

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze Mediche di Novara

DOTTORATO DI RICERCA
IN MEDICINA MOLECOLARE
(XIX Ciclo)



**ANALISI MOLECOLARE DEL DEFICIT
DELL'ORMONE DELLA CRESCITA**

Tutor: Prof. Gianni Bona

Dottoranda: Godi Michela M.

Relazione I anno

2003-2004

SCOPO

Scopo 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.



L'ORMONE GH

L' ormone della crescita umano, GH, è una proteina secreta dalle cellule somatotrope del lobo anteriore dell'ipofisi (fig.1). La sua produzione è massima durante la crescita e diminuisce nell'adulto [1, 2]. Questo diverso grado di produzione è giustificato dal principale ruolo svolto dall'ormone: l'accrescimento. Il GH è un ormone multifunzionale (fig.2), infatti oltre a promuovere la crescita è essenziale per la differenziazione cellulare e svolge importanti funzioni sul metabolismo proteico, glucidico e lipidico (rende positivo il bilancio azotato, aumentando l'incorporazione degli aminoacidi e delle proteine, diminuisce il contenuto lipidico dei tessuti ed aumenta la glicemia) [3, 4].

L'ormone 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 [5]. L'espressione del gene del GH (GH1) genera 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, è prodotta da uno splicing alternativo a livello dell'esone 2 del gene GH1, per la presenza di un sito accettore di splicing nell'esone 3; questo determina la delezione dei codoni codificanti per gli aminoacidi 32-46 [6]. Sono note, infine, forme più rare: una del peso di 17,5 kD, mancante degli aminoacidi 32-71 codificati dall'esone 3; altre, inattive, derivano da splicing che causano la delezione degli esoni 3 e 4 oppure 2, 3 e 4 [7].

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 [7]. Esso circola nel plasma in parte legato 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, ne contengono le escursioni plasmatiche in relazione a stimoli esogeni ed endogeni [3].

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 [3]. 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 [8]. 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.

