

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”



Facoltà di Medicina e Chirurgia

TESI DI DOTTORATO

IN MEDICINA MOLECOLARE

XIV CICLO

***BASSA STATURA IDIOPATICA E
INSENSIBILITA' AL GH: ANALISI
MOLECOLARE DEL GENE GHR***

Relatore:
prof. Gianni Bona

Coordinatore:
prof. Umberto Dianzani

Candidata:
Dott.ssa Stefania Riccomagno

Anno Accademico 2010-2011

1.INTRODUZIONE

Il complesso ipotalamo-ipofisi controlla a livello centrale il funzionamento delle più importanti ghiandole endocrine. I nuclei di cellule ipotalamiche regolano la sintesi e la secrezione di numerosi neurotrasmettitori e fattori di rilascio ormonale come CRH, GHRH, GNRH, TRH e SS; nell'ipofisi anteriore questi fattori determinano la produzione/secrezione dei diversi ormoni (ACTH, GH, LH/FSH, TSH, PRL), regolate dalle diverse cellule costituenti il tessuto ipofisario.

L'ormone della crescita (GH) è un polipeptide a singola catena prodotto dalle cellule somatotrope dell'ipofisi e secreto in modo pulsatile con ritmo circadiano; esso agisce principalmente stimolando i processi anabolici e la maggior parte dei suoi effetti biologici è mediata da IGF1.

1.1 Fisiologia e meccanismo d'azione del sistema GH-IGF1

L'asse GH/IGF1 riveste un ruolo chiave nei meccanismi di regolazione della crescita somatica, con effetti a vari livelli: dalla regione ipotalamo-ipofisaria, sede di sintesi del GHRH e del GH stesso, al fegato come organo target del GH e sede di sintesi di IGF1, fino all'osso in cui determina la crescita longitudinale; quindi, le anomalie coinvolgenti i diversi livelli danno luogo a differenti patologie.

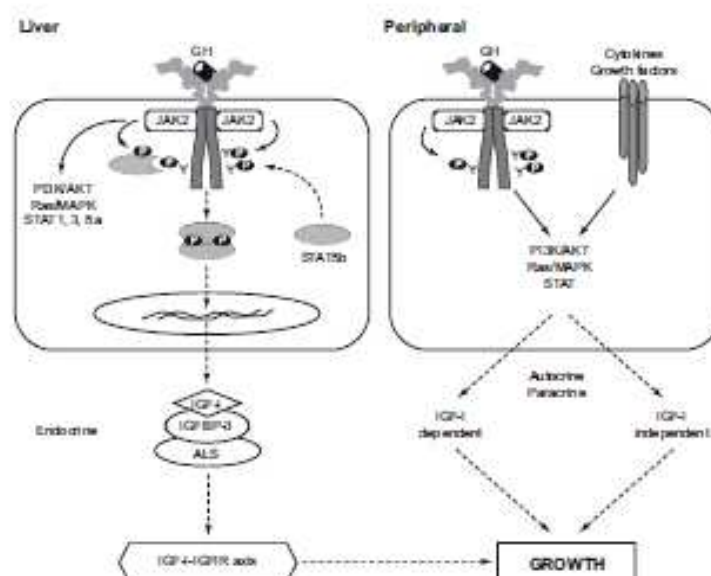


Fig.1: asse GH-IGF1

Il GH prodotto dall'ipofisi agisce principalmente regolando l'espressione di IGF1, sia a livello epatico che periferico; nei tessuti non-epatici però, anche le citochine e altri fattori di crescita possono esercitare effetti locali di crescita, regolando la produzione di IGF1 o mediante meccanismi indipendenti dalla sua espressione. La produzione di IGF1 è regolata dal GH attraverso il sistema di signaling JAK/STAT.

La trasduzione del segnale indotta dal GH consiste in una complessa serie di eventi tra loro coordinati e comprendenti un grande numero di molecole; esso agisce mediante il legame con il proprio recettore, una glicoproteina di 620 aminoacidi espressa in modo ubiquitario, composta da un dominio extracellulare responsabile del legame con GH, da un dominio transmembrana che serve per l'ancoraggio alla superficie cellulare e da un dominio intracellulare coinvolto nella trasduzione del segnale.

Il GHR appartiene alla famiglia recettoriale delle citochine e trasduce il segnale intracellulare mediante attivazione di molecole "docking site", tra le quali la più coinvolta è la proteina chinasi JAK2. Il legame ligando-recettore determina la dimerizzazione del GHR e l'attivazione di JAK2 che, a sua volta, determina la fosforilazione di fattori trascrizionali appartenenti alla famiglia delle proteine STAT (in particolare STAT5b e STAT3), che promuovono la proliferazione cellulare (figura 1).[3]

