

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE



«AMEDEO AVOGADRO»

Facoltà di Medicina e Chirurgia

TESI DI DOTTORATO

IN MEDICINA MOLECOLARE

XVII CICLO

***STUDIO DEI GENI COINVOLTI NELLA
PATOGENESI DEI DIFETTI IPOFISARI***

Relatore:

Prof. Gianni Bona

Coordinatore:

Prof. Umberto Dianzani

Candidata:

Dott.ssa Daniela Vivenza

Anno Accademico 2005-2006

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag.1
1.1 EMBRIOLOGIA IPOFISARIA	pag 1
1.2 DEFICIT ISOLATO DI GH	pag 3
1.2.1 Geni coinvolti nell'IGHD	pag 4
1) GH1	pag 3
Polimorfismi del promotore del GH1	pag 8
2) GHRH-R	pag 9
1.3 DEFICIT COMBINATI	pag 10
1.3.1 Geni coinvolti nel CPHD	pag 10
1) PIT1	pag 10
2) PROPI	pag 11
3) HESX1	pag 13
4) LHX4	pag 17
5) LHX3	pag 19
2. SCOPO DEL LAVORO	pag 20
3. CASISTICA	pag 21
4. MATERIALI E METODI	pag 24
4.1 ESRAZIONE DEL DNA	pag 24
4.2 AMPLIFICAZIONE PCR	pag 24
4.2.1 Gene GH1	pag 24
4.2.2 Geni GHRH-R, PIT1, PROPI,	
HESX1, LHX4	pag 26
4.3 DHPLC	pag 30
4.4 SEQUENZIAMENTO	pag 33
4.5 SINTESI E AMPLIFICAZIONE cDNA	pag 34

4.6 PLASMIDI E TRASFEZIONE	<i>pag 35</i>
4.7 ANALISI STATISTICA DEI DATI	<i>pag 36</i>
5. RISULTATI	<i>pag 37</i>
5.1 ANALISI CLINICA	<i>pag 37</i>
5.1.1 Pazienti IGHD	<i>pag 37</i>
5.1.2 Pazienti CPHD	<i>pag 41</i>
5.2 ANALISI GENETICA	<i>pag 52</i>
5.2.1 Gene GHI	<i>pag 52</i>
5.2.2 Gene GHRH-R	<i>pag 63</i>
5.2.3 Gene PROP1	<i>pag 65</i>
5.2.4 Gene PIT1	<i>pag 66</i>
5.2.5 Gene HESX1	<i>pag 67</i>
5.2.6 Gene LHX4	<i>pag 71</i>
6. DISCUSSIONE	<i>pag 74</i>
6.1 IGHD e CPHD	<i>pag 74</i>
6.2 IGHD	<i>pag 76</i>
6.3 CPHD	<i>pag 84</i>
7. CONCLUSIONI	<i>pag 90</i>
8. BIBLIOGRAFIA	<i>pag 92</i>
9. PUBBLICAZIONI	<i>pag 106</i>
Introduzione alle pubblicazioni di Ghrelin	<i>pag 106</i>
Bibliografia all'introduzione su Ghrelin	<i>pag 110</i>
10. ELENCO delle PUBBLICAZIONI	<i>pag 113</i>

1. INTRODUZIONE

Si definiscono come difetti ipofisari i disordini endocrini e/o neuroanatomici che coinvolgono uno o più ormoni secreti dall'adenoipofisi. In particolare si distinguono in deficit isolati di GH (IGHD) e in deficit ipofisari combinati (CPHD), che comprendono un difetto di produzione di almeno 2 tra gli ormoni secreti dall'ipofisi anteriore (GH, TSH, PRL, ACTH, LH, FSH) fino al deficit totale di tutti gli ormoni. In sintesi, si definisce ipopituitarismo globale, o panipopituitarismo, l'insufficiente secrezione di tutti gli ormoni ipofisari, ipopituitarismo parziale la situazione di carenza di uno o di alcuni di essi. La condizione di deficit dell'ormone antidiuretico (ADH) prodotto dall'ipofisi posteriore, associato al deficit di uno o più ormoni prodotti dall'ipofisi anteriore rientra tra i deficit ipofisari combinati o multipli.

Negli ultimi 20 anni sono stati compiuti notevoli progressi nella conoscenza delle basi genetico-molecolari dello sviluppo ipofisario e sono stati mappati e sequenziati numerosi geni coinvolti nella regolazione del processo di crescita: i geni che codificano per il GHRH e per il suo recettore (GHRH-R), il GH1 che codifica per il GH, i geni dei fattori trascrizionali ipofisari (PIT1, PROP1, HESX1, LHX3, LHX4).

1.1 EMBRIOLOGIA IPOFISARIA

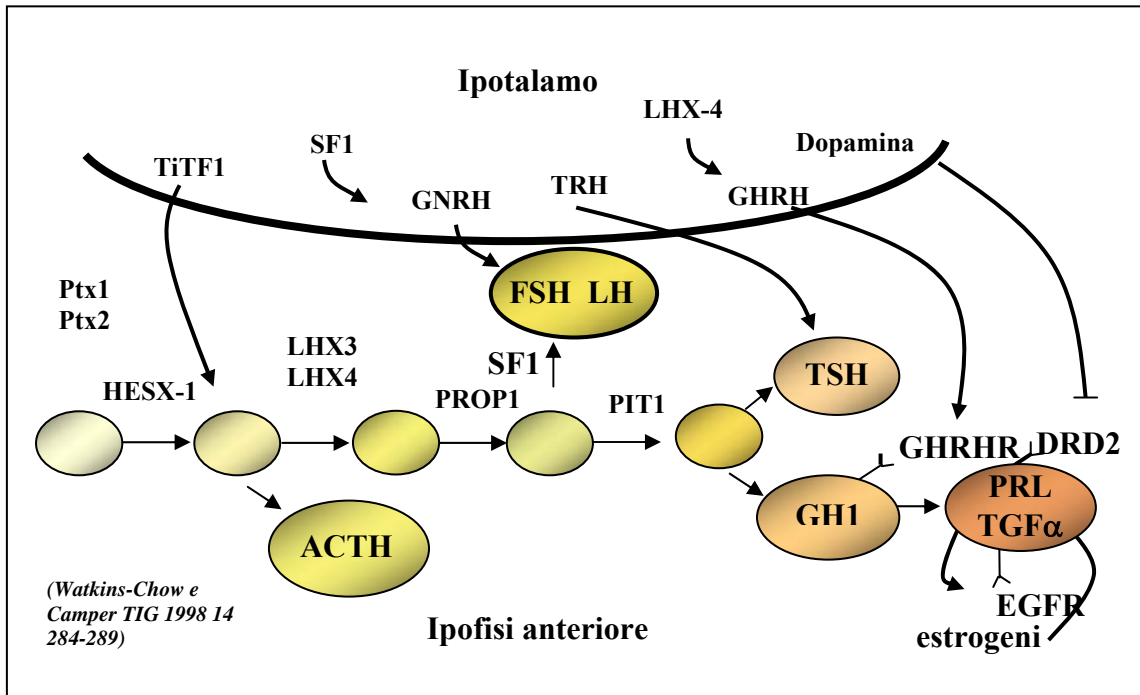
Per la formazione e lo sviluppo della ghiandola ipofisaria è necessario il coordinamento di un complesso processo di differenziazione cellulare e strutturale, che da studi di morfogenesi eseguiti su modelli animali, risulta simile in tutti i vertebrati (Dattani *et al*, 2000, Dattani, *et al*, 2005).

L'adenoipofisi prende origine dalla tasca di Rathke, che si abbozza come un diverticolo dall'ectoderma della cavità orale a circa 24 giorni di sviluppo embrionale. Da principio, la tasca di Rathke è una struttura rudimentale che si estende in direzione caudale, in seguito si forma una tasca chiusa e separata dallo stomodeo che cresce dirigendosi verso l'encefalo fino a prendere contatto con l'infundibolo, il quale si sviluppa come diverticolo ventrale del pavimento del terzo ventricolo (diencefalo) da cui originerà la neuroipofisi. Durante la sesta settimana la connessione della tasca di Rathke con la cavità orale scompare e le cellule della parete ventrale proliferano e si differenziano per dare origine alla adenoipofisi, mentre uno sviluppo più limitato della parete 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 spazio-temporale e con lo stessa sequenza in

tutti i mammiferi (Simmons *et al*, 1990; Japon *et al*, 1994). Le cellule corticotrope si differenziano sul lato dorsale del lobo anteriore verso l'apice rostrale, le gonadotrope nella regione ventrale; le tireotrope nella regione centrale; mentre le cellule somatotrope e le lactotrope, che derivano dallo stesso precursore cellulare, popolano la regione dorsale (Dasen *et al*, 1999; Kiousi *et al*, 1999).

La formazione e la successiva differenziazione della tasca di Rathke in adenoipofisi, sono regolate dall'azione combinata di specifici fattori estrinseci di trascrizione (BMP4, *Bone morphogenetic protein*; FGF8, *Fibroblast Growth Factor8*; WNT5, *Wingless-Type mmtv integration site family, member 5°*) ed intrinseci ipofisari (HESX1, PITX1, PITX2, LHX3, LHX4, PROP1, PIT1) (Scully e Rosenfeld, 2002). I fattori estrinseci sono espressi a livello diencefalico e non nella tasca di Rathke, ma sono comunque implicati nello sviluppo ipofisario (Dattani *et al*, 2002; Watkins-Chow *et al*, 1998; Dattani *et al*, 2000) (figura 1).

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



Mutazioni a carico dei geni che codificano per tali fattori determinano difetti endocrini e/o neuroanatomici più o meno gravi.

Le proteine prodotte dai geni PITX1 e PITX2 sono caratterizzate da *homeodomain bicoid-related* ed hanno un ruolo primordiale nello sviluppo della tasca di Rathke. PITX1 mappa al *locus* 5p31 ed è importante nella differenziazione della linea

cellulare corticotropa, mentre nella ghiandola adulta modula con SF1 (*Steroidogenic Factor-1*) la produzione delle gonadotropine, e con PIT1 la produzione di GH e PRL (Tremblay *et al*, 1998; Quentien *et al*, 2002). PTX2 mappa al *locus* 4q25-q26 e sembra coinvolto nella differenziazione finale delle linee cellulari ipofisarie. (Amendt *et al*, 1999). Mutazioni a carico di PITX2 sono 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 (Semina *et al*, 1996; Priston *et al*, 2001).

Alterazioni nei fattori trascrizionali intrinseci sono responsabili dell'insorgenza di difetti più o meno completi degli ormoni ipofisari.

Candidati per una valutazione molecolare per i geni espressi a livello ipofisario sono pertanto i soggetti con IGHD e CPHD in presenza o meno di difetti neuroanatomici.

1.2 DEFICIT ISOLATO DI GH

Il deficit isolato di GH ha una frequenza che è stata stimata tra 1/4000 e 1/10000 nati vivi (Rivarola *et al*, 1984; Vimpani *et al*, 1977; Phillips *et al*, 1994). La maggior parte di questi casi è di tipo sporadico, la cui patogenesi potrebbe essere di tipo organico, e in particolare in difetti che interessano ipotalamo o ipofisi (insulti cerebrali di natura traumatica o infettiva, interventi chirurgici, radiazioni, tumori, malattie infiltrative, edema), o da anomalie di sviluppo (displasia setto-ottica, idrocefalo, anomalie cromosomiche); tuttavia solo nel 12-20% dei pazienti sporadici sono riscontrabili alterazioni anatomiche alla risonanza magnetica (Cacciari *et al*, 1990), in tutti gli altri l'origine del difetto resta ancora sconosciuta e si definiscono pertanto deficit idiopatici.

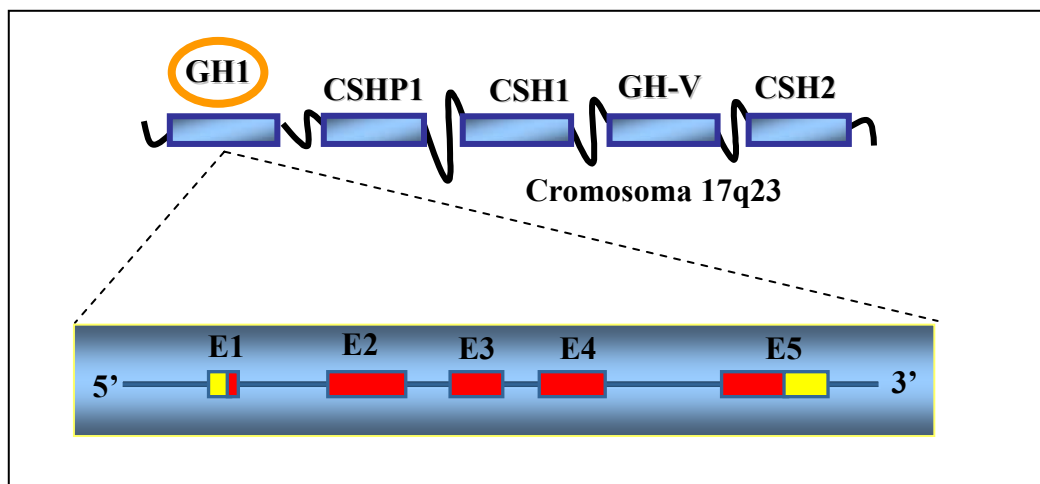
Nel 5-30% dei casi, invece, i pazienti hanno almeno un parente di primo grado affetto e questo suggerirebbe un'eziologia genetica: si parla allora di IGHD familiare (Phillips *et al*, 1994). Studi recenti indicano come anche i numerosi casi sporadici, talvolta, siano caratterizzati da alterazioni genetiche insorte *de novo* o trasmesse come carattere autosomico recessivo, ma non identificate in altri parenti a causa del numero limitato di componenti del nucleo familiare (Massa *et al*, 1998). È quindi ipotizzabile che una percentuale, ancora non ben definibile, di forme considerate idiopatiche abbia, in effetti, un'origine genetica.

1.2.1 Geni coinvolti nell'IGHD

1) GH1

Il gene maggiormente studiato nei pazienti con deficit isolato è il GH1. E' composto da 5 esoni e 4 introni per un totale di 1800 bp ed è localizzato sul cromosoma 17q23 entro un cluster di 66 Kb che include 4 geni altamente omologhi (92-98%), dei quali solo il GH1 viene espresso a livello pituitario nelle cellule somatotrope, CSH-1, CSH-2 e GH-V sono espressi nelle cellule sincizioblastiche della placenta, mentre CSH-P è uno pseudogene. I 5 geni del *cluster* hanno tutti una struttura molto simile caratterizzata dalla presenza di cinque esoni, interrotti in posizioni identiche da 4 introni (Figura 2).

Figura 2. Rappresentazione schematica del cluster genico del GH (GH-N = normal GH1; GH-V = variant GH; CSH = chorionic somatotropic hormone).



A monte del sito di inizio della trascrizione è localizzato il promotore, che comprende i siti di legame di diversi fattori trascrizionali; in particolare PIT1 che è responsabile anche dell'attivazione dei promotori dei geni di PRL e TSH.

Le mutazioni nel gene GH1 sono state scoperte in circa il 12,5% dei casi familiari e nel 10% dei casi sporadici di IGHD ed includono tra le forme più gravi, delezioni dell'intero gene e mutazioni *nonsense*, e tra le forme meno gravi le mutazioni nei siti di *splicing*.

Il peptide maturo è composto da 191 aminoacidi e rappresenta circa il 75% della forma circolante di 22 kDa, mentre *splicing* alternativi danno origine a forme minori. Tra queste la più rappresentata, per il 5-10%, è il peptide bioattivo di 20 kDa che deriva da uno *splicing* alternativo dell'esone 3 che utilizza un sito criptico con

perdita di 15 aminoacidi (dal 32 al 46). Altre forme minori e prodotte fisiologicamente a livelli bassissimi, dovute alla perdita degli esoni 3 e 3 / 4, sono state già riportate dalla letteratura (Procter *et al*, 1998), e corrispondono rispettivamente al peptide di 17,5 kDa (in cui mancano gli aminoacidi 32-71) ed al peptide di 11 kDa (mancante degli aminoacidi 32-126). Studi clinici hanno descritto quattro distinte forme di IGHD familiare; le due forme più frequenti (Tipo IA e IB) hanno una trasmissione a carattere autosomico recessivo, mentre le forme più rare sono trasmesse come autosomiche dominanti (tipo II) o con caratteristiche legate all'X (tipo III) (Cogan e Phillips, 1998; Lee *et al*, 2000).

La forma più grave di IGHD (IGHD IA), caratterizzata dalla totale assenza di GH, si trasmette in modo autosomico recessivo ed è causato da grosse delezioni (6,7-45 Kb) che interessano l'intero gene GH1 (Phillips *et al*, 1981) o, in rari casi, di mutazioni *nonsense* che determinano la formazione di codoni di stop prematuri o microdelezioni anche di una sola base che provocano slittamenti della cornice di lettura con conseguente produzione di una proteina tronca. Costante è il grave deficit staturale ad insorgenza precoce, già nei primi sei mesi di vita. I livelli di GH endogeno non sono misurabili e non si registra alcuna risposta ai test provocativi. In corso di trattamento sostitutivo con GH esogeno i soggetti dimostrano inizialmente un rapido incremento della velocità di crescita, spesso seguito da un arresto per lo sviluppo di anticorpi anti-GH a titoli sufficienti da bloccare l'attività dell'ormone esogeno. L'IGHD IA è infatti causato da un deficit completo probabilmente già prenatale di GH endogeno, che può portare ad una risposta immune al GH esogeno (Phillips *et al*, 1997; Procter *et al*, 1998). Il trattamento per questi pazienti, in particolare per quelli con una scarsa risposta al *hGH* e con un'elevata produzione di anticorpi anti-GH avviene con somministrazione di IGF-1 ricombinate.

L' IGHD di tipo IB (la forma più frequente e meno grave rispetto al tipo IA) ha eredità autosomica recessiva ed è associato ad un fenotipo meno severo rispetto all'IGHD IA, ma sempre caratterizzato dalla presenza dei sintomi più tipici dell'IGHD, quali la *facies* a bambola con fronte prominente, la cute grinzosa e la voce ad alta tonalità. I livelli di ormone somatotropo sono ridotti, ma misurabili, anche se insufficienti, dopo stimoli provocativi. La ridotta velocità di crescita risponde rapidamente e in modo consistente alla terapia con GH esogeno e i pazienti non sviluppano anticorpi bloccanti (Phillips *et al*, 1997). L' IGHD di tipo IB è causato sia da mutazioni che cadono in siti canonici di *splicing* nell'introne 3, sia da

mutazioni nel gene che codifica per il recettore del GHRH (GHRH-R) (Procter *et al*, 1998; Wajnrajch *et al*, 1996

L'IGHD di tipo II ha trasmissione autosomica dominante ed è causato, per la maggior parte dei casi, da mutazioni nei siti canonici di *splicing* dell'esone 3 del gene GH1. I pazienti si presentano con bassa statura e rispondono bene alla terapia sostitutiva con *hGH* senza produzione di anticorpi anti-GH. Queste mutazioni che alterano lo *splicing* normale, di solito cadono nel sito donatore o nelle prime 6 basi del III introne (IVS3: *intervening sequence*) (Mullis *et al*, 2002) provocando lo *skipping* dell'esone 3 stesso e la produzione della proteina di 17,5 kDa che manca degli aminoacidi 32-71 (Binder e Ranke, 1995), corrispondenti all'intera ansa che connette l'elica 1 con l'elica 2 della struttura terziaria del GH, e di conseguenza del ponte di-solfuro tra l'aminoacido 53 ed il 165 (de Vos *et al*, 1992; Cunningham *et al*, 1991). Altre mutazioni che danno lo stesso risultato sono state trovate nelle sequenze dello *splice enhancer* esonico (ESE) dell'esone 3 (in +1 G->T e in +5 A->G) e dello *splice enhancer* intronico (ISE) dell'introne 3 (in +28G->A e nella delezione Δ +28-45) (Takahashi *et al*, 2002; Cogan *et al*, 1995; Moseley *et al*, 2002; Cogan *et al*, 1997; Ryther *et al*, 2003; McCarthy, 1998). Queste mutazioni si trovano entro sequenze ricche in purine e causano un aumento dei livelli di trascritti con *skipping* dell'esone 3, suggerendo che l'utilizzo dei normali elementi di *splicing* potrebbe essere distrutto. I primi 7 nucleotidi dell'esone 3 sono cruciali per lo *splicing* dell'mRNA (Ryther *et al*, 2004), tanto che alcune mutazioni *nonsense* potrebbero causare lo *skipping* di uno o anche di più esoni durante lo *splicing* dell'mRNA. Oltre le mutazioni che portano allo *skipping* dell'esone 3, per l'IGHD di tipo II sono state riportate mutazioni *missense* che comprendono la sostituzione della prolina in posizione 89 con la leucina (P89L), dell'arginina in 183 con l'istidina (R183H) e della valina in 110 con la fenilalanina (V110F) (Duquesnoy *et al*, 1998; Deladoey *et al*, 2001; Binder *et al*, 2001).

A livello funzionale, la variante di 17,5 kDa ha effetto dominante negativo ed influisce negativamente sulla secrezione dell'isoforma di 22 kDa sia *in vitro* (colture cellulari) che *in vivo* (animali transgenici) (Lee *et al*; 2000; McGuinness *et al*, 2003). Dagli esperimenti sembra che la variante di 17,5 kDa venga trattenuta nel reticolo endoplasmatico, distrugga l'apparato del Golgi e danneggi l' isoforma di 22kDa (Graves *et al*, 2001) riducendone parzialmente la stabilità. La proteina di 17,5 kDa, mancando della cisteina in posizione 53 che forma uno dei due ponti di-solfuro, non

avrebbe un *folding* corretto. In genere le proteine con un “*folding* non corretto” sono ri-trasportate nel citosol dove vengono degradate dal proteasoma e solitamente non causano un effetto dominante negativo, a meno che non vi sia un eccesso di produzione della proteina “*misfolded*” tale da danneggiare la capacità di degradazione del proteasoma stesso (Gething *et al*, 1990; Schwartz e Ciechanover, 1999). Recentemente si è pensato che l’isoforma di 17,5 kDa possa formare degli eterodimeri con l’isoforma di 22 kDa che a sua volta formerebbe degli omodimeri. La successiva oligomerizzazione con gli eterodimeri non sarebbe sufficiente da permettere il *packing* (l’impaccamento) e la condensazione delle proteine corrette, bloccando la formazione del GH nelle vescicole secretorie mature del *trans*-Golgi. I complessi eterodimerici 17,5 kDa + 22 kDa sono stabili ma incapaci di uscire in modo efficiente tramite le vescicole secretorie, perciò si accumulerebbero nel Golgi e nella riserva del reticolo endoplasmatico scatenando la risposta cellulare di ritrasporto nel citosol. Quando la produzione dei complessi supera la capacità di degradazione del proteasoma, questi si accumulano come aggregati nel citosol, nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi, provocando in ultimo un effetto tossico. *In vivo*, nel topo transgenico con la delezione dell’esone 3 del GH (McGuinness *et al*, 2003) questo effetto è ancora più pronunciato ed accelerato per la stimolazione del GHRH sulle cellule somatotrope. Il GH, normalmente, regola la sua produzione tramite *feedback* diretti ed indiretti, riducendo la secrezione di GHRH ed aumentando l’espressione di somatostatina. La mancanza di questo *feedback* nel topo transgenico porta ad un aumento di GHRH e ad una diminuzione di somatostatina rispetto all’animale normale. L’impulso eccessivo di GHRH stimola sia la produzione della proteina di 22kDa sia dell’isoforma di 17,5 kDa portando in ultimo al blocco cellulare. Il successivo deficit di GH e la deregolazione del GHRH formerebbe quindi un circolo vizioso che accelererebbe la produzione e l’autodistruzione della popolazione cellulare del GH, esaurendo rapidamente la capacità di generare nuove cellule somatotrope. L’animale transgenico, infatti, mostra un grave deficit nella crescita, ipoplasia dell’ipofisi anteriore per grave perdita delle cellule somatotrope, che all’esame microscopico mostrano un ingrandimento del reticolo endoplasmatico, dei mitocondri, dell’apparato del Golgi e molte vescicole lipidiche.

Nell’uomo, dal punto di vista clinico, la bassa statura grave (< 4,5 SDS) non è presente in tutti gli individui affetti, e ciò indica che in alcune forme di IGHD di tipo II il difetto nella crescita può essere più o meno grave. Si è ipotizzato che i bambini

con mutazioni nei siti di *splicing* siano più bassi ed abbiano un esordio precoce rispetto ai loro coetanei con mutazioni *missense* (Binder *et al*, 2001).

Complessivamente, questi dati indicano che la variabilità fenotipica dovuta al deficit di GH di tipo II sia dipendente dalla quantità della proteina di 17,5 kDa rispetto alla proteina di 22kDa (McGuinness *et al*, 2003; Millar, *et al*, 2003), poiché sarebbe il loro rapporto a determinare la secrezione di GH.

Da studi *in vitro* sembra che mutazioni nel sito donatore dell'IVS3 (+1/+2 bp) abbiano un effetto più grave per l'aggregazione dello spliceosoma e per il suo funzionamento rispetto alle mutazioni che cadono in posizioni più lontane (in +5/+6 bp rispetto al sito donatore, nell'ISE o nell'ESE), e ciò influirebbe anche sullo skipping dell'esone 3 e di conseguenza sulla produzione della proteina di 17,5 kDa. L'aumento della proteina di 17,5 kDa, che apparentemente esercita un effetto dominante-negativo sull'impaccamento e sulla secrezione della proteina normale di 22 kDa, porterebbe infine ad un fenotipo più grave.

L'IGHD di tipo III ha caratteristiche di tipo recessivo ed è legato all'X. Oltre al deficit di GH, in questi pazienti è stata vista anche agammaglobulinemia. Non è stata documentata alcuna anomalia entro il GH-1 ed il meccanismo che sottostà al fenotipo per ora è sconosciuto.

Polimorfismi del promotore del GH1

Data la molteplicità degli elementi necessari alla corretta espressione di GH1, molti dei quali non sono stati ancora identificati, è evidente come i deficit di GH di origine genetica possano essere determinati non solo da mutazioni localizzate nel GH1, ma anche nei geni che ne regolano l'espressione (GHRH, recettore di GHRH, PIT1 o PROP1) e nelle sequenze regolatrici a monte del GH1.

Mentre la sequenza codificante del gene GH1 è altamente conservata e mostra un basso livello di polimorfismo, la regione del promotore prossimale è caratterizzata da un elevato grado di polimorfismo, presentando 15 variazioni nucleotidiche (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) nelle 500 basi a monte del sito di inizio di trascrizione (Horan *et al*, 2003; Giordano *et al*, 2001). Questi SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) danno origine ad almeno 40 diverse combinazioni aploipiche che hanno mostrato una differente attività trascrizionale *in vitro*. Tre dei polimorfismi riportati cadono all'interno di altrettanti siti di legame di fattori

trascrizionali: G-278T è localizzato all'interno del sito di legame del fattore ubiquitario NF1; A-75G nel sito del fattore di trascrizione ipofisario Pit1; G-57T in un sito di legame del recettore della vitamina D che reprime la trascrizione del GH1. Questi polimorfismi potrebbero avere una rilevanza funzionale nel modulare il livello trascrizionale del gene GH1.

2) **GHRH-R**

Il gene che codifica per il GHRH-R è stato mappato sul cromosoma 7p15. È formato da 13 esoni di dimensione variabile tra 40 bp e 154 bp e si estende su una regione di oltre 15 Kb (Mayo *et al*, 1992; Gaylinn *et al*, 1993).

La prima evidenza di un possibile coinvolgimento del GHRH-R nella patogenesi dell'IGHD è derivata dall'identificazione, in un naturale modello animale di IGHD (*little mouse*), di una mutazione missense nel dominio extracellulare del recettore, che lo rende funzionalmente inattivo (Godefrey *et al*, 1993).

Sino ad oggi la ricerca di alterazioni del gene del GHRH-R nell'uomo ha condotto all'identificazione di 15 diverse mutazioni in pazienti IGHD omozigoti o eterozigoti composti (Netchine *et al*, 1998; Carukushansky *et al*, 2003; Salvatori *et al*, 2001). Tali mutazioni rendono il GHRH-R funzionalmente inattivo e sono alla base di un fenotipo caratteristico, noto come "Nanismo di Sindh" (Maheshwari *et al*, 1998). Questa sindrome rappresenta l'omologo umano del *little mouse*, in cui una mutazione *missense*, che abolisce il legame con il GHRH, determina un analogo quadro clinico. Si trasmette con modalità autosomica recessiva ed è caratterizzata da un deficit severo di GH, bassi livelli sierici di IGF-1, IGF-II e IGFBP-3, elevate concentrazioni di IGFBP-2, con grave difetto di crescita (4-8 deviazioni standard sotto la media), aspetto armonico, microcefalia, intelligenza normale, pubertà ritardata e ipotensione asintomatica. Possono essere presenti bozze frontali e obesità troncale. I pazienti rispondono bene alla terapia e non sviluppano anticorpi anti-GH esogeno come nei deficit di tipo IB. I dati riportati sino ad ora in letteratura indicano che le mutazioni a carico del gene del GHRH-R costituiscono circa il 10% delle forme di IGHD di tipo IB (Salvatori *et al*, 2001).

1.3 DEFICIT COMBINATI

Si definiscono come deficit combinati (CPHD) i disordini che comprendono un difetto di produzione di almeno due tra gli ormoni secreti dall'ipofisi anteriore (GH, TSH, PRL, ACTH, LH, FSH), e dall'ipofisi posteriore (ADH) fino al deficit totale di tutti gli ormoni. Si tratta di una rara patologia che deriva da un'alterata funzionalità ipofisaria che può avere diverse origini eziopatologiche. L'incidenza di CPHD è stata stimata intorno a 1/8000 nati vivi. La maggior parte dei casi sono sporadici e dovuti principalmente a lesioni organiche o a conseguenza di parti traumatici. Circa il 10% dei pazienti, tuttavia, ha almeno un parente di primo grado affetto, con modelli di trasmissione che possono essere autosomico recessivo, autosomico dominante, o X-linked recessivo. Ciò ha suggerito una possibile causa genetica del difetto (Dattani *et al*, 2000).

Per lungo tempo ci si è chiesti come la mutazione di un singolo gene potesse provocare un difetto di diversi ormoni che sono ampiamente dispersi su tutto il genoma. Un contributo importante a questa domanda è venuto dalla conoscenza dei meccanismi che stanno alla base dello sviluppo e della differenziazione della ghiandola pituitaria, e alla scoperta dei fattori trascrizionali che dirigono lo sviluppo embriogenetico dell'ipofisi anteriore (Parks *et al*, 1999)

1.3.1 Geni coinvolti nel CPHD

1) PIT1

Scoperto nel 1988 PIT1 (*pituitary-specific transcription factor 1*) è stato il primo fattore identificato come causa di CPHD. PIT1 noto anche come GHF1 (*growth factor 1*), è un fattore di trascrizione specifico per l'ipofisi, che 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 per la subunità β del TSH. Il gene PIT1, ufficialmente noto come POUF1 (*Pou Domain Class 1 Transcription Factor 1*), è stato localizzato nell'uomo sul cromosoma 3p11 e consiste di 6 esoni che codificano per una proteina di 291 aminoacidi (Andersen *et al*, 2001). PIT1 contiene due domini proteici, detti POU-specific (POU-S) e POU-homeo (POU-H), entrambi necessari al legame con il DNA dei geni GH e PRL (Fox *et al*, 1990). Studi di cristallografia a raggi X mostrano la presenza di 4 α -eliche presenti nel dominio POU-S e 3 α -eliche presenti nel dominio POU-H (Jacobson *et al*, 1997). Pit-1 solitamente si lega a siti multipli dei geni bersaglio, e la sua dimerizzazione sul

DNA sembra essere importante per il legame ad alta affinità. La terza α -elica di POU-S e POU-H è quella che ha i maggiori contatti con il solco maggiore del DNA, e Pit-1 dimerizza sul DNA mediante l'interazione tra il dominio POU-S di una molecola ed il C-terminale di POU-H appartenente all'altra molecola. Quando si lega al DNA, Pit-1 attiva l'espressione dei geni GH e PRL, in parte mediante un dominio N-terminale di transattivazione ricco di residui aminoacidici idrossilati (ricco in serine e treonine) (Ingraham *et al*, 1990)

Mutazioni di PIT1 sono responsabili di un fenotipo CPHD caratterizzato da assenza di GH, PRL, TSH. Il deficit di GH è generalmente grave con livelli non rilevabili ai test di stimolazione ipofisaria e si manifesta in età precoce (generalmente entro i 2 anni) con grave difetto di crescita e *facies* tipica con caratteristiche simili alle forme di IGHD di tipo IA. Esiste invece una certa variabilità per quanto riguarda il grado di ipotiroidismo. Alcuni pazienti mostrano alla nascita le caratteristiche del cretinismo, altri sono eutiroidei alla diagnosi e sviluppano ipotiroidismo durante il trattamento con GH. Il deficit di PRL non dà segni clinici eclatanti. La secrezione di LH e FSH è normale, tuttavia soggetti con mutazioni di PIT1 possono manifestare un ritardo puberale in caso di trattamento tardivo con GH e T4. Alla risonanza magnetica l'ipofisi anteriore può apparire di volume ridotto o normale, indipendentemente dall'età dei soggetti e dal tipo di mutazione (Parks *et al*, 1999). Sino ad oggi nell'uomo sono stati descritte 2 delezioni (Hendriks e Stegeman, 2001; Blanckstein, 2001) e 19 mutazioni puntiformi (McLennan *et al*, 2003; Hashimoto *et al*, 2003; Salemi *et al*, 2003; Rainbow *et al*, 2005). La maggior parte delle mutazioni si comportano come mutazioni recessive e si manifestano allo stato di omozigosi o di eterozigosi composta. Esse nella maggior parte dei casi alterano residui importanti per il legame con il DNA o la conformazione tridimensionale delle α eliche dei POU-domains, determinando un'incapacità fisica ad interagire con i promotori; talvolta invece la mutazione induce la perdita più o meno completa della capacità di attivazione trascrizionale; la delezione dell'intero gene provoca invece la mancata sintesi della proteina .

2) PROP1

L'identificazione di pazienti con deficit combinato di GH, PRL, e TSH non associati ad alterazioni molecolari a carico di PIT1, ha indotto recentemente diversi autori a studiare il ruolo causale di mutazioni nell'ambito di PROP1.

PROP1 (*Prophed of Pit1*) è uno dei fattori di trascrizione ipofisari di più recente identificazione e sembra essere coinvolto nel processo di ontogenesi delle cellule gonadotrope oltre che di quelle somatotrope, lattotrope e tireotrope caudo-mediali. Mutazioni di PROP1 sono infatti responsabili di un fenotipo CPHD caratterizzato da assenza o bassi livelli di GH, PRL, TSH, LH, FSH (Parks *et al*, 1999). Il gene di PROP1 è stato mappato sul cromosoma 5q, occupa una regione di circa 3 Kb ed è costituito da 3 esoni, che codificano per una proteina di 223 aminoacidi (Dusquenoy, *et al*, 1998).

Le mutazioni di PROP1 rappresentano una delle cause più comuni di CPHD rispetto a PIT1. Fino ad oggi sono state identificate 15 mutazioni di PROP1 sia in casi familiari che sporadici (Fluck *et al*, 1998; Fofanova *et al*, 1998; Wu *et al*, 1998; Roosenbloom *et al*, 1999; Deladoey *et al*, 1999; Mendonca *et al*, 1999; Osorio *et al*, 2000; Agarwall *et al*, 2000; Asteria *et al*, 2000; Pernasetti *et al*, 2000; Vallette-Kasic *et al*, 2001; Riepe *et al*, 2001; Crone *et al*, 2002; Arroyo *et al*, 2002; Tatsumi *et al*, 2004; Voutetakis *et al*, 2004; Reynaud *et al*, 2005).

Sono tutte ereditate in modo autosomico recessivo e tutte (ad eccezione di G582A) coinvolgono il dominio che lega il DNA, codificato dagli esoni 2 e 3, determinando una completa, o quasi completa, incapacità da parte del prodotto proteico di legare il DNA. Recentemente è stata identificata una nuova mutazione G582A che, a differenza delle altre, cade nella sequenza che codifica per il dominio di transattivazione di PROP1 e genera un codone di stop prematuro in posizione 194. In questo caso la proteina mutata mantiene la capacità di legare il DNA, ma perde il dominio responsabile delle proprie capacità di attivatore trascrizionale

Il fenotipo clinico è molto variabile soprattutto rispetto alla gravità dei sintomi e all'età d'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 d'esordio, tuttavia, è sempre rappresentato da un difetto di crescita staturale. La maggior parte dei pazienti non iniziano lo sviluppo puberale e mostrano una risposta di LH e FSH allo stimolo con LHRH costantemente ridotta. Raramente i pazienti raggiungono spontaneamente la pubertà con livelli normali di LH e FSH ai test di stimolo, e sviluppano tardivamente un progressivo ipogonadismo.

Recentemente sono stati descritti alcuni pazienti che hanno sviluppato anche un deficit di ACTH. Si tratta di un deficit progressivo e ad esordio tardivo che può tuttavia indurre una insufficienza surrenalica acuta con rischio di *shock* (Agarwall *et*

al, 1999). Pertanto si rende necessaria un'analisi molecolare in tutti i soggetti con CPHD al fine di identificare i portatori di mutazioni di PROP1 che richiederanno un'attenta valutazione dell'asse ACTH-surreni a lungo termine.

Non esiste una perfetta correlazione genotipo-fenotipo: il fenotipo varia non solo tra differenti mutazioni ma anche tra pazienti che presentano la stessa mutazione nella stessa famiglia.

La maggior parte dei pazienti con mutazioni a carico di PROP1 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 un'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 PROP1. Importante è dunque la diagnosi differenziale con patologie espansive come craniofaringioma, adenoma ipofisario, disgerminoma o cisti della tasca di Rathke in quanto nei pazienti con mutazioni a carico di PROP1 non è indicata la chirurgia ipofisaria (Riepe *et al*, 2001) .

3) **HESX1**

HESX1, la cui sigla è l'acronimo di *Homeobox gene expressed in Embryonic Stem cell*, è un gene identificato recentemente con un ruolo importante per lo sviluppo dei nervi ottici e dell'ipofisi anteriore. Nell'uomo è localizzato al *locus* 3p21.1-21.2 ed è composto da 4 esoni e 3 introni codificanti per un fattore di trascrizione di 185 aminoacidi con funzione repressiva (Brickman *et al.*, 2001). Possiede un *homeodominio* di 60 aminoacidi molto conservato nella scala filogenetica (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 nel determinare il *pattern* anteriore del sistema nervoso centrale in diverse specie di vertebrati. 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. La sua espressione si estingue 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 regolato 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 anch'esso, come l'*homeodomain*, 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, a carico del gene HESX1, sono state identificate 5 mutazioni *missense*: due a trasmissione autosomica recessiva e tre a trasmissione dominante, 2 inserzioni ed 1 delezione (tabella I e II).

Tabella I: variazioni in *HESX1*

Mutazione nucleotidica	Sostituzioni aminoacidiche	Dominio proteico coinvolto	Referenza
C478T nell'esone 4	R160C	<i>Homeodominio</i>	(Dattani <i>et al.</i> , 1998)
C509T nell'esone 4	S170L	Confini dell' <i>homeodominio</i>	(Thomas <i>et al.</i> , 2001 e Brickman <i>et al.</i> , 2001)
A541G nell'esone 4	T181A	In posizione carbossi-terminale	(Thomas <i>et al.</i> , 2001)
G18C nell'esone 1	Q6H	In posizione amino-terminale	(Thomas <i>et al.</i> , 2001)
T77C nell'esone 1	I26T	Nel dominio repressivo all' amino-terminale	(Carvalho <i>et al.</i> , 2003)
*c306/307 ins AG nell'esone 2	E102 → frameshift	Perdita completa dell' <i>homeodominio</i>	(Tajima <i>et al.</i> , 2003)
**g.1684delG nell'esone 4	A175 → frameshift	Cambiamento degli ultimi 8 aminoacidi al carbossi-terminale	(Cohen <i>et al.</i> , 2003)
c385-386ins315 Alu-element ins nell'esone 3	V129 → frameshift	Perdita del 56% e del 70% dell' <i>homeodominio</i>	(Sobrier <i>et al.</i> , 2005)

* c: posizione sul cDNA; **g: posizione genomica

Tabella II : correlazioni tra mutazioni di *HESX1* e fenotipo

Posizioni	Tipo di trasmissione	Deficit associati	RMN
R160C ^a	recessiva	GH, TSH, ACTH, FSH e LH	ACC, ONH (SOD)
R160C ^a	recessiva	GH, TSH, ACTH, FSH e LH	ACC, ONH (SOD)
S170L ^b	dominante	GH	ONH bilaterale
S170L ^b	dominante	GH	Normale
S170L	dominante	GH	Ipoplasia adenoipofisi, ectopia neuroipofisi
T181A	dominante	GH	Ipoplasia adenoipofisi
Q6H	dominante	GH, TSH	Ipoplasia adenoipofisi, ectopia neuroipofisi
I26T ^c	recessiva	GH, TSH, ACTH, FSH e LH	Ipoplasia adenoipofisi, ectopia neuroipofisi
306/307 ins AG	dominante	GH, TSH, ACTH, FSH e LH	ONH monolat. Ipoplasia adenoipofisi, Ectopia neuroipofisi
g.1684delG	dominante	GH	ACC, ONH (SOD)
Alu-element ins nel terzo esone	recessiva	GH, TSH, FSH e LH	Agenesia adenoipofisi, coloboma

^a e ^b casi familiari: ^a famiglia 1 (fratello e sorella figli di consanguinei); ^b famiglia 2 (fratelli); ^c figlia di consanguinei; ACC= agenesia del corpo calloso; ONH= ipoplasia del nervo ottico

I soggetti portatori di tali mutazioni hanno fenotipi estremamente diversi, sia dal punto di vista neuroanatomico che endocrino, che vanno da gravi quadri di SOD, a CPHD relativamente moderati o IGHD.

Generalmente i soggetti eterozigoti descritti ereditano la mutazione da un genitore sano e tendono ad avere un fenotipo più lieve. Dal momento che in tali pazienti la più comune manifestazione clinica è il deficit isolato di GH, diventa importante studiare il contributo delle mutazioni in eterozigosi di HESX1 nei soggetti con difetti ipofisari sporadici e familiari ed in particolare in quelli con IGHD (Thomas *et al*, 2001)

Recentemente sono state descritte 2 inserzioni (306/307insAG ed *Alu-element* nell'esone 3) e 1 delezione (1684delG), che provocano uno slittamento della cornice di lettura con produzione di proteine non funzionali.

La prima è un'inserzione *de novo* (306/307insAG) in stato di eterozigosi trovata in un paziente CPHD di origine giapponese che presentava un quadro di panipopituitarismo, ipoplasia dell'adenoipofisi con ectopia neuroipofisaria e ipoplasia del nervo ottico (Tajima *et al*, 2003). Tale mutazione produce una proteina tronca al residuo 104 e perdita di tutto l'*homeodominio* legante il DNA.

La seconda è un'inserzione in omozigosi di una sequenza *Alu* di circa 300 bp nel terzo esone, che è stata trovata in una paziente CPHD affetta da aplasia dell'adenoipofisi e da coloboma del nervo ottico di destra con conseguente cecità unilaterale. La probanda era figlia di genitori consanguinei non affetti e portatori della mutazione in stato di eterozigosi (Sobrier *et al*, 2005). L'inserzione della sequenza *Alu* provoca *splicing* alternativi dell'mRNA, determinando sia lo *skipping* dell'esone 3 sia lo *skipping* dell'esone 2 e dell'esone 3 con produzione di 2 proteine aberranti che perdono rispettivamente il 56% e il 70% dell'*homeodominio* legante il DNA.

La delezione in eterozigosi g.1684delG, insorta *de novo*, è stata trovata in un paziente IGHD affetto da displasia setto-ottica (Cohen *et al*, 2003). Tale delezione cade nell'esone 4 e provoca un cambiamento nella traduzione degli ultimi 8 aminoacidi al carbossi-terminale della proteina, con spostamento del codone di stop di una tripletta. Studi funzionali eseguiti sulla proteina mutata (di 186 AA) hanno dimostrato che avrebbe una maggiore affinità di legame per il DNA e, legandosi agli stessi siti di legame di PROP1, tenderebbe ad impedirne o ritardarne l'attività trascrizionale.

I pazienti recanti le mutazioni *missense* in eterozigosi hanno un fenotipo più lieve rispetto ai portatori di mutazioni in omozigosi, e ciò riflette l'effetto visto sul modello animale in cui solo l'1% dei topi *Hesx1*^{+/-} manifestavano difetti a livello del prosencefalo e degli annessi ipofisari, mentre tutti gli omozigoti per la delezione del gene (*Hesx1*^{-/-}) presentavano malformazioni gravi già a livello embrionale.

Inoltre, anche la posizione della mutazione in un dominio più o meno conservato della proteina potrebbe influenzarne oltre le caratteristiche steriche, e quindi la struttura quaternaria, anche la funzionalità. Infatti, studi di spettroscopia di risonanza magnetica nucleare hanno dimostrato che la mutazione R160C, che cambia il residuo molto conservato di arginina in cisteina, avrebbe un impatto molto grave sulla stabilità dell'*homeodominio*, e studi funzionali che valutano il legame con il DNA (*EMSA: electromobility shift assay*) dimostrano una visibile incapacità legante della proteina mutata rispetto alla proteina normale od alle altre proteine recanti variazioni che cadono al di fuori dell'*homeodominio* (S170L e T181A).

Quindi HESX1 ha un effetto di semidominanza con una penetranza incompleta del fenotipo eterozigote, ed un effetto più ingravescente del fenotipo omozigote.

Le mutazioni identificate nell'uomo in definitiva non forniscono una spiegazione generale della SOD, ma suggeriscono un potenziale importante ruolo di questo gene nelle forme idiopatiche dominanti o recessive di ipopituitarismo, che in definitiva potrebbero essere l'effetto della modulazione dell'interazione tra HESX1 e le proteine *partners* coinvolte nello sviluppo del prosencefalo e della ghiandola pituitaria (Arslanin *et al*, 1994). Il gene HESX1, inoltre, è stato il primo gene associato a quadri neuroradiologici di aplasia dell'adenipofisi e di ectopia e mancata discesa dell'ipofisi posteriore. Recentemente tali fenotipi sono stati associati a mutazioni di un altro gene, LHX4, che codifica per un fattore trascrizionale che interviene nello sviluppo embriogenetico dell'ipofisi.

4) LHX4

Il gene LHX4 (*Lim Homeobox Gene 4*) è un gene *homeobox* localizzato al *locus* 1q25 che codifica per un fattore di trascrizione di 390 aminoacidi caratterizzato da 2 domini LIM trascritti dagli esoni 2 e 3 e da un *homeodomain* di legame con il DNA molto conservato, trascritto dall'esone 4 e da parte dell'esone 5 (Liu *et al*, 2002). Le proteine LIM contengono 2 domini tandem ripetuti ricchi in cisteina ed istidina

localizzati all'N-terminale che non si legano al DNA ma possono essere coinvolti nella regolazione trascrizionale (Bach *et al.*, 1995).

LHX4 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). Nel topo l'assenza combinata di Lhx3 e Lhx4 determina un precoce arresto dello sviluppo ipofisario con la sola formazione di una tasca rudimentale; le ghiandole ipofisarie in cui manca Lhx4 mostrano una corretta differenziazione di tutte le 5 linee cellulari, ma in esse l'espansione di ciascuna cellula specializzata è notevolmente ridotta. Topi portatori di mutazioni di Lhx4 hanno un fenotipo meno grave rispetto ai portatori di mutazioni di Lhx3, in quanto presentano tutti i 5 tipi cellulari, anche se estremamente ridotti di numero (Sheng *et al.*, 1997).

Sino ad oggi è stata identificata una sola mutazione nell'uomo a carico di LHX4, a trasmissione dominante in due fratelli figli di consanguinei ed affetti da deficit combinato. Tale mutazione coinvolge il sito accettore (AG) di *splicing* dell'esone 5, con sostituzione della G con una C. 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'*homeodomain* (VWFQ) (Machinis *et al.*, 2001). La trasmissione della mutazione è stata ricercata nei familiari dei 2 pazienti affetti su tre generazioni e si è verificato che i soggetti che avevano ereditato l'allele mutato presentavano un quadro variabile di deficit ipofisario da IGHD a CPHD con deficit di GH, TSH e ACTH associato ad anomalie strutturali della sella turcica e delle tonsille cerebellari. Per quanto riguarda le anomalie ipofisarie i soggetti presentavano alla risonanza magnetica una ipoplasia dell'ipofisi anteriore associata, solo in alcuni di essi, ad una ectopia dell'ipofisi posteriore. Infine il fenotipo includeva lo stiramento delle tonsille cerebellari tipico di pazienti con malformazione di Arnold Chiari.

Quindi, l'effetto trascrizionale di LHX4, se compromesso, potrebbe essere la causa patogenetica delle anomalie strutturali che si notano in questo studio, inoltre il riscontro dell'ectopia neuroipofisaria riflette il difetto del *pattern* cellulare visibile nei topi *knock-out* Lhx4^{-/-} (Sharma *et al.*, 1998)

5) **LHX3**

Il gene LHX3 (*Lim Homeobox Gene 3*) è localizzato sul cromosoma 9q34.3, codifica per un fattore di trascrizione espresso nella fase di sviluppo in cui le cellule ectodermiche orali della tasca di Rathke prendono contatto con quelle neuronali che formano il lobo posteriore dell'ipofisi. Si tratta dunque di un fattore critico per lo sviluppo strutturale della ghiandola ipofisaria ma anche per la differenziazione e la proliferazione delle cellule ipofisarie gonadotrope, lattotrope, somatotrope e tireotrope. Topi *knockout* per il gene *Lhx3* non sviluppano un'ipofisi matura, ma solo un abbozzo con poche cellule adrenocorticotrope. Recentemente nell'uomo sono state identificate 2 mutazioni (una delezione e 1 mutazione missense) a carico di LHX3. Esse sono associate ad un quadro di CPHD caratterizzato dal deficit di tutti gli ormoni secreti dall'adenipofisi, ad eccezione dell'ACTH, con grave difetto di crescita staturale. I pazienti sino ad oggi descritti presentano inoltre rigidità spinale cervicale con limitata capacità di rotazione del capo (Netchine *et al*, 2000)

Dal momento che LHX3 sembra essere molto importante nei processi precoci di formazione della ghiandola ipofisaria è stato ipotizzato che mutazioni a carico di tale gene potessero essere responsabili delle forme di ipopituitarismo anteriore associato ad ectopia dell'ipofisi posteriore. Tuttavia le indagini molecolari in pazienti con ectopia neuroipofisaria non confermano questa ipotesi (Sloop *et al*, 2000).

2. SCOPO DEL LAVORO

Il presente studio è finalizzato all'identificazione delle basi molecolari dei difetti ipofisari su un'ampia casistica di soggetti con IGHD e CPHD, familiari e sporadici, non organici, selezionati mediante valutazione anamnestica, clinica, auxologica, laboratoristica e strumentale in 26 centri italiani ed in un centro turco.

A tale scopo su campioni di DNA provenienti da tali pazienti sono state ricercate mutazioni causali nei geni candidati dei difetti ipofisari: GH1, GHRH-R, PIT1, PROP1, LHX4 ed HESX1.

In particolare per i soggetti affetti da IGHD l'analisi molecolare prevedeva di studiare come geni candidati il GH1, il gene codificante per il recettore del GHRH, HESX1 ed infine PIT1 e PROP1 solo nei soggetti prepuberi poiché potrebbero non avere ancora sviluppato CPHD.

I soggetti affetti da CPHD sono invece stati suddivisi in pre-puberi, ipogonadici e puberi. I CPHD prepuberi sono stati studiati per PROP1, PIT1, HESX1, LHX4; quelli ipogonadici per PROP1, HESX1, LHX4, quelli puberi ed eugonadici per PIT1, HESX1, LHX4.

3. CASISTICA

Lo studio è stato rivolto a soggetti con diagnosi di IGHD e CPHD reclutati da Specialisti Endocrinologi Pediatri e dell'adulto appartenenti a 26 centri italiani e 1 turco.

I pazienti sono stati selezionati mediante valutazione anamnestica, clinica, auxologica, laboratoristica e strumentale.

Nessuno dei soggetti presentava una storia di trauma neonatale all'anamnesi, né difetti congeniti, né patologie organiche.

La diagnosi di IGHD veniva effettuata secondo i seguenti criteri:

- 1- statura alla diagnosi inferiore a - 2 DS rispetto alla media per l'età e/o velocità di crescita inferiore al 25° percentile;
- 2- deficit di GH: in età infantile sono stati considerati patologici picchi secretori di GH < 10 ng/ml a due classici test provocativi; oppure un picco di GH < 20 mg/dl al test con GHRH + Arginina (Shalet *et al*, 1998; Ghigo *et al*, 1996). In età adulta sono state considerate patologiche risposte ai test classici <9 ng/dl e al test GHRHR + arginina < 16.5 ng/dl (Shalet *et al*, 1998).
- 3- funzionalità tiroidea (TSH), adrenocorticotropa, e gonadotropa (nei pazienti in età puberale) nella norma

Tra gli IGHD sono stati inclusi anche quei soggetti che presentavano disfunzione neurosecretoria (NSD), la cui diagnosi seguiva i seguenti criteri (Spiliotis *et al*, 1984):

- 1 statura alla diagnosi al di sotto del 3° percentile, velocità di crescita inferiore a 4cm/anno
- 2 età ossea ritardata di almeno 2 anni rispetto all'età cronologica
- 3 valori del picco di GH, dopo test di stimolazione, nella norma (> o uguale a 10 ng/ml), bassi livelli di somatomedina C, ma con *pattern* di GH insufficiente nel corso della 24 ore (<3 ng/ml alla secrezione spontanea).

La diagnosi di CPHD era definita dalla mancanza di 2 o più ormoni secreti dalla adenoipofisi. Il deficit di ADH associato ad uno o più ormoni prodotti dall'adenoipofisi, rientra tra i deficit multipli.

Per testare la funzionalità tiroidea, adrenocorticotropa e gonadotropica, i pazienti erano sottoposti a test di polistimolo mediante l'infusione combinata di insulina, *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) e *thyrotropin-releasing hormone* (TRH). Sono stati registrati i valori basali e di picco dopo stimolo dei seguenti ormoni: cortisolo, ACTH, TSH, LH, FSH.

I difetti di tali ormoni erano definiti sulla base dei seguenti criteri:

- 1- deficit di ACTH: livelli basali di cortisolo $< 5 \mu\text{g/dl}$ con picchi $< 25 \mu\text{g/dl}$ con mancato aumento dei livelli di ACTH.
- 2- deficit di TSH: livelli basali di TSH $\leq 0.2-4.6 \mu\text{U/dl}$ con picchi $< 10 \mu\text{g/dl}$ e/o livelli di L-tiroxina libera $< 0.8 \text{ ng/dl}$ in associazione a normali livelli di TSH ($0.2-4.6 \mu\text{U/dl}$)
- 3- deficit di gonadotropine: aumento di LH $< 2-3$ volte e di FSH $< 1,5-2$ volte rispetto ai livelli basali dopo stimolo con GnRH, nei pazienti in età puberale (Larsen p260, 2003).

Tutti i dati relativi a ciascun individuo erano riportati su una *Scheda Raccolta Dati* (figura 3) che doveva accompagnare un campione di sangue venoso che, prelevato da ciascun paziente, veniva inviato presso il nostro Centro per l'analisi genetica.

Figura 3. Scheda raccolta dati

SCHEMA RACCOLTA DATI

GENI COINVOLTI NELLA PATOGENESI DEL DEFICIT DI GH

Centro _____ Tel: _____
 Responsabile: _____ Paz: _____
 Medico compilatore: _____ Email: _____

Dati anagrafici
 Cognome, Nome (kinishi): Sesso: M F
 Data di nascita: _____

Cognome, Nome (kinishi) padre: Luogo di nascita: _____
 Cognome, Nome (kinishi) madre: Luogo di nascita: _____

Luogo di nascita nonni paterni: _____ materni: _____

Eventuali dati anagrafici di fratelli o altri consanguinei: _____

Albero genealogico

Indicare i casi di eventuale consanguineità e la presenza nella genealogia di soggetti con bassi statura

Statura madre: cm _____ Statura padre: cm _____

Anamnesi fisiologica:
 Decorso della gravidanza: _____
 nato a termine: parto entocico:
 nato pretermine: parto distocico:
 peso alla nascita: _____ lunghezza alla nascita: _____
 circonferenza cranica: _____

Anamnesi patologica remota: _____
 Patologie croniche concomitanti: _____

Test endocrinologici
 Data di rilevazione: _____ Età cronologica: _____
 Età ossea: _____ Peso: _____ Statura: _____
 Velocità di crescita: _____
 Stadio puberale: _____
 Eventuali altri controlli: _____

Indagini diagnostiche
 Secrezione di GH
 1° test (specificare): _____
 GH basale: _____ picco GH: _____ pagini
 2° test (specificare): _____
 GH basale: _____ picco GH: _____ pagini
 Secrezione spontanea (nocturna): media _____ pagini, picco _____ pagini

Test al OHRH: _____
 Proteina di legame: _____
 IGF1: _____
 TSH basale: _____ dopo TRH: picco: _____
 PRL basale: _____ dopo TRH: picco: _____
 ACTH basale: _____ dopo ITT: picco: _____
 Cortisolo basale: _____ dopo ITT: picco: _____

In pazienti in età puberale:
 LH basale: _____ dopo GnRH: picco: _____
 FSH basale: _____ dopo GnRH: picco: _____

EMN o TAC Spirale: _____

Terapia con GH: sì no Altre terapie: _____
 Velocità di crescita post-terapia: _____

4. MATERIALI E METODI

4.1 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO E DETERMINAZIONE DELLA SUA CONCENTRAZIONE

Il DNA genomico è stato ottenuto da sangue venoso intero mediante estrazione con Sali, utilizzando la procedura standard del *salting-out* (Miller *et al.*, 1988).

Per determinarne la concentrazione del DNA, 3 µl di ogni campione sono stati diluiti 1:100 in acqua bidistillata e sono stati esaminati allo spettrofotometro a 260 nm ed a 280 nm.

La lettura a 260 nm serve per determinare la concentrazione degli acidi nucleici, quella a 280 nm l'entità della presenza di proteine.

$$C (\mu\text{g/ml}) = A \times 50 \times 100$$

C = concentrazione

A = assorbanza (valore dato dallo spettrofotometro)

50 = costante caratteristica del DNA

100 = diluizione

Il rapporto tra le concentrazioni a 260 e 280 è indice della purezza del DNA ed è accettabile quando compreso tra 1.6 e 1.8.

4.2 AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR

4.2.1 Gene GH1

L'intera sequenza del gene è stata amplificata mediante tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction) impiegando i primers specifici per il GH1, Gh32 e Gh33 (tabella II), che fiancheggiano le due estremità del gene e non amplificano gli altri geni del *cluster*. I primers Gh18 e Gh4, amplificano la regione del promotore.

La reazione è stata preparata in un volume totale di 50 µl contenenti: 300 ng di DNA genomico, 20 pmol di ciascuno dei due primers, 200 µM per ciascuno dei quattro deossinucleotiditriofosfati (dNTPs), a concentrazioni di MgCl₂ pari a 1,5 mM, in una soluzione tampone a 50 mM di KCl e 10 mM di Tris-HCl (ph8,3) ed utilizzando 1,5 U di DNA polimerasi High fidelity EXT (Finnzymes, Espoo, Finland).

Il ciclo di PCR era così costituito: una denaturazione iniziale di 1 minuto a 94° C, seguita da 30 cicli di 10 secondi a 94° C (denaturazione), 30 secondi a 62° C (*annealing*) e 3 minuti a 68° C (estensione). È stato infine aggiunta un'estensione finale di 5 minuti a 72° C.

Il DNA così amplificato veniva visualizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% colorato con etidio bromuro.

Al fine di ottenere frammenti di lunghezza idonea all'analisi di mutazioni sono state disegnate le seguenti coppie di primers interni: Gh40-Gh13, Gh14-Gh27, Gh26-Gh15, IVS4F-IVS4R, Gh16.17-Gh31, comprendenti gli esoni e gli introni del gene. Le sequenze dei primers e le condizioni di analisi per DHPLC di ogni frammento sono elencate nella tabella III.

Tabella III. *Primers e condizioni DHPLC usati per l'analisi del GHI*

Primers		Condizioni DHPLC	
	Sequence (5' → 3')	% buffer B	Temperatura (°C)
Gh32 (f)	CCAGCAATGCTCAGGGAAAG	--	--
Gh33(r)	TGTCCCACCGGTTGGGCATGGCCAGGTAGCC		
Gh18 (f)	GGAGGTTAAACATGCGGGGA	--	--
Gh4 (r)	GCCCCCGTCCCATCTACAGGT		
Gh40 (f)	TTTGGGCACAATGTGTCCT	60,5-70,5	63-61
Gh13 (r)	CTGAGCTCCTTAGTCTCCTCCTC		
Gh14 (f)	GACTTTCCCCCGCTGGAAATAAG	58,5-68,5	62,7-60,7
Gh27 (r)	AGATGCGGAGCAGCTCTAGG		
Gh26 (f)	CTCAGAGTCTATTCCGACACCC	58,5-68,5	63,1-60,7
Gh15 (r)	GTGTTTCTCTAACACAGCTCTC		
IVS4F (f)	CCCCTGACTTTGAGAGCTG	58-68	61,9
IVS4R (r)	CATGTCCTTCCTGAAGCAGT		
Gh16.17(f)	TCACACAACGATGACGCACT	51,7-61,7	64,9-62,9
Gh31 (r)	CCAGGGCCAGGAGAGGCACTGGGG		

La reazione per ciascuna di queste coppie di primers interni veniva effettuata in un volume finale di 25 µl contenente: KCl 50 mM, Tris-HCl (ph 8,3) 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 100 µM di ciascun dNTPs, 1 unità di Taq Gold polimerasi (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 pmol di ciascun primers e 25 ng del prodotto di PCR dell'amplificazione con i primers Gh 32 e Gh33 .

L'amplificazione è stata condotta utilizzando il seguente protocollo: dopo una denaturazione iniziale a 96° C per 10 minuti, 25 cicli a 96° C per 30 sec, 58° C per 30 sec, 72° C per 30 sec, seguiti da una estensione finale di 5 minuti a 72° C.

I prodotti di PCR (ampliconi) sono stati visualizzati su gel di agarosio all'1,5% con colorazione con etidio bromuro.

4.2.2 Geni *GHRH-R*, *PIT1*, *PROP1*, *HESX1* ed *LHX4*.

Tutti gli esoni e le giunzioni esone-introne dei geni *GHRH-R*, *PIT1*, *PROP1*, *HESX1* ed *LHX4*, sono stati amplificati mediante tecnica di PCR utilizzando i primers elencati nelle tabelle IV-V-VI.

Le reazioni di PCR avvenivano in un volume totale di 50 µl contenente: KCl 50 mM, Tris-HCl (ph 8,3) 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, ciascun dNTP 250 µM, 1 unità di Taq Gold polimerasi, 20 pmol di ciascun primers e 100 ng di DNA genomico. Dopo una iniziale denaturazione a 95° C per 10 min, è stato utilizzato il seguente protocollo di 14 cicli: 95° C per 30 sec, da 63° C a 58° C con un decremento di 0,5° C per ciclo per 30 sec, 72° C per 30 sec. Seguiti da 20 cicli con seguente protocollo: 30 sec a 94° C, 30 sec a 56° C e 30 sec a 72° C, con estensione finale di 5 min a 72° C.

Tutti i prodotti di reazione sono stati visualizzati su gel di agarosio all'2% con colorazione con etidio bromuro.

La ricerca di variazioni di sequenza sui prodotti di PCR è stata effettuata mediante la tecnica di *Denaturing Hight Performance Liquid Cromatografy* (DHPLC).

