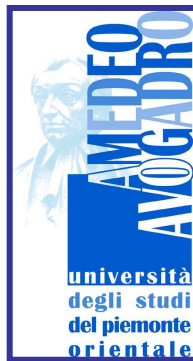
**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**

**Dipartimento di Scienze Mediche di Novara**

DOTTORATO DI RICERCA

IN MEDICINA MOLECOLARE

(XIX Ciclo)



**RICERCA DELLA CAUSE GENETICHE CHE CONTRIBUISCONO  
AL DEFICIT DELL'ORMONE DELLA CRESCITA**

**Tutor: Prof. Gianni Bona**

**Dottoranda: Godi Michela M.**

Relazione III anno

2005-2006

## ***SCOPO***

Scopo generale di questo progetto di ricerca è l'identificazione delle cause genetiche che contribuiscono al deficit dell'ormone della crescita (GH) presente in individui con bassa statura. La ricerca condotta nei primi 3 anni del dottorato ha riguardato, più specificatamente, il coinvolgimento di polimorfismi del promotore del gene GH-1 nel deficit isolato di GH.

## **L'ORMONE GH E IL DEFICIT ISOLATO IGHD**

L'ormone della crescita umano, GH, è una proteina multifunzionale secreta dalle cellule somatotrope del lobo anteriore dell'ipofisi. Essa promuove la crescita postnatale, è essenziale per la differenziazione cellulare e svolge importanti funzioni nel metabolismo proteico, glucidico e lipidico [1, 2].

La secrezione di GH è di tipo pulsatile e dipende dall'età, dal sesso, dallo stato nutrizionale e da altri parametri fisiologici: risulta aumentata nel digiuno, ridotta nell'obesità e declina progressivamente con gli anni. Essa, infatti, presenta picchi secretori giornalieri correlati all'esercizio, allo stress o all'ingestione di cibo, ma soprattutto di notte, in coincidenza delle fasi elettroencefaliche 3 e 4 del sonno [1,3]. Il GH viene immagazzinato in granuli secretori e rilasciato in circolo tramite esocitosi in maniera intermittente, sottoforma di una famiglia eterogenea di peptidi che derivano da meccanismi di splicing alternativo dell'mRNA e da modificazioni post-traduzionali [4]. Esso circola nel plasma legato, in parte, a due specifiche proteine, binding-proteins (BPs). Queste proteine trasportano l'ormone della crescita e modulano la sua attività, dato che ne prolungano il tempo di emivita, ne limitano il volume di distribuzione regolando il legame recettoriale e l'accesso alle cellule bersaglio [1].

Nei mammiferi, la secrezione interna di GH è sotto controllo dell'ipotalamo, strettamente connesso all'ipofisi attraverso il peduncolo ipofisario. La regolazione è mediata dalle azioni opposte di due neuropeptidi ipotalamici: l'ormone di rilascio del GH (GHRH), ad attività stimolante, e la somatostatina (SS) con attività inibente. I picchi di GH si verificano in corrispondenza dei periodi di massima secrezione del GHRH e di minima produzione di somatostatina [3]. Questi due ormoni vengono rilasciati nel sistema portale a livello del peduncolo ipotalamo-ipofisario, il quale rappresenta una comunicazione vascolare diretta tra l'ipotalamo e l'ipofisi. Raggiunta l'ipofisi, il GHRH e la Somatostatina si legano a specifici recettori presenti sulle cellule somatotrope, regolando il lavoro di quest'ultime; da questa interazione vengono infatti attivate proteine G stimolatorie (Gs) o inibitorie (Gi), responsabili rispettivamente dell'aumento o della riduzione di cAMP intracellulare. L'aumento di cAMP determina la fosforilazione e l'attivazione di fattori trascrizionali, che a loro volta interagiscono su diversi geni bersaglio.

Il rilascio dell'ormone della crescita può anche essere regolato da segnali periferici indipendenti dal GHRH ipotalamico, per l'intervento di alcuni composti chiamati GH secretagoghi (GHSs) che è stato provato sia in vivo che *in vitro* essere capaci, a seconda della dose, di stimolare il rilascio di GH.

L'ormone GH è codificato dal gene GH-1, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q23). Il GH-1 appartiene ad un cluster di cinque geni strettamente associati: CSHP-1, CSH-1, GH-2 e CSH-2. Essi presentano un elevato grado di omologia per quanto riguarda il promotore e la regione 5' codificante, differenziandosi maggiormente nel tratto 3'. Essi hanno inoltre una struttura molto simile, caratterizzata dalla presenza di cinque esoni interrotti da quattro piccoli introni nella stessa posizione e della stessa lunghezza [5]. Nonostante l'elevato grado di omologia di sequenza, circa 91-99%, l'espressione di ciascun gene risulta essere tessuto-specifica: GH-1 viene espresso esclusivamente nelle cellule somatotrope dell'ipofisi anteriore, mentre i geni CSH-1, CSH-2 e GH-2 a livello placentare, nelle cellule del sinciziotrofoblasto. Il gene CSHP1 è in realtà uno pseudogene, contenente una mutazione che altera il meccanismo di splicing e il risultante prodotto [6-9].

L'ormone della crescita umano GH è una proteina a singola catena costituita da 191 amminoacidi. Il core della molecola è rappresentato da due paia di alfa eliche, stabilizzate da ponti disolfuro tra i residui 53-165 e 182-189 [10]. *Splicing* alternativi danno origine a diverse isoforme. Tra queste la più attiva e maggiormente rappresentata (75% del GH ipofisario) è quella di peso molecolare pari a 22kD. La variante di 20 kD, che costituisce il 10% circa, deriva da uno splicing alternativo dell'esone 3 che utilizza un sito criptico con perdita di 15 aminoacidi (dal 32 al 46) [11]. Altre forme minori e prodotte fisiologicamente a livelli bassissimi, dovute alla perdita degli esoni 3 e 3 / 4, sono state già riportate dalla letteratura [12], e corrispondono rispettivamente al peptide di 17,5 kDa (privo degli aminoacidi 32-71) ed al peptide di 11 kDa (mancante degli aminoacidi 32-126).

In letteratura sono riportate mutazioni identificate nel gene GH-1, le quali portano ad una carenza della proteina e si associano quindi ad un deficit di tipo isolato [13,14]. La percentuale di casi di bassa statura associata ad un deficit isolato dell'ormone GH (IGHD) sembra essere piuttosto bassa, con un'incidenza di 1 su 4000/10000 nati vivi [15-17]. La maggior parte di questi casi è di tipo sporadico, causata da anomalie durante lo sviluppo (displasia setto-ottica, idrocefalo, anomalie cromosomiche) o da fattori ambientali; tuttavia solo nel 12-20% dei pazienti sporadici sono riscontrabili alterazioni anatomiche alla risonanza magnetica [18], in tutti gli altri l'origine del difetto resta ancora sconosciuta e si definiscono pertanto deficit idiopatici. Nel 5-30% dei casi, invece, i pazienti possiedono almeno un parente di primo grado affetto e questo suggerirebbe un'eziologia genetica: l'IGHD viene quindi definito di tipo familiare [17]. Studi recenti indicano come anche i numerosi casi sporadici, talvolta, siano caratterizzati da alterazioni genetiche insorte *de novo* o trasmesse come carattere autosomico recessivo, ma non identificate in altri parenti a causa del numero

limitato di componenti del nucleo familiare [19]. È quindi ipotizzabile che una percentuale, ancora non ben definibile, di forme considerate idiopatiche abbia, in effetti, un'origine genetica.

### **Polimorfismi del promotore del GH-1**

Il meccanismo di regolazione della produzione di GH è un processo piuttosto complicato, in cui sono coinvolti diversi geni. Data la molteplicità degli elementi necessari alla corretta espressione di GH-1, molti dei quali non sono stati ancora identificati, è evidente come i deficit di GH di origine genetica possano essere determinati non solo da mutazioni localizzate nel GH-1, ma anche nei geni che ne regolano l'espressione (GHRH, recettore di GHRH, PIT-1 o PROP1), nelle sequenze regolatrici a monte del GH-1 e nei fattori trascrizionali dell'ipofisi (Pit-1, Prop-1, Hesx-1, Lhx-3, Lhx-4) [20].

Il deficit di GH in pazienti sporadici in cui non si trovino mutazioni causali potrebbe essere determinato da polimorfismi associati ad una diminuita produzione di GH. Mentre la sequenza codificante del gene GH-1 risulta altamente conservata, la regione del promotore prossimale è caratterizzata da un elevato grado di polimorfismo, presentando 15 variazioni nucleotidiche nelle 500 basi a monte del sito di inizio di trascrizione [21, 22]. Questi SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) danno origine ad almeno 40 diverse combinazioni aplotipiche che hanno mostrato una differente attività trascrizionale in vitro. In particolare, tre dei polimorfismi identificati cadono all'interno di altrettanti siti di legame di fattori trascrizionali: G-278T è localizzato all'interno del sito di legame del fattore ubiquitario NF1; A-75G nel sito del fattore di trascrizione ipofisario Pit-1; G-57T in un sito di legame del recettore della vitamina D. Questi polimorfismi potrebbero avere una rilevanza funzionale nel modulare il livello trascrizionale del gene GH-1.

Questo progetto si propone quindi di valutare il coinvolgimento di queste variazioni del promotore del gene GH-1 nel deficit isolato di GH.