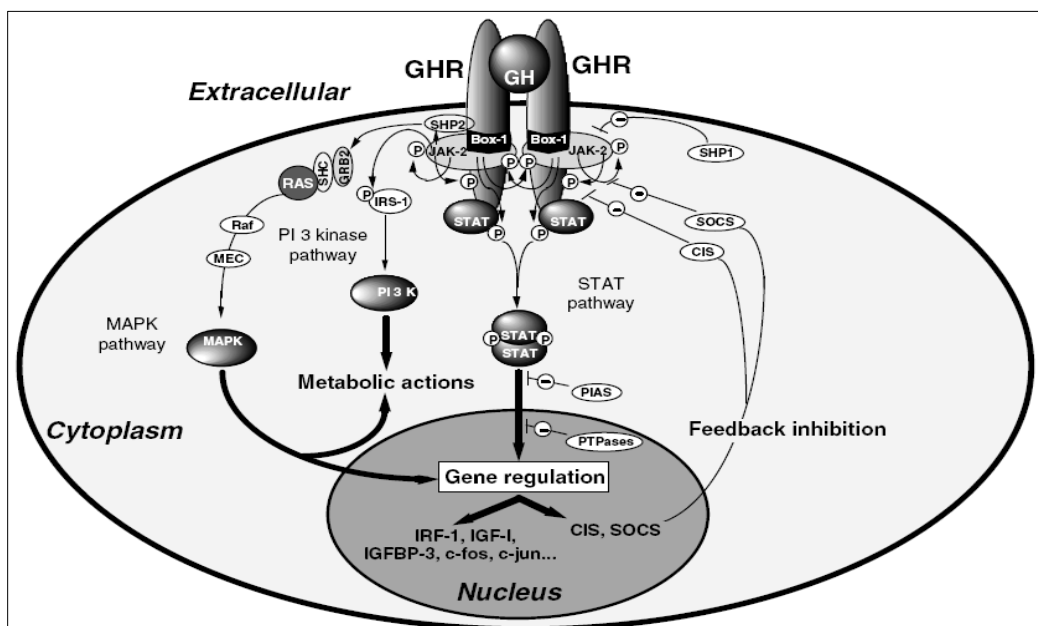


Fig.2: signaling del GHR

La regolazione della trasduzione del segnale del GH avviene a diversi livelli, tra cui il grado di espressione cellulare del recettore stesso, la defosforilazione delle molecole attivate, l'inibizione del segnale da parte di regolatori negativi e la degradazione proteosomale del GHR.

1.2 Bassa statura idiopatica

La normale secrezione di GH e l'integrità funzionale del sistema IGF sono essenziali per una normale crescita lineare.

La condizione di bassa statura idiopatica (BSI) è definita da una statura inferiore a 2 SDS rispetto alla popolazione di riferimento e da una bassa velocità di crescita, nonostante una normale secrezione di GH e l'assenza di disordini sistemici o deficit ormonali. La diagnosi si basa quindi sull'esclusione delle cause più note, attraverso l'effettuazione di esami laboratoristici e strumentali indicati dall'anamnesi e da un accurato esame obiettivo.[1]

Sebbene il meccanismo patogenetico della BSI non sia ancora noto, diversi studi hanno evidenziato che bambini affetti da BSI possono mostrare un certo grado di insensibilità al GH, caratterizzata dalla resistenza periferica all'azione del GH, per difetti a carico del recettore del GH (GHR) o dei meccanismi post-recettoriali della trasduzione del segnale.[2]

La maggioranza dei difetti a carico del gene *GHR* interessa la regione codificante il dominio extracellulare del recettore, la cui isoforma solubile circola come GH-Binding Protein (GHBP); queste mutazioni causano l'assenza della GHBP e manifestazioni fenotipiche caratteristiche dell'insensibilità al GH o GHI (Growth Hormone Insensitivity).

La GHI descrive un range di disordini per cui si distinguono due categorie eziologiche: i disordini genetici causati da mutazioni di geni coinvolti nella regolazione dell'asse GH-IGF1 ed i disordini con insensibilità acquisita, dovuta a condizioni come malnutrizione, disturbi metabolici, malattie epatiche, presenza di anticorpi contro GH.[9]

Le forme più gravi di GHI, conosciute come Sindrome di Laron (GHI classica), sono causate da mutazioni omozigoti del *GHR*; i pazienti che mostrano un fenotipo meno severo vengono definiti atipici e sono caratterizzati da BSI.

Ad oggi solo il 5% dei pazienti con BSI presenta mutazioni eterozigoti a carico del *GHR*, mentre nella maggior parte dei casi l'eziologia rimane ancora sconosciuta.

Considerando il gruppo abbastanza numeroso di pazienti con BSI a nostra disposizione, abbiamo deciso di fare uno screening mutazionale di *GHR* nei soggetti che mostravano parziale insensibilità al GH.

Sono stati selezionati i pazienti che presentavano livelli di IGF1 inferiori ai limiti di norma per l'età e con scarsa risposta alla terapia con GH; su questi soggetti ho svolto l'analisi molecolare del gene *GHR*, con lo scopo di identificare possibili anomalie genetiche a carico del recettore responsabili della parziale insensibilità al GH associata alla condizione di BSI. I soggetti con BSI, infatti, hanno una notevole variabilità dei livelli di IGF-1 che potrebbe dipendere dalla resistenza periferica al GH, spesso dovuta alla GHI.

2.MATERIALI E METODI

2.1 Fase di campionamento

In seguito all'approvazione di questo progetto da parte del Comitato Etico del nostro Ospedale, è iniziato il reclutamento dei soggetti, che sono stati scelti in base ai criteri clinici stabiliti nello studio, dopo aver ricevuto il consenso informato da parte dei genitori o da chi ne avesse la patria potestà.

I soggetti sono stati scelti in base ai seguenti criteri diagnostici:

- altezza inferiore a 2SD per età cronologica
- età ossea ritardata di oltre 2SD per età cronologica
- velocità di crescita inferiore al 25° percentile per età cronologica
- peso normale alla nascita
- assenza di disordini endocrini noti o displasie scheletriche e nessuna altra causa per bassa statura

Sono stati reclutati in totale 200 pazienti con bassa statura idiopatica, afferenti sia al nostro centro che ai centri partecipanti al progetto.

Considerando i livelli di IGF1, tra questi soggetti sono stati selezionati 103 pazienti con bassa secrezione di IGF1 per la valutazione del gene del GHR; è stato utilizzato un gruppo di controllo composto da 50 soggetti sani di statura normale.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazioni auxologiche e ormonali. Dal punto di vista auxologico in ciascun soggetto è stata misurata l'altezza con lo statimetro di Harpenden, in modo da ottenere una misura precisa per definire il percentile dell'altezza; la velocità di crescita è stata valutata utilizzando due misure dell'altezza a distanza di almeno 6 mesi una dall'altra. Sono stati esclusi bambini con: malformazioni congenite, anomalie cromosomiche, malattie croniche e autoimmuni, precedenti terapie con rhGH o steroidi, grave ritardo psicomotorio.

