

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"A.AVOGADRO"
XVII CICLO - DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE**

Dottoranda: DANIELA VIVENZA

Analisi molecolare dei geni HESX1 e LHX4 in soggetti affetti da deficit di GH isolato (IGHD: Isolated Growth Hormone Deficiency) o combinato con altri ormoni ipofisari (CPHD: Combined Pituitary Hormone Deficiency).

Tutore: Prof. Gianni Bona

Anno 2003-2004

ATTIVITA' FORMATIVE

Anno 2003-2004

Corsi e seminari seguiti durante l'anno:

5 incontri sul Corso di Formazione in “**Biologia Molecolare in Endocrinologia Pediatrica 2003-2004**” : 20-11-2003 e 11-12-2003a Milano, 22-01-2004, 19-02-2004 e 18-03-2004 a Roma.

30 gennaio 2004: Prof **Magnus Ingelman-Sundberg** (Division of Molecular Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, di Stoccolma): “Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy”.

3 febbraio 2004: Dr. **Rita Clementi** (Università di Pavia): “Alterazioni del gene della perforina nelle patologie linfoproliferative”.

18 febbraio 2004: Dr. **Bice Chini** (Cnr Istituto Di Neuroscienze, Sezione Di Farmacologia Cellulare E Molecolare, Milano): “Lipid Rafts E Recettore per l' ossitocina: modulazione del signalling e del controllo della proliferazione cellulare”

10 marzo 2004: Prof. **Guido Valesini** (Cattedra di Reumatologia, Università la Sapienza di Roma): "TNF, anti-TNF ed autoimmunità".

31marzo 2004: Dr **Antonia Follenzi** (Albert Einstein College of Medicine,Liver Research Center): “Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso di vettori lentivirali”.

27 aprile 2004: Dr. **Susanna Ceffa** (comunità di Sant'Egidio): “DREAM: Drug resource enhancement against AIDS in Mozambique”

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

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”.

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): “pi 3-kinaseg 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 Savage** (Paediatric Endocrinology Department of Endocrinology, St Bartholomew's Hospital and the Royal School of Medicine and Dentistry, London): Cushing's Syndrome in childhood.

Pubblicazioni

1. **Vivenza D**, Rapa A, Castellino N, Bellone S, Petri A, Vacca G, Aimaretti G, Broglio F, Bona G. Ghrelin gene polymorphisms and ghrelin, insulin, IGF-I, leptin and anthropometric data in children and adolescents. Eur J Endocrinol. 2004 Jul;151(1):127-33.

2: Bellone S, Rapa A, **Vivenza D**, Vercellotti A, Petri A, Radetti G, Bellone J, Broglio F, Ghigo E, Bona G. Circulating ghrelin levels in the newborn are positively associated with gestational age. Clin Endocrinol (Oxf). 2004 May; 60 (5):613-7.

3: Bellone S, Castellino N, Broglio F, Rapa A, **Vivenza D**, Radetti G, Bellone J, Gottero C, Ghigo E, Bona G. Ghrelin secretion in childhood is refractory to the inhibitory effect of feeding. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Apr; 89 (4):1662-5.

4: Gottero C, Bellone S, Rapa A, van Koetsveld P, **Vivenza D**, Prodham F, Benso A, Destefanis S, Gauna C, Bellone J, Hofland L, van der Lely AJ, Bona G, Ghigo E, Broglio F. Standard light breakfast inhibits circulating ghrelin level to the same extent of oral glucose load in humans, despite different impact on glucose and insulin levels. J Endocrinol Invest. 2003 Dec; 26 (12):1203-7.

Comunicazioni a Congressi:

1: Bellone S, Rapa A, **Vivenza D**, Grugni G, Crinò A, Castellino N, Petri A, Me E, Broglio F, Bellone J, Bona G. Total and acylated ghrelin levels in Prader-Willi Syndrome. ENDO New Orleans 16-20 giugno 2004

2: Bellone S, Rapa A, **Vivenza D**, Radetti G, Castellino N, Petri A, Me E, Broglio F, Ghigo E, Bellone J, Bona G. Ghrelin secretion in neonates progressively increases and is refractory to the

inhibitory effect of food intake. X International Congress of Auxology, Firenze 3-6 luglio

3: Bellone S., Rapa A., **Vivenza D.**, Radetti G., Baldelli R., Petri A., Taccagno A., Bellone J., Me E., Ghigo E., Bona G. Ghrelin secretion in neonates and the effect of food intake. ESPE Congres, Basilea, settembre 2004

4: **Vivenza D.**, Rapa A., Bellone S., Crinò A., Grugni G., Fassone L., Schiaffini R., Sartorio A., Bona G. Identification of Polymorphisms in the ghrelin gene in subjects with Prader-Willi Syndrome. . ESPE Congres, Basilea, settembre 2004

5: Baldelli R., Bellone S., Rapa A., **Vivenza D.**, Petri A., Bellone J., Broglio F., Radetti G., Ghigo E., Bona E. Ghrelin plasma levels from delivery to young-adult age. ESPE Congres, Basilea, settembre 2004

6: Trada M., Bellone S., Baldelli R., Rapa A., **Vivenza D.**, Esposito K., Boschetti K., Petri A., Ghigo E., Bona G. L'effetto del pasto sulla secrezione di grelina nel neonato. Congressos Nazionale della Società Italiana di Pediatria, Napoli, ottobre 2004.

7: Baldelli R., Bellone S., Rapa A., **Vivenza D.**, Trada M., Esposito S., Boschetti K., petri A., Bona G. Livelli circolanti di grelina dalla nascita alla pubertà. Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina dell'Adolescenza, Chieti, ottobre 2004.

8: Giordano M, Mellone S, Petri A, Paracchini R, Godi M, Bellone J,, **Vivenza D.**, Bona G, Momigliano-Richiardi P. Un polimorfismo nel sito di legame del recettore della vitamina D (VDR) nel promotore del gene dell'ormone della crescita (GH) è associato a deficit di GH (IGHD). VII Congresso SIGU 13-15 ottobre 2004, Pisa.

