

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in:
MEDICINA MATERNO INFANTILE E DELL'ETÀ EVOLUTIVA E
FISIOPATOLOGIA DELLA FUNZIONE SESSUALE

Ciclo XXII

Settore scientifico disciplinare di afferenza:
PEDIATRIA GENERALE E SPECIALISTICA, MED/38

**STUDIO DI MUTAZIONI GENICHE E VARIAZIONI
COPY-NUMBER IMPLICATE NEL DEFICIT
COMBINATO DEGLI ORMONI IPOFISARI (CPHD)**

Presentata da:

Dott. Giorgio Sponza

Coordinatore Dottorato

**Chiar.mo
Prof. Giuseppe Pelusi**

Relatore

**Chiar.mo
Prof. Piero Pirazzoli**

Esame finale: anno 2010

INDICE GENERALE

Capitolo 1	1
GENI PER LO SVILUPPO IPOFISARIO E PANIPOPITUARISMO	1
1.1 <i>Introduzione</i>	1
1.2 <i>Deficit di ormoni ipofisari</i>	1
Deficit isolato di GH (IGHD) di origine genetica	2
Deficit combinato di ormoni ipofisari (CPHD)	3
1.3 <i>Lo sviluppo dell'ipofisi</i>	5
1.4 <i>Geni di fattori di trascrizione attivati o inibiti nello sviluppo ipofisario</i>	8
Fattori di trascrizione regolanti le fasi precoci dello sviluppo ipofisario	8
Fattori di trascrizione per la le fasi intermedie e tardive dello sviluppo ipofisario.....	12
1.5 <i>Morfologia ipofisaria in RM ed ipopituitarismo</i>	13
1.6 <i>Il gene e la proteina POU1F1</i>	17
1.7 <i>Il gene LHX3 e le isoforme proteiche Lhx3a e Lhx3b</i>	21
1.8 <i>Il gene e la proteina SOX3</i>	24
Capitolo 2	29
METODI PER DETERMINARE IL “GENE COPY NUMBER”	29
2.1 <i>Tecniche classiche e nuove tecniche</i>	30
2.2 <i>La tecnica MLPA</i>	32
Denaturazione ed ibridazione	33
Azione della ligasi	33
Amplificazione	34
Separazione e quantificazione dei frammenti amplificati fluorescenti.....	34
2.3 <i>Vantaggi e svantaggi della tecnica MLPA</i>	35
2.4 <i>Altri impieghi dell'MLPA: studio di SNP e di siti metilati</i>	36
2.5 <i>Il metodo quantitativo della Real Time PCR (qPCR)</i>	37
2.6 <i>Fluorofori impiegabili nella qPCR</i>	40
2.7 <i>Correlazione tra serie di dati ed efficienza di qPCR</i>	44
2.8 <i>Il metodo delle curve standard in qPCR</i>	45
2.9 <i>Il metodo comparativo del CT ($\Delta\Delta CT$) ed il metodo di Pfaffl</i>	47
Note sui metodi alternativi per rilevare l'efficienza di qPCR.....	49
Capitolo 3	51
SCOPO DELLA TESI	51
Capitolo 4	53
PAZIENTI, MATERIALI E METODI	53
4.1 <i>Metodica usata per il sequenziamento diretto</i>	54
Estrazione di DNA genomico.....	54
Amplificazione del DNA (PCR) e purificazione dei frammenti	55
Cycle sequencing, purificazione e corsa elettroforetica	55
4.2 <i>Settaggi per la PCR ed il sequenziamento dei nuovi geni studiati</i>	56
PCR e sequenziamento per i geni POU1F1 e LHX3	58
Condizioni di amplificazione e sequenziamento del gene SOX3: un caso esemplare.....	60

4.3 Screening di una mutazione puntiforme in <i>LHX3</i> mediante tecnica CAPS.....	64
4.4 Screening di pazienti per possibili InDel nel gene <i>SOX3</i>	66
4.5 Pazienti, materiali e metodo negli esperimenti MLPA.....	67
Rielaborazione dei dati grezzi ricavati con il metodo MLPA.....	67
4.6 Pazienti, materiali e metodi nella tecnica qPCR.....	70
Real time PCR sul gene <i>GH1</i>	70
Real time PCR sul gene <i>SOX3</i>	72
Real time PCR sul gene <i>LHX3</i>	73
Capitolo 5	75
RISULTATI	75
5.1 Analisi di sequenziamento diretto di 5 geni.....	75
Sequenziamento dei geni <i>POU1F1</i> e <i>SOX3</i>	75
Scoperta in <i>LHX3b</i> di una nuova mutazione, la sostituzione c.1248A>G.....	77
5.2 La tecnica CAPS può rilevare mutazioni c.1248A>G in <i>LHX3b</i>	78
5.3 Nessuna mutazione INDEL rintracciata al momento dentro <i>SOX3</i>	79
5.4 L'MLPA rileva alcuni casi di ampie delezioni in <i>GH1</i> e <i>LHX3</i>	80
5.5 Impiego della qPCR come conferma dei dati dell'MLPA.....	83
5.6 Analisi qPCR per rintracciare possibili duplicazioni di <i>SOX3</i>	86
Capitolo 6	89
DISCUSSIONE	89
APPENDICE MATEMATICA	97
BIBLIOGRAFIA	101

Capitolo 1

Geni per lo sviluppo ipofisario e panipopituitarismo

1.1 Introduzione

La crescita di un individuo nel periodo fetale e poi nell'infanzia, fanciullezza e pubertà è metabolicamente dipendente dai “messaggi” inviati dal cervello e da ghiandole annesse come l'ipofisi, che, direttamente o indirettamente controlla anche una serie di altre ghiandole e distretti del corpo. L'asse ipotalamo-ipofisario quindi è una centralina direzionale non solo dell'accrescimento ma anche del metabolismo dell'intero organismo. In questo approfondimento teorico ci si interesserà soprattutto della ghiandola ipofisaria e di svariati fattori di trascrizione (codificati da svariati geni) la cui interazione in ambiti spazio temporali definiti è responsabile del corretto sviluppo dell'ipofisi stessa. Alcuni di questi geni, inoltre, presiedono al differenziamento e alla formazione delle cinque linee cellulari ipofisarie secernenti (tra cui le cellule somatotrope) e controllano la trascrizione dei geni che codificano messaggeri ed ormoni ipofisari.

1.2 Deficit di ormoni ipofisari

Uno dei vari sintomi che suggerisce ad un medico di effettuare dei dosaggi ormonali ipofisari può essere, come noto, un ritardo di crescita. L'ormone oggetto di studio è principalmente il GH (growth hormone) ma nella casistica clinica non è infrequente rinvenire nel contempo carenze per altri ormoni. Ciò è dovuto al fatto che (come si vedrà) le cellule somatotrope si differenziano sulla base di segnali dati da fattori di trascrizione genici che permettono la differenziazione anche di altre linee cellulari.

Un ritardo di accrescimento, per essere precisi, non è comunque legato necessariamente a deficit ormonali in quanto una serie di altri fattori può

influire, per esempio la dieta, eventuali patologie, tumori, traumi. Se dal punto di vista auxologico, essere sotto il 3° percentile* di una curva di crescita¹ significa avere una crescita sotto la norma, nessun'altra conclusione in sé è possibile senza ulteriori indagini.

Un ritardo di crescita può essere valutato anche in feti grazie all'ecografia ed essere correlato a qualche problema o della gravidanza o a motivi congeniti. In questi casi si parla di **IUGR** (Intrauterine growth retardation) che può concludersi in una nascita sotto-peso cioè in un evento **SGA** (Small for Gestational Age cioè piccolo per l'età gestazionale) oppure risolversi entro la nascita. Molti neonati SGA riescono entro i primi due anni di vita a recuperare il ritardo di crescita (**catch-up growth**).

Secondo alcune statistiche² una minor porzione di SGA (circa il 10%) non presenta tuttavia un sufficiente recupero staturico-ponderale e può manifestare in età adulta complicanze a carico delle funzioni cognitive, endocrine, metaboliche e cardiovascolari.

Quando i problemi di crescita sono associati a un qualche deficit ormonale ipofisario, normalmente si può avere o un **deficit isolato di GH** o un **deficit combinato di ormoni ipofisari**. Inoltre il deficit può avere un'origine genetica o essere dovuto ad altre cause.

Deficit isolato di GH (IGHD) di origine genetica

Il termine **IGHD (Isolated Growth Hormone deficiency)** si usa quando è carente o assente, per quanto riguarda l'ipofisi, il solo ormone della crescita.

Se la condizione IGHD è di origine **genetica**, allora una o più mutazioni geniche interferisce direttamente sulla sintesi dell'ormone della crescita o sulla trasmissione del segnale poco a monte o a valle.

Si stima che l'incidenza di deficit isolato di GH sia tra 1 su 4000 e 1 su 10000 nati vivi (con un'ampia incertezza sul dato), ma in gran parte dei soggetti le cause genetiche sono molteplici o sconosciute. In questi casi si parla di deficit di GH **idiopatico**^{3 4}.

* Percentile: considerando una serie di misure non decrescenti, il 1° percentile è la soglia al di sotto del quale ricade una quota delle misure pari all' 1%

I casi di deficit isolato di GH di origine genetica sono stati classificati (a seconda del genotipo mutato) in 4 sottogruppi, come è spiegato nella seguente tabella (tabella 1.1)⁵.

Tabella 1.1 – Classificazione⁵ dei deficit isolati di ormone della crescita di origine genetica

Tipo IGHD	Ereditarietà	Gene/mutazione	Proteina corrispondente	fenotipo
IA	Autosomica recessiva	GH1/Ampia delezione, microdelezioni o sostituzioni punt. connesse a \neq aa	Del tutto assente	Severa bassa statura, necessità di usare anticorpi neutralizzanti gli anticorpi antiGH
IB	Autosomica recessiva	GH1 oppure GHRHR/Mutazioni del sito di splicing, perdita di esoni	Proteina tronca, con attività carente	Bassa statura. Buona risposta alla terapia con GH
II	Autosomica dominante	Mutazioni del sito di splicing, sostituzioni punt. connesse a \neq aa	Proteina con attività carente	Bassa statura. Buona risposta alla terapia con GH
III	X-linked, recessiva	Meccanismo ancora sconosciuto		Maschi con ipogammaglobulinemia

☞E' da notare che anche mutazioni a valle del percorso d'azione del GH, come una mutazione nel recettore per l'ormone della crescita (GHR) possono comportare un fenotipo molto simile a quello di un IGHD. Nella **sindrome di Laron**: si ha una resistenza completa a trattamento con GH a causa soprattutto di mutazioni nel dominio TM o intracellulare di GHR (in tali casi si interviene con IGF1).

Deficit combinato di ormoni ipofisari (CPHD)

Il termine **CPHD (Combined Pituitary Hormone Deficiency)** si riferisce al deficit per svariati ormoni dell'adenoipofisi. Generalmente al deficit di GH (sempre presente) si accompagna il deficit di uno o più ormoni. Talvolta, invece di parlare di CPHD, si usa l'equivalente abbreviazione **MPHD** (deficit multiplo di ormoni ipofisari).

La statistica medica riporta frequenze di pazienti **panipopituitarici** (cioè affetti da CPHD) dell'ordine di 1 su 20000 nati vivi

A livello eziologico sono state riportate svariate cause possibili (cause genetiche ma anche traumi ipofisari, disfunzioni, dieta). In gran parte dei soggetti non sono ben note le cause di CPHD e si parla perciò di CPHD **idiopatico** (presenza di fattori genetici ed ambientali sconosciuti) e di **ISS** (idiopathic short stature).

Per quanto riguarda le cause genetiche accertate, molti soggetti CPHD presentano mutazioni in particolari geni codificanti per fattori di trascrizione genici che regolano le fasi di sviluppo dell'ipofisi e la differenziazione dei 5 tipi cellulari del lobo anteriore dell'ipofisi stessa.

La figura 1.1 è stata presentata ad un convegno internazionale di endocrinologia pediatrica (ESPE2007-Helsinki) e rende l'idea su quanto ancora si deve fare per trovare le cause genetiche del CPHD.

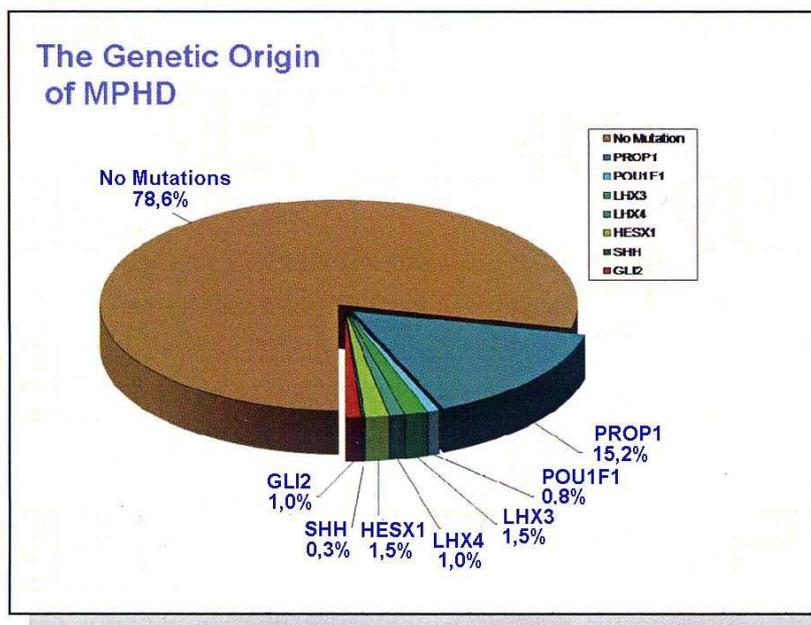


Figura 1.1 – Diagramma a torta illustrante una stima dei fattori genetici e non, alla base di una serie di analisi in soggetti panipopituitarici. Presentato al convegno ESPE del 2007 dal gruppo di Pfaffle RW.

Di seguito, si sintetizzano le conoscenze attuali sullo sviluppo ipofisario indicando i geni necessari per un corretto sviluppo dell'ipofisi e delle sue cellule secernenti.

1.3 Lo sviluppo dell'ipofisi

L'ipofisi deriva embriologicamente da 2 tessuti primitivi; il lobo anteriore e quello intermedio originano dall'ectoderma orale mentre la neuroipofisi si sviluppa dall'ectoderma neurale. Nel topo la sequenza di eventi di sviluppo è ben conosciuta e sembra riflettere ciò che avviene anche nell'uomo⁶. Schematicamente (figura 1.2) si possono distinguere 4 fasi:

- 1) Formazione dei primordi dell'ipofisi (Pituitary placode). Nel topo ciò si scorge in posizione ventrale a 7,5-8,5 dpc (dpc=days post coitum, cioè giorni embrionali) nel mezzo del tubo neurale anteriore ed in posizione adiacente con la regione che originerà l'ipotalamo e l'infundibolo ipofisario (in posizione posteriore). Il primordio appare come un ingrossamento del palato dell'ectoderma orale
- 2) Fase di tasca di Rathke rudimentale. Il tessuto primordiale subisce un'invaginazione dorsale via via più profonda
- 3) Tasca di Rathke definitiva⁷: corrisponde a circa 10,5 dpc nel topo e a circa 40 dpc nell'uomo. La tasca rudimentale si è approfondita e poi si è chiusa, ma può avere ancora una piccola connessione con l'ectoderma della cavità orale.. Nel frattempo un'evaginazione dell'ectoderma neurale alla base del diencefalo (in fase di sviluppo) comincia a dare origine all'ipofisi posteriore o neuroipofisi.
- 4) Ipofisi oramai completa: Nel topo a 12,5 dpc la tasca chiusa ha perso i contatti con l'ectoderma della cavità orale e le cellule del lato ventrale della tasca proliferano e si differenziano per dare origine al lobo anteriore ipofisario (adenoipofisi) verso i 15,5 dpc⁸ mentre un più limitato sviluppo della parete dorsale darà origine al lobo intermedio⁹. Anche l'evaginazione del diencefalo si chiude e si appressa contro il lobo anteriore ed intermedio formando il lobo posteriore dell'ipofisi.

Alla fine della quarta fase, nell'adenoipofisi finiscono di differenziarsi le varie cellule che origineranno i 5 tipi di cellule ghiandolari ovvero:

- ✓ cellule corticotrope secernenti ACTH (ormone adrenocorticotropo)
- ✓ cellule gonadotrope secernenti le gonadotropine FSH (ormone follicolo stimolante) e LH (ormone luteotropo)

- ✓ cellule tireotrope secernenti TSH (ormone stimolante la tiroide)
- ✓ cellule somatotrope secernenti l'ormone della crescita GH
- ✓ cellule lattotrope secernenti PRL (prolattina)

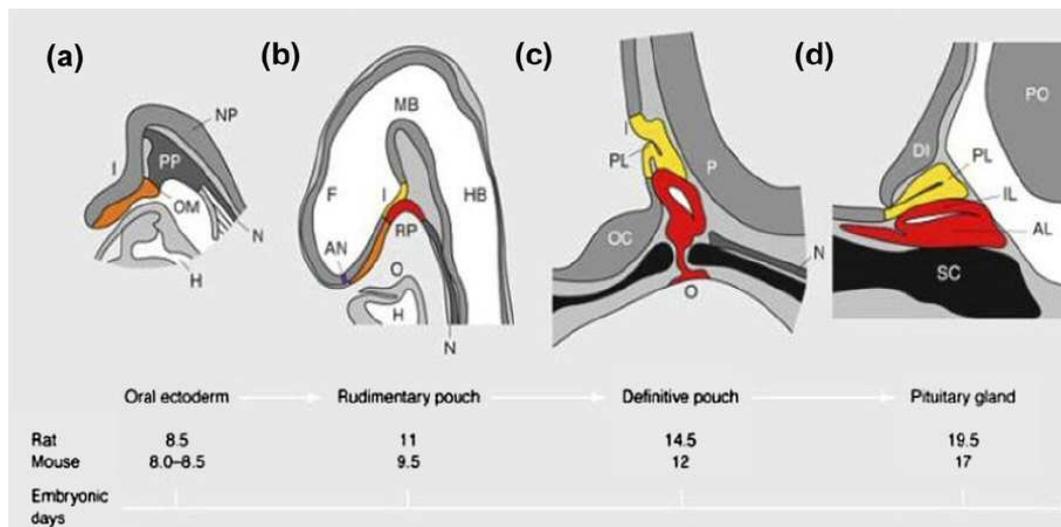


Figura 1.2 – Schema delle fasi di sviluppo dell'ipofisi in roditori. (a) Ectoderma orale (b) Tasca di Rathke primitiva (c) Definitiva tasca di Rathke (d) Ipofisi completa. Legenda: I, infundibulo; NP, piastra neurale; N, notocorda, PP piastra pituitaria OM, membrana orale, RP, tasca di Rathke O, cavità orale PL, lobo posterior IL, lobo intermedio; AL, lobo anteriore; OC, chiasma ottico; DI, diencefalo; SC, cartilagine sfenoide. Da Sheng and Westphal- Trends in Genetics 1999; 15: 236–240

I vari tipi cellulari tra l'altro vanno ad occupare posizioni ben precise dell'adenoipofisi. L'ordine con cui sono state menzionate (dalle corticotrope alle lattotrope) corrisponde alla disposizione delle cellule a partire dalla porzione ventrale a quella dorsale dell'adenoipofisi verso il lobo intermedio. Le cellule somatotrope e lattotrope sembrano derivare dalle stesse cellule progenitrici e popolano la regione dorsale del lobo anteriore ipofisario¹⁰.

Vi è anche un ordine temporale nella differenziazione completa delle cellule ghiandolari (come visualizzabile nella figura 1.3 a destra). Le prime cellule a differenziarsi sono le corticotrope (12,5 dpc nel topo) seguono le tireotrope (14.5 dpc) e contemporaneamente le somatotrope e lattotrope (15,5 dpc) che derivano dal un progenitore cellulare comune ed infine poco dopo vengono le gonadotrope (16,5 dpc).

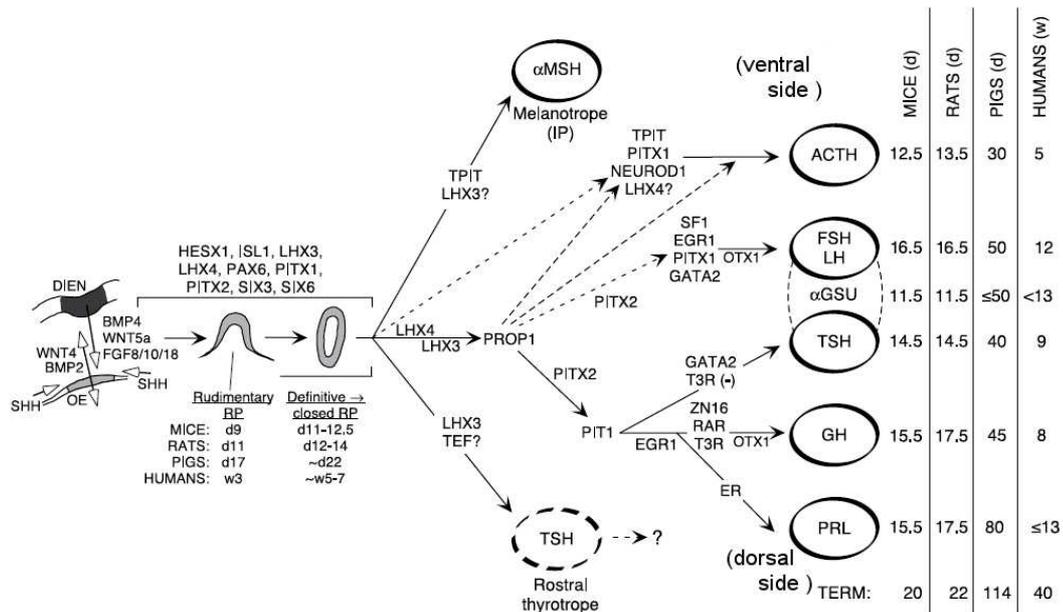


Figura 1.3 – Regolazione trascrizionale dello sviluppo del lobo anteriore dell'ipofisi (adenopofisi). Una serie di fattori di trascrizione coinvolge, da parti opposte, porzioni limitate del diencefalo ventrale (DIEN) e dell'ectoderma orale (OE), poi, nella tasca di Rathke (primordio dell'adenopofisi) definitiva si vanno a differenziare i 5 tipi cellulari secondo un preciso ordine spaziale e temporale (giorni sulla destra della figura). Tratto da Savage et al., in *Gene* 2003; **319**: 1-19.