Fig.1

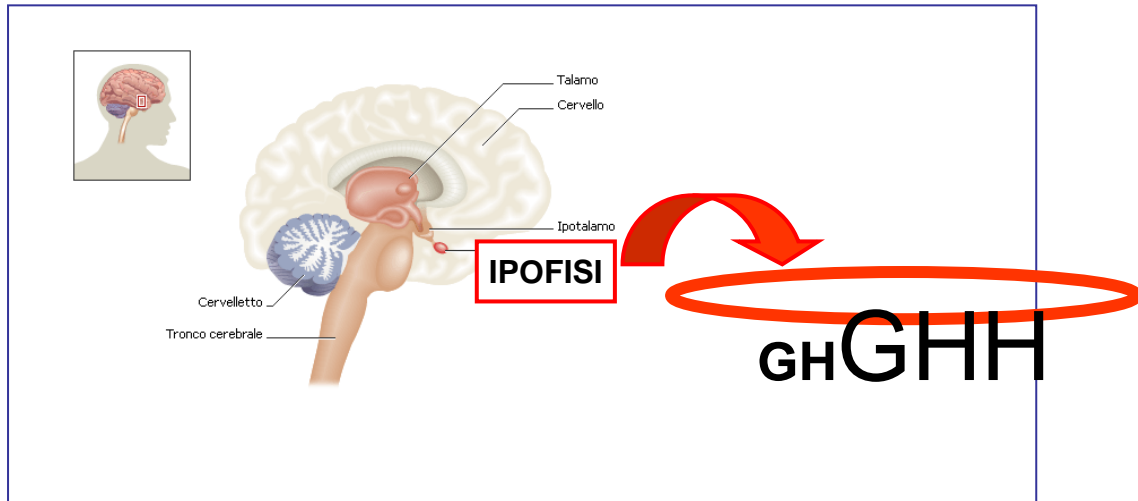
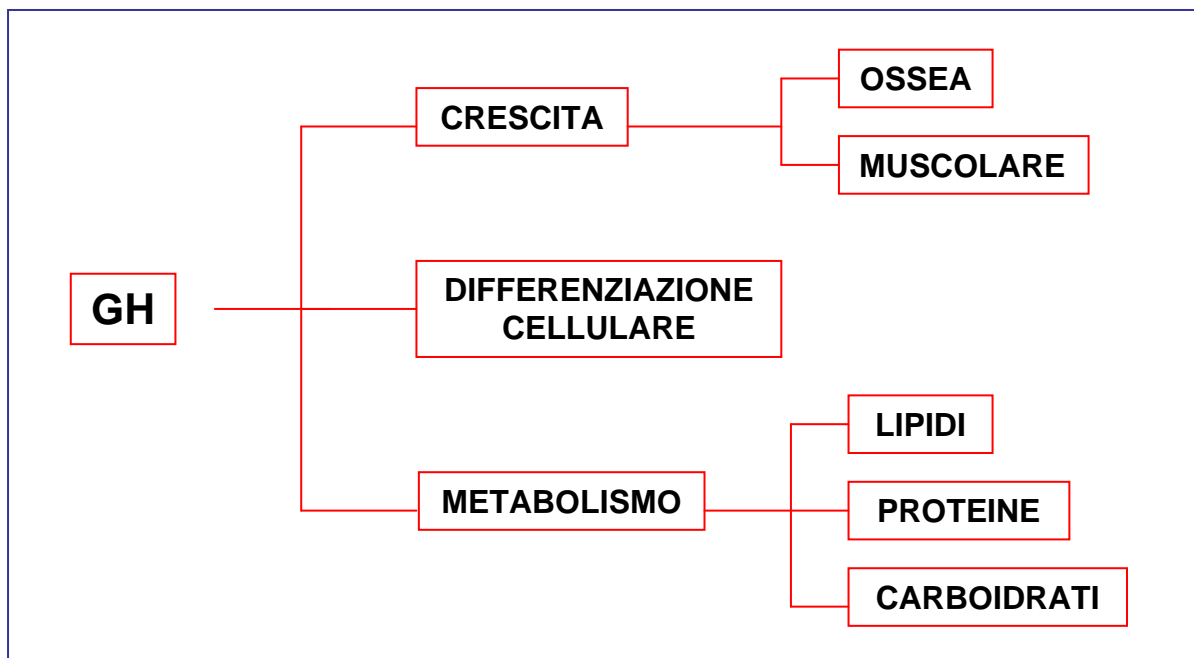


