

**Università degli Studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca**

**in**

**Medicina Molecolare**

*Ciclo XIX*

**Relazione 4° anno**

**ANALISI MOLECOLARE DI TRE NUOVE  
MUTAZIONI IDENTIFICATE NEL GENE GH1**

Candidato: Michela Godi

*Tutor:* Prof. Gianni Bona

## **INTRODUZIONE**

L'ormone della crescita GH è una proteina globulare monomerică, secreta dalle cellule somatotrope che rappresentano circa il 40% delle varianti cellulari dell'adenipofisi, localizzate prevalentemente nelle porzioni laterali della ghiandola [1]. Inizialmente essa viene sintetizzata sotto forma di un precursore di 217 aminoacidi, di cui 26aa del peptide segnale vengono eliminati mediante un taglio enzimatico. Il peptide maturo risulta così costituito da una singola catena di 191 aa (22 kDa) e rappresenta circa il 75% della forma circolante. *Splicing* alternativi danno origine a forme con minor peso molecolare (20 kDa e 17,5 kDa), meno rappresentate. Il *core* della molecola è rappresentato da due paia di alfa eliche, stabilizzate da due ponti disolfuro tra i residui 53-165 e 182-189 [2]. La variante di 20 kD, che costituisce il 10% del GH circolante, è prodotta da uno *splicing* alternativo, dovuto alla presenza di un sito alternativo accettore di *splicing* nell'esone 3; questo determina la delezione dei codoni codificanti per gli aminoacidi 32-46. Tale isoforma promuove la crescita e la differenziazione cellulare, possiede inoltre attività lattogenica durante la gravidanza, come l'ormone nativo, ma non presenta le sue proprietà iperglicemizzanti e l'azione lipolitica [3]. Altre forme minori e prodotte fisiologicamente a livelli bassissimi, dovute alla perdita degli esoni 3 e 3 / 4, sono state già riportate dalla letteratura [4], 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).

Il GH viene immagazzinato in granuli secretori e rilasciato in circolo tramite esocitosi in maniera intermittente [5]. Esso circola nel plasma in parte legato a due specifiche proteine, binding-proteins (BPs). Queste proteine trasportano l'ormone della crescita e ne modulano l'attività, dato che ne prolungano il tempo di emivita, ne regolano il legame al recettore GHR (*Growth Hormone Receptor*) e quindi l'accesso alle cellule bersaglio [6].

La produzione intermittente del GH 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 [6]. La secrezione pulsatile è sotto controllo dell'ipotalamo, strettamente connesso all'ipofisi attraverso il peduncolo ipofisario. La

regolazione è mediata da due neuropeptidi: 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 [7]. I due neuropeptidi vengono rilasciati nel sistema portale a livello del peduncolo ipotalamo-ipofisario e raggiungono specifici recettori presenti sulle cellule somatotrope; dall'interazione con essi vengono 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 recettore dell'ormone della crescita (GHR) è una proteina glicosilata di 620 aminoacidi (110 kD), che appartiene alla famiglia recettoriale per GH/prolattina/citochine, caratterizzata da un comune meccanismo di trasduzione del segnale. Il gene che codifica per il GHR si estende su 85 kb del cromosoma 5p13.1-12, ed è costituito da 10 esoni.

La molecola del GH presenta due siti di legame per il GHR, i quali interagiscono in maniera sequenziale con due molecole di tale recettore, permettendone la dimerizzazione [8]. Il GHR così attivato interagisce con una tirosina chinasi, JAK-2, la quale, a sua volta, è in grado di fosforilare una serie di molecole coinvolte nel segnale di traduzione, tra cui Stat5. Questa proteina, una volta attivata, è quindi in grado di regolare numerosi geni *target* del GH [9, 10].

Mutazioni nel gene del GH sono responsabili del deficit isolato di GH. Le mutazioni sino ad ora identificate sono soprattutto grosse delezioni che coinvolgono l'intero gene (IGHD IA), mutazioni di stop (IGHD IA e IGHDI IB) e mutazioni di *splicing* che hanno come conseguenza lo skipping dell'esone 3 (IGHDII). In alcune forme della malattia sono state identificate mutazioni missense [11,12] per le quali deve essere dimostrato sperimentalmente l'effetto funzionale.

## **SCOPO DEL LAVORO**

Scopo generale del mio progetto del dottorato di ricerca è l'identificazione delle cause genetiche che contribuiscono al deficit dell'ormone della crescita (GH) presente in individui con bassa statura e l'analisi funzionale delle variazioni trovate. La ricerca condotta in quest'ultimo anno ha riguardato, più specificatamente, l'analisi molecolare di tre nuove mutazioni identificate all'interno del gene GH1: R178H, G120V e C182X.

## **MATERIALI E METODI**

### Pazienti

Le tre pazienti analizzate erano tutte affette da IGHD di tipo II.

R178H: la paziente, nata dopo 38 settimane di gestazione, alla nascita pesava 2,225 kg, era lunga 47cm e presentava una circonferenza cranica di 35,0 cm. I genitori, non consanguinei, avevano un'altezza di 160 cm, la madre, e 170 cm, il padre. All'età di cinque anni la paziente mostrava un picco di GH di 11,9mU/L, un valore di IGF-1 di 11ng/ml (intervallo di riferimento: 17-250) ed un ritardo di accrescimento osseo di -3 anni. Da ulteriori analisi effettuate successivamente la paziente risultava affetta da celiachia. La mutazione *missense* R178H riscontrata nella paziente era presente in condizione di eterozigosi.

G120V: la paziente, nata nel Regno Unito, era figlia di genitori consanguinei, originari della Mauritania. All'età di 9,8 anni presentava una SDS dell'altezza di -5,0 ed un picco di GH di 0,1mU/L (dopo stimolo con Glucagone). La risonanza magnetica mostrava una severa ipoplasia dell'adenoipofisi. La mutazione *missense* G120V era presente in omozigosi.

C182X: di questa paziente, nata in Algeria, ma adottata nel Regno Unito, non si hanno molte notizie riguardo alla famiglia d'origine. All'età di 8 anni mostrava una SDS dell'altezza di -5,7, un picco di GH < 0,2mU/L (dopo stimolo con Glucagone) e valori di IGF-1 non misurabili. La risonanza magnetica rilevava un'ipoplasia dell'adenoipofisi. La mutazione di stop C182X identificata in questa paziente era presente in omozigosi.

### Vettori di espressione e mutagenesi

La sequenza del cDNA del gene GH1 wild-type (accession number J03071) è stata clonata all'interno del vettore di espressione pXGH5 (Nichols Institute Diagnostics, CA, 92675, USA), precedentemente digerito con l'enzima EcoRI, come descritto in Moseley et al. [13].

I tre mutanti studiati, R178H, G120V e C182X sono stati quindi ottenuti mediante mutagenesi sito-specifica utilizzando il kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene AG, Basel, Switzerland). Per ogni mutagenesi sono stati disegnati

oligonucleotidi specifici contenenti il nucleotide da modificare (R178H Forward 5'-GTCGAGACATTCCTGCACATCGTGCAAGTG-3', R178H Reverse 5'-CACTGCACGATGTGCAGGAATGTCTCGAC-3'; G120V Forward 5'-GACCTAGAGGAAGTCCATCCAAACGCTGAT-3', G120V Reverse 5'-ATCAGCGTTTGGATGACTTCCTCTAGGTC-3'; C182X Forward 5'-TGCCGATCGTGCAAGTGACGCTCTGTGGAG-3', C182X Reverse 5'-CTCCACAGAGCGTCACTGCACGATGCGCA-3'). Le cellule competenti XL1 blue (Stratagene) sono state quindi trasformate con i tre diversi costrutti e cresciute su terreno LB/ampicillina<sup>+</sup>. Dopo aver selezionato i cloni corretti mediante digestione con EcoRI, i plasmidi sono stati estratti (Plasmid Maxiprep, Jetstar) ed utilizzati nei vari esperimenti di trasfezione transiente.