La secrezione dell'ormone della crescita è stata valutata secondo i criteri diagnostici classici ed è stato raccolto il siero per il dosaggio di IGF-I, IGFBP-3 e ALS; in ciascun soggetto sono stati effettuati i test dinamici della secrezione di GH, come la clonidina e l'arginina o il test massimale GHRH+arginina. Sulla base del quadro clinico, in alcuni soggetti sono state effettuate la valutazione della secrezione spontanea di GH o il test di generazione somatomedinica, somministrando GH alla dose di 0,1 U/Kg per quattro sere accompagnata dal dosaggio dei livelli di IGF-I basalmente e 12 ore dopo l'ultima somministrazione.

2.2 Analisi molecolare

Il gene *GHR* è formato da 10 esoni che codificano per una proteina di 638 aminoacidi; la ricerca di variazioni di sequenza è stata effettuata negli esoni e nelle regioni introniche adiacenti. Il DNA genomico, amplificato mediante PCR con primers specifici, è stato analizzato tramite DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography); questa tecnica consente di identificare direttamente gli individui eterozigoti attraverso la formazione di molecole heteroduplex, che vengono eluite dalla colonna ad un tempo di ritenzione minore rispetto alle molecole homoduplex.

Tutti i prodotti di PCR con un picco heteroduplex, oppure homoduplex differente dal picco wilde-type, sono stati sequenziati con un sequenziatore automatico utilizzando il kit di reazione "Big-dye terminator cycle sequencing".

2.3 Studi funzionali

Come modello cellulare per gli studi in vitro sono state utilizzate le cellule CHO, perché fisiologicamente non esprimono GHR e non producono GH.

Gli effetti della mutazione R179C sono stati valutati mediante trasfezione transiente con protocollo Mirus (TransIT-LT1 transfection reagent), nelle CHO è stato introdotto un plasmide pcDNA3.1 contenente il gene di GHR, sia wilde-type (wt) che mutato (mut); l'espressione del recettore è stata poi analizzata mediante microscopia confocale e Western Blotting.

- ❖ Analisi al confocale: le CHO trasfettate per GHR wt e mut sono state fissate su vetrino, marcate con anticorpo primario MAB263 (Santa Cruz) e poi con anticorpo secondario coniugato FITC.
- ❖ Western Blotting: i lisati totali delle CHO trasfettate sono stati analizzati con due diversi anticorpi primari: MAB263, che riconosce il recettore totale, e FG12Z, che riconosce il dominio extracellulare del recettore.

Per valutare gli effetti della mutazione R43X sono stati utilizzati i fibroblasti di un paziente, ottenuti mediante coltura primaria di biopsia cutanea.

- ❖ Analisi al confocale: i fibroblasti sono stati fissati su vetrino, marcati con anticorpo primario S16 o H300 (Santa Cruz) e poi con anticorpo secondario coniugato FITC.
- ❖ Western Blotting: i lisati totali di fibroblasti sono stati analizzati con due diversi anticorpi primari: S16, che riconosce il recettore totale, e H300, che riconosce il dominio extracellulare del recettore.

Come controllo positivo, sia nell'analisi al confocale che per il western blotting, sono state utilizzate le cellule ipofisarie di ratto GH4.

3.RISULTATI

3.1 Analisi del gene *GHR*

In sintesi, si evidenzia la presenza di 4 polimorfismi (SNPs) già descritti: rs6179 (A/G) nell'esone 6; rs6176 (C/T), rs6180 (A/C) e rs6182 (G/T) nell'esone 10, tutti in condizioni sia di eterozigosi che di omozigosi; nel 10% dei soggetti è stata identificata la delezione dell'esone 3, ad oggi considerata polimorfica (fig.3). Le frequenze alleliche di questi SNPs risultano sovrapponibili a quelle trovate nel gruppo di controllo. (tabella 1)

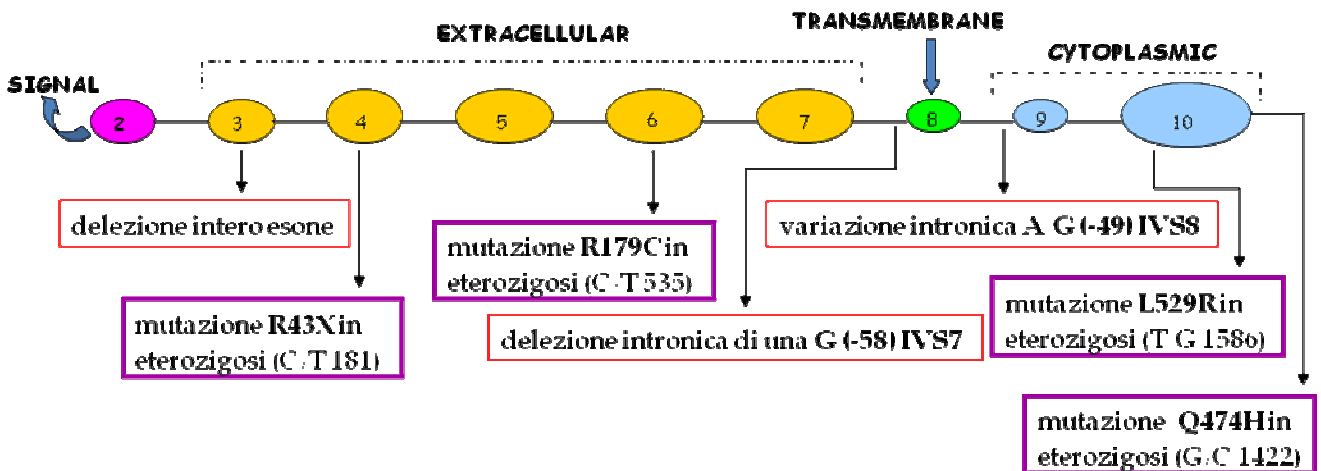
	rs6176	rs6179	rs6180	rs6182
alleli	C/T	A/G	A/C	G/T
pazienti	0,95-0,05	0,37-0,63	0,5-0,5	0,99-0,01
controlli	0,97-0,03	0,32-0,68	0,44-0,56	0,97-0,03

Tab.1: frequenze alleliche

Inoltre, sono state identificate due nuove variazioni introniche:

- la delezione di una G nell'IVS7 del gene in posizione -58 (fig.3), sia in eterozigosi che in omozigosi, con una frequenza di 0,53 per l'allele G nei pazienti, presente anche nei controlli con una frequenza simile (G=0,58);
- la sostituzione A/G nell'IVS8 del gene in posizione -49 (fig.3), presente solo nel 10% dei pazienti, in eterozigosi.