### **NF1**

Il fattore trascrizionale NF1 appartiene ad una famiglia di proteine in grado di legare sequenze di DNA ricche di GC. NF1 è espresso in modo ubiquitario in molti tessuti ed è in grado di legarsi al DNA in modo costitutivo. NF1 è stato identificato in numerosi elementi regolatori genici [23]. Esso si lega come omodimero alla sequenza consenso di DNA

TTGGC(N5)GCCAA. La famiglia dei fattori NF1, nei vertebrati, contiene quattro geni differenti, NF1-A, NF1-B, NF1-C, e NF1-X. Il dominio di legame al DNA e quello di dimerizzazione (distanti circa 200 aminoacidi) sono altamente conservati in tutte e quattro le proteine, mentre la regione C-terminale è più variabile. La proteina NF1-C contiene un dominio ricco di prolina, il quale sembra stimolare l'attività trascrizionale. Per ciascuno dei quattro geni NF1 ci sono diverse varianti di splicing, espresse differenzialmente in vari tessuti [23]. I domini proteici che mediano l'inibizione trascrizionale sono stati identificati sia in NF1-A sia in NF1-X. E' probabile che la repressione e l'attivazione da parte dei fattori NF1 sia specifica sia del tipo cellulare che del contesto.

### **PIT-1**

PIT-1 (*Pituitary Transcription Factor 1*), noto anche come GHF1 (*Growth Human Factor 1*), è un fattore di trascrizione specifico per l'ipofisi, avente un ruolo essenziale nello sviluppo delle cellule somatotrope, lattotrope e tireotrope dell'ipofisi anteriore e nell'attivazione dell'espressione dei geni che codificano per GH, PRL e per la subunità  $\beta$  del TSH. Il gene PIT-1, ufficialmente noto come POUF1 (*Pou Domain Class 1 Transcription Factor 1*), è stato localizzato nell'uomo sul cromosoma 3p11 e consiste di 6 esoni che codificano per una proteina di 291 aminoacidi [24]. Il peptide maturo, di 33 kD, appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione con un tipico dominio detto POU (il nome deriva dai prodotti genici che contengono tale dominio: Pit-1, Oct-1, Oct-2 e unc-86). Questo dominio, di doppio legame al DNA, è costituito da due regioni molto conservate separate da una zona variabile. La regione amino-terminale di circa 75 aminoacidi, detta *POU-specific domain* ( $POU_S$ ), è responsabile del legame specifico al DNA e delle interazioni con altre proteine, mentre quella carbossi-terminale di 60 aminoacidi, detta *POU-homeo domain* ( $POU_H$ ), lega il DNA con minore affinità [25, 26]. Questi due domini sono regioni della proteina ad alfa elica deputate al legame con il DNA. Il legame risulta piuttosto versatile e flessibile poiché esperimenti in vitro hanno mostrato come questi fattori di trascrizione siano in grado di legarsi ai loro siti di riconoscimento come monomeri o come omodimeri a seconda della specifica sequenza riconosciuta sul DNA [27, 28].

A livello della regione prossimale del promotore del GH sono state identificate due regioni che legano specificatamente Pit-1: una *distale*, a -127/-107 dal sito di inizio della trascrizione e l'altra *prossimale* a -87/-72. Diversi studi hanno dimostrato come i siti di legame per Pit-1 siano critici per l'attività del promotore sia in esperimenti di trascrizione *in*

*vitro* [29] sia in saggi di trasfezione transiente in colture cellulari di tessuti [30]. Tuttavia studi sull'espressione del GH umano in topi transgenici hanno dimostrato che il legame di Pit-1 nei due siti del promotore non è sufficiente a garantire un elevato livello tessuto-specifico dell'espressione del GH *in vivo* [31]. Altri tre siti di legame per Pit-1 sono inoltre stati identificati all'interno di una locus control region (LCR) localizzata a circa 14.5 kb a monte del GH-1 sembrerebbero essere necessari a conferire un elevato livello, somatotropo-specifico dell'espressione del GH [32].

Mutazioni a carico di PIT-1 sono responsabili di un fenotipo CPHD (Combined Pituitary Hormone Deficiency) caratterizzato da assenza di GH, PRL, TSH. Il deficit di GH è generalmente grave con livelli non rilevabili ai test di stimolazione ipofisaria e si manifesta in età precoce (generalmente entro i 2 anni) con grave difetto di crescita e *facies* tipica con caratteristiche simili alle forme di IGHD di tipo IA. Sino ad oggi nell'uomo sono stati descritte 2 delezioni [33, 34] e 19 mutazioni puntiformi [35-38]. La maggior parte delle mutazioni si comportano come mutazioni recessive e si manifestano allo stato di omozigosi o di eterozigosi composta. Esse nella maggior parte dei casi alterano residui importanti per il legame con il DNA o la conformazione tridimensionale delle  $\alpha$  eliche dei POU-domains, determinando un'incapacità fisica ad interagire con i promotori; talvolta invece la mutazione induce la perdita più o meno completa della capacità di attivazione trascrizionale; la delezione dell'intero gene provoca invece la mancata sintesi della proteina. Le sequenze regolatrici riconosciute dal *POU-specific domain* del fattore trascrizionale Pit-1 possono contenere o un *core* a sequenza fissa 5'-TATNCAT-3' o una regione adiacente ricca in A/T. Generalmente una molecola del dimero Pit-1 si lega alla sequenza core, mentre l'altra si lega alla regione ricca in A/T (POUs<sub>2</sub>) [39]. Quest'ultima varia molto tra i siti di legame riconosciuti da Pit-1 e ciò potrebbe modulare sia la conformazione di legame del fattore di trascrizione che la sua interazione con altre proteine. I *POU-homeo domain* non riconoscono invece sequenze specifiche, ma una regione in 5' rispetto a quella riconosciuta dai *POU-specific domain*.

## **VDR**

Il recettore della vitamina D, chiamato VDR, è un recettore nucleare, appartenente alla famiglia dei recettori steroidei ligando-dipendenti. La sua funzione principale è regolare l'espressione di geni bersaglio in risposta alla vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) [40-42]. VDR media l'azione della 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nel trasporto di calcio e fosfato in vari tessuti: intestinale, osseo, e renale. Non solo, esso risulta coinvolto in una serie di processi in altri sistemi cellulari:

immunitari, neuronali, epiteliali ed endocrini. Infatti, benchè il principale obiettivo di VDR sia la regolazione di geni coinvolti nel metabolismo minerale e il legame con la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  *in vivo* [43, 44], esso è anche in grado di agire su geni i cui prodotti regolano processi fondamentali nella proliferazione e differenziazione cellulare [45, 46]. Questi ulteriori effetti biologici potrebbero essere attribuiti, in larga parte, alla distribuzione tissutale ubiquitaria di VDR, tanto quanto alla regolazione altamente selettiva dell'espressione genica da parte di questo ormone in tipi cellulari specifici [47].

VDR possiede un dominio di legame al DNA all'estremità N-terminale (DBD), altamente conservato tra i recettori nucleari steroidei. Costituito da due motivi "zinc finger", tale dominio è responsabile dell'interazione di VDR con specifiche sequenze di DNA nella regione del promotore di geni bersaglio, chiamate VDRE (Elementi di Risposta alla Vitamina D). DBD sembrerebbe inoltre responsabile della localizzazione di VDR all'interno del nucleo, anche quando non si trovi legato al ligando. Le attività biologiche del recettore della vitamina D dipendono dall'interazione con un ligando funzionalmente attivo; nel caso specifico di VDR il ligando è rappresentato dall'ormone steroideo  $1\alpha,25$ -diidrossi-vitamina D<sub>3</sub> [ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ]. In posizione COOH-terminale è infatti presente il dominio di legame del ligando (LBD), grazie al quale VDR è in grado di legare la vitamina D con un'elevata affinità. Questo legame porta a modificazioni conformazionali della struttura terziaria del recettore, promuovendo la formazione di eterodimeri con il recettore retinoide X (RXR), aumentando il legame con specifiche sequenze di DNA, con coattivatori, e regolando l'attivazione trascrizionale [48-53].

L'analisi delle sequenze e del promotore di diversi geni regolati dalla vitamina D ha portato all'identificazione di diverse sequenze di DNA alle quali VDR si lega (VDREs), modulando successivamente l'attività trascrizionale sia positivamente che negativamente. Per la sua regolazione positiva VDRE prende il nome di "DR3" ed è costituito dalla ripetizione di due elementi di 6 paia di basi separati da 3 nucleotidi. Questa sequenza dirige l'eterodimero VDR-RXR verso la regione del promotore di geni regolati dalla  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dove VDR va ad occupare la metà in posizione 3' di VDRE, mentre RXR lega la metà in 5' [54]. Un altro tipo di VDRE, "IP9", consiste invece di due sequenze palindromiche invertite separate da 9 paia di basi. I VDREs di geni inibiti dalla vitamina D, come PTH nel pollo e l'osteocalcina nel topo, sono simili alla sequenza DR3 trovata in geni in cui la trascrizione è indotta dalla vitamina. Questo pone importanti quesiti riguardanti il meccanismo che determina se la trascrizione di un gene venga attivata o repressa dalla vitamina D. Il passaggio da uno stato di trans-repressione ad uno di attivazione suggerisce che una variazione nella polarità del



complesso VDR/RXR-VDRE, con la metà in 5' occupata da VDR, possa contribuire alla regolazione VDR-negativa della trascrizione genica [55].