#### Colture cellulari

La linea cellulare AtT-20/D16v-F2 (cellule tumorali ipofisarie murine) (ATCC, Manassas, VA, USA) è stata cresciuta in terreno DMEM (Biochrom AG Seromed, Germany) addizionato con 10% di FBS inattivato (Life Technologies, Invitrogen AG, Basel, Switzerland), 1% di piruvato di sodio e 100 U/l penicillina/streptomomicina.

La linea cellulare CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) (fornita dal Prof. U. Wiesmann, Inselspital, Bern, Switzerland) è stata cresciuta in terreno Ham's F12 (Biochrom AG Seromed, Germany) addizionato con 10% di FBS inattivato (Life Technologies, Invitrogen AG, Basel, Switzerland), 1% di piruvato di sodio e 100 U/l penicillina/streptomomicina. Entrambi i tipi di colture cellulari sono state mantenute a 37°C in atmosfera umidificata con CO<sub>2</sub> al 5%.

#### Analisi di Splicing

La linea cellulare CHO è stata trasfettata in maniera transiente con i costrutti contenenti il GH-wt o il mutante, mediante elettroporazione (Nucleofector, Amaxa Biosystems GmbH, Köln, Germany), utilizzando la soluzione *Nucleofector* T e il programma U-30. Le cellule sono state successivamente trasferite in piastre da 60mm in presenza di terreno preriscaldato 10% FCS. Come controllo negativo sono state utilizzate cellule CHO non trasfettate.

RT-PCR: Dopo 24 ore l'RNA totale è stato estratto e purificato mediante l'RNeasy Mini Kit (QIAGEN). La reazione di retrotrascrizione è stata effettuata in un volume totale di 25 µl contenente: 1 µg di RNA totale, 1.6 ng di oligonucleotidi p(dT)<sub>15</sub> (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), dNTPs 10 mM, tampone "first strand" 5x, 28U di Rnasin ricombinante, 200U di retro-trascrittasi M-MLV (Invitrogen). Il cDNA così ottenuto è stato amplificato utilizzando la soluzione "PCR Super Mix High Fidelity" (Invitrogen) in presenza di oligonucleotidi specifici per il gene umano GH-1 (GHcDNA Forward: 5'-ATGGCTACAGGCTCCCGGA-3'; GHcDNA Reverse: 5'-GAAGCCACAGCTGCCCTCCAC-3'). Il ciclo di PCR era così costituito: una denaturazione iniziale di 5 minuti a 94° C, seguita da 25 cicli di 30 secondi a 94° C di denaturazione, un annealing di 60 secondi a 60° C e un'estensione di 3 minuti a 68° C. È stata infine aggiunta un'estensione finale di 10 minuti a 72° C. Il DNA amplificato è stato quindi visualizzato mediante elettroforesi su gel *metaphore* all' 1,5%. Come controllo interno è stata utilizzato il gene GAPDH (Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) per stabilire sia la qualità del cDNA che eventuali differenze dovute al caricamento dei campioni (GAPDH Forward: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; GAPDH Reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3').

Western blot: 24 ore dopo la trasfezione l'estratto proteico totale è stato ottenuto utilizzando il tampone di lisi RIPA (Tris 50mM, NaCl 150mM, 1% NP40, 0,5% sodio desossicolato, 0,1% SDS). Gli estratti proteici (30µg) sono stati analizzati mediante SDS-PAGE (15% acrilammide) e trasferiti su membrana Immobilon P (Millipore, Bedford, MA, USA) mediante trasferimento *semi-dry* (Trans-Blot Semi-Dry apparatus, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La membrana è stata quindi incubata con i seguenti anticorpi: anticorpo policlonale GH (Cappel, MP Biomedicals 1:1000) ed anticorpo monoclonale β-actina (Sigma Aldrich, 1:1000). L'anticorpo secondario utilizzato è coniugato con la perossidasi (Amersham Biosciences). Le proteine sono state visualizzate attraverso un sistema di intensificazione della chemiluminiscenza (ECL, Amersham Biosciences) ed il segnale è stato analizzato mediante autoradiografia (Hyperfilm, Amersham).

### Saggio di Secrezione dell'ormone GH in cellule AtT-20

Circa  $2 \times 10^5$  cellule sono state piastrate in presenza di terreno DMEM 5% FCS, in piastre da sei pozzetti. Il giorno successivo sono state trasfettate in maniera transiente con 2  $\mu$ g di DNA, utilizzando il reagente FuGene 6 (Roche Diagnostics AG). Il vettore pcDNA3, del tutto simile al plasmide pXGH5 utilizzato per il clonaggio, è stato utilizzato come controllo negativo. Ventiquattr'ore dopo la trasfezione le cellule sono state stimulate con forskolina 50  $\mu$ M (Sigma Aldrich). Sono state quindi raccolte le aliquote del terreno di coltura prima della stimolazione (livello basale) e nei 15, 30, 60, 90, 120 e 150 minuti successivi. Il GH è stato misurato mediante il kit "DSL-10-1900 Active® human GH enzymelinked immunoabsorbent assay (ELISA)" (DSL).

La secrezione di GH è stata valutata successivamente anche a livello intracellulare. Dopo circa due ore dalla stimolazione le cellule sono state lavate con PBS 1X e lisate con il tampone RIPA. Il livello di GH è stato misurato sia in cellule stimulate (S) che non (NS).

### Saggio di proliferazione in cellule AtT-20

Al fine di studiare l'effetto del mutante R178H sulla crescita cellulare è stato effettuato un saggio di proliferazione cellulare dopo trasfezione transiente mediante elettroporazione (Nucleofector Amaxa Biosystems GmbH, Cologne, Germany), utilizzando la soluzione *Nucleofector* R e il programma A-23.

La proliferazione è stata testata mediante il saggio colorimetrico MTS (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega), secondo il protocollo fornito dalla ditta. Circa  $5 \times 10^4$  cellule sono state piastrate in quadruplicato in piastre da 96 pozzetti ed incubate per tre giorni. L'assorbanza è stata misurata ad una lunghezza d'onda di 490 nm mediante lo spettrofotometro Rainbow ELISA (Magelan software; Tecan Co., Gröding, Austria). L'efficienza della trasfezione è stata testata utilizzando il vettore EGFP-N1 (enhanced green fluorescent plasmid) fornito dalla ditta Amaxa Biosystems.

### Analisi con microscopio confocale

Circa  $0,12 \times 10^6$  cellule sono state fatte crescere in apposite fiasche *slide flask* (Falcon; Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA), e trasfettate con il reagente FuGENE6 (Roche Diagnostics AG). Il giorno seguente sono state fissate con paraformaldeide 4%,



permeabilizzate con Tween 20 0,05% in un tampone contenente BSA e successivamente incubate con un anticorpo primario anti-GH e con markers specifici per tre diversi compartimenti cellulari: Grp94,  $\beta$ COP e Rab3a. Ventiquattr'ore dopo le cellule sono state incubate per 30 minuti a 37°C con i due anticorpi secondari AlexaFluor 488 e Cy3 (Invitrogen, La Jolla, CA, USA), specifici, rispettivamente, per l'anticorpo primario anti-GH e per gli altri tre markers. Il controllo negativo è stato ottenuto omettendo l'anticorpo primario. Le immagini al microscopio confocale sono state analizzate mediante il microscopio confocale "Zeiss LSM 410 laser scanning", utilizzando le due lunghezze d'onda di 488nm e 517nm, rispettivamente per l'anticorpo AlexaFluor 488 e Cy3 e le lunghezze d'onda d'emissione 510nm e 575–640nm. L'analisi di co-localizzazione del GH wt con i tre compartimenti cellulari è stata eseguita mediante il software "Imaris 3.2 co-localization" (Bitplane AG, Zürich, Switzerland). Dopo aver ottenuto la scansione dell'immagine di una singola cellula i segnali fluorescenti dei due fluorocromi sono stati quantificati nell'area in cui risultavano sovrapposti. L'istogramma così ottenuto si riferisce ai picchi di sovrapposizione. La correlazione tra i fluorocromi è stata calcolata come correlazione di Pearson (1 in caso di perfetta correlazione; 0 se non c'è correlazione; -1 per una correlazione inversa).