Tabella IV. Primers e condizioni DHPLC usati per l'analisi del GHRH-R

Primers		Condizioni DHPLC	
Nome	Sequenza (5' → 3')	gradiente (% buffer B)	temperatura (°C)
Gr1 (f)	AACGGCTGTGTCAGGGGACAG	51,1-61,1	65,7
Gr2 (r)	CAGAGGCCAGAGGGTCTCAG		
Gr3 (f)	GACACCCAAATGGCTTGGCTCAT	59,7-69,7	61,1-63,1
Gr4 (r)	GCCACTTCCAGATGAAAGCACCTC		
Gr5 (f)	GTGTCCCTGGGCAGGCTAGAC	60-70	60,6-62,6
Gr6 (r)	GTGGGTCACCCTTCAGTAACTTA		
Gr7 (f)	TGTCAAGCCTCTCTTTCCCTCCAAA	56,5-66,5	55-57-59,9- 61,9
Gr8 (r)	AAAGTTAGACATGGGTATGGCG		
Gr9 (f)	TGATTCGATTCACCTCCTGCC	59-69	56-58-61,5- 63,5
Gr10 (r)	TTAGGGGGTGACATGGGAAAG		
Gr11 (f)	CTGCAGGTCCCAGCCTAACAT	61,1-71,1	62,6-64,6
Gr12(r)	AAGCGAGGGAGTCTGCATCCT		
Gr 13(f)	AGATCTCAGAGTCAAGGATGCAGA	51,4-61,4	63-65
Gr 14 (r)	TCCACTCCACCCCCATGTAG		
Gr 17(f)	GAAACGTTTGTCCATCTAGGTG	61-71	60,9-61,9
Gr 18 (r)	TCTGCAACCAGCACATTAGGC		
Gr 19(f)	CATTCACCTGCACATTCTCACG	58,6-68,6	59,2-61,2
Gr 20 (r)	GAAGGAAGGGGCCAGGTCTATT		
Gr 21(f)	TGAAGTGACACGACAGTTTCTA	56-66	60,4-62,4
Gr 22 (r)	ATGAACTCAGCCAAGGCC		
Gr 23(f)	AGGCCAAAGGGTTCTGATGGG	48,5-58,5	60,5-62,5
Gr 24 (r)	TTAGGTCTGGTGGGAGGGGGA		
Gr 25(f)	GACCTTCCTAACGTCCTCTTC	52,7-62,7	62,1-64,1
Gr 26 (r)	CAGCTGGGGTGGGGATGTGGC		

Tabella V. Primers e condizioni DHPLC usati per l'analisi di PIT1 e PROP1

Primers		Condizioni DHPLC	
Nome	Sequenza (5' → 3')	gradiente (% buffer B)	temperatura (°C)
PIT1			
P1 (f)ex1	AAAGGGATTTCCCTTGCAGTATAA	58,7-68,7	54-61
P2 (r)ex1	GATTCAAAGCATTCATTCTGAAATA		
P3 (f)ex2	TGAAATAAAACGAATGTGTCTTGAA	55,1-65,1	52-56
P4 (r)ex2	AATCCATCTAAGTGTCCCAAAT		
P5 (f)ex3	GAGAATGACAAATGGTCTTTTTCA	57,1-67,1	53,6-59,6
P6 (r)ex3	CAAACCAAGTTCTTTTTCTGTG		
P7 (f)ex4	GAGCTGATGGTCTTTATTGTCCC	55,8-65,8	54-60,2
P8 (r)ex4	GCATTAATCCTACTTATTGAAGCCA		
P9 (f)ex5	TTTGAAATCCAAATCAGATCGTT	53,6-63,6	52-54
P10 (r)ex5	CCTGCATTACACTCAAATGCTC		
P11 (f)ex6	TAAAAACAACAAAATTTACCCC	56,4-66,4	53,5-59,5
P12(r)ex6	AACGGGAGAAAAAGGCTATTATACA		
PROP1			
PPex1 (f)	TGGCATAACAGAGGGAGAAGG	57,6-67,6	58,1-60,1-63-65
PPex1 (r)	ACATGATAGGATTCGGGTT		
PPex2 (f)	AGCTGGAGCAGCACAGGA	58,4-68,4	58-60-63,1-65,1
PPex2 (r)	GAGGAGGATCCTGGAGCATCA		
PPex3a(f)	TGCAGCAGACCAGGCTCAG	58,2-68,2	61,9-63,1
PPex3a (r)	CTGGTGTGACAAAGCAAAGG		
PPex3b (f)	TGCTTGCCCCTATTCTTACG	55,6-65,6	57-59-62,2-64,2
PPex3b (r)	AGGCTGGGGATCACCTTG	53,6-63,6	

Tabella VI. Primers e condizioni DHPLC usati per l'analisi di HESX1 e LHX4

Primers		Condizioni DHPLC	
Gene	Sequenza (5' → 3')	gradiente (buffer B)	temperatura (°C)
HESX1			
H1 (f)ex1	AAGATCCCAGCCCTATACACG	57,1-67,1	61-58
H2 (r)ex1	GCTCTATGTAGTATGAAATAAAGGGCA		
H3 (f)ex2	GCAATTCTCTTGTGAACCCC	59,2-69,2	58-56
H4 (r)ex2	CCAAAGTGAGTGGGCTTTTG		
H5 (f)ex3-4	GCTCATTTTTTGGAGACATACTGAA	59,7-69,7	54-52
H6 (r)ex3-4	TGCAGGAAAGAAAACATCACA		
LHX4			
L1 (f)ex1	TGAATCGAGCTAGAGCGAGAG	52,7-62,7	63,8-61,8
L2 (r)ex1	CTGAGGCTGCTAGCTGTCTTGT		
L3 (f)ex2	GTCTGTTTCCACCATCAGCA	58-68	65-63
L4 (r)ex2	AAACTTCCCCCTCACTGCTT		
L5 (f)ex3	GAAGCCAGATCCCTTGCTC	56,8-66,8	64-62
L6 (r)ex3	CCTCTCCAGGCCTTTGTTT		
L7 (f)ex4	CAGGCTTAGGTGCAGAAAGG	57-67	64,6-62,6
L8 (r)ex4	AGGATACCTTCCACCCCTGT		
L9 (f)ex5	GGCTTTGGGTTTGTGGTG	56,8-66,8	64-62
L10 (r)ex5	TCCTGAGTGCCAGGGATTAC		
L11 (f)ex6p	TTTCCTGGTCATGTGTGTTCCCT	57,7-67,7	62,7-60,7
L12 (r)ex6p	TGATGCCCAAATTA CTGTCCAC		
L13 (f)ex6s	GTCTCCATCCTCCATATCGTCC	57-67	63,3-61,3
L14 (r)ex6s	GGCAAGTCTCTTTTGATCCTTGA		

4.3 DENATURING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (DHPLC)

Principio del metodo

La tecnica si basa sulla capacità della cromatografia inversa a coppie ioniche di risolvere all'interno di un prodotto di PCR molecole di DNA *heteroduplex* da molecole di DNA *homoduplex* in condizioni di parziale denaturazione (Xiao et Oefner, 2001).

Per *heteroduplex* si intende una molecola di DNA a doppia elica formata dall'appaiamento di due singole eliche, che differiscono in una o più posizioni nucleotidiche ed in cui è dunque presente un disappaiamento (“*mismatch*”).

Le molecole di DNA sono cariche negativamente. La fase stazionaria della colonna che viene utilizzata è elettricamente neutra e idrofobica, e quindi di per sé i frammenti di DNA non potrebbero adsorbirsi alla matrice della colonna. E' necessaria l'aggiunta di una molecola in grado di fare da “ponte”, denominata reagente accoppiante di ioni, per coadiuvare l'adsorbimento del DNA alla fase stazionaria. In questo caso la molecola impiegata è il trietilammonio-acetato (TEAA), i cui ioni positivi interagiscono con gli ioni fosfato del DNA mentre la catena alchilica del TEAA interagisce con la superficie idrofobica della colonna. In questo modo il DNA aderisce alla colonna mediante l'interazione idrofobica tra la colonna e il TEAA. L'interazione idrofobica tra la fase stazionaria e la catena alchilica del DNA è ridotta dall'aumento di acetonitrile nella fase mobile. I frammenti più corti vengono rilasciati prima dei frammenti più lunghi, grazie al loro minor contenuto di molecole ponte di TEAA. Dunque la separazione dei frammenti di DNA in condizioni non denaturanti dipende esclusivamente dalla loro dimensione.

Come sopra accennato in condizione di parziale denaturazione, che viene ottenuta con l'incremento della temperatura, questo sistema è in grado di separare molecole di DNA *heteroduplex* da molecole *homoduplex*. Le molecole di DNA *heteroduplex* si formano in un campione eterozigote per una mutazione puntiforme (es. A-T →G-C). In seguito alla denaturazione e alla graduale rinaturazione delle singole eliche del DNA si ha la formazione di un “*mismatch*” nel punto in cui è presente la variazione (figura 4).

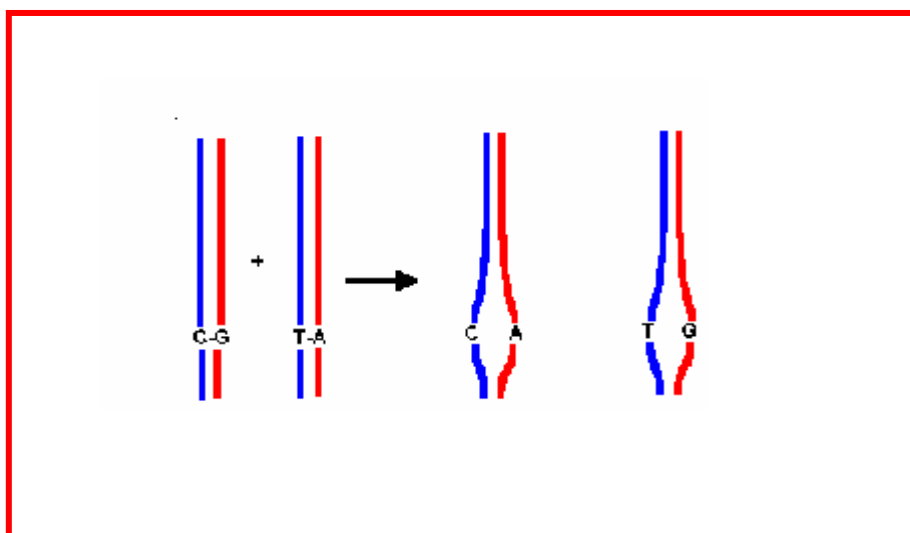


Figura 4. Formazione degli heteroduplex in un campione eterozigote

Nel campione dopo tale processo saranno dunque presenti due molecole *homoduplex* (con le basi perfettamente appaiate A-T e G-C) e due molecole *heteroduplex* (con le sequenze non complementari A-C e e T-G). A temperature non elevate (50°) i due tipi di molecole vengono co-eluiti e nel cromatogramma sarà presente un solo picco di eluizione (figura 5). Aumentando gradualmente la temperatura, il DNA inizia a denaturarsi preferibilmente in corrispondenza della regione dove è presente il *mismatch*. Il DNA parzialmente denaturato viene trattenuto meno dalla colonna e conseguentemente l'*heteroduplex* viene eluito prima dell'*homoduplex* con la comparsa di un picco aggiuntivo. A temperature molto elevate (> 65°C) in genere sia gli *heteroduplex* che gli *homoduplex* sono completamente denaturati e risultano ancora indistinguibili.

La temperatura è il parametro critico della metodica e dipende in larga misura dalla composizione in basi del frammento. E' possibile determinare la temperatura sperimentalmente mediante l'osservazione dello stato di denaturazione della molecola a diverse temperature. La temperatura di analisi deve essere quella a cui l'*heteroduplex* è preferenzialmente denaturato rispetto all'*homoduplex* in corrispondenza della zona in cui è presente il mismatch.

Attualmente è disponibile un programma al sito <http://lotka.stanford.edu/dhplc/melt.html> che mediante un algoritmo calcola la temperatura a cui deve essere analizzato il campione.

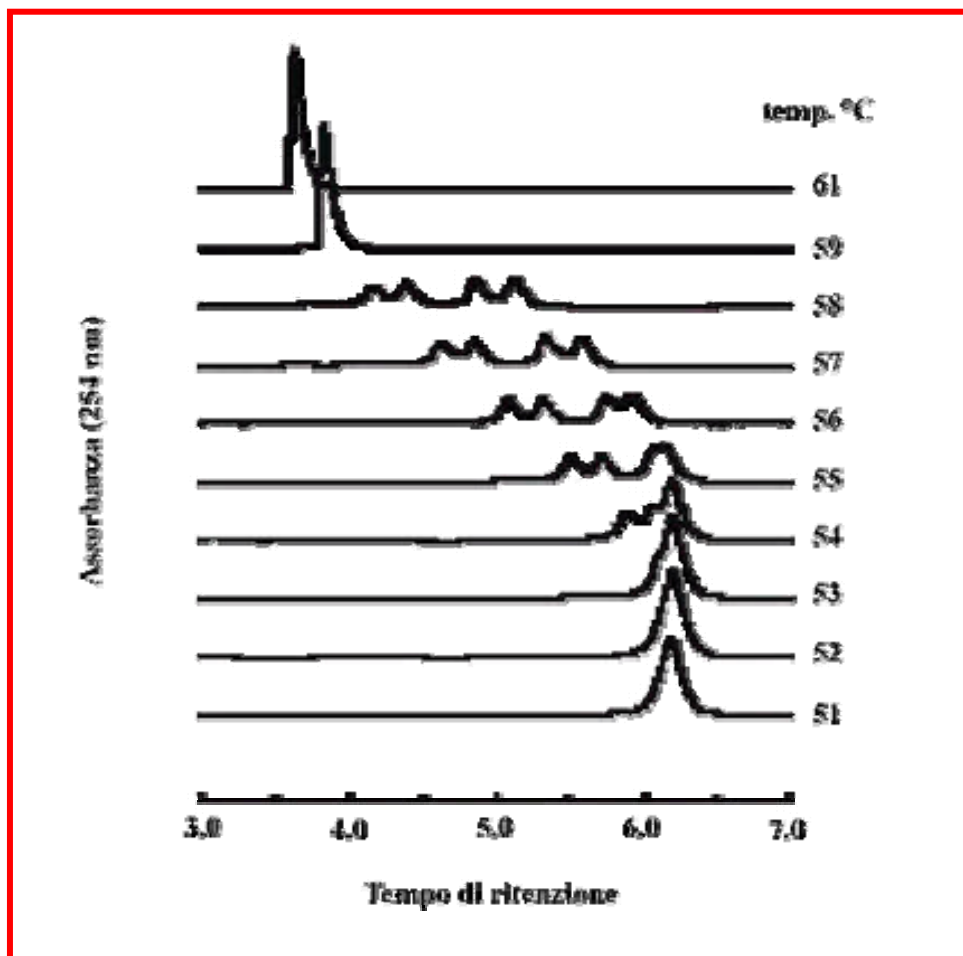


Figura 5. *Influenza della temperatura sulla separazione degli homoduplex dagli heteroduplex*

L'analisi cromatografica è stata effettuata con un strumento DHPLC convenzionale (Transgenomics, Santa Clara, CA).

La fase stazionaria era costituita da particelle di 2 μ m non-porose di poly-(styrene-divinylbenzene) impaccate in una colonna di 50 X 4.6-mm. La fase mobile era costituita da 0.1 M trietil-ammonioacetato a pH 7.0. Il gradiente si formava dalla miscela di due tamponi diversi: tampone A (trietil-ammonioacetato 0.1 M) e tampone B (trietil-ammonioacetato 0.1; 25% di acetonitrile).

Le molecole *heteroduplex* si formano quando una variazione allo stato eterozigote è presente in un frammento di DNA dopo la denaturazione dei prodotti di PCR e la graduale rinaturazione. I prodotti di PCR sottoposti a 3 min di denaturazione a 95°C seguita da una graduale rinaturazione da 95°C a 41°C, scendendo di 2°C per volta e per 40 sec ad ogni ciclo, venivano eluiti con un gradiente lineare di tampone B al 2% al minuto ad una velocità di flusso di 0.9 ml/min. Il punto di inizio e fine del

gradiente dipendevano dalla dimensione del frammento di PCR. La temperatura richiesta per la risoluzione delle molecole *heteroduplex* era determinata empiricamente iniettando e analizzando i prodotti di PCR a temperature crescenti, con incrementi di 1-2°C partendo da 50°C sino a quando non si osservava una ritenzione del tempo di eluizione di circa 1 min.

Al fine di evidenziare una variazione allo stato omozigote, i campioni che non dimostrano l'*heteroduplex* devono essere mescolati ad un campione omozigote di riferimento (già sequenziato) e sottoposti al ciclo per la formazione degli *heteroduplex*. Negli individui omozigoti si formano molecole *heteroduplex* qualora presentino una variante diversa da quella del campione di riferimento.

4.4 SEQUENZIAMENTO

Per i frammenti che avevano mostrato la presenza di un *heteroduplex* in almeno un individuo, sono stati sequenziati un campione *heteroduplex* e un campione *homoduplex* in entrambe le direzioni.

I prodotti di PCR, prima di iniziare il ciclo di sequenziamento, sono stati purificati per eliminare primers e nucleotidi non incorporati durante l'amplificazione.

Sono stati utilizzati diversi Kit di purificazione tra cui il QIAquick PCR purification kit (Quiagen), il Perfectprep Gel Cleanup system (Eppendorf, Hamburg, Germany,) e il PCR96Cleanup Kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) che utilizzano particolari membrane in grado di assorbire il DNA in specifici tamponi, e permettono di separare oligonucleotidi di 40 basi o meno dal DNA amplificato.

Per la reazione di sequenza è stata utilizzata la metodica secondo Sanger (Sambrook 1989), impiegando un kit della ditta Applera Italia ("ABIPRISM Big Dye Terminator vs 1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing"), contenente didesossinucleotidi trifosfati (ddNTPs) marcati con quattro fluorocromi diversi e una particolare DNA polimerasi (Taq F.S.).

La reazione avveniva in un termociclatore con il seguente ciclo: 20 secondi a 96°C, seguiti da 25 cicli di 10 secondi a 96° C, 5 secondi a 55° C, 4 minuti a 60°C.

Il prodotto di reazione veniva precipitato in etanolo e acetato di sodio 3M a 5,2 pH, portato a secco e risospeso in 4 µl di un tampone contenente il 95% di formammide.

I campioni, denaturati per 5 minuti a 95° C e messi in ghiaccio per 5 minuti, venivano caricati in una piastra ottica adatta per il caricamento nel sequenziatore automatizzato a 16 capillari (ABIPRISM 3100).

Nella figura 6 viene rappresentato un esempio di elettroferogramma che si ottiene con questa tecnica.

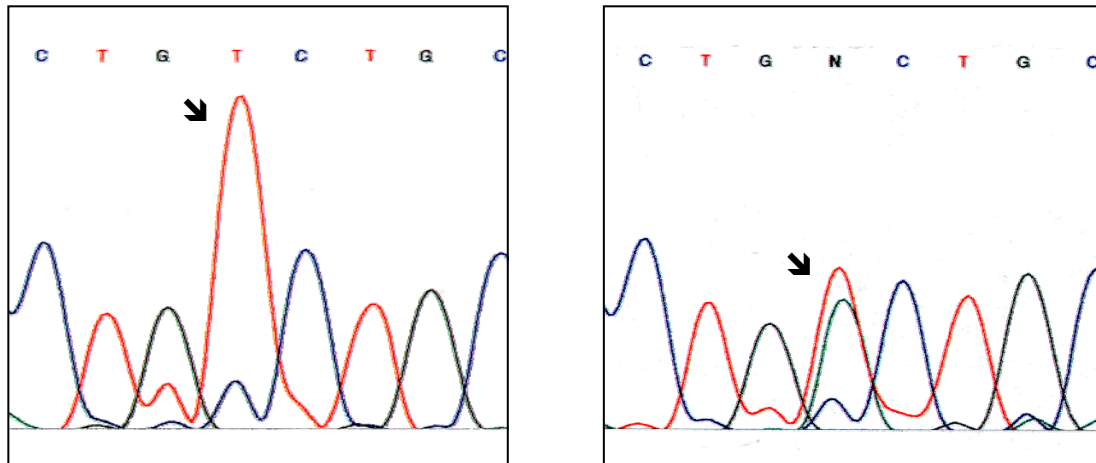


Figura 6. Esempio di elettroferogramma. A sinistra è rappresentato un omozigote TT, a destra un eterozigote AT.

4.5 SINTESI E AMPLIFICAZIONE DEL cDNA del GH

L'RNA totale è stato estratto dai linfociti di sangue periferico con l'RNA wiz (Ambion, Austin, TX), e dalle colture cellulari tramite RNeasy Mini Kit della Qiagen. Il cDNA è stato ottenuto mediante un kit di retrotrascrizione (RETROscript Kit, Ambion) ed amplificato con tre diverse coppie di primers elencate nella tabella VII che amplificano diverse parti del cDNA del gene *GHI*.

Tabella VII. Primers per l'amplificazione del cDNA di GH1.

Primers		
Nome	Sequenza (5' → 3')	Grandezza frammento
GH1 cDNA (f)	AACGGCTGTGTCAGGGGACAG	389 bp
GH6 cDNA (r)	CAGAGGCCAGAGGGTCTCAG	
GH5 cDNA(f)	GACACCCAAATGGCTTGGCTCAT	548 bp
GH31 cDNA (r)	GCCACTTCCAGATGAAAGCACCTC	
GH2 cDNA (f)	GTGTCCCTGGGCAGGTTAGAC	518 bp
GH7 cDNA (r)	GTGGGTCACCCTTCAGTAACTTA	

4.6 PREPARAZIONE DEI PLASMIDI E TRASFEZIONE CELLULARE

Il prodotto di 2700 bp comprendente l'intero gene *GH1* è stato sub-clonato in pMOS (pMOSBlue T-vector kit; Amersham). In seguito mediante sequenziamento sono stati selezionati due cloni contenenti rispettivamente l'allele *wt* e l'allele mutato (Δ 56-77 IVS3 del gene GH1). Il frammento di 2 kb contenente l'intera sequenza del GH1 è stato tagliato con *Bam*HI, visualizzato su gel di agarosio all'1%, purificato con un Kit di purificazione per gel ed inserito nel vettore di espressione pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Chatsworth, CA), precedentemente digerito con *Bam*HI.

Il vettore mut Δ 7 mutagenizzato *in vitro* è stato generato dal plasmide GH1 con l'allele *wt* mediante il QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA), utilizzando oligonucleotidi specifici per creare una delezione di 7 bp nel BPS (*branch point-site*).

Le cellule competenti DH101F' sono state trasformate con diversi costrutti e cresciute su terreno LB/ampicillina +.

Il plasmide è stato estratto (Plasmid Midiprep; QIAGEN), sequenziato, ed utilizzato per la trasfezione transiente delle cellule ipofisarie di ratto GH4C1 (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Le cellule sono cresciute ad una confluenza dell'80% in piastre di 35 mm di diametro e trasfettate con 2 μ g di ciascun costrutto utilizzando il reagente di trasfezione Fugene 6 (Roche), seguendo le informazioni del

produttore. L'RNA totale è stato purificato dalle cellule ipofisarie di ratto dopo 48 ore dalla trasfezione mediante l'RNeasy Mini Kit (QIAGEN) e retrotrascritto con il RETROSCRIPT Kit (Ambion).

4.7 ANALISI STATISTICA DEI DATI

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata usando test appropriati per dati parametrici, per quanto riguarda i valori di SDS della statura e i livelli di GH dopo test di stimolo, e test non parametrici per i valori di età alla diagnosi, ritardo di età ossea.

Tramite analisi della varianza (ANOVA) multivariata è stata studiata la relazione esistente fra alcune variabili indipendenti o predittrici (etnia e familiarità per i deficit) e l'età alla diagnosi, intesa come variabile dipendente. I coefficienti di regressione ottenuti dall'analisi di regressione multipla sono indicati come coefficienti β .

L'analisi statistica è stata eseguita con il programma STATISTICA v. 6.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

5. RISULTATI

5.1 ANALISI CLINICA

5.1.1 Pazienti IGHD

La casistica comprende 198 soggetti con diagnosi di IGHD, 125 maschi e 73 femmine, tra cui sono presenti 6 casi (3 maschi e 3 femmine) con deficit di GH dovuto a disfunzione neurosecretoria (NSD). Il 90% dei soggetti ha origini italiane, mentre il 10% ha origini straniere di diverse etnie: maghrebine, turche, slave e di alcune nazionalità asiatiche.

Nei soggetti con IGHD, il picco di secrezione di GH ottenuto con i test classici è in media (\pm DS) di $4,7 \pm 5,3$ ng/ml al primo stimolo e di 5 ± 3 ng/ml al secondo stimolo; nei 6 soggetti con NSD è rispettivamente di $9,4 \pm 2,2$ ng/ml e di $18,6 \pm 14,7$ ng/ml, in accordo con i normali livelli di GH ipofisari, mentre la secrezione spontanea notturna rimane insufficiente essendo in media di $2,4 \pm 0,5$ ng/ml.

Considerando l'età alla diagnosi, è stato possibile suddividere gli IGHD in 170 bambini (154 italiani e 16 stranieri), 13 adolescenti (solo italiani) e 4 adulti (3 italiani e 1 maghrebino).

I rimanenti soggetti (2 maschi e 3 femmine, tra cui un adolescente e 4 adulti), erano già in terapia sostitutiva con il GH ricombinante al momento dell'inserimento nello studio; di 6 soggetti (4 italiani e 2 stranieri) i dati clinici erano incompleti.

Tra i pazienti italiani 161 sono casi sporadici (107 maschi e 54 femmine) e 17 (8 maschi e 9 femmine, tutti bambini) appartengono a 11 diverse famiglie. La consanguineità è presente in 2 casi sporadici.

Tra i pazienti stranieri, 13 sono sporadici (9 maschi e 8 femmine) e 7 (3 maschi e 4 femmine) appartengono a 4 diverse famiglie. La consanguineità è presente in 6 soggetti di 3 famiglie diverse.

Le caratteristiche cliniche alla diagnosi dei soggetti con IGHD sono elencate nelle tabelle VII e IX.

Tabella VIII. Descrizione dell'età alla diagnosi, della media staturale e del ritardo osseo dei bambini IGHD, suddivisi in casi familiari e sporadici, italiani e stranieri. (n= numerosità del campione); (1)= mediana (range); (2)= media \pm DS.

IGHD bambini					
	Bambini italiani sporadici	Bambini italiani familiari	Bambini stranieri sporadici	Bambini stranieri familiari	
	n = 137	n = 17	n = 10	n = 6	
Età alla diagnosi (1)	7,8 (0,3 - 13,9)	8,3 (0,85 - 12,6)	7,25 (1,9 - 12,1)	7,6 (0,4 - 12,8)	P= 0,5* R= 0,12
	n = 129	n = 17	n = 10	n = 6	
SDS altezza (2)	-2,16 \pm 0,91	-2,45 \pm 1,37	-4,38 \pm 1,32	-4,43 \pm 1,51	P < 0,0001* R= 0,55
	n = 112	n = 10	n = 7	n = 4	
Δ età ossea-età anagrafica (1)	-1,25 (-9,6 - 2,4)	-2,175 (-4,6 - 0,1)	-4,2 (-5,6; -1,2)	-3,9 (-5,5; -2,4)	P < 0,0001* R= 0,42

* ANOVA Multimediate

Tabella IX. Descrittiva adolescenti ed adulti IGHD. (1)= mediana (range); (2)= media \pm DS

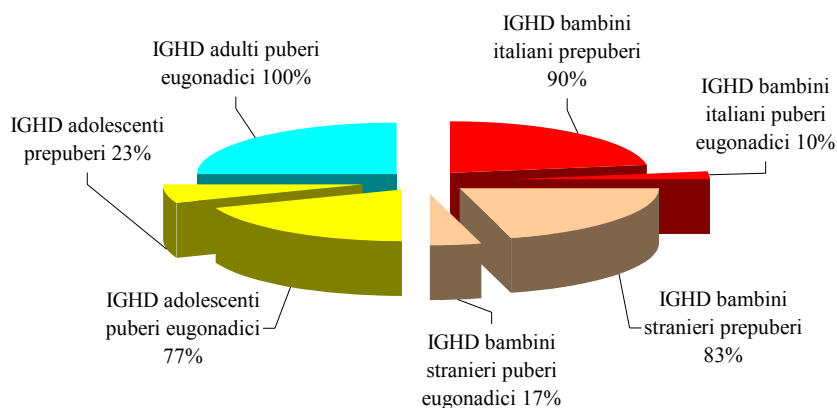
IGHD		
	Adolescenti	Adulti
	n = 13	n = 4
Età alla diagnosi (1)	14,5 (12,6 - 17,20)	19,6 (18 - 31)
	n= 12	n = 1
SDS altezza (2)	-1,95 \pm 1,077	- 1,10
	n= 12	n = 1
Δ età ossea-età anagrafica (1)	-1,4 (-5 - 1,4)	- 0,8

Tra i bambini IGHD classificati come casi sporadici, l'età mediana alla diagnosi era di 7,8 anni per gli italiani e di 7,25 anni per i soggetti di origine non italiana con una media staturale rispettivamente di -2.2 SDS e di $-4,38$ SDS. Tra i casi familiari l'età mediana alla diagnosi era di 8,3 anni nei pazienti italiani e 7,6 in quelli stranieri con una statura media rispettivamente di -2.45 SDS e di $-4,43$ SDS. Mediante ANOVA multivariata si è verificato che l'età alla diagnosi non è influenzata né dalla familiarità né dall'origine etnica (R multiplo= 0.12, p=0.5), mentre sia la media staturale (R multiplo= 0.55, p<0.0001; coefficiente β = 0.52, p<0.0001 per l'origine

etnica, $\beta = 0.05$, $p = 0.6$ per la familiarità per IGHD) sia il ritardo di maturazione ossea, calcolato come differenza tra età ossea ed età cronologica, (R multiplo = 0.42, $p < 0.0001$; coefficiente $\beta = 0.36$, $p < 0.0001$ per l'origine etnica, $\beta = 0.06$, $p = 0.6$ per la familiarità per IGHD) hanno dato valori significativamente inferiori nel gruppo dei bambini stranieri rispetto al gruppo di italiani. Ciò è dovuto, verosimilmente, alla selezione dei pazienti con un deficit più grave da parte del Centro Endocrinologico straniero. Tra gli adolescenti l'età mediana era di 14,5 anni, la media staturale di -1,95 SDS e la maturazione ossea ritardata di -1,4 anni (mediana). Tra gli adulti l'età mediana era di 19,6 anni, mentre i dati dell'altezza e del ritardo osseo erano presenti solo nell'unico paziente adulto straniero.

Per quanto riguarda lo stato gonadico alla diagnosi (figura 7), il 90% dei bambini italiani era prepubere, ed il 10% pubere, tra i bambini stranieri rispettivamente l'83% ed il 17%. Tra gli adolescenti il 77% risultava pubere ed eugonadico, mentre il 23% era ancora prepubere. Gli adulti erano tutti puberi eugonadici.

Figura 7. Rappresentazione dello stato gonadico degli IGHD alla diagnosi



Per quanto riguarda i quadri neuroradiologici, tra tutti i soggetti italiani con IGHD sporadico erano disponibili, per la nostra valutazione, 68 referti RMN (Risonanza Magnetica Nucleare): 26 soggetti presentavano quadri di normalità, 16 una ipoplasia ipofisaria, 11 una ectopia della neuroipofisi, 9 difetti del peduncolo ipofisario, 8 anomalie della sella turcica, e solo 1 o 2 soggetti presentavano quadri più rari come la displasia setto-ottica e la disconnessione ipotalamo-ipofisaria. Anomalie multiple erano presenti in 14 soggetti.

Tra i soggetti italiani con IGHD familiare erano disponibili 3 RMN: 2 evidenziavano ipoplasia ipofisaria ed 1 un quadro di normalità.

Infine tra i pazienti stranieri erano disponibili 8 RMN. Tra i casi sporadici c'erano 3 quadri di normalità 2 ipoplasie ipofisarie e 1 caso di sella vuota; tra gli IGHD familiari c'era 1 caso con un quadro di normalità, 1 con ipoplasia ipofisaria e 1 con malformazione di Arnold-Chiari.

Le percentuali di tali anomalie sono riportate nella tabella X.

Tabella X. Percentuali dei quadri neuroanatomici riscontrate negli IGHD.

RMN	IGHD sporadici italiani (n= 68)	IGHD familiari italiani (n= 3)	IGHD sporadici stranieri (n= 5)	IGHD familiari Stranieri (n=3)
Normale	38%	33,30%	60%	33,30%
Ipoplasia ipofisaria	23,50%	66,60%	20%	33,30%
Neuroipofisi ectopica	16%	-	20%	-
Anomalie del peduncolo ipofisario (assenza-interruzione-ispessimento)	13,20%	-	-	-
Sella vuota o parzialmente vuota (dismorfica)	11,70%	-	-	-
Agenesia o ipoplasia adenoipofisaria	8,80%	-	-	-
Disconnessione ipotalamo-ipofisaria	3%	-	-	-
Agenesia o ipoplasia neuroipofisaria	1,50%	-	20%	-
Displasia setto-ottica	1,50%	-	-	-
Anomalie associate	20%	-	20%	-
Malformazioni varie	15%	-	20%	33,30%

5.1.2 Pazienti CPHD

Per quanto concerne i CPHD, sono stati selezionati 114 soggetti (68 maschi e 46 femmine): 103 italiani e 11 stranieri (7 turchi, 3 slavi ed 1 greco).

I pazienti italiani reclutati all'età della diagnosi comprendono 47 bambini, 9 adolescenti e 11 adulti, il gruppo di soggetti di origine straniera è composto da 10 bambini e da 1 solo adulto.

Nei soggetti CPHD bambini ed adolescenti, il picco di GH valutato in risposta ai test classici di stimolazione ipofisaria era in media pari a $2,03 \pm 2,2$ ng/ml al primo stimolo e di $1,5 \pm 1,9$ ng/ml al secondo stimolo, per gli adulti era pari a $0,9 \pm 1,5$ ng/ml al primo stimolo.

Tra i pazienti italiani 67 sono casi sporadici (37 maschi e 30 femmine) e 12 (6 maschi e 6 femmine) appartengono a 7 diverse famiglie. I soggetti stranieri sono tutti casi sporadici e comprendono 8 maschi e 3 femmine.

Dei 36 casi restanti (20 maschi e 16 femmine), 20 (13 maschi e 7 femmine) erano pazienti reclutati per l'analisi genetica al momento della rivalutazione della funzionalità ipofisaria (cosiddetto "re-testing"), nel passaggio dall'età infantile all'età adulta, per verificare la persistenza dei deficit ipofisari. L'età mediana era di 33,8 anni (10,9 – 60 anni) con media staturale di $-1,6 \pm 16$ SDS. Per 16 pazienti (7 maschi e 9 femmine), invece, vi erano solo dati clinici incompleti.

La composizione del campione di soggetti CPHD selezionati alla diagnosi è rappresentata nelle tabelle XI e XII.

Tabella XI. Descrizione dell'età alla diagnosi, della media staturale e del ritardo osseo dei bambini CPHD, suddivisi in casi familiari e sporadici, italiani e stranieri

CPHD				
	Bambini Italiani sporadici	Bambini Italiani familiari	Bambini Stranieri sporadici	
	n = 41	n = 6	n = 10	
Età alla diagnosi	5 (0,3-12,7)	6,5 (0,3-10,2)	7,25 (4,4-13)	<i>P=0,3*</i> <i>R=0,19</i>
	n = 39	n = 6	n = 9	
SDS altezza	-2,18 ± 2,24	-1,28 ± 2,72	-4,04 ± 1,67	<i>P=0,04*</i> <i>R=0,35</i>
	n = 22	n = 4	n = 10	
Δ età ossea-età alla diagnosi	-1,5 (-4,5; -0,2)	-1,2 (-5; 2)	-3,95 (-7,8; -1,8)	<i>P=0,002*</i> <i>R=0,56</i>

* ANOVA Multimedia

Tabella XII. Descrittiva adolescenti ed adulti CPHD

CPHD		
	Adolescenti	Adulti
	n = 9	n = 12
Età alla diagnosi	16,8 (15,8 - 18,40)	28,1 (18 - 45)
	n = 6	n = 8
SDS altezza	- 2,77 ± 1,95	-2,6 ± 1,86
	n = 7	n = 4
Δ età ossea-età alla diagnosi	-3,3 (-5,5 ; - 0,4)	-4,8 (-11;-3,5)

Nel gruppo dei bambini con CPHD sporadico l'età mediana alla diagnosi era di 5 anni per gli italiani e di 7,25 anni per i soggetti di origine non italiana con una media staturale rispettivamente di -2,8 SDS e di -4,04 SDS. Nei casi familiari italiani l'età mediana alla diagnosi era di 6,5 anni e la media staturale di -1,28 SDS. Non è stato reclutato nessun caso familiare di CPHD tra i bambini di origine straniera.

Nel gruppo di adolescenti italiani l'età mediana alla diagnosi era di 16,8 anni, la media staturale di -2,77 SDS ed il ritardo di accrescimento osseo di -3,3 anni (mediana). Nel gruppo di soggetti adulti con CPHD di tipo sporadico l'età mediana alla diagnosi era di 28,1 anni con una statura media di -2,6 SDS. Per quanto riguarda il caso familiare si tratta di 2 fratelli (1maschio ed 1femmina) che alla diagnosi avevano rispettivamente 34,8 e 35,8 anni; non è stata riportata la statura del maschio mentre la sorella aveva una statura pari a -3,6 SDS. I due fratelli sono stati inclusi nel gruppo degli adulti alla diagnosi.

L'unico adulto di origine straniera selezionato per CPHD è un caso sporadico che alla diagnosi aveva 24,1 anni e una statura di -3 SDS, ed anch'egli è stato inserito nel gruppo degli adulti.

Anche nel deficit multiplo, mediante ANOVA multivariata si è verificato che nei bambini l'età alla diagnosi non è influenzata né dalla familiarità né dall'origine etnica (R multiplo= 0.19, p=0.3), mentre sia la media staturale (R multiplo= 0.35, p=0.04; coefficiente β = 0.3, p=0.03 per l'origine etnica, β = 0.12, p=0.4 per la familiarità per CPHD) sia il ritardo di maturazione ossea, calcolato come differenza tra età ossea ed età cronologica, (R multiplo= 0.56, p=0.002; coefficiente β = 0.53, p=0.001 per l'origine etnica, β = -0.09, p=0.5 per la familiarità per CPHD) hanno

dato valori significativamente inferiori nel gruppo dei bambini stranieri rispetto al gruppo di italiani. Pertanto il gruppo di bambini stranieri analizzati mostra un fenotipo più grave per quanto riguarda la statura e l'accrescimento osseo rispetto al gruppo di bambini italiani. Ciò, verosimilmente, è dovuto ad una selezione dei casi più gravi dal Centro Endocrinologico straniero inviante.

Tutti i soggetti CPHD inclusi nello studio presentano un deficit di GH associato ad uno o più degli altri ormoni secreti dall'adenoipofisi.

Oltre al GH, l'ormone che risulta deficitario più di frequente è il TSH, seguito, nei bambini, dall'ormone adrenocorticotropo e, negli adulti, dalle gonadotropine.

In 6 soggetti (5 femmine e 1 maschio) è stato inoltre dimostrato oltre al deficit di ormoni adenoipofisari, anche un deficit di ADH di origine neuroipofisaria, con conseguente diabete insipido. Nella figura 9 è raffigurata la distribuzione dei deficit multipli all'interno dei pazienti selezionati, comprendente bambini, adolescenti, adulti e soggetti al *re-testing* italiani e stranieri, familiari e sporadici.

Tra i bambini italiani la forma di CPHD più comune coinvolge il GH ed il TSH, sia nei casi sporadici (34%) (figura 10), che nei casi familiari (50%) (figura 11).

Tra i pazienti di origine straniera il difetto più comune interessa il GH e le gonadotropine ed è presente nel 50% dei bambini (figura 12).

Tra gli adolescenti, il 25% presentava panipopituitarismo mentre il deficit più rappresentato, oltre al GH, è quello di TSH, seguito dal deficit di gonadotropine e di ACTH (figura 13)

Figura 9. Rappresentazione grafica dei tipi di deficit ormonali nei soggetti con CPHD

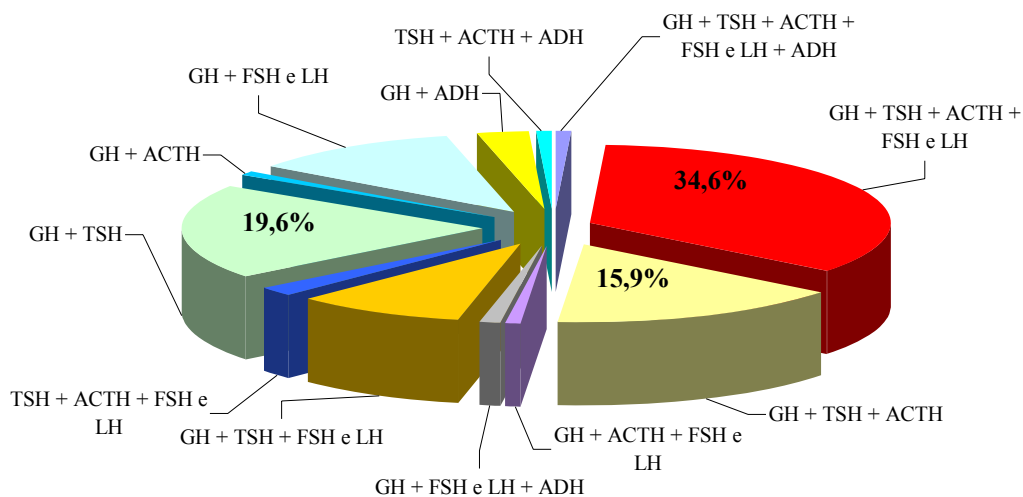


Figura 10. Bambini CPHD italiani di tipo sporadico. Solo il 27% presenta un panipopituitarismo.

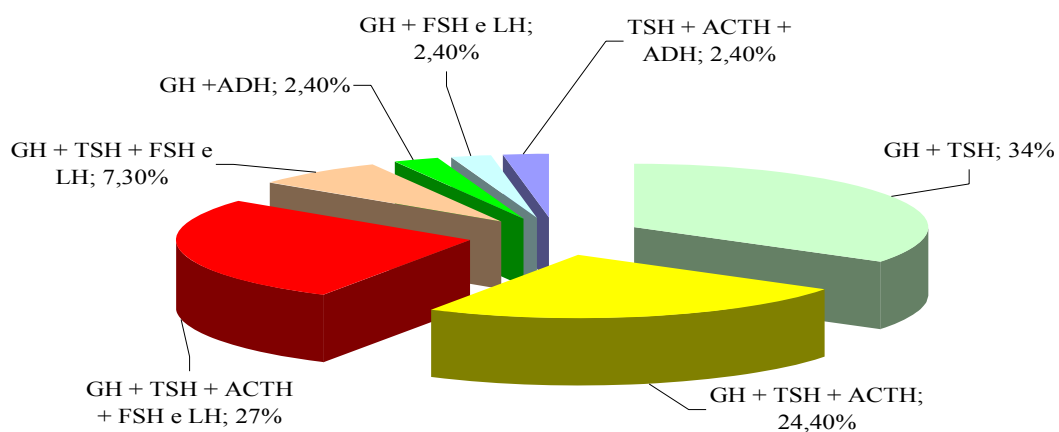


Figura 11. Bambini CPHD italiani di tipo familiare.

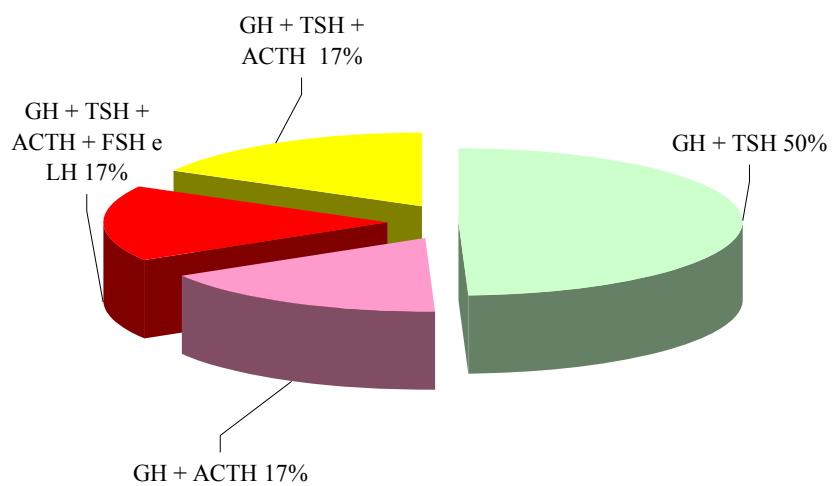


Figura 12. Bambini CPHD stranieri di tipo sporadico.

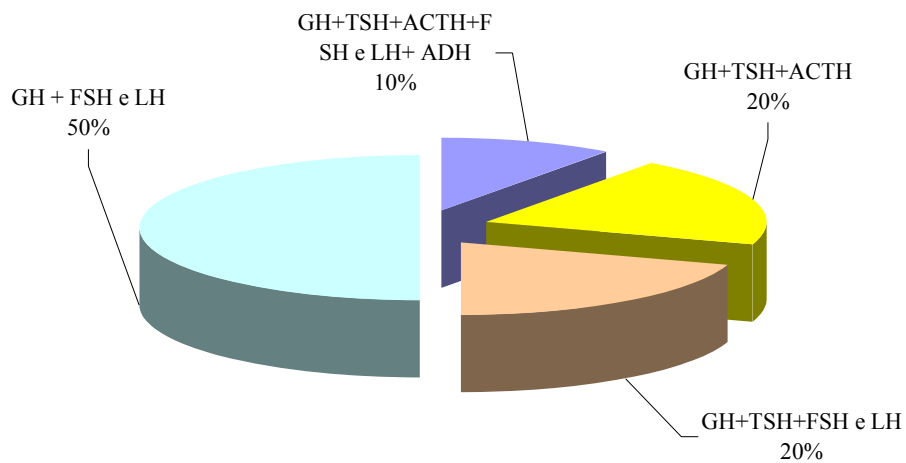
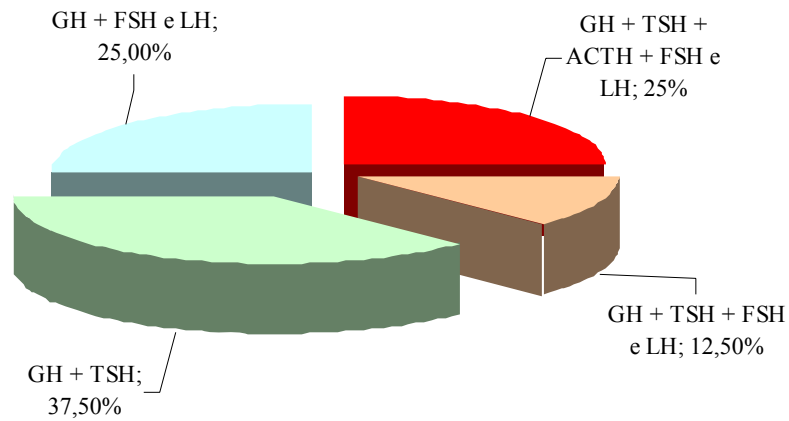
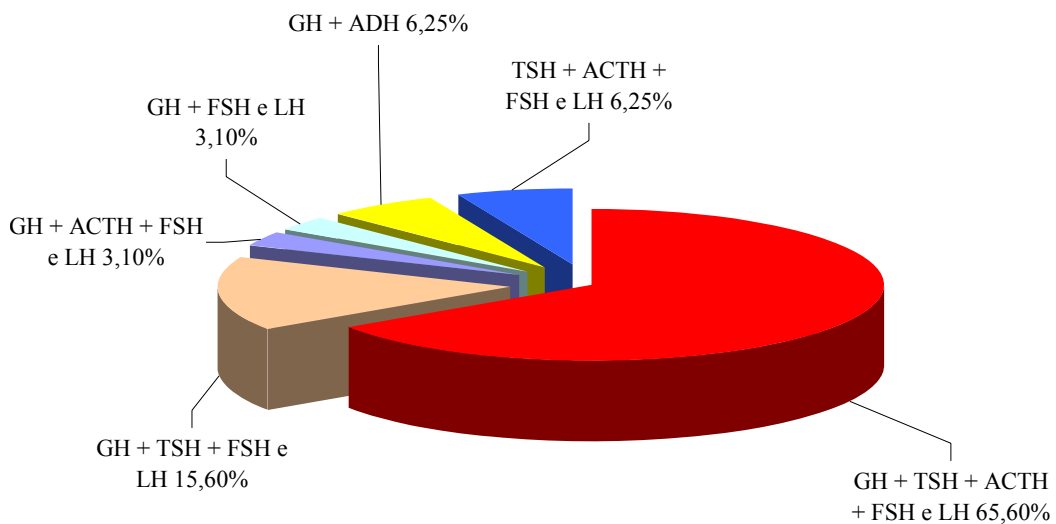


Figura 13. Adolescenti CPHD italiani sporadici. Il 25 % presenta deficit di GH e gonadotropine.



Tra gli adulti prevale il panipopituitarismo, con un 65,6 %, mentre gli ormoni maggiormente deficitari sono il TSH e le gonadotropine (figura 14).

Figura 14. Adulti CPHD.



Per quanto riguarda la pubertà, la maggior parte dei pazienti risultava ipogonadico. I grafici delle figure 15 e 16 riportano lo stato gonadico nelle tre categorie d'età:

Figura 15. Stato gonadico alla diagnosi nei bambini CPHD

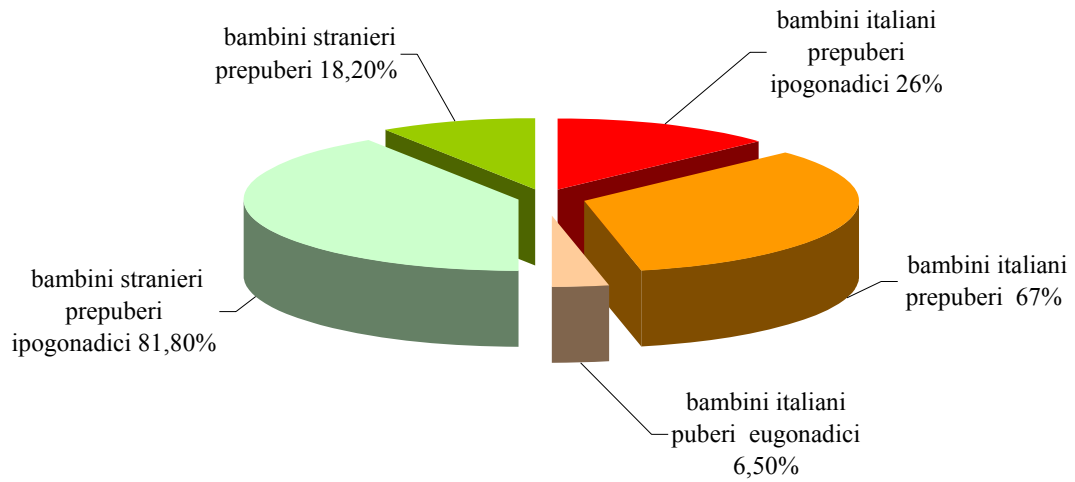
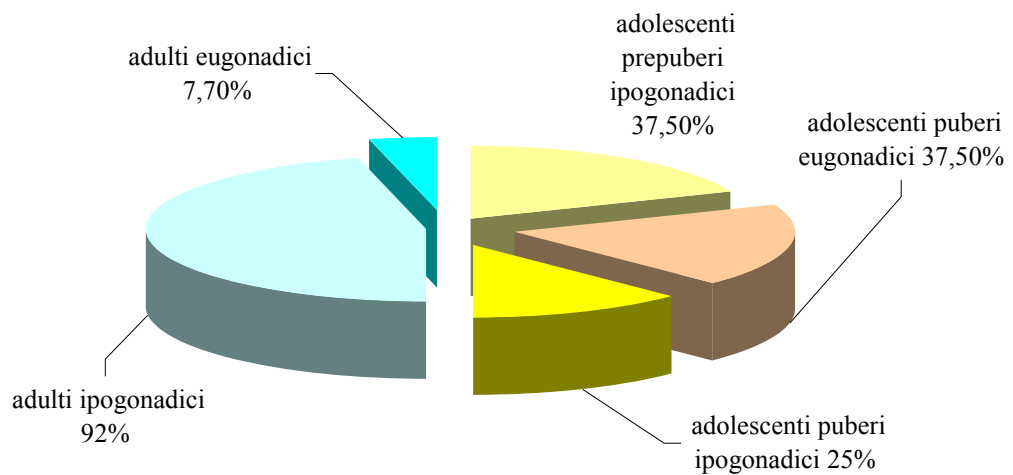


Figura 16. Stato gonadico alla diagnosi negli adolescenti ed adulti CPHD



Per quanto riguarda i quadri neuroradiologici, nei pazienti italiani con CPHD sporadico erano disponibili 70 referti RMN che evidenziavano con maggior frequenza una ipoplasia ipofisaria seguita da ectopia della neuroipofisi. Le percentuali dei difetti ipofisari sono descritte per i CPHD italiani e stranieri sporadici e per i CPHD italiani familiari nella tabella XIII.

Tabella XIII: Percentuali dei quadri neuroanatomici riscontrati nei CPHD

RMN	CPHD Italiani Familiari (n=7)	CPHD Italiani sporadici (n=70)	CPHD Stranieri sporadici (n=9)
Ipoplasia ipofisaria	28,60%	38,60%	11,10%
Neuroipofisi ectopica	-	22,30%	-
Sella vuota o parzialmente vuota (dismorfica)	14,30%	17,10%	11,10%
Normale	28,60%	14,30%	-
Agenesia o ipoplasia adenoipofisaria	-	12,90%	-
Anomalie del peduncolo ipofisario (assenza-interruzione-	14,30%	11,40%	22,20%
Disconnessione ipotalamo-ipofisaria	-	8,60%	-
Anomalie del setto pellucido, del corpo calloso e cerebellari	-	7,14%	-
Agenesia neuroipofisaria	-	5,70%	-
Displasia setto-ottica	-	4,30%	-
Agenesia ipofisaria	14,30%	2,90%	
Malformazioni varie	14,30%	1,40%	-
Più anomalie associate	14,30%	35,70%	11,10%

In ultima analisi, se si confrontano i picchi di GH ottenuti nei soggetti IGHD, dopo stimolazione ipofisaria effettuata con i test classici (Arginina, Clonidina, ITT, Glucagone, GHRH), con quelli ottenuti nei soggetti CPHD, si è verificato che esiste una differenza significativa tra le medie dei picchi. Negli IGHD, infatti, in media il valore del picco di GH, pari a $4,63 \pm 2,7$ ng/ml, è superiore a quello prodotto dai soggetti con CPHD. Scomponendo i CPHD in categorie recanti 2, 3 e 4 deficit si verifica una tendenza, seppur statisticamente non significativa, dell'entità del picco di GH, ottenendo valori di secrezione di GH pari a $2,12 \pm 2,29$ ng/ml per i soggetti recanti due deficit ormonali, di $1,92 \pm 1,93$ per quelli con 3 deficit associati e di $1,27 \pm 1,94$ per quelli con 4 deficit (figura 17). Tale differenza è invece significativa confrontando i pazienti con deficit di GH isolato rispetto ai pazienti con panipopituitarismo ($p < 0.0001$, ANOVA, test post-hoc di Bonferroni).

Si notano ancora delle differenze tra i CPHD e gli IGHD confrontando i quadri delle risonanze magnetiche, con quadri malformativi più gravi in soggetti con più deficit associati rispetto a quelli che hanno un solo deficit ormonale ($p = 0,01$, χ^2) (Tabella XIV e figura 18).

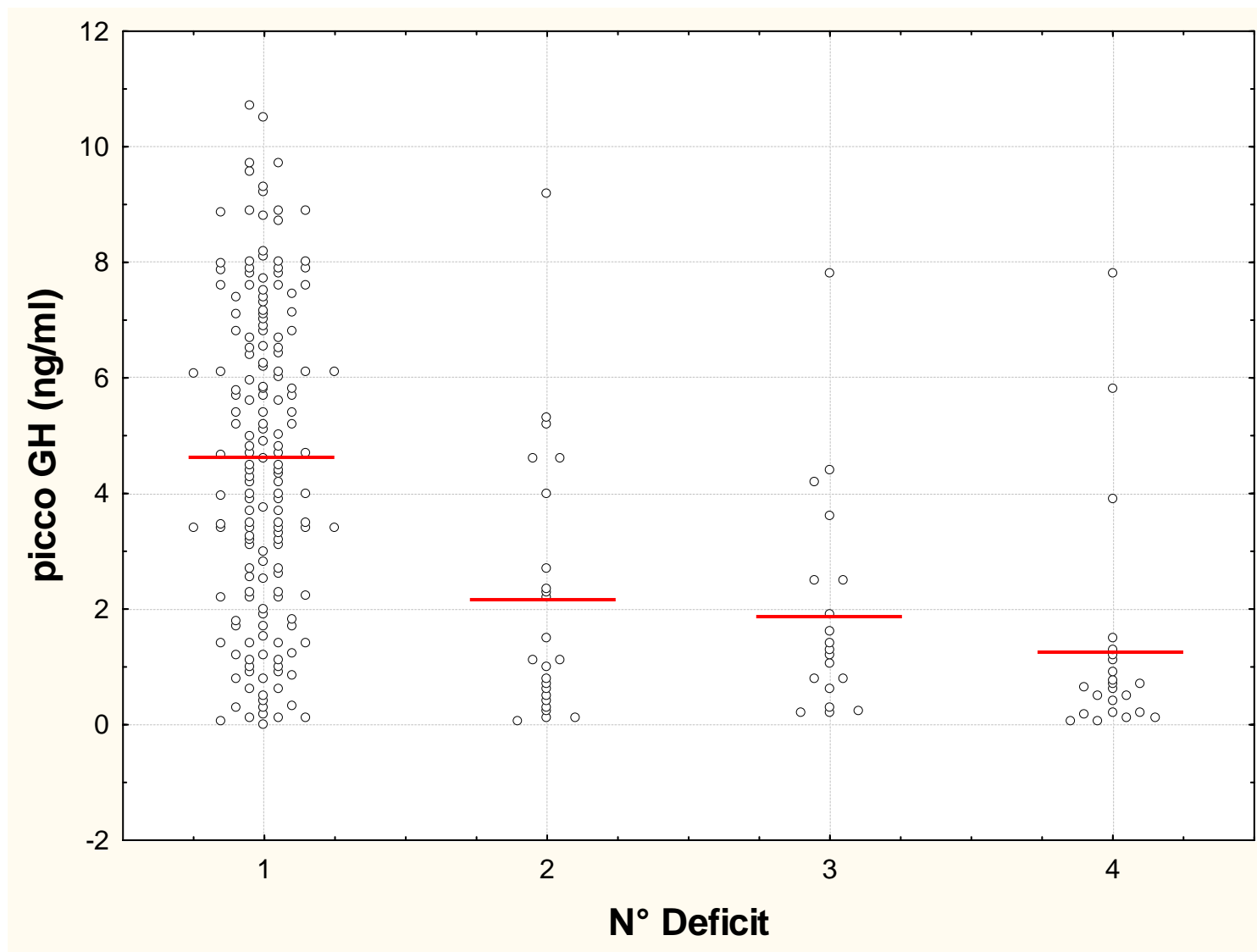
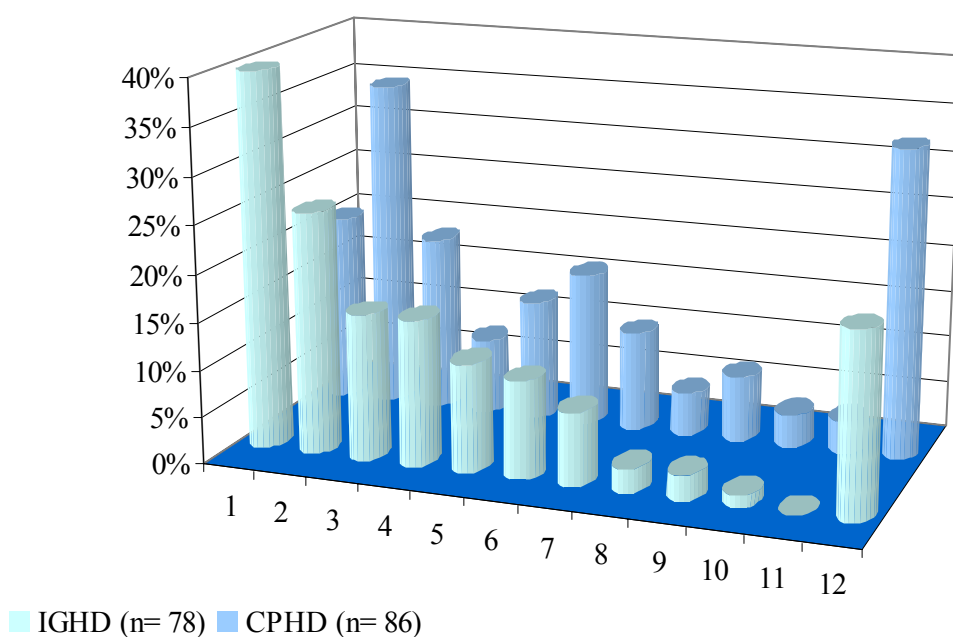


Figura 17. Distribuzione delle concentrazioni di GH al picco dopo test di stimolazione in pazienti IGHD e CPHD, in base al numero di deficit associati. La media di GH al picco è rappresentato dalla linea rossa

Tabella XIV. Percentuali dei quadri neuroanatomici riscontrati negli IGHD e CPHD.

	RMN	IGHD (n= 78)	CPHD (n= 86)
1	Ipofisi Normale	39,70%	20%
2	Ipoplasia Ipofisaria	25,60%	35%
3	Neuroipofisi ectopica	15,40%	18,60%
4	Malformazioni varie	15,40%	8%
5	Anomalie del Peduncolo Ipofisario	11,50%	12,70%
6	Anomalie della Cavità Sellare	10,30%	16,30%
7	Agenesia o Ipoplasia Adenoipofisaria	7,70%	10,50%
8	Agenesia o Ipoplasia Neuroipofisaria	2,60%	4,60%
9	Disconnessione Ipotalamo-Ipofisi	2,60%	7%
10	Displasia Septo-Ottica	1,30%	3,50%
11	Agenesia Ipofisaria	-	3,50%
12	Più anomalie associate	19,20%	32,60%

Figura 18. Rappresentazione grafica delle anomalie all'RMN riscontrate nei CPHD ed IGHD, i numeri sull'asse delle ascisse si riferiscono a quelli riportati nella tabella XIV.



5.2 ANALISI GENETICA

5.2.1 Gene *GHI*

L'analisi del gene *GHI* è stata completata in 183 dei 198 soggetti con diagnosi di IGHD. Centosessantaquattro (107 maschi e 57 femmine) sono casi sporadici e 12 sono casi familiari (9 casi italiani e 3 casi stranieri) comprensivi di 19 pazienti (7 maschi e 12 femmine), tra cui 9 fratelli provenienti da 4 diverse famiglie, una coppia di cugine di 1° grado ed una coppia di madre e figlia; gli altri casi familiari riportavano all'anamnesi parenti con deficit di GH. Di questi ultimi non è stata eseguita l'analisi molecolare in quanto il DNA non era disponibile.

Il DNA genomico dei 183 pazienti è stato amplificato con primers specifici fiancheggianti il gene *GHI* (Gh31 e Gh32). In tutti i pazienti è stata evidenziata, mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5%, la presenza di una banda di 2700 paia di basi, dimostrando che nessuno di essi era omozigote per una delezione dell'intero gene.

Al fine di ottenere frammenti idonei all'analisi con DHPLC (<500 pb) sono stati disegnati dei primers interni ai primers Gh31 e Gh32 ed i prodotti della prima PCR sono stati sottoposti ad una successiva amplificazione, definita come Nested PCR. I primers sono stati disegnati in modo da eseguire l'analisi dell'intero gene, comprendendo quindi le regioni esoniche, introniche, il promotore e le regioni non tradotte al 3' ed al 5' (UTR3' e UTR5').

Casi sporadici

Il sequenziamento degli ampliconi che dimostravano la presenza di *heteroduplex* al DHPLC ha condotto all'identificazione, nei casi sporadici di IGHD, di 9 variazioni nucleotidiche all'interno delle regioni codificanti e di una serie di variazioni nucleotidiche all'interno delle regioni introniche, tra cui la più frequente è la sostituzione A→T in posizione + 90 dell'IVS 4 (rs2665802). Nella nostra casistica l'allele T ha una frequenza del 22% che risulta del tutto sovrapponibile a quella documentata di recente in uno studio di pazienti IGHD spagnoli, in cui la frequenza di T risulta essere pari al 25% (Quinteiro *et al*, 2006). Sarà necessario analizzare un gruppo di controlli sani per verificare la frequenza di tale polimorfismo.

Le variazioni di sequenza identificate nella sequenza codificante sono elencate nella tabella XV ed accostate alle caratteristiche cliniche del paziente in cui sono state trovate. Tali variazioni, inoltre, sono raffigurate nella figura 19 dove sono riportate anche le variazioni introniche. Di queste 9 variazioni esoniche, 2 sono già state riportate dalla letteratura e precisamente la transizione in eterozigosi A→G al 7° nucleotide della sequenza con scambio di threonina con alanina al codone -24 (riportata da Miyata *et al*, 1997). La nomenclatura utilizzata dalla letteratura considera come codone numero 1, il primo aminoacido della proteina matura e poiché la regione *leader* del peptide è formata dai primi 26 aminoacidi, la variazione treonina-alanina che si trova al 3° aminoacido del peptide *leader*, diventa la -24 per la proteina matura (nomenclatura in accordo a den Dunnan e Antonarakis, 2000) La seconda variazione è la transizione G → A al nucleotide 406 che provoca la sostituzione Val110Ile (riportata da Millar *et al*, 2003). Variazioni e SNPs intronici sono presenti nel database degli SNP (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabella XV. Variazioni identificate nella sequenza codificante del gene *GHI*.

Variazione Nucleotidica	Codone	Paziente	Caratteristiche	RMN/TAC
c7 A → G	Thr-24Ala*	maschio italiano di 10,5 anni	-1,3 SDS h, ritardo osseo di 1 anno, pubere, picco di GH (test classici) = 7 ng/ml	ND
c7 A → G	Thr-24Ala	maschio italiano di 9 anni	-3,4 SDS h, ritardo osseo di 4,5 anni, prepubere, picco di GH (test classici) = 0,32 ng/ml.	Ipoplasia adenoipofisaria, agenesia del peduncolo ipofisario ed ectopica della neuroipofisi
c99 C → G	Ser7Ser	maschio italiano di 13 anni	-1,88 SDS h, nessun ritardo osseo, pubere, picco di GH (test classici) = 4,34 ng/ml	ND
c256 G → C	Glu56Asp	maschio italiano di 16,5 anni	-2,7 SDS h, ritardo osseo di 1,7 anni, pubere, picco di GH (test classici) = 7,71 ng/ml	ND
c255 G → A c261 C → T	Pro59Pro; Pro61Pro	maschio italiano di 13 anni	-1,4 SDS h, pubere, picco di GH (test classici) = 3,9 ng/ml	ND
c261 C → T c272 A → T	Pro61Pro; Glu65Val	maschio turco di 7,3 anni	-2,4 SDS h, ritardo osseo di 3,8 anni, prepubere, picco di GH (test classici) = 8,9 ng/ml	Normale
c447 G → A	Thr123Thr	maschio italiano di 7,8 anni	-2 SDS h, prepubere, picco di GH (test classici) = 3,1 ng/ml	ND
c447 G → A	Thr123Thr	maschio italiano di 5 anni	-2,4 SDS h, prepubere, picco di GH /test classici) = 7,61 ng/ml	Ipoplasia ipofisaria, assottigliamento del peduncolo ipofisario ed ectopia della neuroipofisi.
c406 G → A	Val110Ile	femmina italiana di 3,7 anni	-3,4 SDS h, ritardo osseo di 1,7 anni, prepubere, picco di GH (Arg + GHRH) = 6,3 ng/ml	TAC: difetto di migrazione ipofisi (eterotopia) RMN: corticodisplasia frontoparietale sinistra
c597 G → A	Val173Val	femmina italiana di 9 anni	-1,67 SDS h, pubere, picco di GH (test classici) = 4,5 ng/ml	ND
c597 G → A	Val173Val	femmina italiana di 4,5 anni	- 1,2 SDS h al re-testing dopo terapia, prepubere, picco di GH (test classici) = 1 ng/ml	Cavità sellare vuota

c = posizione nucleotidica sul cDNA a partire dal primo trascritto

* La numerazione degli aminoacidi segue la nomenclatura corrente di *den Dunnen e Antonarakis (2000)* che considera l'aminoacido 1 come il primo tradotto. ND: non disponibile.