Fig. 2

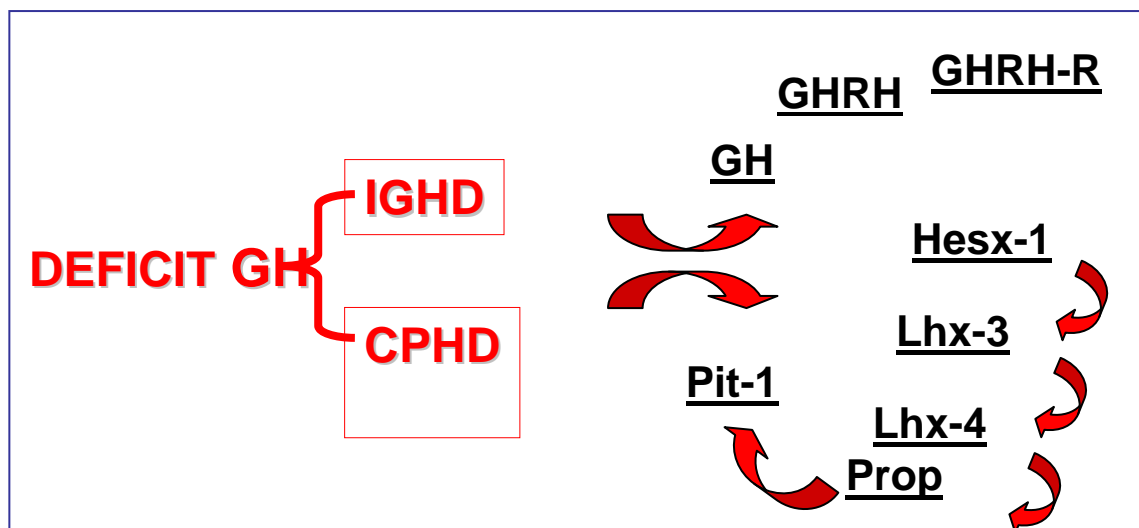


IL DEFICIT DI GH

Il meccanismo di regolazione della produzione di GH è un processo piuttosto complicato, in cui sono coinvolti diversi geni (fig.3). Mutazioni a carico di questi possono portare ad un deficit dell'ormone della crescita. Il deficit di GH può essere principalmente di due tipi: isolato (IGHD) o combinato (CPHD). L'IGHD è dovuto alla carenza del solo ormone GH. La forma più frequente di IGHD è rappresentata da quella sporadica, causata da anomalie durante lo sviluppo o da fattori ambientali. Circa il 3-30% dei casi di IGHD è invece di tipo familiare, classificabile in quattro tipi (IA, IB, II e III) [9], in base alla severità e alle modalità di trasmissione. Il deficit di GH di tipo combinato (CPHD) prevede invece difetti nella produzione dell'ormone della crescita associati al deficit di almeno uno degli altri ormoni ipofisari (TSH, PRL, ACTH, LH, FSH). In questo tipo di deficit sono coinvolti diversi geni, codificanti per fattori di attivazione trascrizionale responsabili dello sviluppo embrionale dell'ipofisi anteriore. La maggior parte dei casi di CPHD presenta mutazioni a carico dei geni Pit-1 e PROP-1[10, 11]. Mutazioni responsabili di un deficit di GH combinato sono state identificate anche nel gene HESX1, Lhx-3 e Lhx4.

Questo progetto di ricerca si propone di analizzare individui affetti da deficit di GH e di studiare questi geni, alla ricerca di eventuali mutazioni. Nel caso in cui ciò non avvenisse dovremo considerare altre cause molecolari e, di conseguenza, analizzare altri geni.

Fig. 3



PROGETTO

In questi primi mesi il progetto di ricerca ha riguardato esclusivamente del deficit di GH di tipo isolato, caratterizzato dall'assenza del solo ormone GH. Il primo gene candidato è stato quindi il gene **GH-1**. Esso codifica per l'ormone somatotropo ipofisario ed è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q23). Il GH-1 appartiene ad un cluster di cinque geni strettamente associati (fig.4). Essi presentano un elevato grado di omologia per quanto riguarda il promotore e la regione 5' codificante, differenziandosi maggiormente nel tratto 3'. Questi geni hanno inoltre una struttura molto simile, caratterizzata dalla presenza di cinque esoni interrotti da quattro piccoli introni nella stessa posizione e della stessa lunghezza [12]. Oltre al GH1, il cluster contiene CSH1, CSH2, GHV e CSHP1. Il GH-1 viene espresso nelle cellule somatotrope dell'ipofisi anteriore, gli altri a livello placentare. Il gene GH-V codifica per una proteina espressa nella seconda metà della gravidanza; i geni CSH1 e CSH2 codificano per una proteina che ha la stessa sequenza nota come lattogeno placentare; il gene CSHP1 è in realtà uno pseudogene che contiene una mutazione che altera il meccanismo di splicing e il risultante prodotto.

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]. Mentre la sequenza codificante del GH-1 risulta altamente conservata, la regione del promotore presenta un elevato grado di polimorfismo. Nel laboratorio di Genetica erano già state identificate una serie di variazioni a carico del promotore, alcune delle quali cadono in siti di legame per fattori di trascrizione [15]. In posizione -278, ad esempio, è presente un sito di legame per il fattore ubiquitario NF1, il quale appartiene ad una famiglia di proteine in grado di legare sequenze di DNA ricche di GC. In -75 è stata invece identificata una regione in grado di legare specificatamente Pit-1, essenziale per la proliferazione e la differenziazione delle cellule dell'adenipofisi secernenti GH, prolattina (PRL), e ormone tireotropo (TSH). In -57 è inoltre contenuto un sito riconosciuto dal recettore della vitamina D, VDR. Esso appartiene alla famiglia dei recettori steroidei e media l'attivazione trascrizionale in

risposta alla 1,25-diidrossivitamina D3, legandosi a specifiche sequenze di DNA (VDREs) [16].