Fig.3: struttura del gene GHR, le frecce indicano la posizione delle variazioni trovate



Infine, sono state trovate le seguenti mutazioni (fig.3): R43X nell'esone 4, R179C nell'esone 6, Q474H e L529R nell'esone 10, tutte in condizioni di eterozigosi e non presenti nel gruppo di controllo.

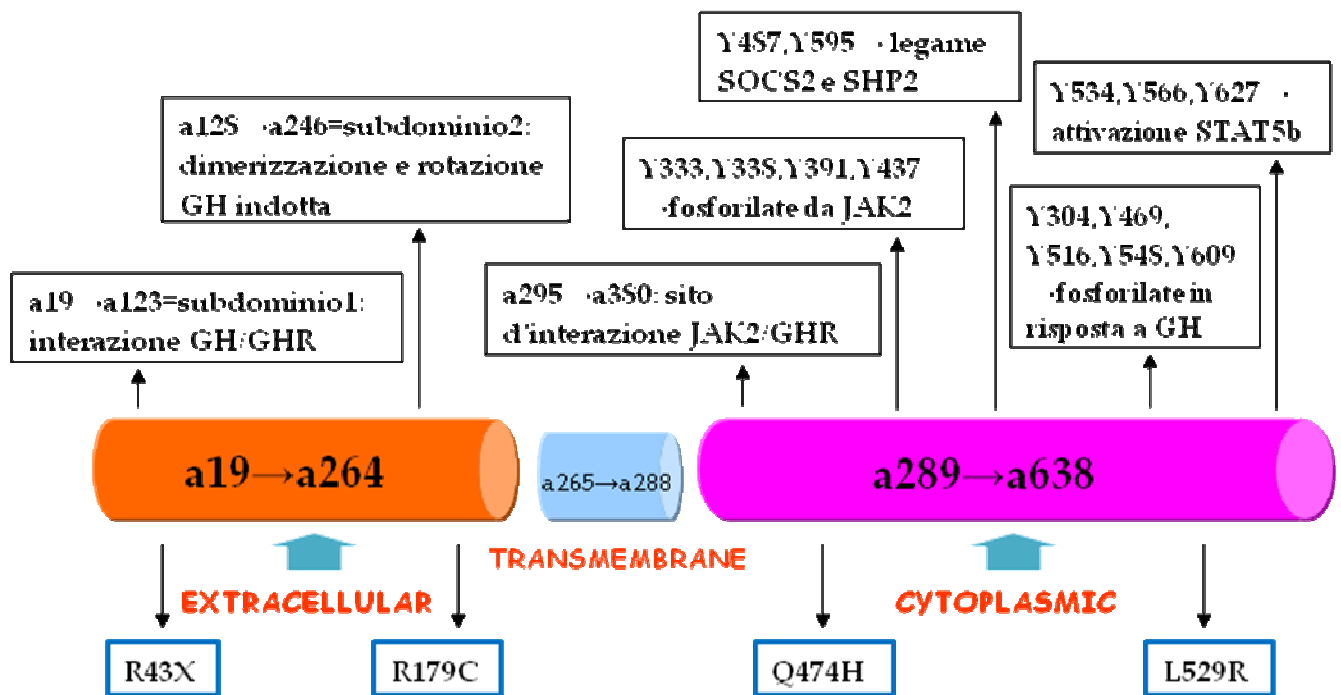


Fig.4: struttura schematica dei domini funzionali del GHR; nei riquadri in alto sono segnalati i residui aminoacidici di maggiore importanza per il recettore

R43X

La mutazione **R43X** si trova in posizione 181 nella regione codificante dell'esone 4, la sostituzione aminoacidica Arg→Term (CGA>TGA) a livello del dominio extracellulare del recettore (fig.4) determina l'introduzione di un codone di STOP prematuro e quindi la sintesi di una proteina tronca, mancante sia del dominio transmembrana che del dominio intracellulare.

E' stata scoperta nel 1991[12] in omozigosi in 2 soggetti con Sindrome di Laron, entrambi figli di genitori consanguinei; nel nostro caso è presente in 4 pazienti ISS in condizione di eterozigosi. Ad oggi non ci sono dati relativi agli effetti di tale mutazione, ma è ipotizzabile che determini una ridotta espressione di GHR ed un'alterazione del signaling del recettore.

R179C

Descritta per la prima volta nel 1993 in un soggetto con Sindrome di Laron[13] la mutazione non-sinonima **R179C** è stata individuata in 5 pazienti ISS in condizione di eterozigosi; si trova in posizione 535 nella regione codificante dell'esone 6 e determina una sostituzione aminoacidica Arg→Cys (CGC>TGC) in posizione 179 della proteina, a livello del dominio extracellulare del recettore (fig.4). Esso contiene 7 cisteine, 6 formano ponti disolfuro ed una rimane libera per formare un legame durante la dimerizzazione; l'introduzione di una cisteina dispari "spaiata" potrebbe quindi determinare cambiamenti conformazionali nel recettore, con conseguente alterazione della dimerizzazione di GHR e ridotta affinità di legame per il GH.