Data la presenza di una sequenza VDRE all'interno del promotore del gene GH-1, è probabile che la vitamina D possa in qualche modo influire sull'attività del GH. La vitamina D può essere ottenuta dall'esposizione alla luce solare (raggi UV) e dalla dieta, anche se solo pochi alimenti ne contengono fonti significative. Essa viene trasportata nel fegato mediante il circolo sanguigno, legata a specifiche proteine plasmatiche e successivamente idrossilata a livello del carbonio 25 e convertita in 25- idrossivitamina D<sub>3</sub>. La bioattivazione avviene principalmente, ma non esclusivamente, nel rene con la formazione della 1,25-diidrossivitamina D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]. Questa rappresenta la forma più attiva dell'ormone [53]. La principale funzione della vitamina D è regolare l'omeostasi minerale, stimolando il trasporto del calcio e del fosforo a livello intestinale, osseo e renale. Essa svolge due diversi tipi di attività, uno di tipo endocrino e l'altro di tipo autocrino-paracrino. L'attività endocrina prevede la regolazione dell'omeostasi minerale, del metabolismo osseo, della pressione sanguigna e della secrezione di insulina. Specifici recettori nucleari per la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sono stati identificati in altri tessuti. Questo suggerisce che essa possa ricoprire altri ruoli (attività autocrina/paracrina), nella proliferazione e nella differenziazione cellulare, nella prevenzione di tumori, modulando la risposta immunitaria, e controllando diversi sistemi endocrini. Inoltre questo concorda con l'evidenza epidemiologica che associa la vitamina D a diversi tipi di tumori, malattie autoimmuni, ipertensione e diabete [53-56].

Dati presenti in letteratura confermano che il recettore della vitamina D in presenza dell'ormone agisce negativamente sull'attività trascrizionale del gene GH-1 [57, 58]. Tuttavia, la regolazione dell'ormone della crescita umano da parte della 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> è un meccanismo ancora poco chiaro. Infatti la presenza di recettori della vitamina D nella ghiandola ipofisaria umana è stata dimostrata solo da pochi anni [59].

# Vitamina D

fegato

25(OH)D

rene

1,25(OH)<sub>2</sub>D

## Attività Endocrina

- trasporto di Ca nell'intestino
- metabolismo osseo
- riassorbimento renale di Ca
- pressione sanguigna
- secrezione di insulina

tumori (prostata, seno,  
colon)

risposta immunitaria

1,25(OH)<sub>2</sub>D

## Attività Autocrina/Paracrina

- inibizione della proliferazione cellulare
- promozione della differenziazione cellulare
- regolazione immunitaria

## PROGETTO DI RICERCA

Studi condotti sul promotore prossimale del gene GH-1 [60, 61] hanno evidenziato un elevato grado di polimorfismo. Nella regione compresa tra il sito di inizio della traduzione e la posizione -608 sono stati infatti identificati 18 polimorfismi (fig.1). Si può notare che le variazioni in posizione -278, -75 e -57, a differenza delle altre, si trovano all'interno di siti riconosciuti da fattori di trascrizione, rispettivamente da NF-1, Pit-1 e VDR.

La ricerca condotta si propone quindi di valutare il coinvolgimento dei polimorfismi del promotore del gene GH-1 nel deficit isolato di GH. Questo ha comportato un'analisi di associazione confrontando le frequenze dei diversi polimorfismi e delle loro combinazioni genotipiche e aploipiche nei pazienti e in una popolazione di controllo e un'analisi funzionale per valutare la rilevanza delle variazioni di sequenza nella regolazione della produzione di GH.

In quest'ultimo anno è stata completata l'analisi funzionale dei polimorfismi in -75 e -57. Inoltre è stata completata l'analisi di associazione aggiungendo due nuovi polimorfismi a quelli precedentemente esaminati. I risultati riguardanti il polimorfismo in -75 sono stati pubblicati in Mol Cell Endocrinol. 2006, 249: 51-7.

**Figura 1.**



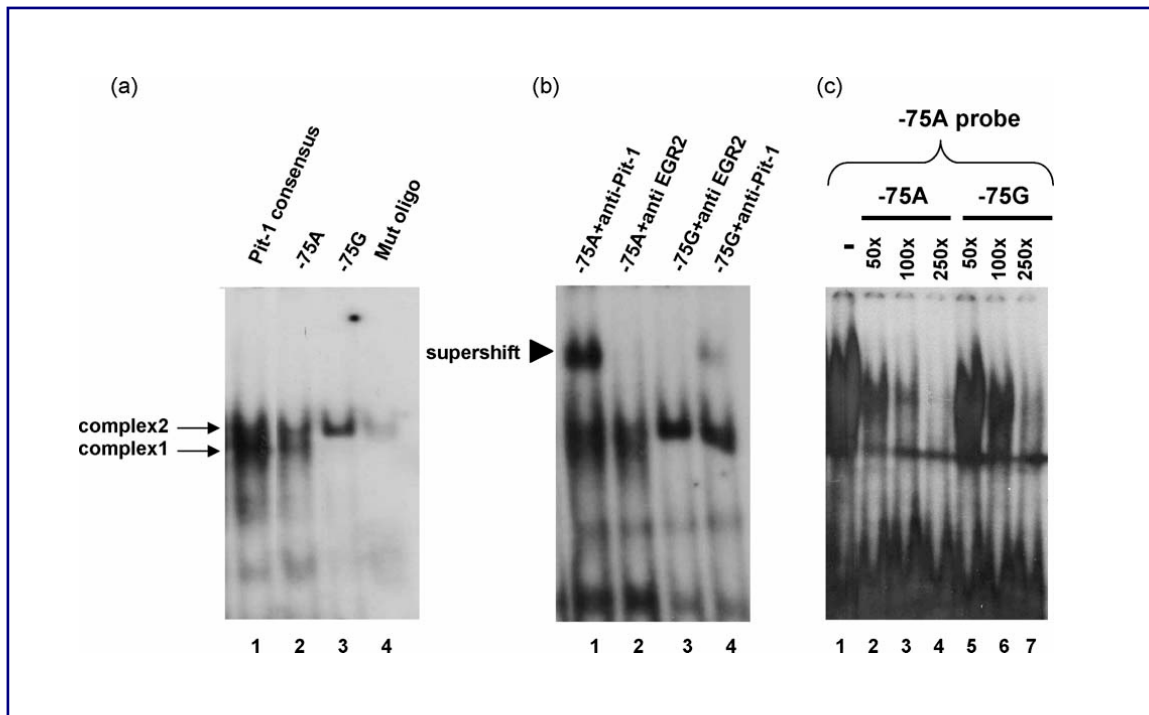
## POLIMORFISMO -75A/G

L'analisi del polimorfismo -75G/A, situato all'interno del sito di legame prossimale di Pit-1, era già stata avviata in uno studio precedente. Diverse combinazioni aplotipiche del promotore del GH-1 erano state clonate in plasmidi contenenti il gene reporter della luciferasi. Mediante saggi di trasfezione transiente in cellule ipofisarie di ratto (GH4C1) si è visto che l'aplotipo con la G in -75 induce un'attività ridotta rispetto agli altri aplotipi testati aventi tutti la A nella stessa posizione. In particolare, la diminuzione era circa del 45% rispetto all'aplotipo A ( $p < 0.0001$ ). Si è dunque ipotizzato che la G potesse essere responsabile di una diminuita attività luciferasica. La capacità della variante G in -75 di diminuire l'affinità di Pit-1 per il suo sito di legame è stata quindi testata mediante un saggio EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).

Cellule ipofisarie di ratto (GH4C1) sono state utilizzate come fonte di estratto nucleare in cui poteva trovarsi la proteina Pit-1. Nel test sono stati utilizzati oligonucleotidi marcati corrispondenti alla regione del promotore da -93 a -62, contenenti o la A o la G in posizione -75. Due oligonucleotidi commerciali corrispondenti alla sequenza consenso di Pit-1 e la stessa sequenza mutagenizzata nel sito di Pit-1 sono stati utilizzati rispettivamente come controllo positivo e negativo.

Due bande ritardate sono state osservate (complesso "1" e "2" in fig.2a, lane 1 e 2) utilizzando le sonde corrispondenti alla sequenza consenso di Pit-1 e all'oligonucleotide -75A mentre con la sequenza -75G era visibile solo una banda (lane 3). Questa stessa banda risulta molto debole con l'oligonucleotide *mut* (lane 4). Aggiungendo un anticorpo anti-Pit1 è stato dimostrato che la banda ritardata conteneva effettivamente la proteina Pit-1 (fig.2b lane 1). La banda "supershifted" in corrispondenza della sonda -75A era molto più intensa rispetto a quella osservata con la sonda -75G nelle stesse condizioni sperimentali (lane 4). Infine, l'esperimento di competizione con gli oligonucleotidi non marcati -75A e -75G ha mostrato una maggiore affinità per la sonda -75A (fig.2c).

**Figura 2.**



Questi risultati suggerivano quindi che l'allele -75G fosse associato ad una diminuita affinità di legame per il fattore di trascrizione Pit-1. Infatti, mentre con la sonda -75A si possono distinguere due complessi differenti, con la sonda G se ne forma solo uno (complesso "2"). Quest'ultimo potrebbe rappresentare un complesso non sensibile al cambiamento di base in -75, formato dall'interazione tra Pit-1 e altri co-fattori coinvolti nell'attivazione sinergica della trascrizione del gene GH-1 (quali il recettore retinoide X, il recettore dell'acido retinoico e il recettore dell'ormone tiroideo) [62-64]. Il ridotto legame della sequenza -75G con Pit-1 potrebbe perciò essere dovuto a modificazioni conformazionali della molecola di Pit-1 indotte dal cambiamento di base. La minore affinità di legame del dimero di Pit-1 nel suo sito nel promotore prossimale del GH-1 sembra essere quindi responsabile della riduzione dell'attività trascrizionale osservata negli esperimenti di trasfezione.