La precisa disposizione delle cellule progenitrici e la loro progressiva differenziazione in cellule ghiandolari è codificata geneticamente e viene permessa da uno scambio di messaggi cellulari che attiva certi geni le cui proteine possono a loro volta fungere da fattori di trascrizione in una complessa reazione a catena. Questi messaggeri chimici possono diffondere nei tessuti circostanti cosicché messaggeri della tasca di Rathke primitiva possono indurre strutture in formazione derivanti dal diencefalo e viceversa (figura 1.3). Da una serie di osservazioni su animali con mutazioni spontanee o indotte, soprattutto topi, le proteine finora conosciute più precocemente implicate nella trasmissione di segnali sono tra le altre, le proteine dei geni FGFs (fibroblast growth factors), BMP4 (bone morphogenetic protein 4), WNT5a della parte ventrale del diencefalo e, per quanto riguarda la tasca di Rathke, BMP2 e WNT4¹¹. Inoltre, uno dei geni più importanti nel delimitare inizialmente la porzione di tessuto che darà origine alla tasca di Rathke sembra essere il gene Sonic hedgehog (SHH)¹².

1.4 Geni di fattori di trascrizione attivati o inibiti nello sviluppo ipofisario

Di seguito si descrivono in forma concisa l'azione di alcuni fattori di trascrizione importanti per la formazione delle strutture ipofisarie e per la differenziazione cellulare. L'azione di molti geni codificanti per questi fattori è stata ben studiata in topo con mutazioni spontanee o indotte ma è stata confermata in altri animali o studiando casi clinici.

Fattori di trascrizione regolanti le fasi precoci dello sviluppo ipofisario

Tra i più precoci geni attivati per la sintesi di fattori di trascrizione vi sono i geni per le **proteine Pitx** contenenti omeodomini bicoid-like (Bicoid è un noto fattore di trascrizione in *Drosophila*). Sono proteine con omologia di sequenza non solo con Bicoid ma anche con Pit1, che è un fattore di trascrizione più tardivo. Sia Pitx1 che Pitx 2 sono espressi precocemente nello sviluppo nei topi e loro mutazioni sono connesse a svariati anomalie cerebrali ed anche dello sviluppo dei primordi dell'ipofisi¹³. Alcuni studi hanno mostrato un ruolo di Pitx2 anche in fasi più tardive aumentando la trascrizione tramite il legame ai promotori dei geni FSH β e del gene della prolattina^{14 15}. Mutazioni nel gene Ptx2 sono state associate non solo a panipopituarismo ma anche a difetti cerebrali noti come sindrome di Rieger. Geni che vengono attivati precocemente e che regolano con le loro proteine altri geni sono i **fattori di trascrizione LIM-HD**. Nei mammiferi sono stati trovati almeno 12 proteine LIM-HD che agiscono come fattori di trascrizione legandosi al DNA con il tipico omeodominio (HD) e con due domini LIM. Tali proteine regolano lo sviluppo sia di strutture cerebrali che dell'ipofisi¹⁶. I più importanti fattori di trascrizione sono *Isl1*, *Isl2*, *Lhx2*, *Lhx3*, *Lhx4*. Gli ultimi due, tra l'altro, sembrano agire sia nelle fasi precoci di sviluppo delle strutture dell'ipofisi, sia nelle fasi tardive della differenziazione cellulare.

Il gene *LHX3*, nei mammiferi viene tradotto in almeno 3 isoforme con distinti percorsi di espressione e proprietà trascrizionali^{17 18}. La proteina *Lhx3* può attivare, costrutti con geni reporter contenenti il promotore di ormoni ipofisari e i geni di fattori di trascrizione includenti i geni *PIT1*,

PRL, TSH β ed α GSU agendo da solo o assieme ad altri fattori di trascrizione (come Pit1 e Pitx1) ¹⁹. Nei topi con ambo le copie geniche LHX3 inattivate si ha un arresto dello sviluppo delle fasi posteriori alla tasca di Rathke quindi la mancata differenziazione di tutti i tipi di cellule endocrine; ulteriori problemi soprattutto ai motoneuroni condannano questi topi alla morte. Nell'uomo; pazienti con mutazioni in LHX3 oltre al panipopituitarismo, possono avere altri sintomi includenti rigidità della spina cervicale e riduzione della rotazione del collo²⁰.

Il gene LHX4 codifica per una proteina molto imparentata con quella di LHX3. LHX4 è inizialmente espressa attraverso la tasca di Rathke, ma la sua espressione è transitoria ed è ristretta alla futura adenoipofisi²¹. L'inattivazione di entrambe le copie geniche di LHX4 non impedisce la formazione della tasca di Rathke, ma la tasca è anomala e presenta un ridotto numero di tipi cellulari. Inoltre una singola copia di LHX3 o LHX4 nei topi è sufficiente per la formazione della tasca definitiva, da cui questi due geni probabilmente agiscono in modo ridondante, almeno nelle fasi precoci dello sviluppo ipofisario⁶

Alcuni pazienti con LHX4 mutato avevano una proteina LHX4 troncata con l'omeodominio mancante, ed un fenotipo con bassa statura, ipopituitarismo, difetti cerebrali e anomalie nella sella turcica²². Negli ultimi anni sono state scoperte altre mutazioni, in generale comunque il quadro di deficit ipofisari è variabile ²³ e spesso sono presenti ulteriori anomalie cerebrali tipo la malformazione di Chiari. Nell'uomo inoltre, al contrario che nel topo, l'inattivazione di una delle due copie geniche comporta un fenotipo mutato, probabilmente perché LHX4 con una sola copia non sembra regolare bene la trascrizione di Pou1f1²⁴.

Pax 6 è un altro precoce fattore di trascrizione con tipici omeodomini leganti il DNA. Il gene PAX6 è stato studiato in topi mutati ed anche in mutazioni spontanee umane e si è visto che anch'esso ha un ruolo chiave nella corretta formazione di molte strutture cerebrali ed anche per lo sviluppo del pancreas e dell'ipofisi²⁵. In quest'ultimo caso sembra regolare l'azione di SHH.

Sono state anche segnalate pazienti con mutazioni geniche in **SHH**. Anche questo gene, se mutato provoca molte anomalie cerebrali, oltre ai sintomi di panipopituitarismo, spesso compare oloprosencefalia ovvero vi è una mancata segmentazione del prosencefalo rispetto al resto dell'encefalo²⁶.

Tre geni **GLI** sono ritenuti importanti nel propagare il segnale di SHH. Mutazioni eterozigoti in **GLI2** sono state trovate in una piccola percentuale di pazienti con oloprosencefalia²⁷. In tali pazienti, oltre a varie anomalie cerebrali anche le funzioni ipofisarie erano anormali.

Nel topo sono state analizzate le funzioni di vari geni **SIX** (**SIX**= sine oculus) che sono tra i più precocemente espressi nei primordi della tasca di Rathke e con profilo di espressione persistente anche nel topo adulto. Sono state anche correlati stati di panipopituarismo a mutazioni in particolare del gene **SIX6** ma sembra che, in ambito umano, finora non siano ancora stati riscontrati pazienti con difetti oculari o panipopituarismo aventi mutazioni in **SIX6**²⁸.

Hesx1 è un fattore di trascrizione membro delle proteine a omeodominio del tipo paired-like. Sembra agire in questo caso da repressore trascrizionale, in particolare tale azione verrebbe espletata quando si lega ad alcune proteine come Tle1 e N-Cor²⁹. Anche la DNA metil transferasi I può associarsi a Hesx1 e promuovere la repressione di certi geni effettuando una metilazione di siti bersaglio. La sua espressione dal punto di vista temporale è tra 9 e 13,5 dpc in topo, quindi è un fattore di trascrizione molto precoce, presente inizialmente nella linea mediana della parte anteriore del tubo neurale dove si sviluppa la placca ipofisaria ed anche nell'adiacente piastra neurale rostrale. Quando comincia a diminuire la sua espressione verso i 13,5 dpc, può essere sbloccato il gene **PROP1** che è un fattore di trascrizione che più direttamente influisce sulla differenziazione di svariati tipi cellulari ipofisari. Mutazioni in Hesx1 provocano difetti nello sviluppo in modo pleiotropico. In Homo spesso sono associate a displasia setto ottica e disfunzioni ipofisarie³⁰. E' da notare che il gene **HESX1** è a sua volta attivato dalle proteine a omeodomini **LHX1** ed **LHX3** che sono richieste per la sua precoce espressione, mentre la regione 3' a valle contiene elementi necessari e sufficienti per una sua più tardiva espressione nella tasca di Rathke che si sta sviluppando³¹.

I fattori di trascrizione Sox1, Sox2, Sox3 sono tutti raggruppati nella subfamiglia B1 di proteine **Sox** che in totale sono una ventina sia nel topo che nell'uomo. Tali proteine legano il DNA e lo piegano con i loro domini HMG. Possono regolare l'attivazione genica come classici fattori di trascrizione ma anche, viste le alterazioni di conformazione che inducono sul DNA, possono permettere l'assemblaggio di molte proteine

trascrizionali in modo complesso³² **SOX2** viene espresso precocemente e mantenuto durante la fase di formazione della tasca di Rathke. Man mano che procede la differenziazione cellulare, il gene viene parzialmente inibito ma l'espressione non è mai completamente bloccata. SOX2 è espresso anche nella parte ventrale del diencefalo. Quasi tutti gli embrioni modificati in topo con inattivazione di ambo le copie geniche di SOX2 sono non vitali, i pochi animali rimasti vivi mostrano un moderato ipopituitarismo. Una serie di osservazioni fa pensare che la presenza di SOX2 può permettere la presenza di cellule indifferenziate anche nell'ipofisi di un animale adulto. Inoltre SOX2 potrebbe essere coinvolto nella regolazione di HESX1³³.

SOX3 è in gene espresso inizialmente non solo in svariate regioni del sistema nervoso centrale anche nella parte ventrale del diencefalo includente l'infundibolo e il presunto ipotalamo. E' un gene situato sul cromosoma X la cui delezione induce un fenotipo variabile, spesso caratterizzato da panipopituitarismo, difetti cranio-facciali e problemi mentali³⁴. Ultimamente sono state descritti anche pazienti con mutazioni in SOX3 connesse a panipopituitarismo e neuroipofisi ectopica senza la presenza contemporanea di alterazioni mentali³⁵.

La figura 1.4 tratta da una recente review³⁶, mostra schematicamente i rapporti tra i vari fattori di trascrizione implicati nello sviluppo dell'ipofisi.

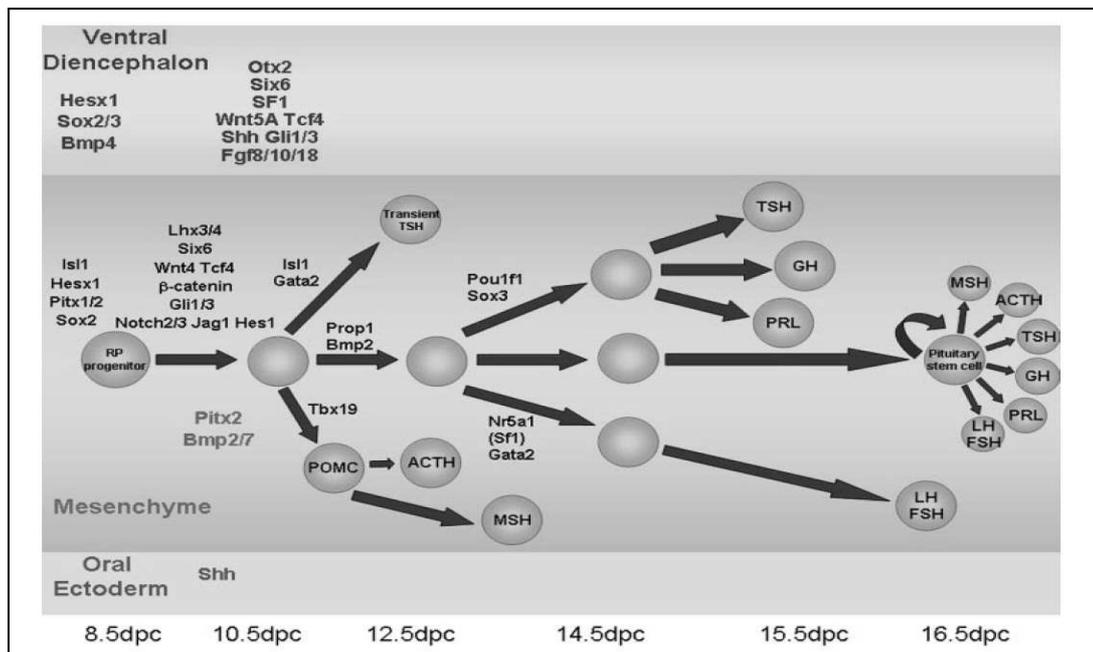


Figura 1.4 – Schema dei geni che si attivano temporalmente e le cui proteine fungono da fattori di trascrizione di altri geni a cascata, nello sviluppo dell'ipofisi

Fattori di trascrizione per le fasi intermedie e tardive dello sviluppo ipofisario

Quando la tasca di Rathke si è completamente chiusa ed eventualmente staccata dalla cavità orale, varie cellule già in fase di differenziazione acquisiscono la definitiva funzionalità e spazialità prevista per il tipo di secrezione endocrina a cui sono destinate. A tal scopo entrano in gioco fattori di trascrizione, eventualmente in sinergia con alcuni dei fattori visti nella fase precoce. E' da notare che, rispetto ai geni e ai fattori di trascrizione menzionati precedentemente, mutazioni di geni di fattori di trascrizione medio-tardivi generano raramente sindromi complesse a carico di strutture cerebrali limitandosi spesso ad originare quadri di panipopituarismo più o meno esteso. Sono stati tuttavia riscontrati anche casi di mutazioni con conseguenze fenotipiche più estese del solo panipopituarismo³⁷.

La proteina **Prop1** è un fattore di trascrizione a omeodominio, appartenente alla famiglia paired-like. Esso comincia ad esprimersi dentro la tasca di Rathke a 10 dpc (topo) in un intervallo temporale parzialmente sovrapposto a quello di Hesx1. Probabilmente agisce anche da repressore di Hesx1 in modo da poter prendere il controllo degli eventi della differenziazione in alcune linee cellulari. Inoltre agisce anche da attivatore del fattore di trascrizione Pit1 (o Pou1f1), tanto è vero che il nome Prop1 significa "*Prophet of Pit1*". Superati i 15,5 dpc, il gene viene disattivato³⁸. Si è notato che, se Prop1 è over-espresso (soprattutto nelle cellule producenti α Gsu) si ha un ritardo nella differenziazione delle cellule gonadotrope, una temporanea carenza di gonadotropine e un ritardo nella pubertà. Perciò Prop1 deve attivare Pit1 ma poi è importante che sia disattivato per una corretta differenziazione di certe linee cellulari³⁹.

Da studi su costrutti con geni reporter sembra che la capacità di attivare geni sia legata all'estremità carbossi-terminale. Invece l'estremità amino terminale e l'omeodominio di Prop1 avrebbero un'attività importante per l'inibizione dell'espressione genica⁴⁰ (Showalter et al. 2002).

Topi nani "Ames" che hanno un'impressionante riduzione di cellule tireotrope, somatotrope e lattotrope e ridotti livelli di gonadotropine portano

diverse mutazioni in Prop1 tra cui una mutazione puntiforme che determina un cambiamento di un aminoacido cruciale in un omeodominio legante il DNA. In questi topi inoltre è assente l'espressione di Pit1, perciò Prop1 ha un effetto epistatico su Pit1⁴¹. Le mutazioni recessive in Prop1 sono uno delle più frequenti cause genetiche di deficienza combinata degli ormoni ipofisari⁴².

Si sono fatti studi su topi nani Ames con geni LHX4 inattivati (oltre alle funzioni Prop1 compromesse). Si è notato che Prop1 e Lhx4 funzionano con ruoli sovrapposti per promuovere l'espansione della tasca di Rathke durante la fase precoce di sviluppo pituitario. Tali topi erano deficitari nelle funzioni di ambo i geni e avevano una differenziazione ritardata delle cellule corticotrope, non sviluppavano le altre cellule secernenti ormoni, mostrando la richiesta di PROP1 e LHX4 nella differenziazione di linee cellulari specializzate⁴³.

La proteina **Pou1f1**, detta anche Pit1 è un membro delle proteine a omeodomini POU di classe 1. POU1F1 è espresso relativamente tardi nello sviluppo ipofisario ed è riscontrabile a 13,5 dpc nei progenitori delle cellule somatotrope, lattotrope e tireotrope.. A 16 dpc si osserva la massima espressione nelle cellule secernenti GH, PRL e TSH, ed lo stato di attivazione per PIT1 persiste in queste cellule anche nell'individuo adulto. Alcune conclusioni sull'azione del fattore Pou1f1 erano già emerse all'inizio degli anni 90 grazie all'osservazione dei topi mutati nani Snell (dw, da dwarf) e Jackson (dw^J). I topi Snell portano una mutazione puntiforme recessiva mentre i topi Jackson una mutazione nulla, in ambo i casi si era notata l'assenza delle cellule tireotrope, somatotrope e lattotrope⁴⁴ Ulteriori informazioni su Pou1F1 sono riportate poco più avanti in questa tesi.

1.5 Morfologia ipofisaria in RM ed ipopituitarismo

Gli studi di risonanza magnetica (RM) della regione della sella turcica che accoglie l'ipofisi hanno fornito molte informazioni ulteriori sui difetti ipofisari oltre ai classici studi sulle carenze ormonali. Il vantaggio dell'uso di questa tecnica è legato al metodo non invasivo e all'analisi dettagliata,

necessaria d'altronde per un organo molto piccolo (il peso nell'adulto non supera normalmente 0,9 grammi).

La ghiandola ipofisaria aumenta di dimensioni in funzione dell'età. Appare connessa all'ipofisi tramite un peduncolo ben vascolarizzato. Nella ghiandola pituitaria fetale si possono distinguere la pars distalis (lobo anteriore) e la pars nervosa (lobo posteriore) separate dalla pars intermedia (lobo intermedio). Quest'ultima, nel terzo trimestre della gravidanza tende a regredire lasciando un lume residuo detto fenditura di Rathke (Rathke's clef) praticamente invisibile tra i due lobi⁴⁵

Nel feto e nel neonato sotto i due mesi, sia il lobo anteriore che posteriore sono molto ben visibili in sequenze in T1, probabilmente in relazione all'intensa attività cellulare durante questo periodo di sviluppo. Inoltre l'ipofisi ha una forma bulbosa probabilmente dovuta a un'ipertrofia cellulare. Solo in seguito il suo margine superiore diventa più piatto. Più avanti invece il lobo posteriore sarà distinguibile per la sua maggior luminosità nelle immagini T1. Alla pubertà si osserva una caratteristica ipertrofia ipofisaria: l'ipofisi si ingrossa con dimensioni di circa 8 mm nei maschi e 10 mm nelle femmine (nelle quali inoltre il margine superiore diventa caratteristicamente convesso). Dopo la pubertà infine l'ipofisi si riduce leggermente in dimensioni. Si è notato che molte carenze ormonali pituitarie si possono associare anche ad un'alterata morfologia dell'ipofisi.

Per quanto riguarda l'adenoipofisi, essa può in questi casi apparire normale oppure ipoplastica con altezza ridotta e talvolta con un bordo superiore concavo oppure, molto raramente, allargata (con una soglia superiore di 5 mm durante il periodo prepuberale.. Nel contempo, la neuroipofisi (normalmente più luminosa nelle immagini) può in posizione normale o ectopica, presso il peduncolo ipofisario o a livello dell'eminanza mediana. È importante notare la posizione della neuroipofisi rispetto al peduncolo. Il peduncolo può essere normale, oppure sottile o non visibile.

Un esempio di ipofisi normale e ipofisi con alterazioni è riportato nella figura 1.5.

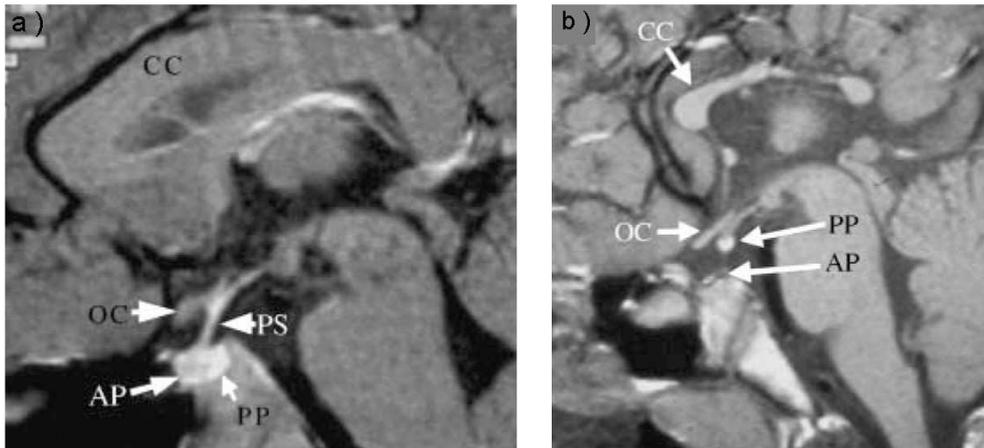


Figura 1.5 – visualizzazioni di RM in: a) controllo sano b) paziente affetto da panipopituitarismo e alterazioni di altre strutture cerebrali tipiche di displasia setto ottica per mutazione nel gene *HESX1*. Notare l'agenesia del corpo calloso (CC), l'ipoplastico chiasma ottico (OC), l'ipoplasia dell'adenopofisi, l'ectopia della neuroipofisi (PP) e l'assente infundibulo (PS) (da Dattani, *Clinical Endocrinology* 2005)

Alcuni studi hanno associato l'altezza dell'adenopofisi ai livelli di GH poiché le cellule somatotrope sono il tipo cellulare più abbondante⁴⁶. Tuttavia non sembra esserci una relazione precisa tra altezza e severità del deficit ormonale. Inoltre l'adenopofisi ipoplastica può essere notata sia in pazienti con deficit isolato di GH che in pazienti con deficit combinato (CPHD). La condizione CPHD tuttavia sembra condurre ad un'adenopofisi ipoplastica con una frequenza maggiore che nel caso dell'IGHD⁴⁷.

E' da notare che, talvolta sono stati trovati pazienti esibenti particolari variazioni nel tempo della morfologia del lobo anteriore ipofisario che, inizialmente nella condizione di ipoplasia diventava temporaneamente iperplastico per poi ritornare alla situazione ipoplastica. Molti di questi individui erano giovani pazienti affetti da mutazioni nel gene *PROP1* e si è supposto che l'iperplasia temporanea, fosse dovuta ad accumulo temporaneo di massa nel lobo intermedio⁴⁸

Un'altra anomalia piuttosto frequente in casi clinici di deficit ormonali ipofisari è la presenza di neuroipofisi ectopica (detta PPE= posterior pituitary ectopia o EPL=ectopic posterior lobe). Qualora non si riesca a trovare il peduncolo ipofisario, la neuroipofisi sarà sempre posta nell'eminenza mediana (figura 1.5-b), se il peduncolo è visibile pur se

ipoplastico, la neuroipofisi può invece essere rintracciata ovunque lungo il peduncolo. Sembra che i pazienti nei quali non sia visibile il peduncolo ipofisario (per cui la neuroipofisi si posiziona a livello dell'eminanza mediana) costituiscano i casi più severi e persistenti di carenza di GH⁴⁹.