Q474H e L529R

In due diversi soggetti ISS sono state trovate due nuove mutazioni non-sinonime, entrambe in condizioni di eterozigosi, nella regione codificante dell'esone 10: Q474H si trova in posizione 1422 e determina una sostituzione aminoacidica Glu→His (CAG>CAC); L529R si trova in posizione 1586 e determina una sostituzione aminoacidica Leu→Arg (CTT>CGT).

Entrambe le mutazioni interessano residui aminoacidici che occupano una posizione critica a livello del dominio intracellulare del recettore, responsabile del signaling di GHR (fig.4), quindi è ipotizzabile che la presenza di queste mutazioni determini alterazioni nella trasduzione del segnale del recettore.

3.2 Studi funzionali

Per valutare gli effetti delle mutazioni identificate, sono stati svolti studi funzionali in vitro utilizzando due tipologie di approccio:

Analisi al microscopio confocale

Per valutare i possibili effetti della mutazione R179C sulla traslocazione in membrana del recettore, sono stati analizzati mediante confocale i vetrini con cellule CHO/ghr wilde-type (wt), CHO/ghr mutato (mut) e CHO non trasfettate (nt); dalle immagini, acquisite in tre diversi esperimenti, risulta evidente che non ci sono differenze significative nell'espressione di GHR nelle CHO mut rispetto alle CHO wt, mentre si nota la mancanza di fluorescenza nelle CHO nt (fig.5)

Per valutare i possibili effetti della mutazione R43X sull'espressione e sulla traslocazione in membrana del recettore, sono stati analizzati mediante confocale i vetrini con cellule GH4/ghr wilde-type (wt) e fibroblasti/ghr mutato (mut); dalle immagini, acquisite in tre diversi esperimenti, risulta evidente che ci sono differenze significative nell'espressione di GHR nei fibroblasti con la mutazione rispetto al controllo wt (fig.6).

Fig.5: immagini al confocale di cellule CHO; le cellule sono state trasfettate per GHR wt e mut, fissate su vetrino e marcate con anticorpo MAB263.

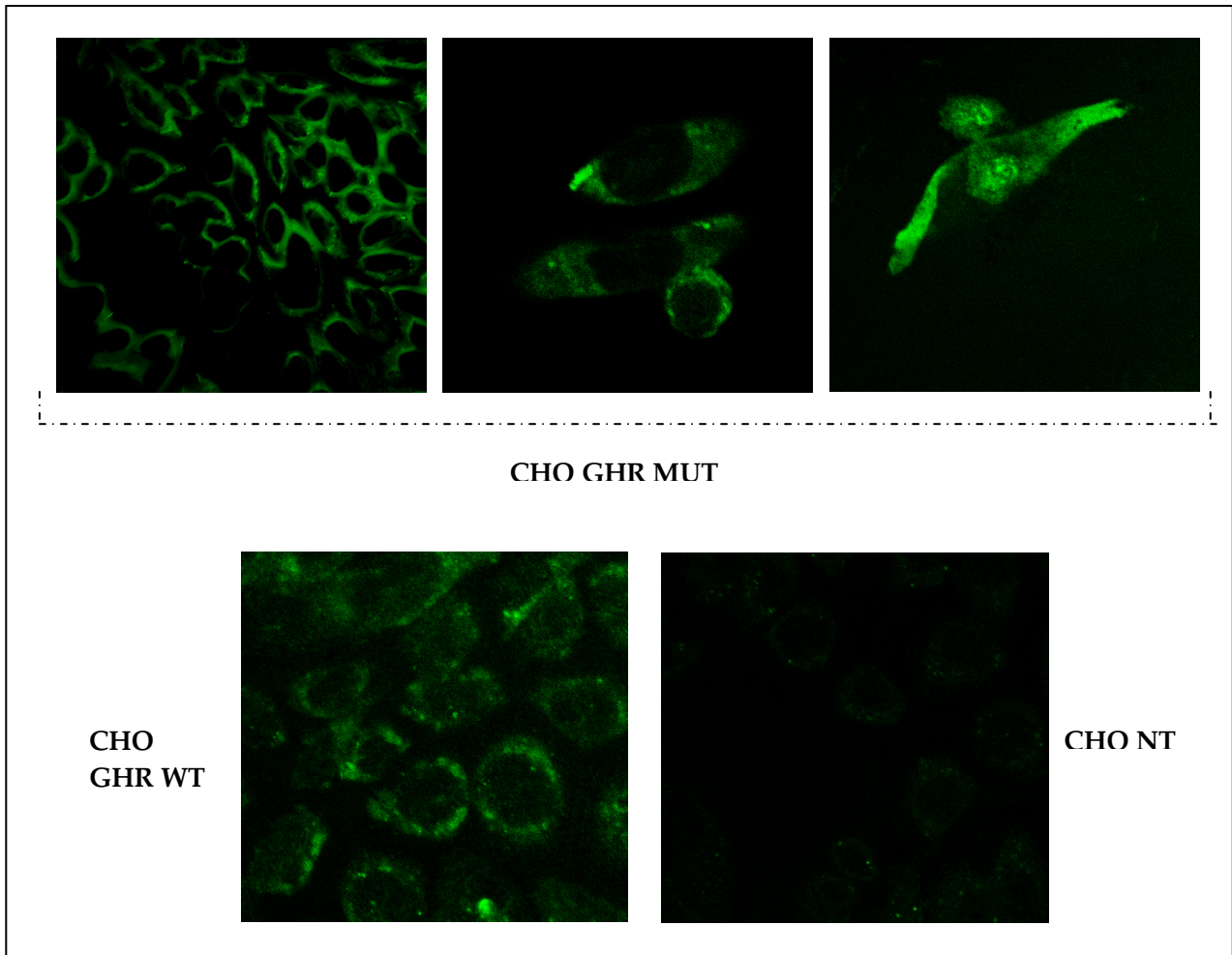
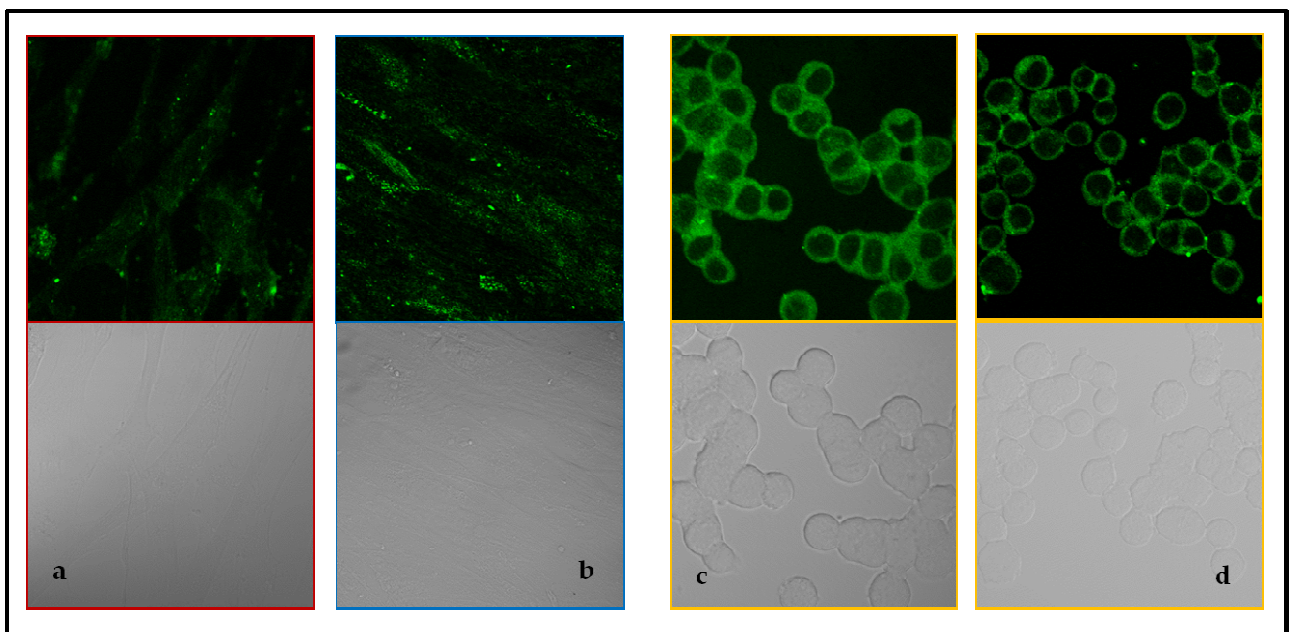