Introduzione

I difetti ipofisari

L'ipofisi è la ghiandola endocrina che regola la crescita e lo sviluppo dei vertebrati ed ha un ruolo critico nel controllo dell'omeostasi. Essa regola processi vitali come il metabolismo, la crescita e la riproduzione integrando, con un meccanismo di feed-back, informazioni provenienti sia dal cervello attraverso l'ipotalamo, sia dagli organi endocrini periferici, come la tiroide, le ghiandole surrenaliche e le gonadi, mediante la produzione di GH, PRL TSH, ACTH, FSH, ed LH. Lo sviluppo dell'ipofisi è simile in tutti i vertebrati e richiede l'intervento di numerosi geni, come evidenziato da accurati studi su modelli murini (Dattani *et al*, 2000). L'ipofisi matura è localizzata sotto l'ipotalamo, nella sella turcica del corpo dello sfenoide. E' costituita da due lobi: il posteriore (neuroipofisi) di derivazione diencefalica, che mediante il peduncolo ipofisario mantiene con l'ipotalamo rapporti di continuità, e l'anteriore (adenoipofisi), proveniente dalla tasca di Rathke. Deriva da due distinti foglietti embrionali: l'adenoipofisi origina dell'ectoderma orale ed include il lobo dell'ipofisi anteriore, la parte più sviluppata dell'intero corpo ghiandolare (pars distalis), il lobo intermedio (pars intermedia o lamina iuxtannervosa) e la pars tuberalis, mentre la neuroipofisi è di origine neuroectodermica, origina dalla base del diencefalo ed include l'ipofisi posteriore (pars nervosa), il peduncolo infundibulare e l'eminenza mediana. La formazione della ghiandola ipofisaria richiede un complesso processo di differenziazione cellulare e strutturale. L'adenoipofisi origina dalla tasca di Rathke, che si abbozza a circa 24 giorni dello sviluppo embrionale come un diverticolo che si estende verso l'alto a partire dall'ectoderma della cavità orale. Da principio, la tasca di Rathke è una struttura rudimentale che si estende in direzione caudale, in seguito si forma una tasca più definitiva che alla fine si chiude e si separa dalla stomodeo. Durante la sesta settimana le cellule della parte ventrale della tasca proliferano e si differenziano per costituire il lobo dell'ipofisi anteriore, mentre uno sviluppo più limitato della parte dorsale dà origine al lobo intermedio (Dattani *et al*, 2000). Durante lo sviluppo del lobo anteriore, le cellule secernenti si differenziano secondo un preciso ordine temporale e con lo stessa sequenza in tutti i mammiferi (Simmons *et al*, 1990; Japon *et al*, 1994). Le cellule corticotrope sono sul lato dorsale del lobo anteriore verso l'apice rostrale, le gonadotrope si differenziano nella regione ventrale; le tireotrope si trovano nella regione centrale; mentre le cellule somatotrope e le lactotrope, che derivano dallo stesso precursore cellulare, popolano la regione dorsale (Dasen *et al*, 1999; Kioussi *et al*, 1999). Gli studi evolutivi hanno rivelato che, durante lo sviluppo dell'ipofisi, è necessaria l'interazione di

segnali provenienti dai tessuti in via di sviluppo dell'ipotalamo e dell'ipofisi per promuovere i programmi di proliferazione e differenziazione cellulare mediati da fattori di trascrizione, i quali stabiliscono i profili delle cellule secernenti della ghiandola matura (Treier *et al*, 1998; Savage *et al*, 2003).

La formazione dell'adenoipofisi è regolata dall'azione combinata di specifici fattori trascrizionali che vengono suddivisi in intrinseci, espressi dalla tasca di Rathke, come HESX1, PITX1, PITX2, LHX3, LHX4, PROP-1, PIT1 ed estrinseci, espressi a livello diencefalico, come TTF1, BMP4, FGF8. Mutazioni a carico di tali fattori determinano difetti ipofisari.

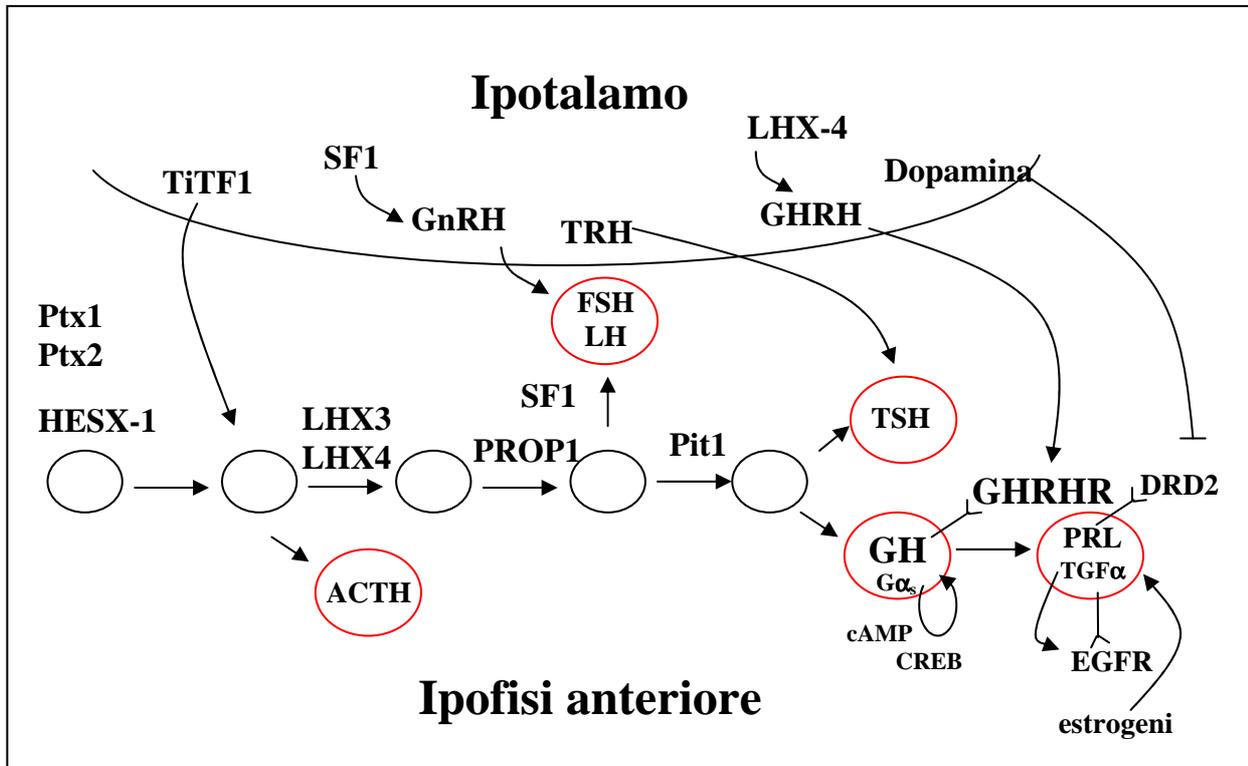
Si definiscono come difetti ipofisari i disordini endocrini e/o neuroanatomici che coinvolgono uno o più ormoni secreti dall'adenoipofisi, in particolare si distinguono i deficit isolati dell'ormone della crescita (IGHD Isolated Growth Hormone Disease) ed i deficit ipofisari combinati (CPHD Combined Pituitary Hormone Disease) che comprendono un difetto di produzione di GH associato al deficit di uno o più degli altri cinque ormoni secreti dall'ipofisi anteriore.