Dato che la variazione -75G mostrava *in vitro* un effetto piuttosto rilevante, è stata valutata la possibilità di un simile effetto anche *in vivo*, mediante uno studio di associazione tra i polimorfismi e il deficit isolato di GH (IGHD). 145 pazienti IGHD e 168 controlli (individui con statura normale) sono stati genotipizzati per il polimorfismo -75G. Sia le frequenze alleliche che quelle genotipiche non erano significativamente differenti tra pazienti e controlli (frequenza dell'allele -75G: 13,8%, vs 15,1% nei controlli). La mancanza di associazione con il deficit di GH, tuttavia, non esclude un potenziale effetto della variazione

-75G sul livello di secrezione di GH *in vivo*. Abbiamo quindi valutato la media dei picchi di secrezione di GH dopo stimolazione in pazienti con un severo deficit di crescita dovuto a IGHD e in individui con bassa statura con secrezione di GH normale. Il livello medio dei picchi non risultava significativamente differente tra individui omozigoti AA ed eterozigoti AG sia nei controlli che nei pazienti. Il numero di individui GG era troppo basso per effettuare un'analisi statistica.

### **POLIMORFISMI -278G/-57T**

Per l'analisi dei due polimorfismi in -278 e -57 sono stati utilizzati due approcci: 1) uno studio genetico consistente in un'analisi di associazione caso-controllo basata sul confronto delle frequenze alleliche e genotipiche di polimorfismi del promotore del GH in pazienti IGHD e in controlli; 2) uno studio funzionale dell'attività trascrizionale *in vitro* indotta dai diversi aplotipi del promotore.

#### ***1) Analisi Genetica***

In questo studio sono stati considerati esclusivamente pazienti con deficit di GH di tipo isolato (IGHD), caratterizzato cioè dall'assenza del solo ormone della crescita. La casistica esaminata finora comprende 151 individui affetti da deficit di GH isolato (M=101, F=50) provenienti dalla Clinica Pediatrica di Novara e da altri 26 centri Italiani. Sono tutti pazienti sporadici, la cui diagnosi è stata confermata dai classici test provocativi con arginina o clonidina. Tutti i pazienti, infatti, presentavano un picco secretorio <10ng/ml dopo entrambi i test di stimolo. Sono stati classificati come "gravi" (PZg) i pazienti che presentavano un picco secretorio <6 ng/ml dopo entrambi i test di stimolo. In tutti i pazienti inclusi nello studio sono state escluse mutazioni deleterie a carico dei geni GH-1 e GHRH-R. I controlli erano costituiti da 168 individui italiani di statura normale oppure di statura inferiore alla media ma controllati per avere un picco secretorio di GH normale dopo stimolo.

Il promotore di tutti gli individui è stato sequenziato dalla posizione -608 a +59, considerando la posizione +1 la prima base trascritta. In questa regione, altamente polimorfica, erano stati identificati in precedenza 18 SNPs. Otto di questi mostrano una frequenza maggiore del 3% nel nostro campione: G-308T, G-301T, G-278T, A-75G, G-57T, G-31delG, A-6G, A-1T. Le frequenze alleliche non sono risultate significativamente diverse

tra pazienti e controlli per nessuno di questi SNPs mentre erano significativamente distorte le frequenze genotipiche dei polimorfismi alle posizioni -278 ( $p = 0.023$ ) e -57 ( $p = 0.013$ ). Il rischio era soprattutto dovuto all'aumento dei genotipi -278GG e -57TT nei pazienti (tab 1). La significatività, tuttavia, non reggeva alla correzione di Bonferroni.

Prendendo in considerazione solo i 57 pazienti con un deficit più grave (PZg), la significatività dell'associazione risultava notevolmente aumentata e aumentava ulteriormente considerando l'omozigosi per la combinazione aplotipica -278G/-57T ( $p = 0.0018$ , OR=3.64, 95% CI: 1.54-8.65). E' interessante notare non solo che tra le due posizioni esiste un forte linkage disequilibrium ( $D' = 0.9$ ), ma che esso viene mantenuto estendendo l'aplotipo -278G/-57T ad altre due variazioni: A1157T nell'IVS4 e LCR990GG. Mentre il primo polimorfismo è localizzato nell'introne 4 del GH-1, il secondo cade all'interno della *Locus Control Region* (LCR) in prossimità di tre siti di legame per Pit-1. Abbiamo visto che tutti gli individui omozigoti per le posizioni -278GG/-57TT/IVS4TT lo erano anche per la posizione LCR990GG. Tuttavia non si notava un aumento della significatività. E' stata quindi effettuata l'analisi di sequenza della regione in prossimità dei siti di legame di Pit-1 all'interno della LCR, per i soggetti aventi l'aplotipo -278GG/-57TT/IVS4TT/LCR990GG. Non è stata però trovata nessuna variazione.

**Tabella 1**

Genotipo	Frequenza			OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p
	CT (n=168)	PZ (n=151)	PZg (n=57)	PZ-CT		PZg-CT	
<b>-278GG</b>	0.256	0.397	0.46	1.92 (1.16-3.1)	0.010	2.44 (1.24-4.7)	0.0077
<b>-57TT</b>	0.107	0.212	0.26	2.24 (1.15-4.39)	0.015	2.98 (1.29-6.8)	0.0078
<b>-278GG/ -57TT</b>	0.089	0.211	0.263	2.74 (1.36-5.59)	0.003	3.64 (1.54-8.65)	0.0018
<b>-278GG/ -57TT/ IVS4TT</b>	0.065	0.16	0.263	2.70 (1.21-6.13)	0.012	5.06 (2.01-12.88)	0.0001

CT = controlli, PZ = pazienti; PZg = pazienti gravi.

## 2) *Analisi Funzionale*

Al fine di valutare se i due polimorfismi del promotore in posizione -278 e -57 potessero avere un ruolo funzionale nell'attività trascrizionale del GH, differenti combinazioni aplotipiche del promotore sono state testate per la loro capacità di indurre la sintesi di luciferasi *in vitro*. Dati presenti in letteratura mostrano che la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> legandosi al recettore VDR tende ad inibire l'attività trascrizionale del gene hGH. Data l'attuale mancanza di una linea cellulare di ipofisi umana per uso di laboratorio, è stata utilizzata la linea di adenocarcinoma mammario umano MCF7 in cui è stata dimostrata la produzione sia di VDR che di GH e che, pertanto, è un buon modello per lo studio degli effetti della 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sul GH umano. Abbiamo quindi selezionato quattro aplotipi i quali differivano per almeno una delle due posizioni: l'aplotipo a (-278G/-57T) che, oltre a contenere entrambi gli alleli di rischio, risulta essere il più frequente tra i pazienti come dimostrato anche in studi precedenti [21,65]; l'aplotipo b (-278T/-57G), in cui i due alleli associati sono assenti; gli aplotipi c e d (-278T/-57T e -278G/-57G, rispettivamente), ciascuno contenente un solo allele di rischio, entrambi ottenuti mediante mutagenesi dell'aplotipo a.