Fig6: immagini al confocale: fibroblasti (mut) non permeabilizzati (a) marcati con anticorpo S16, fibroblasti permeabilizzati (b) marcati con anticorpo H300; GH4 non permeabilizzate (c) e permeabilizzate (d).

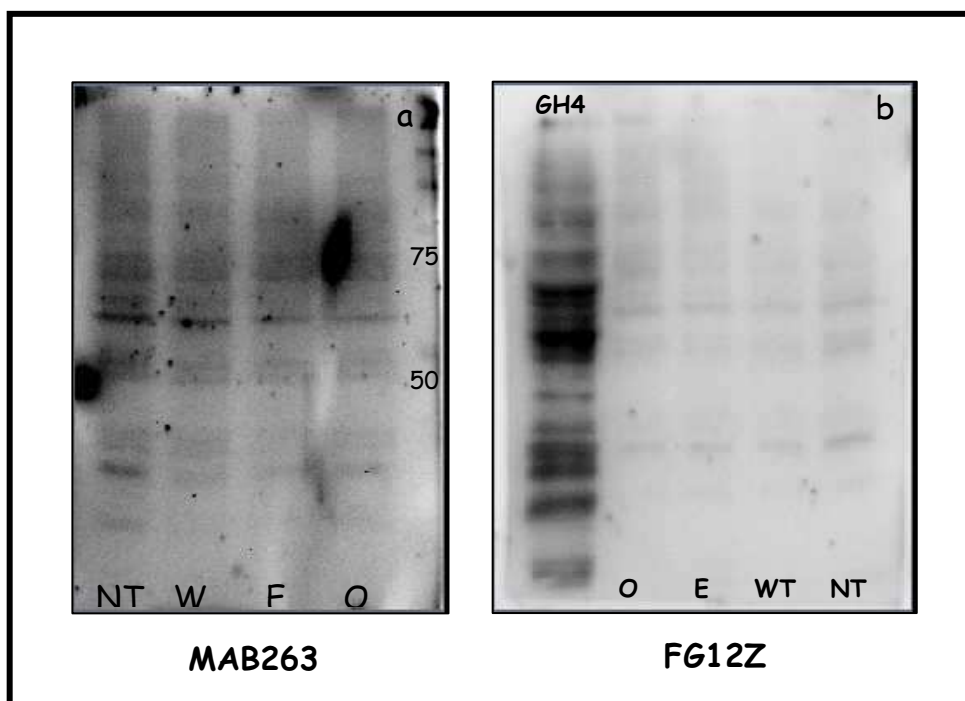


Analisi con Western Blotting

Per verificare la corretta espressione di GHR e la possibile presenza di variazioni dovute alla mutazione R179C, sono stati analizzati con western blotting i lisati totali delle cellule CHO trasfettate, utilizzando due diversi anticorpi: MAB263 (mouse monoclonale), che riconosce la proteina intera (a), e FG12Z (mouse monoclonale), che lega il dominio extracellulare del recettore (b). Sono state utilizzate CHO non trasfettate come controllo negativo e cellule ipofisarie di topo GH4 come controllo positivo.

I risultati ottenuti, anche se parziali, non sono significativi: entrambi gli anticorpi mostrano attività aspecifica, senza differenze tra le diverse condizioni sperimentali; inoltre, sono assenti le bande a 85kDa (precursore GHR) e a 110-140 kDa corrispondenti al GHR maturo (fig.7).