#### Analisi statistica

I dati ottenuti dal saggio di proliferazione e dall'analisi confocale sono stati elaborati mediante l'analisi della varianza ANOVA (univariata) e con il test di Dunnet.

#### Analisi di Molecular Dynamics (MD)

L'analisi di simulazione MD è stata effettuata mediante il software YASARA, utilizzando il programma AMBER99 per i calcoli di dinamica molecolare. Le immagini sono state create con i programmi PYMOL e POVRAY.

## **RISULTATI**

La variazione R178H è stata identificata all'interno dell'esone 5 del gene GH-1, in posizione +1487. Si tratta di una nuova mutazione *missense*, in cui un residuo di arginina nel codone 178 viene convertito in un residuo di istidina. La paziente, affetta da IGHD di tipo II, presentava la mutazione in eterozigosi.

Le altre due variazioni G120V e C182X, localizzate rispettivamente all'interno del quarto e del quinto esone del gene GH-1 sono state identificate in omozigosi in due diverse pazienti, entrambe figlie di genitori consanguinei.

Al fine di identificare un eventuale ruolo funzionale di queste tre mutazioni è stata avviata un'analisi in vitro. Abbiamo innanzitutto valutato un possibile effetto dei mutanti nel processo di splicing. La sequenza del cDNA del gene GH-1 *wildtype* è stata clonata all'interno del vettore di espressione pXGH5, successivamente mutagenizzato utilizzando oligonucleotidi specifici per ottenere le tre variazioni. La linea cellulare CHO (Chinese Hamster Ovary) è stata quindi trasfettata in maniera transiente con i costrutti contenenti il GH-wt e i tre mutanti (da soli o co-espressi con il wt). Dato che le cellule CHO normalmente non esprimono l'ormone della crescita, l'unica forma di GH espressa risulta essere quella sintetizzata dai costrutti stessi. In questo modo è possibile evitare qualsiasi tipo di interferenza da parte del GH endogeno. Ventiquattr'ore dopo la trasfezione è stato estratto l'mRNA totale. Il livello di espressione di tutti e tre i mutanti, sia in eterozigosi che in omozigosi, non mostra nessuna differenza significativa rispetto al GH-wt (fig. 1). Abbiamo quindi analizzato il livello di espressione del GH prodotto dai mutanti, mediante Western blot. R178H sembra esprimere principalmente l'isoforma di 22 kDa senza mostrare particolari differenze rispetto al wt (fig. 2A). Tuttavia in presenza delle due variazioni G120V e C182X, in omozigosi, la sintesi del peptide GH maturo risulta totalmente compromessa (fig. 2B).

Successivamente abbiamo valutato un eventuale effetto delle tre mutazioni sull'attività secretoria dell'ormone della crescita. I mutanti sono stati quindi espressi nella linea cellulare AtT-20 in modo da poterne analizzare l'attività secretoria sia a livello extracellulare che intracellulare. Anche le cellule AtT-20 normalmente non esprimono il

gene GH, ma a differenza della linea CHO sono cellule neuroendocrine, quindi possiedono la completa *pathway* di regolazione secretoria ormonale.

Circa ventiquattr'ore dopo la trasfezione le cellule sono state stimolate per circa due ore con forskolina, un laudano-diterpene prodotto dalla pianta indiana *Plectranthus barbatus*, comunemente utilizzato negli studi di fisiologia cellulare. Essa è in grado di stimolare i recettori cellulari mediante l'attivazione dell'enzima adenilato ciclasi, aumentando i livelli intracellulari di AMP ciclico, a sua volta fondamentale per la comunicazione cellulare dell'asse ipotalamico/ipofisario e per la regolazione di *feedback* ormonale. Come controllo negativo sono state utilizzate cellule trasfettate solo con il vettore pcDNA3.

E' stato innanzitutto quantificato il GH secreto a livello extracellulare. Diverse aliquote del terreno di coltura sono quindi state raccolte prima della stimolazione (rilascio basale) e a differenti intervalli di tempo successivi (da 15 a 150 minuti). I valori di tutte le misurazioni sono stati calcolati prendendo come riferimento il livello basale di GH (16.5 ng/mL) misurato nello stesso terreno di coltura in cui le cellule trasfettate erano cresciute, fissato a 100%. Complessivamente la concentrazione del mutante R178H tende ad aumentare progressivamente nel tempo, mostrando un andamento leggermente inferiore rispetto al rilascio ormonale del GH-wt (fig 3A). Tuttavia i livelli di GH secreti dai mutanti G120V e C182X risultano estremamente ridotti. Queste due variazioni sembrerebbero quindi interferire nell'attività secretoria dell'ormone della crescita.

La sintesi di GH è stata successivamente quantificata anche a livello intracellulare. Le cellule sono state nuovamente stimolate con forskolina, dopodiché sia i campioni stimolati (S) che non (NS) sono stati lisati ed il contenuto di GH è stato quantificato. Anche a livello intracellulare l'attività secretoria del GH risulta ridotta rispetto al wt in presenza del mutante R178H e pressoché nulla con le due variazioni G120V e C182X (fig 3B).

Abbiamo quindi approfondito lo studio sull'attività secretoria mediante un'analisi con microscopia confocale, effettuata per ora solo con il mutante R178H. La linea cellulare AtT-20 è stata quindi trasfettata con il GH-wt e con il mutante in omozigosi. Le cellule sono state successivamente incubate con l'anticorpo anti-GH (in grado di identificare l'ormone della crescita), Grp94,  $\beta$ COP e Rab3a. Grp94 (*glucose-related proteins*) è una

chaperonina del reticolo endoplasmatico ed appartiene ad un gruppo di proteine *heat shock* (Hsp 90). Essa agisce quindi come marcatore per l'RE [14, 15];  $\beta$ COP è il principale componente del complesso proteico COP-I, fondamentale nel trasporto vescicolare tra il reticolo endoplasmatico e il Golgi. Viene utilizzato come marker delle cisterne *cis* del Golgi [16]. Rab3, infine, appartiene alla famiglia delle proteine Rab e alla superfamiglia delle GTPasi e viene utilizzato come marker per le vescicole secretorie [17].

Nelle figure 4AI ed 4AII sono indicati, rispettivamente, l'accumulo complessivo dell'ormone GH (in verde) e la localizzazione dei tre compartimenti cellulari coinvolti nel processo di secrezione del GH (in rosso): il reticolo endoplasmatico, il complesso di Golgi e le vescicole secretorie. In figura 4AIII è invece mostrata la localizzazione cellulare del GH in ciascun compartimento. L'intensità fluorescente dei due fluorocromi è stata misurata nelle aree di co-localizzazione in tutti e tre i compartimenti, sia per il GH-wt che per il mutante R178H. Il grado di co-localizzazione dell'ormone GH con i tre markers è stato quindi determinato su cellule singole, mediante il software Imaris (fig. 4AIV). La media dei coefficienti di correlazione di Pearson non evidenzia nessuna differenza significativa nel livello di co-localizzazione subcellulare tra il GH-wt ed il mutante R178H all'interno dei tre compartimenti cellulari presi in considerazione (fig. 4B).