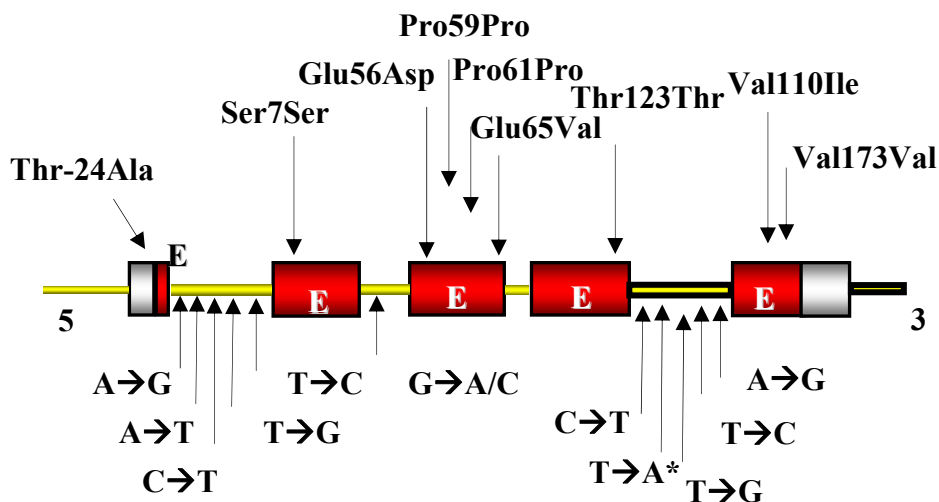


Figura 19. Rappresentazione schematica del gene *GHI*. Nella figura sono rappresentati i 5 esoni (rettangoli rossi) le regioni 5' UTR e 3' UTR (rettangoli grigi), i 4 introni (linee gialle tra gli esoni) e le variazioni individuate nella casistica. Esse sono state divise in variazioni introniche (nella parte bassa della figura) e variazioni esoniche (nella parte alta della figura).

rs: variazione descritta come polimorfismo nel database degli SNP (www.ncbi.nlm.nih.gov, rs2665802)

Per quanto riguarda le variazioni esoniche, si tratta di sostituzioni nucleotidiche puntiformi in stato di eterozigosi, riscontrate in soggetti con IGHD di tipo sporadico. Cinque di esse (C99G, G255A, C271T, G477A e C597T) non hanno probabilmente un effetto causale in quanto non determinano alcun cambiamento aminoacidico nel prodotto proteico (Ser7Ser, Pro59Pro, Pro61Pro, Thr123Thr, Val173Val) e non cadono all'interno di sequenze regolatrici dello *splicing* come ad esempio l'ESE (*Exon Splicing Enhancer*). Le rimanenti variazioni sono invece responsabili di una sostituzione aminoacidica: in particolare A7G con scambio della Treonina in posizione -24 con Alanina (Thr-24Ala), G246C con la conseguente sostituzione di Acido Glutammico in posizione 56 con Acido Aspartico, A272T con la sostituzione di Acido Glutammico in posizione 65 con Valina, e G406A con la sostituzione di Valina al codone 110 con Isoleucina. Le variazioni Thr-24Ala e Val10Ile sono già state descritte in letteratura come polimorfismi poiché sono state individuate anche in soggetti senza deficit di GH (Millar *et al*, 2003). Nella casistica studiata la variazione Thr-24Ala è stata individuata in 2 pazienti, mentre Val10Ile è stata trovata in 1 solo soggetto. Le altre variazioni identificate (Ser7Ser, Glu56Asp, Pro59Pro, Pro61Pro, Glu65Val) non sono ancora state descritte.

Due pazienti risultano dei doppi eterozigoti recando, il primo una doppia transizione G255A e C261T con conseguenti sostituzioni sinonime Pro59Pro e Pro61Pro, ed il secondo una transizione C261T ed una trasversione A272T con il risultato rispettivamente di una variazione sinonima Pro61Pro e di una variazione *missense* Glu65Val. Le variazioni sinonime, come già affermato, non dovrebbero avere delle conseguenze sulla struttura e sulla funzionalità della proteina, la variazione *missense* Glu65Val, invece, che scambia un aminoacido a residuo acido con uno alifatico potrebbe avere delle conseguenze. Per ora non sono ancora stati programmati studi funzionali su questo caso.

Tra le variazioni introniche identificate 9 non sono ancora state descritte come polimorfismi, ma nessuna cade in regioni implicate nel processo di *splicing* e probabilmente non hanno significato patologico.

Casi familiari

I casi familiari della casistica studiati per il GH1 erano 12 ma in 4 di questi non è stato possibile ottenere il DNA di più di un componente della famiglia. In totale sono stati studiati 19 pazienti. In nessun caso sono state trovate variazioni, tranne in un'unica famiglia per la quale disponevamo del DNA di 2 membri affetti. In questa famiglia le pazienti, madre e figlia, presentavano un grave quadro di IGHD con deficit severo di GH (picco di GH < 5 ng/ml in due test di stimolo) diagnosticato nella madre (soggetto II2 figura 21) all'età di 2 anni, quando aveva una statura di -6,9 SDS e nella bambina (soggetto III1 figura 21) all'età di 7 mesi, per grave ritardo di crescita (-5,8 SDS).

La bambina presentava un aspetto fenotipico caratteristico dell'IGHD. Alla diagnosi mostrava uno sviluppo corporeo lento ma armonico e proporzionato, delle bozze frontali pronunciate ed il naso a sella. Non aveva altri deficit ormonali (TSH, cortisolo) e la risonanza magnetica evidenziava una leggera ipoplasia dell'adenipofisi. La terapia con il *hrGH* è iniziata a 9 mesi di vita con buone risposte nell'accrescimento.

Nella storia clinica della madre, nata a metà degli anni '60, vi era stato un grave ritardo di crescita, poi diagnosticato come IGHD. Anche lei era stata sottoposta a terapia sostitutiva ma discontinua con GH estrattivo fino a 16 anni raggiungendo una statura di 146 cm. Dopo la sospensione del GH era andata incontro ad obesità. La stimolazione ipofisaria eseguita da adulta al *re-testing*, dopo il ricovero della figlia nel 2003, ha evidenziato un deficit completo di GH. Per tale motivo, la donna era

stata riammessa a terapia sostitutiva e la somministrazione di *hrGH*, recentemente, ha dato risultati buoni almeno nella riduzione dell'obesità. La risonanza magnetica dell'ipofisi della donna mostra un'adenoipofisi di dimensioni normali

Madre e figlia sono state sottoposte ad analisi molecolare del gene GH1. Il sequenziamento diretto del gene su DNA genomico delle due pazienti ha evidenziato una delezione in eterozigosi nell'IVS3, che mediante sub-clonaggio risultava essere una delezione di 22 bp. Non è possibile definire la posizione precisa della delezione per la presenza di una sequenza di 5 e di 3 Citosine ai 2 estremi della regione deleta, perciò la delezione è stata definita in modo arbitrario come del +56-77 (a partire dal sito donatore del III introne). Questa delezione include il *Branch-Point Site* (BPS) dell'IVS3 che si estende dal nt 67 al nt 73 (tra -25 e -20 dal sito di *splicing* al 3').

Per identificare l'origine della delezione, sono stati tipizzati tutti i membri della famiglia materna mediante i polimorfismi descritti nel promotore. In questo modo si è visto che l'allele con aplotipo -278T/-75A/-57G/-6G/+3G, che reca la delezione nelle due probande, è stato trasmesso senza delezione agli altri componenti della famiglia materna. La delezione di 22 bp, quindi, è insorta *de novo* nella madre che l'ha trasmessa alla figlia (figura 21). L'analisi dei trascritti, eseguita sul cDNA ottenuto dall'RNA di sangue periferico di tutti i membri della famiglia, ha confermato la presenza di un prodotto aberrante solo nella madre e nella figlia.

I primers (figura 20) per l'analisi dei trascritti sono stati disegnati in modo da evidenziare eventuali anomalie del processo di *splicing*.

La 1° coppia (RT-PCR1) comprendeva = al 5' un primer nel II esone ed al 3' un primer tra il IV ed il V esone.

La 2° coppia (RT-PCR2) comprendeva = al 5' un primer con una sequenza in parte nel II esone e in parte nel III esone e al 3' un primer nel V esone:

La 3° coppia mostrata in figura 20 (RT-PCR3) comprendeva = al 5' un primer nel II esone e al 3' un primer nel V esone, ed è stata utilizzata per gli esperimenti condotti *in vitro*.

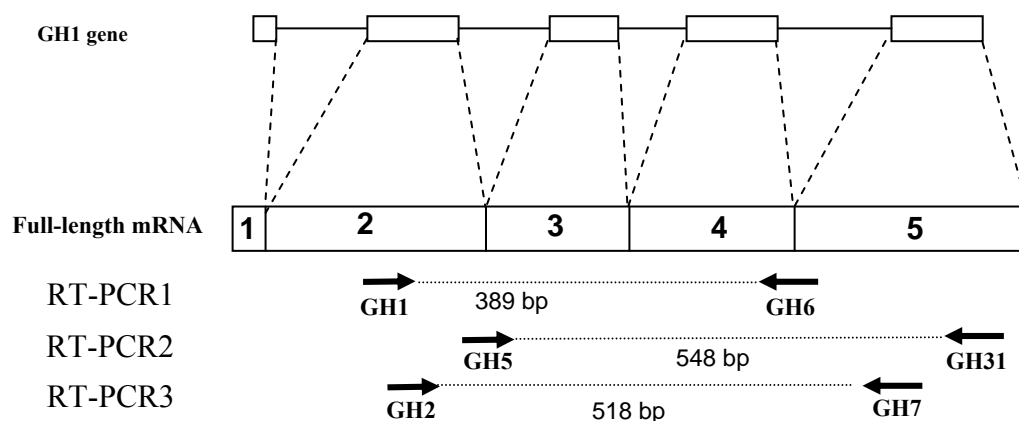


Figura 20. Schema del pre-mRNA di GH1 e selezione dei primers che permettono di visualizzare: con la PCR1 lo skipping dell'esone3, con la PCR2 lo skipping dell'esone 4 e con la PCR3 lo skipping degli esoni 3 e 4.

La prima reazione (RT-PCR1) (figura 21b) mostrava una banda di 389 bp di pari intensità in tutti i membri della famiglia, corrispondente al prodotto *full-length* e alla proteina nativa matura (22 kDa). La bambina e la madre, però, mostravano tra i loro trascritti un altro prodotto di taglia minore (269 bp) ma di pari intensità, corrispondente al trascritto senza l'esone 3 (che porta alla proteina di 17,5 kDa). Infine, in tutti i membri della famiglia compariva una leggerissima banda di 344 bp, corrispondente all'mRNA ottenuto dallo *splicing* alternativo nell'esone 3 mancante delle prime 45 bp (proteina di 20 kDa). I trascritti corrispondenti alle proteine di 20 kDa e di 17,5 kDa sono presenti fisiologicamente in quantità molto bassa rispetto a quello normale di 22 kDa, nelle due pazienti, invece, l'espressione pronunciata del prodotto di 17,5 kDa creava una situazione patologica.

Nell'uomo molte delle mutazioni che affiggono il BPS documentano o uno skipping parziale e/o totale dell'esone che segue l'introne mutato (Maslen *et al*, 1997), o il mantenimento dell'introne recante il BPS mutato (Kuivenhoven *et al*, 1996)

Per questo motivo sono stati disegnati dei primers (RT-PCR2) che potessero visualizzare, a livello periferico e successivamente su costrutti *in vitro*, uno splicing recante la perdita dell'esone 4 o il trattenimento dell'introne 3. L'RT-PCR2, invece, mostrava solo una banda di 548 bp per tutti i componenti della famiglia che in ultimo corrisponde alla proteina normale di 22 kDa (figura 22).

A livello periferico, quindi, l'informazione più importante era che la delezione nell'IVS3 produceva in maggior quantità un mRNA con lo skipping dell'esone 3.

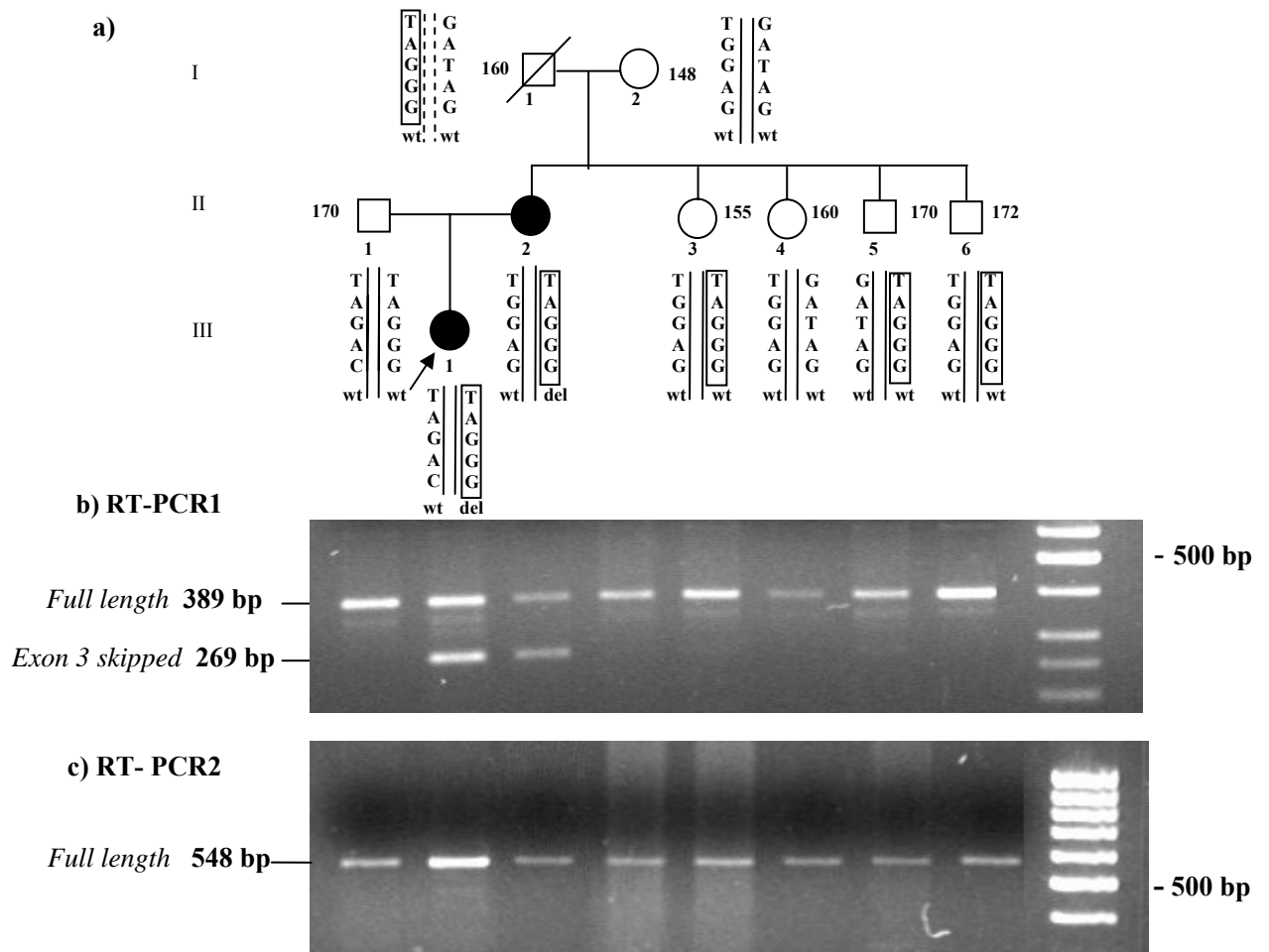


Figura 21. a) Albero genealogico della famiglia. I simboli anneriti indicano gli individui affetti. Per ciascun individuo non affetto è stata riportata la statura in cm, e l'aplotipo creato con i polimorfismi del promotore. L'aplotipo in cui vi è la delezione di 22bp è evidenziato. La probanda è indicata da una freccia.

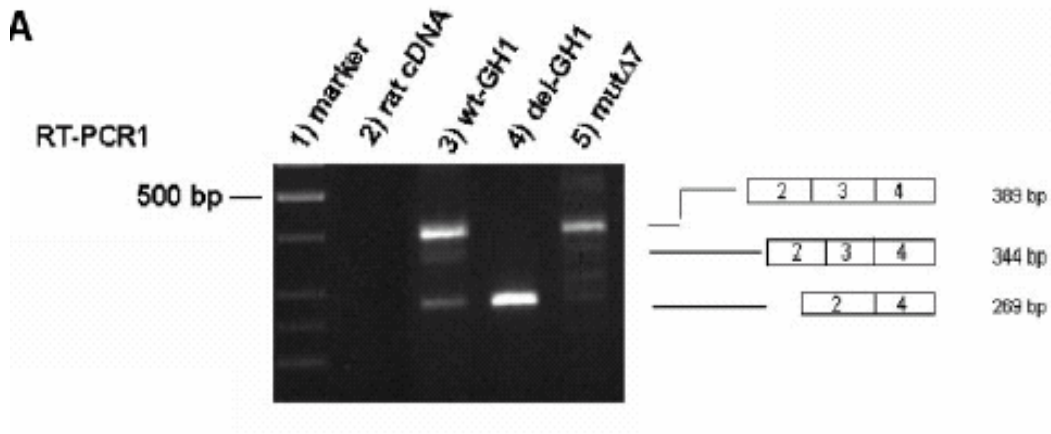
b) RT-PCR1 eseguita su cDNA ottenuto da RNA estratto da linfociti.

c) RT-PCR2 eseguita su cDNA ottenuto da RNA estratto da linfociti.

Per verificare se la del +56-77 nell'IVS3 provocasse altri *splicing* aberranti, non visibili a livello periferico, si sono condotti studi *in vitro* utilizzando vettori di espressione [pcDNA 3(+), Invitrogen, Chatsworth, CA] recanti l'allele *wt* e l'allele deleto con cui si sono trasfettate indipendentemente delle cellule ipofisarie di ratto (GH4C1). L'RNA totale estratto dalle cellule trasfettate dopo 48 ore di coltura, è stato retrotrascritto a cDNA che a sua volta è stato utilizzato per le reazioni di RT-PCR descritte sopra.

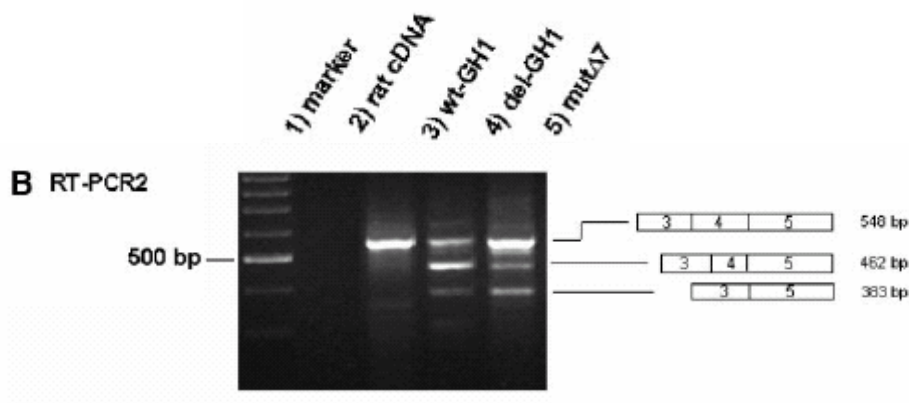
L'RT-PCR1 (figura 22) su cDNA ottenuto da cellule trasfettate con l'allele *wt* ha prodotto tre bande: la più intensa di 389 bp, e due leggerissime di 344 bp e di 269 bp corrispondenti rispettivamente ai prodotti di 22 kDa, di 20 kDa e di 17,5 kDa. L'amplificazione di cDNA ottenuto da cellule trasfettate con l'allele deleto, invece, ha dato solo la banda di 269 bp corrispondente allo skipping dell'esone 3 (proteina di 17,5 kDa).

Figura 22. RT-PCR1



L'RT-PCR2 (figura 23), ha mostrato una sola banda di 548 bp, corrispondente al prodotto *full-length*, per l'allele *wt* e 3 bande, di 548 bp, 462 bp e 383 bp per l'allele deleto che corrispondono rispettivamente al prodotto *full-length*, ad un trascritto che perde le prime 86 bp dell'esone 4 e produce una proteina tronca al residuo 77 e al trascritto con *skipping* dell'esone 4, che mantiene la cornice di lettura e produce una proteina priva degli aminoacidi 72-126 dell'esone 4.

Figura 23. RT-PCR2.

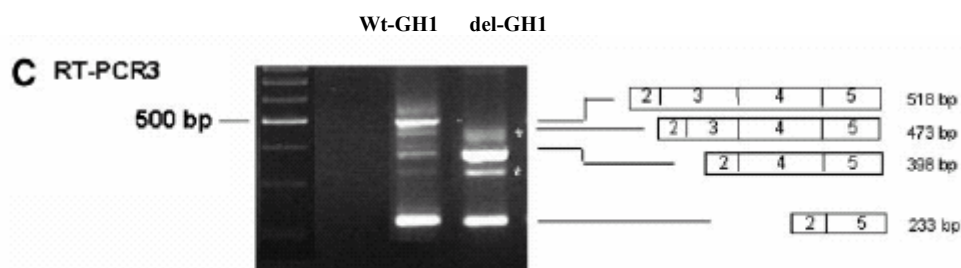


Questa reazione ha permesso di verificare che in condizioni strettamente sperimentali (*in-vitro*) la delezione del BPS provoca *splicing* aberranti alternativi non visibili a livello periferico, e che l'allele deleto mantiene lo *splicing* corretto con produzione di un trascritto *full-length*.

Per capire quale dei trascritti prodotti dall'allele deleto fosse veramente la conseguenza della perdita del BPS, le 7 basi corrispondenti al BPS dell'IVS3 sono state delete dal plasmide recante l'allele *wt* mediante una reazione di mutagenesi (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit-Stratagene, La Jolla, CA). Il plasmide *mutΔ7* è stato inserito nel vettore di espressione pcDNA 3 (+) che a sua volta è servito per trasfettare le cellule ipofisarie di ratto. Le reazioni RT-PCR1 e RT-PCR2 eseguite sul cDNA ottenuto dall'RNA estratto dalle colture a 48 ore dalla trasfezione, mostrano che l'effetto della mancanza del BPS è lo *skipping* dell'esone 4, oltre alla forma aberrante senza le prime 86 bp dell'esone 4 e al prodotto *full-length*. La produzione del prodotto *full-length* e la mancanza del prodotto con *skipping* dell'esone 3 indicano che i meccanismi di *splicing* che portano all'uno e all'altro non dipendono dal BPS

Infine, l'ultima coppia di primers (RT-PCR3) (figura 24) era stata disegnata per poter confrontare le quantità relative delle isoforme prodotte dall'allele deleto. Questa coppia si appaia al 5' con l'esone II e al 3' con l'esone V, includendo quindi i 2 esoni critici ai lati della delezione +56-77 IVS3 (il 3 ed il 4). L'analisi dei prodotti, tuttavia, è stata solo approssimativa perché fatta mediante visualizzazione dei frammenti di PCR su gel di agarosio al 2%, tenendo in considerazione che i frammenti più piccoli sono amplificati in modo preferenziale rispetto agli altri.

Figura 24. RT-PCR3.



Mediante questo set di primers si è visto che l'allele deleto produce per la maggior parte il trascritto con *skipping* dell'esone 3, mentre l'allele *wt* produce per la maggior

parte il trascritto *full-length*. La banda di 233 bp visibile per tutte e 2 gli alleli è un prodotto di *splicing* alternativo con *skipping* degli esoni 3 e 4, corrispondente alla proteina di 11,3 kDa, documentata dalla letteratura come normale prodotto di *splicing*. Le condizioni di reazione, in questo caso, ne permettono l'evidenza ma non stimano la reale quantità relativa, in quanto, come già detto, è amplificato in modo preferenziale per la piccola taglia rispetto agli altri frammenti. Si visualizzano ancora altre due bande più deboli che risultano essere un mix dei due prodotti (*skipping* esone 3 e *full-length*) che si sono uniti in un *heteroduplex*.

5.2.2 Gene *GHRH-R*

Lo studio del gene *GHRH-R* è stato completato in 145 bambini italiani (130 casi sporadici e 8 casi familiari comprensivi di 15 soggetti) e 22 bambini stranieri (16 sporadici e 3 casi familiari comprensivi di 6 soggetti) selezionati per IGHD.

In tutti i soggetti è stato possibile amplificare da DNA genomico, mediante primers specifici, tutti i 12 frammenti comprendenti i 13 esoni del *GHRH-R* e le giunzioni esone-introne.

Tutti gli ampliconi ottenuti sono stati sottoposti allo screening per la presenza di mutazioni puntiformi mediante tecnica di DHPLC e i frammenti presentanti un *heteroduplex* sono stati sequenziati.

Casi sporadici

Nei soggetti sporadici studiati sono state identificate 7 varianti, tutte in eterozigosi, che cadono all'interno delle regioni codificanti. Si tratta di 1 delezione puntiforme e 6 sostituzioni nucleotidiche (Arg4Trp, Val10Gly, Ala57Thr, Glu121Asp, Tyr163Tyr e Met422Thr). Non sono state trovate alterazioni a carico delle giunzioni esone-introne.

La delezione, che molto probabilmente ha significato patologico, coinvolge un nucleotide che cade in posizione 407 (407delG) dell'esone 5. Essa determina uno spostamento della cornice di lettura a partire dal codone 136 con la formazione di un prematuro codone di Stop in posizione 142 e la conseguente produzione di una proteina tronca totalmente priva dei domini transmembrana e intracellulare. Tale mutazione è stata trovata, in eterozigosi, in una sola bambina italiana in cui, oltre alla sequenza codificante e alle regioni introne-esone, è stato studiato anche il promotore del *GHRH-R* che ha escluso la presenza di altre mutazioni causali in questa regione.

Tra le sostituzioni nucleotidiche identificate, 1 è una variazione sinonima e non determina alcun cambiamento nel prodotto proteico (Tyr163Tyr), le altre 5 determinano una sostituzione aminoacidica: 2 cadono nel peptide segnale della proteina immatura (Arg4Trp, Val10Gly), 2 nel dominio extracellulare (Ala57Thr, Glu121Asp) e 1 nel dominio intracellulare (Met422Thr) (Figura 25).

Le variazioni più frequentemente riscontrate sono Ala57Thr e Glu121Asp presenti in doppia eterozigosi in 13 soggetti italiani e, singolarmente, in 2 (Ala57Thr) e in 3 bambini italiani (Glu121Asp). La variazione Met422Thr è stata invece trovata in 3 soggetti, di cui 2 italiani e 1 di origine marocchina. La variazione sinonima

Tyr163Tyr è presente in 2 pazienti: uno italiano, l'altro di origine turca. Le rimanenti 2 varianti (Arg4Trp, Val10Gly) sono state individuate ciascuna in un singolo paziente, tutti bambini di origine italiana.

Le sostituzioni Arg4Trp, Ala57Thr, Glu121Asp, Met422Thr sono polimorfismi dal momento che sono state trovate anche in un pannello di soggetti sani, con frequenze alleliche sovrapponibili tra pazienti e controlli (Lessi *et al*, 2001).

Analizzando un pannello di 600 soggetti, la variazione Val10Gly, non è mai stata identificata, suggerendo che si possa trattare di una mutazione causale. Il paziente in cui è stata trovata tale variazione era un soggetto italiano di 14,2 anni che presentava un quadro moderato con una statura di $-2,7$ SDS e un deficit parziale di GH.

Casi familiari

Tra le 11 famiglie analizzate per il GHRH-R, comprensive di 21 soggetti, non sono state identificate mutazioni causali, ma solo 3 polimorfismi. In particolare un bambino italiano è risultato eterozigote per entrambe le sostituzioni Ala57Thr e Glu121Asp ed un altro solo per la variazione Met422Thr.

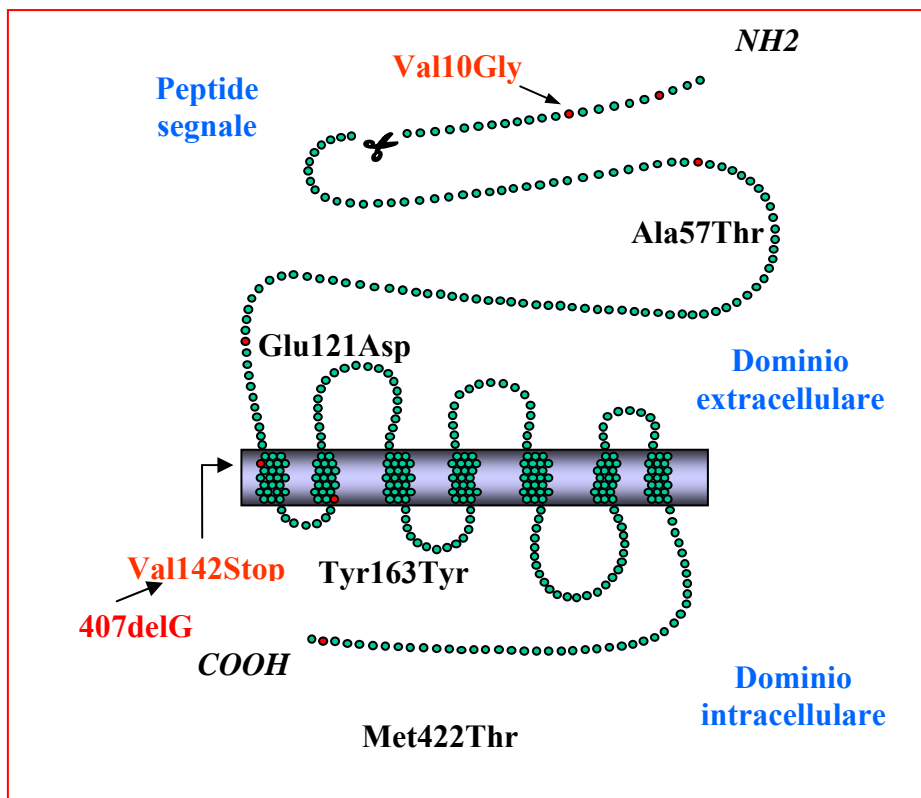


Figura 25. Modello della struttura proteica del recettore del GHRH-R. In rosso sono colorati gli aminoacidi colpiti dalle variazioni riscontrate nel presente studio. Solo due di queste (segnalate con la scritta rossa) sembrano aver caratteristiche di mutazioni causali

5.2.3 Gene *PROP1*

L'analisi del gene *PROP1* è stata completata in 55 soggetti con diagnosi di CPHD (46 italiani e 9 stranieri) e 16 soggetti italiani con IGHD.

Il gruppo di soggetti IGHD era formato da bambini prepuberi.

Il gruppo dei 46 CPHD italiani studiati per *PROP1* è così rappresentato: 36 soggetti sporadici, suddivisi in 18 bambini (5 prepuberi e 13 ipogonadici), 2 adolescenti e 13 adulti ipogonadici; e 6 casi familiari, comprensivi di 11 soggetti (9 bambini, di cui 6 ipogonadici e 3 prepuberi e 2 adulti ipogonadici). I CPHD stranieri studiati erano 9 bambini di tipo sporadico (7 maschi e 2 femmine; 7 ipogonadici e 2 prepuberi).

In tutti i soggetti CPHD analizzati sono stati analizzati i 3 frammenti corrispondenti ai tre esoni del gene e alle regioni esone-introne. Tutti i frammenti sono stati sequenziati con l'identificazione di 3 polimorfismi (Ala9Ala, Ala20Ser e Ala142Thr) 2 microdelezioni in omozigosi (301-302 GA e 150 delA) e 2 mutazioni *missense* in eterozigosi composta (Arg73Cys e Arg73His).

Le 2 microdelezioni: 301-302 delGA e 150 delA sono già state ampiamente descritte in letteratura perché cadono in 2 *hot spots* mutazionali del gene (Fofanova *et al*, 1998). Esse determinano uno slittamento della cornice di lettura con la conseguente formazione di un codone di stop prematuro e la produzione di proteine tronche e non funzionali.

La delezione 301-302 del GA è stata trovata in omozigosi in un ragazzo di origine turca, giunto all'osservazione clinica all'età di 5,5 anni per grave ritardo di accrescimento con una statura di - 3 SDS. In tale occasione era stata fatta una diagnosi iniziale di IGHD, seguita in età puberale dal riscontro di ipogonadismo ipogonadotropo con conseguente diagnosi di CPHD. Lo studio della risonanza magnetica (RMN) in tale soggetto ha dimostrato la presenza di una ghiandola ipofisaria di dimensioni normali.

La delezione 150 delA è stata invece riscontrata, anch'essa in omozigosi, in una bambina di origine slava, la cui diagnosi di CPHD è stata fatta all'età di 7,6 anni quando, nel corso di accertamenti per bassa statura (- 2,6 SDS), le indagini ormonali hanno rivelato la presenza di deficit combinato di GH, TSH e ACTH. I livelli di gonadotropine non sono ancora stati indagati dal momento che la bambina è ancora in età prepuberale. La RMN ha evidenziato un'ipoplasia della adenoipofisi con assottigliamento del peduncolo ipofisario.

Entrambi i genitori della bambina, fenotipicamente normali, si sono rivelati all'analisi genetica portatori eterozigoti della stessa delezione.

Le sostituzioni Arg73Cys e Arg73His sono mutazioni causali riscontrate in eterozigosi composta in un fratello e una sorella di origine italiana che presentano entrambi CPHD. Esse sono conseguenza di 2 sostituzioni in due nucleotidi consecutivi (C217T e G218A) appartenenti allo stesso codone all'interno dell'esone 2. L'analisi di sequenza dell'esone 2 nei genitori ha dimostrato che ciascuno di loro è portatore di una delle due mutazioni, in particolare il padre è eterozigote per C217T e la madre per G218A. I genitori sono fenotipicamente normali dimostrando che entrambe le mutazioni *missense* non sono sufficienti singolarmente a determinare il fenotipo patologico, ma in associazione sono responsabili di CPHD.

Infine, le 3 variazioni aminoacidiche, Ala9Ala, Ala20Ser e Ala142Thr di PROP1 sono stati identificati in soggetti italiani adulti, ma già state descritte in letteratura come polimorfismi e registrate nel database degli SNPs (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Il gene PROP1 è infine stato studiato in un piccolo gruppo di 16 bambini con diagnosi di IGHD, prepuberi, che non presentano mutazioni a carico dei geni GH1 e GHRH-R. In tale gruppo non è stata identificata alcuna mutazione nella sequenza codificante e nelle giunzioni esone-introne di PROP1.

5.2.4 Gene PIT1

L'analisi del gene PIT1 è stata condotta in modo completo in 21 dei 31 soggetti della casistica di CPHD che non manifestano deficit di gonadotropine (15 casi sporadici e 3 casi familiari, comprensivi di 6 soggetti tutti italiani), e in un piccolo gruppo di composto da 19 soggetti IGHD prepuberi (2 casi familiari italiani, 1 familiare di origine marocchina e 16 casi sporadici italiani)

I 6 esoni del gene e le sequenze esone-introne sono state amplificate in tutti i soggetti selezionati e l'analisi mediante DHPLC non ha però evidenziato alcuna variazione.

5.2.5 Gene *HESX1*

Il gene *HESX1* con i suoi 4 esoni e 3 introni è stato interamente studiato mediante DHPLC e sequenziamento diretto in 114 casi (46 femmine e 68 maschi) di CPHD e in 190 casi (121 maschi e 69 femmine) di IGHD.

Tutte le informazioni sulla struttura e funzionalità del gene si trovano nei database internazionali, al sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> in cui il numero di accesso per il gene è AF059734, oppure al sito <http://snpper.chip.org>.

Nei casi familiari, 12 per gli IGHD e 7 per i CPHD, comprensivi rispettivamente di 18 e 12 soggetti, non si sono evidenziate variazioni né nelle regioni codificanti, né nelle regioni confinanti i siti di *splicing*, né nell'introne 3, incluso nel frammento contenente gli esoni 3 e 4.

Nei casi IGHD di tipo sporadico, invece, sono state trovate 5 variazioni nucleotidiche in condizione di eterozigosi. Tre di queste si trovano nelle regioni codificanti, 1 cade nell'introne 2 (IVS2) e l'ultima nella regione non tradotta al 3' (UTR-3').

La prima sostituzione esonica è la transizione T183C nell'esone 2 che porta alla variazione sinonima His61His, che cade al di fuori dell'homeodominio proteico, ed è presente in un solo soggetto di origine indiana. La seconda è la transizione A374G nell'esone 3 che porta alla sostituzione aminoacidica Asn125Ser, che cade all'interno dell'homeodominio legante il DNA, ed è presente in 4 soggetti, 3 italiani ed un maghrebino. La variazione Asn125Ser è già stata documentata dalla letteratura (SNP rs9878928) e risulta essere un polimorfismo comune nella popolazione africana sud-sahariana (dati di GenBank) e nella popolazione Afro-Caraibica (Thomas *et al*, 2001, Brickman *et al*, 2001). Le frequenze relative all'allele G, che determina la sostituzione dell'Asparagina con la Serina, sono pari a 0,356 nella popolazione Africana e di 0,643 in quella Caraibica. Nella nostra casistica, invece, se si considerano tutti i soggetti studiati (IGHD e CPHD) la frequenza di G è pari a 0,0066, che si avvicina a quella trovata da Brickman nella popolazione inglese in cui la frequenza di G è pari a 0,005, inficiata però dal fatto che i soggetti recanti la variazione avevano origini africane. È stata dunque analizzata una popolazione Italiana di 303 controlli sani con statura normale, ed in 3 di questi è stata trovata la variazione aminoacidica Asn125Ser in condizione di eterozigosi. La frequenza dell'allele 374G trovata nei pazienti (0,0066) è risultata del tutto sovrapponibile a quella trovata nel gruppo dei controlli (0,005) ($p=1$, χ^2).

La terza sostituzione nella regione codificante, G385A, mai stata descritta in letteratura, si trova nell'esone 3 e determina il cambiamento aminoacidico della Valina in Isoleucina in posizione 129. Tale variazione cade nell'homeodominio di legame con il DNA, ed è stata trovata in un soggetto IGHD di origine turca.

La variazione intronica G/A in posizione +3 (IV2+3G→A) non è riportata come SNP dai database internazionali e potrebbe avere un ruolo funzionale nel meccanismo di *splicing* data la sua posizione all'interno del sito donatore. Sono stati quindi programmati studi funzionali per valutare se questa variazione causa un'alterazione dello *splicing*.

L'ultima variazione G/A in posizione +48 dell'UTR 3' è stata riscontrata in un solo soggetto ed anch'essa non risulta documentata dalla letteratura.

Nella figura 26 sono raffigurate le posizioni all'interno del gene, mentre nella tabella XVI sono riportate le variazioni trovate in HESX1 affiancate alla descrizione del paziente.

Figura 26. Posizioni delle variazioni nucleotidiche trovate nel gene *HESX1*.

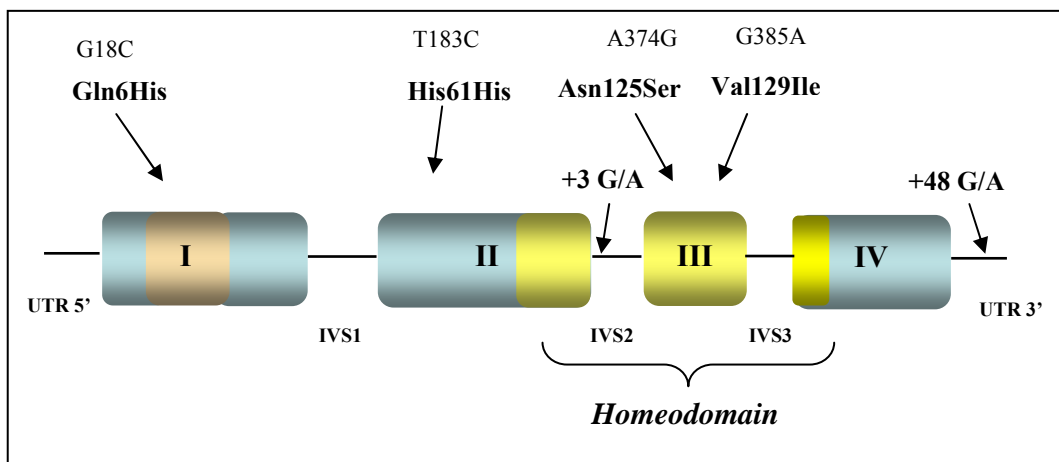


Tabella XVI. Variazioni trovate nel gene *HESX1* affiancate alle caratteristiche cliniche dei pazienti

Variazione Nucleotidica	Codone	Paziente	Caratteristiche	RMN/TAC
18 G → C	Gln6His	maschio italiano CPHD (GHd e GnD) di 5 mesi	picco di GH ai test classici = 2,35 ng/ml	Ectopia della neuroipofisi ed assenza del peduncolo ipofisario
183 T → C	His61His	femmina indiana IGHD di 22 anni al <i>re-testing</i> (non disponibile diagnosi infantile poiché adottata)	-1,6 SDS h al <i>re-testing</i> , eugonadica, picco di GH al GHRH+Arginina = 0,1 ng/ml	Normale
+3 G → A in IVS2	-	maschio italiano IGHD si 12,5 anni	-2,9 SDS h, ritardo osseo di 3,5 anni, prepubere, picco di GH (test classici) = 4,7 ng/ml	ND
374 A → G	Asn125Ser	maschio maghrebino IGHD	ND	ND
374 A → G	Asn125Ser	maschio italiano IGHD di 4,6 anni	-3,4 SDS h, ritardo osseo di -2,6 anni, prepubere, picco di GH (test classici) = 6,8 ng/ml	ND
374 A → G	Asn125Ser	maschio italiano IGHD di 9,8 anni	-1,3 SDS h, ritardo osseo di 0,5 anni, prepubere, picco di GH (test classici) = 9,7 anni	ND
374 A → G	Asn125Ser	maschio italiano IGHD di 12 anni	-1,49 SDS h, prepubere, ritardo osseo di 0,9 anni, picco di GH (test classici) = 7,86 ng/ml	ND
385 G → A	Val129Ile	maschio turco IGHD di 2,3 anni	- 5 SDS h, prepubere, picco di GH (test classici) = 4 ng/ml	ND
385 G → A	Val129Ile	maschio italiano CPHD (GHD, TSHD, ACTHD, GnD) di 28 anni	ipogonadico, picco di GH al GHRH+Arginina = 2,4 ng/ml	Ipoplasia ipofisaria
385 G → A	Val129Ile	maschio italiano CPHD (GHD e GnD) di 15,7 anni al <i>re-testing</i>	-2,4 SDS h al <i>re-testing</i> , ipogonadico, picco di GH al GHRH+Arginina = 0,9 ng/ml	Ipoplasia ipofisaria
+487 G → A in UT3'	-	femmina italiana IGHD di 9,3 anni	-1,3 SDS h, ritardo osseo di 1,5 anni, prepubere, picco di GH (test classici) = 7,6 ng/ml.	Ipoplasia ipofisaria

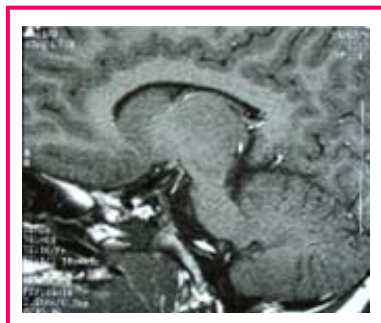
Nei casi di CPHD di tipo sporadico sono state trovate due variazioni: Val129Ile presente in 2 soggetti e Gln6His, trovata in un soggetto.

La variazione Val129Ile, già riscontrata nel paziente turco IGHD della nostra casistica, è dovuta alla transizione in eterozigosi G385A nell'esone 3 ed anche in questo caso si trova in condizione di eterozigosi in entrambe i soggetti. Per uno dei due è stato possibile recuperare il DNA dei familiari per l'analisi genetica. L'analisi ha evidenziato che questa variazione era presente anche nella madre e nella sorella, entrambe apparentemente sane.

La seconda è la trasversione G18C sempre in condizione di eterozigosi che porta alla sostituzione di una Glutamina in posizione 6 con una Istidina (Gln6His). Tale variazione è stata trovata in un solo individuo ed è già stata documentata dalla letteratura internazionale (Thomas *et al*, 1998) che la descrive come mutazione causale della malattia. Il riscontro nel nostro paziente avvalorava l'ipotesi che si tratti di una vera e propria mutazione causale ad effetto dominante.

Il paziente recante la mutazione Gln6His, è un maschio diagnosticato come IGHD a 5 mesi di vita. Alla diagnosi mostrava una serie di 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 *re-testing* eseguito all'età di 9 anni ha mostrato oltre al deficit di GH anche un deficit di gonadotropine insorto verso l'età puberale, che quindi lo classifica come CPHD. Le immagini neuroradiologiche eseguite di recente mostrano ectopia neuroipofisaria (figura 27)

Figura 27: Immagine neuroradiologica del paziente recante la mutazione Gln6His, con ectopia della neuroipofisi



Per valutare sia la frequenza del polimorfismo Asn125Ser, sia la possibilità che le variazioni descritte (Gln6His, His61His, +3 G →A in IVS2, Val129Ile e +487 G →A in UT3') fossero variazioni rare o polimorfismi, per ognuna delle regioni in cui le variazioni erano presenti, sono stati analizzati dei controlli sani mediante DHPLC, e precisamente: sono stati valutati 234 alleli per l'esone 1, 100 alleli per l'esone 2 e 606 alleli per gli esoni 3 e 4. Solo il polimorfismo Asn125Ser è stato riscontrato in 3 soggetti, con una frequenza di G pari a 0,005.

5.2.6 Gene LHX4

Il gene LHX4, con i suoi 6 esoni e 5 introni, è stato interamente analizzato nelle regioni codificanti e nelle regioni che comprendono i siti di *splicing* tramite DHPLC e sequenziamento diretto nei 114 soggetti (46 femmine e 68 maschi) affetti da CPHD.

Tutte le informazioni sulla struttura e sulla funzionalità del gene sono descritte nel Database di GenBank al sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> in cui il numero di accesso per il cDNA è NM_033343.

Nel gene LHX4 sono state identificate 3 sostituzioni nucleotidiche nelle regioni codificanti (Gly21Gly, Asp128Asp, Asp328Ser) e 4 introniche: 2 già documentate dalla letteratura nell'IVS3 e nell'IVS5 e 2 nuove nell'IVS4 e nell'IVS5 (tabella XVII e figura 28)

Le 3 sostituzioni nucleotidiche nelle regioni codificanti sono: la sostituzione sinonima Gly21Gly dovuta alla transizione T63C nel primo esone, trovata in un soggetto, la sostituzione sinonima Asp128Asp dovuta alla transizione C384T nell'esone 3, trovata in 4 soggetti, e la sostituzione non-sinonima Asp328Ser dovuta alla transizione G983A nell'esone 6, trovata in 51 soggetti.

Le due variazioni sinonime (Gly21Gly e Asp128Asp) non sono mai state riportate dalla letteratura, ma non dovrebbero avere alcun effetto sulla struttura proteica né conseguenze sulla sua funzionalità.

La variazione Asp328Ser, invece, è un polimorfismo comune descritto dalla letteratura internazionale. Tra i soggetti CPHD analizzati in questo studio erano presenti 51 eterozigoti AG, 36 omozigoti GG e 27 omozigoti AA (frequenze alleliche A=0,46 e G=0,54).

Le variazioni introniche note corrispondono agli SNP rs276449 e rs3806302. La prima (T→C) cade nell'IVS3 a -5 bp dall'inizio dell'esone 4. Le frequenze alleliche di T e C nei soggetti CPHD sono pari rispettivamente a 0,917 e 0,083. La seconda variazione nucleotidica (G→T) cade nell'IVS5 a +14 nt dall'inizio dell'introne 5. La frequenza di G è pari a 0,94 e quella di T pari a 0,053.

Nell'IVS5 è stato trovato anche un altro SNP in posizione +25 dal sito donatore che scambia una C con una T in un solo soggetto, mentre nell'IVS4 in posizione -17 dal sito donatore dell'esone 5 è stato individuato lo scambio di una G con una T, ancora in un solo individuo.

Tabella XVII. Variazioni presenti nelle regioni codificanti trovate in LHX4 ed affiancate alle caratteristiche cliniche dei pazienti.

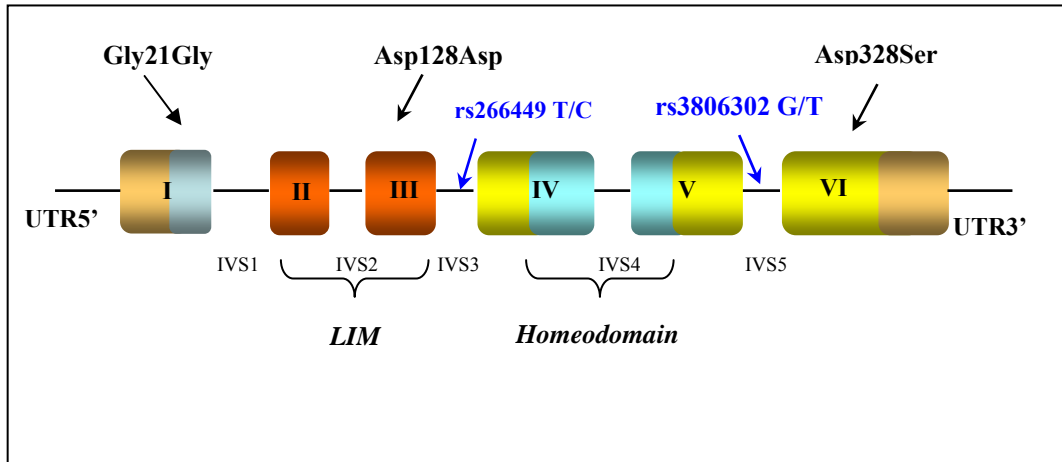
Variazione Nucleotidica	Codone	Paziente	Caratteristiche	RMN/TAC
63 T→C	Gly21Gly	maschio italiano CPHD (GHD, TSHD, ACTHD e GnD) di 3,2 anni	-1,8 SDS h, ritardo osseo di 2,45 anni, ipogonadico, picco di GH ai test classici = 1,1 ng/ml	Normale
384 C → T	Asp128Asp	maschio turco CPHD (GHD, TSHD e GnD) di 11,3 anni	-5,9 SDS h, ipogonadico, ritardo età ossea di 7 anni, picco di GH = 1,4 ng/ml	Normale
384 C → T	Asp128Asp	femmina italiana adulta CPHD (GHD, ADHD)	-2,6 SDS h al <i>re-testing</i> , pubere eugonadica, picco di GH al GHRH+Arginina = 8,4 ng/ml	Ipoplasia Ipofisaria
384 C → T	Asp128Asp	maschio italiano CPHD	ND	ND
384 C → T	Asp128Asp	maschio italiano CPHD (GHD, TSHD e GnD) di 1,1 anni	-1,4 SDS h, prepubere, picco di GH (test classici) = 1,9 ng/ml	Ipoplasia Ipofisaria

Al fine di valutare la frequenza delle variazioni (Gly21Gly, Asp128Asp e Asp328Ser) nella popolazione sana, sono stati analizzati 108 alleli per l'esone 1 senza trovare sostituzioni, 86 alleli per l'esone 3, trovando 2 soggetti con la transizione C450T (che porta alla sostituzione sinonima Asn150Asn, già descritta dalla letteratura come rs16855642, e con frequenze alleliche del tutto sovrapponibili), 88 alleli per l'esone 4, 104 per l'esone 5 e 162 per l'esone 6.

Il polimorfismo Asp328Ser, dovuto alla transizione G983A, nella nostra popolazione di controllo mostra una frequenza per l'allele G pari a 0,6 e per l'allele A pari a 0,4, quindi del tutto sovrapponibile con quella ottenuta dalla letteratura (che documenta una frequenza per G pari a 0,454 e per A pari a 0,546) e con quella dei pazienti.

Gli SNP rs 276449 T/C nell'IVS3 e rs 3806302 G/T nell'IVS5 sono stati trovati anche nella popolazione di controllo con frequenze del tutto sovrapponibili a quelle dei pazienti, essendo rispettivamente la prima pari a 0,057 per C e la seconda pari a 0,001 per T.

Figura 28. Rappresentazione delle variazioni trovate nel gene *LHX4*



6. DISCUSSIONE

Nel presente lavoro abbiamo analizzato un'ampia casistica di soggetti con IGHD e CPDH al fine di valutare il ruolo della componente genetica nella patogenesi delle patologie ipofisarie.

6.1 IGHD e CPDH

I soggetti affetti dal deficit isolato di GH mostrano un fenotipo meno grave rispetto ai soggetti con deficit multiplo. Hanno medie staturali meno compromesse e ritardo nell'accrescimento osseo meno pronunciato rispetto ai soggetti CPDH, inoltre la secrezione di GH ha dei valori più elevati, se si considerano le medie dei picchi ottenuti dopo stimolazione ipofisaria, rispetto alla secrezione ottenuta dai soggetti con più di un ormone deficitario. Ciò trova conferma nei dati documentati dalla letteratura che riportano, negli individui adulti, una riduzione nella secrezione di GH, e quindi della severità del deficit, con l'aumentare del numero di deficit ipofisari presenti (Aimaretti *et al*, 2005).

Inoltre, considerando i quadri neuroanatomici dei due gruppi, si conferma la minor gravità delle anomalie per quanto riguarda i soggetti con IGHD rispetto ai CPDH (Osorio *et al*, 2002; Maghnie *et al*, 2006). Ciò presuppone che la base patogenetica dei quadri malformativi più gravi sia da ricercare in geni omeotici, deputati allo sviluppo e differenziazione primordiale degli abbozzi ipofisari.

La classificazione di un paziente come IGHD tuttavia, in particolare dalla nascita alla prima infanzia, non lo conferma come tale per tutta la vita, poiché con lo sviluppo puberale potrebbe sviluppare altri deficit ormonali. Il deficit di GH, infatti, è solo il primo a comparire, mentre gli altri deficit possono comparire in seguito, e di solito prima si manifesta il TSH, poi le gonadotropine e l'ACTH. D'altra parte, al momento del passaggio all'età adulta, durante la cosiddetta "fase di transizione" è necessario riconfermare, mediante test di stimolo, la persistenza del deficit di GH (Clayton *et al.*, 2005).

La nostra casistica contiene per la maggior parte bambini classificati come IGHD, a diverso grado di gravità sia per quanto riguarda la secrezione di GH, la compromissione staturale, il ritardo scheletrico, lo sviluppo gonadico e le anomalie ipofisarie, che potrebbero, quindi, sviluppare altri deficit. Per questo motivo, tali pazienti, sono stati indirizzati verso analisi genetico-molecolari che

comprendessero geni omeotici deputati allo sviluppo e codificanti per fattori trascrizionali necessari per la secrezione ormonale, oltre all'analisi principale del GH1 e del recettore del GHRH.

Per quanto riguarda i soggetti CPHD, invece, la nostra casistica riporta soggetti diagnosticati in età infantile ed adulti che hanno sviluppato deficit multiplo in età post-puberale per cause sconosciute, ma non traumatiche od organiche note. Inoltre, sono rientrati nel progetto anche quegli individui adulti o ancora in epoca puberale e prepuberale, di cui non si conosceva la storia clinica dell'esordio dei deficit, ma che mostravano quadri deficitari multipli verosimilmente idiopatici.

Pertanto, per stabilire quali geni studiare in ciascun paziente e con quale priorità, tutti i pazienti sono stati suddivisi sulla base dei deficit ipofisari presenti. Per questo motivo i soggetti affetti da IGHD sono stati sottoposti all'analisi molecolare del gene GH1 e successivamente del GHRH-R, poi di PROP1 se erano ancora prepuberi, e di PIT1 se erano già puberi o eugonadici. L'analisi di HESX1 è stata eseguita su tutti gli IGHD, in quanto i dati della letteratura internazionale documentano mutazioni a carico del gene in soggetti con fenotipo a diverso grado di gravità che variano dall'IGHD all'ipopituitarismo parziale e globale.

I soggetti CPHD sono stati analizzati per HESX1 ed LHX4, indipendentemente dallo stato gonadico e dai deficit associati, per PIT1 quelli prepuberi e puberi o eugonadici e per PROP1 quelli prepuberi e puberi che successivamente hanno sviluppato ipogonadismo.

Infine è suggestivo il fatto che si nota un eccesso di maschi sia nel gruppo degli IGHD che nel gruppo di CPHD. La loro presenza nel primo gruppo è pari al 63% e nel secondo gruppo pari al 60% ed è statisticamente significativa sommando i 2 gruppi ($p= 0.000492$ test χ^2). Questa osservazione è in accordo con un recente studio multicentrico (Reynaud *et al.*, 2006) eseguito su 195 pazienti CPHD in cui il 60% era formato da maschi. Questa preponderanza di maschi potrebbe essere spiegata da un fattore *X-linked* recessivo. Questa ipotesi è avvalorata dall'identificazione, in pazienti con ipopituitarismo con e senza ritardo mentale, di mutazioni nel gene SOX3 localizzato in Xq27 (Laumonnier *et al*, 2002, Woods *et al*, 2005). Inoltre, alterazioni del gene SOX3 sono trovate in pazienti con ectopia della neuroipofisi, anomalie infundibolari ed ipoplasia del corpo calloso. Tuttavia, l'incidenza di anomalie legate a SOX3 nei pazienti CPHD resta da definire.

6.2 IGHD

Nella popolazione, i casi di bassa statura associata a deficit di GH hanno una frequenza stimata intorno a 1/4000-1/10000 e tra questi solo il 5-30% ha almeno un parente di primo grado affetto, suggerendo un'eziologia di origine genetica.

Tali stime di prevalenza sono state ottenute da casistiche di pazienti selezionati con i criteri conservativi e stringenti comunemente accettati, ossia con stature inferiori a -4,5 SDS rispetto alla norma. Sono stati dunque esclusi i pazienti con forme intermedie di deficit di GH alla cui base però potrebbero esserci lesioni genético-molecolari. Per questa ragione la proporzione di casi ad eziologia genetica sarebbe più alta, considerando anche il fatto che molti casi familiari hanno trasmissione autosomica recessiva e potrebbero non essere riconosciuti appartenendo a famiglie di dimensioni troppo piccole.

Inoltre, casi classificati come sporadici, in cui abitualmente non vengono ricercate spiegazioni genetiche del disordine, potrebbero derivare da mutazioni *de novo*, che rimarrebbero sconosciute. In letteratura sono stati descritti pazienti anche appartenenti a casi familiari in cui, in effetti, è stato possibile identificare mutazioni insorte *de novo* (Massa *et al*, 1998)

Per estendere lo studio genetico al maggior numero di casi in cui non si esclude una base genetica, sono stati selezionati anche pazienti con forme meno gravi di IGHD (statura <-2DS dalla media per età) e deficit parziali di GH, allargando i criteri di inclusione e comprendendo casi sia familiari che sporadici.

Al momento attuale, la percentuale di pazienti in cui sono state identificate mutazioni causali è molto bassa.

Il GH1 è il gene più studiato per la presenza di mutazioni in pazienti con deficit isolato di GH. In letteratura vengono riportate frequenze di mutazioni nel GH1 pari al 12,5% nei casi familiari e al 10% nei casi sporadici (Wagner *et al*, 1998).

Nessuna delle mutazioni già note è stata identificata tra i pazienti della casistica del presente studio, solo una nuova mutazione (IVS3 del+56-77) è stata trovata in 1 famiglia su 9 italiane studiate (11%) (Vivenza *et al*, 2006).

Questa nuova mutazione, presente in una bambina ed in sua madre con deficit di IGHD di tipo II, consiste in una delezione di 22 bp nell'IVS3 (IVS 3 dell +56-77). La delezione rimuove completamente il BPS (branch-point site) dell'IVS3 (AGCCAAT) che è stato localizzato tra -20 e -25 a monte della giunzione introne 3 esone 4 e che si accoppia a 5 dei 7 residui del BPS riconosciuto nei mammiferi (Y₈,

NY₁₀₀T₈₇R₈₁A₁₀₀Y₉₄, in cui Y rappresenta una pirimidina, R una purina; ed N una base qualunque) (Smith *et al*, 1989). La posizione a -21 di A probabilmente rappresenta l'adenina maggiormente conservata e coinvolta nella formazione del laccio con il sito di *splicing* donatore. L'analisi eseguita sull'mRNA estratto dai linfociti, ha mostrato che questa mutazione aveva un modello di *splicing* analogo a quello osservato in molti casi di IGHD di tipo II: la probanda e sua madre mostravano 2 forme principali di mRNA, cioè l'mRNA *full-length* (codificato dall'allele *wt*) ed un prodotto di *splicing* aberrante senza l'esone 3 (codificato dall'allele mutato). In accordo con la letteratura, il fenotipo clinico determinato dalla delezione di 22 bp nell'IVS 3 correlava con quello osservato in altri pazienti IGHD di tipo II che portavano mutazioni nel sito di *splicing*. (Binder e Ranke, 1995; Cogan *et al*, 1995; Missarelli *et al*, 1997; Hayashi *et al*, 1999; Binder *et al*, 2001).

Il fenotipo dei pazienti affetti da IGHD di tipo II è alquanto eterogeneo. In media, i pazienti con mutazioni nel sito di *splicing* mostrano un'età di esordio del ritardo di crescita più precoce, che si aggrava progressivamente, rispetto ai pazienti che portano mutazioni *missense*. La variabilità del fenotipo, tuttavia, è presente anche tra i membri affetti della stessa famiglia e ciò dimostra che, durante l'infanzia, la crescita dipendente dal GH è differente da individuo ad individuo, ed è modificata da vari fattori, molti dei quali ancora sconosciuti (Binder *et al*, 2001; Fofanova *et al*, 2003; Mullis *et al*, 2005).

Entrambe le pazienti hanno mostrato un esordio del ritardo di crescita post-natale precoce con ingravescenza progressiva.

La paziente ha mostrato un arresto della crescita all'età di 4 mesi ed è stata diagnosticata a 7 mesi (-5,8 SDS); sua madre, invece, venne diagnosticata a 4 anni (-6,9 SDS), con un'altezza di -5 SDS all'età di 2 anni (non è stato possibile avere informazioni sull'età più remota). La madre, comunque, presentava un fenotipo clinico meno grave della figlia. Infatti, la secrezione di GH dopo test di stimolazione ipofisaria era completamente assente nella bambina, mentre nella madre, alla diagnosi fatta in età infantile, risultava grave ma non completamente ridotto. Anche le dimensioni dell'ipofisi sono diverse: nella madre risulta normale, nella figlia è ridotta. Tuttavia, quando la madre ha effettuato il *re-testing* in età adulta, non ha presentato nessuna risposta al forte test di stimolazione ipofisaria (GHRH + arginina) al quale è stata sottoposta, suggerendo che la funzione delle cellule somatotrope si era esaurita nel corso degli anni. La madre non ha sviluppato altri deficit ipofisari,

come è riportato in alcuni pazienti adulti con IGHD di tipo II (Mullis *et al*, 2005). In conclusione, la mutazione qui descritta è diversa dalle altre mutazioni introniche trovate nelle famiglie affette da IGHD di tipo II poiché lascia intatte le giunzioni di *splicing* e gli *enhancers*, mentre rimuove completamente il BPS. Sulla base di ciò che è stato osservato in altre malattie dell'uomo (Maslen *et al*, 1997; Hamlington *et al*, 2000; Di Leo *et al*, 2004; Khan *et al*, 2004; Kuivenhoven *et al*, 1996), si può ipotizzare che una mutazione che coinvolge il BPS potrebbe indurre lo *skipping* parziale o totale dell'esone 4. L'analisi dell'mRNA estratto dai linfociti, comunque, così come l'analisi sull'mRNA estratto dalle cellule ipofisarie di ratto trasfettate con l'allele recante la delzione di 22 bp, ha rivelato che il trascritto presente in maggiore quantità era quello con *skipping* dell'esone 3.

Solo in condizioni strettamente sperimentali sono state individuate 2 isoforme nuove, dovute ad un'aberrazione del meccanismo di *splicing* per la mutazione del BPS. L'esperimento è stato eseguito in modo da escludere l'amplificazione del trascritto senza esone 3. La prima isoforma, che perde tutto l'esone 4, codifica per un presunto peptide maturo senza gli aminoacidi 72-126. L'altro sarebbe un mRNA privo delle prime 86 bp dell'esone 4, e causerebbe uno slittamento della cornice di lettura con produzione di un peptide maturo che differisce da quello *wt* a partire dall'aminoacido 72, con troncamento della proteina stessa al residuo (codone) 77. Questo prodotto probabilmente deriva dall'utilizzo di un sito di *splicing* criptico in posizione 85-86 dell'esone 4 (AG). Il riconoscimento di questo sito di *splicing* potrebbe essere mediato dalla presenza di un presunto BPS criptico (CGCCAAC), dato che appaia 6 delle 7 basi della sequenza consenso, localizzato tra i nt 78 e 84 dell'esone 4.