Casi di ipoplasia del lobo anteriore e contemporanea neuroipofisi ectopica sono abbastanza comuni. In questi casi, la situazione di peduncolo non visibile poi sembra più statisticamente più frequente con pazienti panipopituitari. Infatti, secondo una ricerca con 60 pazienti inizialmente diagnosticati come IGHD, 5 pazienti mostranti PSA (agenesia del peduncolo pituitario) e PPE (neuroipofisi ectopica) hanno inevitabilmente sviluppato ulteriori carenze ormonali⁵⁰. Anche altre ricerche sembrano confermare tale aspetto⁵¹. Sulle cause della neuroipofisi ectopica gli studiosi del settore non hanno ancora pareri concordanti. Secondo alcuni scienziati (**teoria del trauma**) eventi di asfissia perinatale potrebbero comportare lesioni del peduncolo⁵². Ultimamente sembra più screditata la **teoria della malformazione genetica**, secondo cui un difetto nell'embriogenesi su base genetica è la causa principale di anomalie dell'asse ipotalamo-pituitario⁵³. Uno delle prove di questa teoria è la presenza di vari tipi di malformazioni cerebrali osservate in compresenza con anomalie dell'ipofisi.

A tal proposito, alcune anomalie cerebrali sono risultate associate proprio a mutazioni in geni di fattori di trascrizione precoci per lo sviluppo dell'ipofisi e che evidentemente giocano un ruolo importante anche nell'organogenesi di alcune strutture cerebrali. Come già ricordato per esempio mutazioni in LHX3 possono essere associate con spina rigida e limitata rotazione del collo, mentre HESX1 mutato può essere associato a SOD (displasia setto-ottica).

Nella tabella 1.2 è riportato uno schema con le carenze ormonali trovate, i riscontri di risonanza magnetica, alcuni dei possibili geni implicati e il tipo di mutazioni dominanti o recessive.

Tabella 1.2 – geni, ereditabilità delle mutazioni riscontrate (R=recessivo D=dominante), deficit ormonali associati (●=deficit; ⊕=possibile presenza di deficit; “(vuoto)”=nessun deficit) ed aspetto dei lobi anteriore e posteriore dell’ipofisi. Le informazioni inserite sono una sintesi da vari articoli e reviews^{54 55}.

gene	Trasmis- sione	Deficit ormonali					Adeno- ipofisi	Neuro- ipofisi	Altro	
		GH	TSH	PRL	FSH LH	ACTH				
GH1	R, D	●					Normale o ipoplasia	Variabile		
GHRHR	R	●					ipoplasia	variabile		
POU1F1	R, D	●	●	●			ipoplasia	Normale		
PROP1	R	●	●	●	●	⊕	iperplasia poi ipoplasia	normale		
HESX1	R, D	●	⊕	⊕	⊕	⊕	Ipoplasia	Ectopica	Displasia setto- ottica	
LHX3	R	●	●	●	●	⊕	Ipoplasia o iperplasia	Normale	Collo rigido	
LHX4	D	●	●		⊕	⊕	Ipoplasia	Ectopica (spesso)	Possibile craniofaringioma, e difetti cerebrali	
SOX3	X-linked	●	⊕	⊕	⊕	⊕	Ipoplasia	Ectopica	Possibile ritardo mentale/agenesia del corpo calloso	
GLI2	D	●	⊕	⊕	⊕	⊕	difettosa	difettosa	Possibile oloprosencefalia e difetti cerebrali	
PITX2	D	●	⊕	⊕	⊕	⊕	difettosa	difettosa	Sindrome Rieger	di

1.6 Il gene e la proteina POU1F1

La proteina del gene POU1F1 è stata il primo fattore di trascrizione con attività provata nel regolare l’espressione del gene GH1, la sua scoperta è del 1988 e uno dei suoi vecchi nomi è, a proposito, Ghf1 (GH factor 1). Un altro nome della proteina è stato Pit1 (Pituitari transcription factor 1) soprattutto nel caso del topo mentre nell’uomo il nome ufficiale è Pou1f1. Il nome significa “POU domain, class 1, transcription factor 1” dove POU è l’acronimo di Pit, Oct e Unc, tre fattori di trascrizione omologhi presenti in molti animali⁵⁶. Nella proteina umana lunga 291 aminoacidi (figura 1.6b) si distinguono un dominio di transattivazione e due omeodomini tipo POU detti POU-specific e POU-homeo. I due domini POU sono entrambi indispensabili per il legame a specifici siti a monte di geni da regolare. Tra

questi vi sono il gene codificante il GH, la PRL, quello per la subunità beta del TSH. La sua azione, come già menzionato a proposito degli esperimenti sui topi nani Snell e Jackson, è permettere la differenziazione e la proliferazione delle cellule somatotrope, lattotrope e tireotrope, eventualmente in associazione con altri fattori di trascrizione.

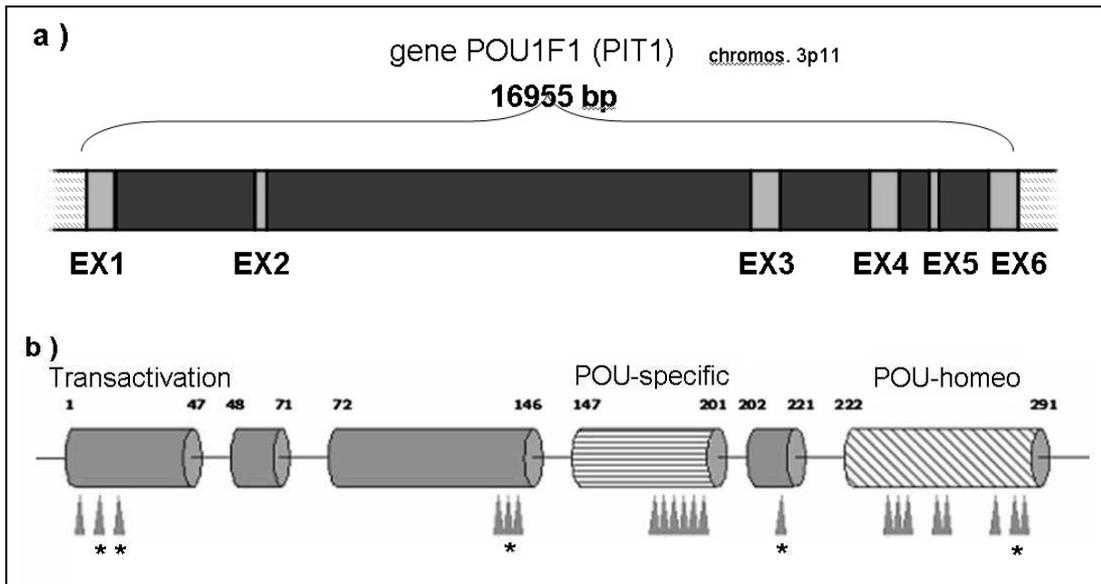


Figura 1.6 – la struttura del gene e della proteina *pou1f1*. Nel riquadro (a) è inserita la disposizione del gene con i suoi 6 esoni intervallati da introni in uno schema in scala, invece nel riquadro (b) è visualizzata la struttura proteica con i 3 domini più importanti e la posizione relativa alle mutazioni aminoacidiche trovate nell'uomo (Turton et al. 2005⁵⁷), in gran parte recessive (tranne le 5 mutazioni dominanti segnate con “*”). Dal 2005 ad oggi non sono state trovate ulteriori mutazioni dominanti.

Il gene POU1F1 è stato mappato⁵⁸ nel cromosoma 3 (posizione di mappa 3p11) grazie a metodo FISH (Fluorescence in situ hybridisation). Si estende per circa 17 Kbp con i suoi 6 esoni intervallati da introni come nella figura 1.6a. L'analisi molecolare del gene in pazienti panipopituitarici ha finora permesso di rintracciare 28 differenti mutazioni, concentrate soprattutto nei 3 domini principali (come indicato in figura 1.6b). Nella tabella 1.3 sono inserite tutte le mutazioni finora identificate del gene POU1F1 nell'uomo.

Tabella 1.3 – Mutazioni rintracciate finora nel gene POU1F1 in pazienti panipopituitarici. HD=POU Homeodomain; POU=POU-specific homeodomain
 La tabella è tratta da Kelbermann *et al.* - *Endocrine reviews* 2009

Mutation	Type of mutation	Location	Inheritance
p.Q4X	Nonsense	Exon 1	Recessive
p.P14L	Missense	Exon 1	Dominant
p.P24L	Missense	Exon 1	Dominant
p.F135C	Missense	Exon 3	Recessive
p.R143Q	Missense	Exon 3	Recessive
p.R143L	Missense	Exon 3	Recessive
p.K145X	Nonsense	Exon 3	Recessive
p.A158P	Missense	Exon 4 (POU)	Recessive
p.Q167K	Missense	Exon 4 (POU)	Dominant
p.R172Q	Missense	Exon 4 (POU)	Recessive
p.R172X	Nonsense	Exon 4 (POU)	Recessive
p.E174G	Missense	Exon 4 (POU)	Recessive
p.W193R	Missense	Exon 4 (POU)	Recessive
p.W193X	Nonsense	Exon 4 (POU)	Recessive
p.L194Q	Missense	Exon 4 (POU)	Recessive
c.682 + 1G>A	Splice site	Intron 4	recessive
p.K216E	Missense	Exon 5	Dominant
p.E230K	Missense	Exon 6 (HD)	Recessive
p.F233L	Missense	Exon 6 (HD)	Recessive
p.P239S	Missense	Exon 6 (HD)	Recessive
c.725_726delAA (reported as p.Q242R)	Frameshift	Exon 6 (HD)	Recessive
c.747delA	Frameshift	Exon 6 (HD)	Recessive
p.E250X	Nonsense	Exon 6 (HD)	Recessive
c.778insA	Frameshift	Exon 6 (HD)	Recessive
p.F262L	Missense	Exon 6 (HD)	Recessive
p.R271W	Missense	Exon 6 (HD)	Dominant
p.V272X	Nonsense	Exon 6 (HD)	Recessive

Ci si è interrogati sul meccanismo patogenetico di queste mutazioni. Molte di queste causano un disordine autosomale recessivo che è stato messo in relazione con una ridotta capacità di legare particolari siti bersaglio⁵⁷. Tuttavia alcune di queste, studiate con appositi software o tramite esperimenti diretti, sembrano legare normalmente il DNA. Nel caso della mutazione p.S179R, la sostituzione aminoacidica comporterebbe invece una minor interazione tra Pou1f1 ed altre proteine regolatrici⁵⁹. Nel caso delle mutazioni dominante p.R271W la proteina Pou1f1 riesce a legarsi ad un'altra proteina regolatrice a monte del gene della PRL ma solo come monomero e non come dimero⁶⁰. Tuttavia non si è ancora riusciti a studiare il meccanismo che viene alterato da molte altre mutazioni. Le difficoltà insite in questo studio forse derivano dalla molteplicità di relazioni della proteina Pou1f1 con siti del DNA e con altre proteine che partecipano alla regolazione genica nelle cellule somatotrope, lattotrope e tireotrope.

POU1F1 regola direttamente la trascrizione di GH, PRL e TSH β , ed inoltre altri geni “target” dell’azione regolatrice di Pou1f1 sono quelli per il recettore GHRHR ed per il recettore dell’ormone tiroideo beta di tipo 2. A questo punto, una domanda centrale è stata la comprensione di come questo fattore di trascrizione riesce ad agire in modo coordinato e con ruoli diversi in diverse cellule. Alcuni studi molto interessanti hanno considerato le cellule somatotrope e lattotrope che, tra l’altro, condividono le stesse cellule progenitrici. Scully et al (2000)⁶¹ hanno riportato le sequenze a monte dei geni GH1 e PRL comprendendo sia i promotori che gli enhancer e hanno considerato come alcune proteine interagiscono presso questi siti del DNA (figura 1.7)

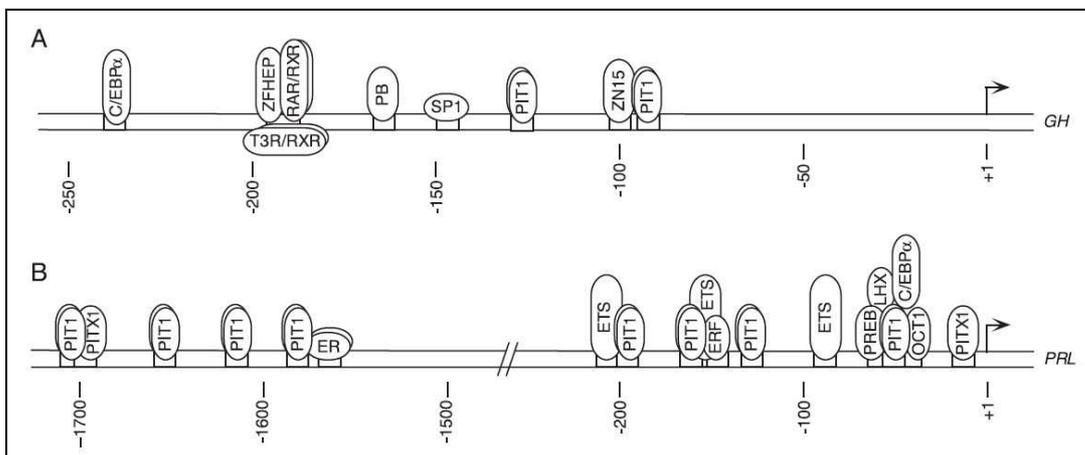


Figura 1.7 – (A) caratteristiche della regolazione del promotore di GH ipofisario (B) Regolazione trascrizionale a livello del promotore e dell’enhancer per PRL. Da studi su topi, con posizioni dei siti di legame in coppie di basi prima del sito di inizio della trascrizione. (figura tratta da Savage et al. 2003)

Quando la proteina Pit1 (=Pou1f1) si lega a monte del gene del GH occupa in modo bipartito determinati siti e lascia scoperti altri siti rispetto al caso del promotore della PRL. A questo punto intervengono altri fattori proteici agenti in *trans* per la regolazione genica. Sembra che nel caso del gene del GH, nell’ambiente delle cellule *lattotrope*, la proteina Pit1 legandosi al DNA lascia lo spazio per il legame anche di co-repressori con un meccanismo tale da prevenire un’inappropriata espressione di GH. Per verificare tale modello, sono stati inseriti in cellule lattotrope dei costrutti per il promotore del GH in cui i siti di legame tipici di PIT1 in GH erano

stati cambiati con i siti di legami tipici di Pit1 in PRL. In questo costrutto si aveva un'attiva espressione di GH anche in cellule lattotrope. Perciò elementi *cis* nel promotore comportano una repressione del GH mediata da Pit1 nelle lattotrope e l'attivazione nelle cellule somatotrope.

Come si nota da questi studi, il meccanismo è molto complesso e Pit1 può agire sia da attivatore che da repressore della trascrizione in associazione ad altre proteine, tra cui fattori di trascrizione agenti nelle fasi precoci dello sviluppo ipofisario. Nel caso della regolazione del gene PRL sembrano partecipare alla regolazione anche Pitx1 e Pitx2 in sinergia con Pit1 e LHX3^{62 63}.

D'altronde si era già scoperto un meccanismo di autoattivazione di Pit1. Sia nel promotore genico di Pou1f1 che in un suo enhancer distale sono stati rintracciati siti di legame per la proteina Pou1f1 stessa. Ciò potrebbe essere un meccanismo per rinforzare l'azione di Pou1f1 nelle cellule pituitarie Pit1-dipendenti⁶⁴.

Il gene POU1F1 presenta sia mutazioni recessive che dominanti (con una prevalenza delle prime nell'uomo) comportanti un prospetto di carenze ormonali variabili. In generale le deficienze in GH e PRL si presentano precocemente nella vita mentre la carenza in TSH si può presentare anche più avanti nell'infanzia⁵⁷.

1.7 Il gene LHX3 e le isoforme proteiche Lhx3a e Lhx3b

Il cDNA del gene LHX3 è stato clonato e sequeziato⁶⁵ da Zhadanov et al. inizialmente nel topo, nel 1995, basandosi sull'omologia di sequenza con *Xenopus laevis*. In seguito è stato studiato nell'uomo soprattutto da Sloop et al.¹⁷. La struttura del gene LHX3 umano comprende almeno 6 esoni intervallati da ampi introni nel cromosoma 9, posizione di mappa 9q34.3. Gli esoni iniziali sono detti 1a e 1b poiché causa splicing alternativo si possono generare due proteine LHX3 secondo la isoforma *a* oppure *b* (figura 1.8) che differiscono solo per l'estremità N-terminale che determina anche la diversa lunghezza (rispettivamente 397 e 402 aa). Per il resto le due isoforme sono identiche e nella struttura proteica comune si trovano due domini Lim (Lim1 e Lim2) molto conservati in tutti gli organismi e

codificati dagli esoni 2 e 3 ed un omeodominio codificato dall'esone 4 e da un piccolo pezzo dell'esone 5, infine si trova l'estremità carbossi-terminale al cui interno vi è un piccolo dominio LSD (cioè Lhx3/LIM3 Specific Domain).

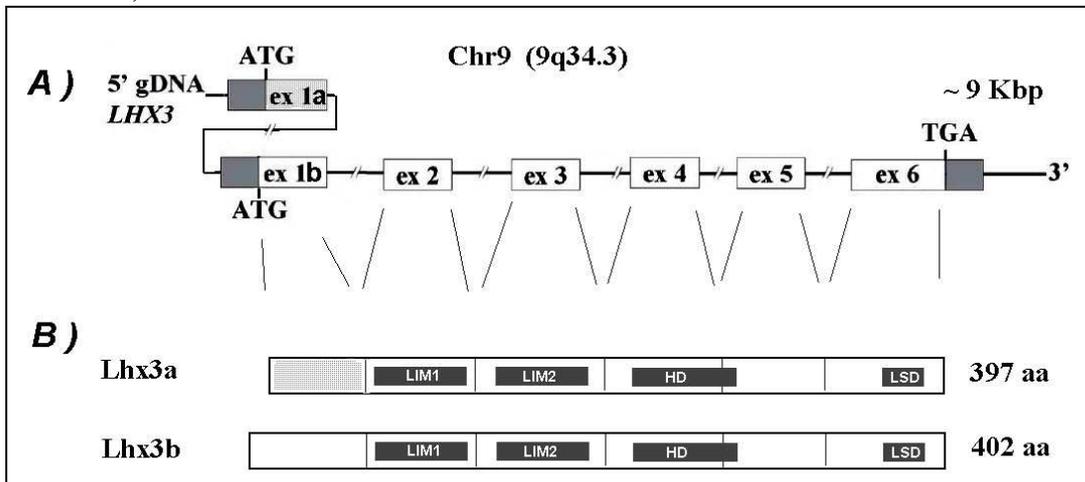


Figura 1.8 – (A) Disposizione del gene LHX3 umano con esoni ed introni. Sono presenti 7 esoni comprendendo l'esone 1a e l'esone 1b. (B) Struttura delle due isoforme "a" e "b" della proteina Lhx3, generate per splicing alternativo impiegando all'estremità proteica N-terminale, le informazioni derivanti dall'esone 1a oppure dall'esone 1b. Disegno della porzione proteica riadattato rispetto a Sloop et al. 1999.

I domini LIM sono stati così chiamati dalle iniziali di 3 proteine tra loro omologhe ovvero Lin-11, Islet-1 (o Isl1) e Mec-3. Tali domini hanno un motivo a Zinc-finger⁶⁵ composto da 50 a 60 residui di aa con la presenza di His e Cys in posizioni conservate. All'interno dell'omeodominio (HD), invece, sono state trovate 3 piccole sequenze segnale che, insieme ad un altro segnale nella zona carbossi-terminale, permetterebbero l'ingresso della proteina nel nucleo agendo in sinergia. Ciò si è capito grazie a mutazioni indotte in queste sequenze che negli esperimenti hanno impedito l'ingresso nel nucleo cellulare⁶⁶. Per quanto riguarda l'estremità N-terminale, che distingue le due isoforme, Sloop ha notato che entrambe sono espresse nell'ipofisi ma con caratteristiche funzionali diverse. L'isoforma Lhx3a trans-attiva il promotore di α -GSU (α -glicoprotein subunit) ed un costrutto con gene reporter contenente un sito di legame a Lhx3 in modo molto più efficiente che l'isoforma Lhx3b. Inoltre Lhx3a riesce ad agire in modo coordinato con Pit1 per aumentare l'espressione di TSH β , mentre

l'isoforma b no. Si suppone che la differenza nella capacità di attivazione genica delle due isoforme sia legata ad un maggior legame al DNA bersaglio per l'isoforma a.

Le isoforme si accumulano nell'embrione di topo in corrispondenza dei primordi della tasca di Rathke già a 9,5 giorni embrionali, la loro espressione permane nel lobo anteriore ed intermedio dell'ipofisi per permettere, insieme ad altri fattori di trascrizione e molecole segnale, il corretto sviluppo dell'ipofisi e la differenziazione e proliferazione delle cellule tireotrope, lattotrope e gonadotrope. Inoltre LHX3 è espresso lungo la corda spinale, nella parte posteriore del cervello e, secondo studi di Rajab et al (2008) nell'orecchio interno⁶⁷. Lo stesso gruppo di ricerca, (studiando embrioni e feti morti per cause naturali) ha verificato che l'intervallo temporale di espressione di LHX3 è parzialmente sovrapposto a quello di SOX2. Più precisamente, da studi con costrutti con un gene reporter, SOX2 può agire da fattore di trascrizione di LHX3 legandosi a siti del promotore del gene (tra l'altro è noto che SOX2 agisce come attivatore trascrizionale anche di HESX1). Le mutazioni riscontrate nell'uomo per LHX3 sono finora sempre state in omozigosi, cioè sono recessive, e tra l'altro sono state rinvenute in pazienti CPHD con bassa frequenza.

A livello dell'ipofisi mutazioni di LHX3 sono state quasi sempre associate a deficit multiplo di GH, TSH, PRL, FSH/LH mentre solo per alcune mutazioni è stato riscontrato deficit di ACTH. L'adenoipofisi si presentava quasi sempre con ipoplasia, raramente con iperplasia e non era mai presente neuroipofisi ectopica. Quasi sempre i pazienti avevano anche anomalie delle vertebre cervicali oppure vertebre molto appressate e limitata rotazione del collo mentre solo in alcuni casi si è notato un problema di sviluppo dell'orecchio interno. La tabella 1.4 sintetizza le 8 mutazioni riscontrate nell'ultimo decennio su 13 pazienti con i relativi riferimenti bibliografici.

Tabella 1.4 – Mutazioni rinvenute per il gene LHX3 e relativi riferimenti bibliografici (tabella tratta da Kelberman et al. in *Endocrine reviews* 2009; 30: 790-829)

Mutation	Reference
p.Y116C	67, 20
23-bp deletion	67, 20
g.159delT	68
p.A210V	69
p.E173X	69
p.W224X	69
LHX3 gene deletion	69
c.80532_775+454del3088	67
p.K50X	67
Splice acceptor site mut.(intron 3)	70

1.8 Il gene e la proteina SOX3

Il gene SOX3 appartiene alla famiglia di geni SOX, con il termine SOX che è l'acronimo di Sry-related HMG-BOX gene. L'omologia con Sry è soprattutto per la regione codificante l'HMG-box (HMG=high mobility group). Il gene SOX3 è stato clonato e caratterizzato come cDNA nel 1993 e nel 1996 Collignon et al. hanno determinato che SOX3 possiede un unico esone⁷¹.(figura 1.9 -parte alta). Il gene è stato mappato sul cromosoma X in posizione Xq26-q27.