Fig. 4

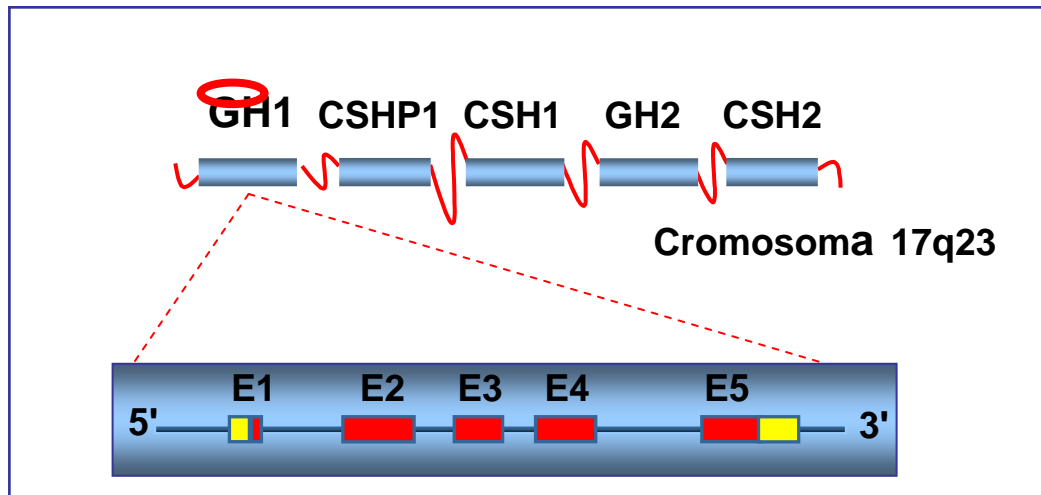


Fig. 5

		-339DEL			
-358	GGGATGTGGT	CGGTAGGGGG	TCTCAAGGAC	TGGCTATCCT	GACATCCTTC
	-308T	-301T		-278T	
-308	GCCGCGT	GCA	GGTTGGCCAC	CATGGCCTGC	GCCAGAGGG
				NF-1	USF
-258	ACCCTTAAAG	AGAGGACAAG	TTGGGTGGTA	TCTCTGGCTG	AACTCTGTG
				DCRE	
-208	CACAACCCTC	ACAACACTGG	TGACGGTGGG	AAGGGAAAGA	-168C
					TGACAAGCCA
-158	GGGGGCATGA	TCCCAGCATG	TGTGGGAGGA	GCTTCTAAAT	TATCCATTAG
			SP1-BOX	PIT-1	DISTALE
-108	CACAAGCCCG	TCAGTGGCCC	CATGCATAAA	TGTACACAGA	AACAGGTGGG
	-57G		PIT-1	PROSSIMALE	
		ZN-15		-75G	
-58	GTC AACAGTG	GGAGAGAAGG	GGCCAGG	GTA	TAAAAAGGC
				TATA-BOX	CCACAAGAGA
				-31DEL	
-8	-6G	-1T	+3C	+16G	+23T
	CCAGCTCA	AAG	GATCCCAAGG	CCCAACTCCC	CGAACCACTC
					AGGGTCCTGT
				+59G	
+43	GGACAGCTCA	CCTAGCGT	TCA	ATG	

Abbiamo quindi valutato l'ipotesi che alcuni dei polimorfismi identificati a livello del promotore del gene GH-1 potessero contribuire al deficit dell'ormone della crescita.