Al fine di confermare e avvalorare i dati ottenuti con i precedenti esperimenti abbiamo effettuato un saggio di proliferazione cellulare, per testare se la crescita cellulare potesse essere influenzata dalle tre mutazioni R178H, G120V e C182X. La linea cellulare AtT-20 è stata trasfettata in maniera transiente, mediante elettroporazione. Il numero di cellule è stato quindi determinato con un saggio colorimetrico, misurando l'assorbanza nei quattro giorni successivi la trasfezione. Durante questo intervallo di tempo non sono state osservate differenze significative nel livello di proliferazione nelle cellule trasfettate con il GH-wt e con i tre mutanti da soli e coespressi con il GH-wt (fig. 5A, 5B e 5C). I campioni presentavano valori del tutto equivalenti tra loro, e leggermente superiori a quelli mostrati dalle cellule trasfettate solo con il vettore di espressione pUC18, utilizzato come controllo negativo. Questi risultati, quindi, non evidenziano nessun effetto negativo sull'attività proliferativa del GH da parte delle tre mutazioni.

Nell'ipotesi che le tre mutazioni potessero in qualche modo alterare il normale legame dell'ormone GH con il suo recettore (GHR) è stata infine effettuata un'analisi di dinamica molecolare (MD). Per ora abbiamo analizzato solo il mutante R178H. Il codone 178 è localizzato nella porzione centrale dell'elica 4 della molecola del GH, la quale, in base alla letteratura, sembra essere coinvolta nel legame con il GHR. L'interazione con il recettore del GH è stata così simulata sia con una molecola di GH *wildtype* sia con la variante R178H (fig. 6A). Dall'analisi effettuata con il software YASARA è evidente che l'introduzione di un residuo di istidina (indicata in rosso in figura 6B) presenta una catena laterale molto più corta rispetto a quella mostrata dall'arginina (indicata in verde). La sostituzione Arg178His provocherebbe quindi un ridimensionamento della superficie molecolare, indicata come una rete rossa, con un possibile effetto negativo sull'interazione tra le due molecole. La normale dimerizzazione potrebbe quindi risultare compromessa, e di conseguenza, anche il normale legame tra il GH e il GHR.

## **DISCUSSIONE**

Tre nuove mutazioni, due *missense* (R178H e G120V) e una *nonsense* (C182X) sono state identificate all'interno del gene GH1 in tre pazienti affetti da IGHD di tipo II. L'analisi di splicing dei tre mutanti non rivela differenze significative rispetto al GH-wt, mostrando livelli di trascrizione del tutto paragonabili. Tuttavia, le due variazioni G120V e C182X, quando espresse da sole, sembrerebbero compromettere l'espressione del peptide maturo. Anche l'attività secretoria del GH da parte di questi due mutanti appare estremamente ridotta, sia a livello extra- che intracellulare. Il rilascio di GH in presenza della variazione R178H tende invece ad aumentare progressivamente nel tempo, dopo stimolazione con forscolina, ma con valori leggermente inferiori rispetto a quelli mostrati dal GH-wt.

L'analisi mediante microscopia confocale, effettuata per ora solo con il mutante R178H, non evidenzia nessuna alterazione particolare. La localizzazione subcellulare del GH appare del tutto simile a quella del wt, in tutti i compartimenti esaminati (RE, complesso di Golgi e granuli secretori). Un'ulteriore conferma di questi risultati è stata ottenuta testando la proliferazione cellulare. Anche in questo caso non è stato evidenziato nessun effetto negativo sulla crescita cellulare da parte dei tre mutanti.

L'analisi funzionale delle tre mutazioni R178H, G120V, C182X ha quindi finora identificato solo un effetto negativo sull'attività secretoria del GH, più evidente con i mutanti G120V e C182X. Queste due variazioni sembrerebbero compromettere la sintesi del peptide maturo, come dimostrato dagli esperimenti di Western blot.

Nella mutazione *nonsense* C182X l'introduzione di un codone di stop al posto di un residuo di cisteina e la conseguente rottura del ponte disolfuro coinvolto, dà origine ad una proteina tronca, in grado di compromettere la normale funzionalità del GH.

La variazione *missense* G120V è invece localizzata all'interno del quarto esone del gene GH1, sulla terza  $\alpha$ -elica della molecola del GH. La presenza di un residuo di glicina in questa posizione gioca un ruolo molto importante nell'attività biologica del GH. Questo aminoacido è caratterizzato da una catena laterale minima e non-polare e sembra formare una cavità nella porzione centrale dell'elica. Eventuali mutazioni in questa regione possono dare origine a molecole analoghe dell'ormone della crescita, in grado di alterarne la normale attività. È noto dalla letteratura che la sostituzione del residuo di glicina con uno di arginina in posizione 120 genera il peptide G120R, un analogo del GH. Questa variazione provoca l'alterazione di uno dei due siti di legame per il GHR, compromettendone la normale dimerizzazione [18-20].

Il codone 178, infine, è posizionato nella parte terminale del quinto esone, corrispondente alla porzione centrale dell'elica 4, in prossimità di un sito di legame per lo ione  $Zn^{2+}$ . È stata dimostrata l'importanza di questo ione nel modulare il rilascio di GH dalle vescicole secretorie [21,22]. Il GH umano è in grado di formare un complesso dimerico (44kDa) solo in presenza di  $Zn^{2+}$ . Tuttavia, elevate concentrazioni di zinco tendono ad inibire la secrezione di GH. La mutazione *missense* R178H potrebbe quindi alterare il normale legame dello ione zinco con il GH, compromettendo il rilascio dell'ormone della crescita dalla ghiandola ipofisaria [23].

Il codone 178, inoltre, si trova in una regione normalmente coinvolta nel normale legame tra una molecola di GH e il suo recettore GHR. La variazione di un residuo di arginina con uno di istidina nel codone 178 potrebbe quindi compromettere il normale legame del GH con il suo recettore (GHR). Una prima analisi con un modello artificiale effettuato solo per R178H sembrerebbe avvalorare questa ipotesi, confermando un effetto negativo da parte di questo mutante sull'interazione delle due molecole. L'introduzione di un residuo di istidina nel codone 178 comporterebbe una riduzione della catena laterale aminoacidica e il successivo ridimensionamento della superficie molecolare. E' quindi ragionevole ipotizzare un conseguente effetto negativo a livello della normale interazione tra una molecola di GH con il suo recettore. Tuttavia, se la mutazione alterasse il legame tra il GH e il GHR non si spiegherebbe la presenza del deficit di GH riscontrato nella paziente.

Sono tutt'ora in corso ulteriori esperimenti al fine di chiarire l'effettivo ruolo svolto dalle tre mutazioni identificate nel gene GH1. Verranno ripetuti gli esperimenti riguardanti sia la proliferazione cellulare sia l'attività secretoria del GH, in modo da poter effettuare anche un'analisi statistica. Inoltre verrà approfondita l'analisi con microscopia confocale e lo studio di dinamica molecolare anche per i due mutanti G120V e C182X.

Fig.1. RT-PCR.

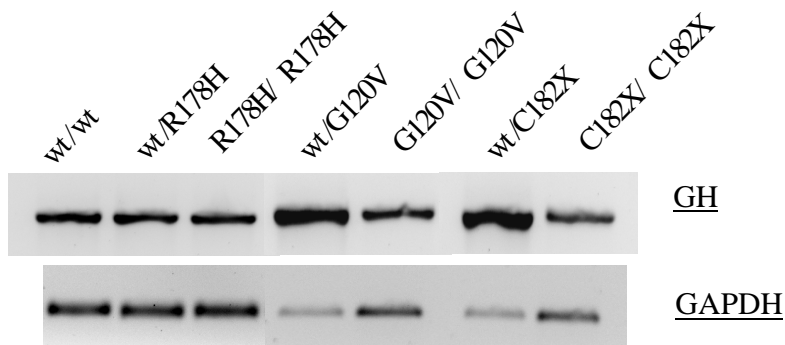


Fig.2. Western-blot.