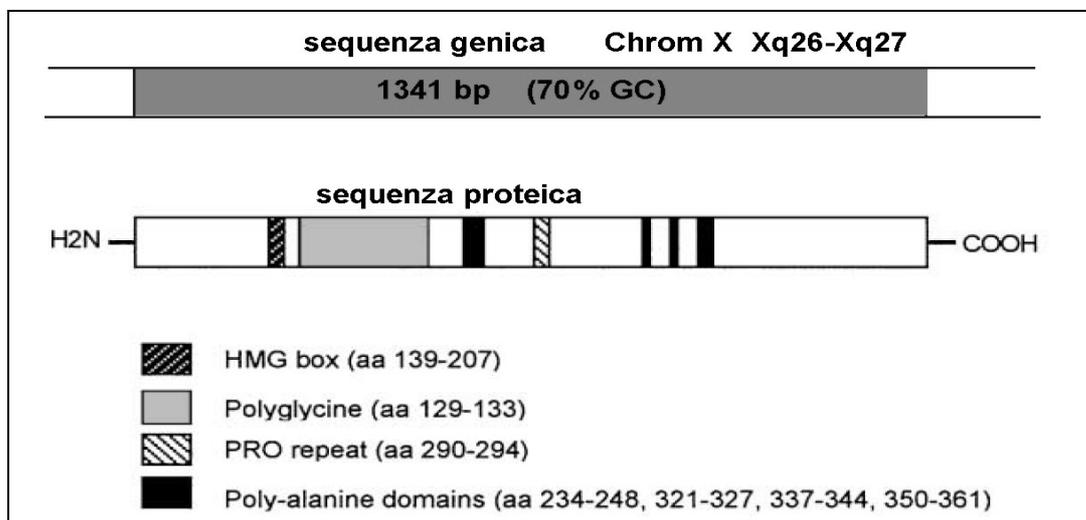


Figura 1.9 – Nella parte alta, caratteristiche del gene SOX3, con 1341 bp (tra il segnale di inizio e di fine traduzione) in un unico esone. Appena sotto si riporta lo schema della sequenza proteica umana di 446 aa (quest'ultima è tratta da Laumonnier, Ronce et al. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71:1450–1455)

La proteina nell'uomo è lunga 446 aa (figura 1.9-parte bassa) e contiene nella parte iniziale un HMG-box con altissima omologia di sequenza

rispetto al gene Sry (il gene per la determinazione dei testicoli) ed alcuni intervalli con ripetuti di Gly, Pro, e soprattutto Ala. Il tratto poli-alaninico più lungo comprende 15 Ala.

Come altri geni SOX, anche SOX3 ha un ruolo importante nello sviluppo del sistema nervoso. I prodotti dei geni SOX sembrano mantenere le cellule primordiali neuronali ad uno stato indifferenziato, e l'inibizione degli stessi porterebbe alla differenziazione dei neuroni⁷². Nel caso di SOX3, alti livelli di espressione sono stati trovati anche nella parte ventrale del diencefalo, includente l'infundibolo ed il presunto ipotalamo. SOX3 non è espresso nella tasca di Rathke, tuttavia è espresso ad altri livelli nel diencefalo ventrale includente l'infundibolo che elabora segnali induttivi importanti per la formazione del lobo anteriore ipofisario. In topi SOX3 mutanti, l'evaginazione dell'infundibolo è meno evidente dei topi normali, perciò l'ipopituitarismo dei topi mutanti potrebbe essere una conseguenza secondaria all'assenza di SOX3 nel diencefalo ventrale^{73, 7, 34}. Le prime mutazioni SOX3 osservate nell'uomo si riferivano a pazienti con malattie mentali con alterazioni visibili in risonanza magnetica ed insieme panipopituitarismo. *Solomon et al.*⁷⁴, studiando tali pazienti trovò 5 pazienti maschi provenienti da famiglie non tra loro imparentate che esibivano una duplicazione (studiata con il metodo dell'ibridazione genomica comparativa) di una regione di 3,9 Mb tra Xq26.1 e Xp 27.3. Di tale regione sono conosciuti 18 geni trascritti tra cui SOX3, ma la maggior conoscenza delle mutazioni nel topo spostava l'attenzione proprio su SOX3. In generale le mutazioni umane in SOX3 si riferiscono a pazienti di sesso maschile, tuttavia *Stankiewicz et al.*⁷⁵ hanno anche trovato alcune pazienti (una madre e la figlia) con scarsa crescita, dislalia e ipopituitarismo esibenti una tipica duplicazione di Xq26.2-q27.1. Secondo gli autori all'interno della duplicazione il gene SOX3 era in una posizione distale cosicché la duplicazione non riusciva ad includere completamente il gene e probabilmente lo spezzava portando ad una condizione di emizigosi per il gene in questione. Tuttavia tale ipotesi non è ancora stata confermata dal punto di vista molecolare. *Woods et al.*³⁵ hanno riportato un quadro familiare in cui due fratellastri evidenziavano un ipopituitarismo X-linked

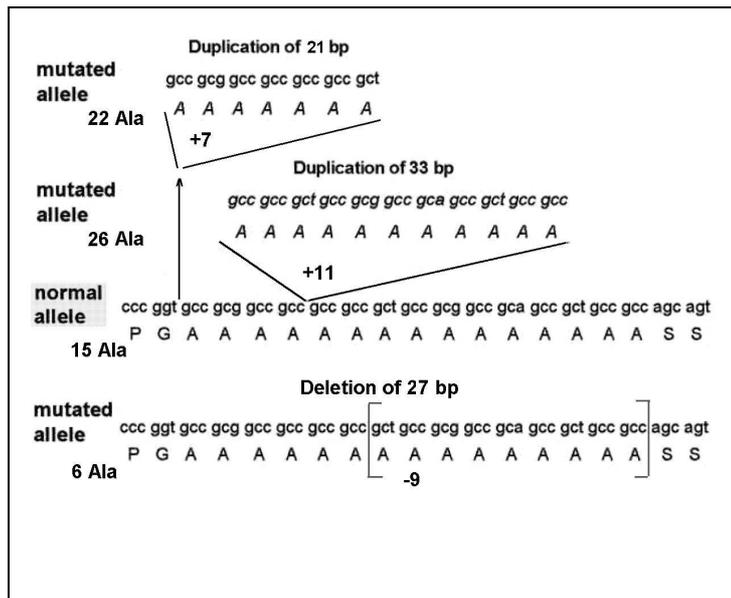
caratterizzato a livello molecolare da una duplicazione submicroscopica sul cromosoma Xq27.1. Venne definito anche l'intervallo della duplicazione, di circa 690 kb, in pratica la più piccola duplicazioni finora trovata comprendente SOX3 e altri due geni a funzioni sconosciute ma i cui trascritti non sono mai stati trovati nell'infundibolo in sviluppo. Ciò ha suggerito che il fenotipo mutato fosse dovuto ad un'ulteriore copia di SOX3. Lo stesso gruppo di ricerca ha individuato una nuova mutazione in tre fratelli, non dovuta a duplicazione ma ad espansione di una porzione genica codificante per una serie di 15 Ala. Nella mutazione si aveva l'inserzione all'interno del gene SOX3 di 21 basi codificanti per 7 Ala ulteriori. Contrariamente alle mutazioni trovate precedentemente in SOX3, le mutazioni trovate da Woods et al. erano connesse ad ipopituitarismo e talvolta anomalie del corpo calloso, a ipoplasia dell'infundibolo con neuroipofisi ectopica ma non a minorazioni mentali.

Anche il gruppo di ricerca di *Laumonnier*⁷⁶ nel 2002 aveva comunque trovato un'inserzione simile all'interno dei 45 nucleotidi codificanti le 15 alanine, in questo caso si trattava di un'inserzione "in frame" di 33 nucleotidi, con un'aggiunta di ulteriori 11 Ala nella proteina tradotta. Il fenotipo riportato era legato a livelli bassi di GH con scarsa crescita e ritardo mentale "X-linked".

Sia nel caso mutazione con proteina finale con l'aggiunta di +7 Ala (Woods), che nel caso della variante proteica con +11 Ala (Laumonnier), analisi in vitro suggerivano che l'espansione portava a una parziale perdita di funzionalità dovuta a minor capacità di ingresso nel nucleo rispetto alla proteina wild-type^{35 77}. Nell'insieme, sia la duplicazione di Xq27 comprendente SOX3 e quindi la possibile sovra-espressione di SOX3 che l'inserzione di Ala con perdita di funzione della proteina (in modo simile a una sotto-espressione) sono sostanzialmente associati a simile fenotipo, in particolare un'ipoplasia dell'infundibolo ed ipopituitarismo mentre la presenza di minorazioni mentali non è sempre presente. Ciò potrebbe anche suggerire che il dosaggio di SOX3 è critico per il normale sviluppo del diencefalo e dell'infundibolo e secondariamente del lobo anteriore dell'ipofisi^{34, 7}.

Sono state rintracciate con minor frequenza anche delle delezioni sempre a livello della regione del gene SOX3 codificante per le 15 Ala. Per due fratelli con severa demenza⁷⁶ si è appurata una delezione di 27 nucleotidi corrispondenti a una riduzione di -9Ala; in altri pazienti appartenenti ad un'altra famiglia, in uno studio con malati mentali⁷⁸, la delezione ha interessato 6 nucleotidi corrispondenti a una riduzione di -2Ala. In ambo gli studi, considerando i parenti dei pazienti, si sono trovati fenotipi non previsti in quanto nella prima ricerca il nonno era portatore della mutazione ma non soffriva di malattie mentali e nella seconda analisi la madre era omozigote per la mutazione ed aveva problemi psichici, ma altri due fratelli maschi pur avendo la mutazione genica non erano minorati mentali. Evidentemente certe mutazioni in SOX3 possono predisporre a malattia mentale ma non sono un fattore sufficiente al suo manifestarsi.

Figura 1.10 – schema (tratto da Laumonnier et al. 2002, riaggiornato ed adattato) delle mutazioni tipo INDEL scoperte nel gene SOX3 e riportate nei lavori di Woods et al.³⁵(prima riga) e Laumonnier et al.⁷⁶ (seconda e quarta riga) rispetto alla variante normale (terza riga). A queste mutazioni si deve aggiungere anche una delezione di 6bp trovata da Salemi et al.⁷⁸



Capitolo 2

Metodi per determinare il “gene copy number”

L'introduzione di sequenziatori sempre più performanti e dal costo vantaggioso per singola reazione ha portato molti laboratori ad avvalersi sempre più del sequenziamento del DNA per rilevare le mutazioni genetiche anche quelle che un tempo erano evidenziate con tecniche meno costose. Con il sequenziamento possono essere rintracciare mutazioni di una o più basi (con possibile effetto sul fenotipo), singoli polimorfismi (SNP=single nucleotide polymorphism) di popolazione ed anche piccole inserzioni/delezioni (InDel).

Vi sono tuttavia alterazioni del patrimonio genetico che non vengono rilevate dal sequenziamento ma che devono essere considerate per la loro entità e il loro effetto sul fenotipo. Si tratta per esempio delle variazioni del numero di copie di un frammento di DNA (dette CNV=copy-number variations) quando quest'ultimo, per la sua lunghezza, sia difficilmente inseribile all'interno di una coppia di primers per poter essere amplificato e sequenziato (figura 2.1).

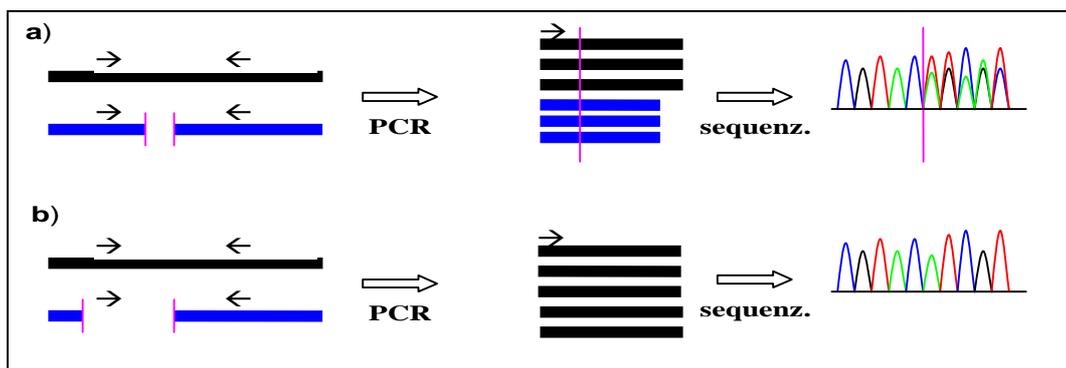


Figura 2.1 - il sequenziamento che si basa sulle informazioni della PCR può rilevare anche piccole inserzioni/delezioni in eterozigosi, purché siano incluse in un frammento delimitato da primers, come nel riquadro a), in casi contrario (vedi b) le informazioni sono tratte solo da 1 filamento di DNA (materno o paterno), e non si avrà traccia della delezione.

I frammenti di DNA coinvolti da queste variazioni “copy-number” possono essere lunghi da 1 migliaia (1 Kb) a diversi milioni di basi (Mb) comportando nel genoma inserzioni o delezioni che possono interessare anche molti geni tra loro adiacenti. Possono essere ereditati oppure causati da mutazioni “de novo”. In quest’ultimo caso possono tra gli altri essere causati da crossing-over ineguale dovuto alla presenza in una coppia di cromosomi di porzioni vicine con sequenze molto simili che possono indurre un accoppiamento errato e portare alle creazioni di inserzioni e delezioni⁷⁹.

Anche i trasposoni, i virus e i tumori possono originare variazioni di DNA copy-number con il risultato di alterare in positivo o in negativo il livello di espressione di determinati geni. Delezioni eterozigoti di un gene autosomico, possono anche far emergere nel fenotipo mutazioni recessive a causa della mancanza della controparte “wild-type”. Recenti studi sul genoma umano indicano che variazioni copy-number sono più frequenti del previsto, si stima ora che circa lo 0.4% dei genomi di popolazioni tra loro geneticamente distanti è interessato da variazioni copy-number^{80, 81}

2.1 Tecniche classiche e nuove tecniche

Variazioni copy-number (indicate come CNV) possono essere rilevate con tecniche citogenetiche come la **FISH** cioè “fluorescent-in-situ hybridization” (figura 2.2), oppure essere studiate con tecniche di **southern blotting** (una delle

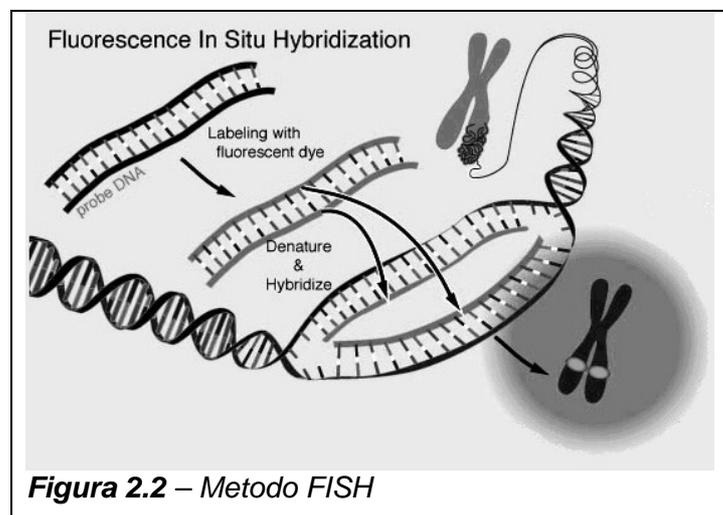


Figura 2.2 – Metodo FISH

prime tecniche usate ma certo di non facile esecuzione, vedi figura 2.3) o più agevolmente con l’**array-CGH** cioè l’ibridazione genomica comparativa basata su microarray (figura 2.4). Oltre a questi metodi, spesso di non facile esecuzione o dalle spese non irrilevanti, vi sono almeno due

altri metodi che sono stati via via perfezionati in un decennio, cioè la tecnica **MLPA** e la **real time PCR** di cui si parlerà nei prossimi paragrafi.

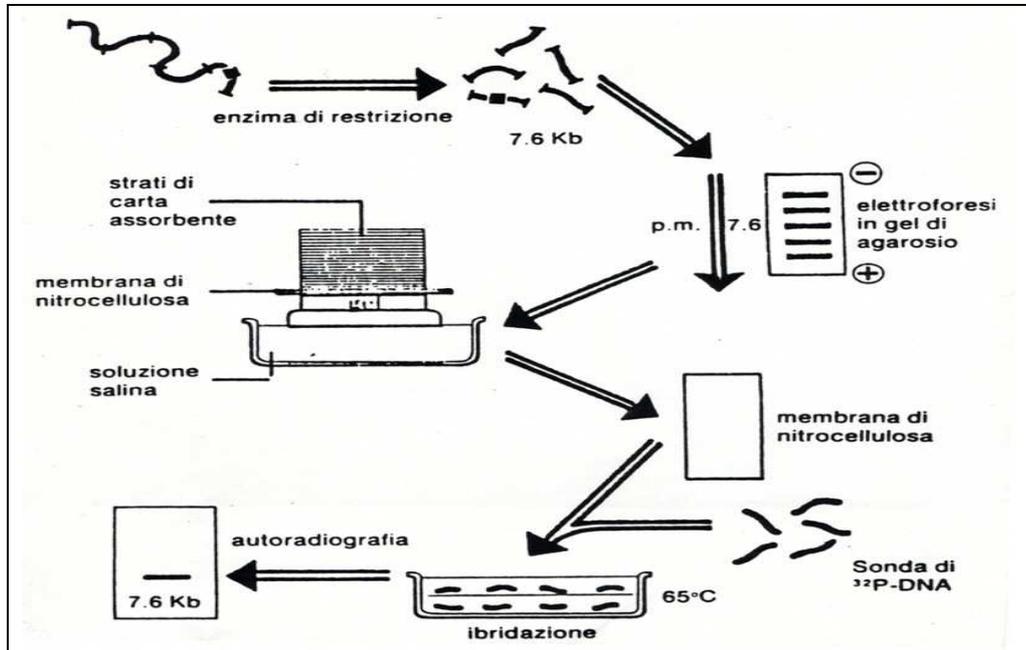
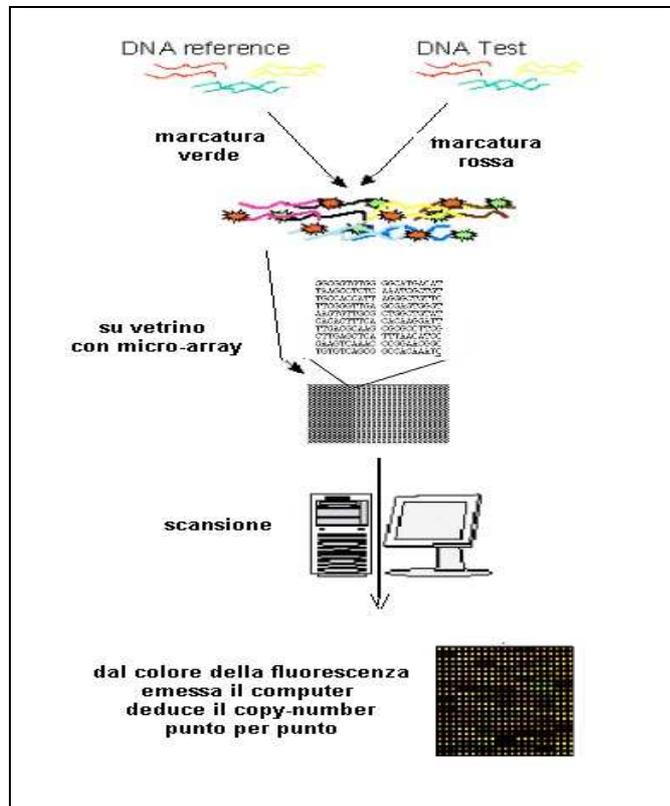


Figura 2.3 – Il metodo Southern-blotting o blotting di DNA

Figura 2.4 – Il metodo array CGH (ibridazione genomica comparativa con microarray).

Rappresenta una delle tecniche emergenti negli ultimi anni, anche se per ora abbastanza costosa.



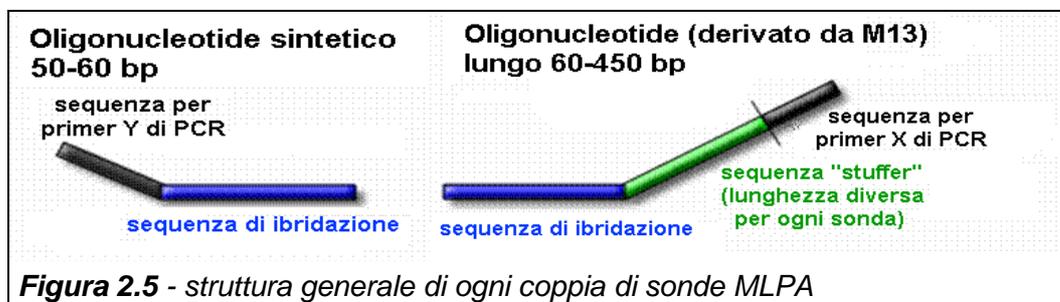
2.2 La tecnica MLPA

Il termine MLPA è l'acronimo di **multiplex ligation-dependent probe amplification**. Questa tecnica è abbastanza recente e il primo articolo scientifico⁸² in proposito risale al 2002

E' un metodo per stabilire il copy-number di 40-45 sequenze nucleiche in una sola reazione. Può essere applicato al DNA genomico (per trovare il numero di copie o quantificare la metilazione) ed anche all'mRNA. L'ultima fase sperimentale dell'MLPA è una PCR in 33 cicli, con l'amplificazione contemporanea di decine di siti con la stessa coppia di primers, riuscendo in tal modo a ridurre eventuali deviazioni tra le varie PCR e producendo amplificati distinguibili e quantificabili. Inoltre è un metodo abbastanza economico, veloce e che non richiede un'attrezzatura troppo elaborata (oltre ad un termociclatore è necessario almeno un sequenziatore anche di vecchio tipo per separare su gel o su capillare i frammenti prodotti).

Un ruolo fondamentale dell'esperimento è attribuito alla struttura delle sonde MLPA. Ogni bersaglio sul genoma necessita dell'impiego di 2 sonde così costituite (figura 2.5):

- un'estremità (**sequenza di ibridazione**) è complementare ad un sito bersaglio sul DNA genomico
- l'altra estremità è un **oligonucleotide** in cui l'ultima ventina di paia di basi è complementare ad un primer universale M13
- in una sola delle 2 sonde vi è anche una sequenza aspecifica avente lunghezza precisa (**stuffer sequence**) aggiunta solo per permettere il riconoscimento in base alla lunghezza dei frammenti marcati che si produrranno alla fine dell'esperimento.