Fig7: immagini SDS-PAGE; NT= CHO non trasfettate, WT= CHO trasfettate con ghr wilde type, E= CHO trasfettate con mutazione R179C in eterozigosi, O= CHO trasfettate con mutazione R179C in omozigosi.



Per verificare gli effetti della mutazione R43X sull'espressione di GHR, sono stati analizzati con western blotting i lisati totali dei fibroblasti di un paziente, utilizzando due diversi anticorpi: S16, che riconosce la proteina intera e H300, che lega il dominio extracellulare del recettore. I risultati ottenuti mostrano una ridotta espressione della forma matura di GHR (bande a 110-140 kDa) ed una normale espressione della GHBP (banda a 60kDa) (fig.8a).

Inoltre, per valutare la possibile presenza di variazioni nel signaling del recettore, sono stati analizzati i lisati totali di fibroblasti stimolati con rhGH (100ng/ml) per diversi tempi (5'-10'-30'), verificando i livelli di fosforilazione delle proteine JAK2 e STAT5b (bande a 125 e 92 kDa), principali mediatori dell'azione di GH: per entrambe le proteine risulta evidente una riduzione nel grado di fosforilazione (fig.8b).

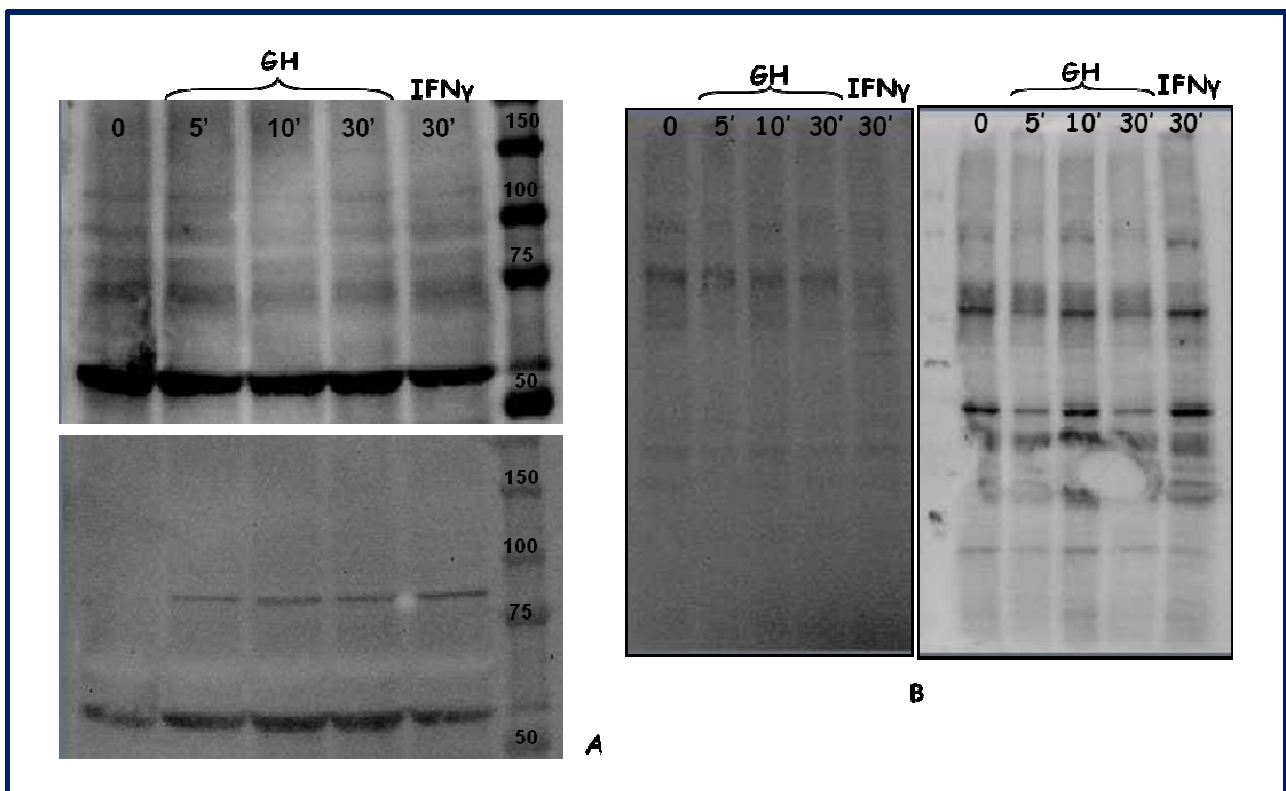


Fig8: immagini SDS-PAGE. A: lisati totali marcati con S16 (pannello in alto) e H300 (pannello in basso); B: lisati totali marcati con anti fosfo-STAT5b (pannello a sinistra) e anti fosfo-JAK2 (pannello a destra).

4. Discussione

La crescita è un fenomeno complesso, regolato da molteplici meccanismi genetici ed epigenetici ed influenzato anche da fattori ambientali; relativamente ai geni coinvolti in questo processo, il tempo di crescita e l'altezza in età adulta sono considerati eventi geneticamente programmati. Quindi l'altezza di una popolazione dipende sia da fattori genetici associati all'origine etnica sia da fattori ambientali, seguendo in generale una distribuzione Gaussiana.^[10]

Il termine bassa statura idiopatica (BSI) viene utilizzato per descrivere la condizione in cui l'altezza di un individuo è inferiore di 2SDS all'altezza media della popolazione di appartenenza. Nella categoria delle BSI sono comprese anche le basse stature familiari e i ritardi di crescita costituzionale, due condizioni con differente eziologia e storia naturale. Anche se non è possibile fare una distinzione precisa, la suddivisione delle basse stature è considerata utile per l'interpretazione dei risultati del trattamento di tali condizioni.