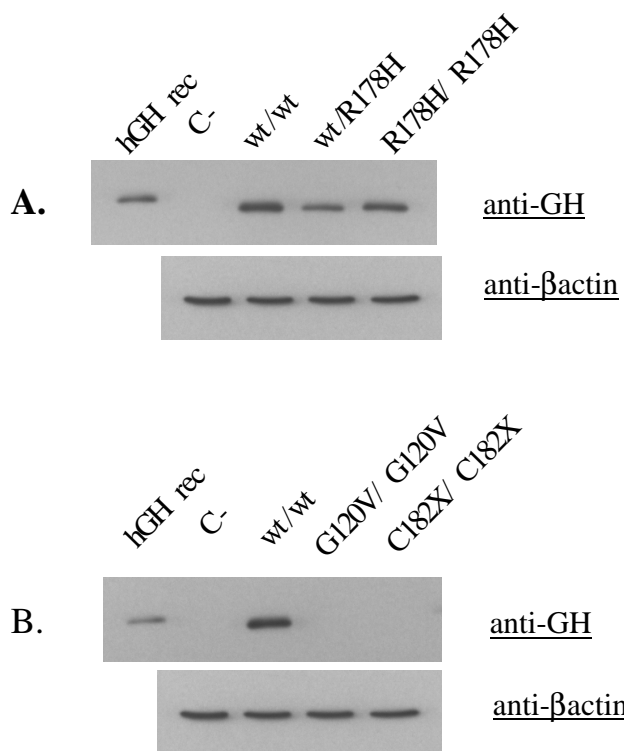




Fig.3. Saggio di Secrezione.

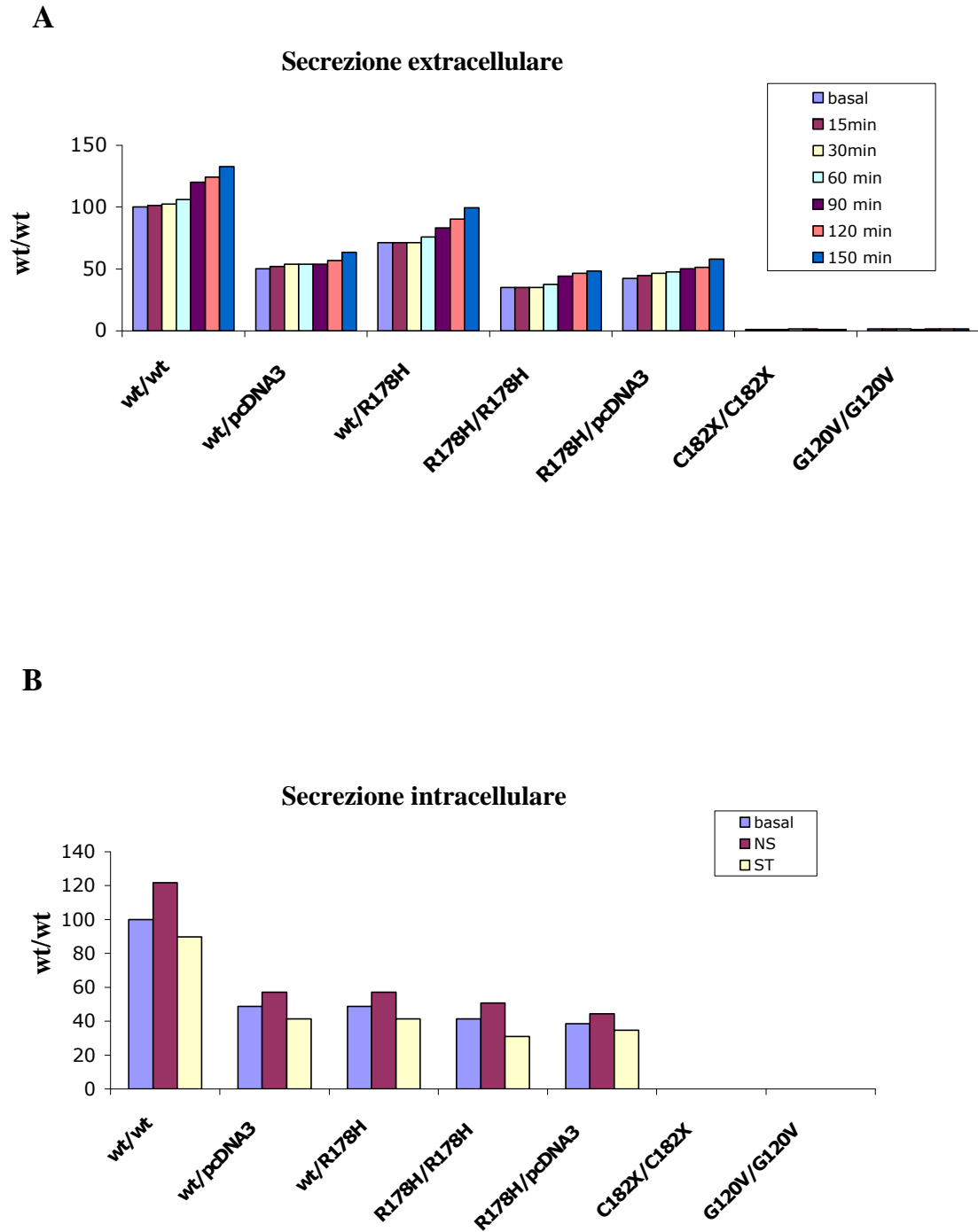
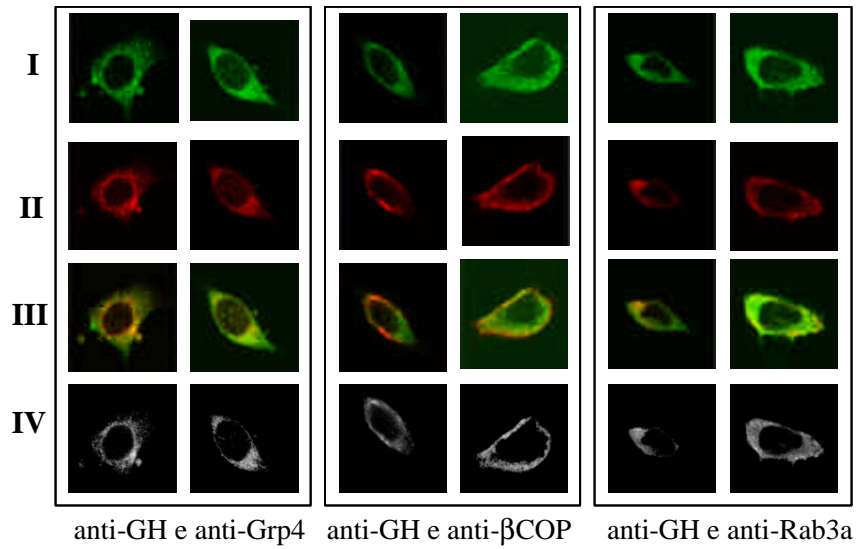


Fig. 4. Localizzazione subcellulare.