La quantità dell'mRNA anomalo senza esone 4, o senza una parte di esso, è veramente molto bassa nei linfociti dei pazienti in confronto all'mRNA normale o a quello senza l'esone 3 e può quindi essere visualizzato solo in condizioni sperimentali. Una delle ragioni per cui non si riscontrano le isoforme dovute alla delezione del BPS (isoforma con *skipping* dell'esone 4 e isoforma senza le prime 86 bp dell'esone 4) potrebbe essere dovuta alla sua rapida degradazione che è tipica del decadimento dell'mRNA *nonsense* (Alonso, 2005).

Le due forme di *splicing* aberrante che coinvolgono l'esone 4 sono una diretta conseguenza della perdita del BPS, come dimostrato dai costrutti mutagenizzati che perdono solo le 7 bp del BPS consenso. Al contrario, l'aumento dell'isoforma senza esone 3 rimane da spiegare. In un lavoro recente, Ryther e colleghi dimostrarono che

l'integrità dell'IVS3 è cruciale per l'inclusione dell'esone 3 nell'mRNA e dimostrarono che delezioni di 12-14 basi sono sufficienti per aumentare lo *skipping* dell'esone 3. Essi ipotizzano che questo sia dovuto alla riduzione dell'IVS3 piuttosto che alla delezione di sequenze specifiche. Si può quindi ipotizzare che il maggior effetto della delezione di 22 bp, ossia l'aumento dello *skipping* dell'esone 3 e la produzione dell'isoforma patologica di 17,5 kDa associata all'IGHD di tipo II, sia la conseguenza della riduzione dell'IVS3 che supererebbe l'effetto causato dalla delezione del BPS.

Tra le delezioni effettuate mutagenizzando i costrutti e riportate da Ryther et al., tuttavia, il BPS dell'IVS3 rimaneva inalterato e mediava la formazione del laccio con il sito donatore dell'IVS2. Nel nostro caso, non è chiaro come i due mutanti che perdono il BPS dell'IVS3 (cioè l'allele con del+56-77 e l'allele mutagenizzato per la delezione di 7 bp del BPS) riescano a processare correttamente lo splicing dell'IVS3 necessario per lo *skipping* dell'esone 3 e per l'mRNA *full-length* (Black, 2003). Una situazione simile è stata riportata per altre malattie dovute a mutazioni nel BPS in cui l'allele mutato produceva ancora l'isoforma *wt* oltre all'isoforma con uno *splicing* aberrante (Kiuvenhoven et al, 1996; Burrows et al, 1998; Zhu et al, 2001). Una spiegazione ovvia per queste osservazioni è l'utilizzo di BPS alternativi in altre posizioni nell'IVS3 che sostituiscono in modo efficiente quello deletato.

Due sequenze localizzate tra -40/-46 e -61/-67 dal sito di *splicing* accettore nell'allele deletato, ad una distanza compatibile con la funzione del BPS (Helfman e Ricci, 1989), si appaiano con la sequenza consenso più di altre posizioni. Tuttavia, il plasmide *del-GHI* mutagenizzato ad uno solo o a tutti e due i nucleotidi A più conservati delle due sequenze BPS criptiche, ha dato lo stesso modello di *splicing* che aveva dato l'allele non mutagenizzato. E' quindi possibile che altre sequenze meno omologhe alla sequenza consenso possano agire come un BPS criptico. Infatti, anche se alcune mutazioni riportate nel BPS sono la causa di fenotipi gravi, è stato anche dimostrato che un BPS mutato può essere rimpiazzato da un BPS criptico senza somigliare alla sequenza di *branch-site* di consenso, a parte il nucleotide A che, invece, è necessario per la formazione del laccio (Padgett et al, 1985).

In conclusione, nonostante l'assenza del BPS canonico, lo *skipping* dell'esone 3 è il trascritto principale e la causa dell'IGHD di tipo II dei nostri pazienti. Quindi, il contesto in cui la mutazione del BPS è localizzata, cioè la delezione di 22 bp, ha un'influenza fenotipica più grande rispetto alla mutazione nel BPS di per sé. E'

improbabile che le due isoforme con uno *splicing* aberrante dell'esone 4 contribuiscano al fenotipo dell'IGHD di tipo II poiché probabilmente esse sono poco espresse.

Nessuna mutazione con sicuro significato causale, invece, è presente tra i 164 casi sporadici, tra italiani e stranieri, studiati. In questi ultimi sono stati identificati 2 polimorfismi (Thr-24Ala e Val110Ile) e 7 varianti non ancora note in letteratura (Ser7Ser, Glu56Asp, Pro59Pro, Pro61Pro, Glu65Val, Thr123Thr, Val173Val). Cinque di esse sono sinonime e probabilmente non hanno significato patologico e solo due determinano un cambiamento aminoacidico nel prodotto proteico. Per determinare se tali alterazioni possono essere considerate mutazioni, è necessario analizzare una popolazione di soggetti normali, per escludere che si tratti di polimorfismi ed inoltre devono essere messi a punto studi funzionali per valutare con certezza eventuali effetti patologici.

Mentre la percentuale di mutazione tra i casi familiari è risultata simile a quelle della letteratura, nei casi sporadici, nella remota ipotesi che tutte queste 7 varianti abbiano un ruolo patologico, la frequenza di mutazione risulterebbe essere ancora molto ridotta rispetto alle stime riportate (4,3% vs 10%).

La ricerca di mutazioni nei soggetti IGHD nel presente studio è continuata con l'analisi del gene GHRH-R.

La prevalenza di mutazioni a carico del GHRH-R in soggetti con IGHD non è ancora stata determinata con precisione. Risultati preliminari indicano che mutazioni a carico del GHRH-R sono responsabili di circa il 10% dei casi di IGHD IB. Sino ad oggi sono state descritte almeno 15 mutazioni in casistiche limitate di soggetti. Un'unica variazione (Leu144His) è stata riscontrata sia in Europa che in Asia, le altre 14 mutazioni identificate sembrano essere ciascuna specifica di una particolare area geografica. La maggior parte dei soggetti in cui sono state identificate mutazioni nel GHRH-R appartengono a grosse famiglie in cui c'è un'ampia percentuale di consanguineità. Quattro su 15 mutazioni del GHRH-R sono state identificate in famiglie Pakistane, tra le quali peraltro c'è un'alta prevalenza di matrimoni tra consanguinei, stimata intorno al 60% (Alba *et al*, 2004).

Nella nostra casistica sono state identificate 2 nuove alterazioni del gene GHRHR che potrebbero avere un significato patologico (Val10Gly e 407delG). La variazione Val10Gly si trova nel peptide segnale che è deputato al corretto trasporto del recettore in membrana. La variazione 407delG, invece, determina la formazione di

una proteina tronca totalmente priva dei domini transmembrana e intracellulare. Entrambe queste mutazioni sono state trovate in due soggetti IGHD italiani sporadici figli di genitori non consanguinei. Tuttavia esse sono state trovate in eterozigosi in entrambi i soggetti studiati, nei quali la ricerca di altre mutazioni, estesa anche a livello del promotore del GHRH-R, è risultata negativa. Non è ancora stato possibile definire se tali alterazioni siano responsabili da sole del fenotipo patologico. Si tratta delle prime alterazioni del GHRH-R descritte nella popolazione italiana. Dal momento che non è stato possibile ottenere il DNA dei genitori di questi pazienti, non è possibile definire se siano mutazioni insorte *de novo*. Per definire se Val10Gly è una mutazione causale con possibile effetto dominante è necessario mettere a punto studi funzionali che ne dimostrino l'effetto patologico. La 407delG che causa una proteina tronca, è più probabilmente una mutazione recessiva. È dunque necessario riuscire ad identificare l'altra mutazione sul secondo allele. Dato che la sequenza codificante e il promotore non hanno evidenziato altre alterazioni, potrebbe essere presente una mutazione intronica con effetto sullo *splicing* e pertanto verrà analizzato l'RNA del paziente.

Dal momento che in letteratura sono stati descritti casi di IGHD con mutazioni del gene HESX1, l'analisi dei soggetti della casistica con IGHD è proseguita con lo studio di HESX1.

Sino ad oggi in letteratura sono state riportate solo 3 mutazioni a carico di HESX1 in soggetti con deficit di GH isolato: S170L, T181A, e la delezione di una G nell'esone 4 che porta ad una proteina aberrante negli ultimi 8 AA al carbossi terminale. La mutazione S170L è stata trovata in 3 soggetti maschi, 2 dei quali appartengono alla stessa famiglia, ma hanno quadri neuroanatomici diversi. Tutti i soggetti IGHD presentano un fenotipo lieve, nonostante si noti una progressione dei deficit, in particolare per quanto riguarda il soggetto con la g.1684delG.

Nello studio presentato in questa Tesi, sono state identificate 3 variazioni nella regione codificante: una sinonima, His61His, e 2 *missense*: Asp125Ser e Val129Ile (tabella XVIII).

Tabella XVIII. Mutazioni a carico di *HESX1* in IGHD riportate dalla letteratura e in questo studio.

Variazioni trovate in HESX1 in pazienti IGHD e caratteristiche della trasmissione genetica					
Posizioni	Soggetto	Genotipo	Endocrinopatia	Parente da cui è stato trasmesso l'allele recante la mutazione	Referenza
S170L ^b	Maschio	eterozigote	IGHD	Dal padre	(Thomas <i>et al</i> , 2001)
S170L ^b	Maschio	eterozigote	IGHD	Dal padre	(Thomas <i>et al</i> , 2001)
S170L	Maschio	eterozigote	IGHD	Non conosciuto	(Thomas <i>et al</i> , 2001)
T181A	Femmina	eterozigote	IGHD	Dalla madre, l'allele mutato è stato trasmesso anche ad una sorella della paziente che non è affetta	(Thomas <i>et al</i> , 2001)
g.1684delG	Maschio	eterozigote	IGHD	Insorta <i>de novo</i>	(Cohen <i>et al</i> , 2003)
V129I	Maschio	eterozigote	IGHD	Non conosciuto	Dati di questo studio
+3 G →A in IVS2	Maschio	eterozigote	IGHD	Non conosciuto	Dati di questo studio

^b caso familiare: 2 fratelli.

La sostituzione sinonima His61His è stata trovata in una ragazza indiana che, alla risonanza magnetica nucleare, mostrava un quadro neuroradiologico normale. Tale variazione sinonima, mai descritta nella popolazione Caucasoide, potrebbe non avere effetti sulla funzionalità della proteina ed essere un polimorfismo tipico dell'Asia. Alternativamente potrebbe determinare un'alterazione dello splicing se fosse localizzata all'interno di una sequenza ESE (Exon Splicing Enhancer). Solamente uno studio funzionale può dare informazioni sull'effetto di questa variante.

La sostituzione Asp125Ser, già documentata dalla letteratura come polimorfismo caratteristico della popolazione africana e caraibica (Dattani *et al*, 1998; Brickman *et al*, 2001; Thomas *et al*, 2001), nel nostro studio è stata trovata, oltre che in un paziente maghrebino, anche in 3 soggetti di origine italiana. La ricerca di tale variazione, effettuata in un gruppo di 303 soggetti sani di origine Italiana, ha mostrato la presenza di tale polimorfismo in condizione di eterozigosi in 3 soggetti. Quindi, come già dimostrato da Rainbow *et al*, (2005), si tratterebbe di un polimorfismo appartenente anche alla popolazione caucasoide. Inoltre, dati della letteratura (Brickman *et al*, 2001), sostengono che Asn125Ser non sia un polimorfismo del tutto silente, in quanto cadendo nell'*homeodomain* molto conservato della proteina, e scambiando l'asparagina, che ha gruppo aminico, con la

serina, che ha gruppo idrossilico, potrebbe cambiarne la struttura, la carica e la funzione. Studi funzionali eseguiti con la proteina recante la sostituzione Asn125Ser hanno dimostrato una maggior affinità di legame con il DNA rispetto alla proteina *wt* (Brickman *et al*, 2001), tuttavia non esistono prove *in vivo* dell'effetto di questa sostituzione.

La sostituzione Val129Ile è stata trovata in un bambino IGHD prepubere di origine turca. La letteratura non riporta dati su questa variazione e la ricerca nella popolazione di controllo ha dato risultati negativi. Anche tale variazione, come la Asn125Ser, cade nell'*homeodomain* di HESX1, e nonostante provochi un cambiamento aminoacidico che non modifica la polarità, avendo valina ed isoleucina due residui alifatici, potrebbe avere qualche effetto sull'ingombro sterico, e quindi sulla struttura.

Le altre variazioni trovate nel gruppo degli IGHD, si trovano nelle regioni non codificanti del gene. La sostituzione G/A in +3 nell'IVS2 è stata trovata in un solo individuo, e cadendo nel sito donatore di *splicing* potrebbe causare un'alterazione del corretto *splicing* dell'mRNA. Finora non è stata documentata alcuna mutazione nei siti di *splicing* del gene HESX1, e questa potrebbe essere una buona base su cui allestire studi di tipo funzionale.

La sostituzione +48 G/A nel 3'UTR individuata in un solo soggetto, non è mai stata documentata ed anch'essa potrebbe avere effetti sulla stabilità dell'mRNA, nella regolazione dei meccanismi di traduzione e nei segnali di poliadenilazione.

Infine lo studio degli IGHD si è completato con l'analisi di PIT1 e PROP1 in una piccola proporzione di soggetti in età prepubere. In tali bambini, infatti, il deficit isolato di GH potrebbe essere la prima espressione di un CPHD a sviluppo più tardivo, pertanto anche i geni coinvolti nel CPHD devono essere considerati dei candidati per lo ricerca di mutazioni in questa categoria di soggetti. Tra i bambini analizzati non è stata descritta alcuna mutazione.

6.3 CPHD

Tra i soggetti con CPHD sono state individuate solamente 4 mutazioni causali nel gene PROP1, in due casi sporadici su 45 analizzati (4,4%) e in una famiglia su 6 analizzate (17%), mentre nel gene HESX1 è stata trovata una sola mutazione (0,9%) in un caso sporadico su 102 studiati.

Nessuna mutazione, invece, è stata riscontrata nei geni PIT1 ed LHX4 in tale categoria di soggetti.

Sino ad oggi la letteratura riporta 3 mutazioni *missense* a carico del gene HESX1 in soggetti affetti da CPHD (R160C, Q6H, I26T), 2 recessive in omozigosi ed 1 dominante in eterozigosi, e 2 inserzioni (una in omozigosi e l'altra in eterozigosi) che causano uno slittamento della cornice di lettura (tab XIX). Rispetto ai soggetti IGHD con mutazioni in HESX1, i pazienti CPHD che presentano mutazioni nel gene HESX1 hanno un fenotipo più grave, associato ad alterazioni anatomiche cerebrali della linea mediana.

Nel nostro studio, l'unica mutazione causale identificata è la Gln6His, trovata in un maschio CPHD con deficit di GH, TSH e che con l'età puberale sta mostrando ipogonadismo.

Tabella XIX. Mutazioni a carico di HESX1 in soggetti affetti da CPHD riportate dalla letteratura ed in questo studio.

Variazioni trovate in HESX1 in pazienti CPHD e caratteristiche della trasmissione genetica					
Posizioni	Soggetto	Genotipo	Endocrinopatia	Parente da cui è stato trasmesso l'allele recante la mutazione	Referenza
R160C ^a	Femmina	omozigote	CPHD	Entrambi i genitori eterozigoti e consanguinei	(Dattani <i>et al.</i> , 1998)
R160C ^a	Maschio	omozigote	CPHD	Entrambi i genitori eterozigoti e consanguinei	(Dattani <i>et al.</i> , 1998)
Q6H	Maschio	eterozigote	CPHD	Dal padre	(Thomas <i>et al.</i> , 2001)
I26T ^c	Femmina	omozigote	CPHD	Entrambe i genitori eterozigoti e consanguinei	(Carvalho <i>et al.</i> , 2003)
306/307 ins AG	Maschio	eterozigote	CPHD	Insorta <i>de novo</i>	(Tajima <i>et al.</i> , 2003)
Alu-element ins nel terzo esone	Femmina	omozigote	CPHD	Entrambe i genitori eterozigoti e consanguinei	(Sobrier <i>et al.</i> , 2005)
Q6H	Maschio	eterozigote	CPHD	Dalla madre	Dato di questo studio
V129I	Maschio	eterozigote	CPHD	Dalla madre	Dato di questo studio
V129I	Maschio	eterozigote	CPHD	Non conosciuto	Dato di questo studio

La variazione Gln6His è una mutazione in eterozigosi già descritta in letteratura (Thomas *et al*, 2001) trovata in un solo soggetto affetto da CPHD, che ha ereditato la mutazione dal padre fenotipicamente sano. Anche il paziente del nostro studio ha ereditato la mutazione da uno dei genitori, in questo caso dalla madre clinicamente normale. Inoltre, le caratteristiche neuroradiologiche del paziente, che mostra un'ectopia della neuroipofisi, si sovrappongono a quelle descritte da Thomas (2001). Nonostante il riscontro di soggetti sani che presentano la stessa mutazione dei malati, la descrizione di un ulteriore caso con fenotipo simile avvalorava l'ipotesi che si tratti comunque di una mutazione a penetranza incompleta. E ciò sarebbe in accordo con i dati di Shawlot *et al*, 1995, e di Dattani *et al*, 1998, in cui topi *knock-out* per *Hesx1* manifestano sindromi malformative di gravità differente.

Il fenomeno della semidominanza (ossia l'espressione di un fenotipo eterozigote meno grave rispetto agli omozigoti), con penetranza incompleta del fenotipo eterozigote, è già stato descritto almeno in altri tre disordini congeniti che dipendono da mutazioni in geni *homeobox*, ossia: la sinpolidattilia (HOXD13) (Akarsu *et al*, 1996), nell'amaurosi congenita di Leber (CRX) (Swaroop *et al*, 1999) e nell'agenesia sacrale (HB9) (Ross *et al*, 1998). Si può ipotizzare che l'espressione di un fenotipo che dipende dal dosaggio genico sia una forma comune dei disordini congeniti che sono la causa di mutazioni di geni omeotici dello sviluppo, almeno negli individui che sopravvivono fino al termine.

Questa manifestazione di semidominanza e di penetranza incompleta può essere spiegata con il fatto che le mutazioni in eterozigosi riducono i livelli di HESX1 *wild-type* nelle cellule embrionali a concentrazioni vicino alla soglia richiesta per la normale e corretta embriogenesi. Per motivi stocastici della trascrizione genica, i livelli proteici di HESX1 al di sotto di questa soglia potrebbero trovarsi in uno stadio critico durante le prime fasi di sviluppo embrionale, e causare una perdita della proliferazione cellulare e/o una differenziazione inadeguata del prosencefalo e dell'ipofisi primordiale. Se tali difetti embrionali si manifestano precocemente, come è stato dimostrato nel topo *knock-out* per *Hesx1*, si amplificano durante l'embriogenesi, ed un piccolo difetto nell'embrione potrebbero diventare un'ipoplasia significativa alla nascita. Dal momento che *Hesx1*/HESX1 è implicato nella migrazione del tessuto nel prosencefalo e nella tasca di Rathke, è possibile che una piccola riduzione del livello proteico di HESX1 abbia conseguenze a livello funzionale. In particolare, dal momento che le cellule somatotrope sono le ultime a

differenziarsi, potrebbero essere le più vulnerabili a questo tipo di effetto, e questo spiega perché il deficit di GH è la manifestazione più comune della riduzione di HESX1 tra gli individui eterozigoti.

Dal momento che tutti i pazienti eterozigoti mostrano difetti ipofisari più o meno gravi, e solamente tre di questi avevano un'ipoplasia del nervo ottico, sembrerebbe che lo sviluppo ipofisario sia più sensibile a bassi livelli di HESX1 rispetto alla formazione del prosencefalo. Questo modello potrebbe anche spiegare le variazioni fenotipiche tra i pazienti con la stessa mutazione (come nel caso dei fratelli IGHD con la variazione S170L, in cui un individuo mostra malformazioni anatomiche del volto, degli arti e dei nervi ottici e l'altro, invece, un aspetto normale senza anomalie visive), che sarebbe la conseguenza di deboli differenze tra gli individui a quantità di tessuto perso o recuperato durante lo sviluppo. Questo riflette anche le grandi differenze viste nella severità del fenotipo tra i topi mutanti di *Hesx1*.

Quindi, tutti gli individui che hanno mutazioni in eterozigosi in HESX1 sono a rischio di sviluppare un fenotipo di ipoplasia ipofisaria per una ridotta concentrazione della proteina HESX1 funzionale nell'ipofisi embrionale. Tuttavia, è possibile che sia geni modificatori sia fattori ambientali non ancora identificati abbiano un'influenza nello sviluppo e nella morfogenesi.

Nel nostro studio, tra i CPHD, oltre alla variazione Gln6His suddetta, è stata trovata anche la variazione Val129Ile, già riscontrata in un soggetto turco affetto da IGHD. Nei CPHD è stata trovata in due individui italiani, in un maschio diagnosticato in età puberale con deficit di GH e gonadotropine ed in un soggetto adulto affetto da panipopituitarismo. Come già detto, la sostituzione della valina con isoleucina in posizione 129 dell'*homeodomain* della proteina potrebbe determinare un cambiamento nella sua funzionalità. È interessante notare che tutte e due gli individui CPHD recanti la variazione Val129Ile, sono ipogonadici e mostrano all'RMN, un'ipoplasia ipofisaria. In particolare, l'individuo diagnosticato da adulto ha sviluppato il deficit di gonadotropine dopo i 20 anni in seguito ad un normale sviluppo puberale eugonadico. La variazione Val129Ile è stata trovata anche nella madre e nella sorella apparentemente sane.

Dalla letteratura recente, si è visto che HESX1 viene espresso anche nell'individuo adulto (Mantovani *et al*, 2006), e per questo motivo si è ipotizzato che possa avere un meccanismo di espressione bifasico detto di *turn-off/turn-on*, ossia la sua espressione si estinguerebbe dopo la differenziazione della tasca di Rathke durante lo sviluppo

embrionale, per riaccendersi nella vita dell'individuo adulto. Questo meccanismo *di turn-off/turn-on*, tuttavia, non è conosciuto, ma si può speculare che come per il gene TTF-2 (Tannini *et al*, 1997), anche HESX1, una volta riattivato cambi la sua azione e da repressore diventi attivatore della trascrizione. E' interessante ancora notare che studi *in vitro* hanno dimostrato come Hesx1 possa modulare l'espressione dei geni codificanti per le subunità α GSU e LH β e, quindi, la produzione di gonadotropine (Quirk e Brown, 2002). Quindi, si potrebbe pensare che nell'individuo adulto HESX1 moduli la produzione di gonadotropine, e che una variazione nell'*homeodomain* possa causare una *loss-of-function* se agisse come attivatore o una *gain-of-function* se agisse come repressore. Il riscontro della stessa variante, Val129Ile, in un soggetto IGHD di 2 anni, quindi ancora prepubere, non esclude che possa causare un deficit futuro nella sua produzione di gonadotropine, mentre la presenza della stessa variazione nella madre e nella sorella dell'individuo CPHD adulto, potrebbe indicare che nel sesso femminile esistono altri fattori che possono in qualche modo modulare l'azione di una proteina HESX1 mutata. Nonostante non si possa associare la variazione Val129Ile ai soggetti con deficit ormonali, perché il gruppo di controllo (costituito da 303 individui) non è sufficientemente significativo rispetto al gruppo IGHD+CPHD (costituito da 304 pazienti), (anche se tale variazione non sia stata trovata) non si può escludere che non abbia un significato causale. Solo un ampliamento del gruppo di controllo ed esperimenti di tipo funzionale che valutano l'affinità di legame al DNA, potranno chiarire il suo significato.

In letteratura non esistono *screening* di HESX1 effettuati su una casistica di soggetti affetti da deficit ormonali così ampia, tuttavia la percentuale di mutazioni (0,3% vs 0,6%) si discosta molto da quella ottenuta da Dattani *et al* (1998) pari a 1,6% , ed il motivo, probabilmente, sta nella selezione del campione in studio.

Mentre per PIT1, ed LHX4 i nostri dati corrispondono ai pochi sino ad ora pubblicati, c'è una notevole discrepanza tra i nostri risultati e ciò che viene riportato in alcuni lavori della letteratura per quanto riguarda la prevalenza di mutazione a carico di PROP1.

PROP1 è il gene che più frequentemente è stato individuato come responsabile dei CPHD nelle popolazioni caucasiche. Sino ad oggi sono state descritte più di 40 famiglie indipendenti e più di 40 casi sporadici con mutazioni a carico di tale gene, per la maggior parte provenienti dall'Europa e dal Nord America e solamente 1 caso

nell'Est asiatico, in un soggetto Giapponese (Sung-Su, *et al*, 2003). In particolare la maggior parte delle mutazioni descritte cadono nei codoni 50, 73, 99 (incluso nella delezione 301-302delAG) e 115-120. Queste regioni sono state definite come “*hot spots*” di mutazione. La mutazione più comune è 301-320 del AG trovata in 20 famiglie su 40 (50%) e 27 casi sporadici su 46 (58%) e la seconda come frequenza è 150delA descritta in 5 famiglie (10%) e 10 casi sporadici (21%). Queste due mutazioni sono frequentemente descritte in Russia, Svizzera, Polonia, Grecia dove la proporzione di anomalie di PROP1 è estremamente alta. In un recente studio, infatti, Deladoey *et al*, 1999, hanno descritto 73 pazienti svizzeri con CPHD, 35 dei quali presentavano mutazioni di PROP1. Questi dati sono confermati anche in altri studi dove sono descritte percentuali di mutazione che variano dal 33 al 50% (Parks *et al*, 1999).

Anche in questo caso le discrepanze tra il nostro studio e gli altri possono essere spiegate da differenze nei campioni di pazienti selezionati. Infatti nello studio di Deladoey la maggior parte dei casi erano familiari e i 35 soggetti con mutazioni appartenevano a 18 famiglie, mentre nel nostro le famiglie analizzate sono solo 6. La frequenza di mutazione tra i casi familiari risulta essere piuttosto alta (17%) anche nel nostro studio, mentre nei casi sporadici la frequenza è decisamente ridotta (5,6%). I nostri dati sono confermati da un recente lavoro condotto da Rainbow *et al* del 2005 in cui su 50 soggetti di origine britannica sporadici con CPHD o SOD nessuno presentava mutazioni di PROP1, e in uno studio di McLennan *et al* del 2003 in cui non sono state trovate mutazioni di PROP1 su un campione di 33 soggetti CPHD australiani.

Nei casi sporadici del nostro studio sono state trovate le due mutazioni più frequentemente descritte in letteratura (301-320 del AG e 150 del A). È interessante notare che entrambi i soggetti non sono italiani, uno è di origine turca e uno slava. Non sono state trovate mutazioni nei soggetti italiani sporadici. Si può ipotizzare dunque che le differenze osservate tra le varie casistiche descritte in letteratura non siano solo dovute a diversità nelle proporzioni di casi familiari e sporadici presenti in ciascuna di esse, ma anche ad effettive differenze di prevalenza di mutazione nelle diverse popolazioni.

Abbiamo inoltre descritto le mutazioni Arg73Cys e Arg73His riscontrate in eterozigoti composta in un fratello e una sorella di origine italiana affetti da CPHD. I due soggetti hanno ereditato le due mutazioni ciascuna da un genitore. I genitori sono

fenotipicamente normali dimostrando che solo in associazione le due mutazioni possono determinare un quadro di CPHD.

7. CONCLUSIONI

In conclusione lo studio molecolare dei geni coinvolti nei difetti ipofisari condotto su un'ampia casistica di IGHD e CPHD ha permesso l'identificazione di mutazioni causali solo in rari casi, prevalentemente familiari. In particolare fra i soggetti IGHD la frequenza totale di mutazioni è risultata pari all'1,5% nei casi sporadici e al 7,7% nei casi familiari, mentre nei CPHD è pari al 2,6% nei casi sporadici e al 12,5% nei familiari. Tuttavia non tutti i pazienti sono stati ancora analizzati per tutti i geni candidati. In ogni caso la frequenza di mutazioni è risultata estremamente ridotta in tutti i geni studiati e nella maggioranza dei casi l'origine del deficit rimane pertanto sconosciuta.

Data la scarsa incidenza di mutazioni nella nostra casistica non è possibile fare correlazioni tra genotipo e fenotipo e definire se la gravità dei deficit possa essere in qualche modo correlata alla presenza o meno di mutazioni. Tuttavia valutando le caratteristiche dei singoli pazienti si possono fare alcune considerazioni.

Mentre nel caso familiare in cui è stata descritta la mutazione del GH1 le due pazienti mostravano un fenotipo grave con deficit di GH severo e notevole ritardo di crescita, i soggetti IGHD portatori di mutazioni di altri geni (GHRHR e HESX1) presentavano, invece, quadri più lievi con deficit parziale di GH.

Nei CPHD tutti i soggetti portatori di mutazioni di PROP1 erano bambini e presentavano quadri di CPHD incompleti e variabili: un caso mostrava deficit di GH e gonadotropine, un altro deficit di GH TSH e ACTH, nel caso familiare i due fratelli avevano un deficit di GH e TSH. Dal momento che si tratta di bambini con quadri ancora incompleti di CPHD, il riscontro di mutazioni di PROP1 in tali pazienti ha un grande valore nello stabilire la prognosi e la programmazione del *follow-up* endocrinologico. Infatti i soggetti portatori di mutazioni di PROP1 possono sviluppare deficit progressivi, in particolare di ACTH e gonadotropine. Questi bambini pertanto necessitano di un monitoraggio periodico e a lungo termine al fine di instaurare eventuali terapie sostitutive in modo tempestivo.

Infine per quanto riguarda i quadri RMN i soggetti IGHD portatori di mutazioni presentavano ipoplasia ipofisaria, i pazienti CPHD, invece, mostravano una certa variabilità neuroradiologica.

Il ruolo della genetica nella valutazione dei pazienti con IGHD e CPHD resta ancora da definire e con la continua scoperta di nuovi geni che intervengono nel processo di crescita e nello sviluppo ipofisario rimane ancora un problema aperto.

I maggiori vantaggi dei test genetici sono, oltre la definizione di una diagnosi precisa, anche la possibilità di dare indicazioni sulla prognosi e sulla terapia, soprattutto nel caso di PIT1 e PROP1, e fornire un *counseling* genetico.

Tra gli svantaggi ci sono i costi dei test genetici, anche se con l'introduzione delle tecniche automatiche sono in riduzione.

Probabilmente trattandosi di patologie rare la migliore strategia è quella che prevede la centralizzazione delle analisi in uno o due Centri Specialistici per Nazione.

8. BIBLIOGRAFIA

Alba M, Hall CM, Whatmore AJ, Clayton PE, Price DA, Salvatori R. Variability in anterior pituitary size within members of a family with GH deficiency due to a new splice mutation in the GHRH receptor gene. *Clinical endocrinology (Oxford)*, 2004; **60**:470-475.

Alonso CR Nonsense-mediated RNA decay: a molecular system micromanaging individual gene activities and suppressing genomic noise. *Bioessays*, 2005; **27**:463-466.

Aimaretti G, Corneli G, Di Somma C, Baldelli R, Gasco V, Rovere S, Migliaretti G, Colao A, Tamburrano G, Lombardi G, Ghigo E, Camanni F. Different degrees of GH deficiency evidenced by GHRH+arginine test and IGF-1 levels in adults with pituitary disease. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2005; **28**:247-252.

Agarwall G, Bhatia V, Cook V, Thomas PQ. Adrenocorticotropin deficiency in combined pituitary hormone deficiency patients homozygous for a novel PROP1 deletion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2000; **85**:4556-4561.

Akarsu AN, Stoilov I, Yilmaz E, Sayli BS, Sarfarazi M. Genomic structure of HOXD13 gene: a nine polyalanine duplication causes synpolydactyly in two unrelated families. *Human Molecular Genetics*, 1996; **5**:945-952

Amendt BA, Sutherland LB, Russo AF. Multifunctional role of the Pitx2 homeodomain protein C-terminal tail. *Molecular and cellular biology*, 1999; **19**:7001-7010.

Andersen B, Rosenfeld M. POU domain factors in the neuroendocrine system: lesson from development biology provide insights into human disease. *Endocrine Review*, 2001; **22**:35.

Arroyo A, Pernasetti F, Vasilyev VV, Amato P, Yen SS, Mellon PL. A unique case of combined hormone deficiency caused by a PROP-1 gene mutation (R120C) associated with normal height and absent puberty. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 2002; **57**:283-291.

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

Asteria C, Oliveira JHA, Abuchm J, Beck-Peccoz P. Central hypocortisolism as part of combined pituitary hormone deficiency due to mutations of Prop-1 gene. *European Journal of Endocrinology*, 2000; **143**:347-352.

Bach I, Rhodes SJ, Pearse RV, Heinzl T, Gloss B, Scully KM, Sawchenko PE, Rosenfeld Mg. P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary

organ and cell commitment and synergies with Pit-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995; **92**:2720-2724.

Binder G, Ranke MB. Screening for growth hormone (GH) gene splice-site mutations in sporadic cases with severe isolated GH deficiency using ectopic transcript analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1995; **80**: 1247-1252.

Binder G, Keller E, Mix M, Massa GG, Stokvis-Brantsma WH, Wit JM, Ranke MB. Isolated GH deficiency with dominant inheritance: new mutations, new insights. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001; **86**:3877-3881.

Black DL Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry*, 2003; **72**:291–336.

Blankenstein O, Muhlenberg R, Kim C, Wuller S, Pfaffle R, Heimann G. A new C-terminal located mutation (V272ter) in the PIT-1 gene manifesting with severe congenital hypothyroidism. Possible functionality of the PIT-1 C-terminus. *Hormon Research*, 2001; **56**:81-86.

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 associated with human pituitary disorders. *Development*, 2001; **128**:5189-5199.

Burrows NP, Nicholls AC, Richards AJ, Luccarini C, Harrison JB, Yates JR, Pope FM A point mutation in an intronic branch site results in aberrant splicing of COL5A1 and in Ehlers-Danlos syndrome type II in two British families. *American journal of human genetics*, 1998; **63**:390–398.

Cacciari E, Zucchini S, Carla G. Endocrine function and morphological findings in patients with disorders of the hypothalamo-pituitary area: a study with magnetic resonance. *Archives of disease in childhood*, 1990; **65**:119-120.

Carakushansky M, Whatmore AJ, Clayton PE, Shalet SM, Gleeson HK, Price DA, Levine MA, Salvatori R. A new missense mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor gene in familial isolated GH deficiency. *European Journal of Endocrinology*, 2003; **148**:25-30.

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. *The Journal of clinical investigation*, 2003; **112**:1192-1201.

Clayton PE, Shalet SM. Difficulties in patient management associated with the transition period. *Hormone Research*, 2005; **64**:74-75.

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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2003; **88**:4832-4839.

Cogan J, Ramel B, Lehto M, Phillips III J, Prince M, Blizzard R, de Ravel T, Brammert M, Groop L. A recurring dominant negative mutation causes autosomal dominant growth hormone deficiency - a clinical research center study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1995; **80**:3591-3595.

Cogan J, Prince M, Lekhakula S, Bunday S, Futrakul A, McCarthy E, III JP. A novel mechanism of aberrant pre-mRNA splicing in humans. *Human Molecular Genetics*, 1997; **6**:909-912.

Cogan JD, Phillips III JA. Growth disorders caused by genetic defects in the growth hormone pathway GH deficiency. In: Barness LA, Morrion III G, Rudolph AM, et al eds *Advances in Pediatrics*. St. Louis: Mosby; 1998; **45**:337-361.

Crone J, Pfaffle R, Stobbe H, Prayer D, Gomez I, Frish H. Familial combined pituitary hormone deficiency caused by PROP1 gene mutation. *Hormone Research* 2002; **57**:120-126.

Cunningham BC, Ultsch M, De Vos 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*, 1991; **254**:821-825.

Dasen JS, Rosenfeld MG. Combinatorial codes in signaling and synergy: lessons from pituitary development. *Current opinion in genetics & development*, 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 & Development*; 2001; **15**:3193-3207.

Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Martensson IL, Toresson H, Fox M, Wales JKH, Hindmarsh PC, Krauss S, Beddington RSP, Robinson ICAF. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with setto-optic dysplasia in human and mouse. *Nature Genetics*, 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.

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

Dattani MT, Robinson IC. HESX1 and Septo-Optic Dysplasia. *Review in Endocrinology and Metabolic Disorders*, 2002; **3**:289-300 .

Dattani M. Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter? *Clinical Endocrinology* , 2005; **63**:121-130.

Deladoey J, Fluck C, Buyukgebiz A, Kuhlmann BV, Eblé A, Hindmarsh PC et al. "Hot spot" in the Prop-1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1999; **84**:1645-1649.

Deladoey J, Stocker P, Mullis PE. Autosomal dominant GH deficiency due to an Arg183His GH-1 gene mutation: clinical and molecular evidence of impaired regulated GH secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001; **86**:3941-3947.

Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human Mutation*, 2000; **15**:7-12.

de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, 1999; **255**:306-312.

Di Leo E, Panico F, Tarugi P, Battisti C, Federico A, Calandra S. A point mutation in the lariat branch point of intron 6 of NPC1 as the cause of abnormal pre-mRNA splicing in Niemann-Pick type C disease. *Human Mutation* 2004; **24**:440.

Duquesnoy P, Roy A, Dastot F, Ghali I, Teinturier C, Netchine I, Cacheux V, Hafez M, Salah N, Chaussain JL, Goossens M, Bougneres P, Amselem S. Human Prop-1: cloning, mapping, genomic structure. Mutations in familial combined pituitary hormone deficiency. *FEBS letters*, 1998; **23**:216-220.

Duquesnoy P, Simon D, Netchine I, Dastot F, Sobrier ML, Goossens M, Cernichow P, Amselem S. Familial isolated growth hormone deficiency with slight height reduction due to a heterozygote mutation in GH gene. *Program of the 80th Annual meeting of The Endocrine Society. New Orleans, LA*, 1998, P2-202.

Fofanova O, Takamura N, Kinoshita E, Parks JS, Brown MR, Peterkova VA, Evgrafov OV, Goncharov NP, Bulatov AA, Dedov II, Yamashita S. Compound heterozygous of the PROP1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1998; **83**:2601-2603.

Fofanova OV, Evgrafov OV, Polyakov AV, Poltarau AB, Peterkova VA, Dedov II. A novel IVS2 -2A_T splicing mutation in the GH-1 gene in familial isolated growth hormone deficiency type II in the spectrum of other splicing mutations in the Russian population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2003; **88**:820-826.

Fox SR, Jong MT, Casanova J, Ye ZS, Stanley F, Samuels HH. The homeodomain protein, Pit-1/GHF-1, is capable of binding to and activating cell-specific elements of both the growth hormone and prolactin gene promoters. *Molecular Endocrinology*, 1990, **4**:1069-1080.

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 mutation resulting in the substitution of Arg→Cys at codon 120 (R120C). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1998; **83**:3727-3733.

Gaylinn BD, Harrison JK, Zysk JR, Lyons CE, Lynch KR, Thorner MO. Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Molecular Endocrinolog*, 1993; **7**:77-84.

Gething MJ, Sambrook J. Transport and assembly processes in the endoplasmic reticulum. *Seminar in Cell Biology*, 1990; **1**:65-72.

Ghigo E, Bellone J, Aimaretti G, Bellone S, Loche S, Cappa M, Bartolotta E, Dammacco F, Camanni F. Reliability of provocative tests to assess growth hormone secretory status. Study in 472 normally growing children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1996; **81**:3323-3327.

Giordano M, Lessi Monica, Paracchini R, Petri A, Ozerkan E, Cavallo L, Wasniewska M, Aimaretti G, Momigliano-Richiardi P, Bona G. Molecular analysis of the growth hormone gene in isolated growth hormone deficiency: possibile involvement of a promoter polymorphism. *Journal of Endocrine Genetics*, 2001; **2**:45-54.

Godefrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE. GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nature Genetics*, 1993; **4**:227-232.

Graves TK, Patel S, Dannies PS, Hinkle PM. Misfolded growth hormone causes fragmentation of the Golgi apparatus and disrupts endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic. *Journal of Cellular Science*, 2001; **114**:3685-3694.

Hamlington JD, Clough MV, Dunston JA, McIntosh I. Deletion of a branch-point consensus sequence in the LMX1B gene causes exon skipping in a family with nail patella syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*, 2000; **8**:311-314.

Hayashi Y, Kamijo T, Yamamoto M, Ohmori S, Phillips 3rd JA, Ogawa M, Igarashi Y, Seo H. A novel mutation at the donor splice site of intron 3 of the GH-1 gene in a patient with isolated growth hormone deficiency. *Growth hormone & IGF research*, 1999; **9**:434-437.

Hashimoto Y, Cisternino M, Cohen LE. A novel missense Mutation in the Pit-1 gene: evidence for a gene dosage effect. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2003; **88**:1241-1247.

Helfman DM, Ricci WM. Branch point selection in alternative splicing of tropomyosin pre-mRNAs. *Nucleic Acids Research*; 1989, **17**:5633-5650.

Hendriks-Stegeman BI, Augustijn KD, Bakker B, Holthuizen P, van der Vliet PC, Jansen M. Combined pituitary hormone deficiency caused by compound

heterozygosity for two novel mutations in the POU domain of the Pit1/POU1F1 gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001; **86**:1545-1550.

Horan M, Millar DS, Hedderich J, Lewis G, Newsway V, Mo N, Fryklund L, Procter AM, Krawczak M, Cooper DN. Human growth hormone 1 (GH1) gene expression: complex haplotype-dependent influence of polymorphic variation in the proximal promoter and locus control region. *Human Mutation*, 2003; **21**:408-423.

Ingraham HA, Flynn SE, Voss JW, Albert VR, Kapiloff MS, Wilson L, Rosenfeld MG. The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1-Pit-1 interactions. *Cell*, 1990; **61**:1021-1033.

Izenberg N, Rosenblum M, Parks JS. The endocrine spectrum of septo-optic dysplasia. *Clinical pediatrics*, 1984; **23**:623-636.

Jacobson EM, Li P, Leon-del-Rio A, Rosenfeld MG, Aggarwal AK. Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: Unexpected arrangements and flexibility. *Genes & Development*, 1997; **11**:198-212.

Japon MA, Rubinstein M, Low MJ. In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 1994; **42**:1117-1125.

Khan SG, Metin A, Gozukara E, Inui H, Shahlavi T, Muniz-Medina V, Baker CC, Ueda T, Aiken JR, Schneider TD, Kraemer KH. Two essential splice lariat branchpoint sequences in one intron in a xeroderma pigmentosum DNA repair gene: mutations result in reduced XPC mRNA levels that correlate with cancer risk. *Human molecular genetics*, 2004; **13**:343-352.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999; **96**:14378-14382.

Kuivenhoven JA, Weibusch H, Pritchard PH, Funke H, Benne R, Assmann G, Kastelein JJ. 1996 An intronic mutation in a lariat branchpoint sequence is a direct cause of an inherited human disorder (fish-eye disease). *Journal of Clinical Investigation*, 1996; **98**:358-364.

Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. *Williams Textbook of Endocrinology*. 10th Eds Saunders, Philadelphia 2003; p 260.

Laumonnier F, Ronce N, Hamel BC, Thomas P, Lespinasse J, Raynaud M, Paringaux C, Van Bokhoven H, Kalscheuer V, Fryns JP, Chelly J, Moraine C, Briault S. Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 2002; **71**:1450-1455.

Lee MS, Wajnrajch MP, Kim SS, Plotnick LP, Wang J, Gertner JM, Leibel RL, Dannies PS. Autosomal dominant growth hormone (GH) deficiency type II: the Del32–71-GH deletion mutant suppresses secretion of wild-type GH. *Endocrinology*, 2000; **141**:883–890.

Lessi M, Giordano M, Paracchini R, Petri A, Federico G, Wasniewska M, Pasquino AM, Aimaretti G, Bona G, Momigliano-Richiardi P. Molecular analysis of the Growth Hormone Releasing Hormone Receptor (GHRH-R) gene in Isolated Growth Hormone Deficiency (IGHD): identification of a likely etiological mutation in the signal peptide. *Journal of Endocrine Genetics*, 2001; **2**:215-228.

Liu Y, Fan M, Yu S, Zhou Y, Wang J, Yuan J, Qiang B. cDNA cloning, chromosomal localization and expression pattern analysis of human LIM-homeobox gene LHX4. *Brain Research*; 2002; **928**:147-155.

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.

Maghnie M, Ambrosini L, Cappa M, Pozzobon G, Ghizzone L, Ubertini MG, di Iorgi N, Tinelli C, Pilia S, Chiumello G, Lorini R, Loche S. Adult height in patients with permanent GH deficiency with and without multiple pituitary hormone deficiencies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2006; **9** doi: 10.1210/jc.

Maheshwari HG, Silverman BL, Dupuis J, Baumann G. Phenotype and genetic analysis of a syndrome caused by an inactivating mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor: Dwarfism of Sindh. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1998; **83**:4065-4074.

Mantovani, G.; Asteria, C.; Pellegrini, C.; Bosari, S.; Alberti, L.; Bondioni, S.; Peverelli, E.; Spada A, Beck-Peccoz P. HESX1 expression in human normal pituitaries and pituitary adenomas *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006; **247**:135-139.

Maslen C, Babcock D, Raghunath M, Steinmann B. A rare barnch-point muataion is associated with missplicing of fibrillin-2 in a large family with congenital contractural arachnodactyly. *American Journal of Human Genetics*, 1997; **60**:1389-1398.

Massa CG, Binder G, Oostijik 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**:272-275.

Mayo KE. Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone releasing hormone. *Molecular Endocrinology*, 1992; **6**:1734-1744.

McCarthy EMS, Phillips III JA. Characterization of an intron splice enhancer that regulates alternative splicing of human GH pre-mRNA. *Human Molecular Genetics*, 1998; **7**:1491-1496.

McGuinness L, Magoulas C, Sesay AK, Mathers K, Carmignac D, Manneville JB, Christian H, Phillips JA 3rd, Robinson IC. Autosomal dominant growth hormone deficiency disrupts secretory vesicles in vitro and in vivo in transgenic mice. *Endocrinology*, 2003; **144**:720-731.

McLennan K, Jeske Y, Cotterill A, Cowley D, Penfold J, Jones T, Howard N, Thomsett M, Choong C. Combined pituitary hormone deficiency in Australian children: clinical and genetic correlates. *Clinical Endocrinology*, 2003; **58**:785-794.

Mendonca BB, Osorio MGF, Latronico AC, Estefan V, Lo LS, Arnhold JJ. Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP1 gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1999; **84**:942-945.

Millar DS, Lewis MD, Horan M, Newsday V, Easter TE, Gregory JW, Fryklund L, Norin M, Crowne EC, Davies SJ, Edwards P, Kirk J, Waldron K, Smith PJ, Phillips JA 3rd, Scanlon MF, Krawczak M, Cooper DN, Procter AM. Novel mutations of the growth hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature. *Human Mutation*; 2003, **4**:424-440.

Miller SA, Dykes DD & Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 1988; **16**:1215.

Missarelli C, Herrera L, Mericq V, Carvallo P. Two different splice site mutations in the growth hormone gene causing autosomal dominant growth hormone deficiency. *Human Genetics*, 1997; **101**:113-117.

Miyata I, Cogan JD, Prince MA, Kamijo T, Ogawa M, Phillips JA 3rd. Detection of growth hormone gene defects by dideoxy fingerprinting (ddf). *Endocrine Journal*, 1997; **44**: 149-154.

Moseley C, Mullis P, Prince M, Phillips III J. An exon splice enhancer mutation causes autosomal dominant GH deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2002; **87**:847-852.

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

Mullis PE, Deladoey J, Dannies PS. Molecular and cellular basis of isolated dominant-negative growth hormone deficiency, IGHD type II: Insights on the secretory pathway of peptide hormones. *Hormone Research*, 2002; **58**: 53-66.

Mullis PE, Robinson IC, Salemi S, Eble A, Besson A, Vuissoz JM, Deladoey J, Simon D, Czernichow P, Binder G Isolated autosomal dominant growth hormone deficiency: an evolving pituitary deficit? A multicenter follow- up study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2005; **90**:2089–2096.

Netchine I, Talon P, Dastot F, Vitaux F, Goossens M, Amselem S. Extensive phenotypic analysis of a family with growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH- releasing hormone receptor gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1998; **83**:432-436.

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

Osorio MGF, Kopp P, Marui S, Lantronico AC, Mendoca BB, Arnhold I. Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a conserved residue (F88S) in the homeodomain of PROP1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2000; **85**:2779-2785.

Osorio MGF, Marui S, Jorge AA, Latronico AC, Lo LSS, Leite CC, estefan V, Mendonica BB, Arnhold IJP. Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2002; **87**:5076-5084.

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

Padgett RA, KonarskaMM,Aebi M, Hornig H, Weissmann C, Sharp PA. Nonconsensus branch-site sequences in the *in vitro* splicing of transcripts of mutant rabbit α -globin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985; **82**:8349–8353.

Pernasetti F, Toledo SPA, Vasilyev VV, Hayashida CY, Cogan JD, Ferrari C Lourenco DM, Mellon PL. Impaired adrenocorticotropin-adrenal axis in combined pituitary hormone deficiency caused by a two-base pair deletion (301-320delAG) in the Prophet of Pit-1 gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2000; **85**:390-397.

Phillips JA III, Hjelle BL, Seeburg PH, Zachmann M. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *Proceeding of National Academy od Sciences of United States of America*, 1981; **78**:6372-6375.

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

Phillips JA III, Rimoin DL. Genetic disorders of the pituitary gland. In: *Principle and Practice of Medical Genetics, edn 3, ch 61, pp 1331-1364. Eds Churchill Livingstone, New York: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, 1997.*

Priston, M.; Kozłowski, K.; Gill, D.; Letwin, K.; Buys, Y.; Levin, A. V.; Walter, M. A.; Heon, E. : Functional analyses of two newly identified PITX2 mutants reveal a novel molecular mechanism for Axenfeld-Rieger syndrome. *Human molecular genetics*, 2001; **10**:1631-1638.

Procter AM, Phillips JA, Cooper DN. The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Human Genetics*, 1998; **103**:255-272.

Quentien MH, Manfroid I, Moncet D et al Pitx factors are involved in basal and hormone-regulated activity of the human prolactin promoter. *The Journal of biological chemistry*, 2002; **46**:44408-44416.

Quinterio CG, Castro-Fejoè L, Loidi L, Barreiro J, Redondo C, Gonzales-Leston D, Estrada RC, Farina P. En analisis de la secuencia del gen GH1 demuestra una elevada variabilidad. Poster in *XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Espanola de Endocrinologia Pediatrica (II), Oviede, 5-6 de mayo de 2005. In An Pediatr (Barc)*, 2006; **64**:190-219.

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.

Rainbow LA, Rees SA, Shaikh MG, Shaw NJ, Cole T, Barrett TG, Kirk JM. Mutation analysis of POUF-1, PROP-1 and HESX-1 show low frequency of mutations in children with sporadic forms of combined pituitary hormone deficiency and septo-optic dysplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2005; **62**:163-8.

Reynaud R, Barlier A, Vallette-Kasic S, Saveanu A, Guillet MP, Simonin G, Enjalbert A, Valensi P, Brue T. An uncommon phenotype with familial central hypogonadism caused by a novel PROP1 gene mutant truncated in the transactivation domain. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2005; **90**:4880-4887.

Reynaud R, Gueydan M, Saveanu A, Vallette-Kasic S, Enjalbert A, Brue T, Barlier A. Genetic screening of combined pituitary hormone deficiency: experience in 195 patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2006; **30**, doi:10.1210/jc.2005-2173

Riepe FG, Partsch CJ, Blankenstein O, Monig H, Pfaffle RW, Sippel WG. Longitudinal imaging reveals pituitary enlargement preceding hypoplasia in two

brothers with combined pituitary attributable to Prop-1 mutations. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001; **86**:4353-4357.

Rivarola MA, Phillips JA III, Migeon CJ, Heinrich JJ, Hjelle BJ. Phenotypic heterogeneity in familial isolated growth hormone deficiency type IA. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1984; **59**:34-40.

Roosenbloom AL, Almonte AS, Brown MR, Baumbach L, Parks JS. Clinical and biochemical phenotype of familial anterior pituitaryism from mutation of the PROP1 gene *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1999; **84**:50-57.

Ross AJ, Ruiz-Perez V, Wang Y, Hagan DM, Scherer S, Lynch SA, Lindsay S, Custard E, Belloni E, Wilson DI. A homeobox gene HLXB9, is the major locus for dominantly inherited sacral agenesis. *Nature Genetics*, 1998; **20**:358-361

Ryther RC, McGuinness LM, Phillips JA 3rd, Moseley CT, Magoulas CB, Robinson IC, Patton JG. Disruption of exon definition produces a dominant-negative growth hormone isoform that causes somatotroph death and IGHD II. *Human Genetics*, 2003; **113**:140-148.

Ryther RC, Flynt AS, Harris BD, Phillips JA 3rd, Patton JG. GH1 splicing is regulated by multiple enhancers whose mutation produces a dominant-negative GH isoform that can be degraded by allele-specific siRNA. *Endocrinology*, 2004; **145**:2988-2996.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning (a laboratory manual) 2nd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.

Salemi S, Besson A, Eblè A, Gallati S, Pfaffle RW, Mullis PE. New N-terminal locator (Q4ter) within the POUF1-gene (PIT-1) causes recessive combined pituitary hormone deficiency and variable phenotype. *Growth Hormone and IGF Research*, 2003; **13**:264-268.

Salvatori R, Fan X, Phillips JA 3rd, Espigares-Martin R, Martin De Lara I, Freeman KL, Plotnick L, Al-Ashwal A, Levine MA. Three new mutations in the gene for the growth hormone (GH)-releasing hormone receptor in familial isolated GH deficiency type IB. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001; **86**:273-279.

Schwartz AL, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human disease. *Annual Review of Medicine*, 1999; **50**:57-74.

Scully KM, Rosenfeld MG Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science*, 2002; **295**:2231-2235.

Semina, E. V.; Reiter, R.; Leysens, N. J.; Alward, W. L. M.; Small, K. W.; Datson, N. A.; Siegel-Bartelt, J.; Bierke-Nelson, D.; Bitoun, P.; Zabel, B. U.; Carey, J. C.;

Murray, J. C. : Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nature Genetics*, 1996; **14**:392-399.

Shalet SM, Toogood A, Rahim A, Brennan BMD. The diagnosis of growth hormone deficiency in children and adults. *Endocrine reviews*, 1998; **19**:203-223.

Sharma K, Sheng HZ, Lettieri K, Li H, Karavanov A, Potter S, Westphal H, Pfaff SL. LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell*, 1998, **95**:817-828.

Shawlot W, Behringer RR. Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature*, 1995; **30**:425-30.

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 Development*, 1990; **4**:695-711.

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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2000; **85**:2701-2708.

Smith CW, Porro EB, Patton JG, Nadal-Ginard B. Scanning from an independently specified branch point defines the 3' splice site of mammalian introns. *Nature*, 1989; **342**: 243-247.

Sobrier ML, Netchine I, Heinrichs C, Thibaud N, Vie-Luton MP, Van Vliet G, Amselem S. Alu-element insertion in the homeodomain of HESX1 and aplasia of the anterior pituitary. *Human Mutations*, 2005; **25**:503.

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.

Sung-Su K, Youngo K, Young-Lim S, Gu-Hwan K, Tae-Ue K, Han-Wook Y. Clinical characteristics and molecular analysis of PIT1, PROP1, LHX3, and HESX1 in combined pituitary hormone deficiency patients with abnormal pituitary MR imaging. *Hormone Research*, 2003; **60**:277-83.

Swaroop A, Wang QI, Wu W, Cook J, Coats C, Xu S, Chen S, Zack DJ, Sieving PA. Leber congenital amaurosis caused by a homozygous mutation (R90W) in the homeodomain of the retinal transcription factor CRX: direct evidence for the

involvement of CRX in the development of photoreceptor function. *Human Molecular Genetics*, 1999; **8**:299-305.

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. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2003; **88**:45-50.

Takahashi I, Takahashi T, Komatsu M, Sato T, Takada G. An exonic mutation of the GH-1 gene causing familial isolated growth hormone deficiency type II. *Clinical Genetics*, 2002; **61**:222-225.

Tannini, M., Avantaggiato, V., Biffali, E., Arnone, M.I., Sato, K., Pischetola, M., Taylor, B.A., Phillips, S.J., Simeone, A., Di Lauro, R. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *The EMBO journal*, 1997; **11**: 3185–3197.

Tatsumi KI, Kikuchi K, Tsumura K, Amino N. A novel PROP1 gene mutation (157delA) in Japanese siblings with combined anterior pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004; **61**:635-640.

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.

Tremblay JJ, Lanctot C, Drouin J The pan-pituitary activator of transcription, Ptx1 (pituitary homeobox 1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Molecular Endocrinology*, 1998; **12**:428-441.

Valette-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 high incidence of corticotroph deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001; **86**:4529-4535.

Vimpani GV, Vimpani AF, Lidgard GP, Cameron EHD, Farquhar JW Prevalence of severe growth hormone deficiency. *British Medical Journal*, 1977; **2**:427-430.

Vivenza D, Guazzarotti L, Godi M, Frasca D, di Natale B, Momigliano-Richiardi P, Bona G, Giordano M. A novel deletion in the *GHI* gene including the IVS3 branch site responsible for autosomal dominant isolated growth hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006; **3**:980-986.

Voutetakis A, Maniati-Christidi M, Kanaka-Gantenbein C, Dracopoulou M, Argyropoulou M, Livadas S, Dacou-Voutetakis C, Sertedaki A. Prolonged jaundice and hypothyroidism as the presenting symptoms in a neonate with a novel Prop1 gene mutation (Q83X). *European Journal of Endocrinology*, 2004; **150**:257-64.

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Human Mutations*, 2001; **17**:439-74.

Wagner JK, Eble A, Hindmarsh PC, Mullis PE. Prevalence of human GH-1 gene alterations in patients with isolated growth hormone deficiency. *Pediatric Research*, 1998; **43**:105-110.

Wajnrajch MP, Gertner JM, Harbison MD, Chua SC jr, Leibel RL. Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nature Genetics*, 1996; **12**:88-90.

Wales JKH, Quarrell OWJ. Evidence for possible mendelian inheritance of setto-optic dysplasia. *Acta Paediatrica*, 1996; **85**:391-392.

Watkins-Chow DE, Cmpfer SA. How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? *Trends in genetics*, 1998; **4**:284-289.

Woods KS, Cundall M, Turton J, Rizotti K, Mehta A, Palmer R, Wong J, Chong WK, Al-Zyoud M, El-Ali M, Otonkoski T, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Robinson IC, Lovell-Badge R, Woodward KJ, Dattani MT. Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *American Journal of Human Genetics*, 2005; **76**:833-849.

Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA 3rd, Rosenfeld MG. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nature Genetics*, 1998; **18**:147-149.

Zhu X, Chung I, O'Gorman MR, Scholl PR. Coexpression of normal and mutated CD40 ligand with deletion of a putative RNA lariat branchpoint sequence in X-linked hyper-IgM syndrome. *Clinical immunology*, 2001; **99**:334-339.

9.PUBBLICAZIONI

Introduzione alle pubblicazioni su ghrelin

In qualità di Dottoranda in Medicina Molecolare, la mia attività di ricerca e di laboratorio è stata rivolta anche ad altri aspetti endocrinologici dell'uomo, riguardanti il metabolismo energetico.

In particolare ho svolto studi su *ghrelin*.

Ghrelin, la cui denominazione deriva dal prefisso “*ghre*” che costituisce la radice Proto-Indo-Europea del termine “*growth*”, e dal suffisso “*relin*”, tipico delle sostanze ad attività secretagoga, è un peptide acilato di 28 aminoacidi (Kojima *et al.* 1999) in grado di stimolare la secrezione di GH mediante il legame con il suo recettore GHS1a associato ad una *G-protein*. L'effetto dei secretagoghi (GHSs) causa la depolarizzazione della membrana plasmatica e l'inibizione dei canali del potassio, inducendo un aumento temporaneo della concentrazione intracellulare di calcio rilasciato dal reticolo endoplasmatico, di inositol trifosfato e dell'attività delle protein chinasi-C (Howard *et al.* 1996). *Ghrelin* è stata individuata monitorando le variazioni dei secondi messaggeri dopo stimolazione di cellule esprimenti recettori dei secretagoghi (GHS-R) con estratti tissutali murini di cervello, polmone, cuore, rene, stomaco ed intestino. Da questi studi si è dimostrato che il tessuto gastrico (in particolare le cellule oxintiche del fondo) è la maggior fonte di produzione dell'ormone. La sua attività secretoria è determinata da una modificazione post-trascrizionale della serina al terzo codone, che risulta esterificata con un gruppo octanoilico.

La ghrelina non acilata rappresenta la forma più abbondante in circolo, è biologicamente attiva, si lega a differenti sottotipi di recettori GHS ed ha effetti metabolici, cardiovascolari ed anti-neoplastici (Cassoni *et al.*, 2001).

Esiste poi un terzo ligando attivo ed acilato del recettore GHS1a, la *Des-Gln14-ghrelin*, che deriva da uno *splicing* alternativo del gene con perdita di un residuo di glutamina in posizione 14 (Hosoda *et al.*, 2000).

La caratterizzazione del precursore di *ghrelin*, *prepro-ghrelin* (preprohormone), prima nel ratto e poi nell'uomo, ha dimostrato l'alta conservabilità della sua struttura con un'omologia dell'82,9%.

Prepro-ghrelin è costituita da 117 amminoacidi i cui primi 23 presentano all'N-terminale le caratteristiche del peptide segnale. Dalla posizione Gly24 inizia la sequenza di *ghrelin* che termina al residuo 51 con l'arginina, sito in cui agiscono le endoproteasi per la scissione proteolitica dei 66 residui aminoacidici al C-terminale, e conseguente liberazione del prodotto maturo.

Nell'uomo il peptide maturo (forma acilata + de-acilata) circola a livello ematico ad elevate concentrazioni (117.2 ± 37.2 fmol/ml) (Kojima *et al.*, 1999) ed esercita funzioni di tipo endocrino e non endocrino, legandosi ai recettori per i secretagoghi del GH distribuiti ampiamente a livello ipotalamico, cardiaco, polmonare, pancreatico, intestinale e del tessuto adiposo (Date *et al.*, 2000).

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che *ghrelin* è un potente secretagogo del GH mediante un meccanismo diverso da quello del GH-releasing Hormone (GHRH), e che tale azione è dose dipendente (Peino *et al.*, 2000).

A livello centrale, l'azione di *ghrelin* non è però ristretta alla stimolazione delle cellule somatotrope ipofisarie ma anche a livello del nucleo arcuato ipotalamico, formato da una sotto-popolazione di neuroni coesprimenti due neuropeptidi oressizzanti coinvolti nelle risposte energetiche: l'*agouti-related protein* (AGRP) e il neuropeptide Y (NPY). Inoltre, mediante l'espressione di *c-fos*, utilizzato come tracciante dell'attività cellulare neuronale, si è dimostrata l'azione di *ghrelin* anche a livello dei nuclei arcuato, paraventricolare, dorsomediale e laterale dell'ipotalamo, e in due regioni del tronco encefalico, il nucleo del tratto solitario e l'area postrema. (Lawrence *et al.*, 2002). Quindi *ghrelin* è coinvolta attivamente nella regolazione del bilancio energetico, in quanto i nuclei ipotalamici rappresentano i modulatori del messaggio metabolico e quelli del tronco encefalico rispondono agli stimoli colinergici del vago (Date *et al.*, 2001). *Ghrelin* influenzerebbe positivamente il bilancio energetico aumentando i processi anabolici, da un lato stimolando l'assunzione di cibo e dall'altro riducendo il consumo lipidico con meccanismi indipendenti dal GH (Wren *et al.*, 2000).

Al contrario, la somministrazione di leptina (peptide prodotto e rilasciato dal tessuto adiposo) per via periferica o centrale, riduce l'appetito e la deposizione di tessuto adiposo stimolando i processi catabolici (Friedman *et al.*, 1998, Kalra *et al.*, 1999). Questi effetti antagonisti di leptina e ghrelin sul bilancio energetico sono mediati principalmente da NPY ed AGRP prodotti da neuroni che, a loro volta, presentano sia i recettori per *ghrelin* (GHS-R) sia i recettori per la leptina (Ob-R) (Traebert *et*

al., 2002). Ciò suggerisce che leptina e ghrelina possano agire come segnali periferici complementari in un comune sistema di regolazione del bilancio energetico (Tschop *et al.* 2000, Nakazato *et al.* 2001, Shintani *et al.*, 2001).

Nei ratti l'espressione dell'mRNA e la concentrazione plasmatica di *ghrelin* aumentano dopo un periodo di digiuno prolungato (48h) e ritornano a livelli basali dopo il pasto (Toshinai *et al.*, 2001). Diversi studi effettuati nell'uomo hanno riportato che l'infusione di *ghrelin* esogena stimola l'appetito e l'assunzione di cibo e che i suoi valori plasmatici, come per l'animale, aumentano dopo il digiuno notturno e si riducono dopo il pasto (Cummings *et al.*, 2001)

Inoltre, l'osservazione che nei roditori la ghrelina esogena stimola la deposizione di tessuto adiposo ha suggerito un suo possibile coinvolgimento nella patogenesi dell'obesità umana. Questa ipotesi, tuttavia, risulta in disaccordo con gli studi di Tschöp in cui si è osservato che i soggetti obesi presentano livelli di ghrelina ridotti rispetto ai soggetti normopeso. La concentrazione di *ghrelin* a digiuno, infatti, è correlata inversamente con la percentuale di grassi corporei e con i valori di leptina e di insulina. Si è quindi ipotizzato che la riduzione dei valori di *ghrelin* osservati nei soggetti obesi possa essere la conseguenza di un adattamento fisiologico al bilancio energetico positivo che è associato all'obesità (Tschop *et al.*, 2001, Bellone *et al.*, 2002). Al contrario, in condizioni di bilancio energetico negativo, come in caso di cachessia e di anoressia nervosa, si osserva un importante aumento dei valori di *ghrelin* che ritornano normali dopo un parziale recupero di peso (Otto *et al.*, 2001; Nagaya *et al.*, 2001).