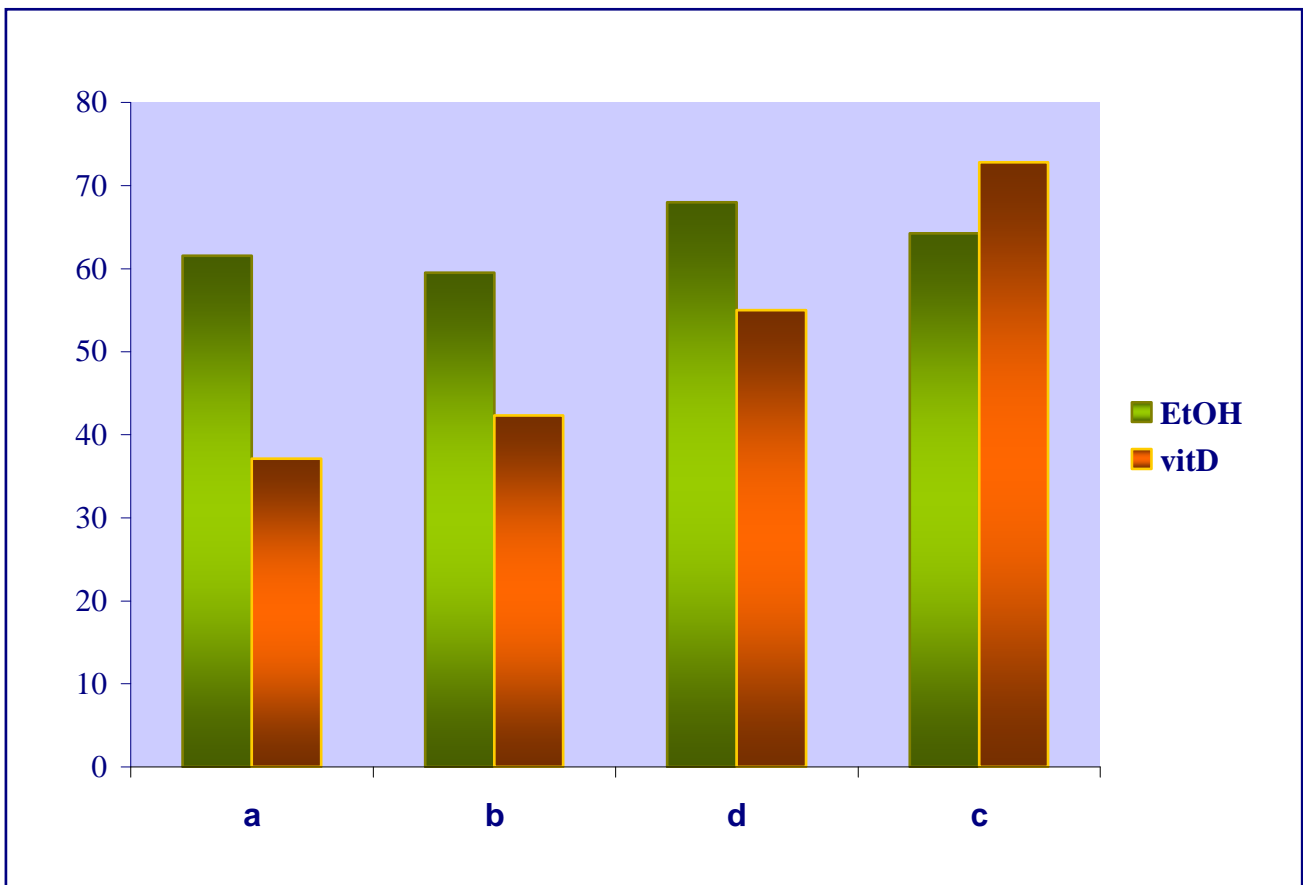
I frammenti a monte del sito di inizio di traduzione (-608, +59) sono stati clonati all'interno del vettore di espressione pGL3, a monte del gene reporter della luciferasi, in modo da poter studiare il livello trascrizionale del gene GH-1 in base all'attività luciferasica. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in presenza e in assenza di vitamina D nel terreno di coltura. I risultati dei test mostrano che la diminuzione di attività luciferasica indotta dalla vitamina D è maggiore per l'aplotipo a (fig.3), in cui sono presenti entrambi gli alleli di rischio, rispetto all'aplotipo b, in cui essi sono assenti (-41,9% vs -28%). Questa differenza risulta statisticamente significativa quando valutata con il test t Student ( $p=0.00124$ ), suggerendo un probabile coinvolgimento del polimorfismo -57 nel deficit isolato di GH. Non si nota, invece, una differente induzione di attività luciferasica dei due aplotipi in assenza di vitamina D. Si potrebbe quindi ipotizzare che il polimorfismo in -278 non sia direttamente implicato.

Al fine di chiarire l'eventuale interazione funzionale tra i due siti associati sono stati condotti esperimenti utilizzando i due aplotipi mutagenizzati. Anche in questo caso si ha una diminuzione di attività luciferasica in presenza dell'allele T in -57 (-21,5%), mentre la presenza del solo allele di rischio -278G (aplotipo d) non sembra sufficiente ad inibire la sintesi di luciferasi (+11,1%).



Questi risultati sembrerebbero suggerire che i due alleli associati agiscano in maniera sinergica diminuendo l'attività luciferasica. Tuttavia, solo l'allele -57T è in grado di mantenere questa capacità inibitoria anche da solo, a differenza dell'altro allele associato -278G. Resta ancora da capire in che modo i due siti interagiscano tra loro. Esperimenti EMSA sono tuttora in corso, al fine di valutare un'eventuale diversa affinità di legame del recettore VDR con i quattro aplotipi esaminati. Cercheremo inoltre di approfondire quale ruolo possa avere il fattore NF1 nella trascrizione del GH, e in che modo agisca in presenza dell'altro allele in posizione -57.

**Figura 3.**



## CONCLUSIONI

In questo progetto di ricerca abbiamo investigato il potenziale ruolo funzionale di tre polimorfismi presenti nel promotore del gene GH, localizzati in tre siti di legame per fattori di trascrizione: -278T/G, -75A/G e -57G/T. Dall'analisi genetica, effettuata considerando sia tutta la casistica di pazienti che pazienti gravi (con entrambi i picchi inferiori a 6 ng/ml), possiamo trarre le seguenti conclusioni:

- Sono risultate significativamente diverse nei pazienti e nei controlli le frequenze genotipiche dei polimorfismi in posizione -278 e -57, localizzati all'interno di siti di legame dei due fattori trascrizionali NF1 e VDR.
- L'aumentato O.R. risulta essere massimo in presenza del genotipo omozigote -278GG/-57TT. La significatività dell'associazione è maggiore se consideriamo solo i pazienti con picchi secretori <6, nonostante questi siano solo 57.
- Il linkage disequilibrium viene mantenuto estendendo l'analisi di associazione anche ad altri due SNPs: IVS41157 e LCR990. L'associazione risulta però significativa solo con il polimorfismo IVS41157.
- L'aumentato O.R. in presenza dell'aplotipo -278GG/-57TT/IVS4TT può essere spiegata con due ipotesi: 1) gli alleli sono marcatori di un aplotipo che porta la variazione di sequenza direttamente coinvolta nella diminuita produzione di GH, 2) le variazioni associate contribuiscono al fenotipo in maniera additiva o sinergica.
- L'analisi funzionale, focalizzata finora soprattutto sul polimorfismo in -57 e sull'effetto della vitamina D sull'attività trascrizionale del GH, indica che ci sia un effetto diretto del polimorfismo -57T. Resta ancora da chiarire il ruolo svolto dall'allele -278G.
- La riduzione dell'attività trascrizionale dovuta all'allele G in posizione -75, vista in precedenza in esperimenti di trasfezione, è stata confermata mediante saggi EMSA. Il ridotto legame della sequenza -75G con Pit-1 potrebbe essere dovuto a modificazioni conformazionali della molecola di Pit-1 indotte dal cambiamento di base.

Il proseguimento del lavoro prevede, pertanto:

- 1) di estendere l'analisi di associazione ad altri polimorfismi nel gene GH-1;
- 2) di approfondire l'eventuale coinvolgimento funzionale del polimorfismo in -278 e una sua interazione con -57. Questo è in fase di valutazione mediante esperimenti di Gel Retardation, per testare se ci sia una variazione nell'affinità di legame tra VDR e NF1 e i loro siti di legame nel promotore del GH;
- 3) di avviare una analisi di polimorfismi di altri geni che potrebbero essere coinvolti nel deficit di GH. Un primo gene candidato potrebbe essere VDR.

I risultati ottenuti sia dall'analisi genetica che da quella funzionale sembrano comunque avvalorare l'ipotesi per cui nella maggior parte dei pazienti, soprattutto sporadici, il deficit di GH abbia un'eziologia **multifattoriale**, in cui più fattori, genetici e ambientali, forniscono un parziale contributo al fenotipo. Tra i fattori genetici sembrano essere rilevanti polimorfismi che contribuiscono alla regolazione della produzione di GH.

## Materiali e Metodi

Pazienti IGHD. Lo studio include 151 pazienti Italiani sporadici aventi un deficit ipofisario isolato di GH. Per tali soggetti sono state escluse in precedenza delezioni nel gene GH-1. Nessuno dei pazienti presentava una storia di trauma neonatale all'anamnesi, né difetti congeniti, né patologie malformative od organiche. I pazienti non hanno una storia familiare di deficit di GH e i genitori non sono consanguinei. Per tali soggetti sono state escluse in precedenza mutazioni nei geni GH-1 e GHRHR. La diagnosi di deficit di GH è stata confermata dai classici test provocativi con arginina o clonidina o insulina. Tutti i pazienti avevano un picco inferiore a 10 ng/ml dopo due tipi di test.

Controlli. Sono stati analizzati finora 168 soggetti di statura e corporatura normali, o con statura inferiore alla media, tutti appartenenti a famiglie Italiane non consanguinee.

Amplificazione del gene GH-1. Il gene dell'ormone della crescita fa parte di un cluster di geni con un elevato grado di omologia. L'intera sequenza del gene (2.7 Kb) è stata amplificata mediante tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizzando primers specifici per il GH-1 (GH32 forward: 5' CCAGCAATGCTCAGGGAAAG 3'; GH33 reverse: 5' TGTCCCACCGGTTGGGCATGGCAGGTAGCC 3') che fiancheggiano le due estremità del gene e non amplificano gli altri geni del *cluster*. La reazione di PCR è stata effettuata in un volume totale di 25 µl: 100 ng di DNA genomico, 10 pmoli di ciascun primer, Tris-HCl 50 mM (pH 9), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15 mM, Triton X-100 0.1%, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 250 µM e 0.03 U di DNA polimerasi High fidelity EXT (DyNAzyme EXT™, Finnzymes). La reazione è stata effettuata in un termociclatore per 35 cicli ciascuno consistente in 30 s a 94 °C, 30 s a 58 °C, 2 min a 72 °C e un'estensione finale di 10 min a 72 °C.

Identificazione dei polimorfismi nel Promotore. Il prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione dell'intero gene GH-1 è stato utilizzato per una nested PCR che amplifica la regione del promotore e il 5'UTR (da -608 a +59 rispetto al sito di inizio di trascrizione). La reazione di nested PCR è stata effettuata in un volume finale di 25 µl con 1 µl del prodotto della PCR del gene completo, 10 pmoli dei primers GH4 e PR18 (:PR18 forward: 5'ACCTGTAGATGGGACGGGGG 3'; GH4 reverse: 5'TTAAACATGCGGGGAGGAGG 3'), KCl 50 mM, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 200 µM e 1 U di Ampli

Taq Gold DNA polimerasi (Applied Biosystem). La reazione è stata effettuata in un termociclatore per 25 cicli ciascuno consistente in 30 s a 96 °C, 30 s a 58 °C, 1 min a 72 °C e un'estensione finale di 5 min a 72 °C.