A)



B)

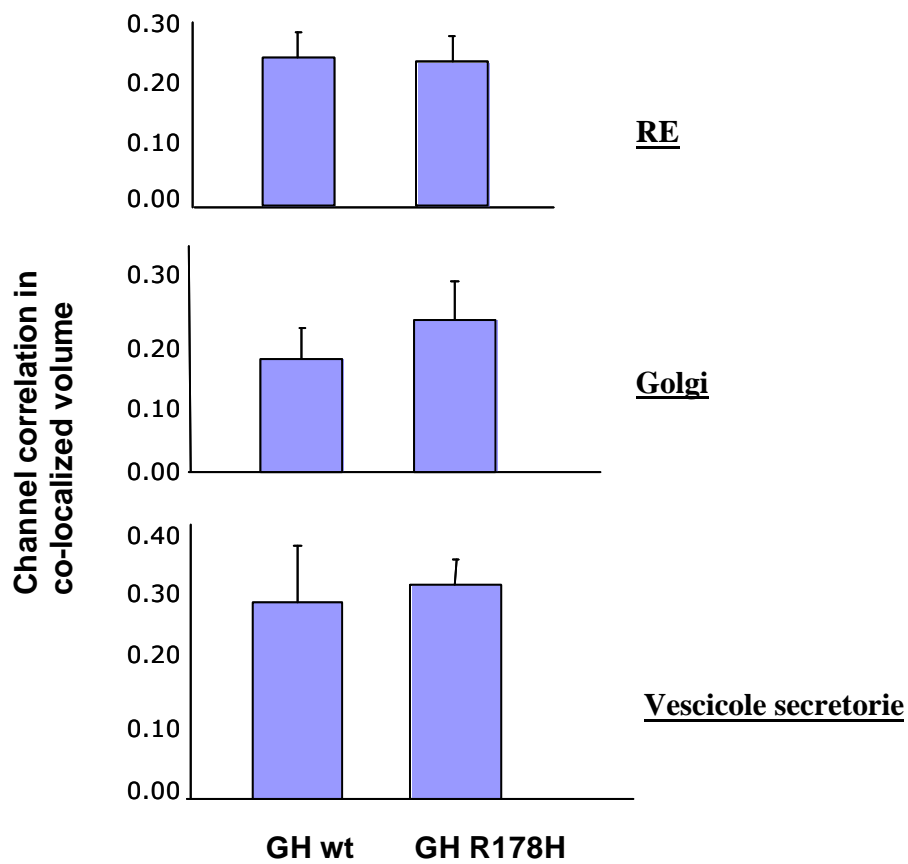
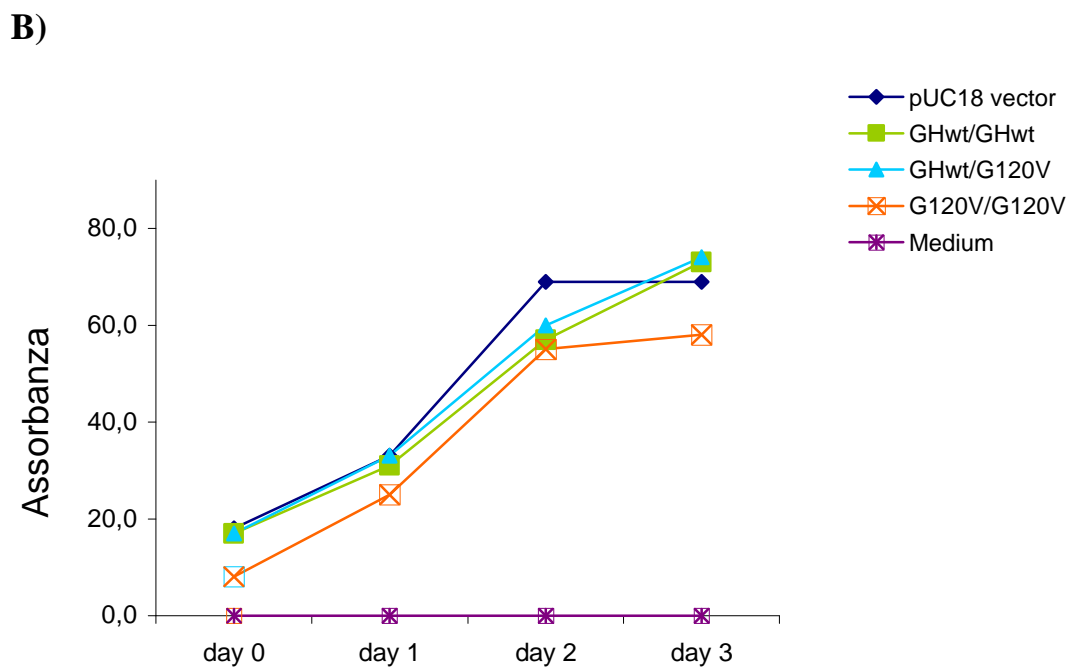
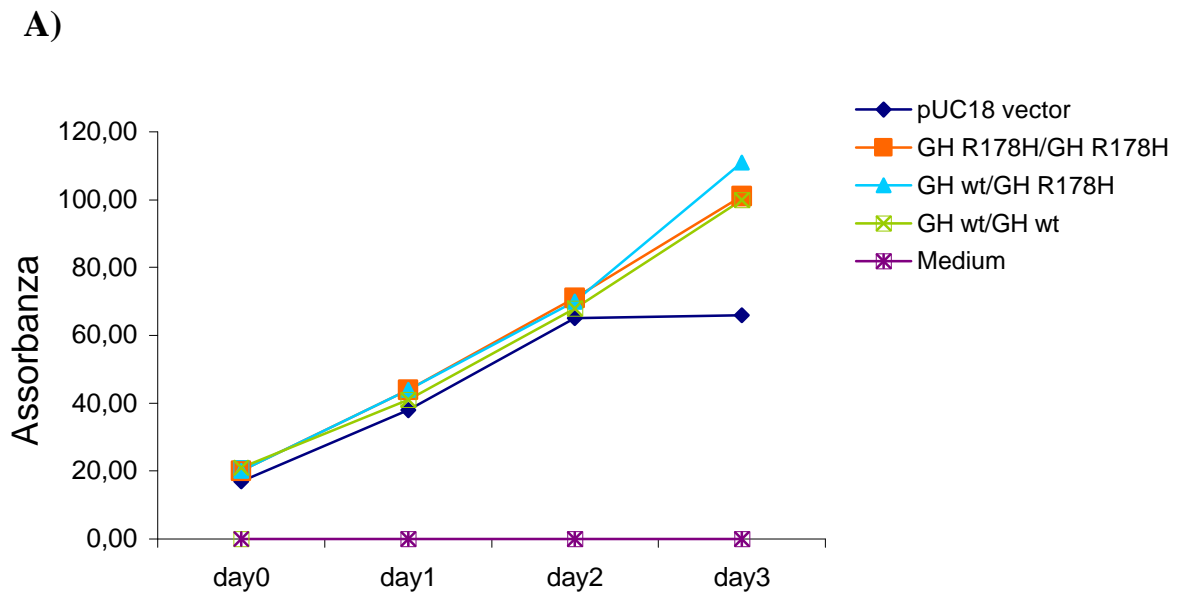


Fig. 5. Proliferaazione cellulare.