Il deficit di GH isolato (IGHD) ha una incidenza di 1 su 4.000 - 10.000 nuovi nati (Rivarola *et al*, 1984; Vimpani *et al*, 1977). Molti casi sono sporadici, ma il 3-30% dei casi sono di tipo familiare, e ciò suggerisce una eziologia di tipo genetico. Si pensa che i casi sporadici di IGHD siano dovuti maggiormente a traumi cerebrali o ad anomalie nello sviluppo. Tuttavia anche nei casi sporadici di IGHD sono state trovate delle mutazioni *de novo*. In circa il 12,5% dei casi familiari e nel 10% dei casi sporadici sono state identificate mutazioni a carico del gene GH1, che includono delezioni dell'intero gene e mutazioni nonsense nelle forme di IGHD più gravi, o mutazioni di splicing in quelle più lievi (Phillips JA e Cogan JD, 1994; Massa *et al*, 1998). Dal momento che, nella maggior parte degli IGHD, non sono dimostrate mutazioni a carico del gene GH1 e che numerosi fattori intervengono nella regolazione della secrezione del GH, è probabile che forme genetiche di deficit di GH possano risultare da mutazioni di altri geni.

Per quanto riguarda i CPHD sono stati compiuti notevoli progressi nello studio dei meccanismi molecolari che ne stanno alla base, grazie alla scoperta dei fattori trascrizionali che dirigono lo sviluppo dell'ipofisi anteriore (Parks *et al*, 1999; Watkins *et al*, 1998; Paracchini R *et al*, 2003; Fluck C *et al.*, 1998), come illustrato nella figura 1.

Figura 1. Modello di regolazione dello sviluppo e proliferazione delle cellule ipofisarie anteriori

Modello di regolazione dello sviluppo e proliferazione delle cellule dell'ipofisi anteriore



PITX1 e PITX2 sono geni homeobox che codificano per fattori trascrizionali che regolano lo sviluppo delle strutture della linea mediana e dell'ipofisi. I geni homeobox sono dei geni regolatori dello sviluppo e rappresentano una superfamiglia ubiquitaria molto conservata nella scala filogenetica degli eucarioti, che codificano per dei fattori di trascrizione coinvolti nella determinazione dell'identità del tessuto e della sua migrazione e posizione. Il prodotto proteico di tali geni contiene un omeodominio altamente conservato al carbossi terminale che include un motivo elica-giro-elica di legame con il DNA (Kissinger *et al*, 1990; Qian *et al*, 1989). Mutazioni a carico di PITX1 determinano anomalie agli arti, palatoschisi, ipoplasia delle cellule tireotrope e gonadotrope ipofisarie. Mutazioni a carico di PITX2 sono invece responsabili di un quadro clinico noto come sindrome di Rieger, caratterizzato da anomalie della camera anteriore oculare, ipoplasia dentaria, dismorfismi cranio-facciali, anomalie del cordone ombelicale e difetti ipofisari.

Recentemente è stato identificato un gene che riveste un ruolo importante nello sviluppo dei nervi ottici e dell'ipofisi anteriore, chiamato **HESX1** (Homeobox gene expressed in Embryonic Stem cell). Mappa al locus 3p21.1-21.2 ed è composto da 4 esoni e 3 introni che codificano per un

fattore di trascrizione di 185 aminoacidi con funzione di regolazione repressiva (Brickman *et al.*, 2001). HESX1 possiede un omeodominio di 60 aminoacidi (AA 108-167) ed è un membro della classe *Paired-like (Prd)* delle proteine omeotiche che possono dimerizzare su siti di legame palindromici contenenti due siti core TAAT (Carvalho *et al.*, 2003).