E' stato avviato uno studio del promotore prossimale di GH-1 mediante un'**Analisi Genetica** e un'**Analisi Funzionale**. L'analisi genetica prevede uno studio di associazione, attraverso la stima delle frequenze alleliche e genotipiche di polimorfismi del promotore del GH sia in controlli sia in pazienti. Finora è stata raccolta una casistica comprendente 130 individui affetti da deficit di GH provenienti dalla Clinica Pediatrica di Novara. Sono tutti pazienti sporadici, la cui diagnosi è stata confermata dai classici test provocativi con arginina o clonidina o insulina. Tutti I pazienti presentavano un picco inferiore a 10 ng/ml dopo due tipi di test. Era stata inoltre esclusa la presenza di mutazioni a carico del gene GH-1. Nella casistica sono stati inclusi anche 161 controlli.

Sequenziando il promotore abbiamo focalizzato l'attenzione su tre polimorfismi in particolare, -278, -75 e -57, dato che essi cadevano all'interno di regioni riconosciute da fattori di trascrizione (NF-1, Pit-1 e VDR). Mediante un'analisi statistica (fig.6) abbiamo identificato un'associazione significativa dei polimorfismi in posizione -278 ($p= 0.012$) e -57 ($p=0.010$). In particolare i genotipi GG e TT, rispettivamente in -278 e in -57, portano ad un aumento del rischio relativo (1.95 e 2.43). Dato che queste due variazioni sono in Linkage Disequilibrium sarà opportuno valutare, mediante analisi statistica, se esse contribuiscano ad aumentare il rischio di deficit di GH in modo indipendente od associato.

Oltre ad un'analisi genetica lo studio del promotore prevede anche un'analisi di tipo funzionale. Essa consiste nello studio dell'attività delle combinazioni polimorfiche identificate del promotore del gene GH-1, mediante un sistema di trasfezione transiente di un gene reporter in cellule ipofisarie di ratto (GH4C1). Al fine di evidenziare un ruolo funzionale dei polimorfismi presenti nel promotore del GH-1, abbiamo selezionato alcuni aplotipi e i frammenti a monte dell'inizio di traduzione sono stati clonati all'interno di un vettore d'espressione a monte del gene reporter della luciferasi. E' possibile in questo modo studiare il livello trascrizionale del gene GH-1

in base all'attività del gene della luciferasi osservando eventuali variazioni di tale attività. Negli studi funzionali, tutt'ora in corso, è stato utilizzato un costrutto in cui erano presenti entrambi gli alleli di rischio, ed uno in cui essi erano assenti (costrutto A e B, fig.7). Stiamo cioè cercando di valutare se la co-presenza della G in -278 e della T in -57 possa in qualche modo alterare il livello di trascrizione del gene GH-1. Inoltre abbiamo ottenuto mediante mutagenesi due costrutti, ciascuno contenente un solo allele di rischio. Intendiamo in questo modo studiare l'effetto del singolo allele indipendentemente dall'altro, sia nei pazienti che nei controlli.

Fig. 6

Posizione	Gt	P %	C %	p	OR
-278 →NF1	GG	38.4	25.4	0.012	1.95
	GT	41.5	52.7		
	TT	18.4	21.7		
-75 →Pit-1	AA	75.4	73.3		
	AG	23.8	23.6		
	GG	7.7	3.1		
-57 →VDR	GG	38.5	38.5		
	GT	39.2	50.9		
	TT	22.3	10.6	0.010	2.43

0.029

ns

0.015

Fig. 7

posizione costrutto	-308	-301	-278	-75	-57	-6	-1
A	G	G	G	A	T	A	A
B	G	G	T	A	G	G	A
-278T	G	G	T	A	T	A	A
-57G	G	G	G	A	G	A	A

In base ai risultati che otterremo dall'analisi funzionale e se non verrà identificata nessuna mutazione a carico del gene GH-1 nei pazienti raccolti, prevediamo di:

- Studiare altri geni noti, alla ricerca di eventuali mutazioni che possano essere associate al deficit di GH. Un primo gene candidato è **GHRH-R**, il quale codifica per il recettore dell'ormone di rilascio del GH.