C)

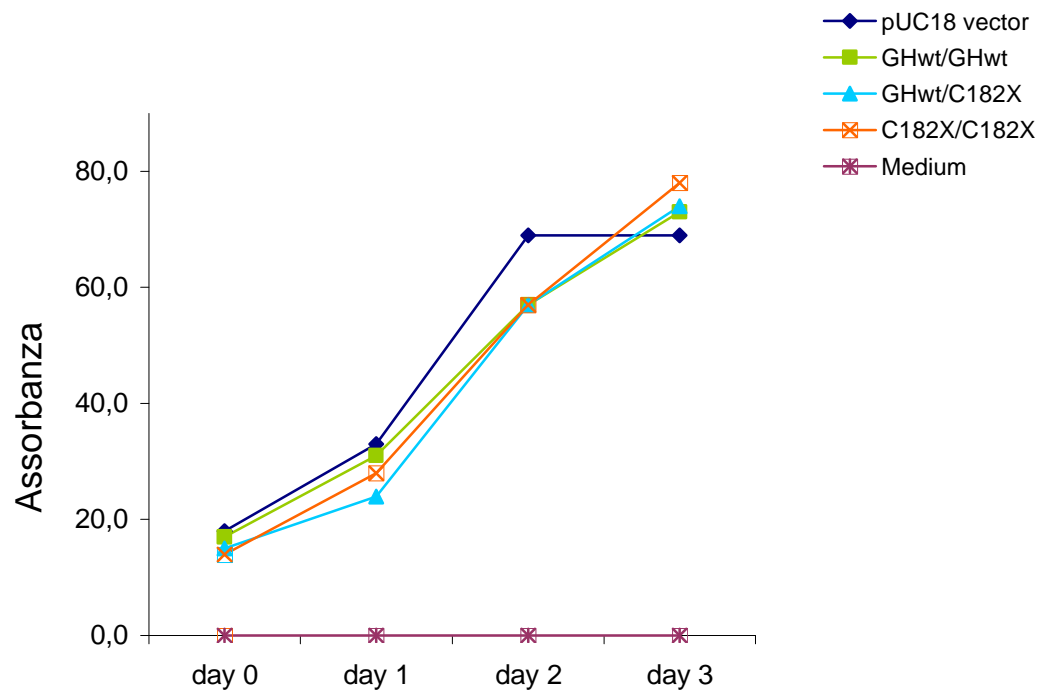
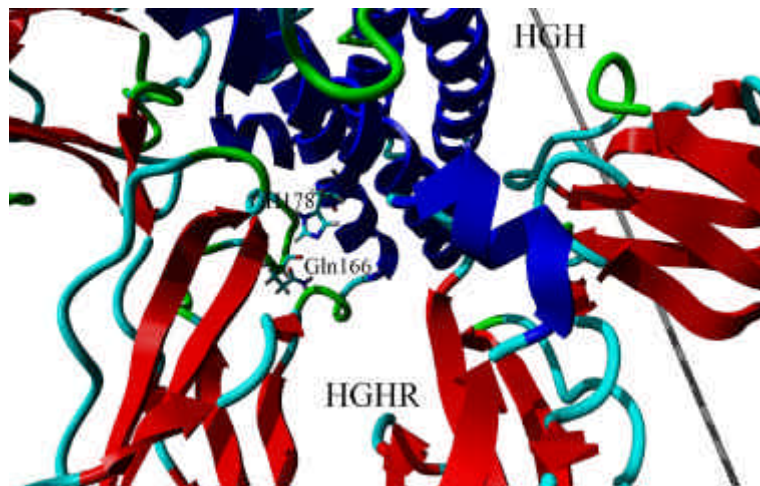
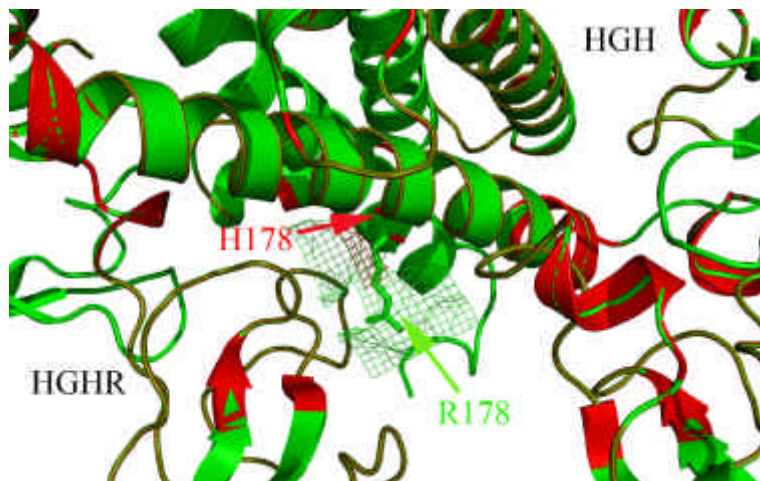


Fig. 5. Analisi MD.

A)



B)



## **BIBLIOGRAFIA**

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Procter AM, Phillips 3rd JA, Cooper DN (1998). The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Hum Genet* 103:255–72.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

8. Wells JA (1996). Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1-6.
9. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C (1993). Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74:237-44.
10. Argetsinger LS, Carter-Su C (1996). Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev* 76:1089-1107.
11. Cogan JD, Phillips JA3rd, Sakati N, Frisch H, Scober E, Milner RD (1993). Heterogeneous growth hormone (GH) gene mutations in familial GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 76(5):1224-8.
12. Wagner JK, Eblée A, Hindmarsh PC, Mullis PE (1998). Prevalence of human GH-1 gene alterations in patients with isolated growth hormone deficiency. *Pediatr Res* 43(1):105-10.
13. Moseley CT, Mullis PE, Prince MA, Phillips JA, 3rd (2002). An exon splice enhancer mutation causes autosomal dominant GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 87:847-52.
14. Arvan P & Castle D (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochemical Journal* 332: 593-610.
15. Nauseef WM, McCormick SJ & Clark RA (1995). Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase. *Biochemical Journal* 270:4741-47.

16. Oprins A, Duden R, Kreis TE, Geuze HJ & Slot JW (1993). Beta-COP localizes mainly to the cis-Golgi side in exocrine pancreas. *Journal of Cell Biology* 121:49–59.
17. Matteoli M, Takei K, Cameron R, Hurlbut P, Johnston PA, Sudhof TC, Jahn R & De Camilli P (1991). Association of Rab3A with synaptic vesicles at late stages of the secretory pathway. *Journal of Cell Biology* 115:625–33.
18. Cunningham BC, Ultsch M, Devos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA (1991). Dimerization of the extracellular domain of the human growth-hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 254:821-825.
19. Chen WY, White ME, Wagner TE, Kopchick JJ (1991). Functional antagonism between endogenous mouse growth-hormone (GH) and a GH analog results in dwarf transgenic mice. *Endocrinology* 129:1402-1408. *The Journal of Biological Chemistry* 270; 16:9222-26.
20. Dattani MT, Hindmarsh PC, Brook CGD, Robinson ICA, Kopchick JJ, Marshall NJ (1995). G120R, a Human Growth Hormone Antagonist, shows Zinc-dependent agonist and antagonist activity on Nb2 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 270; 16:9222-26.
21. La Bella F, Dular r, Vivian S, Queen S (1973). *Biochem Biophys. Res. Commun* 52,786.
22. Lorenson MY, Robson DL, Jacobs LS (1983). *The Journal of Biological Chemistry* 258,8618.
23. Cunningham BC, Mulkerrin MG, Wells JA (1991). Dimerization of Human Growth-Hormone by Zinc. *Science, New Series*, 253(5019):545-48.



## **CORSI FREQUENTATI**

### 2004

- Corso di “Utilità pratica della Diagnostica Molecolare in Endocrinologia”. Istituto Auxologico, 20 novembre 2004 – Cusano Milanino.

### 2005

- Corso di Inglese – Prof. Colin Irving-Bell.