L'espressione di HESX1 è fondamentale per lo sviluppo del nervo ottico e per la regolazione di alcuni stadi precoci dello sviluppo della ghiandola ipofisaria. Studi nel topo hanno dimostrato che viene espresso precocemente durante l'embriogenesi iniziando in una piccola tasca di cellule nell'endoderma viscerale anteriore mediano, successivamente la sua espressione continua a livello del prosencefalo e viene poi ristretta alla tasca di Rathke, da cui si sviluppa l'ipofisi anteriore. La sua espressione si spegne verso il tredicesimo giorno embrionale. Durante lo sviluppo della tasca di Rathke, HESX1 svolge un ruolo repressivo molto importante poiché regola, con l'intervento di altri co-repressori come TLE1 (Transducin-like enhancer of split-1) e NCoR (nuclear corepressor protein) l'espressione di PROP1, decidendo secondo un tempismo ben preciso la sua inattivazione o attivazione mediante la formazione di complessi eterodimerici (Gage *et al.*, 1996, Dasen *et al.*, 2001). PROP1 è un altro fattore di trascrizione *Prd-like* (prophet of pituitary-specific transcription factor 1: prophet of Pit1) la cui espressione è necessaria per l'attivazione di PIT1 che a sua volta è fondamentale per lo sviluppo delle cellule somatotrope, lactotrope e tireotrope (Sornson *et al.*, 1996). HESX1, quindi, agisce come un repressore specifico di proteine attivatrici legate agli stessi siti di riconoscimento del DNA in un processo di repressione eteromera (Brickman *et al.*, 2001). Il dominio con funzione repressiva (engrailed homology domain, eh1) è caratterizzato da 7 residui amminoacidici (AA21-27) ed è molto conservato nella scala evolutiva.

Topi omozigoti knock-out per *Hesx1* mostrano una riduzione del prosencefalo, anoftalmia o microftalmia, anomalie nello sviluppo dei bulbi olfattivi, nel corpo calloso, nelle commissure dell'ippocampo, nel setto pellucido e la biforcazione della tasca di Rathke (Dattani *et al.*, 1998). Nell'uomo un fenotipo assimilabile a quello osservato nei topi *Hesx1*^{-/-} è rappresentato dalla Displasia Setto-Ottica (SOD) che si manifesta con panipopituitarismo congenito, ipoplasia del nervo ottico e/o anomalie di strutture della linea mediana (Izenberg *et al.*, 1984; Morishima *et al.*, 1986). La ricerca di alterazioni a carico del gene HESX1 in individui con difetti ipofisari di vario tipo, alcuni dei quali presentavano quadri variabili di SOD, ha portato alla identificazione di alcune mutazioni causali. Sino ad oggi sono state descritte sette mutazioni a carico di HESX1 (Wales *et al.*, 1996). Cinque si presentavano in condizione di eterozigosi ed avevano un effetto dominante, tre di queste erano state trasmesse da uno dei genitori e portavano ad una variazione amminoacidica (GLN6HIS, SER170LEU, THR181ALA) (Thomas *et al.*, 2001), le altre due, insorte *de novo*, erano

dovute ad errori nella cornice di lettura per inserzioni o delezioni di basi all'interno della regione codificante. In dettaglio: nel caso descritto da Tajima *et al*, 2003 l'inserzione di 2 bp AG in posizione 306-307 introduce un codone di Stop all'aminoacido 103 con produzione di una proteina tronca, mentre in quello descritto da Cohen *et al*, 2003 la delezione di una G nell'esone 4 in posizione 525 provoca una variazione degli ultimi 8 aminoacidi al C-terminale e la traduzione di un aminoacido in più, per una proteina di 186 aminoacidi che avrebbe una maggiore affinità di legame per il DNA ed aumenterebbe l'attività repressiva verso PROP1. Le 2 mutazioni restanti, con sostituzione aminoacidica: ARG160CYS e ILE26THR, erano a trasmissione recessiva (Wales *et al.*, 1996; Dattani *et a.*, 1998; Carvalho *et al*, 2003, Tajima *et al*, 2003). I soggetti portatori di tali mutazioni hanno fenotipi estremamente diversi, sia dal punto di vista neuroanatomico sia endocrinologico, che vanno da gravi quadri di SOD, a CPHD relativamente moderati o IGHD. Anche tra soggetti portatori della stessa mutazione (S170L) i fenotipi sono estremamente variabili in termini di reperti neuroradiologici alla risonanza magnetica e della presenza di ipoplasia dei nervi ottici (Thomas *et al*, 2001). Le mutazioni identificate nell'uomo in definitiva non forniscono una spiegazione generale della SOD, ma suggeriscono un potenziale ed importante ruolo di questo gene nelle forme idiopatiche dominanti o recessive di ipopituitarismo. Quindi la modulazione delle interazioni tra HESX1 e le proteine partner coinvolte nello sviluppo normale del prosencefalo e dell'ipofisi potrebbe spiegare la variabilità di penetranza ed espressione del fenotipo associato alla SOD (Arslanian *et al*, 1984). Il gene HESX1, inoltre, è stato il primo gene associato con quadri neuroradiologici di ectopia e mancata discesa dell'ipofisi posteriore, recentemente tali reperti sono stati associati a mutazioni di un altro gene, LHX4, che codifica per un fattore trascrizionale che interviene nello sviluppo embriogenetico dell'ipofisi.

LHX3 mappa al locus 9q34.4 ed è composto da 7 esoni, ma ne vengono trascritti solo 6 per uno splicing alternativo degli esoni 1a o 1b con il secondo esone. La trascrizione di LHX3, quindi, porta alla produzione di due isoforme proteiche: LHX3a di 397 aminoacidi ed LHX3b di 402 aminoacidi, che sono fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia di proteine LIM-domain (Freyd *et al*, 1990) ed hanno ruoli diversi durante lo sviluppo dell'ipofisi e di altri sistemi neuroendocrini (Sloop *et al*, 1999). LHX3 possiede due domini LIM ed un omeodominio. Nel topo *Lhx3* viene espresso nel momento in cui le cellule ectodermiche orali della tasca di Rathke prendono contatto con quelle neuronali che formano il lobo posteriore dell'ipofisi. Topi knock-out per *Lhx3* non sopravvivono alla nascita, hanno difetti nei motoneuroni, e mancano dei derivati della tasca di Rathke, ossia dei lobi anteriori ed intermedio dell'ipofisi (Sheng *et al*, 1996). Lo sviluppo

dell'ipofisi, infatti, non procede oltre la formazione della tasca di Rathke e alla differenziazione delle cellule corticotrope, mentre le cellule gonadotrope, tireotrope, lactotrope e somatotrope non riescono a differenziarsi (Sheng *et al*, 1996). LHX3 è stato pertanto chiamato in causa come gene candidato nelle forme di ipopituitarismo anteriore associato ad ectopia dell'ipofisi posteriore. L'espressione di LHX3 viene mantenuta anche nella ghiandola adulta, in quanto può attivare la trascrizione di geni di ormoni ipofisari e di geni per fattori di trascrizione, inclusi PIT1, PRL, TSH β , α GSU, β FSH ed agisce da solo o in cooperazione con altri fattori di trascrizione come PITX1 (Bach *et al*, 1995; Sloop *et al*, 2000; West *et al*. 2004).