Ad oggi circa l'80% dei bambini bassi, visitati presso le diverse cliniche pediatriche, non presenta patologie associate alla condizione di bassa statura e non ha una storia di ridotto peso/lunghezza alla nascita, per questo tali soggetti si possono definire basse stature idiopatiche.

Negli ultimi anni sono state chiarite le basi genetiche in alcune forme di bassa statura da deficit di GH isolato o associato a deficit ipofisari multipli, mentre restano ancora da definire i meccanismi alla base dei ritardi di crescita GH-indipendenti.

Studi sui topi knockout hanno dimostrato l'importanza del ruolo svolto dai fattori di crescita insulino-simili nello sviluppo fetale e postnatale; si è quindi ipotizzato che minime alterazioni dei mediatori dei segnali intra ed extracellulari del sistema GH-IGFs possano essere responsabili di alcuni casi di BSI.^[11]

Sulla base di tali evidenze, si è deciso di focalizzare l'attenzione sul meccanismo di trasduzione del segnale del GH, in particolare sull'attività del recettore del GH (GHR); in 103 pazienti BSI con bassa secrezione di IGF1 è stato fatto uno screening mutazionale per il

gene GHR, con l'obiettivo di trovare variazioni di sequenza significative, che potessero rappresentare la causa molecolare della BSI.

L'analisi delle sequenze esoniche ed introniche ha rilevato la presenza di 5 polimorfismi già noti e di 2 variazioni introniche non ancora descritte; il dato più significativo, però, è la presenza delle 4 mutazioni R43X, R179C, Q474H e L529R, tutte trovate in condizioni di eterozigosi.

La mutazione R43X determina l'introduzione di un codone di STOP prematuro in corrispondenza di Arginina (R) 181 nel dominio extracellulare del recettore, causando la sintesi di una proteina tronca, mancante della porzione transmembrana e del dominio intracellulare. E' stata trovata per la prima volta nel 1991 in omozigosi in due soggetti con Sindrome di Laron, entrambi figli di consanguinei [12] ; ad oggi non sono presenti in letteratura dati che chiariscano gli effetti di questa mutazione, ma è ipotizzabile che sia l'espressione che la trasduzione del segnale del recettore tronco non avvengano correttamente. Per verificare tale ipotesi, è stato fatto uno studio funzionale della mutazione R43X, tuttora in corso, utilizzando i fibroblasti di un paziente.

L'analisi mediante microscopia confocale mostra una ridotta espressione di GHR, anche a livello intracellulare, confermata dai risultati dell'analisi con western blotting; quindi la presenza della mutazione interferisce con la traslocazione e l'ancoraggio in membrana del recettore. Inoltre, l'analisi con western blotting dei lisati di fibroblasti stimolati con GH mostra bassi livelli di fosforilazione di JAK2 e STAT5b, i principali mediatori dell'azione di GH; sono quindi necessari ulteriori esperimenti per definire chiaramente gli effetti di tale mutazione e stabilirne l'associazione alla condizione di bassa statura.

La mutazione R179C determina una sostituzione aminoacidica da Arginina (R) a Cisteina (C) in posizione 179 nel dominio extracellulare del recettore, responsabile del legame con GH; è stata trovata per la prima volta nel 1993 in un paziente con Sindrome di Laron e poi descritta in un paziente BSI nel 1995 [13], ma finora in letteratura esistono solo ipotesi relative ai possibili effetti di tale mutazione sul funzionamento di GHR.

Considerando la posizione critica di tale mutazione, è possibile che l'introduzione di una cisteina dispari "spaiata" determini cambiamenti conformazionali nel recettore, con

conseguente alterazione della dimerizzazione di GHR e ridotta affinità di legame per il GH. Per verificare tale ipotesi, è stato fatto uno studio funzionale della mutazione R179C, tuttora in corso.

Cellule CHO in adesione sono state trasfettate con plasmide contenente il gene GHR sia wilde type che mutato; l'analisi mediante microscopia confocale ha dimostrato che la presenza della mutazione non interferisce con la traslocazione in membrana del recettore.

I risultati dell'analisi con western blotting sono incompleti, ma comunque non significativi, probabilmente a causa dell'utilizzo di anticorpi non adeguati alle condizioni sperimentali; restano quindi da chiarire i possibili effetti della mutazione sulla cascata di segnalazione del GHR.

In conclusione, i dati preliminari raccolti suggeriscono il coinvolgimento di entrambe le mutazioni nella patogenesi della parziale insensibilità al GH mostrata dai pazienti, e quindi la loro associazione alla condizione di bassa statura idiopatica; tuttavia, considerando le difficoltà nel dimostrare la significatività clinica delle mutazioni in eterozigosi, sono necessari ulteriori approfondimenti per confermare definitivamente tali evidenze.

Le prospettive future di questo progetto riguardano quindi il completamento degli studi funzionali per entrambe le mutazioni, nonché lo studio funzionale delle due nuove mutazioni.

Bibliografia

- [1] P.Choen et al., J Clin Endocrinol Metab 93, 2008
- [2] E.Bonioli et al., Growth Hormone & IGF Research 15, 2005
- [3] A.J.Brooks et al., IJBCB 2007
- [4] C.J.Greenhalgh et al., The Journal of Clinical Investigation 115, 2005
- [5] Minoru Fujimoto and Tetsuji Naka, TRENDS in Immunology 24, 2003
- [6] D.Metcalf et al., NATURE 405, 2000
- [7] Derek LeRoith and Peter Nissley, The Journal of Clinical Investigation 115, 2005
- [8] B.R.Dey et al., The Journal of Biological Chemistry 273, 1998
- [9] M.O.Savage et al., Nature Clinical Practice 2, 2006
- [10] J.M.Wit et al., Growth Hormone & IGF Research 2008
- [11] M.J.E.Walenkamp and J.M.Wit, Hormone Research 66, 2006
- [12] S.Amselem et al., J.Clin.Invest 1991
- [13] S.Meyer et al., Growth Hormone & IGF Research 2007