La caratterizzazione del gene *ghrelin*, che nell'uomo mappa al locus 3p26-p25, ha reso possibile l'analisi genetica.

Si era ipotizzato che eventuali mutazioni nella regione codificante del gene, formato da 4 esoni codificanti, avrebbero potuto tradursi in una proteina difettosa o inattiva e di conseguenza alterare la secrezione del GH ed il bilancio energetico.

La letteratura riporta alcuni studi diretti all'analisi molecolare del gene in soggetti obesi e sovrappeso. Ukkola e coll. per primi hanno individuato due variazioni nella sequenza del prodotto maturo (Arg51Gln) e della prepro-ghrelina (Leu72Met) valutando una coorte di 96 soggetti femminili adulti obesi e la rispettiva e sovrapponibile controparte di 96 soggetti normopeso (Ukkola *et al.*, 2001). Successivamente il lavoro di Hinney e coll. ha confermato le precedenti variazioni con l'aggiunta di un nuovo polimorfismo (Gln90Leu) individuato nel

preprohormone, estendendo il suo studio a soggetti obesi in età pediatrica, in adolescenti e in soggetti sottopeso (Hinney *et al.*, 2002). In ultimo, un grande studio multicentrico con afferenze scandinave, canadesi e statunitensi, ha valutato se i polimorfismi Arg51Gln e Leu72Met potessero avere ruolo sul fenotipo di 3004 soggetti selezionati tra normopeso e obesi (Ukkola *et al.*, 2002)

Raccogliendo i dati degli studi molecolari finora pubblicati, si constata che il polimorfismo Arg51Gln, che mostra frequenze alleliche del tutto sovrapponibili tra soggetti obesi e normopeso, è meno prevalente rispetto a Leu72Met e Gln90Leu, riscontrati nel prodotto immaturo. E' interessante notare che la sostituzione dell'arginina con la glutamina avviene a livello del sito di clivaggio proteolitico di *prepro-ghrelin*, abolendo il riconoscimento da parte delle endoproteasi e quindi della produzione dell'ormone maturo. Studi preliminari hanno messo in evidenza che la concentrazione plasmatica di *ghrelin* è inferiore nei soggetti aventi la variazione Arg51Gln rispetto ai soggetti che mantengono intatto il sito proteolitico di clivaggio. Questa variazione, tuttavia, non sembra essere associata ad effetti fenotipici legati all'obesità. Per quanto riguarda il polimorfismo Gln90Leu, riscontrabile con frequenze alleliche del tutto paragonabili tra soggetti obesi e soggetti normopeso, non si notano associazioni con l'obesità.

Più interessante, invece, si è rivelato il polimorfismo Leu72Met che nel precedente studio di Ukkola e coll. era stato correlato con una insorgenza precoce dell'obesità.

La variazione Leu72Met mostra frequenze alleliche del tutto paragonabili tra i soggetti obesi e quelli normopeso. L'effetto sul fenotipo, però, mostra delle differenze. Sembra che i soggetti con sostituzione della leucina a metionina in posizione 72 del prepro-hormone, abbiano valori più bassi di BMI (Body Mass Index: peso in kg/ statura in m²), FM (Fat Mass, massa grassa), RQ (Quoziente respiratorio), trigliceridi circolanti ed insulina rispetto ai soggetti omozigoti per la posizione Leu72. Mentre i valori di IGF-1 risultano aumentati nei portatori di Met72, rispetto a quelli Leu72. Tutto ciò merita una discussione. Sebbene la variazione Leu72Met si trovi nel prodotto immaturo della ghreline, potrebbe, tuttavia, provocare instabilità a livello del trascritto primario e modificare l'attività dell'ormone o cambiarne il processo secretorio. Non si conoscono ancora i meccanismi attraverso cui la preproghreline produce l'ormone maturo, e se questo sia l'unico ottenuto. Si potrebbe pensare che *preproghrelin* subisca una trasformazione a livello gastrico simile a quella che si verifica a livello encefalico per la pro-opiomelanocortina,

dando prodotti diversi a seconda dello stimolo ricevuto. La variazione Leu72Met potrebbe, in teoria, cambiare la struttura di uno o più di questi prodotti che, a loro volta, potrebbero legarsi con diversi recettori dei GHS e dare differenti effetti funzionali.

Tuttavia, fino ad ora non esistono variazioni alleliche associate al metabolismo energetico.

Bibliografia all'introduzione su ghrelin

Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Castellino N, Petri A, Bellone J, Me E, Broglio F, Prodham F, Ghigo E, Bona G. Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2002; **25**:RC13-5.

Cassoni P, Papotti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissman T, Ghigo E, Muccioli G. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001; **86**: 1738-1745

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. □ A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 2001; **50**:1714-1719.

Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 2000; **11**: 4255-4261.

Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochemical and biophysical research communications*, 2001; **280**: 904-907.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 1998; **395**: 763-770.

Hinney A, Hoch A, Geller F, Schäfer H, Sigfried W, Goldschmidt H, remschmidt H, Hebebrand J. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2002; **87**:2716-2719.

Hosoda H, Kojima M, Matsu H, Kangawa K. Purification and characterization of Rat des-Gln¹⁴-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; **275**: 21995-22000.

Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CL, hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby m, Sirinathsinhji DJS, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Scaeffler JM, Smith RG, Van der Ploeg LHT. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 1996; **273**:974-977.

Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Review*, 1999; **20**:68-100.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999; **402**:656-660.

Lawrence CB, Snape AC, Baudin FMB, Luckman SM. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite center. *Endocrinology*, 2002; **1**:155-162.

Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H, Hosoda H, Shimizu W, Yamagishi M, Oya H, Koh H, Yutani C, Kangawa K. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation*, 2001; **104**:2034-2038.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 2001; **409**:194-198.

Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschop M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology*, 2001; **145**:669-673.

Peino R, Baldelli R, Rodriguez-Garcia J, Rodriguez-Segade S, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF. Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *European Journal of Endocrinology*, 2000; **6**: R11-4.0

Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*, 2001; **50**:227-232.

Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting,

insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochemical and biophysical research communications*, 2001; **281**:1220-1225.

Traebert M, Riediger T, Whitebread S, Scharrer E, Schmid HA. ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. *Journal of neuroendocrinology*, 2002; **14**:580-586.

Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induced adiposity in rodents. *Nature*, 2000; **407**:908-913

Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 2001; **50**:707-709.

Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Snyder EE, Chagnon M, Sjöström L, Bouchard C. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in human. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001; **86**:3996-3999.

Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Perusse L, Rankien T, Tshöp M, Heiman ML, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Sjöström L, Bouchard C. Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obesity Research*, 2002; **10**:782-791.

Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 2000; **141**:4325-4328.

10. Elenco pubblicazioni del Dottorato di Ricerca

- 1: Arrigo T, Wasniewska M, De Luca F, Valenzise M, Lombardo F, Vivenza D, Vaccaro T, Coradi E, Biason-Lauber A. Congenital adenoypophysis aplasia: clinical features and analysis of the transcriptional factors for embryonic pituitary development. *J Endocrinol Invest*. 2006 Mar;29(3):208-213.
- 2: Bellone S, Baldelli R, Radetti G, Rapa A, Vivenza D, Petri A, Savastio S, Zaffaroni M, Broglio F, Ghigo E, Bona G. Ghrelin secretion in preterm neonates progressively increases and is refractory to the inhibitory effect of food intake. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 May;91(5):1929-1933. Epub 2006 Mar 7.
- 3: Baldelli R, Bellone S, Castellino N, Petri A, Rapa A, Vivenza D, Bellone J, Broglio F, Ghigo E, Bona G. Oral glucose load inhibits circulating ghrelin levels to the same extent in normal and obese children. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Mar;64(3):255-259.
- 4: Vivenza D, Guazzarotti L, Godi M, Frasca D, di Natale B, Momigliano-Richiardi P, Bona G, Giordano M. A novel deletion in the GH1 gene including the IVS3 branch site responsible for autosomal dominant isolated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Mar;91(3):980-986. Epub 2005 Dec 20.
- 5: Broglio F, Gottero C, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, Me E, Riganti F, Vivenza D, Rapa A, Martina V, Arvat E, Bona G, van der Lely AJ, Ghigo E. Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycaemia but unaffected by glucagon and arginine in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004 Oct;61(4):503-509.
- 6: 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):127-133.
- 7: 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):613-617.
- 8: 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):1662-1665.
- 9: Gottero C, Bellone S, Rapa A, van Koetsveld P, Vivenza D, Prodam 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):1203-1207.
- 10: Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Vercellotti A, Petri A, Radetti G, Bellone J, Broglio F, Ghigo E, Bona G. Circulating ghrelin levels in newborns are not associated to gender, body weight and hormonal parameters but depend on the type of delivery. *J Endocrinol Invest*. 2003 Apr;26(4):RC9-11.

11: Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Castellino N, Petri A, Bellone J, Me E, Broglio F, Prodam F, Ghigo E, Bona G. Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *J Endocrinol Invest.* 2002 May;25(5):RC13-5.

RAPID COMMUNICATION

Circulating ghrelin levels in newborns are not associated to gender, body weight and hormonal parameters but depend on the type of delivery

S. Bellone*, A. Rapa*, D. Vivenza*, A. Vercellotti*, A. Petri*, G. Radetti**, J. Bellone***, F. Broglio****, E. Ghigo****, and G. Bona*

*Unit of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, **Department of Pediatrics, Regional Hospital, Bolzano, ***Division of Pediatric Endocrinology, Regina Margherita Children Hospital, ****Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Turin, Turin, Italy

ABSTRACT. Ghrelin, a new gastric-derived hormone, probably plays a major role in managing energy balance and the neuroendocrine response to starvation. Information about the age-related variation in ghrelin secretion is scanty. We measured circulating ghrelin levels in 93 full term newborns adequate for gestational age, in 39 normal children and in 19 lean healthy adults. Our findings demonstrate that ghrelin levels are independent of age and gender from birth to adulthood. Interestingly, ghrelin secretion at birth is not associated to body weight and hormonal parameters such as GH, insulin and leptin levels. On the other hand, ghrelin levels seem dependent on the type of delivery, being lower in newborns after caesarean section with respect to those after normal delivery.

(J. Endocrinol. Invest. 26: RC9-RC11, 2003)

©2003, Editrice Kurtis

INTRODUCTION

Ghrelin, the endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) (1), exerts potent GH-releasing activity and also possesses other neuroendocrine and non-endocrine activities reflecting central and peripheral GHS-R distribution (2). Ghrelin stimulates food intake, plays a major role in managing the energy balance (2, 3) and the neuroendocrine response to starvation. Circulating ghrelin levels are increased by fasting, decreased by food intake, glucose and insulin (2, 3). In accordance with the major influence of nutrition on ghrelin secretion, circulating ghrelin levels are increased in anorexia and cachexia, reduced in obesity and restored by weight recovery (2, 3). Interestingly, recent data show a functional link between leptin, an adipocytic hormone positively correlated with adiposity, ghrelin and insulin in regulating energy balance and food intake (3).

Newborns are connoted by peculiar metabolic balance and GH hypersecretion associated to low IGF-I levels reflecting peripheral GH resistance (4); this functional profile of the

GH/IGF-I axis as well as other neuroendocrine functions at birth is reminiscent of what is generally observed in clinical conditions connoted by anorexia and/or malnutrition. Taking into account the supposed role of ghrelin in managing the neuroendocrine and metabolic response to nutritional impairment, it has been surprisingly reported that ghrelin levels in male newborns are negatively associated to GH and positively to leptin levels (5). Based on the foregoing we aimed at throwing light on the relationships linking ghrelin secretion to gender, body weight, hormonal and metabolic parameters at birth.

SUBJECTS AND METHODS

We studied 93 full-term newborns appropriate for gestational age. Ghrelin, GH, IGF-I, insulin, glucose and leptin levels were measured in cord blood (Table 1). Ghrelin levels were also measured in their mothers immediately after delivery, and in 39 normal-weighted children and in 19 lean healthy adults as comparison (Table 1).

Human ghrelin (pg/ml) was assayed, after extraction in reverse phase C18 columns, by a radioimmunoassay (RIA) (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont CA) using ¹²⁵I-labeled bioactive ghrelin as a tracer and a rabbit polyclonal antibody vs octanoylated and des-octanoylated h-ghrelin. Sensitivity: 30 pg/tube, intra-assay coefficient of variation (CV) range: 0.3-10.7%.

Key-words: ghrelin, newborns, gender, body weight, delivery.

Correspondence: Gianni Bona, MD, Clinica Pediatrica dell'Università, Ospedale Maggiore della Carità, Corso Mazzini 18, 28100 Novara, Italy.

E-mail: gianni.bona@maggioreosp.novara.it

Table 1- Clinical characteristics (mean±SD) and hormonal parameters (median, 25th-75th centile) of subjects.

	Newborns	Children	Adults
Males/females	54/39	18/21	10/9
Gestational age (weeks)	38.9±1.2		
Age (years)		9.0±3.2	28.5±3.4
By natural/caesarean delivery	44/49		
Body weight (kg)	3.29±0.39	32.4±11.0	68.9±7.7
GH (ng/ml)	15.2; 9.9-21.1		1.2; 0.1-2.2
IGF-I (ng/ml)	66.2; 46.6-96.0	238.5; 164.8-327.0	207.0; 153.0-209.0
Leptin (ng/ml)	6.0; 3.6-9.2	12.9; 5.0-24.9	5.3; 3.6-8.1
Insulin (mIU/ml)	6.6; 5.1-8.7	7.6; 5.3-10.5	12.7; 11.0-15.2
Glucose (mg/dl)	72.5; 60.0-95.0	75.5; 70.5-84.0	71.0; 63.0-84.0

Leptin was measured in duplicate by RIA using a commercially available kit (Linco Research Inc., St Charles, MO). Sensitivity: 0.5 ng/ml, intra- and interassay coefficients of variation: 3.4-8.3% and 3.0-6.2% respectively. GH, IGF-I, insulin were assayed as previously described (6). The study protocol had been approved by the Ethical Committee and informed consent had been obtained by all the adult subjects and either newborns' or infants' parents. Data are expressed as median and 25th-75th centiles. The statistical analysis was performed using Mann Whitney U test and Spearman correlation test as appropriate.

RESULTS

Ghrelin levels in cord blood [(median; 25th-75th centile) 339.0; 229.0-438.0 pg/ml] were similar to those found in normal children (328.0; 202.0-570.0 pg/ml) as well as to those in adults (338.0; 250.0-502.0 pg/ml) (Fig. 1), despite the highest GH levels being found in newborns. In newborns as well as in children and in adults, ghrelin levels were similar in both sexes.

Ghrelin levels in neonates born by natural delivery were surprisingly higher ($p<0.03$) than in those born by caesarean section (380.0; 300.0-445.0 pg/ml vs 310.0; 202.0-393 pg/ml) (Fig. 1). Interestingly, ghrelin levels in maternal blood at the delivery (127.0; 86.0-171.0 pg/ml) were lower ($p<0.0001$) than those in newborns independently of the way of delivery; despite this, ghrelin levels in newborns were positively associated to maternal ghrelin concentrations (Spearman $r=0.37$, $p<0.002$).

In newborns no association was found between ghrelin levels and birth weight and length as well as IGF-I, GH, insulin and leptin levels. In children ghrelin levels were negatively associated to IGF-I ($r=-0.5$, $p=0.009$) and leptin ($r=-0.4$, $p=0.02$) levels, while no association was found to anthropometrical parameters.

DISCUSSION

The results of the present study demonstrate that ghrelin secretion does not undergo relevant age- and gender-related variations. Particularly, newborns show ghrelin levels

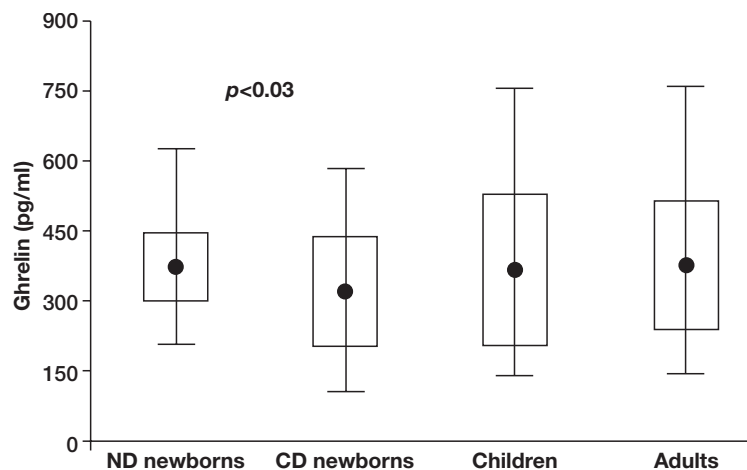


Fig. 1- Distribution of ghrelin levels in newborns born by natural delivery (ND), caesarean delivery (CD), children and adults. Points are median, boxes are interquartile range, and whiskers are 10th-90th percentile values.

similar to children and adults; this age-related independency of ghrelin levels is at variance with the age-related variations in GH levels that are higher at birth. Peculiarly, ghrelin secretion at birth, at least in full term appropriate for gestational age newborns, is independent of body weight as well as length and IGF-I, GH, insulin and leptin levels. Lack of age- and gender-related variations in ghrelin levels have already been reported in a previous study measuring ghrelin secretion in children and adults (6) and is confirmed by the present study in a larger cohort of normal children and adults. This is particularly relevant because newborns are connoted by GH hypersecretion associated with low IGF-I levels reflecting peripheral GH resistance (4). Notably, the present findings bespeak against the possibility that GH hypersecretion at birth is driven by ghrelin whose levels, on the contrary, are not associated to GH levels. We have also found that ghrelin secretion at birth, at least in full term appropriate for gestational age newborns, is independent of body weight as well as length and other hormonal levels including IGF-I, insulin and leptin secretion. On one hand, the lack of any association between ghrelin and IGF-I levels agrees with the hypothesis that ghrelin does not play a major role in regulating the GH/IGF-I axis. In fact, in rats, ghrelin secretion has been reported to be pulsatile and directly related to feeding behaviour but not to GH secretion (7) and, moreover, circulating ghrelin levels have been reported not to be altered in conditions of acromegaly or GH deficiency by some (8) but not by other Authors (9). On the other hand, the lack of any correlation between ghrelin levels and metabolic parameters as well as with body weight and length suggests that this new gastric hormone does not play at birth the same metabolic roles as in adulthood when clear association with body mass index, nutrients intake and insulin secretion is clearly apparent (3). Unexpectedly, we have also found that neonates born after caesarean section show lower ghrelin levels than those born by spontaneous delivery. The explanation of this finding is unclear. Interestingly, it has already been shown that fetuses delivered vaginally show a higher activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis than fetuses delivered by caesarean section, as expression of the different intrauterine stress (10). Notably ghrelin has been reported able to stimulate the HPA axis likely acting at the hypothalamic level and also to induce angiogenesis in different animal models (2, 11). However, although tempting, the hypothesis of a relation between ghrelin levels and the different degrees of stress and of HPA axis activity in these two ways of delivery cannot be supported by present data and needs further investigation. Finally, evidence that circulating ghrelin levels in mothers are significantly lower than those in newborns supports the evidence of a fetoplacental-derived ghrelin production. In fact, ghrelin has been detected both in rat and human placenta showing a pregnancy-related time course of expression (12). Specifically, in humans, ghrelin is mainly expressed in the first half of pregnancy but almost undetectable at term (12). Therefore, present results showing that ghrelin levels from cord blood at term are higher than those in the maternal blood might suggest a fetal ghrelin production. In

agreement with this hypothesis it has already been reported that in human foetuses ghrelin is expressed both in the stomach and, even more, at the pancreatic level (13). In conclusion, the results of the present study demonstrate that ghrelin secretion does not undergo relevant age- and gender-related variations. Notably, this secretory pattern differs from that of GH, further supporting the hypothesis that ghrelin does not play a major role in the physiological control of GH secretion. Accordingly, ghrelin levels in full term appropriate for gestational age newborns do not correlate with IGF-I but also with body weight, length and insulin and leptin levels.

REFERENCES

1. Kojima M., Hosoda H., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001, 12: 118-122.
2. Muccioli G., Tschoep M., Papotti M., Deghenghi R., Heiman M., Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur. J. Pharmacol.* 2002, 440: 235-254.
3. Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001, 2: 551-560.
4. Gluckman P.D. The endocrine regulation of fetal growth in late gestation. The role of insulin-like growth factors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995, 80: 1047-1050.
5. Chanoine J.P., Yeung L.P., Wong A.C., Birmingham C.L. Immunoreactive ghrelin in human cord blood: relation to anthropometry, leptin, and growth hormone. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2002, 35: 282-286.
6. Bellone S., Rapa A., Vivenza D., et al. Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *J. Endocrinol. Invest.* 2002, 25: RC13-RC15.
7. Tolle V., Bassant M.H., Zizzari P., et al. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 2002, 143: 1353-1361.
8. Janssen J.A., van der Toorn F.M., Hofland L.J., et al. Systemic ghrelin levels in subjects with growth hormone deficiency are not modified by one year of growth hormone replacement therapy. *Eur. J. Endocrinol.* 2001, 145: 711-716.
9. Cappiello V., Ronchi C., Morpurgo P.S., et al. Circulating ghrelin levels in basal conditions and during glucose tolerance test in acromegalic patients. *Eur. J. Endocrinol.* 2002, 147: 189-194.
10. Ramin S.M., Porter J.C., Gilstrap L.C. 3rd, Rosenfeld C.R. Stress hormones and acid-base status of human fetuses at delivery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991, 73: 182-186.
11. Asakawa A., Inui A., Kaga T., et al. A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* 2001, 74: 143-147.
12. Gualillo O., Caminos J., Blanco M., et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001, 142: 788-794.
13. Wierup N., Svensson H., Mulder H., Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul. Pept.* 2002, 15: 107: 63-69.

Ghrelin Secretion in Childhood Is Refractory to the Inhibitory Effect of Feeding

SIMONETTA BELLONE, NADIA CASTELLINO, FABIO BROGLIO, ANNA RAPA, DANIELA VIVENZA, GIORGIO RADETTI, JAELE BELLONE, CRISTINA GOTTERO, EZIO GHIGO, AND GIANNI BONA

Units of Pediatrics (S.B., N.C., A.R., D.V., G.B.), Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, 28100 Novara, Italy; Division of Endocrinology (F.B.), Department of Internal Medicine, Erasmus University of Rotterdam, 3000 DR Rotterdam, The Netherlands; Division of Endocrinology (F.B., C.G., E.G.), Department of Internal Medicine, University of Turin, 10126 Turin, Italy; Department of Paediatrics (G.R.), Regional Hospital, 39100 Bolzano, Italy; and Division of Pediatric Endocrinology (J.B.), Regina Margherita Children's Hospital, 10100 Turin, Italy

Ghrelin, a natural GH secretagogue, is predominantly produced by the stomach. Ghrelin has other actions including orexant activity, modulation of energy balance, and modulation of endocrine and nonendocrine functions. Ghrelin secretion is increased by fasting and energy restriction but decreased by food intake, glucose, insulin, and somatostatin. Ghrelin secretion does not seem to be a function of age; in fact, morning ghrelin levels after overnight fasting in prepubertal and pubertal children are similar to those in young adults. To clarify whether children and adults have the same sensitivity to the inhibitory effect of food intake, we studied the ghrelin response to a standardized light breakfast (SLB) in 10 prepu-

bertal lean children whose results were compared with those recorded in 19 normal-weight adults. Basal ghrelin levels in children (median, 224.5; 25th to 75th percentile, 122.0–447.7 pg/ml) and adults (338.0; 238.0–512.0 pg/ml) were similar. SLB inhibited ghrelin levels in adults (263.0; 190.0–399.0 pg/ml). However, no change in ghrelin levels after SLB (206.5; 105.0–274.0 pg/ml) was recorded in children. Thus, food intake inhibits ghrelin secretion in adults but not in children. Ghrelin refractoriness to inhibition by food intake in children would reflect a peculiar functional profile of the ghrelin system in childhood. (*J Clin Endocrinol Metab* 89: 1662–1665, 2004)

GHRELIN IS A 28-amino-acid peptide predominantly produced by the stomach (1–3). In its acylated form, ghrelin displays strong GH-releasing activity mediated by the activation of the GH secretagogue receptor (GHS-R) type 1a (1, 3). GHS-Rs are concentrated in the hypothalamus-pituitary unit but are also distributed in other central and peripheral tissues (3, 4). Indeed, besides a potent GH-releasing effect, ghrelin has several other actions including: 1) stimulation of lactotroph and corticotroph secretion but inhibition of the gonadal axis, 2) orexant activity coupled with control of energy expenditure, 3) influence on behavior and sleep, 4) influence on gastric motility and acid secretion as well as on exocrine pancreatic functions, 5) modulation of insulin secretion and glucose and lipid metabolism, 6) cardiovascular actions, and 7) influence on normal and neoplastic cell proliferation (2, 3, 5, 6).

In adults, circulating ghrelin levels, mostly represented by its unacylated form, are increased by fasting and energy restriction and decreased by food intake, glucose, insulin, and somatostatin; on the other hand, ghrelin secretion seems unaffected by lipids and amino acids, although some influence of amino acids has been recently observed in animals (2, 5, 7–11). Accordingly, circulating ghrelin levels are increased in anorexia and cachexia but reduced in obesity (8, 12, 13). These changes are opposite to those of leptin, and it has been

suggested that both ghrelin and leptin are hormones signaling metabolic balance and driving the neuroendocrine and metabolic response to changes in nutritional status (5, 6, 12). In agreement with this assumption, a clear negative association between insulin and ghrelin levels has been also shown (5, 6, 12). As anticipated, ghrelin is under inhibitory control exerted by insulin whose secretion seems, in turn, affected by ghrelin (8–10, 14, 15). The link between ghrelin and insulin suggests that ghrelin modulates the function of the endocrine pancreas where expression of both ghrelin and its GHS-R has been demonstrated (16–18). This hypothesis agrees also with evidence that there is a functional link between ghrelin and somatostatin (19). In fact, ghrelin is under inhibitory control exerted by somatostatin whose synthesis and secretion seem, in turn, to be positively modulated by ghrelin (19, 20).

The orexigenic action of ghrelin and its GH-releasing effect predict that it could exert an anabolic role that would be particularly important in childhood. However, it has been recently demonstrated that morning ghrelin levels after overnight fasting in either prepubertal or pubertal children are not enhanced, being similar to those in young adults despite very different GH profiles (21).

To further clarify the relationship between ghrelin secretion and nutrients as a function of age, we studied the ghrelin response to a standardized light breakfast (SLB) in children in comparison with adults. In fact, we have previously demonstrated that ghrelin secretion is reduced to the same extent by SLB and oral glucose load in adults (22). Our aim was therefore to clarify whether children and adults have the same sensitivity to the inhibitory effect of food intake.

Abbreviations: BMI, Body mass index; CV, coefficient of variation; GHS-R, GH secretagogue receptor; SLB, standardized light breakfast.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Subjects and Methods

We studied 10 normal-weight prepubertal children [three males and seven females; age (mean \pm sd), 8.5 ± 1.3 yr; height, 131.4 ± 3.7 cm; weight, 31.9 ± 3.1 kg; body mass index (BMI), 18.0 ± 0.8 kg/m²; ponderal excess, $8.6 \pm 3.5\%$] and 19 healthy normal-weight adults (10 males and nine females; age, 28.5 ± 3.4 yr; BMI, 22.4 ± 0.6 kg/m²). Height was measured by the Harpenden stadiometer and weight by using an electronic scale. BMI was calculated as body weight divided by squared height (kg/m²). All subjects had weights adequate for height and sex.

Ghrelin, insulin, and glucose levels were measured in the morning before and 60 min after SLB (energy intake 300 kCal, 45% carbohydrates, 13% proteins, and 42% lipids at 0 min). In children, GH and IGF-I levels were also evaluated.

The study protocol had been approved by the Ethical Committee, and informed consent had been obtained by all the adult subjects and all children's parents.

Human ghrelin (picograms per milliliter) was assayed, after extraction in reverse-phase C18 columns, by a radioimmunoassay (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA) using ¹²⁵I-labeled bioactive ghrelin as a tracer and a rabbit polyclonal antibody *vs.* octanoylated and des-octanoylated human ghrelin. Sensitivity was 30 pg/tube. Based on our data, the intraassay coefficient of variation (CV) range was 0.3–10.7%.

GH (micrograms per liter) was measured by chemiluminescent enzyme-labeled immunometric assay with Immulite 2000 (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA). Sensitivity was 0.01 ng/ml. Intra- and interassay CV ranges were 2.9–4.6 and 4.2–6.6%.

IGF-I (1 ng/ml = 0.1307 nmol/liter) was measured by RIA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX) after acid-ethanol extraction. Sensitivity was 0.8 ng/ml. Intra- and interassay CV ranges were 1.5–3.4 and 1.5–8.2%.

Insulin (1 μ IU/ml = 7.175 pmol/liter) was measured by chemiluminescent enzyme-labeled immunometric assay (Diagnostic Products). Sensitivity was 2 μ IU/ml. Intra- and interassay CV ranges were 2.5–8.3 and 4.4–8.6%.

Data are expressed as median and 25th to 75th percentiles. The statistical analysis was performed using Wilcoxon test, Mann-Whitney *U* test, and Spearman correlation test as appropriate.

Results

Basal ghrelin levels in children (median, 224.5; 25th to 75th percentile, 122.0–447.7 pg/ml) were similar to those in adults (338.0; 238.0–512.0 pg/ml).

As expected, in children as well as in adults, SLB increased both insulin [peak *vs.* baseline (median and 25th to 75th percentile) was 12.1 and 10.7–19.2 *vs.* 5.3 and 4.4–7.0 mU/liter for children and 48.3 and 41.2–54.3 *vs.* 16.3 and 13.7–18.3 mU/liter for adults; $P < 0.01$ for both] and glucose levels (81.4 and 76.7–85.5 *vs.* 72.1 and 68.9–74.9 mg/dl for children and 82.9 and 78.7–86.7 *vs.* 74.5 and 70.3–77.9 mg/dl for adults; $P < 0.01$ for both).

In adults, 60 min after SLB, ghrelin levels (263.0; 190.0–399.0 pg/ml) were significantly lower ($P < 0.0001$) than at baseline (24% inhibition). In contrast, SLB did not induce any change in ghrelin levels in children (206.5; 105.0–274.0 pg/ml) (Fig. 1, A and B).

No correlation between ghrelin and insulin levels was found at baseline and after SLB in both groups. In children, ghrelin levels at baseline were negatively associated ($r = -0.82$; $P < 0.04$) with IGF-I levels (183.5; 151.0–211.0 ng/ml) but not with GH levels (0.1; 0.1–1.6 μ g/liter).

Discussion

The results of the present study demonstrate that food intake inhibits morning ghrelin secretion in adults but not in

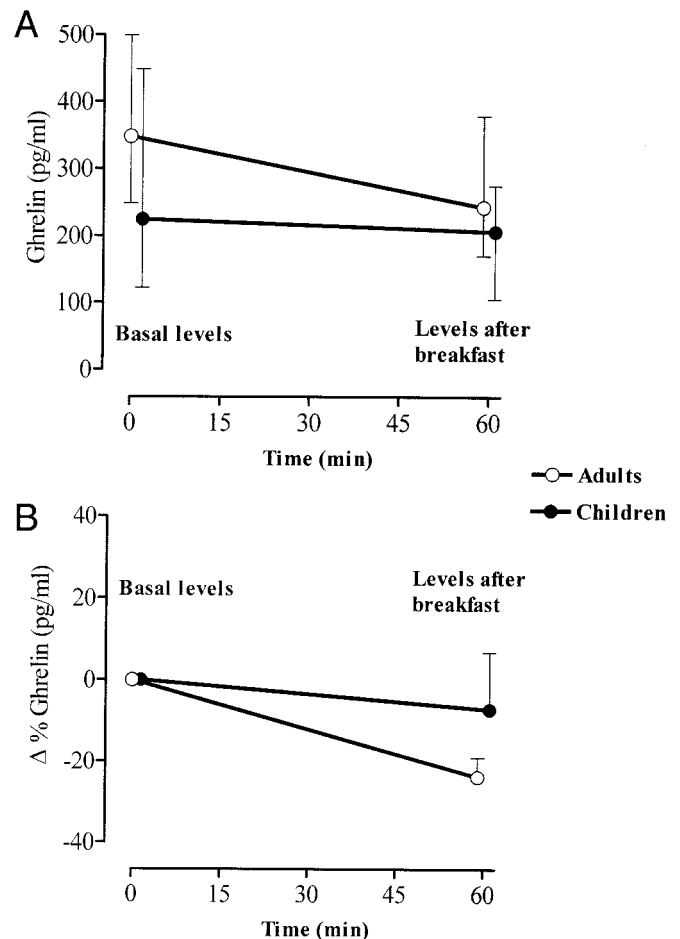


FIG. 1. A, Median and 25th to 75th percentile of ghrelin levels before and after breakfast in adults and in children; B, mean of δ percent variation \pm SEM of ghrelin levels.

prepubertal children. Moreover, children show a peculiar lack of negative association between ghrelin and insulin levels either at baseline or after breakfast.

In addition to potent GH-releasing activity, ghrelin exerts various neuroendocrine and nonendocrine activities reflecting central and peripheral GHS-R distribution (2–6). Particularly, ghrelin coupled with leptin contributes to driving the neuroendocrine and metabolic responses to changes in nutritional status (3, 5). In fact, ghrelin stimulates appetite and food intake and regulates energy balance and the neuroendocrine response to starvation (3, 5). In agreement with this assumption, ghrelin levels are increased in anorexia and cachexia, reduced in obesity, and restored by weight recovery in these conditions (5, 13, 23).

Ghrelin secretion is stimulated by fasting and energy restriction and decreased by food intake and overfeeding (5, 6, 7, 12, 13). Both oral and iv glucose loads inhibit ghrelin secretion in humans as well as in animals (8, 24); thus, glucose load-induced hyperglycemia exerts a negative influence on ghrelin secretion although the mechanisms underlying the inhibitory effect of glucose are still unclear (25).

In agreement with the negative association between ghrelin secretion and body mass, a clear negative association between ghrelin and insulin secretion has been found in

humans as well as in animals (7, 10, 26), suggesting an inhibitory influence of insulin on ghrelin secretion (9, 27). Indeed, during a euglycemic clamp, the steady-state increase in insulin levels is associated with a clear reduction in circulating ghrelin levels (9, 10, 27). The exact mechanisms by which insulin regulates ghrelin secretion are still unknown, although it has been demonstrated that insulin directly modulate ghrelin expression at the gastric level (28).

We have previously shown that morning ghrelin levels show good intraindividual reproducibility (21); in that study, morning ghrelin levels in men and women were similar, but more recently, 24-h ghrelin secretion has been found to be higher in women than in men, suggesting the existence of gender-related dimorphism (29). In normal young adults, it has been shown that circulating ghrelin levels are decreased to the same extent by oral glucose load and light breakfast (22). This inhibitory effect of breakfast shows also good intraindividual reproducibility (22). Because lipids and amino acids do not exert significant inhibitory influence on ghrelin secretion, at least in humans, it is likely that the inhibitory effect of SLB is caused by the glucose intake.

We demonstrate that, differently from in adults, food intake, *i.e.* SLB, does not inhibit circulating total ghrelin levels in prepubertal children; in other words, children seem refractory to the inhibitory influence of food intake on ghrelin secretion. This finding is remarkable taking into account that ghrelin has been proposed as a new anabolic hormone and that childhood is characterized by metabolism that is predominantly anabolic (3, 5).

The explanation of this peculiar functional profile of the ghrelin system in childhood is not obvious. On one hand, one could argue that the insensitivity of ghrelin to the inhibitory effect of food intake in childhood fits well with the hypothesis that the functional profile of the ghrelin system in children is oriented to anabolic purposes. In other words, the lack of any inhibition of ghrelin levels after food ingestion would maintain constant stimulation of appetite and energy intake, thus providing the substrates needed for the anabolic process of growth.

On the other hand, if ghrelin has such an important anabolic role particularly in childhood, it is unclear why circulating ghrelin levels in children are not enhanced with respect to adults. It has been shown that ghrelin secretion does not undergo remarkable age-related changes; in fact, circulating ghrelin levels in newborns, prepubertal and pubertal children, as well as in adults are unchanged despite very different secretory profiles of GH and IGF-I levels (21, 30, 31). In the present study, ghrelin levels in prepubertal children were even lower than in adults, although this difference did not attain statistical significance. Thus, one would reason that food intake reduced ghrelin levels in adults simply because they were relatively elevated in comparison with children. However, to further confuse the definite explanation of our present findings is also evidence that ghrelin hypersecretion in anorectic patients and even ghrelin hyposecretion in obese patients are refractory to the inhibitory effect of food intake (32, 33).

As anticipated, ghrelin secretion is negatively associated with insulin secretion in physiological conditions; a functional feedback link between these hormones is likely to be

present (15, 27), and there are also studies suggesting that ghrelin would also modulate insulin sensitivity (34). Even ghrelin hyper- and hyposecretion in anorexia and obesity, respectively, could reflect the opposite changes in insulin secretion that connote these pathophysiological conditions (5, 12, 13). Despite this, in the present study, there was a lack of any negative correlation between ghrelin and insulin levels either before or after food ingestion in children. It might be that insulin does not play a negative influence on ghrelin secretion, thus allowing its refractoriness to the inhibitory effect of food intake in childhood; based on the present findings, this is, however, pure speculation.

Another interesting aspect of this study is that we found no positive correlation between ghrelin and GH or IGF-I levels; actually, the latter were even negatively associated with circulating ghrelin levels in children. These findings agree with others (5, 13, 29) and make it even more unlikely that ghrelin plays a major role on somatotroph function and growth.

In conclusion, our study demonstrates that food intake inhibits ghrelin secretion in adults but not in children. Ghrelin refractoriness to the inhibitory effect of food intake in children would reflect a peculiar functional profile of the ghrelin system in childhood.

Acknowledgments

We thank Dr. Elisa Me and Flavia Prodam for their participation in the study.

Received July 11, 2003. Accepted January 7, 2004.

Address all correspondence and requests for reprints to: Gianni Bona, M.D., Unit of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale "A. Avogadro", Corso Mazzini 18, 28100 Novara, Italy. E-mail: gianni.bona@maggioreosp.novara.it.

This study was partially supported by grants from Ministero dell'Istruzione, dell'Università, della Ricerca, University of Turin, and Studio delle Malattie Endocrino-Metaboliche Foundation.

References

1. Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K 2001 Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12:118–122
2. Broglio F, Arvat E, Benso A, Papotti M, Muccioli G, Deghenghi R, Ghigo E 2002 Ghrelin: endocrine and non-endocrine actions. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15(Suppl 5):1219–1227
3. Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E 2002 Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 440:235–254
4. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M 2002 The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2988
5. Inui A 2001 Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2:551–560
6. Yoshihara F, Kojima M, Hosoda H, Nakazato M, Kangawa K 2002 Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5:391–395
7. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C 2001 Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24:RC19–RC22
8. Shiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S 2002 Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87:240–244
9. Lucidi P, Murdolo G, Di Loreto C, De Cicco A, Parlanti N, Fanelli C, Santusanio F, Bolli GB, De Feo P 2002 Ghrelin is not necessary for adequate hormonal counterregulation of insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 51:2911–2914
10. Mohlig M, Spranger J, Otto B, Ristow M, Tschop M, Pfeiffer AF 2002

- Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *J Endocrinol Invest* 25:RC36–RC38
11. Knerr I, Groschl M, Rascher W, Rauh M 2003 Endocrine effects of food intake: insulin, ghrelin, and leptin responses to a single bolus of essential amino acids in humans. *Ann Nutr Metab* 47:312–318
 12. Cummings DE, Schwartz MW 2003 Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med* 54:453–471
 13. Tolle V, Kadem M, Bluett-Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B 2003 Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab* 88:109–116
 14. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E 2001 Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5083–5086
 15. Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV, Sherwin RS 2003 The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E313–E316
 16. Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M 2002 Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1300–1308
 17. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S 2002 Ghrelin is present in pancreatic α -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124–129
 18. Adegate E, Ponery AS 2002 Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 14:555–560
 19. Broglio F, Koetsveld P, Benso A, Gottero C, Prodam F, Papotti M, Muccioli G, Gauna C, Hofland L, Deghenghi R, Arvat E, Van Der Lely AJ, Ghigo E 2002 Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4829–4832
 20. Arosio M, Ronchi CL, Gebbia C, Cappiello V, Beck-Peccoz P, Peracchi M 2003 Stimulatory effect of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *J Clin Endocrinol Metab* 88:701–704
 21. Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Castellino N, Petri A, Bellone J, Me E, Broglio F, Prodam F, Ghigo E, Bona G 2002 Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *J Endocrinol Invest* 25:RC13–RC15
 22. Gottero C, Bellone S, Rapa A, van Koetsveld P, Vivenza D, Prodam F, Benso A, Destefanis S, Gauna C, Bellone J, Hofland L, van der Lely AJ, Bona G, Ghigo E, Broglio F 2003 Standard light breakfast inhibits circulating ghrelin level to the same extent of oral glucose load in humans, despite different impact of glucose and insulin levels. *J Endocrinol Invest* 26:1203–1207
 23. Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Kohno N 2003 Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res* 9:774–778
 24. McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR 2002 Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 175:R7–R11
 25. Nakagawa E, Nagaya N, Okumura H, Enomoto M, Oya H, Ono F, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K 2002 Hyperglycemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clin Sci (Lond)* 103:325–328
 26. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS 2001 A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714–1719
 27. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R 2002 Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3997–4000
 28. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley Jr GH 2002 Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143:185–190
 29. Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, Jaffe CA 2003 Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2180–2184
 30. Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Vercellotti A, Petri A, Radetti G, Bellone J, Broglio F, Ghigo E, Bona G 2003 Circulating ghrelin levels in newborns are not associated to gender, body weight and hormonal parameters but depend on the type of delivery. *J Endocrinol Invest* 26:RC9–RC11
 31. Chanoine JP, Yeung LP, Wong AC 2003 Umbilical cord ghrelin concentrations in Asian and Caucasian neonates. *Horm Res* 60:116–120
 32. Nedvidkova J, Krykorkova I, Bartak V, Papezova H, Gold PW, Alesci S, Pacak K 2003 Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1678–1682
 33. English PJ, Ghatei MA, Malik IA, Bloom SR, Wilding JP 2002 Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2984–2987
 34. Poykko SM, Kellokoski E, Horkko S, Kauma H, Kesaniemi YA, Ukkola O 2003 Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 52:2546–2553

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Circulating ghrelin levels in the newborn are positively associated with gestational age

S. Bellone*, A. Rapa*, D. Vivenza*, A. Vercellotti*,
A. Petri*, G. Radetti†, J. Bellone‡, F. Broglio§,
E. Ghigo§ and G. Bona*

*Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, †Department of Paediatrics, Regional Hospital, Bolzano, ‡Division of Pediatric Endocrinology, Regina Margherita Children Hospital and §Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Turin, Turin, Italy

(Received 17 October 2003; returned for revision 30 October 2003; finally revised 24 November 2003; accepted 27 January 2004)

Summary

OBJECTIVE Ghrelin exerts potent GH-releasing activity and stimulates food intake. Circulating ghrelin levels are increased in anorexia and cachexia, reduced in obesity and restored by weight recovery. Newborns are characterized by GH hypersecretion associated with low IGF-I levels reflecting peripheral GH resistance.

STUDY DESIGN The aim of our study was to measure cord ghrelin levels in 117 newborns appropriate for gestational age, born either at term or preterm.

RESULTS Ghrelin levels in cord blood (median; 25th–75th centile: 327.6; 206.0–413.0 pg/ml) were higher ($P < 0.0001$) than those in maternal blood at delivery (133.0; 89.0–173.7 pg/ml), without gender differences.

A positive correlation between ghrelin levels in mothers and newborns ($r = 0.26$, $P < 0.01$) was observed. Ghrelin levels in newborns born at term (399.0; 229.0–438.0 pg/ml) were remarkably higher ($P < 0.0001$) than those in born preterm (208.0; 144.5–278.9 pg/ml). A clear positive association was present between ghrelin levels and gestational age. No association between ghrelin and GH, IGF-I, insulin, glucose and leptin levels were found.

CONCLUSIONS Cord ghrelin levels show clear gestational age-related dependency. The lack of any direct relationship between ghrelin and anthropometric or biochemical parameters in adequate for gestational

age newborns does not support the hypothesis that ghrelin has major role in foetal GH secretion and growth.

Ghrelin, the endogenous ligand of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R; Kojima *et al.*, 2001), exerts potent GH-releasing activity but also has other endocrine and nonendocrine actions among which is a remarkable influence on the control of food intake (Arvat *et al.*, 2001; Inui 2001; Muccioli *et al.*, 2002). In fact, ghrelin treatment has been shown able to induce appetite, food intake and reduce fat utilization leading to weight gain in both animals and humans (Tschop *et al.*, 2000, 2001; Inui 2001; Wren *et al.*, 2001a, 2001b; Muccioli *et al.*, 2002). Circulating ghrelin levels are increased by fasting and energy restriction while decreased by food intake, glucose and insulin (Inui 2001; Tschop *et al.*, 2001; Cummings *et al.*, 2002; Ukkola, 2003). Accordingly, circulating ghrelin levels are increased in anorexia and cachexia, reduced in obesity and restored by weight recovery in all these conditions (Muccioli *et al.*, 2002; Inui 2001). A considerable amount of evidence suggests that ghrelin coupled with leptin, although with opposing actions, plays a role in managing the neuroendocrine and metabolic adaptation to starvation (Horvath *et al.*, 2001; Inui 2001). Ghrelin and leptin are likely signals to the CNS of variations in the nutritional balance; within the CNS, ghrelin and leptin modulate neuropeptide Y/agouti-related protein hypothalamic neurones that express ghrelin and leptin receptors (Inui 2001; Kamegai *et al.*, 2001; Muccioli *et al.*, 2002; Tschop *et al.*, 2002).

The control of growth in newborns is different from later life and involves genetic, nutritional, hormonal and environmental factors (Ogilvy-Stuart *et al.*, 1998). In fetuses as well as in newborns, insulin, IGF-I and nutrient availability are the main determinants of growth while GH secretion does not play a major role (Gluckman, 1995; Ogilvy-Stuart *et al.*, 1998).

GH levels are high during the fetal and neonatal periods (Wollmann, 2000). High GH levels during fetal life might induce insulin resistance thus protecting fetal brain from hypoglycaemia or, alternatively, GH hypersecretion could provide alternative fuels for metabolism via enhanced lypolysis (Adrian *et al.*, 1990; de Zegher *et al.*, 1990).

The GH hypersecretory state in the fetal and neonatal periods probably reflect blunted negative feedback action of IGF-I likely due to peripheral GH insensitivity or might reflect age-related variations in the neural control of somatotroph secretion, i.e. hyperactivity of GHRH-secreting neurones and somatostatin

Correspondence: Gianni Bona, Clinica Pediatrica dell'Università, Ospedale Maggiore della Carità, Corso Mazzini 18, 28100 Novara, Italy. Tel: +39 0321 3733350; Fax: +39 0321 3733598; E-mail: gianni.bona@maggioreosp.novara.it

Newborns	At term	Preterm
Males/females	54/39	13/11
Gestational age (weeks)	38.9 ± 1.2	33.2 ± 2.4
By natural/Caesarean delivery	44/49	12/12
Body weight (g)	3287.6 ± 383.3	2002.7 ± 533.1
Length (cm)	49.7 ± 1.7	44.4 ± 3.5
GH (µg/l), range	15.2 (10.1–21.2)	21.5 (14.9–25.4)
IGF-I (nmol/l), range	8.8 (6.1–12.6)	6.7 (4.4–9.0)
Leptin (ng/ml), range	6.0 (3.6–9.2)	3.5 (1.3–5.7)
Insulin (pmol/l), range	47.4 (36.6–61.7)	35.9 (30.1–43.0)
Glucose (mmol/l), range	4.0 (3.3–5.3)	5.6 (3.6–7.6)

Table 1 Clinical characteristics (mean ± SD) and hormonal parameters (median, 25th–75th centile) of subjects

hypoactivity (Stimano *et al.*, 1985; Deiber *et al.*, 1989; Wollmann *et al.*, 2000); the role, if any, of the ghrelin system in driving GH secretion during fetal life and at birth is still unclear.

Information about ghrelin secretion during fetal life and at birth is scanty. Data available so far suggest that, unlike other hormonal parameters, ghrelin secretion does not undergo relevant age- and gender-related variations and is similar among newborns, prepubertal or pubertal children and young adults (Bellone *et al.*, 2003). At birth, no gender-related difference in ghrelin levels has been found while associations among circulating ghrelin levels and anthropometric and biochemical parameters have been reported by some but not by other authors (Chanoine *et al.*, 2002; Bellone *et al.*, 2003).

The aim of the present study was to analyse the relationships among ghrelin levels, anthropometric and biochemical parameters at birth in a large number of newborns born either at term or preterm.

Subjects and methods

We studied 117 newborns appropriate for gestational age (67 males and 50 females, 93 born at term and 24 born preterm, 56 born from vaginal and 61 from Caesarean deliveries) consecutively born in the Paediatric Departments at Novara and Bolzano. Prematurity was defined as a gestational age less than 37 weeks. Gestational age of term infants was 38.9 ± 1.2 weeks, while that of preterm infants was 33.2 ± 2.4 weeks. All pregnancies were without complications. Vaginal deliveries were uncomplicated, while Caesarean sections were performed because of elective indications such as repeated Caesarean or previous obstetric history of the mothers. After an initial examination in delivery room, all the infants re-examined after stabilization were found to be healthy.

For each newborn we evaluated gestational age, birth weight, length (Table 1) and collected a venous cord blood sample for determination of ghrelin, GH, IGF-I, insulin, glucose and leptin levels. Immediately after delivery a blood sample for the

evaluation of ghrelin levels was also drawn from their mothers (mean ± SD age: 32.7 ± 4.7 years).

Human ghrelin (pg/ml) was assayed, after extraction in reverse phase C18 columns, by a radioimmunoassay (RIA; Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont CA, USA) using ¹²⁵I-labelled bioactive ghrelin as a tracer and a rabbit polyclonal antibody *vs.* octanoylated and des-octanoylated h-ghrelin. Sensitivity was 30 pg/tube and intra-assay coefficient of variation (CV) range was 0.3–10.7%.

Leptin (ng/ml) was measured in duplicate by RIA using a commercially available kit (Linco Research Inc., St Charles, MO, USA). Sensitivity was 0.5 ng/ml and intra- and interassay CVs were 3.4–8.3% and 3.0–6.2%, respectively.

IGF-I (nmol/l) were measured by RIA (Diagnostic System Laboratory Inc., Webster, TX, USA) after acid–ethanol extraction. Sensitivity was 0.8 ng/ml and intra- and interassay CV ranges were 1.5–3.4 and 1.5–8.2%, respectively.

Insulin (pmol/l) was measured by chemiluminescent enzyme-labelled immunometric assay with Immulite 2000 (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). Sensitivity was 2 µUI/ml and intra- and interassay CV ranges were 2.5–8.3 and 4.4–8.6%, respectively.

GH (µg/l) was measured by chemiluminescent enzyme-labelled immunometric assay with Immulite 2000 (Diagnostic Products Corporation). Sensitivity was 0.01 ng/ml and intra- and interassay CV ranges were 2.9–4.6 and 4.2–6.6%, respectively.

The study protocol had been approved by the Ethical Committee and informed consent had been obtained by all the adult subjects and either newborns' or infants' parents.

Data are expressed as median and 25th–75th centiles. The statistical analysis was performed using Mann–Whitney *U*-test and Spearman correlation test as appropriate.

To verify the influence of different variables on neonatal ghrelin levels, we used general linear models which enable us to analyse any combination of categorical or continuous predictor variables. We reported multiple R and beta coefficients with 95% Confidence intervals (95% CI) for each independent variable according

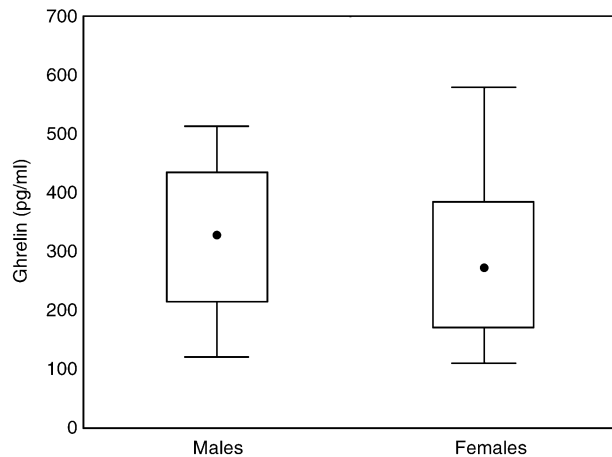


Fig. 1 Cord ghrelin levels in male and female newborns. Points are median, boxes are interquartile range, and whiskers are 10th–90th percentile values.

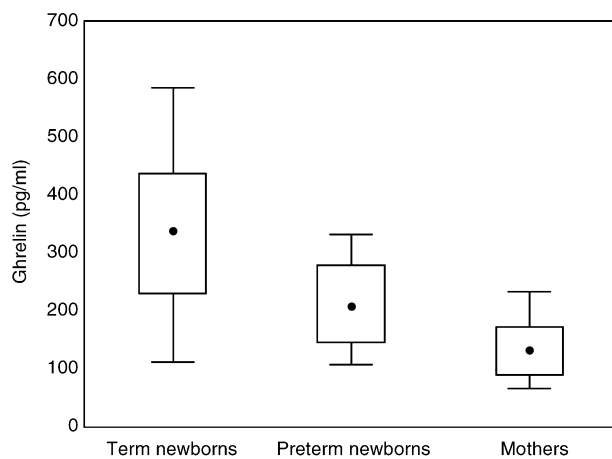


Fig. 2 Plasma ghrelin levels in term and preterm newborns and in their mothers. Points are median, boxes are interquartile range, and whiskers are 10th–90th percentile values.

to the sigma-restricted parameterization. The statistical analysis was performed using Statistica version 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Results

Ghrelin levels in cord blood were 327.6 (range 206.0–413.0) pg/ml and were similar in both sexes (Fig. 1).

Ghrelin levels in maternal blood at delivery (133.0 pg/ml, range 89.0–173.7 pg/ml) were lower ($P < 0.0001$) than those in newborns (Fig. 2): a positive association between ghrelin levels in mothers and newborns ($r = 0.26$, $P < 0.01$) was observed.

Ghrelin levels in neonates born at term (339.0 pg/ml, range 229.0–438.0 pg/ml) were significantly higher ($P < 0.0001$) than in those born preterm (208.0 pg/ml, range 144.5–278.9 pg/ml) (Fig. 2). GH, IGF-I, insulin, glucose and leptin levels were, in turn, similar in both groups.

Ghrelin levels in neonates born by natural delivery were higher than those born by Caesarean section (335.5 pg/ml, range 219.5–434.5 pg/ml vs. 282.8 pg/ml, range 161.0–380.0 pg/ml) without reaching statistical significance. Again, the other hormonal parameters were similar in both groups.

In newborns, ghrelin levels were positively associated with gestational age ($r = 0.3$, $P < 0.0009$), birth weight ($r = 0.23$, $P < 0.01$) and length ($r = 0.24$, $P < 0.01$). Considering the influence of birth weight, length and gestational age altogether on neonatal ghrelin levels, a significant correlation was evident only for gestational age (multiple $R = 0.34$, $P < 0.004$; $\beta = 0.33$, 95% CI: 0.05–0.62, $P < 0.02$). On the other hand, no association between ghrelin and GH, IGF-I, insulin, glucose and leptin levels was found. No correlation between ghrelin concentrations in cord blood and maternal weight was found either.

The general linear model analysis showed that both maternal ghrelin levels ($\beta = 0.35$, 95% CI: 0.17–0.52, $P = 0.0002$) and the degree of prematurity ($\beta = 0.36$, 95% CI: 0.18–0.54, $P < 0.0001$) but not the type of delivery significantly contributed to neonatal ghrelin levels (multiple $R = 0.56$, $P < 0.0001$).

Discussion

The results of the present study demonstrate that cord ghrelin levels show clear positive gestational age-related dependency. Ghrelin levels are independent of gender and also of the type of delivery. Unlike in children and adults, ghrelin levels at birth are independent of body weight as well as length and hormonal parameters including GH, IGF-I, insulin and leptin secretion.

These results firstly demonstrate in humans that ghrelin secretion progressively increase during the third trimester of gestation independently of gender. This finding agrees with data in rats showing that ghrelin cells in the fetal stomach progressively increase from pregnancy day 18; in fact, ghrelin cell number in fetal stomach is positively associated with stomach growth (Hayashida *et al.*, 2002). Interestingly, ghrelin levels in newborns were higher than those in their mothers indicating fetoplacental-derived ghrelin production. Ghrelin expression in rat and human placenta has been demonstrated but peaks in the first half of pregnancy and is almost undetectable at term (Gualillo *et al.*, 2001), suggesting that changes in cord ghrelin levels depends mostly on age-related fetal production.

In a preliminary study we found ghrelin levels in neonates born after caesarean section lower than in those born by spontaneous delivery (Bellone *et al.*, 2003). This result has not been confirmed

by the present study in which we studied a larger population of subjects considering also preterm newborns.

The peculiar pattern of ghrelin secretion, increasing up to the time of birth would suggest that it is needed for growth purposes. Ghrelin has been discovered as natural ligand of the GHS-R that is distributed at the hypothalamus–pituitary level and mediates strong GH-releasing action, at least after administration of pharmacological ghrelin doses in animals, and even more in humans (Muccioli *et al.*, 2002). Moreover, ghrelin coupled with leptin is believed to play major role in driving the central, neuroendocrine and metabolic response to starvation (Inui 2001; Muccioli *et al.*, 2002). This action is likely to be the result of activation of GHS-R also at central and peripheral levels (Horvath *et al.*, 2001; Inui 2001). In fact, ghrelin system mediates central orexigenic action as well as peripheral modulation of insulin secretion and glucose metabolism (Inui 2001; Ukkola *et al.*, 2003).

The neuroendocrine profile of newborns is very similar to that generally observed in malnourished patients. For instance, it includes GH hypersecretion coupled with peripheral GH insensitivity that explains low IGF-I levels that, in turn, exert reduced negative feedback action on somatotroph secretion (Wollmann *et al.*, 2000). Although GH is not believed to play a major role in fetal growth, GH hypersecretion would protect from hypoglycaemia and temporarily provide alternative substrates by activating lypolysis (Adrian *et al.*, 1990; de Zegher *et al.*, 1990). Until now, GH hypersecretion in fetal life and at birth has been supposed to reflect hyperactivity of GHRH-secreting neurones coupled with immaturity of somatostatin activity (Stimano *et al.*, 1985; Deiber *et al.*, 1989; Wollmann *et al.*, 2000). After its discovery, the possibility that ghrelin, as another natural GH secretagogue, might play a role in somatotroph hypersecretion in this period of life, was worthy of consideration. Our present findings show that ghrelin levels are not associated to GH secretion or to IGF-I levels, suggesting that ghrelin is not involved in perinatal GH hypersecretion. This assumption agrees with evidence that ghrelin levels at birth are similar to those in children and adults despite the highest GH secretion occurs in newborns (Bellone *et al.*, 2003).

The existence of a causative relationship between ghrelin and GH hyper- and hypo-secretion in anorexia and obesity, respectively, had been hypothesized, but, even in these conditions, a clear functional link between GH and ghrelin secretion has not been demonstrated (Horvath *et al.*, 2001; Inui 2001; Otto *et al.*, 2001; Tolle *et al.*, 2003).

In the present study we found that ghrelin secretion at birth is independent also of insulin and leptin levels as well as of body weight and length. In fact, linear correlation between cord ghrelin levels and body weight and length are functions of gestational age as shown by multiple regression analysis. It should be noted that associations among circulating ghrelin levels and anthropometric and biochemical parameters have been reported by some

authors in studies performed in smaller groups of subjects (Chanoine *et al.*, 2002). In this context it has to be emphasized that ghrelin knockout mouse does not show any specific alteration (Sun *et al.*, 2003).

The lack of direct correlation between ghrelin levels and metabolic parameters as well as with body weight and length suggests that at birth, this new gastric hormone does not play the same metabolic activities exerted in adulthood when associations with body mass index, nutrient intake and insulin secretion are clearly apparent (Inui 2001). However, the lack of association among ghrelin levels and anthropometric or biochemical parameters in the newborn does not rule out the possibility that ghrelin plays important role in the fetal/maternal communication (Gualillo *et al.*, 2001).

In conclusion, given the major central role of ghrelin in triggering appetite and food intake (Inui 2001; Muccioli *et al.*, 2002), the gestational-dependent increase in ghrelin levels would represent a signal to upregulate the system and activate the seeking of maternal milk after birth. The lack of any direct relationships among ghrelin and anthropometric or biochemical parameters in adequate for gestational age newborns does not support the hypothesis that ghrelin has major role in fetal GH secretion and growth. On the other hand, the lack of any direct correlations between ghrelin and metabolic parameters in newborns adequate for gestational age suggests that the functional link between ghrelin and metabolism is age-related. The possibility that ghrelin plays an important role in the fetal/maternal communication is not ruled out by the present findings but remains to be demonstrated.

References

- Adrian, T.E., Lucas, A., Bloom, S.R. & Aynsley-Green, A. (1990) Growth hormone response to feeding in term and preterm neonates. *Acta Paediatrica Scandinavica*, **72**, 251–254.
- Arvat, E., Maccario, M., Di Vito, L., Broglio, F., Benso, A., Gottero, C., Papotti, M., Muccioli, G., Dieguez, C., Casanueva, F.F., Deghenghi, R., Camanni, F. & Ghigo, E. (2001) Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 1169–1174.
- Bellone, S., Rapa, A., Vivenza, D., Vercellotti, A., Petri, A., Radetti, G., Bellone, J., Broglio, F., Ghigo, E. & Bona, G. (2003) Circulating ghrelin levels in newborns are not associated to gender, body weight and hormonal parameters but depend on the type of delivery. *Journal of Endocrinological Investigation*, **26**, RC9–11.
- Chanoine, J.P., Yeung, L.P., Wong, A.C. & Birmingham, C.L. (2002) Immunoreactive ghrelin in human cord blood: relation to anthropometry, leptin, and growth hormone. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **35**, 282–286.
- Cummings, D.E., Weigle, D.S., Frayo, R.S., Breen, P.A., Ma, M.K., Dellinger, E.P. & Purnell, J.Q. (2002) Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *New England Journal of Medicine*, **346**, 1623–1630.

- Deiber, M., Chatelain, P., Naville, D., Putet, G. & Salle, B. (1989) Functional hypersomatotropism in small for gestational age (SGA) newborn infants. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **68**, 232–234.
- Gluckman, P.D. (1995) Clinical review 68: The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insulin-like growth factors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **80**, 1047–1050.
- Gualillo, O., Caminos, J., Blanco, M., Garcia-Caballero, T., Kojima, M., Kangawa, K., Dieguez, C. & Casanueva, F. (2001) Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology*, **142**, 788–794.
- Hayashida, T., Nakahara, K., Mondal, M.S., Date, Y., Nakazato, M., Kojima, M., Kangawa, K. & Murakami, N. (2002) Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *Journal of Endocrinology*, **173**, 239–245.
- Horvath, T.L., Diano, S., Sotonyi, P., Heiman, M. & Tschop, M. (2001) Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance: a hypothalamic perspective. *Endocrinology*, **142**, 4163–4169.
- Inui, A. (2001) Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nature Reviews Neuroscience*, **2**, 551–560.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H. & Wakabayashi, I. (2001) Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*, **50**, 2438–2443.
- Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H. & Kangawa, K. (2001) Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **12**, 118–122.
- Muccioli, G., Tschop, M., Papotti, M., Deghenghi, R., Heiman, M. & Ghigo, E. (2002) Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European Journal of Pharmacology*, **440**, 235–254.
- Ogilvy-Stuart, A.L., Hands, S.J., Adcock, C.J., Holly, J.M., Matthews, D.R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J.S., Wilkinson, A.R. & Dunger, D.B. (1998) Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-1, growth hormone, and feeding in the newborn. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 3550–3557.
- Otto, B., Cuntz, U., Fruehauf, E., Wawarta, R., Folwaczny, C., Riepl, R.L., Heiman, M.L., Lehnert, P., Fichter, M. & Tschop, M. (2001) Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology*, **145**, 669–673.
- Stimano, S., Suzuki, S., Nagashima, K., Yagi, H., Sakaguchi, M. & Kuroume, T. (1985) Growth hormone responses to growth hormone releasing factor in neonates. *Biology of the Neonate*, **47**, 367–370.
- Sun, Y., Ahmed, S. & Smith, R.G. (2003) Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 7973–7978.
- Tolle, V., Kadem, M., Bluet-Pajot, M.T., Frere, D., Foulon, C., Bossu, C., Dardennes, R., Mounier, C., Zizzarri, P., Lang, F., Epelbaum, J. & Estour, B. (2003) Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 109–116.
- Tschop, M., Smiley, D.L. & Heiman, M.L. (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, **407**, 908–913.
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., Devanarayan, V., Ravussin, E. & Heiman, M.L. (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, **50**, 707–709.
- Tschop, M., Flora, D.B., Mayer, J.P. & Heiman, M.L. (2002) Hypophysectomy prevents ghrelin-induced adiposity and increases gastric ghrelin secretion in rats. *Obesity Research*, **10**, 991–999.
- Ukkola, O. (2003) Ghrelin and insulin metabolism. *European Journal of Clinical Investigation*, **33**, 183–185.
- Wollmann, H.A. (2000) Growth hormone and growth factors during perinatal life. *Hormone Research*, **53**, 50–54.
- Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2001b) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 5992.
- Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., Dhillo, W.S., Seal, L.J., Cohen, M.A., Batterham, R.L., Taheri, S., Stanley, S.A., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2001a) Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*, **50**, 2540–2547.
- de Zegher, F., Kimpen, J., Raus, J. & Vanderschueren-Lodeweyckx, M. (1990) Hypersomatotropism in the dysmature infant at term and preterm birth. *Biology of the Neonate*, **58**, 188–191.

Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycaemia but unaffected by glucagon and arginine in humans

Fabio Broglio*, Cristina Gottero†, Flavia Prodam†, Silvia Destefanis†, Carlotta Gauna*, Elisa Me†, Fabrizio Riganti†, Daniela Vivenza‡, Anna Rapa‡, Valentino Martina†, Emanuela Arvat†, Gianni Bona‡, Aart Jan van der Lely* and Ezio Ghigo†

*Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, Erasmus University of Rotterdam, the Netherlands, †Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, University of Turin and ‡Unit of Paediatrics, Department of Medical Sciences, 'Piemonte Orientale' University, Novara, Italy

(Received 30 December 2003; returned for revision 1 February 2004; finally revised 31 May 2004; accepted 18 June 2004)

Summary

OBJECTIVE Circulating ghrelin levels are increased by fasting and decreased by feeding, glucose load, insulin and somatostatin. Whether hyperglycaemia and insulin directly inhibit ghrelin secretion still remains matter of debate. The aim of the present study was therefore to investigate further the regulatory effects of glucose and insulin on ghrelin secretion.

DESIGN AND SUBJECTS We studied the effects of glucose [oral glucose tolerance test (OGTT) 100 g orally], insulin-induced hypoglycaemia [ITT, 0.1 IU/kg insulin intravenously (i.v.)], glucagon (1 mg i.v.), arginine (0.5 mg/kg i.v.) and saline on ghrelin, GH, insulin, glucose and glucagon levels in six normal subjects.

MEASUREMENTS In all the sessions, blood samples were collected every 15 min from 0 up to + 120 min. Ghrelin, GH, insulin, glucagon and glucose levels were assayed at each time point.

RESULTS OGTT increased ($P < 0.01$) glucose and insulin while decreasing ($P < 0.01$) GH and ghrelin levels. ITT increased ($P < 0.01$) GH but decreased ($P < 0.01$) ghrelin levels. Glucagon increased ($P < 0.01$) glucose and insulin without modifying GH and ghrelin. Arginine increased ($P < 0.01$) GH, insulin, glucagon

and glucose ($P < 0.05$) but did not affect ghrelin secretion.

CONCLUSIONS Ghrelin secretion in humans is inhibited by OGTT-induced hyperglycaemia and ITT but not by glucagon and arginine, two substances able to increase insulin and glucose levels. These findings question the assumption that glucose and insulin directly regulate ghrelin secretion. On the other hand, ghrelin secretion is not associated with the GH response to ITT or arginine, indicating that the somatotroph response to these stimuli is unlikely to be mediated by ghrelin.

Ghrelin is a 28-amino acid peptide predominantly produced by the stomach, although it is expressed also in several other tissues including the endocrine pancreas (Kojima *et al.*, 2001; Muccioli *et al.*, 2002; Broglio *et al.*, 2003b; Ukkola, 2003). In its acylated form, ghrelin displays strong GH-releasing activity mediated by the activation of the GH secretagogues receptor type 1a (GHS-R1a); (Kojima *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2001; Muccioli *et al.*, 2002). GHS receptors are concentrated in the hypothalamus–pituitary unit but also distributed in other central and peripheral tissues, including the endocrine pancreas (Kojima *et al.*, 2001; Gnanapavan *et al.*, 2002; Muccioli *et al.*, 2002). However, ghrelin also exerts other endocrine and nonendocrine actions either at the central or peripheral level. In particular, ghrelin has been discovered to be able to exert a strong stimulatory effect on appetite and food intake while modulating energy balance; these actions take place at the central levels where it is likely to be mediated by the neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AGRP) system (Kalra & Kalra, 2003; Chen *et al.*, 2004). It has also been shown that ghrelin exerts remarkable metabolic actions at the peripheral level being able to influence endocrine pancreatic function as well as glucose and lipid metabolism (Muccioli *et al.*, 2002; Ukkola, 2003).

Circulating ghrelin is mainly in the unacylated form (despite endocrine actions being exerted by its acylated form only) and mostly reflects gastric secretion; in fact, levels are reduced by 70% after gastrectomy as well as after gastric bypass in humans (Ariyasu *et al.*, 2001; Cummings *et al.*, 2002b; Broglio *et al.*, 2003a). Ghrelin secretion occurs in a pulsatile manner without strict correlation with GH levels but with an association to food intake and sleep cycles in rats (Tolle *et al.*, 2002). In humans, ghrelin secretion undergoes remarkable variations throughout the

Correspondence: E. Ghigo, Divisione di Endocrinologia, Ospedale Molinette, Corso Dogliotti 14, 10126 Torino, Italy. Tel: +39 011 6963156; Fax: +39 011 6647421; E-mail: ezio.ghigo@unito.it

day and ghrelin peaks anticipate food intake, suggesting that the latter is triggered by ghrelin discharge (Cummings *et al.*, 2001, 2002b); these findings, however, have not been confirmed by others (Barkan *et al.*, 2003).

Ghrelin secretion shows a negative association with body mass index (BMI); circulating total ghrelin levels are increased in anorexia and cachexia but reduced in obesity, notable exception being obese patients with Prader Willi syndrome (Cummings *et al.*, 2001, 2002a; Otto *et al.*, 2001; Tschop *et al.*, 2001b; DelParigi *et al.*, 2002; Shiiya *et al.*, 2002; Haqq *et al.*, 2003; Ukkola, 2003). In agreement with the major link between nutrition and ghrelin, its circulating levels are increased by fasting and energy restriction but decreased by food intake and overfeeding (Ariyasu *et al.*, 2001; Cummings *et al.*, 2001, 2002b; Tschop *et al.*, 2001a; Yoshihara *et al.*, 2002). These variations in ghrelin secretion predicted its clear negative association with insulin secretion (Cummings *et al.*, 2001; Mohlig *et al.*, 2002; Saad *et al.*, 2002; Broglio *et al.*, 2003b; Flanagan *et al.*, 2003; Reimer *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 2003; Ukkola, 2003).

It has been already demonstrated that ghrelin secretion is reduced by either oral or intravenous glucose load but also, paradoxically, by insulin-induced hypoglycaemia (ITT); (Lucidi *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002; Shiiya *et al.*, 2002; Flanagan *et al.*, 2003). An inhibitory input on ghrelin comes also from the activation of gastric somatostatin receptors as indicated by the finding that the most remarkable inhibition of circulating ghrelin levels is observed under exposure to somatostatin and its analogues (Broglio *et al.*, 2002; Norrelund *et al.*, 2002; Arosio *et al.*, 2003; Barkan *et al.*, 2003; Shimada *et al.*, 2003).

Regarding the mechanisms underlying the influence of glucose and insulin on ghrelin secretion, it is still a matter of debate if hyperglycaemia and insulin exert direct or indirect actions (Caixas *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 2003). On the other hand, despite some stimulatory effect of glucagon on ghrelin expression and secretion in animal models (Kishimoto *et al.*, 2003; Kamegai *et al.*, 2004), the influence of glucagon on circulating ghrelin levels in humans has never been studied. Also the influence of amino acids on ghrelin secretion is still unclear; in fact, some studies reported discrepant results (Lee *et al.*, 2002; Groschl *et al.*, 2003; Moran *et al.*, 2003).

Based on the foregoing, in order to further clarify the mechanisms involved in the regulation of ghrelin secretion in humans, we studied the effects of glucagon and arginine, two well known stimuli of insulin and glucose levels, as well as of oral glucose tolerance test (OGTT)-induced hyperglycaemia and ITT on circulating ghrelin levels in normal young volunteers. In all testing sessions, GH, insulin, glucagon and glucose levels were also assayed.

Research design and methods

Six healthy young male volunteers [age (mean \pm SEM): 28.7 \pm 2.9 years; BMI: 23.4 \pm 0.8 kg/m²] were studied. All subjects

gave their written informed consent to participate in the study which had been approved by an independent ethical committee.

All subjects underwent the following five testing sessions in random order at least 3 days apart:

- saline
- oral glucose load (OGTT, 100 g orally at 0 min)
- ITT [0.1 IU/kg insulin intravenously (i.v.) as a bolus at 0 min]
- intravenous glucagon (1 mg i.v. as a bolus at 0 min)
- i.v. arginine load (ARG, 0.5 mg/kg i.v. as an infusion from time 0 min to +30 min).

After overnight fasting, the tests were begun in the morning at 08:30–09:00 h, 30 min after an indwelling catheter had been placed into an antecubital vein of the forearm kept patent by slow infusion of isotonic saline.

Blood samples were taken every 15 min from 0 up to +120 min. Ghrelin, GH, insulin, glucagon and glucose levels were assayed at each time point in all sessions.

Total plasma ghrelin levels (ng/l) were assayed, after extraction in reverse-phase C18 columns, by a radioimmunoassay (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA) using ¹²⁵I-labelled bioactive ghrelin as a tracer and a rabbit polyclonal antibody *vs.* octanoylated and des-octanoylated h-ghrelin (sensitivity: 30 pg/tube, intra-assay coefficient of variation (CV) range: 0.3–10.7%).

Serum GH levels (μ g/l: 1 μ g/l = 2 mU/l) were measured in duplicate by immunoradiometric assay (IMRA, hGH-CTK IRMA, SORIN Biomedica, Saluggia, Italy). The sensitivity of the assay was 0.15 μ g/l. The inter- and intra-assay coefficients of variation were 2.9–4.5% and 2.4–4.0%, respectively.

Serum insulin levels (mU/l) were measured in duplicate by IMRA (INSIK-5, SORIN Biomedica). The sensitivity of insulin assay was 2.5 \pm 0.3 mU/l. The inter- and intra-assay coefficients of variation were 6.2–10.8% and 5.5–10.6%, respectively.

Plasma glucagon levels (ng/l) were measured in duplicate by IMRA (Glucagon, Biochem ImmunoSystem, Casalecchio di Reno, Italy). The sensitivity of the assay was 14.5 ng/l. The inter- and intra-assay coefficients of variation were 8.2–9.0% and 8.0–9.5%, respectively. Plasma glucose levels (mmol/l: 1 mg/dl = 0.05551 mmol/l) were measured by gluco-oxidase colourimetric method (GLUCOFIX, by Menarini Diagnostici, Florence, Italy).

All samples from an individual subject were analysed together. The hormonal responses are expressed as absolute values. The statistical analysis was carried out using nonparametric ANOVA (Friedman test) and then Wilcoxon test, as appropriate. The results are expressed as mean \pm SEM.

Results

Saline infusion did not modify ghrelin, GH, insulin, glucagon or glucose levels (Figs 1 and 2).

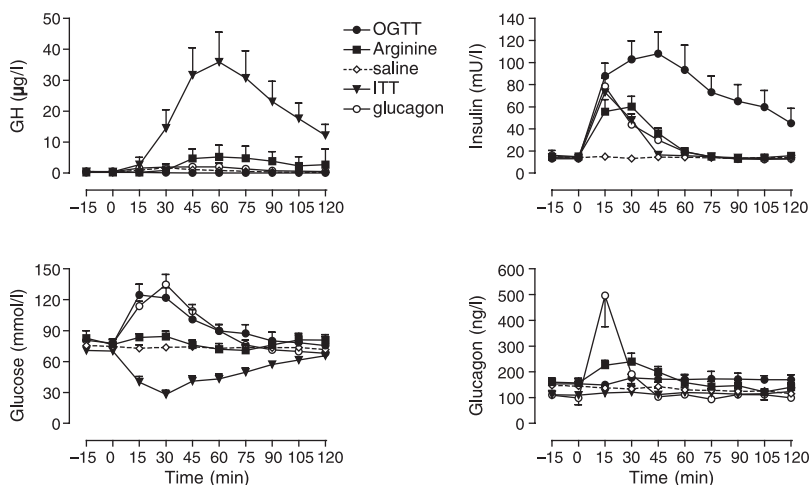


Fig. 1 Mean (\pm SEM) GH, insulin, glucose and glucagon variation after oral glucose load (●, OGTT, 100 g orally at 0 min), insulin-induced hypoglycaemia (▼, ITT, 0.1 IU/kg insulin i.v. as a bolus at 0 min), intravenous glucagon (○, 1 mg i.v. as a bolus at 0 min), i.v. arginine load (■, 0.5 mg/kg i.v. as an infusion from time 0 min to +30 min) and saline (◇) in six normal young subjects.

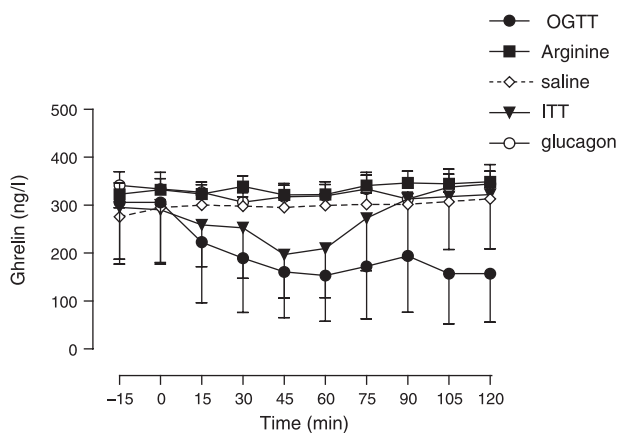


Fig. 2 Mean (\pm SEM) ghrelin variation after oral glucose load (●, OGTT, 100 g orally at 0 min), insulin-induced hypoglycaemia (▼, ITT, 0.1 IU/kg insulin i.v. as a bolus at 0 min), intravenous glucagon (○, 1 mg i.v. as a bolus at 0 min), i.v. arginine load (■, 0.5 mg/kg i.v. as an infusion from time 0 min to +30 min) and saline (◇) in six normal young subjects.

Glucose load was followed by decrease in ghrelin levels, with a nadir level occurring at +60 min (baseline vs. nadir: 305.7 ± 128.5 vs. 153.0 ± 95.2 ng/l; $P < 0.01$; Fig. 1). Oral glucose load obviously increased glucose (baseline vs. peak: 4.29 ± 0.25 vs. 6.91 ± 0.58 mmol/l; $P < 0.01$; peak at time +15 min) and insulin levels (baseline vs. peak: 13.0 ± 2.1 vs. 108.0 ± 19.7 mU/l; $P < 0.01$; peak at time +45 min) while significantly decreasing GH levels (baseline vs. nadir: 0.5 ± 0.3 vs. 0.2 ± 0.0 μ g/l; $P < 0.01$; nadir at time +45 min). No significant change in glucagon levels was recorded after OGTT (Figs 1 and 2). Also, ITT was followed by a significant decrease in circulating ghrelin levels with a nadir at +45 min (baseline vs. nadir: 290.5 ± 110.1 vs. 197.0 ± 90.6 ng/l; $P < 0.01$). ITT was obviously followed by increase in

circulating insulin levels and hypoglycaemia, and also induced the expected increase in GH levels (baseline vs. peak: 4.8 ± 1.6 vs. 35.9 ± 9.7 μ g/l; $P < 0.01$; peak at time +60 min). On the other hand, no significant change in glucagon levels was recorded after ITT although a trend toward an increase was observed at the end of the testing session (Figs 1 and 2).

Intravenous glucagon administration was not followed by any change in circulating total ghrelin levels (baseline vs. nadir: 333.7 ± 35.2 vs. 306.2 ± 19.9 ng/l). Glucagon administration was obviously followed by increase in circulating glucagon levels as well as by the expected increase in glucose (baseline vs. peak: 4.30 ± 0.22 vs. 7.48 ± 0.54 mmol/l; $P < 0.01$; peak at time +30 min) and insulin levels (baseline vs. peak: 14.7 ± 2.4 vs. 78.5 ± 7.6 mU/l; $P < 0.01$; peak at time +15 min). No significant change in GH levels was recorded after intravenous glucagon administration (baseline vs. peak: 1.2 ± 0.7 vs. 2.0 ± 1.2 μ g/l; Figs 1 and 2).

Arginine load also did not induce any change in circulating, total ghrelin levels (baseline vs. nadir: 332.0 ± 23.3 vs. 321.7 ± 20.2 ng/l). As expected, arginine load was followed by an increase in insulin (baseline vs. peak: 15.0 ± 1.0 vs. 60.1 ± 9.3 mU/l; $P < 0.01$; peak at time +30 min), glucagon levels (baseline vs. peak: 156.6 ± 17.3 vs. 258.8 ± 26.3 ng/l; $P < 0.05$; peak at time +30 min) and GH levels (baseline vs. peak: 0.2 ± 0.1 vs. 4.2 ± 1.5 μ g/l; $P < 0.01$; peak at time +60 min). A transient increase in glucose levels was also recorded (baseline vs. peak: 4.24 ± 0.16 vs. 4.68 ± 0.28 mmol/l; $P < 0.05$; peak at time +30 min; Figs 1 and 2).

The evaluation of the hormonal responses to the various tests as area under the curves (AUCs) offered the same results (data not reported). Particularly, the insulin AUCs after OGTT was significantly higher ($P < 0.01$) than those recorded after ITT, glucagon and arginine that were not significantly different. Thus the most remarkable inhibitory effect on ghrelin secretion observed after OGTT was associated with the most prominent increase in circulating insulin levels.

The OGTT- and glucagon-induced increases in glucose AUCs were not significantly different. The glucagon AUCs after intravenous injection of glucagon was similar to that recorded after arginine load; both were higher than those after OGTT and ITT, which were not significantly different. The GH AUC recorded after ITT was higher than that after arginine load ($P < 0.01$).

Side-effects

No side-effects were recorded after placebo as well as oral glucose load. Arginine administration was followed by transient and mild nausea in two subjects. Similarly, glucagon administration was followed by transient and mild nausea in two subjects. ITT was followed by the classical hypoglycaemic symptoms (hunger, sweating, tremor, restlessness, palpitations), which did not require any medication and disappeared spontaneously.

Discussion

The results of the present study in humans show that ghrelin secretion is not modified by glucagon and arginine, two well-known insulin secretagogues, despite being inhibited by either OGTT-induced hyperglycaemia or ITT. On the other hand, ghrelin secretion is not associated with the GH response to ITT and arginine, making it unlikely that the somatotroph response to these stimuli is mediated by ghrelin.

The natural GH secretagogue ghrelin, as well as leptin, has been proposed as a peripheral hormone signalling to the brain the metabolic balance and contributing to the management of the neuroendocrine and metabolic response to starvation (Muccioli *et al.*, 2002; Yoshihara *et al.*, 2002; Cummings & Schwartz, 2003). Besides its central orexigenic action, ghrelin also exerts peripheral metabolic actions consistent with the widespread distribution of GHS receptors that are also expressed in the endocrine pancreas (Gnanapavan *et al.*, 2002; Muccioli *et al.*, 2002). In fact, it has been demonstrated by both animal and human studies that ghrelin is able to affect insulin secretion as well as glucose and lipid metabolism (Muccioli *et al.*, 2002; Broglio *et al.*, 2003b; Choi *et al.*, 2003; Reimer *et al.*, 2003; Ukkola, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

Regarding the regulation of ghrelin secretion, this has been clearly demonstrated to be negatively associated with insulin secretion (Cummings *et al.*, 2001; Mohlig *et al.*, 2002; Saad *et al.*, 2002; Broglio *et al.*, 2003b; Flanagan *et al.*, 2003; Reimer *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 2003; Ukkola, 2003) and even to insulin resistance (Lucidi *et al.*, 2002; Broglio *et al.*, 2003b; Poykko *et al.*, 2003; Purnell *et al.*, 2003). Indeed, ghrelin secretion had been shown to be reduced by insulin infusion during an euglycaemic clamp (Lucidi *et al.*, 2002) as well as by ITT (Lucidi *et al.*, 2002; Flanagan *et al.*, 2003). However, ghrelin secretion has been also shown paradoxically to be inhibited by either oral

and intravenous glucose load (Lucidi *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002; Shiiya *et al.*, 2002; Flanagan *et al.*, 2003). The inhibition of ghrelin secretion following OGTT-induced hyperglycaemia as well as ITT is fully confirmed also by our present study where both the OGTT and ITT reduced circulating ghrelin levels to the same extent (approximately 40%).

Whether insulin and hyperglycaemia directly inhibit ghrelin secretion is, however, still a matter of debate (Caixas *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 2003). In fact, some authors hypothesized that the inhibitory influence of insulin and hyperglycaemia on ghrelin secretion is more likely reflecting an indirect action (Caixas *et al.*, 2002; Schaller *et al.*, 2003). To address this point further, we studied the effects of glucagon and arginine, two well-known insulin secretagogues that also induce different degrees of hyperglycaemia (Cryer, 2003), on circulating total ghrelin concentrations. By comparing the effects, if any, of glucagon and arginine with those of OGTT-induced hyperglycaemia and ITT we were expecting to understand better ghrelin regulation, with particular attention to the role of insulin and glycaemia. Moreover, the role of glucagon and amino acids in the regulation of ghrelin secretion is still unclear, at least in humans (Lee *et al.*, 2002; Groschl *et al.*, 2003; Kishimoto *et al.*, 2003; Moran *et al.*, 2003; Broglio *et al.*, 2004; Kamegai *et al.*, 2004).

Our findings show that neither glucagon nor arginine modify ghrelin secretion in humans. We cannot rule out the possibility that increasing the doses of glucagon and arginine would allow us to show that these factors have some influence on ghrelin secretion, although the arginine dose we administered is generally considered maximal (Ghigo *et al.*, 1998).

The influence of amino acids on ghrelin secretion was still controversial (Lee *et al.*, 2002; Groschl *et al.*, 2003; Moran *et al.*, 2003); in particular, to our knowledge, no study has previously addressed the role of arginine *per se*, if any, and our study makes it unlikely that it has any relevant influence.

Indeed, glucagon has been proposed as a factor able to stimulate ghrelin expression and secretion based on studies in animal models, i.e. ghrelin expression in the rat stomach and secretion from perfused rat stomach under prolonged exposure to glucagon (Kishimoto *et al.*, 2003; Kamegai *et al.*, 2004). The absence of any effect of a high dose of glucagon in humans would also reflect the acute administration performed in our present study.

The lack of any effect of glucagon and arginine administration on circulating total ghrelin levels was apparent despite these factors inducing an increase in circulating insulin levels similar to that recorded after ITT. This evidence seems in agreement with other studies questioning the hypothesis that insulin *per se* plays a direct inhibitory role on ghrelin secretion (Lucidi *et al.*, 2002; Mohlig *et al.*, 2002; Saad *et al.*, 2002; Flanagan *et al.*, 2003; Murdolo *et al.*, 2003). On the other hand, the circulating insulin levels observed after glucagon, arginine and ITT were lower, in terms of AUCs, than that recorded after OGTT; this latter insulin

response to OGTT was associated with an inhibition of ghrelin secretion that seemed more long-lasting. Thus, the possibility that insulin has some direct inhibitory effect on ghrelin synthesis and secretion cannot be definitely ruled out, in agreement with some studies *in vitro* (Kamegai *et al.*, 2004; Lippl *et al.*, 2004).

It appears more likely that glucose *per se* is not directly regulating ghrelin secretion, in agreement with some previous studies in humans (Lucidi *et al.*, 2002; Broglio *et al.*, 2003b; Schaller *et al.*, 2003) as well as in animals (McCowen *et al.*, 2002; Reimer *et al.*, 2003). In fact, ghrelin levels are reduced to the same extent after either OGTT-induced hyperglycaemia or ITT (Lucidi *et al.*, 2002; Flanagan *et al.*, 2003; Gottero *et al.*, 2003; Broglio *et al.*, 2004; present data). Moreover, ghrelin secretion is inhibited by OGTT but not by glucagon despite the fact that administration of the latter induces a similar increase in plasma glucose levels. Again, it has also been demonstrated that ghrelin secretion is negatively associated with body mass independently of the presence of diabetes mellitus (Shiyya *et al.*, 2002).

Another aspect arising from our findings is that the GH response to arginine as well as that to ITT was not associated with any increase in ghrelin secretion, thus suggesting that the somatotroph response to these stimuli is not mediated by ghrelin. That the GH as well as the counter-regulatory response to ITT is coupled to ghrelin decrease and therefore unlikely mediated by this gastric hormone had been already demonstrated (Lucidi *et al.*, 2002). Ghrelin secretion is negatively associated to body mass, being increased in anorexia and decreased in obesity, two conditions associated with GH hyper- and hypo-secretion, respectively (Cummings *et al.*, 2001; Otto *et al.*, 2001; Tschop *et al.*, 2001b; Shiyya *et al.*, 2002; Ukkola, 2003). Moreover, it has been hypothesized that ghrelin mediates the fasting-induced GH increase (Muller *et al.*, 2002); the latter, however, is an experimental model not comparable with ITT (Lucidi *et al.*, 2002). Despite this, the physiological role, if any, of ghrelin in the control of GH secretion is still a matter of debate and some studies in humans as well as in animals indicate that ghrelin is unlikely to have a major role (Popovic *et al.*, 1995; Tolle *et al.*, 2002; Barkan *et al.*, 2003). In all, our present data indicate that the GH response to arginine as well as to ITT is unlikely to be mediated by ghrelin. The decrease in ghrelin secretion after OGTT was associated with the well-known inhibitory effect of hyperglycaemia on GH secretion (Valcavi, 1996); once again, however, the decrease in OGTT-induced GH decrease anticipated that in ghrelin levels, making it unlikely that the inhibitory effect of hyperglycaemia on GH secretion is also mediated by ghrelin inhibition.

Finally, intravenous glucagon administration induced the well-known variations in insulin and glucose levels but no change in ghrelin secretion or even in GH secretion. This finding would seem strange considering that intramuscular glucagon is a well-known and reliable provocative stimulus of GH secretion (Rahim *et al.*, 1996; Aimaretti *et al.*, 2000) widely used for the diagnosis

of GH deficiency. However, it has been clearly demonstrated that intravenous glucagon administration is devoid of any stimulatory effect on GH secretion, indicating that glucagon *per se* is not a true GH secretagogue (Ghigo *et al.*, 1994).

In conclusion, the results of the present study show that ghrelin secretion in humans is inhibited by OGTT-induced hyperglycaemia and ITT but is unaffected by glucagon and arginine, two substances able to increase insulin and glucose levels. These findings further question the assumption that glucose and insulin directly regulate ghrelin secretion.

Acknowledgements

The present study was supported by Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica (MURST), Eureka (Peptido project 1923), SMEM Foundation and Theratechnologies. The skilful technical assistance of Dr A. Rapa, D. Vivenza, P. van Koetsveld, A. Bertagna, A. Barberis and M. Taliano is acknowledged. The research activity of Fabio Broglio at the Division of Endocrinology and Metabolism of the Erasmus University of Rotterdam is supported by a grant of the GH/IGF-I Society.

References

- Aimaretti, G., Baffoni, C., DiVito, L., Bellone, S., Grotto, S., Maccario, M., Arvat, E., Camanni, F. & Ghigo, E. (2000) Comparison among old and new provocative tests of GH secretion in 178 normal adults. *European Journal of Endocrinology*, **142**, 347–352.
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., Shirakami, G., Usui, T., Shimatsu, A., Doi, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K. & Nakao, K. (2001) Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 4753–4758.
- Arosio, M., Ronchi, C.L., Gebbia, C., Cappiello, V., Beck-Peccoz, P. & Peracchi, M. (2003) Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 701–704.
- Barkan, A.L., Dimaraki, E.V., Jessup, S.K., Symons, K.V., Ermolenko, M. & Jaffe, C.A. (2003) Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 2180–2184.
- Broglio, F., van Koetsveld, P., Benso, A., Gottero, C., Prodham, F., Papotti, M., Muccioli, G., Gauna, C., Hofland, L., Deghenghi, R., Arvat, E., van der Lely, A.J. & Ghigo, E. (2002) Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 4829–4832.
- Broglio, F., Benso, A., Gottero, C., Prodham, F., Gauna, C., Filtri, L., Arvat, E., van der Lely, A.J., Deghenghi, R. & Ghigo, E. (2003a) Non-acylated ghrelin does not possess the pituitary and pancreatic endocrine activity of acylated ghrelin in humans. *Journal of Endocrinological Investigation*, **26**, 192–196.
- Broglio, F., Gottero, C., Benso, A., Prodham, F., Volante, M., Destefanis, S., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J. & Ghigo, E. (2003b) Ghrelin and the endocrine pancreas. *Endocrine*, **22**, 19–24.

- Broglio, F., Prodam, F., Gottero, C., Destefanis, S., Me, E., Riganti, F., Giordano, R., Picu, A., Balbo, M., van der Lely, A.J., Ghigo, E. & Arvat, E. (2004) Ghrelin does not mediate the somatotroph and corticotroph responses to the stimulatory effect of glucagon or insulin-induced hypoglycaemia in humans. *Clinical Endocrinology*, **60**, 699–704.
- Caixas, A., Bashore, C., Nash, W., Pi-Sunyer, F. & Laferrère, B. (2002) Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 1902.
- Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Weingarth, D.T., Adams, J.R., Frazier, E.G., Shen, Z., Marsh, D.J., Feighner, S.D., Guan, X.M., YeZ., Nargund, R.P., Smith, R.G., Van Der Ploeg, L.H., Howard, A.D., MacNeil, D.J. & Qian, S. (2004) Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide y and agouti-related protein. *Endocrinology*, **145**, 2607–2612.
- Choi, K., Roh, S.G., Hong, Y.H., Shrestha, Y.B., Hishikawa, D., Chen, C., Kojima, M., Kangawa, K. & Sasaki, S. (2003) The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*, **44**, 754–759.
- Cryer, P.E. (2003) Glucose homeostasis and hypoglycemia. In: *Williams Textbook of Endocrinology*, 10th edn. (eds P. R. Larsen, H. M. Kronenberg, S. Melmed & K. S. Polonsky), pp. 1585–1618. Elsevier Science, Philadelphia.
- Cummings, D.E. & Schwartz, M.W. (2003) Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annual Review of Medicine*, **54**, 453–471.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E. & Weigle, D.S. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, **50**, 1714–1719.
- Cummings, D.E., Clement, K., Purnell, J.Q., Vaisse, C., Foster, K.E., Frayo, R.S., Schwartz, M.W., Basdevant, A. & Weigle, D.S. (2002a) Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nature Medicine*, **8**, 643–644.
- Cummings, D.E., Weigle, D.S., Frayo, R.S., Breen, P.A., Ma, M.K., Dellinger, E.P. & Purnell, J.Q. (2002b) Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *New England Journal of Medicine*, **346**, 1623–1630.
- DelParigi, A., Tschop, M., Heiman, M.L., Salbe, A.D., Vozarova, B., Sell, S.M., Bunt, J.C. & Tataranni, P.A. (2002) High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 5461–5464.
- Flanagan, D.E., Evans, M.L., Monsod, T.P., Rife, F., Heptulla, R.A., Tamborlane, W.V. & Sherwin, R.S. (2003) The influence of insulin on circulating ghrelin. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, **284**, E313–E316.
- Ghigo, E., Arvat, E., Aimaretti, G., Broglio, F., Giordano, R. & Camanni, F. (1998) Diagnostic and therapeutic uses of growth hormone-releasing substances in adult and elderly subjects. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*, **12**, 341–358.
- Ghigo, E., Bartolotta, E., Imperiale, E., Bellone, J., Cardinale, G., Aimaretti, G., Valetto, M.R., Cherubini, V., Maccario, M., Cocchi, D. & Camanni, F. (1994) Glucagon stimulates GH secretion after intramuscular but not intravenous administration. Evidence against the assumption that glucagon *per se* has a GH-releasing activity. *Journal of Endocrinological Investigation*, **17**, 849–854.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A.B. & Korbonits, M. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 2988–2991.
- Gottero, C., Bellone, S., Rapa, A., van Koetsveld, P., Vivenza, D., Prodam, F., Benso, A., Destefanis, S., Gauna, C., Bellone, J., Hofland, L., van der Lely, A.J., Bona, G., Ghigo, E. & Broglio, F. (2003) 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. *Journal of Endocrinological Investigation*, **26**, 1203–1207.
- Groschl, M., Knerr, I., Topf, H.G., Schmid, P., Rascher, W. & Rauh, M. (2003) Endocrine responses to the oral ingestion of a physiological dose of essential amino acids in humans. *Journal of Endocrinology*, **179**, 237–244.
- Hagg, A.M., Stadler, D.D., Rosenfeld, R.G., Pratt, K.L., Weigle, D.S., Frayo, R.S., LaFranchi, S.H., Cummings, D.E. & Purnell, J.Q. (2003) Circulating ghrelin levels are suppressed by meals and octreotide therapy in children with Prader Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 3573–3576.
- Kalra, S.P. & Kalra, P.S. (2003) Neuropeptide Y: a physiological orexigen modulated by the feedback action of ghrelin and leptin. *Endocrine*, **22**, 49–56.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H. & Oikawa, S. (2004) Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regulation Peptide*, **119**, 77–81.
- Kishimoto, M., Okimura, Y., Nakata, H., Kudo, T., Iguchi, G., Takahashi, Y., Kaji, H. & Chihara, K. (2003) Cloning and characterization of the 5'(-)-flanking region of the human ghrelin gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **305**, 186–192.
- Kojima, M., Hosoda, H. & Kangawa, K. (2001) Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Hormone Research*, **56**, 93–97.
- Lee, H.M., Wang, G., Englander, E.W., Kojima, M. & Greeley, G.H. Jr (2002) Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*, **143**, 185–190.
- Lippl, F., Kircher, F., Erdmann, J., Allescher, H.D. & Schudsziarra, V. (2004) Effect of GIP, GLP-1, insulin and gastrin on ghrelin release in the isolated rat stomach. *Regulation Peptide*, **119**, 93–98.
- Lucidi, P., Murdolo, G., Di Loreto, C., De Cicco, A., Parlanti, N., Fanelli, C., Santeusano, F., Bolli, G.B. & De Feo, P. (2002) Ghrelin is not necessary for adequate hormonal counterregulation of insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes*, **51**, 2911–2914.
- McCowen, K.C., Maykel, J.A., Bistrain, B.R. & Ling, P.R. (2002) Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *Journal of Endocrinology*, **175**, R7–R11.
- Mohlig, M., Spranger, J., Otto, B., Ristow, M., Tschop, M. & Pfeiffer, A.F. (2002) Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *Journal of Endocrinological Investigation*, **25**, RC36–RC38.
- Moran, L.J., Noakes, M., Clifton, P.M., Wittert, G., Tomlinson, L., Galletly, C., Luscombe, N., Tomlinson, L. & Norman, R.J. (2003) Ghrelin and measures of satiety are altered in polycystic ovary syndrome but not differentially affected by diet composition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **12**, S52.
- Muccioli, G., Tschop, M., Papotti, M., Deghenghi, R., Heiman, M. & Ghigo, E. (2002) Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European Journal of Pharmacology*, **440**, 235–254.
- Muller, A.F., Lamberts, S.W., Janssen, J.A., Hofland, L.J., van Koetsveld, P., Bidlingmaier, M., Strasburger, C.J., Ghigo, E. & van der Lely, A.J. (2002) Ghrelin drives GH secretion during fasting in man. *European Journal of Endocrinology*, **146**, 203–207.
- Murdolo, G., Lucidi, P., Di Loreto, C., Parlanti, N., De Cicco, A., Fatone, C.,

- Fanelli, C.G., Bolli, G.B., Santeusano, F. & De Feo, P. (2003) Insulin is required for prandial ghrelin suppression in humans. *Diabetes*, **52**, 2923–2927.
- Nakagawa, E., Nagaya, N., Okumura, H., Enomoto, M., Oya, H., Ono, F., Hosoda, H., Kojima, M. & Kangawa, K. (2002) Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clinical Science*, **103**, 325–328.
- Norrelund, H., Hansen, T.K., Orskov, H., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Weeke, J., Moller, N., Christiansen, J.S. & Jorgensen, J.O. (2002) Ghrelin immunoreactivity in human plasma is suppressed by somatostatin. *Clinical Endocrinology*, **57**, 539–546.
- Otto, B., Cuntz, U., Fruehauf, E., Wawarta, R., Folwaczny, C., Riepl, R.L., Heiman, M.L., Lehnert, P., Fichter, M. & Tschop, M. (2001) Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology*, **145**, 669–673.
- Popovic, V., Damjanovic, S., Micic, D., Djurovic, M., Dieguez, C. & Casanueva, F.F. (1995) Blocked growth hormone-releasing peptide (GHRP-6)-induced GH secretion and absence of the synergic action of GHRP-6 plus GH-releasing hormone in patients with hypothalamopituitary disconnection: evidence that GHRP-6 main action is exerted at the hypothalamic level. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **80**, 942–947.
- Poykko, S.M., Kellokoski, E., Horkko, S., Kauma, H., Kesaniemi, Y.A. & Ukkola, O. (2003) Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes*, **52**, 2546–2553.
- Purnell, J.Q., Weigle, D.S., Breen, P. & Cummings, D.E. (2003) Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 5747–5752.
- Rahim, A., Toogood, A.A. & Shalet, S.M. (1996) The assessment of growth hormone status in normal young adult males using a variety of provocative agents. *Clinical Endocrinology*, **45**, 557–562.
- Reimer, M.K., Pacini, G. & Ahren, B. (2003) Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*, **144**, 916–921.
- Saad, M.F., Bernaba, B., Hwu, C.M., Jinagouda, S., Fahmi, S., Kogosov, E. & Boyadjian, R. (2002) Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 3997–4000.
- Schaller, G., Schmidt, A., Pleiner, J., Woloszczuk, W., Wolzt, M. & Luger, A. (2003) Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled cross-over clamp study. *Diabetes*, **52**, 16–20.
- Shiiba, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M.S., Tanaka, M., Nozoe, S., Hosoda, H., Kangawa, K. & Matsukura, S. (2002) Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 240–244.
- Shimada, M., Date, Y., Mondal, M.S., Toshinai, K., Shimbara, T., Fukunaga, K., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., Yoshimatsu, H., Matsuo, H. & Nakazato, M. (2003) Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **302**, 520–525.
- Smith, R.G., Leonard, R., Bailey, A.R., Palyha, O., Feighner, S., Tan, C., McKee, K.K., Pong, S.S., Griffin, P. & Howard, A. (2001) Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine*, **14**, 9–14.
- Tolle, V., Bassant, M.H., Zizzari, P., Poindessous-Jazat, F., Tomasetto, C., Epelbaum, J. & Bluet-Pajot, M.T. (2002) Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behaviour, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology*, **143**, 1353–1361.
- Tschop, M., Wawarta, R., Riepl, R.L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R. & Folwaczny, C. (2001a) Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigation*, **24**, RC19–RC21.
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., Devanarayan, V., Ravussin, E. & Heiman, M.L. (2001b) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, **50**, 707–709.
- Ukkola, O. (2003) Ghrelin and insulin metabolism. *European Journal of Clinical Investigation*, **33**, 183–185.
- Valcavi, R. (1996) Oral glucose tolerance test: an inhibitory or a stimulatory input to growth hormone secretion? *Journal of Endocrinological Investigation*, **19**, 253–255.
- Yoshihara, F., Kojima, M., Hosoda, H., Nakazato, M. & Kangawa, K. (2002) Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **5**, 391–395.
- Zhang, W., Zhao, L., Lin, T.R., Chai, B., Fan, Y., Gantz, I. & Mulholland, M.W. (2004) Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 2484–2491.

CLINICAL STUDY

Ghrelin gene polymorphisms and ghrelin, insulin, IGF-I, leptin and anthropometric data in children and adolescents

D Vivenza, A Rapa, N Castellino, S Bellone, A Petri, G Vacca¹, G Aimaretti², F Broglio² and G Bona

Units of Pediatrics and ¹Physiology, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, 28100 Novara, and ²Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Turin, 10126 Turin, Italy

(Correspondence should be addressed to G Bona; Email: gianni.bona@maggioreosp.novara.it)

Abstract

Background: Previous investigations on the ghrelin gene reported three common polymorphisms (Arg51Gln, Leu72Met, and Gln90Leu), but their role in overweight and obese individuals remains to be clarified.

Objective: To ascertain whether these genetic variants could influence ghrelin secretion and play a part in predisposing to earlier onset of obesity or in modulating the overweight phenotype in childhood.

Design and methods: Mutational analysis of the entire ghrelin gene and total and acylated plasma determinations were performed in 81 obese or overweight children and adolescents (46 were obese and 35 overweight: Ob/Ow). We also recruited 168 normal-weight healthy controls (72 young adults and 96 children) for mutational or plasma ghrelin analysis.

Results: Median total and acylated plasma ghrelin concentrations were significantly lower in Ob/Ow individuals than in controls (175 pg/ml compared with 345 pg/ml, $P < 0.0001$, and 95 pg/ml compared with 114 pg/ml, $P < 0.0001$, respectively). The ghrelin gene variants showed similar allele frequencies in the Ob/Ow individuals and in controls; in the former, they were not associated with any change in total and acylated circulating ghrelin concentrations or anthropometric data. The Leu72Met status was associated with a positive family history for obesity (75% for Leu72Met compared with 39% for Leu72Leu, $P = 0.03$) and with a greater percentage of newborns born 'large for gestational age' (33% for Leu72Met compared with 5% for Leu72Leu, $P = 0.03$), but in the control group it was related to a lower mean body mass index z-score (-0.03 for Leu72Met and -0.47 for Leu72Leu, $P = 0.04$).

Conclusion: Our present findings do not support the hypothesis that the ghrelin gene polymorphisms have a relevant impact in the secretion of total and acylated ghrelin.

European Journal of Endocrinology 151 127–133

Introduction

Ghrelin, a recently described endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor type 1a (GHS-R1a) (1) is a strong stimulator of growth hormone release (2), but may act also as potent appetite-stimulating hormone (3). The human ghrelin gene is located on chromosome 3, at locus 3p25–26, and consists of 4 exons and 3 introns (4). The major product is a 28 amino acid peptide acylated with an *n*-octanoyl at Ser at position 3. Post-transductional mechanisms yield different isoforms of ghrelin, which either are acylated at Ser with a decanoyl or decenoyl group, or have a deletion of the C-terminal Arg at position 28 (5). The *n*-acyl addition is essential for its binding to the receptor and for its biological activity (6).

Ghrelin is mostly secreted by the X/A-like cells in the gastric fundus (7), although it is also expressed in

bowel, pancreas, kidney, gonads, placenta, hypothalamus and pituitary gland (1, 8–13). Plasma ghrelin is mostly des-acylated and inactive at the hypothalamus (14), whereas at this site acylated ghrelin influences neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (AGRP) neurones in the arcuate nucleus (7, 15). In bone marrow, des-acylated ghrelin has a direct adipogenic action (16). Chronic administration of ghrelin increases food intake and body weight, and decreases energy expenditure, whereas acute treatment stimulates the secretion of growth hormone both in rodents and in humans (3, 17). Stimulation of appetite and food intake after acute administration of ghrelin has been shown in humans (17). Normal fluctuations of circulating ghrelin may have a major impact on food intake, as ghrelin peaks precede meals (18). This suggests that derangement in the ghrelin system could have a role in obesity. However, ghrelin secretion

is negatively associated with body weight and insulin secretion (19, 20) and obese individuals generally have significantly lower circulating ghrelin concentrations than lean controls (21). A notable exception to this negative association between ghrelin concentrations and body weight is represented by Prader–Willi syndrome which, although generally characterised by obesity, has the feature of absolutely or relatively increased ghrelin concentrations (22). Thus it has been suggested that, at least in some cohorts of dysgenetic patients, genetic alterations in the ghrelin system would play a part in the pathogenesis of obesity and eating disorders (23).

Previous studies on ghrelin genetic variants provided contradictory findings as to their role in obesity (24). Three polymorphisms have been described (25, 26): a single base substitution G152A, with Gln replacing Arg at codon 28 of mature ghrelin, C214A with Met replacing Leu at codon 72, or A269T with Leu replacing Gln at codon 90 in the prepro-ghrelin. The 72Met variant seems to be associated with an earlier onset of obesity (25), but it has been proposed that, later, 72Met could be protective against the accumulation of fat (24). The aim of our study was to test whether genetic variants in the ghrelin gene could play a part in predisposing to early onset of obesity or be associated with anthropometric data and secretion of total and acylated ghrelin, leptin, insulin or insulin-like growth factor (IGF)-I in overweight and obese children, and to compare them in control children with normal weight.

Materials and methods

Study participants

A total of 249 unrelated Caucasian individuals were recruited for this study and were divided in two groups. The first group consisted of 81 obese or overweight (46 were obese and 35 overweight: Ob/Ow) children and adolescents (M/F 40/41; median age 10.1 years, range 2.4–15.9 years; mean body mass index (BMI) 28.42 ± 5.47 kg/m²). They were tested before the beginning of treatment by diet, undergoing a complete investigation to exclude endocrine and central nervous system disorders, hypothalamic tumours and

genetic syndromes. According to the Italian reference charts for BMI, obesity was defined when BMI exceeded the 99th centile for sex and age, and overweight was defined when BMI was between the 85th and the 99th centiles. Among the Ob/Ow children and adolescents, 86% were still obese or overweight after 1 year of dieting treatment. The second group consisted of 168 healthy normal-weight controls (72 young adults and 96 children) recruited among our Medical School students, staff and children or adolescents referred for regular health check-ups, with no history of obesity in childhood (Table 1). All 96 normal-weight children were enrolled as controls for plasma ghrelin determination, and 18 of them were also available for analysis of the ghrelin gene. Seventy-two young adults were enrolled as controls only for mutational analysis of the ghrelin gene.

All weight and height data were measured by two trained examiners. BMI was calculated as body weight divided by height squared (kg/m²). The BMI of each individual was converted by the LMS method (summarises the data in terms of three smooth age specific curves called L (lamda), M (mu) and S (sigma)) to a standard BMI z-score for the child's age, using Italian reference tables (27). The Ob/Ow and normal-weight groups were matched for age and pubertal development, the latter evaluated according to Tanner (28). Data on gestational age, weight at birth and at 1 year of age, age at onset of obesity, family history for obesity, and eating disorders were collected for obese children by means of a semi-structured interview. Babies with a birth weight for gestational age and sex greater than the 97th centile of the Neonatal Italian Standards (29) were defined as 'large for gestational age'. A positive family history for obesity identified families in which at least one close relative (parents, brothers and sisters) expressed obesity.

The study was approved by the Ethics Committee of our hospital, and written informed consent was obtained from all participants and parents of children.

Blood samples were drawn from the 81 Ob/Ow and the 96 normal-weight children and adolescents after an overnight fast and were immediately mixed with aprotinin (0.6 TIU/ml) to inhibit protease activity, centrifuged at 1600 *g* for 15 min at 4 °C and stored at –80 °C until tested for total ghrelin, leptin, insulin

Table 1 Baseline characteristics of study participants. Age is expressed as median (range), BMI z-score as mean \pm s.d.

	Obese children (n = 46)	Overweight children (n = 35)	Normal-weight children (n = 96)	Normal-weight young adults (n = 72)
Males/females	27/19	13/22	33/63	15/57
Age (years)	10.3 (2.4–15.9)	10 (5.9–15.6)	9.4 (1.5–16.9)	27.5 (22–36)
BMI z-score	2.61 \pm 0.51	1.77 \pm 0.28	–0.27 \pm 0.96	–0.11 \pm 0.76
LGA/AGA	6/40	2/33	ND	ND
Positive/negative family history for obesity	32/14	16/19	ND	ND

LGA, large for gestational age; AGA, adequate for gestational age; ND, not done.

and IGF-I concentrations. Blood samples for the measurement of acylated ghrelin concentrations were drawn in 57 Ob/Ow and in 44 normal-weight children and adolescents as described above.

Blood samples were collected for DNA extraction from all 81 Ob/Ow individuals and 90 normal-weight individuals (72 adults and 18 children).

Mutational analysis of the ghrelin gene

DNA was extracted from peripheral white cells by the salting-out procedure (30). For the Ob/Ow individuals, the entire prepro-ghrelin coding region, part of the 5'-UTR and part of the 3'-UTR were analysed by direct sequencing using the ABI Prism 3100 DNA Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), whereas for all the healthy normal-weight individuals the mutational screening was performed by a wave-denaturing high-performance liquid chromatography system (Wave, Transgenomic, Santa Clara, CA, USA), followed by subsequent direct sequencing of the positive heteroduplex samples. The product was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) technique. Two primers for each of the four exons that encode for the prepro-hormone were designed to include non-coding regions. Their sequences were as follows:

Exon 1: forward primer, 5'-AGGCACATGAGAAGGGAG-3'; reverse primer, 5'-TGAGGTCAGACCCAGAGTCC-3' = 322 bp GHR1-amplicon.

Exon 2: forward primer, 5'-TCTGGGCTTCAGTCTTCTCC-3'; reverse primer, 5'-CTGTTCAGTCCACCTCTCC-3' = 315 bp GHR2-amplicon.

Exon 3: forward primer, 5'-CCTGAAGAGAGGCAGAGAGC-3'; reverse primer, 5'-CAGAGGTTGGGGAAAACTCA-3' = 292 bp GHR3-amplicon.

Exon 4: forward primer, 5'-TCACCACCGTGAAGA-AAAG-3'; reverse primer, 5'-ATTCGCCTCTGAGCTTGTA-3' = 200 bp GHR4-amplicon.

The PCR amplification was carried out in a volume of 30 μ l, containing 200 ng DNA, 20 pmol each primer, 0.1 mmol/l each of the dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech Inc., New Jersey, NJ, USA) and 0.75 unit AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems). Each PCR was performed at 95 °C for 6 min, followed by 36 cycles at 95 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s, and one cycle at 72 °C for 5 min, using a thermal cycler DNA (Techne, Cambridge, UK). Both the size of the primers and their position in the ghrelin genomic sequence (GenBank Accession Number: AF296558) were designed to include the splicing sites and for optimal detection by Wave DHPLC.

Ghrelin and hormone measurements

Total plasma ghrelin (acylated and des-acylated) was measured by RIA (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, USA) after plasma extraction in reverse-phase C18 columns. One millilitre plasma was loaded onto

pre-equilibrated C18 columns (Strata, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The columns were washed with 6 ml 1% trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, Milano, Italy) and eluted with 3 ml 60% acetonitrile (Sigma-Aldrich) in 1% trifluoroacetic acid. The eluant was dried and dissolved in 1 ml RIA buffer. Reconstituted samples were then measured in duplicate in the competitive RIA. Based on our data, sensitivity was 3 pg/tube and the intra-assay coefficient of variation (CV) was 3.9% at 14 pg/tube and 4.9% at 95 pg/tube.

The acylated form of ghrelin was measured by a competitive radioimmunoassay (Linco Research, Inc., St Charles, MO, USA) using a specific antibody for the biologically active form of ghrelin with the acyl group on Ser 3. When 100 μ l plasma was used, sensitivity was 10 pg/ml and intra-assay CV was 9.4% at 62 pg/ml and 5.9% at 232 pg/ml. The specificity of the test was 100% for human ghrelin and <0.1% for des-acylated ghrelin.

Insulin was measured by chemiluminescent enzyme-labelled immunometric assay (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). Sensitivity was 2 μ IU/ml. The intra-assay and interassay CV were 2.5–8.3% and 4.4–8.6% respectively. IGF-I was measured in duplicate by a two-site radioimmunoassay (Diagnostic System Laboratories Inc., Webster, TX, USA) after an acid-ethanol extraction. Sensitivity was 0.8 ng/ml. The intra-assay and interassay CV were 1.5–3.4% and 1.5–8.2%. Leptin was measured in duplicate by RIA using a commercially available kit (Linco Research Inc.). The sensitivity was 0.5 ng/ml. The intra-assay and interassay CV were 3.4–8.3% and 3.0–6.2%.

Statistical analysis

Two-sided χ^2 -test was used to assess whether the observed genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. Insulin, IGF-I and BMI data are expressed as mean \pm s.d. Because leptin and ghrelin concentrations were skewed towards low values, data for leptin and total and acylated ghrelin were expressed as median and interquartile range (IQR). The influence of genetic variants of the ghrelin gene on total and acylated plasma ghrelin concentrations and on the age at onset of obesity was assessed by the Mann-Whitney *U* and the Kruskal-Wallis analysis of variance tests, and the influence on BMI *z*-score at diagnosis was assessed by Student's *t*-test. The influence of the three polymorphisms of the prepro-ghrelin gene on birth weight corrected for gestational age and family history for obesity was tested by χ^2 and Fisher's exact test. To study the influence of the Leu72Met polymorphism on hormone concentrations controlled for age at onset of obesity, sex and BMI *z*-score, we used general linear models. We report multiple *R* and β coefficient with 95% confidence interval (CI) for significantly independent variables according to sigma-restricted

parameterisation. All the analyses were performed with Statistica 6.0 software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) and a *P* value less than 0.05 was accepted as statistically significant.

Results

Genetic analysis

Heterozygous genotypes for the three polymorphisms (Arg51Gln, Leu72Met and Gln90Leu) were found in 81 Ob/Ow children and adolescents and 90 controls. Frequencies for the 51 Gln allele in Ob/Ow individuals and in normal-weight controls were 0.0062 and 0.0055 respectively ($P = 1.0$), those for the 72Met allele were 0.074 and 0.078 ($P = 0.89$), and those for the 90Leu allele were 0.037 and 0.033 ($P = 0.85$). The allele frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium. Genotype distributions in Ob/Ow and normal-weight children are shown in Table 2.

Similarly, when data for the 46 obese and the 35 overweight children were analysed separately, no difference in allele frequencies was found between them. Frequencies for the 51 Gln allele in obese and in overweight children were 0.011 and 0 respectively ($P = 1.0$), those for the 72Met allele were 0.076 and 0.071 ($P = 0.9$), and those for the 90Leu allele were 0.043 and 0.029 ($P = 0.7$).

New single nucleotide substitutions were also identified: a C/T transition was found at position –36 bp in the 5'-UTR in one Ob/Ow and in one normal-weight individual; a G/A transition was found at position 412 in the 3'-UTR in one Ob/Ow child and a C/T silent mutation was found at position 315 in the third coding exon (codon 105 (ATC → ATT)) of the prepro-ghrelin gene in one normal-weight individual.

Ghrelin and hormone concentrations

Median (IQR) total plasma ghrelin concentration in 81 Ob/Ow children was 175 (138–276) pg/ml, significantly less than that in 96 control children and adolescents, in whom it was 345 (202–531) pg/ml ($P < 0.0001$, Mann–Whitney *U* test). Similarly, concentrations of acylated ghrelin were significantly lower in 57 Ob/Ow children than in 44 normal-weight children (95 (77–114) pg/ml compared with 114 (98–138) pg/ml; $P < 0.0001$), and the ratio of

acylated to total ghrelin was significantly greater in Ob/Ow individuals than in normal-weight children (43 (33–74)% compared with 28 (20–47)%; $P = 0.0003$).

Total ghrelin was negatively correlated with age and pubertal development both in Ob/Ow individuals and in normal weight children (data not shown).

Total and acylated ghrelin concentrations and the acylated/total ghrelin ratio were similar when Leu72Met was compared with Leu72Leu, and when Gln90Leu was compared with Gln90Gln in Ob/Ow children and adolescents (Table 3). The lowest values of total and acylated plasma ghrelin (45 and 39 pg/ml respectively) were found in an obese girl with the Arg51Gln substitution.

No statistically significant differences in leptin, insulin and IGF-I concentrations were found when Leu72Met was compared with Leu72Leu and when Gln90Leu was compared with Gln90Gln Ob/Ow children and adolescents (Table 4). However, a multiple design showed that, in the Ob/Ow group, mean IGF-I adjusted for age, sex and BMI *z*-score was 393 ± 42 ng/ml in Leu72Met carriers and 266 ± 17 ng/ml in Leu72Leu carriers (multiple $R = 0.72$, $P < 0.0001$; β coefficient for Leu72Met status = 0.28, 95% CI 0.08 to 0.49, $P = 0.008$; β coefficient for age = 0.69, 95% CI 0.47 to 0.91, $P < 0.0001$).

Polymorphisms and phenotypes

To verify whether polymorphisms could influence the obese phenotype, we compared anamnestic and anthropometric data of the Ob/Ow children and adolescents who were heterozygotes for Leu72 or Gln90 alleles with those of counterparts who were homozygotes for Leu72 or Gln90 alleles. Weight centile at 1 year of age and BMI *z*-score at diagnosis were similar in Leu72Met compared with Leu72Leu and in Gln90Leu compared with Gln90Gln Ob/Ow children. Mean \pm S.D. BMI *z*-score was 2.26 ± 0.62 in Leu72Leu carriers, 2.16 ± 0.44 in Leu72Met carriers, 2.25 ± 0.60 in Gln90Gln carriers and 2.21 ± 0.55 in Gln90Leu carriers.

Median (IQR) age at onset of obesity tended to be lower, although not significantly so, in the 12 Leu72Met carriers than in 69 Leu72Leu carriers (2.5 (1–4.5) years compared with 5 (3–6.5) years; $P = 0.08$). The genotype Leu72Met was associated with a positive family history for obesity (75% for Leu72Met compared with 39% for Leu72Leu;

Table 2 Genotype distributions (%) in Ob/Ow and normal-weight individuals.

	Arg51Arg	Arg51Gln	Leu72Leu	Leu72Met	Gln90Gln	Gln90Leu
Ob/Ow children (<i>n</i> = 81)	80 (98.8%)	1 (1.2%)	69 (85.2%)	12 (14.8%)	75 (92.6%)	6 (7.4%)
Normal-weight individuals (<i>n</i> = 90)	89 (98.9%)	1 (1.1%)	76 (84.4%)	14 (15.6%)	84 (93.3%)	6 (6.7%)

Table 3 Total and acylated ghrelin concentrations and acylated/total ghrelin ratio (median, IQR) in the Ob/Ow children according to ghrelin gene polymorphisms.

	Total ghrelin (pg/ml)	Acylated ghrelin (pg/ml)	Acylated/total ghrelin (%)
Leu72Leu	181 (138–278) (n = 69)	92 (77–105) (n = 49)	43 (34–74) (n = 49)
Leu72Met	169 (140–388) (n = 12)	112 (80–131) (n = 8)	50 (31–84) (n = 8)
Gln90Gln	173 (138–278) (n = 75)	95 (76–115) (n = 52)	44 (33–75) (n = 52)
Gln90Leu	253 (181–322) (n = 6)	90 (78–105) (n = 5)	43 (33–53) (n = 5)

No significant differences (Mann–Whitney *U* test) between Leu72Leu and Leu72Met or between Gln90Gln and Gln90Leu.

Table 4 Hormone concentrations in the Ob/Ow children according to ghrelin gene polymorphisms. Insulin and IGF-I values are expressed as mean \pm s.d. leptin values as median (IQR).

	Insulin (μ IU/ml)	IGF-I (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
Leu72Leu (n = 69)	12.1 \pm 6.5	284 \pm 150	20 (13–26)
Leu72Met (n = 12)	12.9 \pm 8.6	352 \pm 151	21 (16–27)
Gln90Gln (n = 75)	12.7 \pm 7.2	299 \pm 159	21 (13–26)
Gln90Leu (n = 6)	10.2 \pm 3.9	288 \pm 27	17 (16–18)

No significant differences between Leu72Leu and Leu72Met or between Gln90Gln and Gln90Leu.

$P = 0.03$, Fisher's exact test) and with an greater percentage of babies born large for gestational age (33% for Leu72Met compared with 5% for Leu72Leu; $P = 0.03$, Fisher's exact test).

In normal-weight individuals, BMI z-score was significantly lower in Leu72Met than in Leu72Leu carriers (-0.03 ± 0.7 compared with -0.47 ± 0.99 ; $P = 0.04$, Student's *t*-test).

Neither the Arg51Gln nor the Gln90Leu genotypes seemed to be associated with an obesity phenotype.

Discussion

The present study has demonstrated the existence of polymorphisms in the ghrelin gene, some variants of which are described here for the first time. These ghrelin gene polymorphisms, however, were not associated with any changes in circulating ghrelin concentrations or with overweight or obesity. The three polymorphisms in the ghrelin gene reported in other studies (24, 26, 31) were also found in our study population, although without any association with obesity or overweight. In

our groups, the frequencies for the 72Met allele were similar to that described in the White participants in the Heritage Family Study, the Swedish Obese Subjects Study and the Quebec Family Study (24), whereas the frequency for the 90Gln allele in our Ob/Ow children and adolescents was about 50% of that reported for German children (0.037 compared with 0.063) (26), probably reflecting genetic/ethnic heterogeneity between the two populations.

Several studies to date have demonstrated that ghrelin is involved in the control of appetite and energy balance (32). In agreement with previous reports in the literature, we found decreased circulating ghrelin concentrations in our obese children, but we first showed that secretion of both total and acylated ghrelin was significantly lower. Although des-acylated ghrelin seems to be the major form of circulating ghrelin (33), only the acylated ghrelin exhibits neuroendocrine activity (14, 34). However, Thompson *et al.* (16) have shown that both forms of ghrelin may promote bone marrow adipogenesis, whereas only acylated ghrelin probably acts centrally to suppress growth hormone lipolytic activity during prolonged starvation. Thus the proportion of total ghrelin to des-acylated ghrelin could be relevant for regulating the balance between adipogenesis and lipolysis in response to nutritional status (35). In our study, both total and acylated ghrelin concentrations were lower in Ob/Ow than in normal-weight children, whereas the proportion of acylated ghrelin was greater in Ob/Ow than in normal-weight children (43% compared with 28%), showing that obesity and overweight are associated with a relatively lower decrease in acylated ghrelin as compared with total ghrelin. The acylation of the Ser 3 represents a fatty acid moiety that might facilitate passage through the blood–brain barrier (36), acting as a ligand for the hypothalamic and pituitary GHS-R1a and exerting an orexigenic activity through the NPY/AGRP system and the orexin pathway (32). The proportion of acylated ghrelin, as expected, was not influenced by the ghrelin gene variants, being 50% in the case of Leu72Met, 43% for Leu72Leu and Gln90Leu, and 44% for Gln90Gln.

Previous studies (25) of the genetic variants of ghrelin forms gave contradictory results for or against the hypothesis that genetic variants are the cause of obesity (24). Specifically, in two studies (19, 25) the genotype Leu72Met appeared to be associated with an earlier age at self-reported onset of obesity, whereas the findings of another study suggested the Leu72Met status could be protective against the accumulation of fat and metabolic co-morbidities (24). Moreover, a Leu72Met status does not seem to influence basal insulin secretion (19) or ghrelin plasma concentrations, and was associated with greater concentrations of IGF-I in the Black individuals in the Heritage Family Study (24). Similarly, in our Ob/Ow children, the Leu72Met status was associated with greater neonatal

weight-for-age, earlier age at onset of obesity, unmodified plasma ghrelin and insulin secretion and greater IGF-I concentrations. In contrast, in normal-weight children and adults, the BMI z-score was significantly lower in 72Met carriers. These conflicting results could suggest that the Leu72Met genotype may be involved in energy metabolism and fat accumulation by modulating phenotypic weight during different periods of life (37), but its role requires clarification in studies involving large numbers of obese, overweight and constitutionally lean individuals. In addition, as suggested by Ukkola *et al.* (38), the substitution at codon 72 might have effects on the products of prepro-ghrelin, which could have some as yet unknown functional significance, leading to some physiological effects through binding to specific ghrelin receptors. It is unlikely that GHS-R1a is the only receptor involved in the regulation of the adipogenesis mediated by the ghrelin system; the action of des-acylated ghrelin in bone marrow adipogenesis is independent of GHS-R1a (16).

In our series, Arg51Gln and the Gln90Leu genotypes did not seem to influence weight regulation.

In conclusion, our present findings do not support the hypothesis that ghrelin gene polymorphisms have a relevant impact on the secretion of total and acylated ghrelin, or on the regulation of food intake, energy balance and endocrine activities. As far as we know, this is the first demonstration that neither total nor acylated ghrelin is not related to ghrelin gene variants.

References

- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H & Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 **402** 656–660.
- Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F & Ghigo E. Preliminary evidence that ghrelin, the natural secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *Journal of Endocrinological Investigation* 2000 **23** 493–495.
- Tschöp M, Smiley DL & Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000 **407** 908–913.
- Wajnrajch MP, Ten IS, Gertner JM & Leibel RL. Genomic organization of human ghrelin gene. *Journal of Medical Genetics* 2000 **1** 231–233.
- Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S & Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *Journal of Biological Chemistry* 2003 **278** 64–70.
- Kojima M, Hosoda H, Matsu H & Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2001 **12** 118–122.
- Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nature Reviews Neuroscience* 2001 **2** 551–560.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K & Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000 **141** 4255–4261.
- Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K & Grossman AB. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 **86** 881–887.
- Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K & Nakao K. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Letters* 2000 **486** 213–216.
- Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C & Casanueva F. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001 **142** 788–794.
- Tena-Sempere M & Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002 **188** 9–13.
- Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaky K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T & Matsukura S. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002 **51** 124–129.
- Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M & Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European Journal of Pharmacology* 2002 **440** 235–254.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K & Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001 **409** 194–198.
- Thompson NM, Gill DAS, Davies R, Loveridge N, Houston PA & Robinson ICAF. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly *in vivo* by a mechanism independent of GHS-R1a. *Endocrinology* 2004 **145** 234–242.
- Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatti MA & Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and induces food intake in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 **86** 5992–5995.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE & Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001 **50** 1714–1719.
- Korbonits M, Gueorguiev M, O'Grady E, Lecoecur C, Swan DC, Mein CA, Weill J, Grossman AB & Froguel P. A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin in tall, obese children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 4005–4008.
- Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Castellino N, Petri A, Bellone J, Me E, Broglio F, Prodam F, Ghigo E & Bona G. Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *Journal of Endocrinological Investigation* 2002 **25** RC13–RC15.
- Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E & Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001 **50** 707–709.
- Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A & Weigle DS. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nature Medicine* 2002 **8** 643–644.
- Haqq AM, Farooqi IS, O'Rahilly S, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, LaFranchi SH & Purnell JQ. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003 **88** 174–178.
- Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Perusse L, Rankien T, Tshöp M, Heiman ML, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Sjostrom L & Bouchard C. Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obesity Research* 2002 **10** 782–791.
- Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Snyder EE, Chagnon M, Sjostrom L & Bouchard C. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in human. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 **86** 3996–3999.