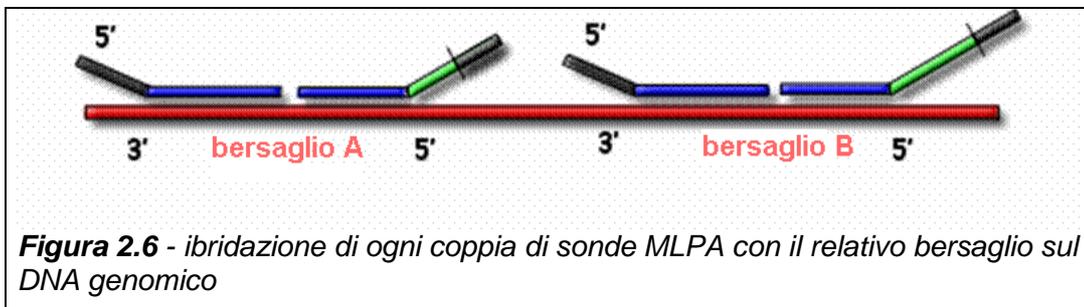


La tecnica MLPA prevede le seguenti fasi: 1) denaturazione 2) ibridazione 3) ligasi 4) PCR 5) separazione dei frammenti amplificati fluorescenti.

Denaturazione ed ibridazione

La **denaturazione** del DNA genomico ovvero la separazione della doppia eliche del DNA serve per permettere la successiva **ibridazione** specifica tra un'estremità di ogni sonda ed il sito bersaglio.

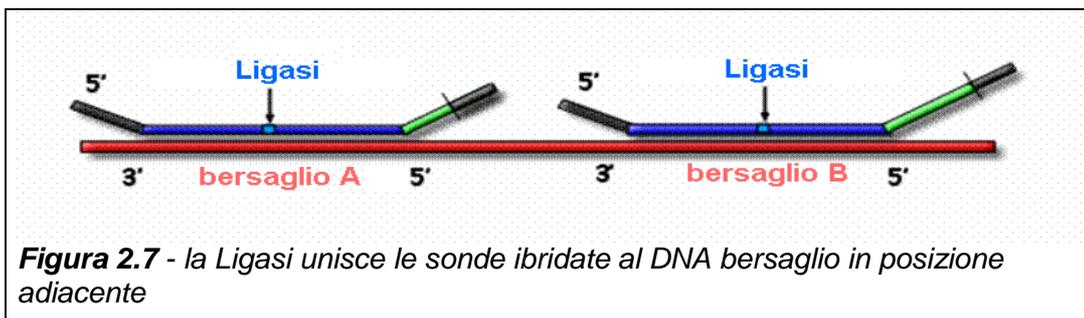
Nella figura 2.6 sono indicate due coppie di sonde che vengono ad interagire con due siti del DNA genomico anche tra loro molto distanti. Notare che in ogni coppia di sonde, le estremità si devono ibridare in modo consecutivo sul DNA genomico. Inoltre in ogni coppia di sonde vi è una "prolunga" molecolare (la stuffer sequence, in verde) dalla lunghezza distintiva.



Azione della ligasi

Se l'ibridazione ha avuto successo, una ligasi può intervenire e legare chimicamente tra loro le due mezze sonde connesse al sito target in un'unica sonda (figura 2.7).

L'enzima ligasi è inattivato per trattamento termico nei passaggi successivi



Notare che l'ibridazione e la ligasi permettono in pratica di rendere disponibile, nel mix di reazione successivo, una serie di frammenti dalla lunghezza variabile che hanno in comune le estremità (colorate in nero nella figura 2.7) che sono complementari alla stessa coppia di primers universali M13.

Amplificazione

Con l’aggiunta di una coppia di primers universali M13, di una polimerasi ed altri reagenti, può avvenire una reazione di PCR (figura 2.8), che nelle condizioni impostate, provvede a soddisfare 2 scopi:

- amplificare ad un adatto livello ogni tipo di frammento emerso dall’azione della ligasi
- permettere la rilevazione e la quantificazione grazie ad emissione di fluorescenza; infatti uno dei due primers M13 ha una marcatura fluorescente utile per la rilevazione in sequenziatori con tecnologia a gel o a capillare

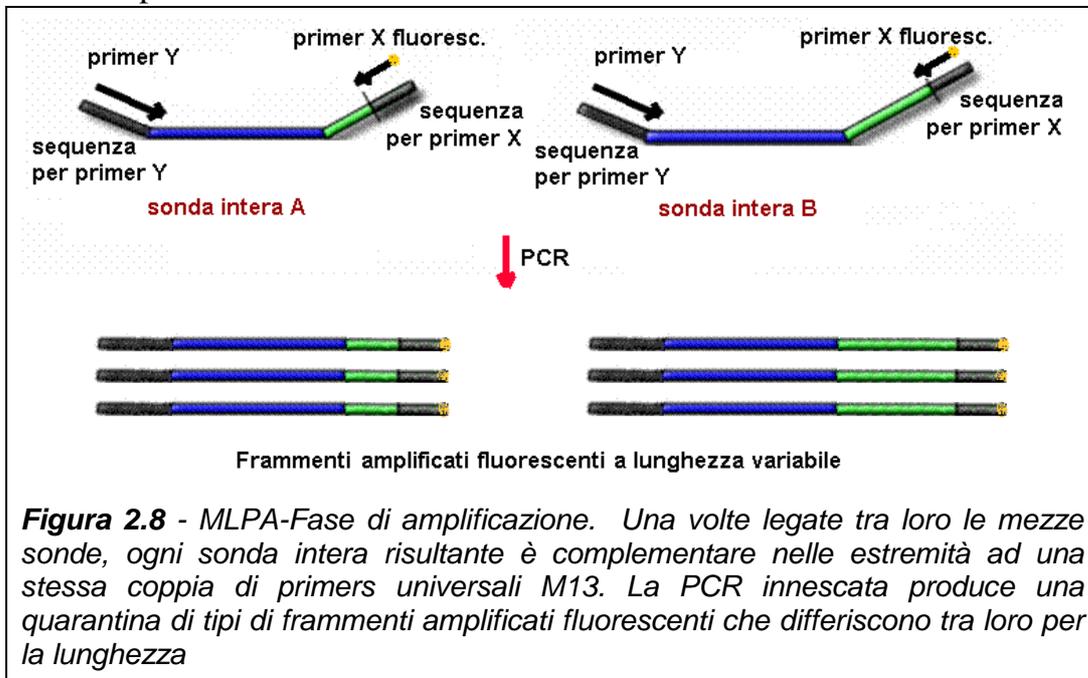
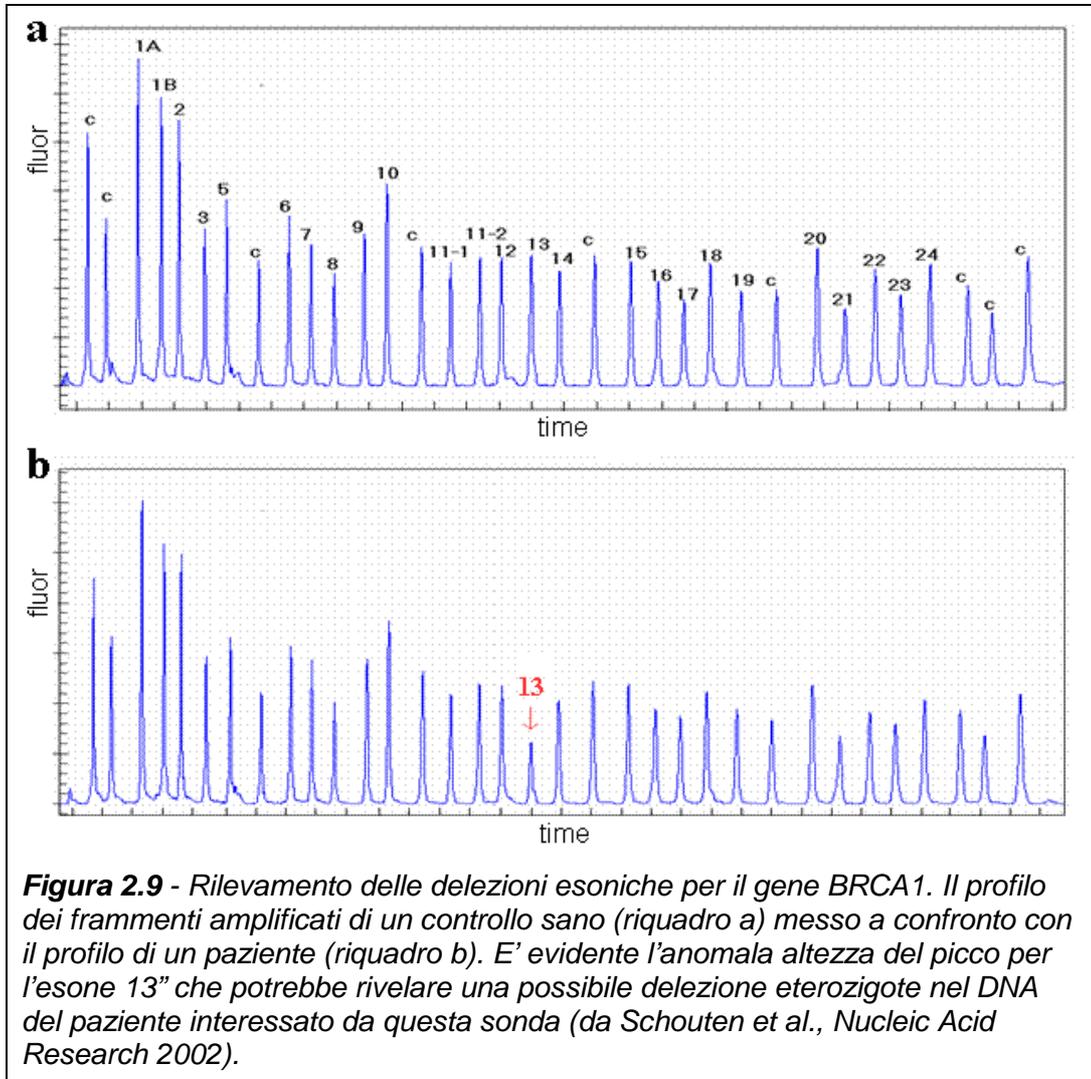


Figura 2.8 - MLPA-Fase di amplificazione. Una volta legate tra loro le mezze sonde, ogni sonda intera risultante è complementare nelle estremità ad una stessa coppia di primers universali M13. La PCR innescata produce una quarantina di tipi di frammenti amplificati fluorescenti che differiscono tra loro per la lunghezza

Separazione e quantificazione dei frammenti amplificati fluorescenti

L’ultima fase sperimentale è la separazione dei diversi frammenti amplificati, la cui lunghezza è connessa al sito bersaglio della sonda MLPA. I vari tipi di frammenti devono anche essere quantificati e normalizzati (vedere a questo proposito la procedura adottata nei metodi e risultati di questa tesi), tuttavia già “ad occhio” evidenti delezioni possono essere riscontrate per confronto del profilo di un campione e del profilo di uno

standard (che in certi casi può essere la media di una serie di campioni) come nella figura 2.9 .



2.3 Vantaggi e svantaggi della tecnica MLPA

I vantaggi della tecnica MLPA sono i seguenti:

- ✓ Rilevamento simultaneo del copy-number di una quarantina di sequenze, con riconoscimento preciso delle stesse; la stessa coppia di primers permette l'innesco della fase finale per tutte le sonde
- ✓ Metodica con poche fasi sperimentali che permette di visualizzare risultati in 24-48 ore
- ✓ Alto numero di campioni analizzabili

- ✓ Richiesta di un quantitativo di DNA iniziale relativamente basso (a partire da 20 ng, ma meglio con 100-300 ng) con risposta poco dipendente dalla quantità di DNA

A fronte di tali vantaggi lo sperimentatore deve mettere sulla bilancia i seguenti possibili inconvenienti:

- Risultati finali soggetti a vari fattori con possibile incertezza della diagnosi finale. La maggior fonte di incertezza è legata a una possibile degradazione del DNA, a poca purezza e a presenza di inibitori. Alcuni inibitori presenti nel sangue o nel liquido amniotico possono alterare i risultati. Per esempio alcune sonde (per es. quelle a basso peso molecolare) possono essere legati ed amplificati a livelli superiori rispetto ad altre sonde in altri campioni di DNA e rendere difficile l'interpretazione dei dati.
- I kit MLPA non sono ancora certificati CE e non sono utilizzati come prova ufficiale nella diagnostica medica. Normalmente la metodica è utile per uno screening veloce ma richiede la conferma sperimentale di altri approcci sperimentali più mirati e precisi
- L'MLPA può non rilevare tutte le triploidie
- Un kit di sonde MLPA è difficile da preparare “in casa” poiché sono necessari mezzi, abilità e tempo per la verifica sperimentale; in pratica si utilizza un kit preconfezionato (da MRC Holland) che può non soddisfare tutti i bisogni dello sperimentatore.

2.4 Altri impieghi dell'MLPA: studio di SNP e di siti metilati

Merita ricordare brevemente altri impieghi correnti della tecnica MLPA. Il primo si riferisce alla valutazione dei livelli di espressione di un gene. Ovviamente il metodo ricalca quello usabile per la rilevazione del gene copy-number con il passaggio preliminare dell'uso di una trascrittasi inversa.

Un secondo impiego (figura 2.10-a) è quello del riconoscimento di polimorfismi o mutazioni puntiformi, sfruttando il fatto che le sonde MLPA, si devono ibridare in modo preciso con il DNA genomico e solo in questo caso può agire la ligasi. In presenza di uno SNP, la sonda relativa

non è “cucita” dalla ligasi a partire dalla coppia di oligonucleotidi e alla fine mancherà il frammento corrispondente alla sonda stessa. Il terzo impiego è legato è la rilevazione di siti mutilati. Come si può notare nella figura 2.10-b appena dopo la ligation si fa agire un enzima di restrizione sensibile ai siti mutilati con la conseguenza di tagliare la sonda intera appena costituita a partire dalla coppia di oligonucleotidi. Anche in questo caso non si osserverà alcun picco in corrispondenza della sonda complementare al sito bersaglio. Quest’ultima applicazione può perciò essere utile per studi di imprinting genetico o per studiare se l’espressione di alcuni geni dipende dalla presenza delle cosiddette isole di metilazione CpG

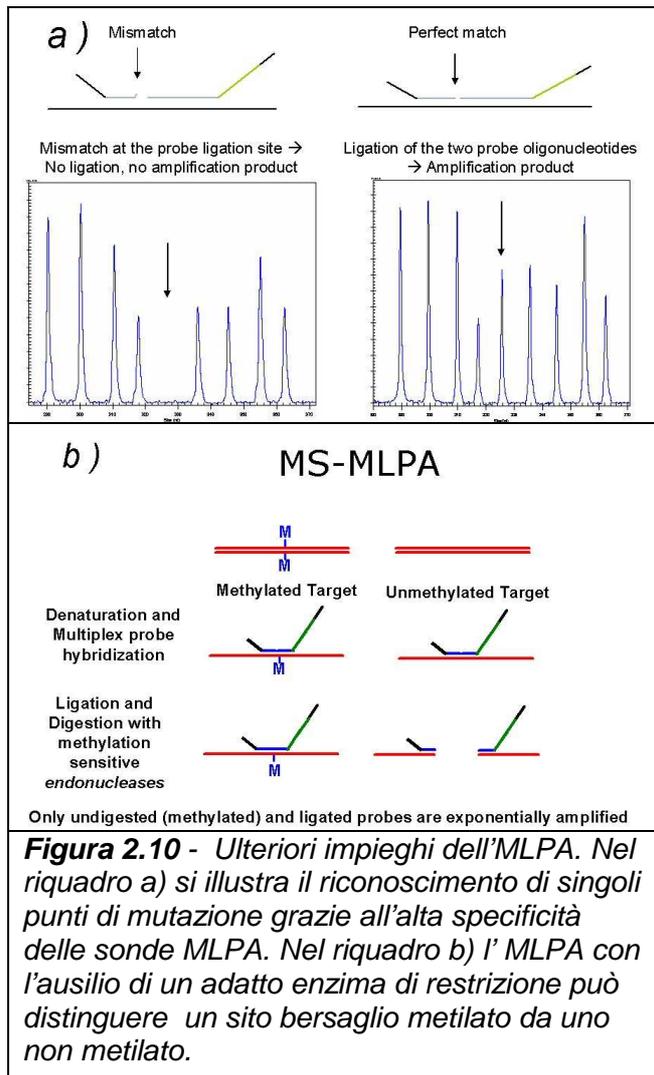


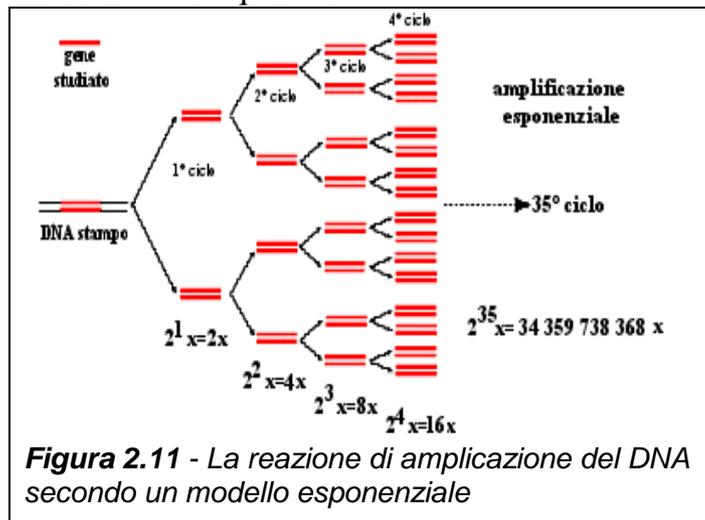
Figura 2.10 - Ulteriori impieghi dell’MLPA. Nel riquadro a) si illustra il riconoscimento di singoli punti di mutazione grazie all’alta specificità delle sonde MLPA. Nel riquadro b) l’MLPA con l’ausilio di un adatto enzima di restrizione può distinguere un sito bersaglio metilato da uno non metilato.

2.5 Il metodo quantitativo della Real Time PCR (qPCR)

La tecnica Real Time PCR detta anche PCR quantitativa o più brevemente qPCR fornisce un altro metodo per rilevare il copy-number di un frammento genico. La real time PCR è conosciuta anche per lo studio quantitativo dell’espressione genica e come tale necessita preliminarmente di mRNA poi retroscritto in cDNA grazie alla Reverse Transcriptase. La

successiva quantificazione grazie a PCR (eventualmente quantitativa) è detta RT-PCR ma la sigla RT si riferisce alla Reverse Transcriptase e non alla visualizzazione in Real Time. Comunque, per evitare malintesi, d’ora in avanti userò per esteso l’espressione “Real time PCR” oppure equivalentemente il più sintetico termine “qPCR”.

La quantificazione del numero di copie di DNA tramite qPCR si basa sulla conoscenza della cinetica dell’amplificazione che almeno inizialmente dovrebbe produrre da ogni singola copia di frammento di DNA un’ulteriore copia alla



fine di ogni ciclo della PCR (caratterizzato dalla denaturation, annealing ed extension) con un tasso di crescita di ciclo in ciclo pari a 2. Trattandosi di un meccanismo che si ripete ciclicamente, è caratterizzato da una crescita geometrica o esponenziale. (figura 2.11) per cui idealmente si può scrivere:

$$X = X_0 \times 2^C \quad (2.1)$$

X=numero di copie del frammento

X₀= numero di copie prima della PCR

C=numero di cicli

Tale cinetica è teorica per almeno due motivi. In primo luogo difficilmente per ogni ciclo partendo da un frammento otteniamo sempre un ulteriore nuovo frammento ma in media se ne ottiene una proporzione variabile tra 0 e 100%. Ciò equivale a dire che **l’efficienza della PCR** è spesso minore del 100% teorico ovvero in termini matematici:

$$X = X_0 \times (1 + E)^C \quad (2.2)$$

dove E=efficienza della PCR (compresa tra 0 e 100%)

In secondo luogo, la crescita **esponenziale** dei frammenti in una PCR avviene normalmente solo nei primi cicli, dopochè la diminuzione dei reagenti e l’aumento dei prodotti residui (es. pirofosfato) inibisce la sintesi

ulteriore del DNA. Ciò comporta prima una stabilizzazione della crescita (fase **lineare**) e poi un diminuzione della stessa fino ad arrivare ad un **plateau** (come ben sintetizzato nella figura .2.12)

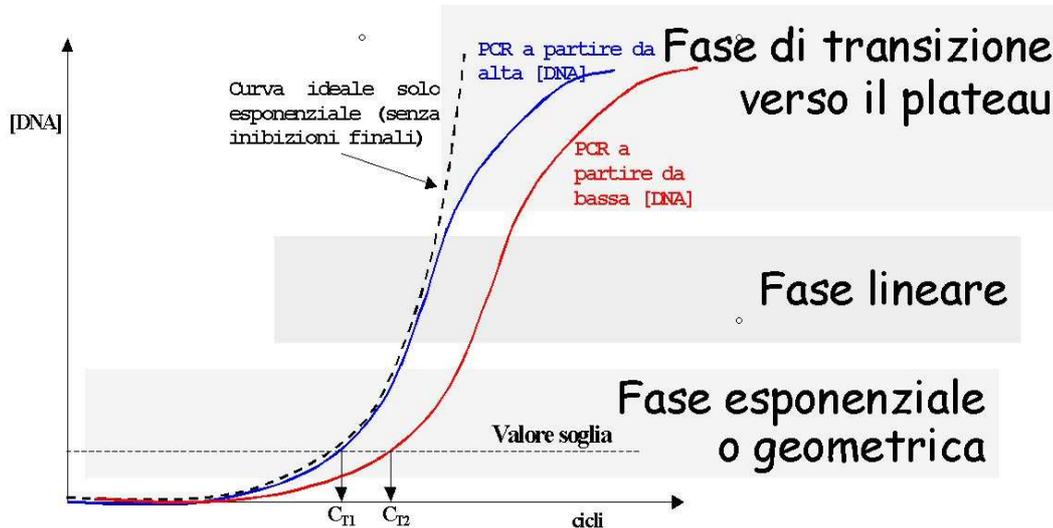


Figura 2.12 - curva di crescita della quantità del DNA con tendenza ideale (tratteggio nero) e due possibili curve reali (blu e rosso) in un grafico della quantità di DNA rispetto al numero dei cicli. E' mostrato inoltre il livello soglia impostato per un esperimento di qPCR a cui corrisponde per una curva, il relativo C_T = cycle-threshold

La presenza di metodi di rilevamento per la quantità di DNA sempre più efficaci (come si vedrà nel prossimo paragrafo) permette comunque di studiare la PCR grazie a strumenti “real-time” nella sua fase esponenziale. Lo strumento ci chiede di fissare un valore soglia (sull’asse delle ordinate, figura 2.12) per la quantità di DNA che ricada nella fase precoce-esponenziale della PCR. In corrispondenza di tale soglia, la macchina rileva il numero di cicli necessari per raggiungere il valore impostato cioè restituisce il C_T o **Cycle-threshold** (sull’asse delle ascisse). Il valore di C_T è un parametro importantissimo e caratteristico di ogni curva di amplificazione di DNA, due curve diverse hanno diversi C_T come nella figura 2.12. Se una curva origina da una quantità iniziale di DNA molto bassa rispetto ad un’altra curva (curva segnata in rosso rispetto a curva blu) lo strumento rileverà quantità di DNA più basse ed insieme la curva apparirà spostata verso destra. In pratica, se la quantità di DNA è bassa, occorreranno molti più cicli per raggiungere un valore soglia prefissato

perciò il C_T sarà maggiore. Perciò se X_0 è la quantità di DNA iniziale possiamo scrivere sinteticamente:

$$X_{0,curva1} < X_{0,curva2} \Leftrightarrow C_{T,1} > C_{T,2} \quad (2.3)$$

Inoltre se abbiamo due campioni di DNA che in qPCR fanno rilevare valori di C_T che differiscono tra loro di 1, allora il campione con C_T maggiore è approssimativamente ad una concentrazione dimezzata rispetto all'altro. E' da notare che queste disuguaglianze forniscono utili informazioni preliminari sulla quantità di DNA iniziale per un frammento genetico, più avanti si affronteranno gli aspetti quantitativi in modo rigoroso, ma già in sé questo approccio iniziale è di gran lunga più preciso del metodo usato talvolta negli anni '90 (soprattutto per valutare i livelli di espressione del DNA) che faceva uso di una PCR tradizionale semiquantitativa con pochi cicli seguita dalla visualizzazione dei frammenti corsi su gel. Infatti la detection di ampliconi su gel con etidio bromuro necessita di alte quantità di DNA e quindi la PCR rilevata dopo molti cicli è comunque già entrata in una cinetica complessa mista o peggio ancora nella fase di plateau che tende a livellare le differenze tra le varie PCR.