Sino ad oggi sono state identificate 2 mutazioni a carico di LHX3 a trasmissione recessiva: una mutazione provoca un cambiamento aminoacidico nel secondo dominio LIM (Y116C), l'altra è una delezione in omozigosi di 23 bp che coinvolge il sito di splicing al 3' del terzo esone e dà come prodotto una proteina tronca (Netchine *et al*, 2000). Esse sono associate ad un quadro di CPHD associato a rigidità spinale cervicale.

Il gene **LHX4** è un gene LIM homeobox e regola insieme a LHX3 la formazione definitiva della tasca di Rathke e con PROP1 la proliferazione e la differenziazione delle cellule ipofisarie (Raetzman *et al*, 2002). Mappa al locus 1q25, è composto da 6 esoni che codificano per un fattore di trascrizione di 367 aminoacidi con 2 domini LIM ed un omeodominio. Topi Knock-out per Lhx4 mostrano uno sviluppo incompleto dell'ipofisi, tuttavia il difetto non è letale come per i topi Lhx3^{-/-}, poichè la tasca di Rathke si forma nonostante i lobi intermedio ed anteriore dell'ipofisi che ne derivano siano distintamente ipoplasici (Sheng *et al*, 1997). Recentemente è stata identificata una mutazione nell'uomo a carico di tale gene a trasmissione dominante che coinvolge il sito AG di splicing 5' dell'esone 5. La trasversione di G→C crea due siti di splicing criptici all'interno dell'esone 5 e porta alla produzione di due proteine tronche di 363 e 199 aminoacidi che perdono 4 aminoacidi fondamentali dell'omeodominio (VWFQ) (Machinis *et al*. 2001). Gli individui studiati appartenevano ad una stessa famiglia in cui i soggetti malati presentavano un quadro variabile di deficit ipofisario da IGHD a CPHD con deficit di GH, TSH e ACTH, associato ad anomalie strutturali dell'ipofisi e delle tonsille cerebellari. Per quanto riguarda le anomalie ipofisarie tali soggetti presentavano alla risonanza magnetica una ipoplasia dell'ipofisi anteriore, associata ad una ectopia dell'ipofisi posteriore; quest'ultima però non era presente in tutti i soggetti portatori della mutazione. Lhx4 è espresso anche nell'ipofisi adulta ed ultimamente traslocazioni t(1;14) (q25;q32) di LHX4 sono state osservate nella leucemia linfoblastica acuta delle cellule pre-B (Kawamata *et al*, 2002; Yamaguchi *et al*, 2003).

Il gene PIT-1 gioca un ruolo essenziale nello sviluppo delle cellule somatotrope, lattotrope e tireotrope dell'ipofisi anteriore e attiva l'espressione dei geni che codificano per GH, PRL e TSH β . Mutazioni a carico di tale gene sono responsabili di un fenotipo caratterizzato da assenza di GH, PRL e TSH. Il deficit di GH è generalmente grave con grave difetto di crescita che si manifesta in età precoce e con facies caratteristica. La secrezione di LH e FSH è normale, tuttavia soggetti con mutazioni di PIT-1 possono manifestare un ritardo puberale in caso di trattamento tardivo con GH e T₄. Per quanto riguarda l'aspetto neuroradiologico, l'aspetto dell'ipofisi in tali soggetti può avere dimensioni normali o ridotte alla risonanza magnetica.

Il gene PROP-1 di più recente scoperta sembra invece essere coinvolto nell'ontogenesi delle cellule gonadotrope oltre che somatotrope, lattotrope e tireotrope caudo-mediali. Codifica per un fattore di trascrizione necessario per l'espressione di Pit-1. Fino ad oggi sono state identificate 13 mutazioni di PROP-1 responsabili di un fenotipo CPHD caratterizzato da assenza o bassi livelli di GH, PRL, TSH, LH, FSH (Parks *et al*, 1999; Daladoey *et al*, 1999; Vallette-Kasic *et al*, 2001; Paracchini *et al*, 2003). Recentemente sono stati descritti pazienti che hanno sviluppato anche un deficit progressivo di ACTH ad esordio tardivo. Il fenotipo clinico tuttavia è molto variabile soprattutto in relazione alla gravità dei sintomi e all'età di esordio dei diversi difetti ormonali. Generalmente il primo ormone deficitario è il GH. Molto raramente il CPHD può esordire con un deficit di TSH. Il sintomo di esordio è comunque sempre rappresentato da un difetto di crescita nella statura. Non esiste una perfetta correlazione fra genotipo e fenotipo, poiché il fenotipo può variare non solo a causa di mutazioni differenti, ma anche fra soggetti portatori della stessa mutazione nella stessa famiglia. Il deficit di ACTH ha di solito esordio tardivo, è asintomatico, ma diventa progressivamente più evidente e può causare crisi iposurrenaliche con rischio di shock in situazioni di stress acuto. Per tale motivo, nei soggetti con mutazioni a carico di tale gene diventa necessaria una valutazione completa dell'assetto ormonale ed un continuo monitoraggio per iniziare tempestivamente una terapia sostitutiva con cortisolo. La maggior parte di tali pazienti mostrano alla RMN una ipoplasia dell'adenoipofisi, tuttavia sono riportati alcuni casi che presentano un aumento delle dimensioni del lobo anteriore ipofisario con un allargamento della sella turcica. Tale aumento è stato osservato solo in età precoce, soggetti seguiti al follow-up con RMN hanno dimostrato che l'ingrandimento ipofisario è seguito da una progressiva involuzione che durante la seconda decade di vita risulta in una ipoplasia ipofisaria. La presenza di una massa ipofisaria a carico del lobo anteriore con un aumento del segnale iperintenso in T1 alla RMN è suggestiva di un deficit di Prop-1; importante è dunque la diagnosi differenziale con craniofaringioma, adenoma ipofisario, disgerminoma o cisti della tasca di Rathke.