Sequenziamento. Gli amplificati del promotore sono stati purificati utilizzando gli enzimi Esonucleasi I e Fosfatasi Alcalina a 37 °C per 30 min e a 80 °C per altri 10 min. I prodotti purificati sono stati successivamente sequenziati con il kit Big-Dye terminator (Applied Biosystem, Applera-Italia) e il sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

Preparazione dei costrutti. Per ottenere la regione in 5' fiancheggiante il gene GH-1 (da -608 a +59) è stata eseguita una nested PCR utilizzando i primers PR7 e PR8 (PR7: 5' CAG TAA TAG GTA CCC CAG CAA TGC TCA GGG AAA 3'; PR8: 5' CAG TCA TCA AGC TTC GCT AGG TGA GCT GTC CAC A 3'), contenenti i nucleotidi per gli enzimi di restrizione KpnI e HindIII rispettivamente per PR7 e PR8 (sottolineati in sequenza), e il prodotto di PCR dell'amplificazione dell'intero gene (primers GH32-GH33). La reazione di nested PCR è stata effettuata in un volume finale di 50 µl con 2 µl del prodotto della PCR del gene completo, 10 pmoli dei primers PR7 e PR8, Tris-HCl 50 mM (pH 9), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15 mM, Triton X-100 0.1%, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 250 µM e 0.004 U di DNA polimerasi con attività proofreading (DyNAzyme EXT<sup>TM</sup>, Finnzymes). Per la reazione è stato impiegato un termociclatore per 25 cicli ciascuno consistente in 30 s a 96 °C, 30 s a 58 °C, 1 min a 72 °C e un'estensione finale di 5 min a 72 °C.

Il prodotto di PCR specifico della regione in 5' fiancheggiante il gene GH-1 (da -608 a +59) è stato clonato nel plasmide pMOSBlue utilizzando il kit pMOSBlue Blunt Ended Cloning (Amersham Pharmacia Biotech). Il DNA plasmidico estratto da almeno cinque cloni diversi è stato sequenziato per verificare che non fossero presenti errori nella sequenza dovuti alla Taq Polimerasi. I plasmidi sono stati in seguito digeriti con gli enzimi KpnI e HindIII, purificati da gel di agarosio con il kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), e inseriti a monte del gene reporter luciferasi di *Photinus pyralis* nel vettore di espressione pGL3 (Promega). I plasmidi ottenuti sono stati estratti (Plasmid Midiprep; QIAGEN), sequenziati, ed utilizzati in saggi di trasfezione transiente.

Mutagenesi. Per ottenere dei nuovi costrutti, che contenessero solo uno dei due alleli di rischio, è stata fatta una mutagenesi. Sono stati utilizzati due primer (PR-278T e PR-57G)

sul sito da mutagenizzare contenenti il nucleotide modificato (PR-278:5' CAG GTT GGC CAC CAT GGC CTG CTG CCA 3'; PR-57G: 5' CTT GTG GGC CCT TTT TAT ACC CTG GCC CCT TCT CTC CCA CTG TTG CCC CC 3') e che comprendessero il primo sito di restrizione non presente altrove nel frammento e nel contempo assente nel plasmide (PR-278 con sito per BalI e PR-57 con sito per ApaI, sottolineati in sequenza). Tali primer, in coppia con un altro contenente anch'esso un sito unico per un enzima di restrizione ( PR8 con sito per HindIII e PR7 per kpnI), sono stati utilizzati per una nested PCR come descritto in precedenza. Il frammento di PCR, una volta clonato nel plasmide pMOSBlue, è stato sottoposto ad una doppia digestione con gli enzimi opportuni (BalI/HindIII; kpnI/ApaI) sia per il prodotto clonato che per il plasmide in cui il frammento è stato inserito. I frammenti così ottenuti sono stati sottoposti ad una reazione con l'enzima T4 DNA Ligasi che consentiva l'inserimento nel corretto orientamento del prodotto mutagenizzato nel vettore di espressione pGL3.

Colture cellulari e trasfezioni. La linea cellulare MCF7, di carcinoma mammario umano di origine epiteliale (ATCC HTB-22), è stata cresciuta in terreno D-MEM (Gibco BRL) addizionato con 10% di FBS, L-glutammina, D-Glucosio 4500 mg/L, HEPES 25 mM, penicillina 100 U/mL e streptomina 100 µg/mL. Le colture cellulari sono state mantenute a 37°C in atmosfera umidificata con CO<sub>2</sub> al 5%. 24 h prima della trasfezione le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (150 x 10<sup>3</sup> cellule per pozzetto), La trasfezione è stata effettuata in pozzetti contenenti 3 µl del reagente di trasfezione Fugene (Roche Diagnostics, Molecular Biochemicals, IN, USA) e 1 µg di DNA di ciascun costrutto. A 24 h dalla trasfezione le cellule sono state incubate per 48 h con 500 nM di 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> diluita in etanolo in terreno privo di siero.

Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato. Le cellule sono state raccolte nel tampone di lisi (125 mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 50% glicerolo e 5% Triton<sup>®</sup> X-100) dopodiché l'attività della luciferasi è stata determinata con un luminometro (Lucy1, Rosys Anthos) utilizzando il kit Luciferase Assay System (Promega). I dati dei singoli esperimenti sono stati normalizzati in base al valore di bioluminescenza relativo alla concentrazione proteica di ciascun campione.

Electrophoretic Mobility Shift Assay. Gli estratti nucleari sono stati ottenuti da linee cellulari GH4C1, mediante il metodo secondo Dignam [66]. Gli oligonucleotidi (corrispondenti alla regione da -93 a -62 del promotore del GH-1) contenenti la posizione -75

[-75A: 5'-GCCCCATGCATAAATGTACACAGAAACAGG-3' and -75G 5'-GCCCCATGCATAAATGTGCACAGAAACAGG-3'] sono stati sintetizzati in entrambi gli orientamenti, senso e antisenso, come molecole a singolo filamento. Gli oligonucleotidi complementari sono stati prima incubati a 85°C nel tampone di appaiamento, quindi raffreddati gradatamente a 45°C, in modo da generare molecole di DNA a doppio filamento. Due oligonucleotidi commerciali a doppio filamento (Geneka Biotechnology) sono stati utilizzati come controlli: un oligonucleotide Pit-1 wild type corrispondente alla sequenza consenso di legame per Pit-1 (5'-CCTGATTATATATATATTCATGAA-3') come controllo positivo e un oligonucleotide Pit-1 mutato (5'-CCTGATGCGGTATCTGGATCATGAA-3') come controllo negativo. Gli oligonucleotidi sono stati quindi marcati in 5' [ $\gamma$ 32P]ATP con l'enzima T4 polynucleotide kinasi (Promega) e utilizzati come sonde negli esperimenti EMSA.

L'estratto nucleare di cellule GH4C1 (1.5-4.0  $\mu$ g) è stato incubato 20 min a temperatura ambiente con 15 fmoli di sonde marcate in una miscela di reazione contenente 10mM HEPES, pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM ditiotritolo (DTT), 50 mM KCl, 1  $\mu$ g of poly(dI-dC), 10% glicerolo. Per esperimenti di "supershift" sono stati aggiunti 2 $\mu$ l di un anticorpo policlonale di coniglio anti-Pit-1 (Geneka Biotechnology) e 2 $\mu$ l di un anticorpo policlonale di coniglio anti-EGR2 (Santa Cruz Biotechnology) alla mix di reazione e incubati 20 minuti in ghiaccio. Le sonde marcate sono state quindi aggiunte e lasciate a incubare per altri 20 minuti a temperatura ambiente. Per gli studi di competizione sono state aggiunte le sonde non marcate in eccesso di 50-, 100-, e 250- volte.

Le reazioni sono state quindi sottoposte a elettroforesi su gel di poliacrilammide al 5% (37,5:1 acrylamide:bisacrylamide), in TBE 0,25x (22mM Tris borato e 0,5 mM EDTA) a 150mV per un'ora mezza circa. Il gel è stato seccato su carta Whatman 3 MM prima di essere esposto per autoradiografia a -80°C.