2.6 Fluorofori impiegabili nella qPCR

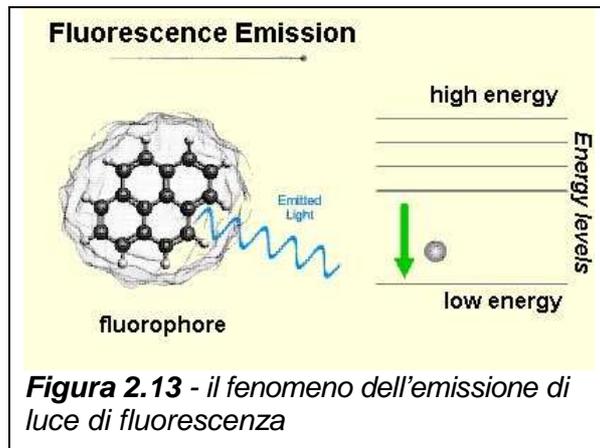
L'avvento della PCR quantitativa è stato permesso da due condizioni essenziali: la scoperta di fluorofori leganti il DNA via più efficienti e rilevatori di fluorescenza estremamente sensibili.

La **fluorescenza** è un fenomeno chimico-fisico di ri-emissione di luce da parte di adatte molecole (fluorofori) a seguito di assorbimento di luce. L'energia luminosa assorbita inizialmente deve essere con una certa lunghezza d'onda e frequenza per poter eccitare particolari elettroni di legame che passano ad un livello energetico superiore.

La diseccitazione in tempi rapidissimi (10^{-9} s.) di questi elettroni con la loro ricaduta al livello energetico base può avvenire con emissione di **luce di fluorescenza** a frequenza minore (figura 2.13) e lunghezza d'onda maggiore.

La fluorescenza viene sfruttata negli strumenti che eseguono la Real Time PCR. Infatti queste macchine rilevano indirettamente la concentrazione del DNA dal valore della fluorescenza di molecole che si legano ai frammenti

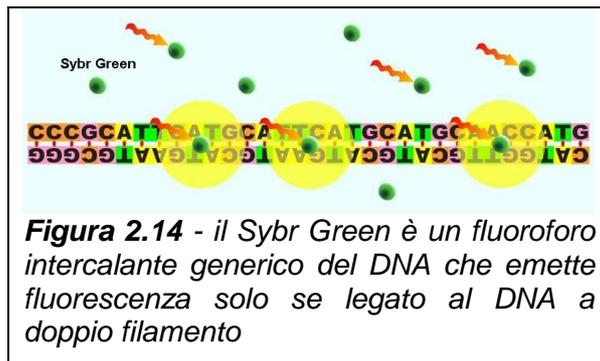
amplificati. La sensibilità data da nuovi fluorofori e dai detectors è migliaia di volte maggiore di quella data dall'etidio dopo una elettroforesi in agarosio permettendo valide misurazioni della quantità di DNA quando la PCR è ancora nella fase di crescita esponenziale.



I fluorofori usati in Real Time PCR sono di due tipi principali:

- ◆ **Intercalanti fluorescenti generici** del DNA (Sybr GreenI, Eva Green)
- ◆ **Sonde fluorescenti specifiche** per parti del frammento amplificato

Tra gli intercalanti generici è spesso menzionato il Sybr Green. Il Sybr Green si lega alla doppia elica del DNA (nel solco minore) con alta affinità e solo quando intercalato può assorbire luce a 494 nm ed emetterla a 521 nm (figura 2.14). Man mano



che procede la PCR, si ha la sintesi di nuove molecole di DNA a doppia elica alle quali può legarsi il fluoroforo. La macchina perciò, ciclo dopo ciclo rileverà un aumento della fluorescenza in corrispondenza delle fasi della PCR a bassa temperatura (nella denaturazione invece il DNA non lega il Sybr Green).

Il Sybr Green ha una lieve azione inibitrice sulla Taq polimerasi della PCR se usato ad alte concentrazioni, ma sono stati recentemente introdotti nuovi fluorofori come l'Eva Green con minori interazioni sulla PCR e maggior stabilità in soluzione. I vantaggi nell'uso degli intercalanti fluorescenti sono soprattutto legati al loro costo limitato che li rende utili per il settaggio di nuovi esperimenti e per la possibilità di controllare alla fine della PCR il profilo della curva di dissociazione del DNA. Un possibile svantaggio è invece che, in caso di PCR aspecifica la fluorescenza misurata non è solo

quella degli ampliconi ma anche di altri prodotti (compresi i dimeri di primers) senza alcuna distinzione. Inoltre usando tali fluorofori generici non si possono eseguire PCR in multiplex monitorabili in real time.

Le sonde fluorescenti specifiche per parti del frammento amplificato hanno generalmente una porzione specifica che si ibridizza con una porzione del frammento amplificato e un fluoroforo che emette luce in dipendenza di determinate fasi del ciclo della PCR.

Le più conosciute sonde fluorescenti sono le FRET-probes, le Taqman probes e le Molecular Beacon probes. In tutti questi casi la luce di fluorescenza è soggetta ad un effetto chimico-fisico detto effetto FRET ovvero Fluorescence Resonance Energy Transfer. L'effetto FRET si verifica se vi sono due fluorofori vicini in cui lo spettro di emissione di uno dei due (detto DONOR) ha un'ampiezza che include lo spettro di assorbimento del secondo (detto ACCEPTOR). In tal caso l'energia si distribuisce sull'acceptor che può emettere luce di fluorescenza senza essere stato interessato primariamente dalla luce iniziale. Se l'acceptor tuttavia è un QUENCHER, l'energia viene dissipata in modo non luminoso. E' da notare che l'effetto FRET agisce a corto raggio, i due gruppi perciò devono essere a distanze tipo 20-100 Å (1-5 nucleotidi).

Nelle figure 2.15, 2.16, 2.17 si indicano brevemente i meccanismi di azione per alcune sonde fluorescenti specifiche.

Vi sono anche altri tipi di sonde fluorescenti specifiche per ampliconi. In generale esse sono abbastanza usate nella Real time PCR perché permettono di ottenere un segnale che è un buon indicatore del numero di copie del frammento amplificato in quanto non vengono considerati gli eventuali prodotti aspecifici di PCR. Questi ultimi tuttavia dovrebbero comunque essere evitati il più possibile poiché abbassano l'efficienza della PCR. Un altro aspetto che rende apprezzabili tali sonde è la possibilità di eseguire esperimenti di qPCR in multiplexing. Il DNA dello stesso soggetto può essere amplificato contemporaneamente in vari loci nella stessa provetta usando sonde con fluorofori che emettono luce di diversa lunghezza d'onda. Se le condizioni di PCR sono ottimali, ciò permette un minor consumo di reagenti e una minor oscillazione dei dati sperimentali.

Figura 2.15 * - meccanismo d'azione delle FRET-probes: due oligonucleotidi con sequenza opportuna e con estremità fluorescenti, nella fasi di annealing della PCR possono ibridarsi con una sequenza dell'amplicone in posizioni adiacenti. E' a questo punto che il fluoroforo in posizione 3' agisce da Donor e l'altro in posizione 5' da Acceptor in un processo FRET con conseguente emissione di luce avente una certa lunghezza d'onda.

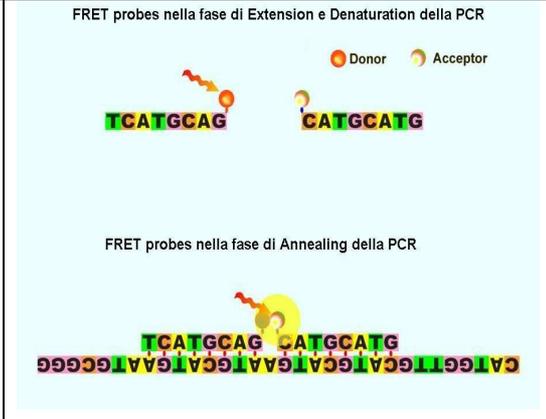


Figura 2.16 – una sonda Taqman è un oligonucleotide a cui sono legati un fluoroforo ed un quencher tra loro vicini. In tale conformazione (tipica della denaturazione e dell'annealing della PCR) la vicinanza del quencher impedisce l'emissione di fluorescenza. Rispetto alle FRET-probes, tali oligo hanno una maggior tendenza a rimanere ibridati all'amplicone, ma ciò comporta che quando la Taq polimerasi esegue l'extension, la sonda viene digerita grazie all'attività 5'-3' esonucleasica della Taq. A seguito di ciò, si rilascia in soluzione il fluoroforo che può emettere luce di fluorescenza

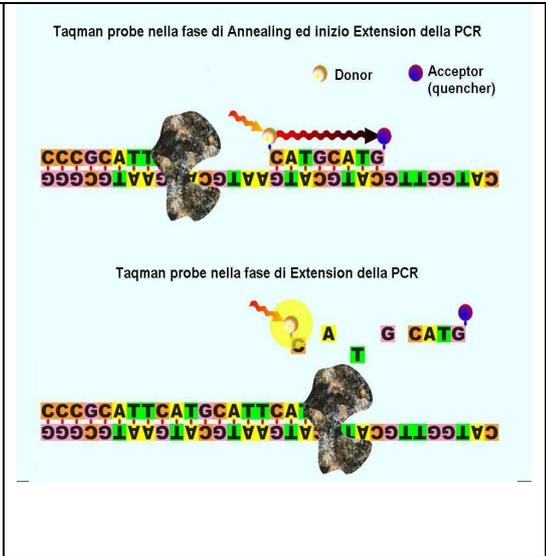
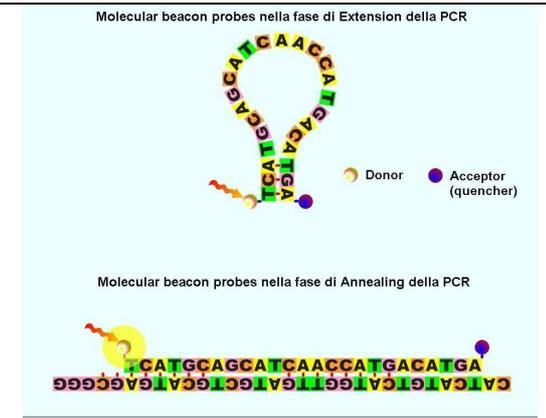


Figura 2.17 – una sonda Molecular-Beacon è un oligonucleotide progettato per essere sia specifico per un amplicone che per avere, normalmente, una conformazione a forcina. In tale conformazione un fluoroforo ed un quencher alle estremità vengono avvicinati e non si sviluppa fluorescenza. Nella fase di annealing della PCR, anche la sonda si appaia alla sequenza bersaglio e la nuova conformazione distesa permette lo sviluppo di fluorescenza. Quando la temperatura di alza nell'extension, la sonda si stacca dall'amplicone e riprende la conformazione a forcina e la fluorescenza cessa. Questo tipo di sonda ha il vantaggio di permettere un background oscuro di riferimento prima dello sviluppo di fluorescenza nella fase di annealing.



* Le figure presenti in questa pagina sono un riadattamento di figure tratte da una presentazione powerpoint del Dott. Perini (esperto Diatech prodotti Corbett Rotor Gene) che ringrazio

2.7 Correlazione tra serie di dati ed efficienza di qPCR

Allo scopo di conoscere l'efficienza di una PCR che condiziona la curva di crescita di una data PCR può essere necessario effettuare una serie di esperimenti con un campione di DNA diluito serialmente.

Nel caso di un buon settaggio della PCR e in assenza di fattori di disturbo come eventuali inibitori della PCR e formazione di aspecifici, si può trovare una correlazione lineare tra i C_T trovati e il logaritmo (in base 10 o in base 2) delle concentrazioni relative, come previsto da una elaborazione teorica

matematica⁸³ della curva di amplificazione del DNA e come esemplificato nella figura 2.18.

La retta di regressione che si ricava ha una pendenza negativa, ciò è intuitivamente prevedibile: se passiamo da una quantità di DNA bassa a una maggiore, ci vogliono meno cicli per raggiungere il valore soglia cioè si ha un C_T minore. Dal valore della pendenza,

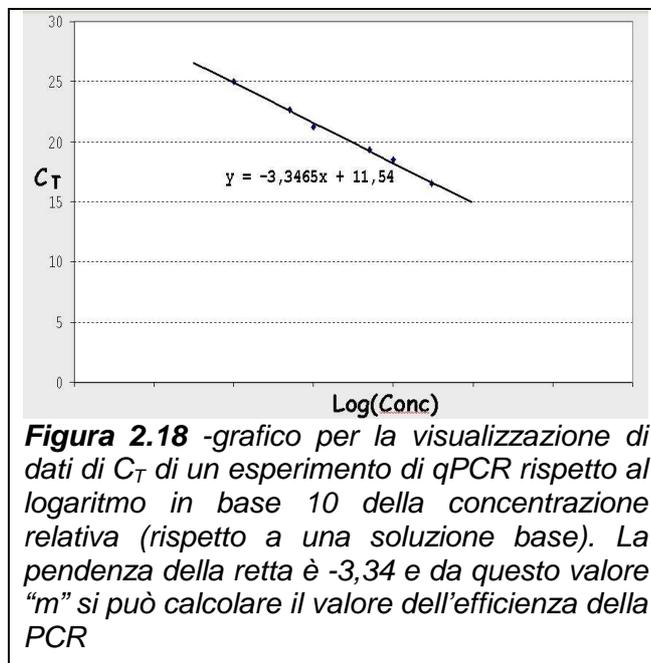


Figura 2.18 -grafico per la visualizzazione di dati di C_T di un esperimento di qPCR rispetto al logaritmo in base 10 della concentrazione relativa (rispetto a una soluzione base). La pendenza della retta è -3,34 e da questo valore "m" si può calcolare il valore dell'efficienza della PCR

ponendo che la retta di regressione sia:

$$Y = mX + q \quad (\text{con } Y = C_T, X = \text{Log}_{10} \text{Conc}) \quad (2.4)$$

si può ricavare^{84 85} che l'efficienza E della PCR è

$$E = 10^{-1/m} - 1. \quad (2.5)$$

Se invece, nel disegnare il grafico si è posto:

$$X = \log_2 \text{Conc} \quad (2.6)$$

allora nel ricavare il valore dell'efficienza E scriveremo:

$$E = 2^{-1/m} - 1 \quad (2.7)$$

Notare che la retta non può assumere valori indiscriminati di pendenza perché l'efficienza non può essere maggiore del 100%. Perciò si dovrà avere quanto segue:

- se la scala nell'asse X è espressa in Log_{10} allora $|a| > \text{Log}_{10} 2 = 3,32$
- se la scala nell'asse X è espressa in log_2 allora $|a| > \text{Log}_2 2 = 1$

Un valore di efficienza troppo alto può essere dovuto a vari motivi ma generalmente il più ricorrente⁸⁶ è l'impiego di pochi punti di diluizione seriale con concentrazione iniziale del DNA troppo elevata. In tal caso infatti è più probabile caricare in PCR delle molecole inibenti (derivanti dall'estrazione del DNA) ed i punti relativi a bassa diluizione (che sono sulla destra del grafico) hanno un C_T anormalmente elevato, abbassando la pendenza e innalzando l'efficienza. Inoltre la retta di regressione in questi casi ha un coefficiente R^2 troppo basso (i punti sono poco allineati).

2.8 Il metodo delle curve standard in qPCR

La qPCR si presta bene alla quantificazione di acidi nucleici amplificabili quindi sia DNA che RNA, quest'ultimo naturalmente previa azione della trascrittasi inversa che porta alla formazione di cDNA. La quantificazione può essere assoluta o relativa. Nella quantificazione **assoluta**^{87 88 89} si deve predisporre di una curva di calibrazione ottenuta tramite diluizioni successive di un campione standard a concentrazione assoluta nota. Poi il valore di C_T relativo al campione da quantificare (eventualmente ottenuto grazie a una serie di repliche per assicurare una maggior attendibilità) viene proiettato sulla curva di calibrazione ottenendo l'equivalente della quantità assoluta di DNA. Questo metodo di quantificazione è in sé relativamente semplice e preciso a condizione di avere un campione standard ben quantificato. A tal scopo possono essere usati campioni di DNA plasmidico⁹⁰.

In altri casi, tuttavia non è necessario ricorrere alla quantificazione assoluta, in quanto si ha la necessità di rilevare deviazioni del copy-number rispetto alla situazione di normalità e si può impiegare anche la **quantificazione relativa**⁹¹. Tale metodo è stato applicato per esempio nel determinare il numero di copie geniche di transgeni inseriti in piante OGM^{92 93} e può essere usato anche per valutare il livello di espressione relativa di un gene

(usando naturalmente una trascrittasi inversa) o il numero di copie di un gene autosomico o eterosomico. Nella quantificazione relativa è necessario considerare due curve standard di calibrazione costruite grazie a diluizioni seriali di un campione di controllo di cui non è necessario sapere una precisa concentrazione assoluta. Le due curve si riferiscono alla PCR quantitativa su un frammento di un **gene target** e di un **gene reference** (per il significato di alcuni termini tecnici, si consideri la tabella 2.1).

Grazie alla calibrazione del campione di controllo sul gene target si può proiettare sull'asse delle ordinate un valore di C_T trovato per un campione sperimentale ricavandone sulle ascisse il valore di concentrazione relativamente al campione di controllo standard (si veda la figura 2.19).

Tabella 2.1 – significato di alcuni termini usati frequentemente in real time PCR

campione sperimentale o treated	è il campione (di acido nucleico) di un eventuale paziente sotto esame
campione di controllo o standard	è il campione di un soggetto sano (talvolta è detto anche calibrator)
gene target	è il gene di cui vogliamo studiare il copy-number oppure i livelli di espressione
gene reference o endogenous	è un gene di riferimento con un copy-number per il DNA o l'RNA costante.

Questo valore tuttavia necessita di essere normalizzato; infatti può dipendere sia da un'eventuale alterazione presente nel soggetto sperimentale sia dalle condizioni dell'acido nucleico (la sua concentrazione, da quante cellule è stato estratto). A tal scopo si esegue una seconda curva di calibrazione sul controllo considerando il gene reference (sempre in figura 2.19).

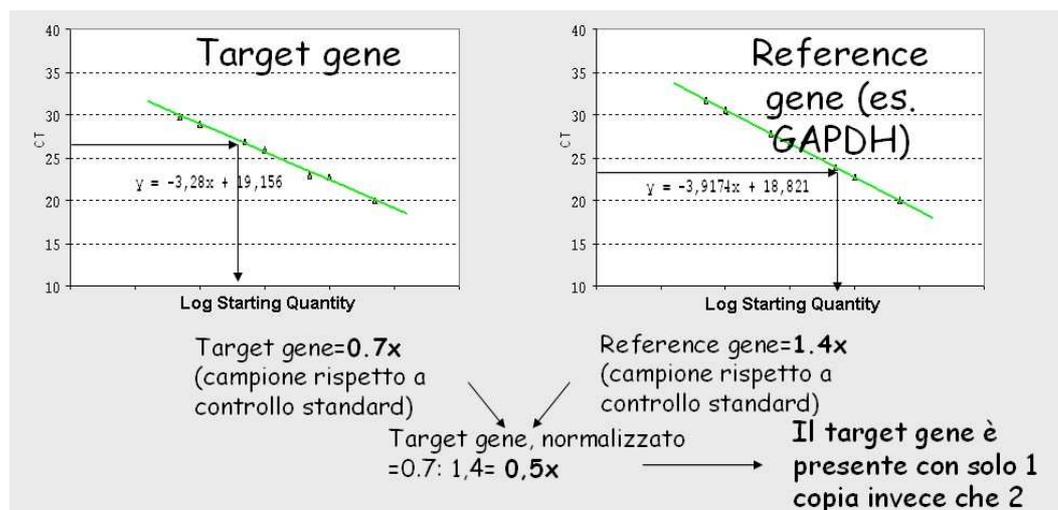


Figura 2.19 – esempio di applicazione del metodo delle 2 curve o rette standard (in verde), con i valori di C_T del campione sperimentale proiettati sulle curve.

A questo punto il valore del copy-number sperimentale normalizzato è dato dal rapporto tra il dato quantitativo ottenuto grazie alla prima curva e il dato quantitativo ottenuto con la seconda curva.

☞ E' da notare, per quanto riguarda la scelta del gene reference, che esso è preferibilmente un gene housekeeping (costitutivamente espresso) soprattutto per studi di espressione genica, mentre per studi di copy-number di frammenti genici può essere anche un qualunque gene autosomico o eterosomico avente una probabilità irrisoria di essere coinvolto in delezioni, duplicazioni e riarrangiamenti⁹⁴. Per quanto riguarda gli studi di espressione genica spesso vengono presi in considerazione i geni dell'actina e del GAPDH.