Progetto anno 2003-2004

Il progetto del terzo anno di Dottorato è stato quello di analizzare il gene HESX1 in un gruppo di soggetti affetti da IGHD e CPHD, sia sporadici sia familiari, con quadri fenotipici a vari gradi di gravità dal momento che la letteratura riporta pazienti con mutazioni di HESX1 con fenotipi molto diversi, sia dal punto di vista neuro-anatomico sia endocrinologico (Thomas *et al.*, 2001). L'analisi di LHX4 è stata eseguita in un gruppo di soggetti affetti da CPHD.

I soggetti destinati all'indagine molecolare sono stati inviati al nostro laboratorio da diversi centri italiani. Tutti soddisfavano i criteri di inclusione per deficit di GH isolato o associato ad uno o più degli altri cinque ormoni secreti dall'ipofisi anteriore (TSH, PRL, ACTH, LH, FSH) secondo le regole dettate dalle linee guide internazionali (Williams *et al.*, 2003). In particolare, un paziente viene considerato affetto da deficit di GH quando il livello del picco dell'ormone, dopo stimolazione, risulta essere inferiore a 10 ng/ml.

Un gruppo di 80 soggetti sani (20 maschi/60 femmine), inoltre, è stato selezionato all'interno della struttura universitaria ed ospedaliera come controllo, per confrontare la presenza o la frequenza delle eventuali alterazioni di HESX1 e LHX4.

Tutti i partecipanti allo studio, o i loro genitori se minorenni, sono stati informati del motivo dello studio ed hanno dato il loro consenso al trattamento dei dati personali.

L'analisi molecolare per HESX1 è avvenuta tramite sequenziamento diretto mediante sequenziatore automatico capillare ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem, USA), utilizzando il kit di reazione Big-dye terminator cycle sequencing (Applied-Biosystem), mentre i frammenti di LHX4 sono stati analizzati mediante DHPLC con un'apparecchiatura automatizzata di tipo HPLC (Wave, Transgenomic Santa Clara, California). L'analisi con DHPLC consente di identificare direttamente gli individui eterozigoti attraverso la formazione di molecole heteroduplex che vengono eluite dalla colonna ad un tempo di ritenzione minore rispetto alle molecole homoduplex.

La regione codificante comprendente i 4 esoni ed i siti di splicing di HESX1 è stata suddivisa in 3 frammenti, mentre per i 6 esoni di LHX4 i frammenti sono stati 7, di dimensioni adatte all'analisi con DHPLC.

I soggetti studiati per HESX1 sono stati 80 suddivisi in:

- 62 CPHD (34 maschi/28 femmine)
- 18 IGHD (9 maschi/9 femmine)

Nei soggetti con CPHD, il 71% era rappresentato da bambini ed adolescenti, mentre il 29% erano adulti, con un'età compresa tra 1 e 29 anni.

Le immagini della risonanza magnetica dell'ipofisi mostravano ipoplasia dell'ipofisi nel 43% dei soggetti, una sella vuota nel 19%, alterazioni o assenza del peduncolo ipofisario nel 16%, ectopia neuroipofisaria o displasia setto-ottica nell'8% e assenza della neuroipofisi o malformazioni cerebellari nel 3%, tuttavia un 8% dei soggetti non presentava alcuna alterazione neuroanatomica.

I 18 soggetti con IGHD erano suddivisi in 12 bambini e 9 adulti. L'immagine di risonanza magnetica dell'ipofisi era normale nel 29% dei casi, mentre nel 21% vi era ipoplasia ipofisaria, nel 14% vi era una sella vuota o una displasia setto-ottica e nel 7% una disgenesia del corpo calloso.

I soggetti studiati per LHX4 sono stati 63 CPHD (36 maschi/27 femmine) scelti all'interno del gruppo CPHD descritto per l'analisi di HESX1.

L'analisi di HESX1 ha permesso di identificare 2 mutazioni in 2 soggetti affetti da CPHD sporadico, nei 78 pazienti restanti non sono state trovate alterazioni di alcun tipo.

Il primo soggetto era un bambino di 9 anni con deficit di GH, TSH e gonadotropine, associato ad ectopia neuroipofisaria e malformazioni anatomiche, quali: restringimento biparietale, prominenza della sutura coronaria, rima oculare ristretta, naso a becco, ipoplasia della mandibola, impianto basso delle orecchie, lateralizzazione dei capezzoli, aracnodattilia con pterigio interdigitale, criptorchidismo con micropene. Il sequenziamento di HESX1 ha permesso di individuare la trasversione G18C nell'esone 1 in condizioni di eterozigosi. Tale mutazione provoca la sostituzione di una glutammina (CAG) con una istidina (CAC) a livello del sesto aminoacido della proteina: Q6H. Tale alterazione in eterozigosi, che è stata ereditata dalla madre, con fenotipo normale, è già stata descritta in un solo soggetto affetto da CPHD ed ectopia neuroipofisaria (Thomas *et al*, 1998). Il significato funzionale di tale alterazione rimane ancora da chiarire, tuttavia, il riscontro di questo ulteriore caso con caratteristiche fenotipiche e genotipiche simili a quelle già note avvalorava l'ipotesi che si tratti di una mutazione causale ad effetto dominante e a penetranza incompleta.

La seconda mutazione è stata trovata in un ragazzo di 30 anni, giunto all'attenzione degli endocrinologi per un'insorgenza tardiva di deficit di GH (picco 2,2 ng/ml) e di gonadotropine [mancata risposta al test di stimolo per LH ed FSH, testosterone basale: 0,2 ng/ml (valori basali normali: 3,10 ng/ml)]. La risonanza magnetica dell'ipofisi presentava una sella vuota.