### Analisi statistica

La deviazione delle frequenze alleliche e genotipiche tra pazienti e controlli è stata calcolata con il test del chi-quadro ( $\chi^2$ ), utilizzando tabelle di contingenza del tipo 2x2.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1 Postel-Vinay M-C, Djiane J (1993) Growth hormone and prolactin: Biochemistry and physiology. In: Bertrand J, Rappaport R, Sizonenko PC (eds) Pediatric endocrinology (physiology, pathophysiology and clinical aspects, 2<sup>nd</sup> Ed.) Williams and Wilkins, Baltimore, pp210-19.
- 2 Thorner MO, Mance ML, Horvath E, Kovaks K (1992) The anterior pituitary. In: Wilson JD, Foster DW (eds) William's textbooks of endocrinology, 8<sup>th</sup> Ed. Saunders, Philadelphia, pp 221-310.
- 3 Gaillard C (1993) Neuroendocrine regulation. In: Bertrand J, Rappaport R, Sizonenko PC (eds) Pediatric endocrinology (physiology, pathophysiology and clinical aspects, 2<sup>nd</sup> Ed.) Williams and Wilkins, Baltimore, pp19-45.
- 4 Palmetshofer A, Zechner D, Luger TA, Barta A (1995) Splicing variants of the human growth hormone mRNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol* 113:225-34.
- 5 Hirt K, Kimelman J, Birnbaum MJ, Chen EY, Seeburg PH, Eberhardt NL, Barta A (1987) The human growth hormone gene locus: structure, evolution and allelic variations. *DNA* 6:59-70.
- 6 Parks JS, Kassels M, McKean MC, Parks JT, Johnson C & Meacham L (1989). Evolution and structure of the growth hormone gene cluster. In *Advances in Growth Hormone and Growth Factor Research*, pp 3–17. Ed. E Mueller. Berlin: Springer-Verlag.
- 7 Phillips III JA (1995). Inherited defects in growth hormone synthesis and action. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, pp 3023–44. Eds CR Shriver, AL Beaudet, WS Sly & D Valle. New York: McGraw-Hill, Inc.
- 8 Seeburg PH (1982). The human growth hormone gene family: Nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA* 1 239–49.
- 9 Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE & Seeburg PH (1989). The human growth hormone locus: Nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 4 479–97.
- 10 De Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255:306-12.
- 11 Rincon-Limas DE, Resendez-Perez D, Ortiz-Lopez R, Alvidrez-Quihui LE, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W, Martiez-Rodiquez HG, Barrera-Saldana HA (1993). HGH isoform: cDNA expression, adipogenic activity and production in cell culture. *Biochim Biophys Acta* 1172:49-54.
- 12 Procter AM, Phillips 3rd JA, Cooper DN (1998). The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Hum Genet* 103:255–72.



- 13 Duquesnoy P, Amselem S, Gourmelen M, Le Bouc Y, Goossens M (1990). A frameshift mutation causing isolated growth hormone deficiency type IA. *Am J Hum Genet* 47:A110.
- 14 Igarashi Y, Kamijo T, Ogawa M, Iwatani N, Nishi Y, Kohno H, Masumara T, Koga J (1993). A new type of inherited growth hormone deficient: a compound heterozygote of a 6.7 kb deletion, including the GH gene, and two bases deletion in the third exon of the GH1 gene. *Pediatr Res* 33:35.
- 15 Rivarola MA, Phillips JA III, Mignon CJ, Heinrich JJ & Hjelle BJ (1984). Phenotypic heterogeneity in familial isolated growth hormone deficiency type IA. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*, 59: 34-40.
- 16 Vimpani GV, Vimpani AF, Lidgard GP, Cameron, EHD & Farquhar JW (1977). Prevalence of severe growth hormone deficiency. *British Medical Journal*, 2:427-30.
- 17 Phillips JA III, Cogan JD (1994). Molecular basis of familiar human growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 78:11-16.
- 18 Cacciari E, Zucchini S, Carla G, Pirazzoli P, Cicognani A, Mandini M, Busacca M, Trevisan C (1990). Endocrine function and morphological findings in patients with disorders of the hypothalamo-pituitary area: a study with magnetic resonance. *Arch Dis Child*. Nov;65(11):1199-1202.
- 19 Massa GG, Binder G, Oostdijk W, Ranke MB, Wit JM (1998). De novo mutations of the growth hormone gene: an important cause of congenital isolated growth hormone deficiency? *Eur J Pediatr*. Apr;157(4):272-5.
- 20 Dattani MT (2005). Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter? *Clinical Endocrinology*, 63: 121-30.
- 21 Horan M, Millar DS, Hedderich J, Lewis G, Newsway V, Mo N, Fryklund L, Procter AM, Krawczak M, Cooper DN (2003). Human growth hormone 1 (GH1) gene expression: complex haplotype-dependent influence of polymorphic variation in the proximal promoter and locus control region. *Hum mutat*, 21(4): 408-23.
- 22 Giordano M, Lessi M, Baracchini R, Petri A, Ozerkan E, Cavallo L, Wasniewska M, Aimaretti G, Momigliano-Richiardi P, Bona, G, (2001). Molecular analysis of the Growth Hormone gene (GH1) in Isolated Growth hormone deficiency. *J Endocrine Genetics* 2, 45-54.
- 23 Osada S, Imagawa M, Nishihara T (2005). Organization of gene structure and expression of nuclear factor 1 family in rat. *DNA Seq*, 16(2): 151-5.
- 24 Andersen B & Rosenfeld MG (2001) POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocrine Reviews*, 22, 2-35.
- 25 Phillips K, Luisi B (2000). The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J Mol Biol*. Oct 6;302(5):1023-39. Review.

- 26 Rosenfeld MG (). POU-domain transcription factors:pou-erful developmental regulators. *Genes Dev* 5:897-907.
- 27 Jacobson EM, Li P, Leon-del-Rio A, Rosenfeld MG, Aggarwal AK (1997). Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: unexpected arrangement and flexibility. *Genes Dev.* Jan 15;11(2):198-212.
- 28 Scully KM, Jacobson EM, Jepsen K, Lunyak V, Viadiu H, Carriere C, Rose DW, Hooshmand F, Aggarwal AK, Rosenfeld MG (2000). Allosteric effects of Pit-1 DNA sites on long-term repression in cell type specification. *Science* 290:1127-31.
- 29 Bodner M, Karin M, (1987). A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell* 50, 267-75.
- 30 Lefevre C, Imagawa M, Dana S, Grindlay J, Bodner M, Karin M (1987). Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J* . 6 , 971-81
- 31 Jones BK, Monks BR, Liebhaber SA, Cooke NE, (1995). The human growth hormone gene is regulated by a multicomponent locus control region. *Mol. Cell. Biol.*15, 7010-21.
- 32 Shewchuk BM, Liebhaber SA, Cooke NE (2002). Specification of unique Pit-1 activity in the hGH locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 11784-89.
- 33 Hendriks-Stegeman BI, Augustijn KD, Bakker B, Holthuisen P, van der Vliet PC, Jansen M (2001). Combined pituitary hormone deficiency caused by compound heterozygosity for two novel mutations in the POU domain of the Pit1/POU1F1 gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 86:1545-1550.
- 34 Blankenstein O, Muhlenberg R, Kim C, Wuller S, Pfaffle R, Heimann G (2001). A new C-terminal located mutation (V272ter) in the PIT-1 gene manifesting with severe congenital hypothyroidism. Possible functionality of the PIT-1 C-terminus. *Horm Res.*;56(3-4):81-6.
- 35 McLennan K, Jeske Y, Cotterill A, Cowley D, Penfold J, Jones T, Howard N, Thomsett M, Choong C (2003). Combined pituitary hormone deficiency in Australian children: clinical and genetic correlates. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Jun;58(6):785-94.
- 36 Hashimoto Y, Cisternino M, Cohen LE (2003). A novel nonsense mutation in the Pit-1 gene: evidence for a gene dosage effect. *J Clin Endocrinol Metab.* Mar;88(3):1241-7.
- 37 Salemi S, Besson A, Eble A, Gallati S, Pfaffle RW, Mullis PE (2003). New N-terminal located mutation (Q4ter) within the POU1F1-gene (PIT-1) causes recessive combined pituitary hormone deficiency and variable phenotype. *Growth Horm IGF Res.* Oct;13(5):264-8.
- 38 Rainbow LA, Rees SA, Shaikh MG, Shaw NJ, Cole T, Barrett TG, Kirk JM (2005). Mutation analysis of POU1F1, PROP-1 and HESX-1 show low frequency of mutations in children with sporadic forms of combined pituitary hormone deficiency and septo-optic

dysplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Feb;62(2):163-8.

- 39 Ingraham HA, Flynn SE, Voss JW, Albert VR, Kapiloff MS, Wilson L, Rosenfeld MG (1990). The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1-Pit-1 interactions. *Cell* 61, 1021-1233.
- 40 Lowe KE, Maiyar AC, Norman W (1992). Vitamin D-mediated gene expression. *Crit Rev Eukaryotic Gene Expression*, 2: 65-109.
- 41 Macdonald PN, Dowd D, Haussler MR (1994). New insight into the structure and functions of the vitamin D receptor. *Semin Nephrol*, 14: 101-18.
- 42 Rachez C and Freedman LP (2000). Mechanisms of gene regulation by vitamin D<sub>3</sub> receptor: a network of coactivator interactions. *Gene*, 246: 9-21.
- 43 Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M (1996). Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev* 76:593-629.
- 44 Kerner SA, Scott RA, Pike JW (1989). Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D<sub>3</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4455-59.
- 45 Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S, Suda T (1981). Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *proc Natl Acad Sci USA*, 78: 4990-94.
- 46 Pike JW (1991). Vitamin D<sub>3</sub> receptors: structure and function in transcription. *Annu Rev Nutr*, 11: 189-216.
- 47 Peleg S, Sastry M, Collins ED, Bishop JE, Norman AW (1995): Distinct conformational changes induced by 20-epi analogues of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> are associated with enhanced activation of the vitamin D receptor. *J Biol Chem*, 5;270(18):10551-8.
- 48 Whitfield GK, Hsieh JC, Nakajima S, MacDonald PN, Thompson PD, Jurutka PW, Haussler CA, Haussler MR (1995). A highly conserved region in the hormone-binding domain of the human vitamin D receptor contains residues vital for heterodimerization with retinoid X receptor and for transcriptional activation. *Mol Endocrinol*, 9:1166-79.
- 49 Freedman LP, Towers TL (1991). DNA binding properties of the vitamin D<sub>3</sub> receptor zinc finger region. *Mol Endocrinol*,5:1815-26.
- 50 Hong H, Kohli K, Garabedian MJ, Stallcup MR (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol* 17:2735-44.
- 51 Baudino TA, Kraichely DM, Jefcoat SC, Jr., Winchester SK, Partridge NC, MacDonald PN (1998). Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription. *J Biol Chem*, 273:16434-41.
- 52 Rachez C, Suldan Z, Ward J, Chang CP, Burakov D, Erdjument-Bromage H, Tempst