2.9 Il metodo comparativo del CT ($\Delta\Delta CT$) ed il metodo di Pfaffl

Il metodo comparativo del C_T è particolarmente vantaggioso perché, una volta che le condizioni della PCR sono ben settate, nell'eseguire la quantificazione non è necessario eseguire una curva di calibrazione del gene target e reference su campioni standard. L'assunto di partenza è che le efficienze di PCR del gene target e del gene di riferimento endogeno siano simili. Se ciò è vero, la quantità iniziale di DNA (o mRNA) in un campione sperimentale può essere studiato solo in base alle variazioni di C_T rispetto al campione di controllo. In realtà, almeno in fase di progettazione, occorre controllare **il valore dell'efficienza di PCR** nel gene target e reference (per esempio costruendo 2 curve standard)

Quando le due curve (una per il gene target e una per il gene reference) calcolate su un campione o standard sono 2 rette di regressione approssimativamente **parallele** e quindi con valori di efficienza simili (figura 2.20), si è nelle condizioni per applicare il metodo comparativo del C_T .

La prima trattazione del metodo prevede anche che le efficienze per il gene target e reference siano entrambe prossime al 100%, ovvero che il tasso di crescita del DNA di ciclo in ciclo sia 2.

Se $N_{0, Norm, tar}$ è il numero di copie iniziali del gene target normalizzate (sul gene reference e sul campione di controllo), e se indichiamo:

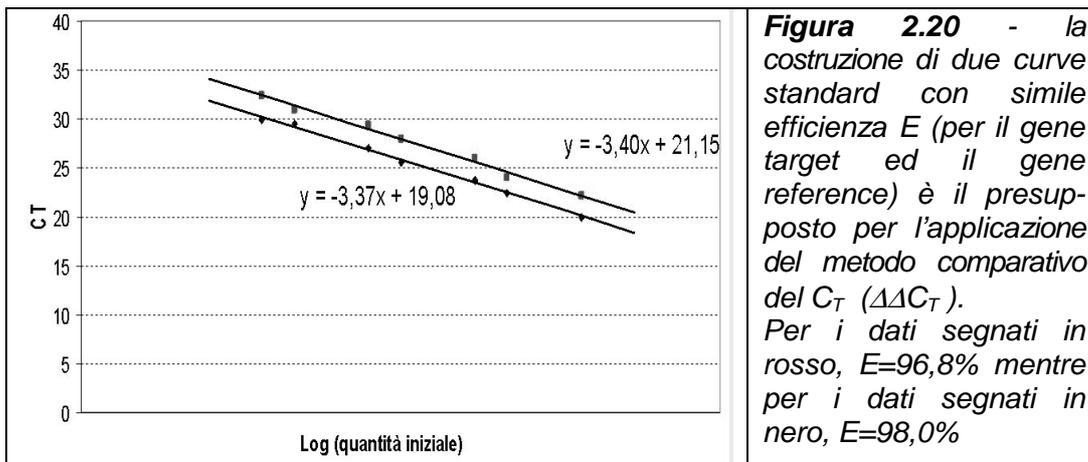


Figura 2.20 - la costruzione di due curve standard con simile efficienza E (per il gene target ed il gene reference) è il presupposto per l'applicazione del metodo comparativo del C_T ($\Delta\Delta C_T$). Per i dati segnati in rosso, $E=96,8\%$ mentre per i dati segnati in nero, $E=98,0\%$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T_{Experim (ref \rightarrow tar)} - \Delta C_T_{Control (ref \rightarrow tar)} \quad (2.8)$$

si può ricavare:

$$N_{0, Norm, tar} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (\text{Livak \& Schmittgen 2001}) \quad (2.9)$$

Questa è l'espressione classica del 2001 del **modello comparativo del CT** secondo **Livak & Schmittgen**⁹⁵. Molti articoli scientifici relativi alla quantificazione grazie a qPCR riporta di aver usato questo metodo.

Qualora l'efficienza della PCR per il gene target e reference sono simili tra loro senza raggiungere il 100% è preferibile usare una relazione di validità più generalizzata⁹⁰ cioè:

$$N_{0, Norm, tar} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_T} \quad (2.10)$$

Infine se le efficienze del gene target e reference sono tra loro diverse, si può usare o il metodo delle due curve standard o il seguente **metodo comparativo calibrato sulle singole efficienze di Pfaffl**⁹⁶:

$$N_{0, Norm, tar} = \frac{(1 + E_{tar})^{-\Delta C_T_{tar(control \rightarrow exper)}}}{(1 + E_{ref})^{-\Delta C_T_{ref(control \rightarrow exper)}}} \quad (2.11)$$

Note sui metodi alternativi per rilevare l'efficienza di qPCR

Malgrado la indubbia utilità dei metodi comparativi, che in certi casi possono far evitare la costruzione di curve standard, (procedura sperimentale relativamente lunga e possibile causa di errori) almeno in fase di prima progettazione è necessario rilevare comunque il valore dell'efficienza sia per il gene target che per il reference. Una erronea valutazione dell'efficienza può comportare un'errata applicazione di formule e valutazioni sperimentali inattendibili. Negli ultimi anni sono proliferati nuovi metodi proprio per valutare l'efficienze di qPCR senza l'impiego della classica curva di calibrazione. Alcuni si basano sullo studio dell'aumento della fluorescenza di ciclo in ciclo per un singolo campione cercando i parametri matematici con i quali la curva teorica approssima meglio la curva reale. Uno di questi metodi considera una serie di punti sperimentali a partire dal cosiddetto "takeoff point" fino al punto in cui la curva smette di crescere. Il takeoff point è il punto al quale la derivata seconda della fluorescenza (calcolata rispetto ai cicli) è arrivata al 20% del suo livello massimo ed indica la fine del rumore di fondo ed il passaggio nella fase esponenziale. Il calcolo dell'efficienza considerando il takeoff point è implementato facoltativamente anche nel software di analisi dei dati di macchine Corbett-Rotor gene, permettendo lo studio di una curva senza necessità di diluizioni seriali. Tale metodo sembra abbastanza efficace a patto però che il segnale della fluorescenza sia molto forte. La discussione è ancora aperta e alcuni lavori scientifici stanno tentando di trovare l'accuratezza ed i pro e contro dei singoli metodi come si nota nella tabella 2.2 tratta da uno di questi lavori scientifici.

Tabella 2.2- Efficienze di amplificazione determinate da vari metodi di analisi di dati di real-time PCR⁹⁷. Sono mostrate le medie aritmetiche \pm SD (deviazioni standard) e i coefficienti di variazione

Gene/Method	Standard curve	DART-PCR	LinRegPCR	Liu&Saint-exp
IL-1 β	0.998	1.033 \pm 0.061 (5.95)	0.950 \pm 0.074 (7.76)	0.974 \pm 0.033 (3.42)
IL-6	0.900	0.912 \pm 0.046 (5.05)	0.881 \pm 0.075 (8.51)	0.870 \pm 0.029 (3.35)
TNF- α	1.012	1.033 \pm 0.024 (2.32)	0.974 \pm 0.072 (7.45)	0.991 \pm 0.032 (3.32)
GM-CSF	0.918	0.978 \pm 0.044 (4.49)	0.932 \pm 0.063 (6.75)	0.898 \pm 0.013 (1.44)
ACTB	0.981	1.086 \pm 0.046 (4.21)	0.999 \pm 0.031 (3.10)	0.978 \pm 0.044 (4.53)
SDHA	0.967	1.072 \pm 0.052 (4.88)	0.980 \pm 0.064 (6.55)	1.017 \pm 0.044 (4.27)
HPRT	1.022	1.069 \pm 0.064 (5.95)	0.978 \pm 0.109 (11.1)	0.976 \pm 0.048 (4.49)

Capitolo 3

Scopo della tesi

Nell'Ospedale S. Orsola Malpigli, presso l'unità operativa di Pediatria (Cicognani) da oltre trent'anni vengono curati pazienti con problemi di accrescimento. L'approccio iniziale, anche in relazione alle conoscenze scientifiche dell'epoca, considerava la stima di dati clinici soprattutto legati all'auxologia e al dosaggio ormonale, poi quando necessario, si provvedeva (soprattutto dagli anni '90) alla somministrazione dell'ormone della crescita. Ci si era tuttavia accorti che non sempre la terapia ormonale sortiva gli effetti sperati soprattutto quando erano presenti deficit ormonali multipli. In seguito, il maggior impiego dei metodi radiologici e della risonanza magnetica ha permesso di correlare alcuni difetti rilevati nell'asse ipotalamo-ipofisario soprattutto a deficit ormonali ipofisari combinati. Man mano le conoscenze scientifiche si sono evolute e sono stati scoperti e studiati molti geni regolanti, con le loro proteine, lo sviluppo dell'ipofisi, la differenziazione dei 5 tipi di cellule secernenti, comprese le cellule somatotrope e l'attivazione dei geni per l'espressione di certi ormoni tra cui il GH. Queste scoperte hanno coinvolto l'impiego di molte metodiche sperimentali, mentre per la rilevazione delle mutazioni è stato essenziale l'impiego della PCR e del sequenziamento. Nell'ultimo decennio, oltre all'evoluzione di queste tecniche sono state impiegati nuovi metodi per lo studio di ampie delezioni, inserzioni, duplicazioni. Alcuni di questi fenomeni non sono ben studiabili con il sequenziamento. Per esempio le delezioni eterozigoti che interessano intervalli maggiori di 1000 bp possono non essere incluse completamente nell'intervallo di amplificazione e passare inosservate in un laboratorio che impiega solo il sequenziatore. Sulla base degli avanzamenti scientifici e tecnologici, anche nel laboratorio di Genetica Molecolare di Pediatria si è deciso di studiare le mutazioni di nuovi geni necessari per lo sviluppo dell'ipofisi sia con il sequenziamento che con nuove metodiche come l'MLPA e la Real Time PCR.

Con queste premesse, il dottorato di ricerca è stata impostato per il raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- ◆ sequenziamento di geni già analizzati nel laboratorio al fine di ampliare la conoscenza di nuove varianti alleliche mutate connesse a particolari problemi di crescita
- ◆ studio di 3 geni (POU1F1, LHX3, SOX3) non ancora considerati nella diagnostica del laboratorio ma potenzialmente coinvolti nella comparsa di deficit multiplo degli ormoni ipofisari con l'eventuale presenza contemporanea (per. LHX3 ed SOX3) di neuroipofisi ectopica.
- ◆ Settaggio per le condizioni di amplificazione e sequenziamento per i geni suddetti
- ◆ Studio di metodi alternativi di screening di eventuali mutazioni rilevate nel sequenziamento o segnalate negli articoli scientifici
- ◆ Impiego del metodo MLPA su 3 pazienti noti, allo scopo di rilevare la sensibilità del metodo anche nei riguardi di delezioni eterozigoti; allargamento dell'analisi ad altri nuovi pazienti
- ◆ Settaggio di un nuovo strumento per Real Time PCR (Corbett Rotor Gene 6000) da poco installato in laboratorio. Impiego della Real Time PCR per l'eventuale conferma dei dati sperimentali acquisiti dall'MLPA e per lo studio di altre anomalie CNV (copy-number variations)

Capitolo 4

Pazienti, materiali e metodi

Le indicazioni relative ai pazienti con deficit multiplo di ormoni ipofisari è stata fornita dal reparto di Endocrinologia Pediatrica dell'Ospedale S. Orsola-Malpighi (prof. Cicognani). Il database dei pazienti seguiti dal reparto (escludendo eventuali pazienti esterni) si compone 53 soggetti analizzati non solo per i deficit ormonali ma anche per altri caratteri fenotipici (in particolare di crescita) ed eventualmente per la conformazione dell'ipofisi tramite immagini di Risonanza magnetica (RM).

Di questi pazienti, 16 mostravano deficit apparente solo di GH ma la presenza di altri sintomi e i referti di RM hanno portato a includerli nell'ambito dei soggetti panipopituitarici. Tra le malformazioni che hanno fatto pensare a casi di CPHD vi erano l'adenoipofisi ipoplasia o iperplasia, il peduncolo assottigliato, la neuroipofisi ectopica. Per questo motivo, 15 di 16 soggetti erano già stati analizzati per la presenza di eventuali mutazioni in regioni codificanti dei geni HESX1 o PROP1.

Per i rimanenti 37 soggetti, sono stati osservati deficit ormonali non solo di GH ma anche di almeno uno dei seguenti ormoni: gonadotropine (FSH e – LH), prolattina (PRL), ormone tireotropo (TSH), ormone adrenocorticotropo (ACTH). Perciò, in questi casi, l'inclusione nella casistica CPHD è stata più scontata. Anche in questi pazienti si è osservata un varietà di conformazioni dell'ipofisi o di strutture ad essa vicine, variazioni di spessore dell'adenoipofisi, del peduncolo, neuroipofisi ectopica, sella turcica vuota ed anche SOD (displasia setto-ottica). Nei pazienti censiti si è rintracciata un'ampia frequenza di queste irregolarità di struttura e solo in 5 casi su 37 la morfologia era nella norma.

A partire da questo database, si è tentato di effettuare un'indagine genetica sui pazienti i cui deficit ormonali e sintomi connessi essere connessi a una mutazione genetica per i geni già studiati in laboratorio (HESX1, PROP1) o per i nuovi che si è deciso di mettere a punto (POU1F1, LHX3,

SOX3). Nell'impossibilità di poter effettuare il sequenziamento diretto per tutti questi geni (sia per praticità che per motivi economici) si è indagato su alcuni pazienti per alcuni tipi di polimorfismi o mutazioni impiegando anche altre tecniche come il metodo CAPS, l'MLPA e la real time PCR. Verranno quindi indicati il numero dei pazienti e la loro patologia in corrispondenza della metodica sperimentale impiegata.

Il corredo delle analisi effettuate comprende anche il sequenziamento diretto di 8 pazienti affetti da deficit isolato di GH studiati per il gene GHR ed il sequenziamento di 2 pazienti per possibili mutazione nel gene THR. Infine sono stati rianalizzati con MLPA e con real time PCR alcuni pazienti "storici" (2 fratelli insieme al padre) nei quali già si era rintracciata una delezione omozigote o eterozigote nel gene del GH.

4.1 Metodica usata per il sequenziamento diretto

Per una questione di sintesi, nel caso di procedure generali adottate da molti laboratori si descrivono solo le fasi salienti necessarie per il sequenziamento diretto, indicando i kit di laboratorio impiegati e la loro azione in breve.

Estrazione di DNA genomico

Il materiale di partenza è stato il sangue i cui leucociti hanno fornito le cellule da cui estrarre il DNA. Nel sangue si rinvengono parecchi inibitori della reazione di amplificazione (PCR) quindi si è impiegato un kit commerciale che finora ha dato buoni risultati (*Wizard Genomic DNA Purification Kit-Promega*). Il kit permette la lisi delle membrane, la precipitazione e l'eliminazione delle proteine cellulari e, a seguire, la precipitazione anche del DNA grazie ad isopropanolo. Infine il DNA è risospeso in soluzione acquosa (si può usare anche acqua sterile).

Il DNA genomico poi è quantificato tramite spettrofotometro (SmartSpec 3000 Biorad) poi è conservato in freezer a -20°C . Aliquote diluite a 50 ng/ul sono tenute in frigorifero per l'impiego fino ad alcuni mesi.

Amplificazione del DNA (PCR) e purificazione dei frammenti

La PCR (=Polymerase chain reaction, reazione a catena della polimerasi) è un processo innescato da una coppia di primers la cui sequenza può essere tratta dalla rete (articoli e banche dati) o ricavata per progettazione ex-novo (come illustrato nei paragrafi seguenti). Con la PCR, attraverso 35-40 cicli si possono **amplificare** specifici frammenti di DNA, solitamente tra 200 e 1200 bp per gli scopi del sequenziamento.

I prodotti di PCR sono poi **separati** e visualizzati su gel di agarosio (all'1,5% fino a 3% in percentuale peso su volume) colorato con Gel Red (nuovo fluoroforo, meno nocivo del vecchio Bromuro di Etidio). Se i frammenti amplificati prodotti sono specifici, possono essere **quantificati** o per confronto con le bande di una ladder quantificata o per confronto con altri frammenti che sono già stati sequenziali con successo. Quindi si può procedere con la **purificazione** per rimuovere l'eccesso di dNTPs e primers non incorporati in modo da non interferire con il successivo sequenziamento. Il protocollo più semplice (tra l'altro usato in molti laboratori) prevede l'aggiunta di Exosap-IT (USB) e l'incubazione a 37°C per 15 min, seguita da un'incubazione a 80°C per 15 min per inattivare gli enzimi presenti nel Kit

Cycle sequencing, purificazione e corsa elettroforetica

La reazione di sequenziamento detta cycle-sequencing è stato eseguito con il metodo dei dideoossi di Sanger impiegando reagenti e strumenti della Beckman coulter (***Ceq DTCS-quick start kit***). La reazione è simile a una PCR ma avviene con un solo primer, inoltre il mix sono presenti anche dei nucleotidi fluorescenti particolari che, se incorporati, portano alla terminazione istantanea della polimerizzazione. In questa reazione una delle fasi critiche è il calcolo della **corretta quantità** di frammenti amplificati e purificati da usare.

Più un frammento da sequenziare è lungo e maggiore è la quantità in ng che deve essere usata. Considerando gli intervalli (in ng) minimi e massimi consigliati dalla Beckman per frammenti di diversa lunghezza, la quantità di DNA usabile può essere data approssimativamente dalla formula:

$$\text{quantità (in ng)} = \text{lunghezza(in bp)} \times 3,15/100$$

Trovata la quantità e sapendo la concentrazione, si risale al volume della soluzione di DNA da usare.

Allego anche il protocollo usato per la reazione di sequenziamento poiché nel laboratorio di Genetica molecolare di Pediatria è leggermente diverso da quello consigliato dalla Beckman:

- inserire il volume di DNA richiesto, poi portare al volume finale di 10 μ l con acqua sterile
- denaturare ad almeno 86°C per 3 min
- aggiungere 1 μ l di primer (5 picomoli)
- aggiungere 9 μ l di DTCS prediluiti (4ul DTCS+5ul di acqua)

A questo punto i campioni possono essere caricati sul termociclatore. I cicli usati dipendono dalla temperatura di melting dei primers per cui saranno illustrati a proposito dei singoli geni.

I nuovi frammenti fluorescenti ottenuti con la reazione di sequenziamento devono poi essere **purificati** per evitare l'interferenza di nucleotidi fluorescenti non incorporati. E' stato usato un kit commerciale (*Seq-Prep kit GD400 –Genedia*) che permette la precipitazione in etanolo 95% dei frammenti, una serie di lavaggi in etanolo 70%, e la risolubilizzazione in 40 μ l di buffer SDS.

I frammenti di sequenziamento sono poi caricati e separati con **elettroforesi capillare** (Beckman CeQ8000). Al termine della corsa un programma del sequenziatore restituisce la sequenza in un formato che può essere gestito dal programma **Chromas**. Le sequenze con il relativo elettroferogramma possono essere stampate per permettere anche all'occhio dello sperimentatore di cogliere eventuali punti dubbi tra cui potenziali polimorfismi o mutazioni in eterozigosi.

4.2 Settaggi per la PCR ed il sequenziamento dei nuovi geni studiati

Quasi tutti i primers per l'amplificazione ed il sequenziamento di POU1F1, LHX3 ed SOX3 sono stati progettati ex-novo con tale modalità:

- Studio di articoli riguardanti tali geni ed informazioni su OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) e sulla sequenza genica su banche dati (per esempio quella dell'NCBI).

- A partire dalla sequenza genica, rinvenimento delle porzioni esoniche e progettazione di primers i cui siti di accoppiamento siano ad almeno 50-60 bp a monte o a valle di un esone (per esigenze di sequenziamento affidabile su tutto l'esone).
- Impiego dei seguenti software per progettare i primers e verificare la loro idoneità: **primer3** (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) **oligo6** (software in dotazione in laboratorio) e **OligoFaktory** (<http://oligofactory.lanevol.org/index.jsp>). Tali programmi restituiscono anche dei parametri tipo un punteggio legato alla stabilità termodinamica di eventuali strutture indesiderate (figura 4.1) come le "arpine" (conformazioni ad uncino dei singoli primers con zone di auto-ibridazione) e gli omo-dimeri ed etero-dimeri di primers (dovuti ad accoppiamento parziali in posizione 3' tra primers uguali o diversi). Inoltre il programma primer3 fornisce anche utili dati sulla temperatura di melting impiegando la formula "nearest-neighbor" di Breslauer⁹⁸ *et al.*, (1986), permettendo così, per quanto possibile, di uniformare le temperature di annealing per le PCR di uno stesso gene.

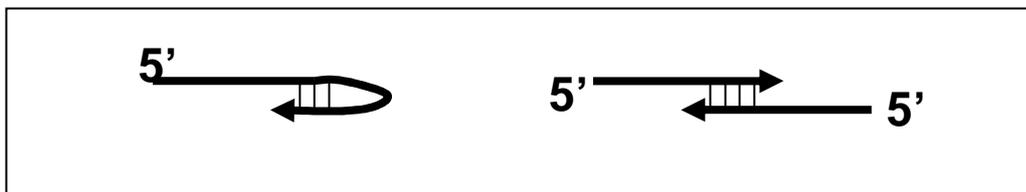


Figura 4.1 - conformazioni indesiderate per i primers di PCR dovute ad accoppiamenti impropri tra porzioni di primers; a sinistra la conformazione ad arpina o uncino, a destra le interazioni che possono originare dimeri di primers

- Una volta ricevuti i primers corrispondenti alla sequenza desiderata, segue il settaggio fine delle condizioni di PCR. A partire da alcune condizioni generali (buffer 1x, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0,2 mM, primers 0,25uM, TaQ 1,25U/50 ul, DNA stampo 50-100 ng) si effettua la PCR usando come temperatura di annealing quella di melting dei primers abbassata di un paio di gradi. Se la PCR non avviene si può abbassare la temperatura di annealing, se viene aspecifica, si alza la temperatura o si agisce sul MgCl₂ (talvolta anche sul buffer) o si abbassano i primers (per usare le soluzioni più usate) . Il settaggio a volte è banale, in altri

casi può essere estremamente laborioso anche perché per essere sicuri dell'effetto di una modifica bisogna variare un parametro alla volta (come d'altronde prevede un metodo scientifico). In certe situazioni poi può essere utile aggiungere additivi, cambiare TaQ o addirittura riprogettare nuovi primers.

PCR e sequenziamento per i geni POU1F1 e LHX3

Per il gene **POU1F1**, dopo la verifica di corretta sequenza di 2 soggetti controllo, sono stati segnalati 6 pazienti da analizzare con sequenziamento. I primers usati per i frammenti esonici amplificati sono indicati nella tabella 4.1 mentre per le condizioni chimiche e termiche si veda la tabella 4.2 .

Per la reazione di sequenziamento possono essere usati tutti i primers indicati per la PCR con una preferenza per Pit-1F, Pit-2F, Pit-3R, Pit-4R (Pit-4R=ACCCCTCAAACCTCCTGCT), Pit-5R, Pit-6R. Le condizioni termiche usate con successo (reagenti Beckman) sono state: 30 cicli (96°C 20s; 55°C 20s-60°C 4min).

Per il gene **LHX3**, dopo la validazione del metodo su due soggetti di controllo, è stato indicato un solo paziente per il sequenziamento. Tale paziente rivestiva un certo interesse poiché era stato già indicato con MLPA un'ampia delezione eterozigote per questo gene (delezione da confermare con altra tecnica) perciò un'eventuale mutazione recessiva trovata con sequenziamento avrebbe potuto avere un grande significato. Per motivi probabilmente economici (il sequenziamento è una tecnica costosa) non sono stati segnalati altri pazienti durante il mio dottorato.