- Studiare nuovi geni in casi familiari. Finora disponiamo di due famiglie, ma prevediamo di raccoglierne altre.

- Consolidare la nostra ipotesi per cui il deficit di GH abbia un'eziologia **multifattoriale**, dovuta a fattori ambientali e genetici. Il primo gene candidato sarà in questo caso **VDR**, data l'associazione con il polimorfismo individuato nel sito di legame per il recettore della vitamina D. VDR sembra avere un importante ruolo nella crescita e nella densità ossea [17]. Quindi valuteremo l'associazione dei polimorfismi identificati nel gene VDR con quelli trovati a livello del promotore del gene GH-1.

MATERIALI E METODI

Controlli

Sono stati analizzati finora 161 soggetti di statura e corporatura normali, appartenenti a famiglie Italiane non consanguinee.

Pazienti IGHD

Lo studio include 130 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 presenta 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 delezioni nel gene GH-1.

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.

Analisi delle variazioni del gene GH-1:

Il gene dell'ormone della crescita fa parte di un cluster di geni con un elevato grado di omologia. Per questo l'intera sequenza del gene (2.7Kb) è stata amplificata utilizzando dei primers (GH32-33) specifici del gene GH-1 che non amplificano gli altri geni del cluster [18].

La reazione è stata effettuata in un volume totale di 50 μ l: 20pmoli di ciascun primer, 200 ng di DNA genomico, KCl 50mM, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 200 μ M e 1.5U DNA polimerasi con attività proofreading (DyNAzyme EXTTM, Finnzymes). La reazione è stata effettuata in un termociclatore per 30 cicli ciascuno consistente in 30s a 95°C, 30s a 58°C, 1.5min a 72°C e un'estensione finale di 10 min a 72°C.

Identificazione dei polimorfismi nel Promotore

Nested PCR: Il prodotto di PCR ricavato dall'amplificazione dell'intero gene GH-1 è stato utilizzato per una nested PCR che amplificasse 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 20µl con 10 pmoli dei primers GH4 e PR18, 2µl del prodotto della PCR del gene completo, KCl 50mM, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 200µM e 1U di Ampli Taq Gold DNA polimerasi (Applied Biosystem). La reazione è stata effettuata in un termociclatore per 25 cicli ciascuno consistente in 30s a 95°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C.

Sequenziamento: Gli amplificati del promotore sono stati sequenziati utilizzando il kit Big-Dye terminator (Applied Biosystem) e il sequenziatore automatico ABI 373. Prima del sequenziamento i dNTP e i primers non incorporati, presenti nei prodotti di PCR, sono stati rimossi utilizzando gli enzimi Esonucleasi I e Fosfatasi Alcalina a 37°C per 30 min che poi sono stati inattivati a 80°C per altri 10 min.

Ricerca di varianti nella regione codificante e nelle sequenze introniche del gene GH-1

Nested PCR: Il prodotto di PCR ricavato dall'amplificazione dell'intero gene GH-1 è stato utilizzato per delle PCR interne al fine di ottenere dei frammenti di lunghezza idonea all'analisi di mutazione mediante DHPLC. Il protocollo utilizzato è quello descritto precedentemente per l'amplificazione del promotore.

Analisi con DHPLC: la ricerca di varianti nucleotidiche è stata condotta mediante la metodica DHPLC (Denaturing High Liquid Chromatography). Questo metodo, basato sulla diversa ritenzione di molecole di DNA homoduplex ed heteroduplex in condizioni di denaturazione parziale [19], è stato impiegato per la ricerca di campioni eterozigoti per variazioni nucleotidiche nel gene GH-1.

Preparazione dei costrutti

Per ottenere la regione in 5' fiancheggiante il gene GH1 (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 GH-32-GH33) di individui precedentemente selezionati come template. La PCR è stata effettuata utilizzando una polimerasi con attività proofreading (DyNAzyme EXTTM, Finnzymes) e lo stesso protocollo delle nested PCR precedentemente descritte.