- P, Freedman LP (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D<sub>3</sub> receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev*, 12:1787–1800.
- 53 Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005). Vitamin D. *AJP Renal Physiol*, 289: F8-28.
- 54 Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW (1998). The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*, 13: 325-49.
- 55 Walters MR (1992). Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocrine Rev*, 13: 719-64.
- 56 Stumpf WE (1995). Vitamin D sites and mechanism of action: a histochemical perspective. Reflections on the utility of autoradiography and cytopharmacology for drug targeting. *Histochem Cell Biol*, 104: 417-27.
- 57 Seoane S, Alonso M, Segura C, Perez-Fernandez R (2002). Localization of a Negative Vitamin D Response Sequence in the Human Growth Hormone Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292: 250-55.
- 58 Alonso M, Segura C, Dieguez C, Perez-Fernandez R (1998). High-affinity binding sites to the vitamin D receptor DNA binding domain in the human growth hormone promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247: 882-87.
- 59 Perez-Fernandez R, Alonso M, Segura C, Munoz I, Garcia-Caballero T, Dieguez C (1997). Vitamin D receptor gene expression in human pituitary gland. *Life Sci*, 60: 35-42.
- 60 Giordano M, Marchetti C, Chiorboli E, Bona G, Momigliano-Richiardi P (1997). Evidence for gene conversion in the generation of extensive polymorphism in the promoter of the growth hormone gene. *Hum. Genet.* 100, 249-55.
- 61 Wagner JK, Ebl A, Cogan JD, Prince MA, Phillips JA III and Mullis PE (1997). Allelic variations in the human growth hormone-1 gene promoter of growth hormone-deficient patients and normal controls. *Eur. J. Endocrinol.* 137, 474-81.
- 62 Schaufele F, West BL, Baxter JD (1992). Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*6:656-65.
- 63 Chang W, Zhou W, Theill LE, Baxter JD, Schaufele F (1996). An activation function in Pit-1 required selectively for synergistic transcription. *J Biol Chem* 271, 17733-38.
- 64 Palomino T, Baretino D, Aranda A (1998). Role of GHF-1 in the regulation of the rat growth hormone gene promoter by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J Biol Chem.* Oct 16;273(42):27541-7.
- 65 Giordano M, Lessi M, Paracchini R, Petri A, Ozerkan E, Cavallo L, Wasniewska M, Aimaretti G, Richiardi PM (2001) Molecular analysis of the growth hormone gene (GH1)

in isolated growth hormone deficiency. *The Journal of Endocrine Genetics*, 2:45-54.  
66

67 Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11, 1475-1489.

## **SEMINARI 2005 / 2006**

19 gennaio 2006– Prof.ssa Maria Grano (Dipartimento di Anatomia e Istologia, Facoltà di Medicina, Università di Bari): **Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation.**

13 febbraio 2006– Prof. Ferdinando Nicoletti (Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, Università “La Sapienza”, Roma): **New Perspectives in Metabotropic Glutamaterceptors Neurobiology.**

15 febbraio 2006– Prof. Daniele Sblattero (Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, Novara): **Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico.**

20 febbraio 2006– Prof.ssa Daniela Furlan (Facoltà di Medicina, Università dell'Insubria): **Tecniche di biologia e genetica molecolare nella diagnostica del carcinoma del colon.**

13 marzo 2006– Dott.ssa Antonia Follenza (Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, Novara): **Il Trapianto di cellule endoteliali (LSCE) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia.**

20 marzo 2006– Prof. Mikael Knip (Hospital for children and adolescents, University of Helsinki, Finland): **The Natural course of preclinical Type I Diabetes.**

23 marzo 2006– Dott.ssa Susanna Ceffa (Dipartimento di Oncologia,, Università di Pisa; Comunità di Sant' Egidio – DREAM Program): **La prevenzione della trasmissione verticale di HIV in Africa Sub Sahariana. L'esperienza del programma DREAM.**

6 aprile 2006- Dr Francesco Forconi (Divisione di Ematologia, Università degli Studi di Siena): **Aspetti immunogenetici e terapeutici della “hairy cell leukemia”.**

20 aprile 2006- Dott.ssa Daniela Cilloni (Divisione di Ematologia, Università di Torino- Polo S. Luigi, Orbassano): **Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative.**

4 maggio 2006- Prof. Mutti Luciano (Ospedale SS Pietro e Paolo, Borgosesia): **Il Mesotelioma: un modello di terapia traslazionale.**

30 maggio 2006- Prof.ssa Marialuisa Lavitrano (Universita' Milano Bicocca): **Sperm Mediated Gene Transfer. Storia e Applicazioni.**

27 giugno 2006- Prof.ssa Lia Rimondini (Universita' del Piemonte Orientale, Novara): **Osteointegrazione e superfici implantari.**

5 luglio 2006- Dott.ssa Renata Grifantini (Novartis Vaccines, Siena): **DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design.**

11 settembre 2006- Prof. Dieter Broemme (University of British Columbia): **The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis.**

### **CORSI 2006**

Corso online di Fondamenti di Biotecnologie modulo I

Corso online di Fondamenti di Biotecnologie modulo II

Corso online di Fondamenti di Biotecnologie modulo III

Corso online di Fondamenti di Biotecnologie modulo IV

## CONGRESSI 2006

- “45<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE)”, 30 giugno-3 luglio 2006, Rotterdam, Paesi Bassi.
- “4° Convegno sulla Real Time PCR. Gli approcci tecnologici dell’era post-genomica: oltre la Real Time PCR”, 12 settembre 2006, Dipartimento di Scienze Farmacologiche - Università degli Studi di Milano.

## ABSTRACTS 2006

- G. Corneli, S. Bellone, A. Petri, R. Paracchini, R. Baldelli, D. Vivenza, **M. Godi**, P. Momigliano-Richiardi, G. Bona. “Phenotypic and genotypic characteristics of patients with Hypopituitarism and GH Deficiency”. 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for paediatric Endocrinology (ESPE), Rotterdam, The Netherlands, June 30- July 3, 2006.
- G. Corneli, S. Bellone, A. Petri, R. Paracchini, R. Baldelli, D. Vivenza, **M. Godi**, M. Salerno, G. Aimaretti, M. Valenzise, C. De Sanctis, G. Weber, P. Momigliano, G. Bona. “Mutations within the transcription factors PRP-1, PIT-1, HESX-1 AND LHX-4 are rare in patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency”. XXVI Giornate Endocrinologiche Pisane, Pisa 8-10 Giugno 2006.
- G. Corneli, S. Bellone, A. Petri, R. Paracchini, R. Baldelli, D. Vivenza, M. Giordano, **M. Godi**, S. Mellone, P. Momigliano-Richiardi, G. Bona e Network di Biologia Molecolare in Endocrinologia pediatrica. “Caratterizzazione clinica e genotipica di pazienti affetti da Ipopituitarismo”. Il incontro Italiano sulle malattie Ipotalamo-Ipofisarie, Bologna 27-28 gennaio, 2006.



## PUBBLICAZIONI

- Garavelli L, Cerruti Mainardi P, Viridis R, Pedori S, Pastore G, **Godi M**, Provera S, Rauch A, Zweier C, Zollino M, Banchini G, Longo N, Mowat D, Neri G, Bernasconi S. “Genitourinary anomalies in Mowat-Wilson syndrome with deletion/mutation in the Zinc Finger Homeo Box 1B gene (ZFHX1B). Report of three Italian cases with hypospadias and review”. *Horm Res.* 2005;63(4):187-192. Epub 2005 May 20.
- Cerruti Mainardi P, Garavelli L, Pastore G, Viridis R, Pedori S, **Godi M**, Provera S, Rauch A, Zweier C, Castronovo C, Zollino M, Banchini G, Bernasconi S, Neri G. "Mowat–Wilson syndrome and mutation of the Zinc Finger Homeo Box 1B gene: a new syndrome probably under-diagnosed”. *Ital J Pediatr* 2005;31:116-125.
- Giordano M, **Godi M**, Giacopelli F, Lessi M, Mellone S, Paracchini R, Petri A, Bellone J, Ravazzolo R, Bona G, Momigliano-Richiardi P. “A polymorphism in a Pit-1 binding site in the growth hormone gene (GH1) proximal promoter induces a differential activity *in vitro*”. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 Apr 25;249(1-2):51-7.
- Vivenza D, Guazzarotti L, **Godi M**, Frasca D, di Natale B, Momigliano-Richiardi P, Bona G, Giordano M. “A Novel GH-1 Gene Splicing Mutation in an Italian family with Isolated Type II Growth Hormone Deficiency (IGHD II)”. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):980-6.
- Cerruti Mainardi P, Pastore G, Castronovo C, **Godi M**, Guala A, Tamiazzo S, Provera S, Pierluigi M, Dagna Bricarelli F. “The natural history of Cri du Chat Syndrome. A report from the Italian Register”. *Eur J Med Genet.* 2006 Jan 13; (Epub ahead of print).