- 26 Hinney A, Hoch A, Geller F, Schäfer H, Sigfried W, Goldschmidt H, Cremer F, Alsina M & Glasmacher A. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 2716–2719.
- 27 Cacciari E, Milani S, Balsamo A, Dammacco F, De Luca F, Chiarelli F, Pasquino AM, Tonini G & Vanelli M. Italian cross-sectional growth charts for height, weight and BMI (6–20y). *European Journal of Clinical Nutrition* 2002 **56** 171–180.
- 28 Tanner JM & Whitehouse RH. Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. *Archives of Diseases in Childhood* 1976 **51** 170–179.
- 29 Bertino E, Murru P, Bagna R, Ventriglia A, Garzena E & Martano C. Standard antropometrici neonatali dell' Italia Nord-Occidentale. *Rivista Italiana di Pediatria* 1999 **25** 899–906.
- 30 Miller SA, Dykes DD & Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 1988 **16** 1215.
- 31 Poykko S, Ukkola O, Kauma H, Savolainen MJ & Kesäniemi YA. Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects. *Diabetologia* 2003 **46** 455–458.
- 32 Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K & Nakazato M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 2003 **144** 1506–1512.
- 33 Hosoda H, Kojima M, Matsuo H & Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000 **279** 909–913.
- 34 Broglio F, Benso A, Gottero C, Prodham F, Gauna C, Filtri L, Arvat E, van der Lely AJ, Deghenghi R & Ghigo E. Non-acylated ghrelin does not possess the pituitary and pancreatic endocrine activity of acylated ghrelin in humans. *Journal of Endocrinological Investigation* 2003 **26** 192–196.
- 35 Thompson NM, Davies JS, Mode A, Houston PA & Wells T. Pattern-dependent suppression of growth hormone (GH) pulsatility by ghrelin and GHRP-6 in moderately GH deficient rats. *Endocrinology* 2003 **144** 4859–4867.
- 36 Banks WA, Tschöp M, Robinson SM & Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood–brain barrier is determined by its unique primary structure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002 **302** 822–827.
- 37 Salvatore F, Scudiero O & Castaldo G. Genotype–phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *American Journal of Medical Genetics* 2002 **111** 88–95.
- 38 Ukkola O & Kesäniemi YA. Preproghrelin Leu72Met polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine* 2003 **254** 391–394.

Received 22 December 2003

Accepted 7 April 2004

Congenital adeno-hypophysial aplasia: Clinical features and analysis of the transcriptional factors for embryonic pituitary development

T. Arrigo¹, M. Wasniewska¹, F. De Luca¹, M. Valenzise¹, F. Lombardo¹, D. Vivenza², T. Vaccaro³, E. Coradi³, and A. Bignon-Lauer³

¹Department of Pediatrics, University of Messina, Messina; ²Unit of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy; ³Division of Pediatric Endocrinology and Diabetology, University Children Hospital, Zürich, Switzerland

ABSTRACT . Anterior pituitary agenesis (APA) has very rarely been reported. Therefore, its phenotypical and genotypical features are not well known. The aim of this study was to ascertain whether the clinical picture in 4 subjects with APA and multiple pituitary hormone deficiencies (MPHD) was different compared to the one observed in a selected control group consisting of 7 MPHD individuals with hypoplastic (and not aplastic) adeno-hypophysial and pituitary stalk interruption syndrome. Another goal was to investigate genetic basis of APA by analyzing for the first time in this condition many of the transcriptional factors which are required for both structural development and cellular differentiation of hypophysis. Age at diagnosis was significantly lower in APA children than in controls (1.5±2.3 vs 11.1±7.6 yr, $p<0.0005$). Mi-

crophallus and neonatal cholestasis were observed only in APA subjects ($\chi^2=4.3$, $p<0.05$) and also neonatal hypoglycemia was more frequent in APA patients than in controls ($\chi^2=4.05$, $p<0.05$). Molecular analyses of the genes of the transcriptional factors POU1F1, PROP1, LHX3, LHX4, ISL1 and HESX1 detected no mutations in APA patients. Conclusions: a) if compared with a selected cohort of MPHD patients with both adeno-hypophysial hypoplasia and pituitary stalk interruption syndrome, the ones with APA show an earlier and more severe picture of hypopituitarism; b) mutations in several transcription factors that are known to be essential for the development of Rathke's pouch are not necessarily found in humans with APA.

(J. Endocrinol. Invest. 29: 208-213, 2006)

©2006, Editrice Kurtis

INTRODUCTION

The syndrome of early onset hypopituitarism (EH) is a well recognized entity (1), whose frequency has been estimated to be approximately 1:100,000 live births (2). Most EH patients have multiple pituitary hormone deficiencies (MPHD) as a consequence of either hypothalamic or pituitary disease (3). Varying combinations of hypoglycemia, prolonged jaundice and microgenitalia in males typically appear at birth or shortly afterwards (3-5).

A possible cause of EH is the congenital absence of the anterior pituitary gland (APA), a condition that has very rarely been reported in the literature (6-9) but has recently been hypothesized to be underestimated (10). In most of the sporadic APA cases to date reported, magnetic resonance imaging (MRI) of the hypothalamo-pituitary region was not described and genotype analyses were not performed (10). Therefore, both phenotypical features and genotypical peculiarities of APA have not been well assessed until now.

Here we report on four children with APA, in order to provide a detailed description of their clinical features. The aim of our study was to ascertain whether the clinical picture in subjects with APA may be different compared to the one observed in a selected cohort of MPHD individuals with hypoplastic (and not aplastic) adeno-hypophysial and pituitary stalk interruption syndrome.

Another goal of the present study was to improve our understanding of the genetic basis of this condition.

Key-words: Multiple pituitary hormone deficiency, anterior pituitary agenesis, LHX3, LHX4, ISL 1, HESX1.

Correspondence: F. De Luca, MD, Dipartimento di Scienze Pediatriche Mediche e Chirurgiche, Policlinico Universitario di Messina, Via Consolare Valeria, 98123 Messina-Gazzi, Italy.

E-mail: wasniewska@yahoo.it

Accepted October 7, 2005.

Given the role of the transcription factors ISL1, LHX3, LHX4, HESX1 (11), PROP1 and POU1F1 (12) in embryonic development of anterior pituitary from Rathke's pouch, we analyzed the coding region of their genes in our patients, in order to assess whether adenohipophysism agenesis may originate from still unidentified mutations of the genes which are known to be involved in the early stages of pituitary development.

MATERIALS AND METHODS

Study population and design

Our retrospective study involved all the MPHD children (3 males and 1 female) with neuroradiologically documented APA who were seen in the Department of Pediatrics of Messina University during the last 10 yr and were diagnosed at a mean age of 1.5 ± 2.3 yr (range 0.1-5.0 yr) (Group A).

The past clinical history and the endocrinological data at diagnosis of these 4 patients were compared with the ones recorded in a control group consisting of all the patients with non-tumoral MPHD, neuroradiologically visible adenohipophysism and pituitary stalk interruption syndrome, who were diagnosed in the same clinic during the same period at an average age of 11.1 ± 7.7 yr (range 3-25 yr) (Group B). All the subjects of Group B were males. From the entire group of the hypopituitary patients seen at our clinic, control subjects were selected for this study provided that they: a) exhibited a clinical and biochemical picture of MPHD, as well as the patients of Group A; b) showed at MRI some of the neuroradiological abnormalities found in the children of Group A, with the only exception represented by the anterior pituitary lobe, that was repeatedly invisible in the subjects of Group A (Fig. 1) and visible even though hypoplastic in the patients of Group B. The mutual neuroradiological abnormalities found in all the subjects of both groups were: a) pituitary stalk interruption; b) ectopic neurohipophysism.

None of the subjects of either group exhibited either facial defects or other congenital abnormalities of the central nervous system. No familial antecedents of pituitary diseases were recorded in either group.

In all the patients of both groups GH peak in response to at least two pharmacological stimulation tests (clonidine, insulin, arginine) was $< 4 \mu\text{g/l}$ (Table 1).

Sex, age at diagnosis and main endocrine features of both patients with APA and controls are reported in Table 1.

All the subjects of both groups underwent genetic analyses for two of the transcriptional activating factors that direct the embryonic development of the anterior pituitary from Rathke's pouch, like PROP1 and POU1F1. In only the 4 patients with APA LHX3, LHX4, ISL1 and HESX1 were also investigated, in the light of their important role in very early pituitary organogenesis and cell-type determination (12). This study design was approved by the Ethics Committee of Messina University Hospital and written consent for genetic analyses was obtained from parents and adult patients.

Clinical evaluations

Perinatal and post-natal clinical history of both patients and controls was reconstructed on the basis of hospital records.

Breech delivery and emergency cesarean section were considered to be abnormal deliveries. An Apgar score < 7 at 5 min after birth was considered to be a clue to neonatal asphyxia. Abnormal deliveries and neonatal asphyxia were considered adverse perinatal events.

Diagnosis of liver cholestasis was based on: a) prolonged jaundice with conjugated hyperbilirubinemia and acholic stools; b) hepatomegaly; c) increased aminotransferase and alkaline phosphatase serum levels.

Endocrinological evaluations

At the time of MPHD diagnosis endocrinological assays were performed in all cases in the local laboratory, using the same commercial kits. GH assays were based on polyclonal antibodies (Biodata, Milan, Italy) (normal response was defined as a GH peak $> 10 \mu\text{g/l}$ to at least 1 stimulation test).

Thyroid and adrenal functions were evaluated in all patients, leading to a classification of MPHD.

The pituitary-thyroid axis function was investigated by evaluating free T_4 and TSH baseline serum concentrations and by a TRH test ($200 \mu\text{g/m}^2$ iv): reduced free T_4 values ($< 12 \text{ pmol/l}$) associated with either subnormal ($< 10 \text{ IU/l}$) or delayed TSH response to TRH injection (TSH value at 60 min greater than that obtained at 20-30 min) were considered to indicate central hypothyroidism.

Adrenal function was estimated as basal serum cortisol (normal values 265-365 nmol/l) and as the serum cortisol response to insulin-induced hypoglycemia (normal response was defined as an increase above baseline cortisol concentrations of $> 190 \text{ nmol/l}$ or an increase to a peak value $> 550 \text{ nmol/l}$).

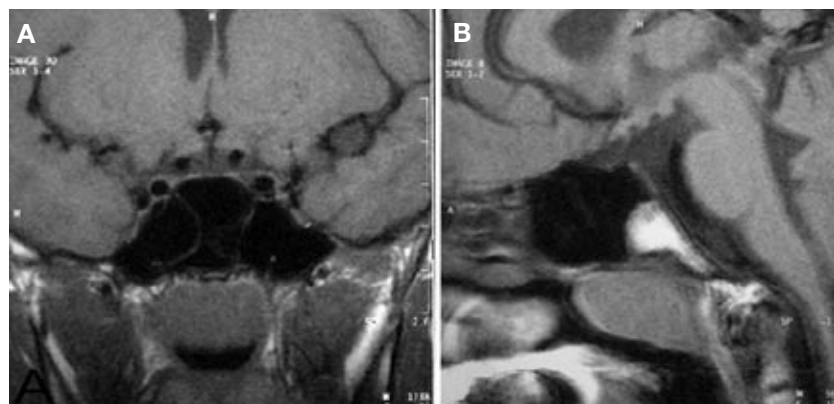


Fig. 1 - Coronal (A) and sagittal (B) views of magnetic resonance imaging (MRI) brain scan: neither adenohipophysism, pituitary stalk nor neurohipophysism are visible (patient no. 3 of Group A).

Table 1 - Sex, age at diagnosis and main endocrinological findings in the 4 patients with multiple pituitary hormone deficiencies (MPHD) and congenital anterior pituitary agenesis (Group A) and in the 7 MPHD patients with other neuroradiological abnormalities but visible adenohypophysis (Group B).

Patients no.	Sex	Age (yr)	GH peak ($\mu\text{g/l}$)	Hormone deficiency
Group A				
1	M	0.1	3.1	MPHD ^a
2	M	0.1	0.1	MPHD ^a
3	F	1.0	0.1	MPHD ^b
4	M	5.0	0.1	MPHD ^a
Mean		1.5	0.8	
\pm SD		2.3	1.5	
Group B				
1	M	3.0	2.8	MPHD ^c
2	M	4.0	1.4	MPHD ^a
3	M	8.0	0.5	MPHD ^a
4	M	10.0	0.1	MPHD ^a
5	M	10.5	0.1	MPHD ^a
6	M	17.0	0.2	MPHD ^a
7	M	25.0	3.5	MPHD ^a
Mean		11.1	1.2	
\pm SD		7.6	1.4	
<i>p</i>		<0.0005	ns	

^aGH+TSH+ACTH+gonadotropin; ^bGH+TSH+ACTH (gonadotropin?); ^cGH+TSH+ACTH. M: male; F: female.

Diagnosis of gonadotropin deficiency was made only on clinical grounds in the newborns with both microphallus and cryptorchidism; in other cases it was suggested by the absence of physical signs of pubertal development at advanced bone age (>12 yr in girls and >13.5 yr in boys) and confirmed by biochemical data (pre-pubertal baseline serum gonadotropin concentrations and no increase after injection of GnRH 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ iv). In girl no. 3 of Group A, diagnosis of gonadotropin deficiency has not been definitely assessed yet, due to her pre-pubertal bone age (10 yr) at the time of this study (Table 1).

Neuroradiological evaluations

In all the patients of both groups the MRI scan of the hypothalamo-pituitary region was routinely performed before hormonal treatment was begun, in order to identify the cause of their hypopituitarism. At the time of the scan, no patients had entered puberty, including the one aged 25 yr (13).

MRI studies were performed with a 0.5-T super-conducting unit using a standard pituitary protocol (14). Pituitary height measurements were compared with published normal values for age as obtained using the same imaging studies. A pituitary was considered to be hypoplastic when the gland height was less than -2.0 SD for age (15).

Diagnosis of APA was based on the combination of the following findings: a) hypoplastic and empty sella turcica; b) invisible pituitary stalk; c) absent posterior pituitary bright spot (Fig. 1). The MRI images were evaluated in all cases of both groups by the same experienced neuroradiologist.

Genetic analyses

The molecular investigations of POU1F1, PROP1 and HESX1 genes were performed in the Molecular Laboratory of Novara University, whereas the ones for LHX3, LHX4 and ISL1 were performed in Molecular Laboratory of Zurich Children Hospital.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood from all the 11 patients included in this study and from their parents, using the Qiagen Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) to perform PCR exonic amplification.

- POU1F1 gene: The DNA fragments, covering the entire coding region and corresponding to the 6 exons of the human POU1F1 gene, were amplified by PCR using the primers reported by Otha et al. (16).

- PROP1 gene: The DNA fragments covering all three exons of the PROP1 gene were amplified by PCR using the same touchdown protocol described elsewhere (17).

- LHX3 gene: This gene amplification was carried out as previously described (18).

- LHX4 and ISL1 genes: LHX4 and ISL1 exons were amplified using primers purchased from Mycosynth, Balgach, Switzerland. Direct cycle sequencing of the PCR products was performed using the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and analyzed by electrophoresis on the ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems, Rotkreuz, Switzerland).

- HESX1 gene: The entire HESX1 coding region (GenBank Accession Number: AF059734) was analyzed by direct sequencing using the ABI Prism 3100 DNA Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA). The product was amplified by the PCR reaction (PCR) technique. A couple of primers for each of the four exons that encode for the transcription factor HESX1 were designed to include also the sites of splicing. Their sequences were as follows:

- Exon 1: forward primer, 5' - AAGATCCCAGCCCTATACACG - 3' and reverse primer, 5' - GCTCTATGTAGTATGAAATAAAG - GGCA - 3'=314 bp amplicon;

- Exon 2: forward primer, 5' - GCAATTCTCTTGGAACCCC - 3' and reverse primer, 5' - CCAAAGTGAGTGGGCTTTT - 3'=406 bp amplicon;

- Exon 3 and Exon 4: forward primer, 5' - GCTCATTTTTGA - GACATACTGAA - 3' and reverse primer, 5' - TGCAGGAAA - GAAAACATCACA - 3'=438 bp amplicon;

The PCR amplification was carried out in a volume of 30 μl , containing 200 ng DNA, 20 pmoles of each primer, 0.25 mM of each of the dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ) and 1 U of AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). Each PCR was performed at 95 C for 6 min, followed by 36 cycles at 95 C for 30 sec, 53 C for 30 sec, and 72 C for 40 sec, and 1 cycle at 72 C for 5 min, using a thermal cycler DNA (PTC-100 MJ Research, Bio-Rad Laboratories, South San Francisco, CA, USA).

Statistical analyses

Comparisons between groups were performed by Student's unpaired t-test, by Pearson's chi-squared test and, when appropriate, by Mann-Whitney test. *P* values <0.05 were considered significant. Data are expressed as mean \pm SD.

Table 2 - Perinatal history and post-natal clinical findings in the 4 patients with congenital anterior pituitary agenesis (Group A) and in the 7 patients with other neuroradiological abnormalities but visible adeno-hypophysis (Group B).

Patient no.	Abnormal deliveries	Neonatal asphyxia	Microphallus	Neonatal cryptorchidism	Neonatal hypoglycemia	Neonatal cholestasis
Group A						
1	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	-
3	-	-			-	+
4	+	+	-	-	+	-
%	50	75	66.6	66.6	75	50
Group B						
1	+	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	-	-	-	+	-	-
4	-	+	-	-	-	-
5	+	+	-	-	+	-
6	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-
%	71.4	42.8	0	14.3	14.3	0
p	ns	ns	<0.05	ns	<0.05	<0.05

RESULTS

The main clinical and endocrinological findings are summarized in Tables 1 and 2.

In the entire study population, only 1 patient (no. 3 of Group A) was female (Table 1).

Age at diagnosis was on average significantly lower in the patients with APA than in those belonging to Group B (Table 1). Among the patients with APA, diagnosis was made at birth in 2 cases (no. 1 and 2), due to the very severe EH picture (Table 2). In case no. 3, diagnosis was performed at the age of 1 yr, in the light of both growth failure and prolonged liver cholestasis. In case no. 4, diagnosis was made only at the age of 5 yr, on the basis of growth retardation and sporadic hypoglycemic attacks. In all the patients of Group B, diagnosis was made after the first 2 yr of life and in two of them (no. 6 and 7) it was very late and based on a very severe growth and puberty retardation (13).

In almost all of patients of both groups pituitary failure involved GH, TSH, ACTH and gonadotropins (Table 1). The frequency of adverse perinatal events was not significantly different in the 2 groups of patients (Table 2). Among the classical clinical manifestations of EH, microphallus and neonatal cholestasis were observed only in the patients with APA, with statistically relevant differences between these patients and controls

(chi-squared=4.3, $p<0.05$). Neonatal hypoglycemia was also more frequent in the patients of Group A (chi-squared=4.05, $p<0.05$) and cryptorchidism was detected more frequently in the patients with APA than in the remaining ones, but this difference did not achieve a statistical relevance (Table 2).

Molecular analyses of the coding region of the genes of the transcriptional factors POU1F1, PROP1, LHX3, LHX4, ISL1 and HESX1 failed to detect any mutations in any of the investigated patients.

DISCUSSION

Before MRI was currently adopted to investigate patients with hypothalamo-pituitary diseases, APA was for a long time considered a very rare condition. Until 2003, in fact, only a few sporadic cases had been reported in detail and most of them were identified at autopsy (19-21) or, more recently, at MRI (7-9). The most extended series so far reported in the literature are very recent and included 5 boys with congenital APA diagnosed by MRI during the first two months of life, due to a very severe neonatal picture, characterized by hypogenitalism, respiratory distress, hypoglycemia and metabolic acidosis, non-cholestatic jaundice and midline defects (10). After the one by

Scommegna et al. (10), ours is the largest series of patients with APA described up to now, which suggests that APA frequency had probably been underestimated for a long time, due to the unavailability of MRI.

According to the results of our study, APA syndrome represents a very severe form of congenital hypopituitarism. In fact, compared to the patients with visible adenohypophysis, the ones with APA seem to be at higher risk of a pre-natal or immediately post-natal onset of hypopituitary clinical manifestations.

Microphallus and neonatal cryptorchidism, which are typical signs of pre-natal onset pituitary failure, were observed in two 2 of 3 boys with APA and high frequency of micropenis and neonatal cryptorchidism in boys with APA had also previously been reported by other authors (6, 9, 10, 22). Therefore, it can be argued that the finding of microgenitalia in a term newborn should arouse the clinical suspicion of an APA syndrome with secondary EH. This suspicion may possibly be reinforced by the discovery of hypoglycaemia and/or liver cholestasis during the first weeks of life. EH, however, is not exclusively associated with APA.

Neonatal cholestasis was a prominent clinical feature in 2 of our patients with APA. Cholestasis is known to be common in EH (23, 24) and is thought to be due to deficiency of one or more trophic hormones (25). Clinical and experimental evidence suggests that hypocortisolism may play some role in its pathogenesis (26, 27).

Among our patients with hypoplastic pituitary, the endocrinological defects were almost superimposable on the ones found in the patients with APA. In spite of this, hypopituitary symptoms at birth were less frequent than in those of Group A. Therefore, it can be concluded that, if compared with MPPH patients with pituitary hypoplasia, the ones with APA are at higher risk of prenatal or immediately post-natal onset of hypopituitary clinical manifestations and show a more severe clinical picture of hypopituitarism at birth.

The absence of POU1F1 and PROP1 gene mutations was not unexpected in our study populations, since the patients with that kind of molecular alterations described up to now show neuroradiological features different from either APA or adenohypophysis hypoplasia and pituitary stalk interruption syndrome (12). The lack of gene mutations of other transcription factors that are known to be essential for the development of Rathke's pouch, such as LHX3 and LHX4, indicates that defects in their genes are not a common cause of APA in humans and suggests the existence in humans of different mechanisms or redundancies that are not present in rodents.

Another gene which is a candidate for the regulation of early aspects of pituitary development is the LIM-homeobox gene ISL1, which is transiently expressed in the oral ectoderm and pouch primor-

dium (28). The role of this transcription factor on the pituitary development is illustrated by the ISL1 -/- null mutant mice, in which the rudimentary pouch is formed but fails to differentiate into the various cell types (29). To the best of our knowledge, the present study is the first one reporting on this gene analysis in humans with APA.

HESX1 is another developmentally critical transcriptional repressor that plays a wide role in the development of multiple anterior structures derived from the placode, including the eyes, the olfactory epithelium, the forebrain and the pituitary (30). In mice, targeted disruption of HESX1 resulted in either absence or hypoplasia of the anterior pituitary (31). In human, HESX1 mutations have been associated with various pituitary anatomy abnormalities (32). Even APA has very recently been reported for the first time in one patient with HESX1 defect (33). This association, however, has not been observed in any of our patients in the present series.

To conclude, molecular analysis of the investigated transcriptional factors in our patients with APA failed to identify genetic lesions responsible for this condition, even though it has to be admitted that our study population was not sufficiently large and the family of the investigated transcriptional factors was not complete. It can also be hypothesized that APA may originate from mutations of other unidentified genes possibly involved in the early phases of pituitary embryonic development.

REFERENCES

1. Gluckman PD, Gunn AJ, Wray A, et al. Congenital idiopathic growth hormone deficiency associated with prenatal and early postnatal growth failure. *J Pediatr* 1992, 121: 920-3.
2. Fisher DA. Effectiveness of newborn screening programs for congenital hypothyroidism: prevalence of missed cases. *Pediatr Clin North Am* 1987, 34: 881-90.
3. De Luca F, Bernasconi S, Blandino A, Cavallo L, Cisternino M. Auxological, clinical and neuroradiological findings in infants with early onset growth hormone deficiency. *Acta Paediatr* 1995, 84: 561-5.
4. Herber SM, Milner RDG. Growth hormone deficiency presenting under age 2 years. *Arch Dis Child* 1984, 59: 557-60.
5. Wit JM, Van Hunen H. Growth of infants with neonatal growth hormone deficiency. *Arch Dis Child* 1992, 67: 920-4.
6. Kosaki K, Matsuo N, Tamai S, Miyama S, Momoshima S. Isolated aplasia of the anterior pituitary as a cause of congenital panhypopituitarism. *Horm Res* 1991, 35: 226-8.
7. Beregszaszi M, Leger J, Garel C, et al. Nasal pyriform aperture stenosis and absence of the anterior pituitary gland: Report of two cases. *J Pediatr* 1996, 128: 858-61.
8. Zucchini S, Mazzanti L, Ambrosetto P, Salardi S, Cacciari E. Unusual magnetic resonance imaging findings in subjects

- with hypopituitarism: Report of 4 cases. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1998, 11: 35-44.
9. Al-Gazali LI, Sztriha L, Punnose J, Shather W, Nork M. Absent pituitary gland and hypoplasia of the cerebellar vermis associated with partial ophthalmoplegia and postaxial polydactyly: A variant of orofacioidigital syndrome VI or a new syndrome? *J Med Genet* 1999, 36: 161-6.
 10. Scommegna S, Galeazzi D, Picone S, et al. Neonatal Identification of pituitary aplasia: A life-saving diagnosis. *Horm Res* 2004, 62: 10-6.
 11. Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, et al. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalons. *Development* 1998, 125: 4835-40.
 12. Parks JS, Brown MR, Hurley DL, Phelps CJ, Wajnrajch MP. Heritable disorders of pituitary development. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84: 4362-70.
 13. Arrigo T, Crisafulli G, Salamone A, Cucinotta D, De Luca F. Adult height exceeding target height in a patient with congenital panhypopituitarism diagnosed after the age of 25 years. *J Pediatr Endocrinol* 1994, 7: 269-72.
 14. Arrigo T, De Luca F, Maghnie M, et al. Relationships between neuroradiological and clinical features in apparently idiopathic hypopituitarism. *Eur J Endocrinol* 1998, 139: 84-9.
 15. Argyropoulou M, Perignon F, Brunella F, Brauner R, Rappaport R. Height of normal pituitary gland as a function of age evaluated by magnetic resonance imaging in children. *Pediatr Radiol* 1991, 21: 247-9.
 16. Ohta K, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, et al. Mutations in the Pit-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 15: 851-5.
 17. Paracchini R, Giordano M, Corrias A, et al. Two new PROP1 gene mutations responsible for compound pituitary hormone deficiency. *Clin Genet* 2003, 64: 142-7.
 18. Schmitt S, Biason-Lauber A, Betts D, Schoenle EJ. Genomic structure, chromosomal localization, and expression pattern of the human LIM-homeobox3 (LHX 3) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 274: 49-56.
 19. Johnson JD, Albritton WL, Werthemann U, Chistiansen RO. Hypoplasia of the anterior pituitary and neonatal hypoglycaemia. *J Pediatr* 1973, 82: 634-41.
 20. Herman SP, Baggenstoss AH, Cloutier MD. Liver dysfunction and histologic abnormalities in neonatal hypopituitarism. *J Pediatr* 1975, 87: 892-5.
 21. Kauschansky A, Genel M, Smith GJ. Congenital hypopituitarism in female infants. Its association with hypoglycaemia and hypothyroidism. *Am J Dis Child* 1979, 133: 165-9.
 22. Heinrichs C, de Zegher F, Vansnick F, Vokaer A, Christophe, Frankenne F. Fetal hypopituitarism: Perinatal endocrine and morphological studies in two cases. *Acta Paediatr* 1994, 83: 448-51.
 23. Ellaway CJ, Silink M, Cowell CT, et al. Cholestatic jaundice and congenital hypopituitarism. *J Paediatr Child Health* 1995, 31: 51-3.
 24. Choo-Kang Chen-Chih LR, Sun J, Counts DR. Cholestasis and hypoglycemia. Manifestation of congenital anterior hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 2786-9.
 25. Arrigo T, Wasniewska M, Ghizzoni L, Messina MF, Crisafulli G, De Luca F. Liver dysfunction associated with congenital hypopituitarism. *J Endocrinol Invest* 2000, 23: 215-6.
 26. Sheehan AG, Martin SR, Stephure D, Scott RB. Neonatal cholestasis, hypoglycaemia, and congenital hypopituitarism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992, 14: 426-30.
 27. Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Couture C, et al. Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev* 2003, 17: 711-6.
 28. Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 1998, 125: 1005-15.
 29. Dattani MT, Robinson IC. The molecular basis for developmental disorders of the pituitary gland in man. *Clin Genet* 2000, 57: 337-46.
 30. Thomas PQ, Dattani MT, Brickman JM, et al. Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. *Hum Mol Gen* 2001, 10: 39-45.
 31. Dasen JS, Barbera JP, Herman TS, et al. Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev* 2001, 15: 3193-207.
 32. Brickman JM, Clements M, Tyrell R, et al. Molecular effects of novel mutations in *Hesx1*/HEXS1 associated with human pituitary disorders. *Development* 2001, 128: 5189-99.
 33. Sobrier ML, Netchine I, Heinrichs C, et al. Alu-element insertion in the Homeodomain of HESX1 and aplasia of the anterior pituitary. *Hum Mutat* 2005, 25: 503-11.

ORIGINAL ARTICLE

Oral glucose load inhibits circulating ghrelin levels to the same extent in normal and obese children

R. Baldelli*‡, S. Bellone*, N. Castellino*, A. Petri*, A. Rapa*, D. Vivenza*, J. Bellonet†, F. Broglio‡, E. Ghigo‡ and G. Bona*

*Unit of Paediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale 'A. Avogadro', Novara, †Division of Paediatric Endocrinology, Regina Margherita Children Hospital, Turin and ‡Division of Endocrinology and Metabolic Diseases, Department of Internal Medicine, University of Turin, Italy

Summary

Objective The presence of both the GH secretagogue (GHS) receptor and ghrelin in the pancreas indicates an involvement of this hormone in glucose metabolism. Ghrelin secretion is increased by fasting and energy restriction, decreased by food intake, glucose load, insulin and somatostatin in normal adults; however, food intake is not able to inhibit circulating ghrelin levels in children, suggesting that the profile of ghrelin secretion in children is different from that in adults. Moreover, how ghrelin secretion is regulated in childhood as a function of fat mass is still unclear.

Design and subjects We studied the effect of oral glucose load (75 g solution orally) on circulating total ghrelin levels in 14 obese children (group A, four boys and 10 girls, aged 9.3 ± 2.3 years) and 10 lean children (group B, five boys and five girls, aged 9.7 ± 3.8 years).

Measurements In all the sessions, blood samples were collected every 30 min from 0 up to +120 min. GH, insulin and glucose levels were assayed at each time point.

Results Glucose peaks following an oral glucose tolerance test (OGTT) in groups A and B were similar; however, both basal and OGTT-stimulated insulin levels in group A were higher than in group B ($P < 0.05$). Basal total ghrelin levels in group A (281.3 ± 29.5 pg/ml) were lower ($P < 0.0005$) than in group B (563.4 ± 81.5 pg/ml). In both groups A and B, the OGTT inhibited total ghrelin levels ($P < 0.005$). In terms of absolute values, total ghrelin levels in group A were lower ($P < 0.0005$) than those in group B at each time point after glucose load. The percentage nadir in total ghrelin levels recorded in group A (-25% at 90 min) was similar to that recorded in group B (-31% at 120 min). Total ghrelin levels were negatively associated with BMI ($r = 0.5$, $P < 0.005$) but not with glucose or insulin levels.

Conclusion Ghrelin secretion is reduced in obese children. It is, however, equally sensitive in both obese and lean children to the inhibitory effect of oral glucose load.

(Received 18 February 2005; returned for revision 17 March 2005; finally revised 29 June 2005; accepted 28 November 2005)

Introduction

Ghrelin is a 28-amino-acid peptide predominantly produced by the stomach but also expressed in several other tissues including the endocrine pancreas.^{1–7} In its acylated form, ghrelin displays strong GH-releasing action mediated by the activation of the GH secretagogue receptor type 1a (GHS-R1a).^{1,3–5} GHS receptors are concentrated in the hypothalamus–pituitary unit but are also distributed in other central and peripheral tissues, including the endocrine pancreas.^{2,3,6,8}

In fact, ghrelin also exerts other endocrine and nonendocrine actions either at the central or the peripheral level. In particular, ghrelin has been demonstrated to exert a modulatory action on appetite and food intake; this action takes place at the central level and is likely to be mediated by the neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (AGRP) system.^{9,10} In addition, ghrelin exerts remarkable metabolic actions at the peripheral level, being able to modulate the pancreatic β -cell function as well as glucose and lipid metabolism.^{5,6,11–13}

Circulating ghrelin levels are mainly represented by an unacylated form and this mostly reflects gastric secretion; in fact, they are reduced by 70% after gastrectomy as well as after gastric bypass in humans.^{14,15} Ghrelin secretion occurs in a pulsatile manner without strict correlation with GH levels but in association with food intake episodes and sleep cycles in rats; furthermore, in humans ghrelin secretion undergoes remarkable variations throughout the day and ghrelin peaks anticipate food intake, suggesting that the latter is triggered by ghrelin discharge.¹⁶

Ghrelin secretion shows negative association with body mass index (BMI); circulating total ghrelin levels are increased in anorexia and cachexia but reduced in obesity both in adulthood and in childhood,^{14,17–19} a notable exception being obese patients with Prader–Willi syndrome.^{20,21} In agreement with the major link between nutrition and ghrelin, its circulating levels are increased by fasting and energy restriction but decreased by food intake and overfeeding.^{14,17,18} These variations in ghrelin secretion predicted its clear negative association with insulin secretion.^{4,12,16,22–26}

Correspondence: Gianni Bona, Clinica Pediatrica, Università del Piemonte Orientale 'Amedeo Avogadro', Ospedale Maggiore della Carità, Corso Mazzini 18, 28100 Novara, Italy. Tel.: 0039/0321 3733474; E-mail: gianni.bona@maggioreosp.novara.it

It has already been demonstrated that ghrelin secretion is reduced by both oral and intravenous glucose load, but also by insulin-induced hypoglycaemia.^{22,27,28} An inhibitory input on ghrelin also comes from the activation of gastric somatostatin receptors as indicated, so that the most remarkable inhibition of circulating ghrelin levels is observed under exposure to somatostatin and its analogues.^{29,30} Regarding the mechanisms underlying the influence of glucose and insulin on ghrelin secretion, there is still controversy; in particular, it is still a matter of debate whether they play a direct or an indirect inhibitory role.^{26,31}

The inhibitory influence of both glucose and food intake has been reported to be a function of either age or fat mass. In fact, glucose load is reported to be unable to inhibit ghrelin secretion in anorexia nervosa while food intake does not modify it in childhood.¹⁸

Based on the above, we studied the ghrelin response to an oral glucose tolerance test (OGTT) in both obese and lean children to clarify the effects of glucose load on total ghrelin secretion as a function of age and fat mass.

Subjects and methods

Twenty-four prepubertal children were enrolled in this study; 14 obese children (group A, four boys and 10 girls, aged 9.3 ± 2.3 years) and 10 lean children (group B, five boys and five girls, age 9.7 ± 3.8 years). The BMI was above the 90th percentile for group A and from the fifth to the 90th percentile for group B; specifically, the mean BMIs in groups A and B were 26.0 ± 0.6 vs. 17.5 ± 0.6 , $P < 0.0005$, respectively. Children in group A as well as those in group B had no endocrine disorder and were receiving no medication at the time of the study. All the children's parents were informed as to the purpose of the study and gave their consent as required by the local ethics committee. Control group subjects were enrolled during a programme of auxological and metabolic screening and their parents gave their consent to the evaluation of glucose tolerance with the OGTT.

The children's heights were measured by Harpenden's stadiometer and their weight was measured by using an electronic scale. BMI was calculated as body weight divided by height squared (kg/m^2). All children in both groups were of normal stature and growing normally. As anticipated, all children were prepubertal.

All subjects underwent the OGTT (75 g glucose solution orally), which was performed in the morning after an overnight fast. Blood samples were taken by an intravenous catheter kept patent by slow infusion of isotonic saline at baseline and then 30, 60 and 120 min after the OGTT. At each time point, circulating ghrelin, glucose and insulin levels were measured.

Human ghrelin (pg/ml) was assayed, after extraction on reverse-phase C18 columns, by a radioimmunoassay (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA) using ¹²⁵I-labelled bioactive ghrelin as a tracer and a rabbit polyclonal antibody vs. octanoylated and des-octanoylated human ghrelin. The sensitivity was 30 pg/tube. Based on our data, the intra-assay coefficient of variation (CV) was 0.3–10.7%.

Serum insulin levels ($1 \mu\text{IU}/\text{ml} = 7.175 \text{ pmol}/\text{l}$) were measured by a chemiluminescent enzyme-labelled immunometric assay (Diagnostic Products). The sensitivity was $2 \mu\text{IU}/\text{ml}$. Intra- and interassay CVs were 2.5–8.3% and 4.4–8.6%, respectively.

Plasma glucose (mmol/l) was measured by the glucose oxidase method on a Beckman Glucose Analyser (Fullerton, CA, USA).

Data are presented as mean \pm SEM of absolute and delta percentage values. The statistical analysis was performed by an analysis of variance (ANOVA) test (to evaluate the ghrelin, insulin and glucose responses to the OGTT) and an unpaired Student's *t*-test (to evaluate data at baseline in obese vs. lean children) by using Statview 5 software for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Basal insulin levels in group A were higher than in group B (252.4 ± 68.1 vs. $36.6 \pm 4.8 \text{ pmol}/\text{l}$; $P < 0.05$) (Fig. 1b), whereas basal glucose levels were similar in groups A and B (4.4 ± 0.1 vs. $4.6 \pm 0.1 \text{ mmol}/\text{l}$) (Fig. 1a). In addition, glucose peaks following an OGTT in group A ($6.7 \pm 0.3 \text{ mmol}/\text{l}$) and group B ($7.3 \pm 0.6 \text{ mmol}/\text{l}$) were similar (Fig. 1a), whereas OGTT-stimulated insulin levels in group A were higher than in group B (732.1 ± 106.6 vs. $268.3 \pm 66.6 \text{ pmol}/\text{l}$; $P < 0.005$) (Fig. 1b). Basal total ghrelin levels in group A ($281.3 \pm 29.5 \text{ pg}/\text{ml}$) were lower ($P < 0.0005$) than in group B ($563.4 \pm 81.5 \text{ pg}/\text{ml}$) (Fig. 1c). In both groups A and B, OGTT inhibited total ghrelin levels ($P < 0.0005$) (Fig. 1c).

In terms of absolute values, after glucose load total ghrelin levels in group A were lower than those in group B at each time point ($P < 0.0005$) (Fig. 1c). However, the percentage nadir in total ghrelin levels recorded in group A (-25% at 90 min) was similar to that recorded in group B (-31% at 120 min) (Fig. 2).

Total ghrelin levels were negatively associated with BMI ($r = 0.5$, $P < 0.005$) (Fig. 3). Nevertheless, no correlation between ghrelin and insulin or glucose levels was recorded.

Discussion

The results of this study demonstrate that obese children show reduced secretion of total ghrelin, which, however, displays normal sensitivity to the inhibitory effect of oral glucose load. Total ghrelin levels in the obese are in fact inhibited by the OGTT to the same extent as they are in lean children. Total ghrelin levels are negatively associated with body mass but not with insulin or glucose levels.

It had been clearly demonstrated that ghrelin secretion is negatively associated with BMI and fat mass.^{14,17,18,32} In fact, circulating total ghrelin levels are reduced in obesity both in adulthood and in childhood;^{14,17,18} our present data confirm this negative correlation in childhood. A notable exception to this is shown by obese patients with Prader–Willi syndrome; the cause of this peculiarity remains unexplained.^{20,21,33}

In agreement with the major link between nutrition, metabolism and ghrelin, the ghrelin circulating levels are increased by fasting and energy restriction but decreased by food intake and overfeeding, at least in adulthood.^{14,16–18,21,34–36} Accordingly, these variations in ghrelin secretion under nutritional manipulations predict its clear negative association with insulin secretion.^{16,17,22,27,28}

That ghrelin secretion is reduced by both oral and intravenous glucose load has been clearly demonstrated in adults, in whom it is also reduced by insulin-induced hypoglycaemia as well as under the euglycaemic–hyperinsulinaemic clamp.^{22,27,28} Thus, either glucose or

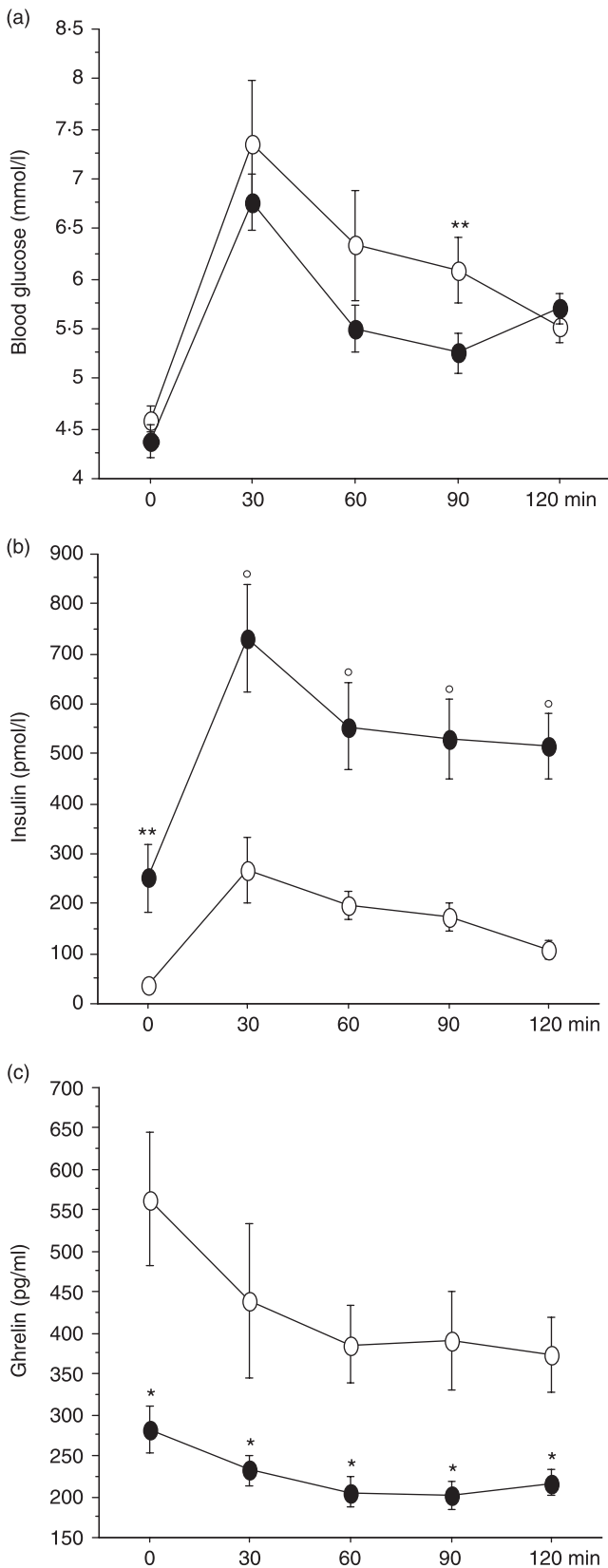


Fig. 1 Absolute values of (a) blood glucose (mmol/l), (b) insulin (pmol/l) and (c) total ghrelin (pg/ml) during OGTT in control (○) and obese (●) children (**P* < 0.0005, ***P* < 0.05, °*P* < 0.005 vs. normal children).

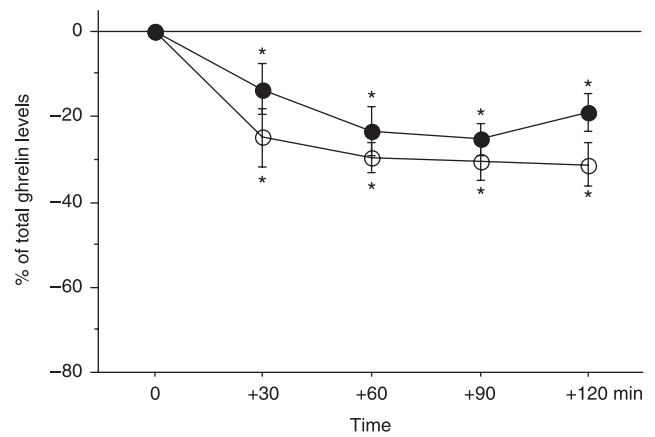


Fig. 2 Mean of delta percentage variation ± SEM of total ghrelin levels (○) normal children, (●) obese children (**P* < 0.005 vs. basal time).

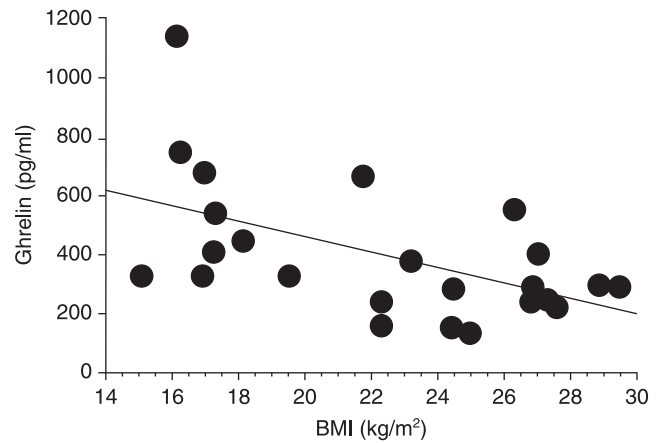


Fig. 3 Negative correlation between total ghrelin levels and BMI in all patients (groups A and B) (*r* = 0.5, *P* < 0.005).

insulin are inhibitory inputs on ghrelin secretion although whether they play a direct or an indirect inhibitory role is still a matter of debate.^{26,31}

Previous studies demonstrated that fasting plasma ghrelin levels were high in anorectic patients, suggesting that ghrelin may play an important role in the pathophysiology of anorexia nervosa.³⁷ Hyperghrelinemia in anorectic patients is caused at least partly by increased secretion of active ghrelin, and glucose ingestion suppresses active ghrelin release in these patients.^{18,38} It has been reported that even the inhibitory effect of food intake on ghrelin secretion is not operative in childhood.³⁹

Our present data demonstrate that ghrelin secretion is inhibited by oral glucose load in obese as well as in lean children. Obese children display a ghrelin hyposecretory state in basal conditions but, at least in terms of percentage decrease, hyperglycaemia inhibits circulating levels to the same extent as recorded in lean children. This occurs despite a clear-cut difference in both basal and OGTT-stimulated insulin secretion. Thus, our present data question previous studies showing the refractoriness of ghrelin secretion to the inhibitory effect of food intake in normal lean children³⁹ as well as to the inhibitory effect of standard light breakfast (SLB) and glucose load

in normal adults.^{40,41} The inhibitory effect of oral glucose load on ghrelin secretion in lean and obese adolescents has been reported;¹⁹ moreover, glucose load and food intake lead to a rapid fall in plasma ghrelin concentration, suggesting that plasma ghrelin reflects an acute feeding state and may also serve as an indicator of short-term energy balance.¹⁸ Thus, the lack of significant reduction of ghrelin secretion following food intake in children reported by some authors could be related to the small number of subjects studied. Alternatively, a meal would be able to inhibit ghrelin only when sufficient amounts of adsorbed carbohydrates elevate glucose and insulin levels enough.⁴² The low glucose content of the SLB would be another explanation for the lack of ghrelin inhibition in children, although the same SLB was able to inhibit ghrelin secretion in adults.⁴⁰

The negative association between ghrelin secretion and fat mass, which, in turn, is positively correlated to insulin secretion, would imply that hyperinsulinism has a role in causing the well-known ghrelin hyposecretory state that connotes obesity.^{14,16,17,43} This would question the major role of insulin per se in controlling ghrelin secretion, at least in childhood. Accordingly, despite hyperinsulinism, ghrelin levels are not reduced at all in obese patients with Prader–Willi syndrome.^{20,21,33} Moreover, children with diabetes type 1 display reduced ghrelin secretion that is not modified by insulin replacement and reduction in glucose levels.⁴⁴ However, it should be emphasized that there is a major drawback of our studies, as well as in the majority of studies addressing ghrelin secretion in physiological and pathological states. In general, total ghrelin is measured, although its acylated form is assumed to be the only active form. However, it has been clearly shown that unacylated ghrelin is also an active peptide exerting remarkable metabolic actions.^{5,11,13,45,46} Thus, a full understanding of the role played by ghrelin at the metabolic level in physiological and pathophysiological states will need an accurate distinction between its circulating acylated and unacylated forms. This knowledge could completely change our understanding of the relationships linking the ghrelin system with insulin secretion and sensitivity, glucose and lipid metabolism.

In conclusion, as in adulthood, obesity in childhood is associated with a significant reduction in total ghrelin secretion. The ghrelin hyposecretory state in obese children is normally sensitive to the inhibitory effect of glucose load.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Sixth EC Program (LSHM-CT-2003-503041) and the SMEM Foundation, Turin, Italy.

References

- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. & Kangawa, K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 656–660.
- Smith, R.G., Leonard, R., Bailey, A.R., Palyha, O., Feighner, S., Tan, C., McKee, K.K., Pong, S.S., Griffin, P. & Howard, A. (2001) Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine*, **14**, 9–14.
- Volante, M., Allia, E., Gugliotta, P., Funaro, A., Broglio, F., Deghenghi, R., Muccioli, G., Ghigo, E. & Papotti, M. (2002) Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 1300–1308.
- Broglio, F., Gottero, C., Benso, A., Prodam, F., Volante, M., Destefanis, S., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J. & Ghigo, E. (2003) Ghrelin and the endocrine pancreas. *Endocrine*, **22**, 19–24.
- van der Lely, A.J., Tschop, M., Heiman, M.L. & Ghigo, E. (2004) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine Reviews*, **25**, 426–457.
- Chanoine, J.P. & Wong, A.C. (2004) Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared with fetal stomach: effect of maternal fasting. *Endocrinology*, **145**, 3813–3820.
- Prado, C.L., Pugh-Bernard, A.E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B. & Sussel, L. (2004) Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 2924–2929.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A.B. & Korbonits, M. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 2988–2991.
- Kalra, S.P. & Kalra, P.S. (2003) Neuropeptide Y: a physiological orexigen modulated by the feedback action of ghrelin and leptin. *Endocrine*, **22**, 49–56.
- Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Weingarh, D.T., Adams, J.R., Frazier, E.G., Shen, Z., Marsh, D.J., Feighner, S.D., Guan, X.M., Ye Z., Nargund, R.P., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., MacNeil, D.J. & Qian, S. (2004) Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*, **145**, 2607–2612.
- Muccioli, G., Tschop, M., Papotti, M., Deghenghi, R., Heiman, M. & Ghigo, E. (2002) Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European Journal of Pharmacology*, **440**, 235–254.
- Ukkola, O. (2003) Ghrelin and insulin metabolism. *European Journal of Clinical Investigation*, **33**, 183–185.
- Gauna, C., Meyler, F.M., Janssen, J.A., Delhanty, P.J., Aribat, T., van Koetsveld, P., Hofland, L.J., Broglio, F., Ghigo, E. & van der Lely, A.J. (2004) Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 5035–5042.
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., Shirakami, G., Usui, T., Shimatsu, A., Doi, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K. & Nakao, K. (2001) Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 4753–4758.
- Cummings, D.E., Clement, K., Purnell, J.Q., Vaisse, C., Foster, K.E., Frayo, R.S., Schwartz, M.W., Basdevant, A. & Weigle, D.S. (2002) Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nature Medicine*, **8**, 643–644.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E. & Weigle, D.S. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, **50**, 1714–1719.
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., Devanarayan, V., Ravussin, E. & Heiman, M.L. (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, **50**, 707–709.
- Shiyya, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M.S., Tanaka, M., Nozoe, S., Hosoda, H., Kangawa, K. & Matsukura, S. (2002) Plasma

- ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 240–244.
- 19 Soriano-Guillen, L., Barrios, V., Martos, G., Chowen, J.A., Campos-Barros, A. & Argente, J. (2004) Effect of oral glucose administration on ghrelin levels in obese children. *European Journal of Endocrinology*, **151**, 119–121.
 - 20 Cummings, D.E., Weigle, D.S., Frayo, R.S., Breen, P.A., Ma, M.K., Dellinger, E.P. & Purnell, J.Q. (2002) Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *New England Journal of Medicine*, **346**, 1623–1630.
 - 21 DelParigi, A., Tschop, M., Heiman, M.L., Salbe, A.D., Vozarova, B., Sell, S.M., Bunt, J.C. & Tataranni, P.A. (2002) High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader–Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 5461–5464.
 - 22 Saad, M.F., Bernaba, B., Hwu, C.M., Jinagouda, S., Fahmi, S., Kogosov, E. & Boyadjian, R. (2002) Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 3997–4000.
 - 23 Mohlig, M., Spranger, J., Otto, B., Ristow, M., Tschop, M. & Pfeiffer, A.F. (2002) Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *Journal of Endocrinological Investigation*, **25**, RC36–RC38.
 - 24 Flanagan, D.E., Evans, M.L., Monsod, T.P., Rife, F., Heptulla, R.A., Tamborlane, W.V. & Sherwin, R.S. (2003) The influence of insulin on circulating ghrelin. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, **284**, E313–E316.
 - 25 Reimer, M.K., Pacini, G. & Ahren, B. (2003) Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*, **144**, 916–921.
 - 26 Schaller, G., Schmidt, A., Pleiner, J., Woloszczuk, W., Wolzt, M. & Luger, A. (2003) Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled crossover clamp study. *Diabetes*, **52**, 16–20.
 - 27 McCowen, K.C., Maykel, J.A., Bistrrian, B.R. & Ling, P.R. (2002) Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *Journal of Endocrinology*, **175**, R7–R11.
 - 28 Lucidi, P., Murdolo, G., Di Loreto, C., De Cicco, A., Parlanti, N., Fanelli, C., Santeusano, F., Bolli, G.B. & De Feo, P. (2002) Ghrelin is not necessary for adequate hormonal counterregulation of insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes*, **51**, 2911–2914.
 - 29 Broglio, F., Koetsveld, P., Benso, A., Gottero, C., Prodam, F., Papotti, M., Muccioli, G., Gauna, C., Hofland, L., Deghenghi, R., Arvat, E., Van Der Lely, A.J. & Ghigo, E. (2002) Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 4829–4832.
 - 30 Barkan, A.L., Dimark, E.V., Jessup, S.K., Symons, K.V., Ermolenko, M. & Jaffe, C.A. (2003) Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 2180–2184.
 - 31 Caixas, A., Bashore, C., Nash, W., Pi-Sunyer, F. & Laferrere, B. (2002) Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 1902–1906.
 - 32 Bellone, S., Rapa, A., Vivenza, D., Vercellotti, A., Petri, A., Radetti, G., Bellone, J., Broglio, F., Ghigo, E. & Bona, G. (2003) Circulating ghrelin levels in newborns are not associated to gender, body weight and hormonal parameters but depend on the type of delivery. *Journal of Endocrinological Investigation*, **26**, RC9–11.
 - 33 Goldstone, A.P., Patterson, M., Kalingag, N., Ghatei, A.M., Brynes, A.E., Bloom, S.R., Grossman, A. & Korbonits, M. (2005) Fasting and postprandial hyperghrelinemia in Prader–Willi syndrome is partially explained by hypoinsulinemia, and is not due to peptide YY3–36 deficiency or seen in hypothalamic obesity due to craniopharyngioma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 2681–2690.
 - 34 Hansen, T.K., Dall, R., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Christiansen, J.S. & Jorgensen, J.O. (2002) Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clinical Endocrinology*, **56**, 203–206.
 - 35 Altman, J. (2002) Weight in the balance. *Neuroendocrinology*, **76**, 131–136.
 - 36 Callahan, H.S., Cummings, D.E., Pepe, M.S., Breen, P.A., Matthys, C.C. & Weigle, D.S. (2004) Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 1319–1324.
 - 37 Nedvidkova, J., Kryorkova, I., Bartak, V., Papezova, H., Gold, P.W., Alesci, S. & Pacak, K. (2003) Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **88**, 1678–1682.
 - 38 Nakai, Y., Hosoda, H., Nin, K., Ooya, C., Hayashi, H., Akamizu, T. & Kangawa, K. (2003) Plasma levels of active form of ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology*, **149**, R1–R3.
 - 39 Bellone, S., Castellino, N., Broglio, F., Rapa, A., Vivenza, D., Radetti, G., Bellone, J., Gottero, C., Ghigo, E. & Bona, G. (2004) Ghrelin secretion in childhood is refractory to the inhibitory effect of feeding. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 1662–1665.
 - 40 Gottero, C., Bellone, S., Rapa, A., van Koetsveld, P., Vivenza, D., Prodam, F., Benso, A., Destefanis, S., Gauna, C., Bellone, J., Hofland, L., van der Lely, A.J., Bona, G., Ghigo, E. & Broglio, F. (2003) 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. *Journal of Endocrinological Investigation*, **26**, 1203–1207.
 - 41 Broglio, F., Gottero, C., Prodam, F., Destefanis, S., Gauna, C., Me, E., Riganti, F., Vivenza, D., Rapa, A., Martina, V., Arvat, E., Bona, G., van der Lely, A.J. & Ghigo, E. (2004) Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycemia but unaffected by glucagon and arginine in humans. *Clinical Endocrinology*, **61**, 503–509.
 - 42 Broglio, F., Benso, A., Gottero, C., Prodam, F., Grottoli, S., Tassone, F., Maccario, M., Casanueva, F.F., Dieguez, C., Deghenghi, R., Ghigo, E. & Arvat, E. (2002) Effects of glucose, free fatty acids or arginine load on the GH-releasing activity of ghrelin in humans. *Clinical Endocrinology*, **57**, 265–271.
 - 43 Yoshihara, F., Kojima, M., Hosoda, H., Nakazato, M. & Kangawa, K. (2002) Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **5**, 391–395.
 - 44 Soriano-Guillen, L., Barrios, V., Lechuga-Sancho, A., Chowen, J.A. & Argente, J. (2004) Response of circulating ghrelin levels to insulin therapy in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Research*, **55**, 830–835.
 - 45 Broglio, F., Gottero, C., Prodam, F., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., Aribat, T., Van Der Lely, A.J. & Ghigo, E. (2004b) Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 3062–3065.
 - 46 Asakawa, A., Inui, A., Sakamaki, R., Shinfuku, N., Ueta, Y., Meguid, M.M. & Kasuga, M. (2005) Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*, **54**, 18–24.

Ghrelin Secretion in Preterm Neonates Progressively Increases and Is Refractory to the Inhibitory Effect of Food Intake

S. Bellone, R. Baldelli, G. Radetti, A. Rapa, D. Vivenza, A. Petri, S. Savastio, M. Zaffaroni, F. Broglio, E. Ghigo, and G. Bona

Division of Pediatrics (S.B., R.B., A.R., D.V., A.P., S.S., M.Z., G.B.), Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, 28100 Novara, Italy; Division of Endocrinology (F.B., E.G.), Department of Internal Medicine, University of Turin, 10126 Turin, Italy; and Department of Pediatrics (G.R.), Regional Hospital, Bolzano 39100, Italy

Context: Ghrelin, a natural GH secretagogue, is mainly characterized by nonendocrine activities such as orexigenic effect and modulation of the endocrine and metabolic response to variations in energy balance. Ghrelin levels have been reported to be negatively associated with insulin secretion, enhanced in anorexia, and reduced in obesity. Ghrelin levels in newborns were shown to be similar to those found in children and adults without any gender-related difference.

Objective: The aim of this study was to evaluate ghrelin variations in preterm newborns as a function of fasting and feeding.

Methods: To this end, in 31 preterm neonates (13 males and 18 females) categorized as appropriate for gestational age, total ghrelin levels were measured in cord blood and then on the fourth day of life before and after meals.

Results: Ghrelin levels in cord blood [(median 25th–75th centile) 184; 122–275 pg/ml] were higher ($P < 0.006$) than levels measured in the

mothers at delivery (167.0; 89–190 pg/ml). In newborns on the fourth day of life, ghrelin levels in fasting conditions (451; 348–649 pg/ml) were higher ($P < 0.0004$) than those in cord blood. The meal did not at all modify ghrelin levels (476; 302–775 pg/ml), which were unchanged, compared with those in fasting condition. Total ghrelin levels in cord blood were not associated with weight and length; conversely, on the fourth day of life ghrelin levels in newborns were negatively correlated to birth weight as well as the present weight ($P = 0.05$, $r = -0.4$). Ghrelin levels were independent of gender, type of delivery, and the kind of feeding regimen.

Conclusions: The secretion of total ghrelin increases from delivery to the fourth day of life when it is refractory to the inhibitory effect of food intake, but it is negatively correlated to body weight. (*J Clin Endocrinol Metab* 91: 1929–1933, 2006)

GHRELIN IS A 28-amino-acid peptide predominantly produced by the stomach that has been discovered as a natural ligand of the orphan GH secretagogue receptor (GHS-R) type 1a and is supposed to play a major role in the control of somatotroph function (1). More recently, ghrelin has been considered as a major new orexigenic factor that, coupled with leptin, is likely to signal the metabolic balance and manage the neuroendocrine and metabolic response to starvation (1).

Circulating ghrelin levels are negatively associated with body mass index; ghrelin secretion is increased in anorexia and cachexia, reduced in obesity, and normalized by recovery of ideal body weight (1, 2). A peculiar exception to the negative association between body mass and ghrelin secretion is Prader-Willi syndrome in which obesity is surprisingly associated with absolute or relative ghrelin hypersecretion (3–4).

In humans, circulating ghrelin levels are increased by energy restriction and decreased by food intake (2, 5), indicat-

ing that the regulation of ghrelin secretion is mostly metabolic. Ghrelin secretion is decreased by an iv or oral glucose load as well as during a euglycemic hyperinsulinemic clamp and even after insulin-induced hypoglycemia (6–8). The inhibitory influence of overexposure to insulin on ghrelin secretion agrees with the strong negative association between ghrelin and insulin levels that had been predicted by the negative correlation between ghrelin levels and body mass index (9). Whether insulin and glucose *per se* play a direct inhibitory role on ghrelin secretion (10, 11) as well as the influence, if any, of amino acids and lipids (12–14) is, however, still unclear.

In humans ghrelin secretion undergoes marked variations throughout the day with peaks that anticipate food intake, suggesting that the latter is triggered by ghrelin discharge (15, 16); although these findings have not been confirmed by others (17), there is agreement that morning ghrelin levels positively correlate with 24-h ghrelin secretion (16). On the other hand, whether ghrelin secretion is age and/or gender dependent is still a matter of debate (2). In a previous study, we found that total ghrelin levels were unchanged from birth to young adulthood (18).

Ghrelin is present in human fetal circulation from 20 wk to term (19). Regarding newborns, it has been demonstrated that ghrelin levels in small for gestational age (SGA) subjects are higher than in adequate for gestational age (AGA) sub-

First Published Online March 7, 2006

Abbreviations: AGA, Adequate for gestational age; GHS-R, GH secretagogue receptor; SGA, small for gestational age.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

jects (19–21). Moreover, lower cord ghrelin levels have been found to be associated with slower weight gain from birth to 3 months of age (22); the clinical consequences, if any, of this picture of ghrelin secretion are unclear. In fact, neither the ghrelin nor the GHS-R1a knockout mice are anorectic dwarfs (23, 24); this evidence, however, does not definitely rule out a role of ghrelin in the control of somatotroph secretion, energy balance, and metabolism.

To further clarify the pattern of ghrelin secretion as a function of the nutritional status around birth, we evaluated ghrelin secretion in the first day of life as a function of fasting and fed state in newborns adequate for gestational age.

Subjects and Methods

We studied 31 neonates (13 males and 18 females) categorized as AGA, born preterm by cesarean section for maternal indications (15 neonates) or spontaneous delivery (16 neonates): gestational age 33.3 ± 1.7 wk (range 31–35 wk), weight 1959 ± 393 g, length 44.2 ± 2.5 cm. AGA was defined as a birth weight from 10th to 90th percentile for gestational age (25). None of the babies showed signs of distress at delivery. Birth weight and length were recorded at birth by the attending nurse. The neonates' weight and meals were monitored during the first 4 d of life. In breast-fed newborns, infants were weighed before and after breast-feeding.

Twelve newborns were completely breast-fed, and 19 newborns were formula fed. Each feed lasted about 20–30 min. Six newborns were fed by nasogastric tube.

Median (25th–75th centile) of total milk intake per day was 14 (9–35) ml on the first day, 56 (35–70) ml for the second day, 96 (64–120) ml on the third day, and 135 (80–200) on the fourth day.

Median (25th–75th centile) of calories per meal on the fourth day was 10.7 (6.6–17.8) kcal.

The content in carbohydrates, lipids, and protein and the energy intake calculated for each meal in the different kinds of milk were statistically similar.

Venous cord blood was drawn immediately after birth. Ghrelin levels were evaluated in different conditions: in cord blood and the mothers at delivery. In the same neonates, ghrelin levels were also measured on the fourth day of life fasting (just before a meal, *i.e.* about 3 h after the previous meal) and about 60 min after a meal.

The study protocol had been approved by the ethical committee, and informed consent had been obtained from all infants' parents.

Human ghrelin (picograms per milliliter) was assayed after extraction in reverse-phase C18 columns by a radioimmunoassay (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont CA) using ^{125}I -labeled bioactive ghrelin as a tracer and a rabbit polyclonal antibody *vs.* octanoylated and des-octanoylated human ghrelin (sensitivity 30 pg/tube). Based on our data, the intraassay coefficient of variation range was 0.3–10.7%.