I prodotti di PCR sono stati poi clonati in pMOS*Blue* utilizzando il kit pMOS*Blue* 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 poi stati testati per confermare la sequenza nucleotidica dell'inserito.

Mutagenesi: per ottenere dei nuovi costrutti, che portassero 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 BallI 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 PCR. Il frammento di PCR, una volta clonato nel plasmide pMOS*Blue*, è stato digerito con gli enzimi opportuni (BallI/HindIII; kpnI/ApaI). Il

prodotto della digestione è stato purificato da gel di agarosio mediante colonnine Qiagen. I frammenti così ottenuti sono stati sottoposti ad una reazione con l'enzima T4 DNA Ligase che consentiva l'inserimento nel corretto orientamento del prodotto mutagenizzato nel plasmide iniziale.

Colture cellulari e Trasfezione transiente

La linea cellulare GH4C1 (ATCC CCL-82.2), derivante dalla linea GH3 di origine epiteliale da adenoma ipofisario di ratto, è stata cresciuta in terreno Ham's F10 (nutrient mixture for hamster, F-10, Gibco BRL) addizionato con 4mM L-glutamina, 15% di siero di cavallo (Gibco BRL) e 2,5% di siero bovino fetale (Gibco BRL). Le colture cellulari sono state mantenute a 37°C in atmosfera umidificata con CO₂ al 5%.

Per la trasfezione sono state piastrate 2×10^5 cellule in pozzetti da 20mm, in 750µl di terreno. La trasfezione è stata effettuata utilizzando il reagente di trasfezione FuGene (Roche). 0.5µg di ciascun costrutto e 50 ng di pRL-CMV sono stati diluiti con 50µl di terreno di crescita senza siero; sono stati poi aggiunti 1.5 µl di FuGene (Roche). Dopo 15 min la miscela di trasfezione è stata aggiunta alle cellule.

Il plasmide pRL-CMV, contenente il cDNA per la luciferasi di *Renilla Reniformis* (Promega) sotto il controllo del promotore forte e dell'enhancer del CMV, è stato cotrasfettato insieme ad ogni campione per normalizzare l'attività della luciferasi. Le cellule sono state lasciate a crescere per 48 h dopodiché l'attività della luciferasi è stata determinata con un luminometro (Lucy1, Rosys Anthos) utilizzando il kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). I valori di attività sono stati espressi come valore di bioluminescenza normalizzato dal valore di *Renilla*.

BIBLIOGRAFIA

1 Boscherini B, Cianfarini S, Mancuso G, Spadoni GL (1990) Ormone della crescita. In: Boscherini B, Cianfarini S, Mancuso G, Spadoni GL (eds) Il bambino con bassa statura (fisiopatologia e clinica dei thdisturbi dell'accrescimento). Piccin, Padova, pp2-46.

2 Lindsay R, Harris D, Feldkamp M, Robertson J, Rallison M (1993) Utah growth study: growth hormone deficiency prevalence. *Pediatr Res* 33:81A.

3 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, 2nd Ed.* Williams and Wilkins, Baltimora, pp210-219.

4 Thorner MO, Mance ML, Horvath E, Kovaks K (1992) The anterior pituitary. In: Wilson JD, Foster DW (eds) *William's textbooks of endocrinology, 8th Ed.* Saunders, Philadelphia, pp 221-310.

5 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.

6 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.

7 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.

8 Gaillard C (1993) Neuroendocrine regulation. In: Bertrand J, Rappaport R, Sizonenko PC (eds) Pediatric endocrinology (physiology, pathophysiology and clinical aspects, 2nd Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, pp19-45.

9 Phillips JA III, Cogan JD (1994) Molecular basis of familiar human growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 78:11-16.

10 Procter AM, Phillips JA III, Cooper DN (1998) The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Hum Genet* 103:255-272.

11 Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, Dasen JS, Frish H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA, Rosenfeld MG (1998) Mutations in *PROP1* cause familiar combined pituitary hormone deficiency. *Nat Gen* 18:147-149.