La mutazione trovata in eterozigosi per la transione G385A nell'esone 3 provoca una sostituzione aminoacidica di una valina (GTA) con una isoleucina (ATA) a livello del codone 129 della proteina (V129I). Non è ancora stato possibile risalire ai genitori di tale soggetto e stabilire se si tratta di una mutazione ereditata o *de novo*. In letteratura tale mutazione non è ancora stata riportata. Si trova

nell'omeodominio e potrebbe influenzare il legame con il DNA. Prove funzionali di tale mutazione tramite electrophoretic mobility shift assay (EMSA) sono nei progetti futuri del laboratorio.

Per verificare che tali variazioni fossero delle vere mutazioni, è stata eseguita l'analisi molecolare dei frammenti contenenti le variazioni su 160 cromosomi di soggetti sani, che sono risultati del tutto normali.

L'analisi di LHX4, invece, non ha portato all'identificazione di alcuna mutazione causale. E' stato trovato, tuttavia, un polimorfismo nel sesto esone del gene a livello dell'aminoacido 312. Tale polimorfismo è una transizione G→A che provoca la sostituzione di un Acido Aspartico (GAC) con Asparagina (AAC). Le frequenze alleliche di tale variante all'interno del gruppo dei soggetti affetti da difetti ipofisari sono del tutto sovrapponibili con quelle del gruppo di controllo dei soggetti sani, essendo la frequenza allelica di G pari a 0,56 e 0,60 e la frequenza di A pari a 0,44 e 0,42 rispettivamente nel gruppo dei CPHD e dei controlli sani (p= NS). L'acido aspartico in posizione 312, inoltre, risulta già essere all'esterno dell'omeodominio ed è quindi poco probabile che abbia influenza nel legame con il DNA.

E' in progetto la valutazione molecolare del gene LHX3 nei soggetti CPHD e l'analisi funzionale delle mutazioni trovate in HESX1: Q6H e V129I. In particolare verrà provata la capacità di legame con il DNA della proteina HESX1 con la mutazione V129I mediante EMSA, come descritto nei lavori di Brickman *et al*, 2001 e di Dattani *et al*, 1998.

Partecipazione a Congressi

-Corso di formazione: "Biologia Molecolare in Endocrinologia Pediatrica"(2 incontri a Milano e 3 a Roma, 2004.

Bibliografia

Arslanian SA, Rothfus WE, Foley TP, Becker DJ. Hormonal, metabolic, and neuroradiologic abnormalities associated with setto-optic dyspesia. *Acta Endocrinol.* 1984 **107** 282-288

Bach I, Rhodes SJ, Pearse IIRV, Heinzl T, Gloss B, Scully KM, Sawchenko PE, Rosenfeld MG. P-Lim, a LIM hoemodomain factor, is expressed during organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 **92** 2720-2724.

Brickman JM, Clements M, Tyrell R, McNay D, Woods K, Warner J, Stewart A, Beddington RS, Dattani M. Molecular effects of novel mutations in Hesx1/HESX1 associated with human pituitary disorders. *Development* 2001 **128** 5189-5199.

Carvalho, L. R.; Woods, K. S.; Mendonca, B. B.; Marcal, N.; Zamparini, A. L.; Stifani, S.; Brickman, J. M.; Arnhold, I. J. P.; Dattani, M. T. A homozygous mutation in HESX1 is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. *J. Clin. Invest.* 2003 **112** 1192-1201.

Cohen RN, Cohen LE, Botero D, Yu C, Sagar A, Jurkiewicz M, Rodovick S. Enhanced repression by HESX1 as a cause of hypopituitarism and setto-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 **88** 4832-4839.

Dasen JS, Rosenfeld MG. Combinatorial codes in signaling and synergy: lessons from pituitary development. *Curr Opin Genet Dev.* 1999 **9** 566-574.

Dasen JS, Barbera JP, Herman TS, Connell SO, Olson L, Ju B, Tollkuhn J, Baek SH, Rose DW, Rosenfeld MG. Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev.* 2001 **15** 3193-3207.

Dattani, M. T.; Martinez-Barbera, J.-P.; Thomas, P. Q.; Brickman, J. M.; Gupta, R.; Martensson, I.-L.; Toresson, H.; Fox, M.; Wales, J. K. H.; Hindmarsh, P. C.; Krauss, S.; Beddington, R. S. P.;

Robinson, I. C. A. F. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with setto-optic dysplasia in human and mouse. *Nature Genet.* 1998 **19** 125-133.

Dattani MT, Robinson IC. The molecular basis for developmental disorders of the pituitary gland in man. *Clinical Genetics* 2000 **57** 337-346.

Deladoey J, Fluck C, Buyukgebiz A, Kuhlmann BV, Eble A, Hindmarsh PC, Wu W, Mullis PE. "Hot spot" in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 **84** 1645-1650.

Freyd G, Kim SK, Horvitz HR. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of *Cenorhabditis elegans* cell lineage gene lin-11. *Nature* 1990 **344** 876-879.

Fluck C, Deladoey J, Rutishauser K, Eblé A, Marti U, Wu W, Mullis PE. Phenotypic variability in familial combined pituitary hormone deficiency caused by a Prop-1 gene mutations resulting in the substitution of Arg->Cys at codon 120 (R120C). *J Clin Endocrinol Metab* 1998 **83** 3727-3733.

Gage PJ, Brinkmeier ML, Scarlett LM, Knapp LT, Camper SA, Mahon KA. The Ames dwarf gene, *df*, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of *Rpx* transcription and initiation of lineage-specific cell proliferation. *Mol Endocrinol.* 1996 **10** 1570-1581.

Izenberg N, Rosenblum M, Parks JS. The endocrine spectrum of septo-optic dysplasia. *Clin Pediatr* 1984 **23** 623-636.