### 2006

- Corso di Statistica Medica – Prof. Corrado Magnani.
- 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 FREQUENTATI**

- “1° Incontro Italiano sulle Malattie Ipotalamo-ipofisarie”, 3-5 febbraio 2005, Palazzo dei Congressi – Firenze.
- “XIII Convention Scientifica Yelethon”, 6-8 marzo 2005, Palazzo dei Congressi – Salsomaggiore Terme.
- “Serono Symposia International Conference on: Genetics of Autoimmune Diseases”, 18-20 marzo 2005, Cannes.
- “XV Congresso SIEDP”, 13-15 ottobre 2005, S.Margherita di Pula – Cagliari.
- “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.
- “Giornata Scientifica della Clinica Universitaria Pediatrica Inselspital di Berna”, 23 marzo 2007, Kemmeriboden-Bad, Svizzera.

- “XVI Congresso SIEDP”, 11-13 ottobre 2007, Parma.

### **COMUNICAZIONI A CONGRESSI**

#### A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster).

- **M. Godi**, S. Mellone, L. Tiradani, Y. Carlomagno, A. Petri, G. Corneli, D. Vivenza, T. Arrigo, S. Bellone, C. Santoro, P. Momigliano-Richiardi, G. Bona, M. Giordano. “Un polimorfismo funzionale nel sito di legame del recettore della vitamina D (VDRE) nel promotore del gene GH1 è un fattore genetico di rischio per il deficit isolato di GH (IGHD)”. XVI Congresso SIEDP, 11-13 ottobre 2007, Parma.
- **M. Godi**, M. Giordano, S. Mellone, D. Vivenza, R. Paracchini, A. Petri, S. Bellone, R. Baldelli, J. Bellone, G. Aimaretti, G. Bona, P. Momigliano-Richiardi. “Un polimorfismo localizzato all’interno del sito di legame del recettore della vitamina D nel promotore del gene dell’ormone della crescita (GH) è associato a deficit isolato di GH (IGHD)”. XV Congresso SIEDP, 13-15 ottobre 2005, S. Margherita di Pula - Cagliari.

#### B) Altre comunicazioni

- S. Mellone, T. Arrigo, G. Aimaretti, L. Tiradani, A. Petri, D. Vivenza, Y. Carlomagno, **M. Godi**, G. Corneli, P. Momigliano-Richiardi, G. Bona, M. Giordano. “Identificazione di una nuova mutazione dominante nel gene GHRHr (Growth hormone releasing hormone receptor) in due pazienti affetti

da deficit isolato di GH (IGHD). X Congresso SIGU, 14-16 novembre 2007, Montecatini Terme (PT).

- **M. Godi**, S. Mellone, L. Tiradani, Y. Carlomagno, A. Petri, G. Corneli, D. Vivenza, T. Arrigo, S. Bellone, C. Santoro, P. Momigliano-Richiardi, G. Bona, M. Giordano. “Un polimorfismo funzionale nel sito di legame del recettore della vitamina D (VDRE) nel promotore del gene GH1 e’ un fattore genetico di rischio per il deficit isolato di GH (IGHD)”. X Congresso SIGU, 14-16 novembre 2007, Montecatini Terme (PT).
- Y. Carlomagno, M. Salerno, D. Vivenza, **M. Godi**, L. Tiradani, D. Capalbo, S. Mellone, G. Bona, P. Momigliano-Richiardi, M. Giordano. “Identificazione di una nuova mutazione di splicing nel gene *Pit-1* in una famiglia affetta da deficit combinato di ormoni ipofisari (CPHD)”. X Congresso SIGU, 14-16 novembre 2007, Montecatini Terme (PT).
- G. Corneli, D. Vivenza, S. Mellone, L. Tiradani, Y. Carlomagno, **M. Godi**, S. Bellone, G. Aimaretti, M. Giordano, P. Momigliano-Richiardi, G. Bona. “Idiopathic isolated GH deficiency (IGHD) and combined pituitary hormone deficiency (CPHD) in Italy: genetic screening and clinical correlates.” European Congress of Endocrinology, Budapest, Hungary, 28 aprile-2 maggio 2007.
- 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, Paesi Bassi, 30 giugno-3 luglio 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". II incontro Italiano sulle malattie Ipotalamo-Ipofisarie, Bologna 27-28 gennaio, 2006.
- D.Vivenza, L.Guazzarotti, D.Frasca, **M.Godi**, C Caprio, S.Bellone, S.Mellone, B.di Natale, G.Bona, P.Momigliano- Richiardi, M.Giordano. "Nuova mutazione a carico del gene GH1 in una famiglia italiana affetta da deficit isolato di GH (IGHD) di tipo II". XV Congresso SIEDP, 13-15 ottobre 2005, S. Margherita di Pula - Cagliari.
- R. Paracchini, A. Petri, S. Bellone, R. Baldelli, J. Bellone, D. Vivenza, M. Giordano, **M. Godi**, S. Mellone, P. Momigliano, G. Bona. " La Biologia Molecolare nella diagnostica delle patologie ipofisarie". XV Congresso SIEDP, 13-15 ottobre 2005, S. Margherita di Pula - Cagliari.
- M. Giordano, D. Vivenza, L. Guazzarotti, B. Di Natale, **M. Godi**, S. Mellone, G. Bona, P. Momigliano Richiardi. "Nuova mutazione a carico del gene GH1 in una famiglia Italiana affetta da deficit isolato di GH (IGHD) di tipo II". VIII Congresso SIGU, 28 settembre-1 ottobre 2005, Chia Domus De Maria, Cagliari.
- D.Vivenza, L.Guazzarotti, D.Frasca, **M.Godi**, C Caprio, S.Bellone, S.Mellone, B.di Natale, G.Bona, P.Momigliano-Richiardi, M.Giordano." A

novel GH-1 Gene Splicing Mutation in an Italian family with Isolated Type II Growth Hormone Deficiency (IGHD II)". VII Congresso ESPE, 21-24 settembre 2005, Lione.

- M. Giordano, S. Mellone, A. Petri, R. Paracchini, **M. Godi**, I. Bellone, S. Bellone, D. Vivenza, G. Bona, P. Momigliano Richiardi. "Un polimorfismo nel sito di legame del recettore della vitamina D (VDR) nel promotore del gene dell'ormone della crescita (GH1) è associato a deficit isolato di GH (IGHD)." VII Congresso SIGU, 13-15 ottobre 2004, Pisa.
  
- L. Garavelli, P. Cerruti Mainardi, R. Viridis, S. Pedori, G. Pastore, **M. Godi**, S. Provera, A. Rauch, C. Zweier, M. Zollino, G. Banchini, S. Bernasconi, G. Neri. "Le anomalie genito-urinarie sono frequenti nella sindrome di Mowat-Wilson con delezione/mutazione in *ZFH1B* (SIP1): descrizione di 3 casi italiani con ipospadia e review." VII Congresso SIGU, 13-15 ottobre 2004, Pisa.

### **ARTICOLI SCIENTIFICI**

- Giordano M, **Godi M**, Mellone S, Tiradani L, Carlomagno Y, Petri A, Ferrante D, Corneli G, Vivenza D, Arrigo T, Bellone S, Giacomelli F, Santoro C, Bona G, Momigliano-Richiardi P. "A functional common polymorphism in the Vitamin D-Responsive Element (VDRE) of the GH1 promoter contributes to Isolated Growth Hormone Deficiency (IGHD) susceptibility". Submitted.
  
- 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.

- 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.
  
- Giordano M, **Godi M**, Giacobelli 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.
  
- 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.
  
- 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.

## **SEMINARI 2006 / 2007**

19 ottobre 2006 - Prof. Di Nardo Paolo (Laboratorio di cardiologia molecolare e cellulare; Dip. Medicina interna; Facoltà di Medicina; Università Tor Vergata - Roma):

**Stem cells in cardiac pathophysiology and treatment.**

24 novembre 2006 - Prof. Marco Tripodi (Università di Roma - La Sapienza): **Vita,**

**opera e miracoli dell'epatocita.**