12 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.

13 Duquesnoy P, Amselem S, Gournelen 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 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.

16 Haussler MR, Jurutka PW, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Haussler CA, Whitfield GK (1995). New understanding of the molecular mechanism

of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone* Aug; 17 (2 Suppl):33S-38S.

17 Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004 Sep 1;338(2):143-56.

18 Miyata I, Cogan JD, Preece MA, Kamijo T, Ogawa M, Phillips JA 3rd. (1997). Detection of Growth hormone gene defects by dideoxy fingerprinting (ddF). *Endocr J*. 44: 149-54.

19 O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P (1998) Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 52: 44-9.

SEMINARI

3 maggio 2004 - Prof. **Frédéric Rieux-Laucat** (INSERM 429, Hôpital Necker, Paris): “Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Autoimmune Syndrome (ALPS) subtypes”.

11 maggio 2004 – Prof. **G. Cossu**, Prof. **P. Vezzoni**, Prof. **P. Cattorini**, Dott. **G. Galli**, Dott.ssa **M. Fiumanò**, Dott. **A. Santosuosso** (Corso di Bioetica, Università di Milano): “Cellule staminali e clonazione.”

13 maggio 2004 - Dr. **Paolo Radice**, Dott.ssa. **Adele Savastano** (Palazzo di Giustizia di Milano): "Il caso Sergeant: test genetici predittivi. riservatezza e lavoro".

20 maggio 2004 - Dr. **Alberto Martini** (Istituto Scientifico Gaslini e Università di Genova): “Le artriti croniche del bambino”.

25 maggio 2004 - Dr. **Antonio Puccetti** (Università di Genova): “Virus e malattie autoimmuni”.

27 maggio 2004 - Prof **Antonino Forabosco**, Avv. **Stefano Nespor** (Palazzo di Giustizia di Milano): "I dati della sorella malata: l'accesso ai dati genetici condivisi".

28 maggio 2004 - Prof. **Angiolo Benedetti** (Dipartimento di Fisiopatologia e Medicina Sperimentale dell'Università di Siena): “Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico”.

14 giugno 2004 - Prof. **Christopher Day** (Centre for Liver Research, Medical School, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK): “Pitfalls of genetic studies in liver disease”.

14 giugno 2004 - Dr **David Murphy** (Dipartimento di Neuroscienze e Neuroendocrinologia Università di Bristol): “Biomedical discovery using microarrays: principles, prospective and problems”.

15 giugno 2004 - Dr **David Murphy** (Dipartimento di Neuroscienze e Neuroendocrinologia Università di Bristol): “Functional genomics of hypothalamic homeostasis plasticity”.

29 giugno 2004 - Prof. **Emilio Hirsch** (Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica, Torino): “ π 3-kinase controls cardiac contractility and hypertrophy through kinase-dependent and independent functions”.

30 giugno 2004 - Prof. **Manlio Ferrarini** (IST e Università di Genova): “Meccanismi patogenetici della Leucemia Linfatica Cronica”.

5 luglio 2004 - Prof **Armando Bartolazzi** (Dipartimento di Patologia, Facoltà di Medicina, Ospedale Sant’Andrea Università La Sapienza - Roma): “From the bench to the bedside: Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions”.

7 luglio 2004 - Prof. **Martin Ronis** (Dept of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock): “Ethanol metabolism and Toxicity in Pregnancy”.

20 settembre 2004 – Prof. **Martin O. Savage** (Dept. of Endocrinology, St. Bartholomew’s Hospital and the Royal School of Medicine and Dentistry, London): “Cushing’s syndrome in childhood”.

ABSTRACTS

■ M. Giordano, S. Mellone, A. Petri, R. Baracchini, M. Godi, I. Bellone, S. Bellone, D. Vivenza, G. Bona, P. Somigliano 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 (IGDH).” 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 *ZFHX1B* (SIP1): descrizione di 3 casi italiani con ipospadia e review.” VII Congresso SIGU, 13-15 ottobre 2004, Pisa.