Japon MA, Rubinstein M, Low MJ. In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J. Histochem. Cytochem.* 1994 **42** 1117-1125

Kawamata N, Sakajiri S, Sugimoto K, Isobe Y, Kobayashi H, Oshimi K. A novel translocation t(1;14) (q25;q32) in pre-B acute lymphoblastic leukemia involves the LIM homeodomain protein gene, *Lhx4*. *Oncogene* 2002 **21** 4983-4991.

Kioussi C, O'Connell S, St-Onge L, Treier M, Gleiberman AS, Gruss P, Rosenfeld MG. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 **96** 14378-14382

Kissinger CR, Liu BS, Martin-Blanco E, Kornberg TB, Pabo CO. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 1990 **63** 579-590.

Machinis K, Pantel J, Netchine I, Leger J, Camand OJ, Sobrier ML, Dastot-Le Moal F, Duquesnoy P, Abitbol M, Czernichow P, Amselem S. Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. *American Journal of Human Genetics* 2001 **69** 961-968.

Massa CG, Binder G, Oostijk W, Ranke MB, Wit JM. De novo mutation of the growth hormone gene: an important cause of congenital isolated growth hormone deficiency?. *European Journal of Pediatrics* 1998 **157** 272-5.

Morishima A, Aranoff GS. Syndrome of septo-optic pituitary dysplasia: The clinical spectrum. *Brain Dev* 1986 **8** 233-239.

Nechine I, Sobrier ML, Krude H, Schnabel D, Maghnie M, Marcos E, Duriez B, Cacheux V, Moer AV, Goossens M, Gruters A, Amselem S. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nature Genet.* 2000 **25** 182-186.

Qian YQ, Billeter M, Otting G, Muller M, Gehring WJ, Wuthrich K. The structure of Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 1989 **59** 573-580.

Paracchini R, Giordano M, Corrias A, Mellone S, Bellone J, Momigliano-Richiardi P, Bona G. Two new PROP-1 gene mutations responsible for compound pituitary hormone deficiency. *Clinical Genetics* 2003 **64** 142-147.

Parks JS, Brown MR, Harley DL, Phelps CJ, Wajnrajch. Heritable disorders of pituitary development *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 **84** 4362-4370

Phillips JA III, Cogan JD. Molecular basis of familial human growth deficiency *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994 **78** 11-16

Raetzman LT, Ward R, Camper SA. Lhx4 and Prop1 are required for cell survival and expansion of the pituitary primordia. *Development* 2002 **129** 4229-4239.

Rivarola MA, Phillips JA III, Migeon CJ, Heinrich JJ, Hjelle BJ. Phenotypic heterogeneity in familial isolated growth hormone deficiency type IA. *J Clin Endocrinol Metab* 1984 **59** 34-40

Savage JJ, Yaden BC, Kiratipranon P, Rhodes SJ. Transcriptional control during mammalian anterior pituitary development. *Gene* 2003 **319** 1-19.

Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B Jr, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA, Westphal H. Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science*. 1996 **272** 1004-1007.

Sheng H, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter S, Mahon K, Westphal H. Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 1997 **278** 1809-1812

Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG, Swanson LW. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev* 1990 **4** 695-711

Sloop KW, Meier BC, Bridwell JL, Parker GE, Schiller AM, Rhodes SJ. Differential activation of pituitary hormone genes by human Lhx3 isoforms with DNA binding properties. *Mol Endocrinol*. 1999 **13** 2212-2225.

Sloop KW, Walvoord EC, Showalter AD, Pescovitz OH, Rhodes SJ. Molecular analysis of LHX3 and Prop-1 in pituitary hormone deficiency with posterior pituitary ectopia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85** 2701-2708

Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carriere C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG. Pituitary lineage determination by Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 1996 **384** 327-333.

Tajima, T.; Hattorri, T.; Nakajima, T.; Okuhara, K.; Sato, K.; Abe, S.; Nakae, J.; Fujieda, K. : Sporadic heterozygous frameshift mutation of HESX1 causing pituitary and optic nerve hypoplasia and combined pituitary hormone deficiency in a Japanese patient. *J. Clin. Endocr. Metab* 2003. **88** 45-50.

Thomas PQ, Dattani MT, Brickman JM, McNay D, Warne G, Zacharin M, Cameron F, Hurst J, Woods K, Dunger D, Stanhope R, Forrest S, Robinson IC, Beddington RS. Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and setto-optic dysplasia. *Human Molecular Genetics* 2001 **10** 39-45

Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* 1998 **12** 1691-1704.

Vimpani GV, Vimpani AF, Lidgard GP, Cameron EH, Farquhar JW. Prevalence of severe growth hormone deficiency. *Br Med J.* 1977 **13** 427-430.

Vallette-Kasic S, Barlier A, Teinturier C, Diaz A, Manavela M, Berthezene F, Bouchard P, Chaussain JL, Brauner R, Pellegrini-Bouiller I, Jaquet P, Enjalbert A, Brue T. PROP1 gene screening in patients with multiple pituitary hormone deficiency reveals two sites of hypermutability and a high incidence of corticotroph deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 **86** 4529-4535.

Wales, J. K. H.; Quarrell, O. W. J. Evidence for possible mendelian inheritance of setto-optic dysplasia. *Acta Paediat* 1996. **85** 391-392.

Watkins-Chow DE, Cmper SA. How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? *TIG* 1998 **4** 284-289

West BE, Parker GE, Savage JJ, Kiratipranon P, Toomey KS, Beach LR, Colvin SC, Sloop KW, Rhodes SJ. Regulation of the Follicle-Stimulating Hormone Beta Gene by LHX3 LIM-Homeodomain TRanscription Factor. *Endocrinology*. 2004 Jul 22 as doi: 10.1210/en.2004-0598

Williams RH, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, Wilson J. Williams textbook of endocrinology. X edizione 2003. Ed. Saunders. Cap. Anterior Pituitary 177-279.

Yamaguchi M, Yamamoto K, Miura O. Aberrant expression of the LHX4 LIM-homeobox gene caused by t(1;14) (q25;q32) in Chronic myelogenous leukemia in biphenotypic blast crisis. *Genes Chromosomes Cancer* 2003 **38** 269-273.