Hormonal data are expressed as median and 25th to 75th centiles, anthropometric parameters as mean \pm SD. The statistical analysis was performed using Wilcoxon test and Spearman correlation test as appropriate.

Results

Ghrelin levels in cord blood [(median; 25th–75th centile) 184; 122–275 pg/ml] were higher ($P < 0.006$) than those measured in the mothers at the delivery (167.0; 89–190 pg/ml) (Fig. 1).

In newborns on the fourth day of life, ghrelin levels in fasting conditions (451; 348–649 pg/ml) were higher ($P < 0.0004$) than those in cord blood (Fig. 1).

The meal did not modify ghrelin levels (476; 302–775 pg/ml), which were unchanged, compared with those in fasting condition (Fig. 2).

Total ghrelin levels in cord blood were not associated with

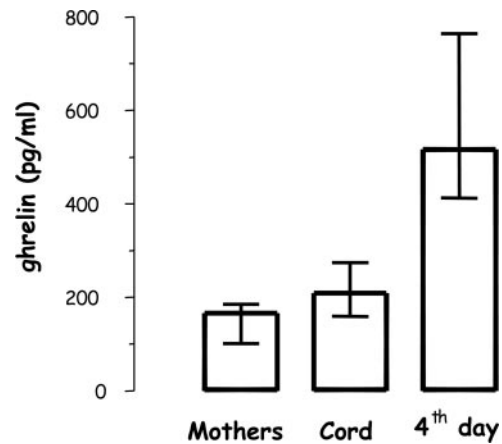


FIG. 1. Plasma ghrelin levels in mothers and newborns in cord blood and fasting on the fourth day of life.

weight and length; they did not correlate with weight, even when data were normalized as a function of gestational age. Conversely, on the fourth day of life, ghrelin levels in newborns negatively correlated to birth weight as well as the present weight ($P = 0.05$, $r = -0.4$ for both) (Fig. 3).

Ghrelin levels did not correlate with gestational age.

Ghrelin levels proved to be independent of both gender and type of delivery either at birth or on the fourth day of life (Table 1).

Ghrelin levels did not vary between breast- and formula-fed infants.

Cord ghrelin levels positively correlated with ghrelin levels at the fourth day of life ($P = 0.005$, $r = 0.5$), whereas they did not correlate with ghrelin levels in mothers.

Discussion

The results of the present study demonstrate that preterm AGA newborns show an increase in total ghrelin secretion from birth (cord levels) to the fourth day of life, which is not modified by a meal. Ghrelin levels are independent of gender and of type of delivery. Circulating total ghrelin levels display negative association with body weight on the fourth day of life but not at birth when, however, they are higher than those in the mothers.

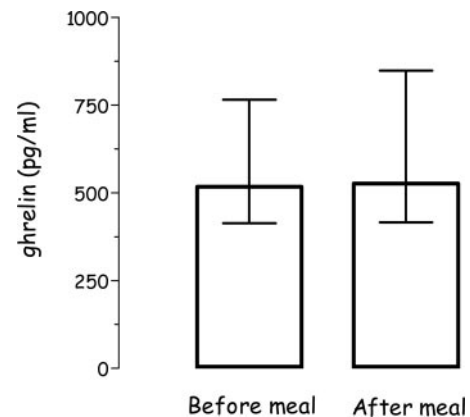


FIG. 2. Ghrelin levels on the fourth day of life before and after a meal.

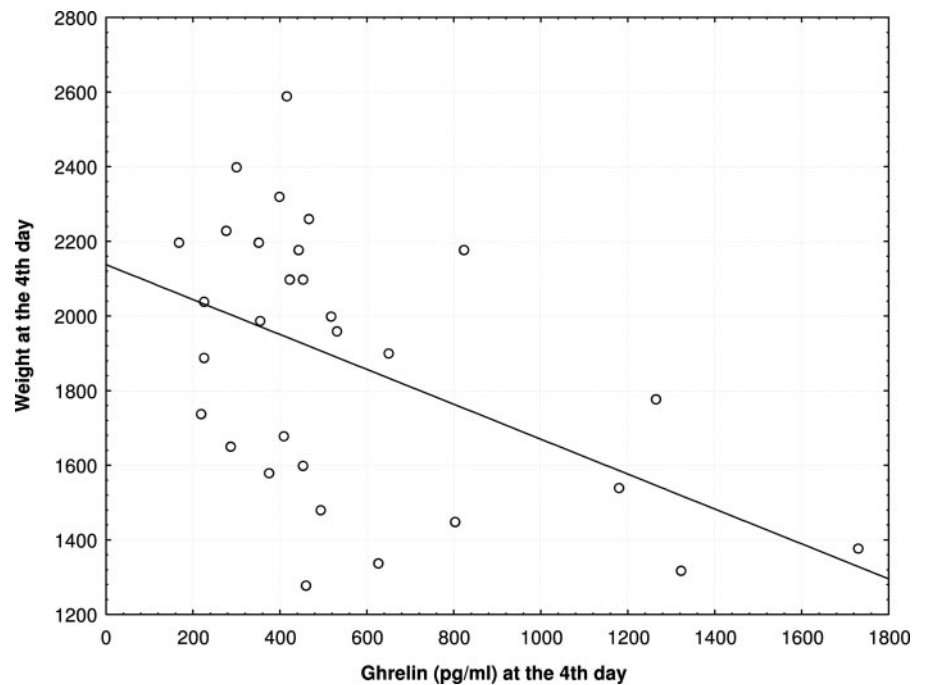


FIG. 3. Correlation between fasting ghrelin levels and weight on the fourth day of life.

Ghrelin synthesis and secretion from the placenta have been demonstrated (26). In the fetal rat stomach ghrelin, cell population progressively increases from the 18th day of pregnancy, and ghrelin cell number has been found to be positively associated with stomach growth (27). In humans, ghrelin has been demonstrated in fetal circulation from 20 wk to term (19). That these ghrelin levels are produced by the fetus is indicated by the lack of difference between arterial and venous concentration as well as by evidence that ghrelin is almost absent in the placenta during the third trimester (19).

Total ghrelin levels in cord blood at birth have been evaluated both in AGA or SGA newborns (20–22, 28–31). Our present data agree with some (22, 28, 29, 31) but not other (20, 21, 31) previous studies showing that circulating total ghrelin levels in cord blood of AGA newborns are independent of gender, body weight, and type of delivery. This is in agreement also with our previous findings in considerable number of newborns in whom ghrelin levels were independent of the two types of delivery (32). Indeed, circulating total ghrelin levels have generally been demonstrated to be higher in SGA than AGA newborns (20, 21, 22, 29, 33). Concerning the correlation between ghrelin and GH/IGF-I axis, no correlation has been reported so often (28–30); in some studies a negative association between ghrelin and IGF-I or IGF binding protein-3 has been reported (21). These findings agree with the opinion of many authors who believe that ghrelin

and somatotroph function are unlikely to be linked by a functional relationship (5). The same concept is likely to apply also to the relationship between ghrelin and leptin; despite the fact that both play relevant actions in the control of appetite and energy expenditure (1, 2), these hormones do not seem linked by direct functional feedback (33).

In the present study as well as two other studies (21, 29), progressive increase in circulating total ghrelin levels in the days after birth has been demonstrated. Moreover, our present study first demonstrates that feeding does not exert its well-known inhibitory effect on circulating total ghrelin levels. It had already been demonstrated that food intake inhibits morning ghrelin secretion in adults but not prepubertal children (34, 35). This ghrelin refractoriness to food intake from birth to childhood would therefore suggest that this hormone is playing a role as an anabolic drive in the phase of life of growth and development. However, it has to be considered that in infants as well as children, ghrelin secretion is sensitive to the inhibitory effect of glucose load despite its refractoriness to feeding (36, 37).

On the other hand, it has to be considered that the first days of life are characterized by physiological weight decrease that reaches a nadir on the fourth day (25). This weight decrease would play a role in stimulating ghrelin secretion and would also account for the refractoriness to the inhibitory effect of feeding, as has been observed also in anorexia nervosa (38). In fact, we, as well as other authors, found that

TABLE 1. Ghrelin levels at each time point in males and females and neonates born by vaginal or cesarean delivery

	Cord blood (pg/ml)	Fourth-day fasting (pg/ml)	Fourth-day feeding (pg/ml)
Males	176, 149–247	494, 374–801	479, 302–741
Females	186, 119–326	414, 275–649	463, 297–833
Vaginal delivery	184, 121–210	420, 300–494	401, 299–526
Cesarean delivery	223, 155–335	541, 353–1264	719, 451–1221

Data are presented as median, 25th–75th centile.

soon after birth and namely on the fourth day of life, circulating total ghrelin levels display inverse association with anthropometric variables, including body weight (22, 29). Furthermore, it has to be considered that in newborns the control of growth is different from that in later life and is related to the immaturity of the neuroendocrine system, in particular in our population consisting of preterm newborns. According to this picture, it has been demonstrated in preterm newborns that circulating concentrations of leptin and free T₄ rapidly decrease after birth. This pattern could be a physiological advantage to newborns by limiting body energy expenditure and conserving nutritional reserves for growth and development (39). These data have to be confirmed in a group of full-term newborns.

Furthermore, it has to be taken into consideration that in our study, as well as in others performed in neonates, only total ghrelin levels were measured. This is a limitation in the comprehension of ghrelin's role in growth and metabolism. In fact, it has been demonstrated that ghrelin circulates in blood in the acylated form that binds GHS-R1a receptors and possesses endocrine activity, and the nonacylated form, which is present in human serum in greater quantities than the acylated one and is able to exert some nonendocrine effects, is devoid of any endocrine activity but exerts some nonendocrine actions including metabolic, cardiovascular, and antiproliferative effects.

In conclusion, the secretion of total ghrelin increases from delivery to the fourth day of life when it is refractory to the inhibitory effect of food intake. This pattern of ghrelin secretion would be focused to represent an anabolic drive in newborns.

Acknowledgments

Received October 3, 2005. Accepted February 27, 2006.

Address all correspondence and requests for reprints to: Gianni Bona, M.D., Division of Pediatrics, Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro," Corso Mazzini 18, 28100 Novara, Italy. E-mail: gianni.bona@maggioreosp.novara.it.

All authors have nothing to declare.

References

1. Van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E 2004 Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25:426–457
2. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB 2004 Ghrelin—a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 25:27–68
3. DelParigi A, Tschop M, Heiman ML, Salbe AD, Vozarova B, Sell SM, Bunt JC, Tataranni PA 2002 High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5461–5464
4. Goldstone AP, Thomas EL, Brynes AE, Castroman G, Edwards R, Ghatei MA, Frost G, Holland AJ, Grossman AB, Korbonits M, Bloom SR, Bell JD 2004 Elevated fasting plasma ghrelin in Prader-Willi syndrome adults is not solely explained by their reduced visceral adiposity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1718–1726
5. Ghigo E, Broglio F, Arvat E, Maccario M, Papotti M, Muccioli G 2005 Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 62:1–17
6. McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR 2002 Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 175:R7–R11
7. Nakagawa E, Nagaya N, Okumura H, Enomoto M, Oya H, Ono F, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K 2002 Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clin Sci* 103:325–328
8. Broglio F, Gottero C, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, Me E, Riganti F, Vivenza D, Rapa A, Martina V, Arvat E, Bona G, van der Lely AJ, Ghigo E 2004 Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycaemia but unaffected by glucagon and arginine in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61:503–509
9. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S 2002 Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87:240–244
10. Caixas A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrere B 2002 Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1902
11. Schaller G, Schmidt A, Pleiner J, Woloszczuk W, Wolzt M, Luger A 2003 Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled crossover clamp study. *Diabetes* 52:16–20
12. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley Jr GH 2002 Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143:185–190
13. Erdmann J, Lippel F, Schusdziarra V 2003 Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 116:101–107
14. Groschl M, Knerr I, Topf HG, Schmid P, Rascher W, Rauh M 2003 Endocrine responses to the oral ingestion of a physiological dose of essential amino acids in humans. *J Endocrinol* 179:237–244
15. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C 2001 Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24:RC19–RC21
16. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS 2001 A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714–1719
17. Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, Jaffe CA 2003 Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2180–2184
18. Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Castellino N, Petri A, Bellone J, Me E, Broglio F, Prodam F, Ghigo E, Bona G 2002 Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *J Endocrinol Invest* 25:RC13–RC15
19. Cortelazzi D, Cappiello V, Morspurgo PS, Ronzoni S, Nobile De Santis MS, Cetin I, Beck-Peccoz P, Spada A 2003 Circulating levels of ghrelin in human fetuses. *Eur J Endocrinol* 149:111–116
20. Farquhar J, Heiman M, Wong AC, Wach R, Chessex P, Chanoine JP 2003 Elevated umbilical cord ghrelin concentrations in small for gestational age neonates. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4324–4327
21. Kitamura S, Yokota I, Hosoda H, Kotani Y, Matsuda J, Naito E, Ito M, Kangawa K, Kuroda Y 2003 Ghrelin concentration in cord and neonatal blood: relation to fetal growth and energy balance. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5473–5477
22. James RJ, Drewett RF, Cheetham TD 2004 Low cord ghrelin levels in term infants are associated with slow weight gain over the first 3 months of life. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3847–3850
23. Sun Y, Ahmed S, Smith RG 2003 Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* 23:7973–7981
24. Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG 2004 Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4679–4684
25. Lubchenco LO, Koops BL 1987 Assessment of weight and gestational age. In: Avery GB, ed. *Neonatology*. Philadelphia: JB Lippincott Co.; 235–257
26. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F 2001 Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142:788–794
27. Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Murakami N 2002 Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol* 173:239–245
28. Chanoine JP, Yeung LP, Wong AC 2003 Umbilical cord ghrelin concentrations in Asian and Caucasian neonates. *Horm Res* 60:116–120
29. Soriano-Guillen L, Barrios V, Chowen JA, Sanchez I, Vila S, Quero J, Argente J 2004 Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *J Pediatr* 144:30–35
30. Chanoine JP, Yeung LP, Wong AC, Birmingham CL 2002 Immunoreactive ghrelin in human cord blood: relation to anthropometry, leptin, and growth hormone. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35:282–286
31. Onal EE, Cinaz P, Atalay Y, Turkyilmaz C, Bideci A, Akturk A, Okumus N, Unal S, Koc E, Ergenekon E 2004 Umbilical cord ghrelin concentrations in small- and appropriate-for-gestational age newborn infants: relationship to anthropometric markers. *J Endocrinol* 180:267–271
32. Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Vercellotti A, Petri A, Radetti G, Bellone J, Broglio F, Ghigo E, Bona G 2004 Circulating ghrelin levels in the newborn are positively associated with gestational age. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:613–617
33. Chan JL, Bullen J, Lee JH, Yiannakouris N, Mantzoros CS 2004 Ghrelin levels

- are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 89:335–343
34. Gottero C, Bellone S, Rapa A, van Koetsveld P, Vivenza D, Prodam F, Benso A, Destefanis S, Gauna C, Bellone J, Hofland L, van der Lely AJ, Bona G, Ghigo E, Broglio F 2003 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* 26:1203–1207
35. Bellone S, Castellino N, Broglio F, Rapa A, Vivenza D, Radetti G, Bellone J, Gottero C, Ghigo E, Bona G 2004 Ghrelin secretion in childhood is refractory to the inhibitory effect of feeding. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1662–1665
36. Iniguez G, Ong K, Pena V, Avila A, Dunger D, Mericq V 2002 Fasting and post-glucose ghrelin levels in SGA infants: relationships with size and weight gain at one year of age. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5830–5833
37. Soriano-Guillen L, Barrios V, Martos G, Chowen JA, Campos-Barros A, Argente J 2004 Effect of oral glucose administration on ghrelin levels in obese children. *Eur J Endocrinol* 151:119–121
38. Nedvidkova J, Krykorkova I, Bartak V, Papezova H, Gold PW, Alesci S, Pacak K 2003 Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1678–1682
39. Ng PC, Lam CW, Lee CH, Wong GW, Fok TF, Chan IH, Ma KC, Wong E 2000 Leptin and metabolic hormones in preterm newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 83:F198–F202

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

WorldMEN 2006

MARSEILLE, France

Palais du Pharo

September 7–10, 2006

International Workshop
on Hereditary and Sporadic Endocrine Tumors

All information is available on the congress web site: www.endocrino.net/GTE

A Novel Deletion in the *GH1* Gene Including the IVS3 Branch Site Responsible for Autosomal Dominant Isolated Growth Hormone Deficiency

Daniela Vivenza, Laura Guazzarotti, Michela Godi, Daniela Frasca, Berardo di Natale, Patricia Momigliano-Richiardi, Gianni Bona, and Mara Giordano

Unit of Pediatrics (D.V., G.B.), Department of Medical Sciences, Eastern Piedmont University, 28100 Novara, Italy; Department of Pediatrics (L.G., D.F., B.d.N.), Luigi Sacco Hospital, University of Milan, 20157 Milan, Italy; and Laboratory of Human Genetics (M.Go., P.M.-R., M.Gi.), Department of Medical Sciences, Eastern Piedmont University and Interdisciplinary Research Center on Autoimmune Diseases, 28100 Novara, Italy

Context: The majority of mutations responsible for isolated GH type II deficiency (IGHD II) lead to dominant negative deleteriously increased levels of the *GH1* exon 3 skipped transcripts.

Objective: The aim of this study was the characterization of the molecular defect causing a familial case of IGHHD II.

Patients: A 2-yr-old child and her mother with severe growth failure at diagnosis (−5.8 and −6.9 SD score, respectively) and IGHHD were investigated for the presence of *GH1* mutations.

Results: We identified a novel 22-bp deletion in IVS3 (IVS3 del+56–77) removing the putative branch point sequence (BPS). Analysis of patients' lymphocyte mRNA showed an excess exon 3 skipping. The mutated allele transfected into rat pituitary cells produced four dif-

ferently spliced products: the exon 3 skipped mRNA as the main product and lower amounts of the full-length cDNA and of two novel mRNA aberrant isoforms, one with the first 86 bases of exon 4 deleted and the other lacking the entire exon 4. A mutagenized construct lacking exclusively the 7 bp of the BPS only generated the exon 4 skipped and the full-length isoforms. The presence of the full-length transcript in the absence of the canonical BPS points to an alternative BPS in IVS3.

Conclusion: The IVS3 del+56–77 mutation, causing IGHHD II in this family, has two separate effects on mRNA processing: 1) exon 3 skipping, analogous to most described cases of IGHHD II, an effect likely caused by the reduction in size of the IVS3, and 2) partial or total exon 4 skipping, as a result of the removal of the BPS. (*J Clin Endocrinol Metab* 91: 980–986, 2006)

APPROXIMATELY 75% OF the circulating GH is a 191-amino-acid peptide with a molecular mass of 22 kDa. Alternative splicing of the original transcript gives rise to minor amounts of several smaller isoforms. The most represented of these alternative spliced transcripts lacks the first 45 bp of exon 3 through activation of an in-frame cryptic splice site and produces a 20-kDa peptide missing amino acids 32–46 (1). Complete skipping of exon 3, accounting for 1–5% of the total *GH1* transcripts, results in a 17.5-kDa form lacking amino acids 32–71. Two isoforms lacking exons 3–4 and exons 2–4 and encoding 11.3- and 7.4-kDa peptides have also been detected (2).

Mutations in the *GH1* gene have been identified both in type I (autosomal recessive) and type II (autosomal dominant) familial isolated GH deficiency (IGHD) (2, 3). IGHHD II is caused mainly by mutations affecting GH mRNA splicing, falling within the first six bases of the IVS3 5' donor splice site (4–8) or disrupting splicing enhancer elements. The latter includes two mutations in an exon 3 splicing enhancer, ESEm1 + 1G→T (9) and ESEm2 + 5A→G (10), and two

mutations in an IVS3 splicing enhancer, ISEm1(IVS3 + 28 G→A) and ISEm2(IVS3Δ28–45) (11, 12). All the reported splicing mutations lead to deleteriously increased levels of the exon 3 skipped transcripts encoding the 17.5-kDa isoform. This isoform lacks the protein linker domain between helix 1 and helix 2 of the mature GH and a cysteine residue, Cys⁵³, involved in the interaction between helix 1 and helix 4 (13). Thus, without the amino acids encoded by the third exon, the molecule cannot fold normally. This altered GH structure exhibits a dominant negative effect on secretion of the 22-kDa isoform. The 17.5-kDa isoform is initially retained in the endoplasmic reticulum, disrupts the Golgi apparatus, impairs both GH and other hormonal trafficking (14), and decreases the intracellular stability of the wild-type GH (15). Moreover, the 17.5-kDa isoform causes a dose-dependent disruption of GH secretory vesicles when expressed in GC cells and transgenic mice (16).

In addition to the above cited splicing mutations, three missense mutations, V110F, P89L, and R183H, are reported (8, 17, 18).

We here describe a novel splicing mutation in an IGHHD II family, a 22-bp deletion in the IVS3 of the *GH1* gene encompassing the branch point sequence (BPS) (11). This mutation generates at least three aberrant isoforms: the more abundant exon 3 skipped isoform and two minor isoforms lacking the first 86 nucleotides of exon 4 and the entire exon 4, respectively.

First Published Online December 20, 2005.

Abbreviations: BPS, Branch point sequence; IGHHD, isolated GH deficiency; SDS, sd score.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

Subjects and Methods

Subjects

The proband, a 2-yr-old girl, came to our observation for severe growth failure at the age of 7 months. She was born by spontaneous delivery after a normal pregnancy at 36 wk gestation with a weight of 2720 g (25th percentile) and a length of 44 cm (3rd percentile). Her phenotype had the IGHD characteristic features: slow but harmonious body development with regular segment proportions, prominent frontal bones, and saddle nose. After biochemical evaluations that excluded organic diseases, two stimulation tests for GH secretion study were performed showing a complete GH deficiency (immunoradiometric assay; DiaSorin, Stillwater, MN) confirmed by the IGF-I dosage (chemiluminescent enzyme-labeled immunometric assay; Medical System, Los Angeles, CA) (Table 1). Analysis of TSH (electrochemiluminescence immunoassay; Roche, Indianapolis, IN) and cortisol (RIA; Adaltis, Montreal, Canada) excluded other anterior pituitary hormone deficiencies (Table 1). The magnetic resonance imaging of the pituitary region performed with narrow scanning and gadolinium injection reported a normal anatomy of the region with the sagittal T1 images showing a mild hypoplasia of the pituitary gland with a height at -2.0 SD score (SDS) for age (21). Therapy with human recombinant GH, started at the age of 9 months at the dose of 0.033 mg/kg·d, yielded a very good response; the growth velocity reached 20 cm/yr (Table 1).

The proband's mother, now 39 yr old, arrived for medical observation for severe growth failure at the age of 4.6 yr. She was born after a normal pregnancy and delivery, but no information is available about her weight and length at birth. Her clinical and hormonal characteristics are shown in Table 1. She was treated, in a noncontinuous way, with human pituitary-derived GH until the age of 16 yr with a final height of 146 cm, which was her target height (mother's height, 148 cm; father's height, 160 cm). After GH suspension at the age of 16, she developed severe obesity. A new test for hypophyseal hormones at the age of 38 confirmed complete GH deficiency, whereas the other pituitary hormones were in the normal range (Table 1). She has now resumed exogenous GH therapy, and her weight is decreasing. The magnetic resonance of the pituitary region, not previously performed, was done with narrow scanning and gadolinium injection, showing a normal anatomy and size of the adenohypophysis for age and sex (-0.5 SDS) (22). A written informed consent was obtained from the proband's mother for herself and her daughter and from all the tested family members.

PCR amplification and sequencing of the GH1 gene

Genomic DNA was amplified by PCR using primers flanking the GH1 gene and a proofreading *Taq* polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland).

TABLE 1. Clinical and hormonal data of the two IGHD II patients

	Age (yr)	HSDS	BMI SDS	GH peak (ng/ml)	IGF-I (ng/ml)	IGF-I SDS (ng/ml)	Free T ₄ (pg/ml)	TSH (μU/ml)	Cortisol (ng/ml)
Child									
h	0.16	-3.4	0.0						
h	0.42	-4.9	-0.7						
A	0.58	-5.8	-0.8	0.4 ^a /0.4 ^b	<15	-5.0	11.5	2.92	75.5
B	1.6	-2.9	-2.1	NA	38.9	-2.5	12.4	5.9	80.2
Mother									
h	2.0	-5.0							
A	4.6	-6.9	-0.4	3.0 ^a /3.6 ^c	NA	NA	NA	NA	105.4
B	5.6	-5.6	-1.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C	16	-3.0	4.3	NA	NA	NA	14.5	4.2	NA
D	38	-2.7	6.7	0.5 ^d	50	-4.0	15.4	1.5	148.2
E	39	-2.7	5.7	NA	164	-1.0	16.2	1.3	NA

NA, Not available; BMI SDS, body mass index SD score calculated from BMI Rolland-Cachera charts in pediatric age (19) and from BMI charts from American National Health and Nutrition Survey data in adulthood age (20); HSDS, height SD score; h, historical data; A, diagnosis; B, after 1 yr of GH treatment; C, stop of GH; D, restart of GH; E, after 1 yr of GH restart. Normal ranges: peak GH above 10 μg/ml; IGF-I 55–327 (0–1 yr), 51–303 (1–2 yr), 109–284 (36–40 yr); free T₄ 11–20 (0–1 yr), 9–17 (1–6 yr), 9.3–17 (>18 yr); TSH 1.36–8.8 (0–1 yr), 0.85–6.5 (1–6 yr), 0.27–4.2 (>18 yr); cortisol 50–250 (early morning).

^a Arginine stimulation test.

^b Desametazone stimulation test.

^c Insulin stimulation test.

^d GHRH + arginine stimulation test.

The resulting 2.7-kb product was used as template for a series of nested PCRs using internal primers for the proximal promoter, the five exons, the four introns, and the untranslated regions of the GH1 gene. PCR conditions and primer sequences are available upon request.

The resulting PCR products were visualized on a 2% agarose gel, purified from the gel using a Perfectprep Gel Cleanup system (Eppendorf, Hamburg, Germany) and used as template for sequencing in both senses with the Big-dye terminator cycle sequencing reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and an ABI 3100 automated sequencer.

The PCR product containing the IVS3 deletion in the heterozygous state was then cloned by the pMOSBlue T-vector kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) following the manufacturer's instructions, and the two alleles were separately sequenced.

Synthesis and amplification of GH cDNA

Total RNA was extracted from lymphocytes by RNAwiz (Ambion, Austin, TX). cDNA was obtained by RT-PCR using the RETROscript Kit (Ambion) and amplified with three different couples of primers designed to amplify different parts of the wild-type cDNA (Fig. 1).

The products were extracted from a 2% agarose gel and directly sequenced.

Plasmid preparation and cell transfection

The 2700-bp PCR product encompassing the entire GH1, obtained from the proband's genomic DNA, was cloned into the pMOS plasmid (pMOSBlue T-vector kit; Amersham). Two clones containing the wild-type and the mutated allele, respectively, were selected by sequencing. A fragment of 2 kb containing the whole GH1 sequence was released by digestion with *Bam*HI, purified from gel by the Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany), and inserted into the pcDNA3.1(+) expression vector (Invitrogen, Chatsworth, CA) previously digested with *Bam*HI.

The *in vitro* mutagenized mutΔ7 was generated from the wild-type GH1-carrying plasmid by the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) using two mismatch complementary oligonucleotides.

DH101F' competent cells were then transformed with the different constructs and grown on LB/ampicillin media.

Plasmid DNA was extracted (Plasmid Midiprep; QIAGEN), sequenced, and used for transient transfection of the rat pituitary GH4C1 cell line (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Cells were grown to approximately 80% confluence in 35-mm dishes and transfected with 2 μg of each construct using the Fugene 6 transfection

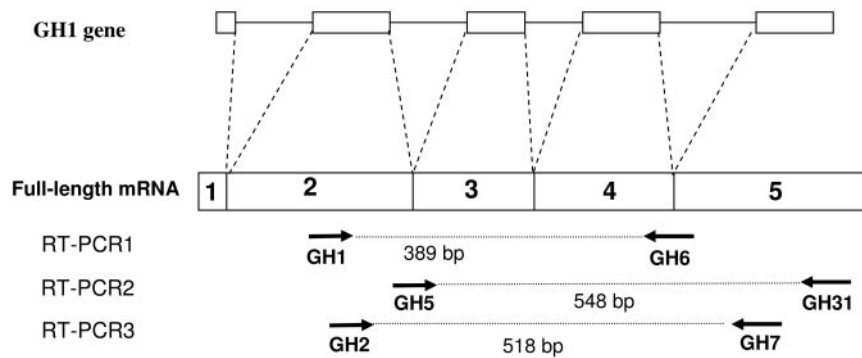


FIG. 1. Scheme of *GH1* pre-mRNA splicing showing the full-length mRNA and the RT-PCR products. RT-PCR1 performed with primers GH1 (5'-TTCCCAACCATTCCCTTATC-3') and GH6 (5'-TCTTCCAGCCTCCCATCAGC-3) amplifies part of exon 2, exon 3, and exon 4 allowing detection of exon 3 skipped products. RT-PCR2 performed with primers GH5 (5'-TACCAGGAGTTTGAAGAAGC-3') and GH31 (5'-TCCAGGCGCAGGAGAGGCACTGGGG-3') amplifies exon 3, exon 4, and exon 5 allowing detection of exon 4 skipped products. RT-PCR3 performed with primers GH2 (5'-CGTCTGCACCAGCTGGCCTT-3') and GH7 (5'-AAGCCACAGCTGCCCTCCACAGA-3') amplifies part of exon 2, exon 3, exon 4, and part of exon 5 allowing detection of both exon 3 and exon 4 skipped products.

reagent (Roche), following the manufacturer's instructions. Total RNA was purified from rat cells 48 h after transfection by RNeasy Mini Kit (QIAGEN) and reverse transcribed.

Results

Sequencing of the *GH1* gene

Sequencing of the *GH1* gene in the proband of an IGHD II family revealed the presence of a heterozygous 22-bp deletion in IVS3 (Fig. 2). The deletion is flanked by a stretch of five Cs (nt 53–57 of the IVS3) at the 5' side and of three Cs (nt 75–77) at the 3' side. Because three of these Cs are retained in the deleted allele, it is not possible to exactly define the limits of the deletion. We arbitrarily named the mutation as IVS3 del+56–77. The deletion includes the IVS3 BPS, which extends from nt 67 to nt 73 of IVS3 (between –25 and –20 from the 3' splice site) (11). The same deletion was detected in the proband's mother (subject II-2, Fig. 3A), whereas it was absent in all the tested unaffected family members.

To identify the origin of the deletion, all the family members were typed for previously described promoter polymorphisms (23, 24), and *GH1* haplotype transmission was deduced from family segregation (Fig. 3A). The 22-bp deletion was carried by a *GH1* haplotype (–278T/–75A/–57G/–6G/+3G) that subject II-2 inherited from her father (I-1). The same haplotype was transmitted without the deletion from I-1 to II-3, II-5, and II-6. Thus, IVS3 del+56–77 is a *de novo* mutation in II-2.

Analysis of *GH1* transcripts in lymphocytes

Ectopic transcript analysis was performed on cDNA from lymphocyte mRNA of all the family members. Two couples of primers were specifically designed to detect an aberrant splicing involving either exon 3 (RT-PCR1) or exon 4 (RT-PCR2), immediately 5' and 3' of the intron with the deletion (Fig. 1).

After amplification with RT-PCR1 primers (Fig. 3B), a band of 389 bp corresponding to the wild-type full-length cDNA was detected in all the individuals. In addition, the affected subjects III-1 and II-2 showed a smaller band of 269 bp with approximately the same intensity of the full-length band. This 269-bp band was scarcely detectable in the normal-height members and corresponded to the 17.5-kDa isoform lacking the entire exon 3. A faint 344-bp band, corresponding to the 20-kDa isoform, was visible in all the subjects.

Most of the previously reported BPS mutations in humans lead to either the partial or total skipping of the exon that follows the mutated intron (25–28) or to the retention of the intron carrying the mutated BPS (29). The presence of aberrant splicing products involving exon 4 was therefore investigated by RT-PCR2 (Fig. 3C). A unique band of 548 bp, corresponding to the full-length transcript, was detected both in the affected and unaffected family members.

Thus, the information deriving from lymphocyte mRNA

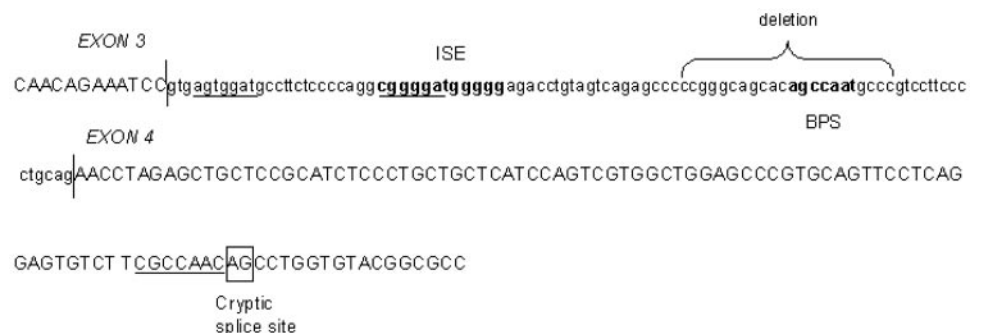


FIG. 2. Sequence of *GH1* IVS3 and of part of exons 3 and 4. The intron splicing enhancer (ISE) and the BPS are in **bold**. The putative cryptic splice site is boxed. In IVS3 and exon 4, the cryptic BPSs are underlined.

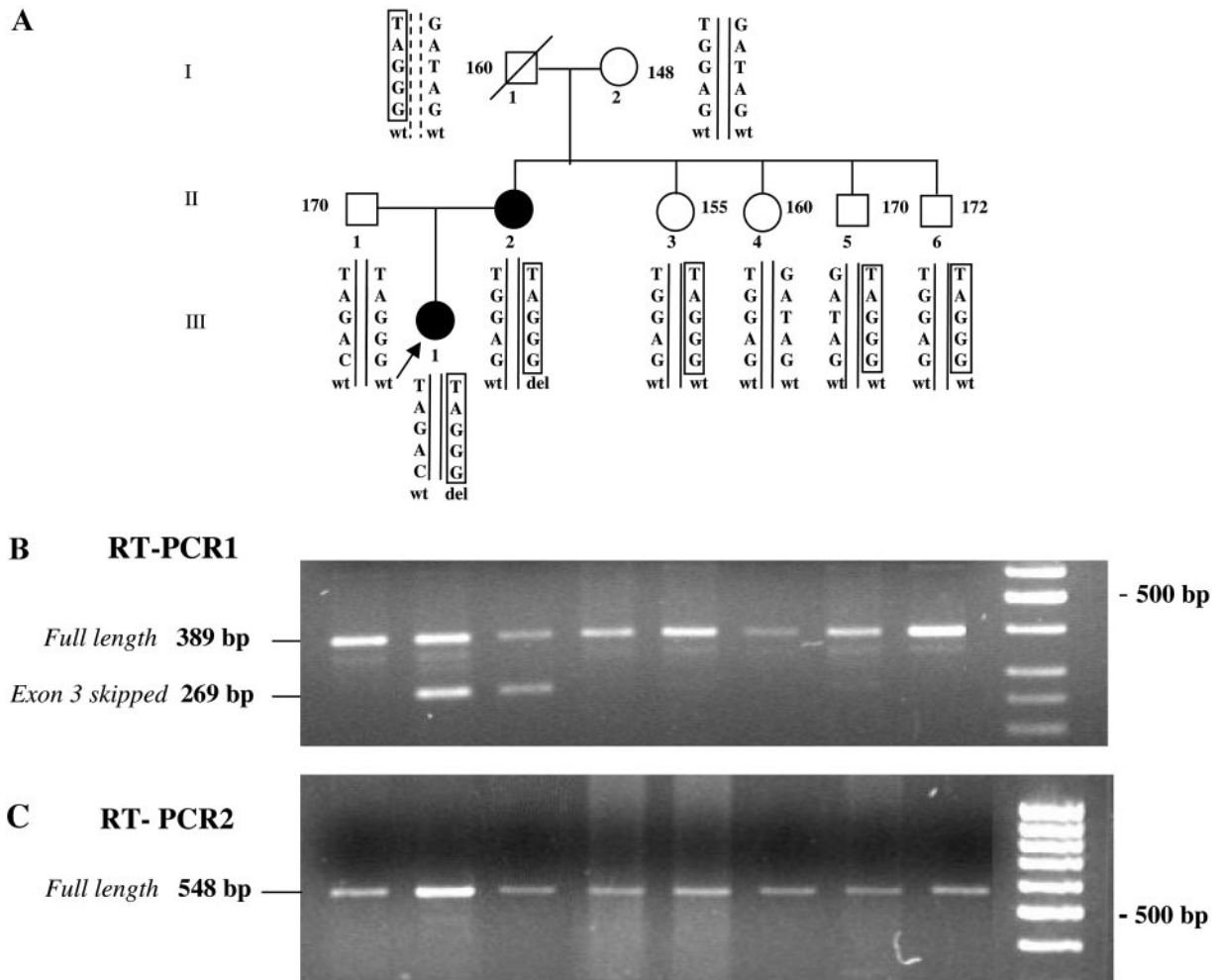


FIG. 3. A, Pedigree of the IGHD II family. *Black symbols* indicate affected individuals. For each member are indicated the stature (expressed in centimeters; only in unaffected individuals), the GH1 promoter haplotypes resulting, from top to bottom, from the allelic combinations of single-nucleotide polymorphisms $-278\text{G}/\text{T}$, $-75\text{A}/\text{G}$, $-57\text{T}/\text{G}$, $-6\text{A}/\text{G}$, $+3\text{G}/\text{C}$, and the IVS3 sequence (wt, wild-type; del, IVS3 del+56–77 mutation). From family segregation, it was possible to reconstruct both *GH1* haplotypes (indicated with a *broken line*) for the deceased individual I-1. The haplotype in which the *de novo* mutation occurred is *boxed*. The proband is indicated by an *arrow*. B, RT-PCR1 performed on lymphocyte mRNA; C, RT-PCR2 performed on lymphocyte mRNA. The gel lanes are positioned under the corresponding individual. All the visible bands were extracted from the gel and sequenced.

analysis was that the IVS3 deletion induces the production of a remarkable amount of mRNA lacking exon 3.

In vitro expression of the *GH1* allele harboring the IVS3 del+56–77 mutation

To assess whether the skipping of exon 3 was the only aberrant product generated by the del+56–77 mutation, we analyzed the transcripts of the mutated allele in pituitary cells *in vitro*. To this purpose, we transfected GH4C1 rat pituitary cells with an expression vector containing either the normal *GH1* allele (wt-*GH1*) or the *GH1* allele with the IVS3 del+56–77 mutation (del-*GH1*). Because the two constructs were independently transfected, this analysis also allowed us to discriminate the products of the mutant and of the wild-type allele, which were coamplified in the lymphocyte cDNA.

The mRNAs from transfected cells were reverse transcribed and amplified with RT-PCR1 and RT-PCR2 primers.

These are specific for the human *GH1* and did not amplify the rat mRNA from untransfected GH4C1 cells (Fig. 4, lane 2).

RT-PCR1 on the wt-*GH1* mRNA yielded three bands corresponding to three *GH1* transcripts (Fig. 4A, lane 3) also detected in the lymphocytes of normal subjects, *i.e.* the main 22-kDa full-length transcript (389 bp), the 20-kDa isoform (344 bp), and the 17.5-kDa isoform (269 bp). On the contrary, the del-*GH1* construct generated exclusively one intense band corresponding to the exon 3 skipped (17.5-kDa) transcript (Fig. 4A, lane 4).

When amplified with RT-PCR2 primers (Fig. 4B), which do not anneal to the exon 3 skipped product, the cDNA from cells transfected with wt-*GH1* only contained the full-length transcript (lane 3), whereas del-*GH1* generated three differently spliced mRNAs (lane 4) corresponding to 1) the full-length mRNA (548 bp), 2) a 462-bp transcript in which the first 86 bp of the exon 4 were deleted, and 3) a 383-bp transcript in which the 165 bp of exon 4 were absent. Thus, in

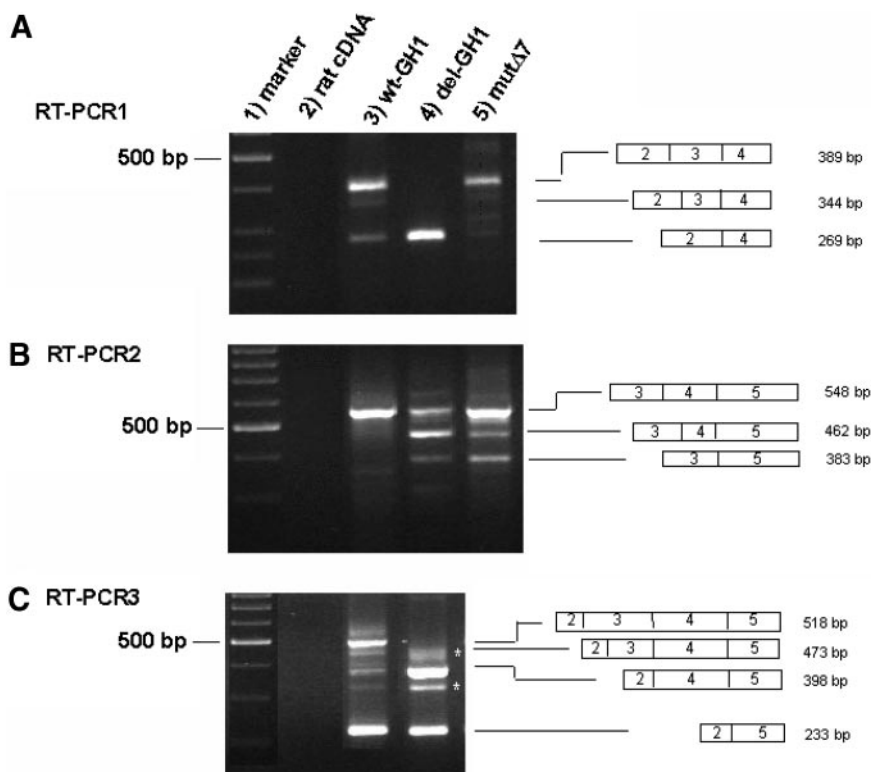


FIG. 4. RT-PCR performed on the mRNA extracted from GH4C1 pituitary cells: untransfected (rat cDNA; lane 2), transfected with the wild-type *GH1* gene (wt-GH1; lane 3), transfected with the *GH1* allele harboring the IVS3 del+56–77 mutation (del-GH1; lane 4), and transfected with the mutagenized *GH1* gene harboring the 7-bp BPS deletion (mut Δ 7; lane 5). The RT-PCR was performed with the three couples of primers of RT-PCR1 (A), RT-PCR2 (B), and RT-PCR3 (C). Each PCR product was eluted from the gel and characterized by sequencing. The result is outlined on the right of each band. *, Heteroduplex molecules formed by mispairing of the 398- and 233-bp fragment.

pituitary cells transfected with the deleted allele, it was possible to detect two novel aberrantly spliced isoforms involving exon 4 that were not visible in the patients' lymphocytes and in pituitary cells transfected with the wild-type allele. Moreover, the RT-PCR2 primers showed that the mutant allele also produces a small amount of the full-length mRNA.

To investigate which of the above described alternatively spliced fragments was the direct consequence of the BPS deletion, the wt-GH1 plasmid was mutagenized to obtain a sequence lacking exclusively the 7 bp of the BPS consensus (mut Δ 7). The cDNA produced by mut Δ 7 showed only the aberrant exon 4 skipped fragments as expected for a BPS mutation (Fig. 4, A and B). As observed for del-GH1, the mut Δ 7 construct also produced a visible amount of the full-length cDNA.

A third set of primers (RT-PCR3) located within exons 1–2 and exon 5 was designed to amplify all the isoforms in the same reaction (Fig. 1). Because we did not perform a quantitative PCR, we can only roughly estimate the relative amount of the different isoforms, with the limitation that smaller fragments are in any case preferentially amplified. Four fragments were visible on a 2% agarose gel in correspondence of the deleted allele (Fig. 4C, lane 4). The two bands of higher intensity corresponded to the 17.5-kDa isoform (398 bp) and to a smaller transcript lacking both exons 3 and 4 (233 bp), encoding the normal 11.3-kDa isoform (2). The latter is detectable only under the RT-PCR3 conditions (Fig. 1) and was visible with a similar intensity also among the wt-GH1 transcripts (Fig. 4C, lane 3). The two fainter bands corresponded to heteroduplex molecules formed by mispairing of the 398- and 233-bp fragments. The full-length cDNA and the transcripts with aberrant exon 4 skipping

were not visible in this PCR. The wt allele (Fig. 4C, lane 3) yielded, besides the 233-bp fragment, a strong band corresponding to the full-length cDNA and two fainter bands corresponding to the 17.5- and 20-kDa isoforms.

Discussion

Mutations in the *GH1* splicing elements that result in an increased level of exon 3 skipped transcripts encoding the 17.5-kDa isoform are a common cause of autosomal dominant type II IGHD and severe growth failure (4–12).

Here we report a new mutation, consisting of a 22-bp deletion in the IVS3 (IVS3 del+56–77) causing IGHD II in a child and her mother. The deletion completely removes the reported BPS (AGCCAAT) (11) located between –20 and –25 upstream of the intron 3/exon 4 junction (Fig. 2) matching five of the seven residues of the weakly defined mammalian BPS (Y₈₁NY₁₀₀T₈₇R₈₁A₁₀₀Y₉₄, where Y represents pyrimidine, R represents purine, and N represents any base) (30). The A at position –21 (underlined) likely represents the highly conserved adenine involved in the lariat formation with the donor splice site.

Lymphocyte mRNA analysis showed that this mutation induced a splicing pattern analogous to that observed in most cases of IGHD II; the proband and her mother showed two principal mRNA species approximately in equal amount, namely the full-length mRNA (encoded by the normal allele) and an aberrant splicing product with the skipping of exon 3 (encoded by the mutant allele) (Fig. 3B).

Accordingly, the clinical phenotype determined by the 22-bp IVS3 deletion correlated with that observed in other IGHD II patients harboring splice site mutations. The phe-

notype of IGHD II patients is heterogeneous. On average, patients carrying splice site mutations show earlier age of onset of the growth failure that is progressive and more severe than patients carrying missense mutations (8, 31, 32). However, phenotype variability is present also among affected members of the same family (8, 31, 33) showing that the GH-dependent growth during childhood is individually different and modified by several factors, most of them still unknown. Both our patients showed an early postnatal onset of the growth failure that was progressive and severe. Patient III-1 showed an arrest of growth at the age of 4 months and was diagnosed at 7 months (-5.8 SDS); her mother was diagnosed at 4.6 yr (-6.9 SDS) and showed a height of -5 SDS at the age of 2 yr (no information is available at an earlier age). The clinical phenotype was somewhat less severe in the mother; GH secretion after provocative test, completely absent in the daughter, was severely but not completely reduced in the mother at the childhood age diagnosis, and the size of the pituitary gland was normal in the mother at the adult age, whereas it was at the lower limit size in the child. When retested in adulthood, the mother had no GH response to the strong GHRH plus arginine stimulation test, suggesting an exhausted function of the somatotrophic cells along the years. Conversely, she did not develop other pituitary hormone deficiencies as described in some adult IGHD II patients (32).

The mutation described here is different from other intronic mutations detected in IGHD II families (4–12) because it leaves intact the splice junctions and the enhancers, whereas it completely removes the BPS. On the basis of what has been observed in other human diseases (25–29), we predicted that a mutation involving the BPS would induce the total or partial skipping of exon 4. However, lymphocyte mRNA analysis as well as analysis on the mRNA extracted from rat pituitary cells transfected with del-GH1 revealed that the major transcript was the exon 3 skipped. Two aberrantly spliced isoforms expected for a BPS mutation were detectable exclusively in experimental conditions where the exon 3 skipped mRNA was excluded from the possible targets (Fig. 4B, lane 4). The first isoform, lacking the entire exon 4, encodes for a putative mature peptide depleted of amino acids 72–126. The other was an mRNA devoid of the first 86 bases of exon 4, and it causes a frameshift leading to a putative protein differing from the wild type from amino acid 72 and prematurely truncated at residue 77. It likely results from the use of a cryptic acceptor splice site at position 85–86 of exon 4. The recognition of this splice site might be mediated by the presence of a putative cryptic BPS (CGC-CAAC), matching six of the seven bases of the consensus sequence, located between nt 78 and 84 of exon 4 (Fig. 2).

The content of the abnormal mRNA lacking exon 4, or a part of it, is likely very low in the patients' lymphocytes compared with the normal-sized and to the exon 3 skipped mRNA and can therefore be visualized only under specific experimental conditions. One of the reasons for the low content, at least for the prematurely truncated isoform, might be its rapid degradation owing to nonsense-mediated mRNA decay (34).

The two aberrant splicing events involving exon 4 are the direct consequence of the missing BPS, as demonstrated by

the mutagenized construct lacking exclusively the 7 bp of the BPS consensus (Fig. 4B, lane 5). Conversely, the high content of the exon 3 skipped isoform remains to be explained. In a recent report, Ryther and colleagues (35) demonstrated that the overall size of IVS3 is crucial for exon 3 inclusion in the mRNA and showed that deletions of 12–14 bp are sufficient to increase exon 3 skipping. They suggested that this is because the decreased IVS3 size rather than the deletion of specific sequences. We can thus speculate that the main effect of the 22-bp deletion, *i.e.* the increased exon 3 skipping with production of the IGHD II-specific pathological amount of the 17.5-kDa isoform, is the consequence of the remarkably decreased size of IVS3 that overwhelms the effect caused by the BPS deletion.

However, in the deletion mutants reported by Ryther *et al.* (35), the IVS3 BPS was unaltered and mediated the lariat formation with the IVS2 donor splice site. In our case, it is not clear how the two mutants lacking the IVS3 branch site (namely the del+56–77 allele and the mutagenized mut Δ 7) can correctly process the IVS3 splicing necessary for the exon 3 skipped and the full-length mRNA (36). A similar situation was reported for other disease-causing BPS mutations where the mutated allele also produced the wild-type isoform in addition to the isoform with an aberrant splicing (29, 37, 38). An obvious explanation for these observations is the use of an alternative BPS elsewhere in the IVS3 efficiently replacing the deleted one. Two sequences located between $-40/-46$ and $-61/-67$ from the GH1-IVS3 acceptor splice site in the deleted allele, within a distance compatible with a BPS function (39), match the consensus more than others. However, the del-GH1 plasmid mutagenized at the highly conserved A of either or both of these two cryptic BPSs yielded the same splicing pattern (data not shown) as the nonmutagenized construct (Fig. 4). It is thus conceivable that other sequences with less homology to the consensus might act as a cryptic BPS. In fact, although several reported BPS mutations cause severe phenotypes, it has also been demonstrated that a mutated BPS can be replaced by a cryptic BPS with no resemblance to the consensus branch site, apart from the A residue necessary for the lariat formation (40).

In conclusion, despite the absence of the canonical BPS, the exon 3 skipped is the principal transcript and the cause of IGHD II in our patients. Thus, the context in which the BPS mutation is located, *i.e.* the 22-bp deletion, has a greater phenotypic influence than the BPS mutation itself. It is unlikely that the two isoforms with an aberrant splicing of exon 4 also contribute to the IGHD II phenotype because they are presumably poorly expressed.

Acknowledgments

We are grateful to the patients and their relatives. We thank Dr. T. Vago and Dr. G. Baldi from the Endocrine Laboratory of Luigi Sacco Hospital for hormonal dosage and Dr. M. Bevilacqua from the Endocrinology Department of Luigi Sacco Hospital for cooperation on adult patient management and scientific support.

Received July 29, 2005. Accepted December 13, 2005.

Address all correspondence and requests for reprints to: Mara Giordano, Ph.D., Dipartimento di Scienze Mediche, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy. E-mail: giordano@med.unipmn.it.

This work was supported by grants from Pfizer, Italian Network for Molecular Biology in Pediatric Endocrinology, Eastern Piedmont University, the Italian Ministry for University and Research (Cofin 2003), and Cariplo Foundation. M.G. and D.V. are Ph.D. fellows of Dottorato in Medicina Molecolare, Eastern Piedmont University.

References

1. Stewart TA, Clift S, Pitts-Meek S, Martin L, Terrell TG, Liggitt D, Oakley H 1992 An evaluation of the functions of the 22-kilodalton (kDa), the 20-kDa, and the N-terminal polypeptide forms of human growth hormone using transgenic mice. *Endocrinology* 130:405–414
2. Procter AM, Phillips 3rd JA, Cooper DN 1998 The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Hum Genet* 103:255–272
3. Binder G 2002 Isolated growth hormone deficiency and the GH-1 gene: update 2002. *Horm Res* 58(Suppl 3):2–6
4. Binder G, Ranke MB 1995 Screening for growth hormone (GH) gene splice-site mutations in sporadic cases with severe isolated GH deficiency using ectopic transcript analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1247–1252
5. Cogan JD, Ramel B, Lehto M, Phillips 3rd J, Prince M, Blizzard RM, de Ravel TJ, Brammert M, Groop L 1995 A recurring dominant negative mutation causes autosomal dominant growth hormone deficiency: a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3591–3595
6. Missarelli C, Herrera L, Mericq V, Carvallo P 1997 Two different splice site mutations in the growth hormone gene causing autosomal dominant growth hormone deficiency. *Hum Genet* 101:113–117
7. Hayashi Y, Kamijo T, Yamamoto M, Ohmori S, Phillips 3rd JA, Ogawa M, Igarashi Y, Seo H 1999 A novel mutation at the donor splice site of intron 3 of the GH-1 gene in a patient with isolated growth hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res* 9:434–437
8. Binder G, Keller E, Mix M, Massa GG, Stokvis-Brantsma WH, Wit JM, Ranke MB 2001 Isolated GH deficiency with dominant inheritance: new mutations, new insights. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3877–3881
9. Takahashi I, Takahashi T, Komatsu M, Sato T, Takada G 2002 An exonic mutation of the GH-1 gene causing familial isolated growth hormone deficiency type II. *Clin Genet* 61:222–225
10. Moseley CT, Mullis PE, Prince MA, Phillips 3rd JA 2002 An exon splice enhancer mutation causes autosomal dominant GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 87:847–852
11. Cogan JD, Prince MA, Lekhakula S, Bunday S, Futrakul A, McCarthy EM, Phillips 3rd JA 1997 A novel mechanism of aberrant pre-mRNA splicing in humans. *Hum Mol Genet* 6:909–912
12. McCarthy EM, Phillips 3rd JA 1998 Characterization of an intron splice enhancer that regulates alternative splicing of human GH pre-mRNA. *Hum Mol Genet* 7:1491–1496
13. De Vos A, Ultsch M, Kossiakoff A 1992 Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255:306–312
14. Graves TK, Patel S, Dannies PS, Hinkle PM 2001 Misfolded growth hormone causes fragmentation of the Golgi apparatus and disrupts endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic. *J Cell Sci* 114:3685–3694
15. Lee MS, Wajnrajch MP, Kim SS, Plotnick LP, Wang J, Gertner JM, Leibel RL, Dannies PS 2000 Autosomal dominant growth hormone (GH) deficiency type II: the Del32–71-GH deletion mutant suppresses secretion of wild-type GH. *Endocrinology* 141:883–890
16. McGuinness L, Magoulas C, Sesay AK, Mathers K, Carmignac D, Manneville JB, Christian H, Phillips 3rd JA, Robinson IC 2003 Autosomal dominant growth hormone deficiency disrupts secretory vesicles *in vitro* and *in vivo* in transgenic mice. *Endocrinology* 144:720–731
17. Duquesnoy P, Simon D, Netchine I, Dastot F, Sobrier ML, Goossens M, Cernichow P, Amsellem S 1998 Familial isolated growth hormone deficiency with slight height reduction due to a heterozygote mutation in GH gene. Program of the 80th Annual Meeting of The Endocrine Society, New Orleans, LA, 1998, p 295 (Abstract P2-202)
18. Deladoey J, Stocker P, Mullis PE 2001 Autosomal dominant GH deficiency due to an Arg183His GH-1 gene mutation: clinical and molecular evidence of impaired regulated GH secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3941–3947
19. Rolland-Cacher MF, Sempe M, Guillond-Bataille M 1984 Adiposity indices in children. *Am J Clin Nutr* 36:178–184
20. Simopoulos AP, Van Itallie TB 1984 Body weight, health and longevity. *Ann Intern Med* 100:285–295
21. Argyropoulos M, Perignon F, Brauner R, Brunelle F 1992 Magnetic resonance imaging in the diagnosis of growth hormone deficiency. *J Pediatr* 120:886–891
22. Tsunoda A, Okuda O, Sato K 1997 MR height of the pituitary gland as a function of age and sex: especially physiological hypertrophy in adolescence and in climacterium. *AJNR Am J Neuroradiol* 18:551–554
23. Giordano M, Marchetti C, Chiorboli E, Bona G, Momigliano-Richiardi P 1997 Evidence for gene conversion in the generation of extensive polymorphism in the promoter of the growth hormone gene. *Hum Genet* 100:249–255
24. Wagner JK, Ebl A, Cogan J D, Prince MA, Phillips III JA, Mullis PE 1997 Allelic variations in the human growth hormone-1 gene promoter of growth hormone-deficient patients and normal controls. *Eur J Endocrinol* 137:474–481
25. Maslen C, Babcock D, Raghunath M, Steinmann B 1997 A rare branch-point mutation is associated with missplicing of fibrillin-2 in a large family with congenital contractural arachnodactyly. *Am J Hum Genet* 60:1389–1398
26. Hamlington JD, Clough MV, Dunston JA, McIntosh I 2000 Deletion of a branch-point consensus sequence in the LMX1B gene causes exon skipping in a family with nail patella syndrome. *Eur J Hum Genet* 8:311–314
27. Di Leo E, Panico F, Tarugi P, Battisti C, Federico A, Calandra S 2004 A point mutation in the lariat branch point of intron 6 of NPC1 as the cause of abnormal pre-mRNA splicing in Niemann-Pick type C disease. *Hum Mutat* 24:440
28. Khan SG, Metin A, Gozokara E, Inui H, Shahnavi T, Muniz-Medina V, Baker CC, Ueda T, Aiken JR, Schneider TD, Kraemer KH 2004 Two essential splice lariat branchpoint sequences in one intron in a xeroderma pigmentosum DNA repair gene: mutations result in reduced XPC mRNA levels that correlate with cancer risk. *Hum Mol Genet* 13:343–352
29. Kuivenhoven JA, Weibusch H, Pritchard PH, Funke H, Benne R, Assmann G, Kastelein JJ 1996 An intronic mutation in a lariat branchpoint sequence is a direct cause of an inherited human disorder (fish-eye disease). *J Clin Invest* 98:358–364
30. Smith CW, Porro EB, Patton JG, Nadal-Ginard B 1989 Scanning from an independently specified branch point defines the 3' splice site of mammalian introns. *Nature* 342:243–247
31. Fofanova OV, Evgrafov OV, Polyakov AV, Poltarau AB, Peterkova VA, Dedov II 2003 A novel IVS2 -2A>T splicing mutation in the GH-1 gene in familial isolated growth hormone deficiency type II in the spectrum of other splicing mutations in the Russian population. *J Clin Endocrinol Metab* 88:820–826
32. Mullis PE, Robinson IC, Salemi S, Eble A, Besson A, Vuissoz JM, Deladoey J, Simon D, Cernichow P, Binder G 2005 Isolated autosomal dominant growth hormone deficiency: an evolving pituitary deficit? A multicenter follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2089–2096
33. Kamijo T, Hayashi Y, Shimatsu A, Kinoshita E, Yoshimoto M, Ogawa M, Seo H 1999 Mutations in intron 3 of GH-1 gene associated with isolated GH deficiency type II in three Japanese families. *Clin Endocrinol* 51:355–360
34. Alonso CR 2005 Nonsense-mediated RNA decay: a molecular system micro-managing individual gene activities and suppressing genomic noise. *Bioessays* 27:463–466
35. Ryther RC, Flynt AS, Harris BD, Phillips 3rd JA, Patton JG 2004 GH1 splicing is regulated by multiple enhancers whose mutation produces a dominant-negative GH isoform that can be degraded by allele-specific siRNA. *Endocrinology* 145:2988–2996
36. Black DL 2003 Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72:291–336
37. Burrows NP, Nicholls AC, Richards AJ, Luccarini C, Harrison JB, Yates JR, Pope FM 1998 A point mutation in an intronic branch site results in aberrant splicing of COL5A1 and in Ehlers-Danlos syndrome type II in two British families. *Am J Hum Genet* 63:390–398
38. Zhu X, Chung I, O'Gorman MR, Scholl PR 2001 Coexpression of normal and mutated CD40 ligand with deletion of a putative RNA lariat branchpoint sequence in X-linked hyper-IgM syndrome. *Clin Immunol* 99:334–339
39. Helfman DM, Ricci WM 1989 Branch point selection in alternative splicing of tropomyosin pre-mRNAs. *Nucleic Acid Res* 17:5633–5650
40. Padgett RA, Konarska MM, Aebi M, Hornig H, Weissmann C, Sharp PA 1985 Nonconsensus branch-site sequences in the *in vitro* splicing of transcripts of mutant rabbit β -globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8349–8353

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

1: J Endocrinol Invest. 2002 May;25(5):RC13-5.

Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood.

Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Castellino N, Petri A, Bellone J, Me E, Broglio F, Prodam F, Ghigo E, Bona G.

Department of Medical Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy.

Ghrelin, a natural GH secretagogue, exerts remarkable endocrine and non-endocrine activities such as orexigenic effect and modulation of the endocrine and metabolic response to variations in energy balance. Ghrelin levels have been reported to be negatively associated to insulin secretion, enhanced in anorexia and reduced in obesity. Ghrelin levels in childhood have never been evaluated. We measured morning ghrelin levels after overnight fasting in 29 healthy lean children (NC) and in 36 obese children (OBC). The results were compared with those recorded twice in 3 different sessions in healthy lean adults (NA). In NA ghrelin levels showed good within-subject reproducibility without gender-related differences. Ghrelin levels in NC [(median; 25 degrees -75 degrees centile): 426.0; 183.0-618.0 pg/ml] were similar to those in NA (380.5; 257.7-551.7 pg/ml). Ghrelin levels in OBC (229.5; 162.5-339.5 pg/ml) were lower ($p < 0.03$) than in NC (426.0; 183.0-618.0 pg/ml). Both in NC and in OBC, ghrelin levels were independent of gender and pubertal status. In all children, ghrelin levels were negatively associated ($p < 0.05$) to weight excess ($r = -0.24$), insulin ($r = -0.28$) and IGF-I ($r = -0.4$) levels. In conclusion, these findings demonstrate that morning ghrelin levels after overnight fasting show good within-subject reproducibility, and are similar in both sexes and do not vary from childhood to adulthood. In childhood, circulating ghrelin levels are reduced in obese subjects being negatively correlated to overweight and insulin secretion.

PMID: 12035950 [PubMed - indexed for MEDLINE]

1: J Endocrinol Invest. 2003 Dec;26(12):1203-7.

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.

Gottero C, Bellone S, Rapa A, van Koetsveld P, Vivenza D, Prodam F, Benso A, Destefanis S, Gauna C, Bellone J, Hofland L, van der Lely AJ, Bona G, Ghigo E, Broglio F.

Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Turin, Turin, Italy.

Ghrelin levels are increased by fasting and energy restriction, decreased by food intake, glucose load and insulin but not by lipids and amino acids. Accordingly, ghrelin levels are elevated in anorexia and cachexia and reduced in obesity. Herein we compared the effects of a standardized light breakfast (SLB) on morning circulating ghrelin levels with those of oral glucose load (OGTT) in normal subjects. Specifically, 8 young adult volunteers [age (mean+/-SEM): 28.0+/-2.0 yr; body mass index (BMI): 22.4+/-0.6 kg/m²] underwent the following testing sessions: a) OGTT (100 g p.o. at 0 min, about 400 kcal); b) SLB (about 400 kcal, 45% carbohydrates, 13% proteins and 42% lipids at 0 min) on three different days; c) placebo (100 ml water p.o.). In all sessions, at baseline, blood samples were withdrawn twice at 5-min interval to characterize the inter- and intra-individual reproducibility of the variables assayed. After placebo and OGTT, blood samples were withdrawn every 15 min up to +120 min. After SLB, blood samples were taken at 60 min only. Ghrelin, insulin and glucose levels were assayed at each time point in all sessions. Similarly to insulin and glucose levels, at baseline, ghrelin showed remarkable intra-subject reproducibility both in the same sessions and among the different sessions. Placebo did not significantly modify ghrelin, insulin and glucose. OGTT increased ($p < 0.01$) glucose (baseline vs peak: 80.0+/-3.6 vs 140.5+/-6.3 mg/dl) and insulin (20.2+/-6.2 vs 115.3+/-10.3 mU/l) levels. SLB increased ($p < 0.05$) both insulin (16.3+/-1.8 vs 48.3+/-6.3 mU/l) and glucose (74.5+/-3.7 vs 82.9+/-3.1 mg/dl) levels. Notably both the insulin and glucose increases after OGTT were significantly higher ($p < 0.01$) than that induced by SLB. After OGTT, ghrelin levels underwent a significant reduction (baseline vs nadir: 355.7+/-150.8 vs 243.3+/-98.8 pg/ml; $p < 0.05$) reaching the nadir at time +60 min. Similarly, ghrelin levels 60 min after SLB (264.8+/-44.8 pg/ml) were significantly ($p < 0.01$) lower than at baseline (341.4+/-54.9 pg/ml). No significant differences in the reduction of ghrelin levels after OGTT and SLB were observed. In conclusion, these findings show that light breakfast inhibits ghrelin secretion to the same extent of OGTT in adults despite lower variations in glucose and insulin levels.

PMID: 15055473 [PubMed - indexed for MEDLINE]