I primers usati per amplificare i frammenti esonici sono segnati nella tabella 4.3 mentre le condizioni chimiche e termiche sono indicati nella tabella 4.5 .

Per il cycle-sequencing possono essere usati tutti i primers indicati per la PCR con una preferenza ed eventualmente altri 3 primers inseriti in coda nella tabella 4.3. Alcune procedure sperimentali consigliate per il sequenziamento sono indicate nella tabella 4.6 .

Tabella 4.1 – Primers usati per la PCR sui frammenti esonici del gene POU1F1

Frammento	lunghezza	Primers e seq. (5'→3')
Ex1	620 bp	Pit-1F ATTTCTCCCTTCCCCTCCAT Pit-1R TTTATTTGGCATGTTGGCTTT
Ex2	304 bp	Pit-2F CCAGTCCCATCTATTTTGTCTTT PIT-2R CAGGAAACAAGAAGTGGTGATTT
Ex3	465 bp	Pit-3F TGGGCTAAGTCAGGC AAAAC Pit-3R TTTGGAGGATTTCCATAACGA
Ex4-5	1157 bp	Pit-4F CAGATTTGTGTGACAATGAACCA Pit-5R GGCCTCCCAATTCACCTTA
Ex6	586 bp	Pit-6F TTCAACCTACCTTAATTTTGAGCTG Pit-6R TGTCTGCGTGTGTGTGAGAA

Tabella 4.2 – Condizioni chimiche e termiche per le amplificazioni di tutti i frammenti POU1F1

Reagenti	Condizioni finali	Settaggio termico
DNA genom	75 ng (1.5 µl)	94°C 2 min
Buffer Roche	1x (con MgCl ₂ 1,5mM)	94°C 30s
MgCl ₂ aggiuntivo	0,4mM	62°C-0.3°/cyc 30s
dNTPs	0,2 mM (ciascuno)	70°C 73s
Primer For	0,2 µM	(ripeti 11x tot.)
Primer Rev	0,2 µM	94°C 25s
Taq Roche	1,1 U	58.5°C-0.3°/cyc 28s
Volume tot	25 µl	70°C 73s
		(ripeti 28x tot.)
		70°C 5 min
		14°C ∞

Tabella 4.3 - Primers usati per amplificare i frammenti esonici del gene LHX3. Questi primers sono stati progettati ex-novo, salvo i primers indicati con il suffisso p (da Pfaeffle RW et al. 2007-JCEM)

Frammento	Lunghezza (bp)	Settaggio termico PCR (A/B)	Primers e seq. (5'→3')
Ex1a	382	A	ex1a-Fp CAACCCAGCCAGGGAGG ex1a-Rp CTTGCCGTTTCTGTCCTCAG
Ex1b	443	A	ex1b-F CGCTCAGAGTCCGAGTGG ex1b-R CGCCCAGATCCTCTAGCTCCT
Ex2	305	A	ex2-F GGCTTCACTGCCTCCTGGTCTAC ex2-R CTTGGTGATTGTGAGGGGAGGA
Ex3	337	A	ex3-F CTCTCTCCAACCCGCTCG ex3-R CGTGGCCTCAGCCCCATT
Ex4-5	511	B	ex45-F CTGCCGCGCCTCACCGCTC ex45-R CTCCCTGGGACCCCTGCGA
Ex6	553	B	ex6-F GTGGAGGGCAGGCGCTGACT ex6-R CTGGCCCCACTTCCTCGGAAAC

Tabella 4.4 – Primers usabili per il cycle sequencing dei frammenti esonici di LHX3. I primers indicati con il suffisso **p** erano citati in letteratura (da Pfaeffle RW)

Primers da PCR	tutti	Altri primers usabili	ex4-Rp GGCGGTTCTGGAACCAAACC ex5-Fp AGAGCGCTTACAACACCTCG ex6-preR TGCTCCCCGTGGATAGGTCA
----------------	-------	-----------------------	---

Tabella 4.5 - Condizioni chimiche e termiche per le amplificazioni di tutti i frammenti LHX3. Notare che, a seconda della coppia di primers bisogna usare il settaggio termico **A** oppure **B**. La polimerasi usata è stata la GC-Rich (Roche)

Reagenti	Condizioni finali	Settaggio termico
DNA genom	75 ng	1) 95°C 5 min
GC Buffer	1x (con MgCl ₂ 1,5mM)	2) 95°C 30 s
MgCl ₂ aggiuntivo	No	3) 60°C 27s (sett.A) o 66°C 27s (sett.B)
GC resol.solut.	0,5M	4) 72°C 40s
dNTPs	0,2 mM (ciascuno)	5) go to (2) 39x tot.
Primer For	0,3 µM	6) 10°C forever
Primer Rev	0,3 µM	
Enzyme	1,0 U (su 25 µl)	
Volume tot	25 µl	

Tabella 4.6 – Procedure sperimentali consigliate per il cycle sequencing e la corsa elettroforetica su Beckman CEQ8000

Fasi	Metodo	Note
Denaturazione	95°C 3 min	
Settaggio cycle seq.	T den=96°C 20s T ann=56°C 20s T ext=61°C 4 min	
Settaggio Ceq8000	Capillari T=52°C	

Condizioni di amplificazione e sequenziamento del gene SOX3: un caso esemplare

Il gene SOX3 ha 3 caratteristiche che lo rendono difficilmente amplificabile e sequenziabile:

- ha un alto contenuto di GC, considerando intervalli da 20-25 bp si trovano spesso percentuali di GC del 90%.
- è disposto in un solo esone con 1341 bp, normalmente in geni ad altro contenuto di GC la presenza degli introni permette di trovare intervalli di “ancoraggio” per i primers a minor percentuale di GC
- appartiene ad una famiglia di geni con alta omologia di sequenza per il gene SRY, quindi i primers disegnati devono essere altamente selettivi.

Avendo trovato un articolo relativo a SOX3, molto citato, di Woods et al.³⁵, Dattani *et al.*- Am. J. Hum. Genet. (2005) si è pensato inizialmente di impiegare i primers e suggerimenti di PCR come descritti. Nonostante ciò,

l'amplificazione è stata più impegnativa del previsto come si può evincere dalle seguenti fasi sperimentali:

1. Impiego iniziale delle 5 coppie di primers suggerite, di Taq polimerasi TTH (Epicentre) o alternativamente Dynazyme ext (Finenzyme) che si è visto lavorare molto bene in presenza di betaina, additivo suggerito dall'articolo. Anche lavorando a temperature e condizioni diverse, si riuscivano ad amplificare abbastanza bene i frammenti I, II, III ma mai i frammenti IV e V. Si è notato tuttavia che aumentando molto la concentrazione dei primers del IV e V frammento, la polimerasi riusciva ad amplificare, sebbene in modo aspecifico. L'uso di DMSO non ha migliorato la specificità, anzi ha represso l'efficienza della reazione.
2. La rilevazione che i primers dell'articolo avevano una T_m (temperatura di melting) relativamente bassa rispetto alla percentuale di GC del gene, ottenuta con una sequenza relativamente corta (18-19 bp) ha indotto alla progettazione di nuovi primers con 20-22 bp per aumentare la specificità dell'interazione degli stessi al DNA stampo. La progettazione non è stata semplice poiché molte porzioni del gene sono "out of limits" per l'aggancio di primers evitando nel contempo conformazioni sfavorevoli degli stessi. In particolare con una coppia di primers (SOX3-1Fnew e SOX3-5Rnew) si è riusciti anche ad amplificare in una sola volta tutta la regione codificante del gene, seppur con un'altra banda aspecifica.
3. Dopo vari tentativi di settaggio, si è pensato di aumentare ulteriormente la specificità della PCR ricorrendo al metodo (già usato nei primi anni di impiego della PCR) della "nested PCR"⁹⁹. Una coppia di primers innesca una PCR portando alla formazione di uno o più prodotti. La presenza di un'altra coppia di primers che ha dei bersagli interni all'eventuale prodotto specifico della prima reazione comporta un'ulteriore amplificazione in modo specifico. Nel caso del gene SOX3, per aumentare anche la quantità di amplificato si è scelto di amplificare l'intero esone genico in due pezzi ognuna con una PCR nested (figura 4.2)
4. Dopo varie PCR si è provato ad usare lo strumento per Real time PCR (Corbett-RotorGene 6000). A seguito di ciò si è notato su gel di agarosio una banda netta con altre bande a minor peso molecolare. In realtà ridenaturando e rinaturando lentamente il DNA non caricato, si è notato

che queste bande accessorie erano un artefatto dovuto probabilmente alla creazione di conformazioni locali per l'alto contenuto in GC.

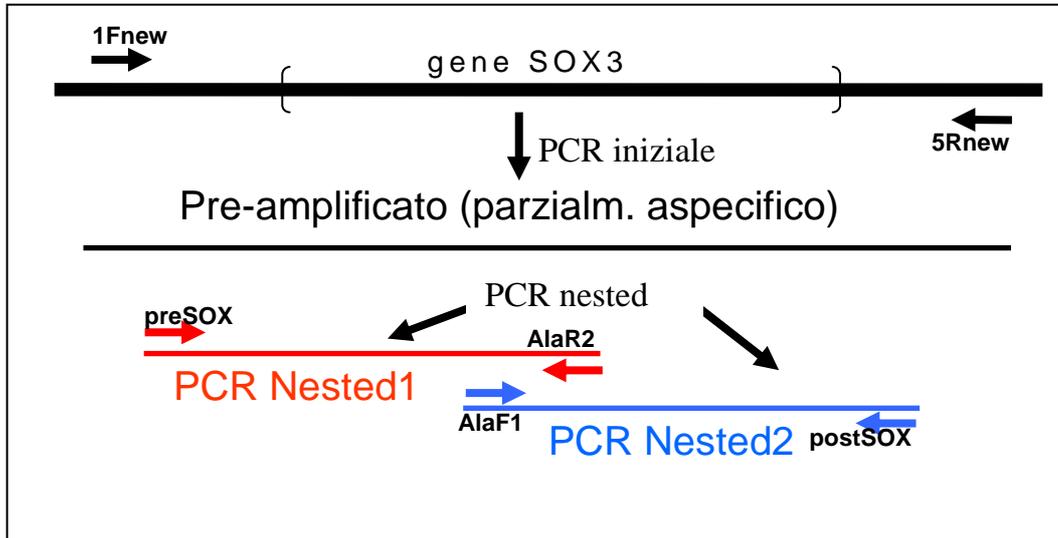


Figura 4.2 - schema dei due passaggi di amplificazione con "nested PCR" allo scopo di ottenere degli amplificati ad alta specificità

5. Infine, a sequenziamento ultimato su un campione di controllo si è anche appurato che nell'articolo di Woods si faceva riferimento a una sequenza di riferimento sbagliata (la genBank accession number X71135).

Di seguito si indicano tutti i primers sia per PCR che per sequenziamento (tabella 4.7) e le procedure chimiche e termiche che permettono di amplificare (tabelle 4.9 - 4.10) e sequenziare (tabella 4.11) il gene SOX3.

La corretta esecuzione del sequenziamento è stata provata su due pazienti di controllo, mentre un solo paziente al momento è stato sequenziato.

Tabella 4.7 – Primers per PCR usati e relative sequenze. Nella prima colonna sono indicati gli impieghi tipici dei primers segnati

Tipo di primer	Nome	Sequenza (5'→3')
Primer PCR primaria	SOX3-1Fnew SOX3-5Rnew	GGCGCATCACTGCGAACCTGT CCCATTTTCGCTGCTCCTGAC
Primer PCR "nested"- framm "FrIniz." (917 bp)	preSOX3 AlaR2	GTTGCGAGGGGCGGACCAAG TGCTCCTGCACCAGCGAGTACG
Primer PCR "nested"- framm. "FrFin." (817 bp)	AlaF1 postSOX3	CGCAAGACCAAGACGCTGCTCAA GGCAACAGTCCCAGGCAAGCA

Tabella 4.8 – Primers utili per cycle-sequencing. I primers indicati con **W** sono stati trovati nell'articolo citato di Woods et al. (2005)

Tipo di primer	Nome	Sequenza (5'→3')
Primer sequenziamento per SOX3- FrIniz.	preSOX	GTTGCGAGGGGCGGACCAAG
	2F (W)	GAGTCCCAGGGCCTTTTC
	3F (W)	AACGCCTTCATGGTATGGTC
	AlaR1	CCGTTGGCCCAGCCGTTTAC
Primer sequenziamento per SOX3- FrFin.	AlaF1	CGCAAGACCAAGACGCTGCTCAA
	4F (W)	AGCGCCTGGACACGTACAC
	4R (W)	GGTGGCAGGTACATGCTGAT
	5Fnew	CCATCGCATCGCACTCTCAGC

Tabella 4.9 – Condizioni chimiche e settaggio termico per la reazione di pre-amplificazione del gene SOX3; la PCR può essere anche fatta in soli 10 µl previa aggiunta di altri 10 µl di mineral oil

Reagenti	Condizioni finali	Settaggio termico
DNA genom	75 ng	1) 95°C 4 min
Buffer TTH	1x	2) 95,2° 1 min
Buf.con betaina	2x	3) 66,2°- 0,2°C/cyc 30s
BSA	1x	4) 72,8° 1 min 45 s
MgCl ₂	1,55 mM	5) torna a (2) [10x tot]
dNTPs	0,2 mM (ciascuno)	6) 95,2° 1 min
Primer For	0,09 µM	7) 62,8° 30 s
Primer Rev	0,55 µM	8) 72,8° 1 min 50 s
Enzyme TTH	1,25 U (su 25 µl)	9) torna a (6) [9x tot]
Volume totale	25 µl (con H ₂ O qb)	10) 95° 5 min (in attesa di mettere in ghiaccio)

Tabella 4.10 - Condizioni chimiche e settaggio termico per le reazioni di "nested-PCR" per amplificare, nel gene SOX3, il frammento FrIniziale (**A**) ed il frammento FrFinale (**B**). A seconda del tipo di PCR nested (tipo A oppure B) sono segnati i relativi valori di concentrazioni finali per i primers

Reagenti	Condizioni finali	Settaggio termico
DNA stampo	(Pre-ampl.) 3,1 µl	1) 95°C 1 min
GC-buffer 5x	1x (con 1,5 mM MgCl ₂)	2) 95,2°C 55s
GC-res.solut. 2M	0,2 M	3) 67,7°C 40s
BSA 100x	1x	4) 72,8°C 1min 10s
MgCl ₂ aggiuntivo	No	5) torna a (2)[40x tot]
dNTPs	0,42 mM (ciascuno)	6) 72,8° 7min
Primer For	0,5µM (Nested A) o 0,2µM (Nested B)	7) 10°C forever
Primer Rev	0,2µM (Nested A);o 0,5µM (Nested B)	
Taq GCrich (Roche)	1 U (su 25 µl)	
Volume totale	25 µl (con H ₂ O qb)	

Tabella 4.11 – procedure sperimentali successive all'amplificazione, consigliate per un corretto sequenziamento del gene SOX3 ad alto contenuto in GC

Fasi	Metodo	Note
Purificazione	Exosap	In tal modo si mantiene parte del buffer della GC rich nel cycle-seq
Quantificazione	Se fatta con gel prima di exosap, la concentrazione reale è i 5/7 di quella calcolata su gel	
Quantità consigliata in ng per cycle-sequencing	FrIniz: 29 ng → FrFin: 31 ng → (reazioni da 20 µl tot)	Corrisponde a 2-4 µl di FrIniz con exosap Corrisponde a 5-8 µl di Frfin. con exosap
Denaturazione campioni	portare a volume di 10 µl, denaturare a 95°C per 3 min	Denaturare solo i campioni di DNA, poi mettere in ghiaccio
Settaggio termico (cycle sequencing)	1) 96°C 28s 2) 98°C 3s 3) 58,5° 20s *** 4) 62°C 4min. 5) torna a (1) [altre 30x] 6) 10°C forever	Nota *** Se si usano i primers di Woods et al., la temperatura di annealing è 53,5°C
Settaggio CEQ 8000	-T capillari=51°C (con wait for temp) -Denature 90°C -135 s -Injet 2 KV per 20 s -Separate 4 KV per 120 min, con pausa 1 min	

4.3 Screening di una mutazione puntiforme in LHX3 mediante tecnica CAPS

A seguito del rinvenimento nel gene LHX3b di una mutazione in eterozigosi all'interno del VI esone (sostituzione A>G nella pos. 1248 per il cDNA, comportante la sostituzione aminoacidica T372A) si è notato che la sequenza nucleotidica era adatta ad essere studiata con l'endonucleasi di restrizione *SacII* (provvisto da New England Biolabs).

Con tale enzima di restrizione possiamo riconoscere selettivamente la sequenza mutata ovvero:



in quanto tale sequenza (e non la sequenza normale) viene tagliata dall'enzima di restrizione in corrispondenza delle frecce rosse originando in tal caso due frammenti di minor peso molecolare.

I polimorfismi di sequenza rilevati con enzimi di restrizione sono detti CAPS (cleavage amplified polymorphic sequence) ed il metodo è stato usato inizialmente da Konieczny¹⁰⁰ nel 1993 ma viene tuttora impiegato allo scopo di rilevare in modo alternativo certi SNP¹⁰¹

- ✓ La procedura è stata impiegata sul DNA di un gruppo di 57 soggetti di controllo per stimare la frequenza della sostituzione nella popolazione e decidere se si trattava di un polimorfismo o di una mutazione.
- ✓ Si è effettuata l'amplificazione dell'esone VI di LHX3 di 553 bp (primers in tabella 4.3), e si è verificato tramite curva di melting dello strumento per real time PCR (Corbett Rotor gene 6000) che i frammenti amplificati erano tutti specifici
- ✓ Ai frammenti purificati tramite il kit Exosap sono stati aggiunti i reagenti enunciati nella tabella 4.12 per effettuare il taglio enzimatico. E' da notare l'aggiunta anche di un primer avente una sequenza tagliabile da SacII, poiché l'enzima, similmente all'enzima *EcoRII* sembra richiedere, per essere al massimo della sua attività, almeno due siti¹⁰² in cui legarsi (all'interno della sequenza amplificata dell'esone VI vi è un solo possibile sito di taglio).
- ✓ La reazione si è svolta a 37°C overnight, poi l'enzima è stato inattivato a 80°C per 10 min.
- ✓ I frammenti eventualmente tagliati sono stati caricati su un gel di agarosio al 2,5 %, corso a 75Volt per circa 90 min, evidenziati con GelRed e luce ultravioletta e quindi fotografati per censire quanti soggetti erano portatori della sostituzione.

Tabella 4.12 – composizione del mix per la digestione enzimatica di frammenti ad opera dell'enzima *SacII*

	Conc iniz	Conc fin.	Vol (µl) per 1 reaz.da 11 µl
H ₂ O	/	q.b.	2,438
Buffer NE(IV)	10x	1x	1,1
BSA	100x	1x	0,11
Primer con seq. sito <i>SacII</i>	5 µM	0,35 µM	0,077
Enzima <i>SacII</i>	20U/ul	0,5 U/µl	0,275
DNA			7

4.4 Screening di pazienti per possibili InDel nel gene SOX3

All'interno del gene SOX3 alcuni articoli scientifici^{76, 35, 78} già segnalati descrivono la presenza di un hot spot per INDELS (Ins o Del) comportanti a livello di sequenza proteica un allungamento o accorciamento di una sequenza poliAla (normalmente 15Ala). Tali INDELS sono stati messi in relazione ad un fenotipo con deficit intellettivo, o, in altri casi, solo a CPHD con neuroipofisi ectopica. Il gene SOX3 è localizzato sul cromosoma X, e per queste mutazioni sono interessati principalmente i soggetti maschili. Questa è la procedura usata:

- ✓ Selezione, a partire dal gruppo di pazienti panipopituitarici, di soggetti maschili con deficit ormonali per GH, FSH-LH, PRL, TSH, ACTH aventi nel contempo neuroipofisi ectopica. Sono stati rintracciati 12 possibili pazienti da analizzare.
- ✓ Progettazione di primers per amplificare un piccolo frammento includente la localizzazione del possibile InDel. Si è trovato che una coppia di primers (tabella 4.13) era idonea per l'amplificazione di un frammento di 176 bp.
- ✓ Preparazione della PCR secondo le condizioni chimiche e termiche riportate nella tabella 4.14 .

Tabella 4.13 – I primers con relativa sequenza (5'→3') per la PCR di studio di possibili InDel per SOX3

AlaF1	CGCAAGACCAAGACGCTGCTCAA
AlaR1	CCGTTGGCCAGCCGTTTAC

Tabella 4.14 – condizioni chimiche e settaggio termico per la PCR sul frammento contenete gli INDELS di studio in SOX3

Reagenti	Conc. fin.	Vol. (µl)	Profilo termico⁽¹⁾ su Rotor Gene 6000 96,9°C 5min Cycling (48 times max) 96,8°C 45s 70,7°C 30 s 71,9° 15s + acquis HRM Melt 60,5°→98,5°C in HRM
Acqua	Qb a 15	3,49	
Buffer 20x	0,95x	0,71	
MgCl ₂	1,8 mM	1,08	
Betaina (buf)	2x	3,00	
dNTPs	0,2 mM	2,40	
BSA 100x	1x	0,15	
Eva 20x	1x	0,75	
Taq TTH 5U/µl	0,6 U	0,12	
Primer AlaF1	0,28µM	0,84	
Primer AlaR1	0,42µM	1,26	
DNA stampo	60 ng	1,20	

¹ sono indicate le temperature reali applicate, nota la calibrazione termica della macchina.

- ✓ Corsa su gel di agarosio speciale a basso punto di fusione (agarosio al 3,3% peso su volume) per consentire una buona risoluzione anche per frammenti con piccoli INDELS . Voltaggio applicato: 45Volt per 2 ore. Applicazione del gel colorato con Gel-Red su apparecchio ad ultravioletti per visualizzare e fotografare le bande.

4.5 Pazienti, materiali e metodo negli esperimenti MLPA

I soggetti di cui si è analizzato il DNA per stabilire il copy-number erano 20, di cui 11 erano con deficit ormonale ipofisario multiplo e 9 con deficit isolato di GH. Di questi ultimi, 3 individui erano stati ben studiati con altre tecniche genetiche efficaci ma laboriose (tra cui il southern blotting) da ricercatori¹⁰³ di questo dipartimento (Baroncini, Baldazzi, Pirazzoli *et al* 1993) che avevano rilevato un'ampia delezione (in omozigosi per il paziente BT e CJ, in eterozigosi per BB) riguardante gran parte del cluster del GH. Pertanto il DNA di tali individui poteva fungere da controllo della validità della nuova tecnica MLPA.

Il kit di sonde impiegato ha la sigla Salsa MLPA P216 (growth hormone deficiency) e serve per quantificare la seguente serie di geni necessari per un corretta sintesi di ormoni per la crescita: GH1, GHRHR, Pou1f1 (=PIT1), PROP1, HESX1, LHX3, LHX4.

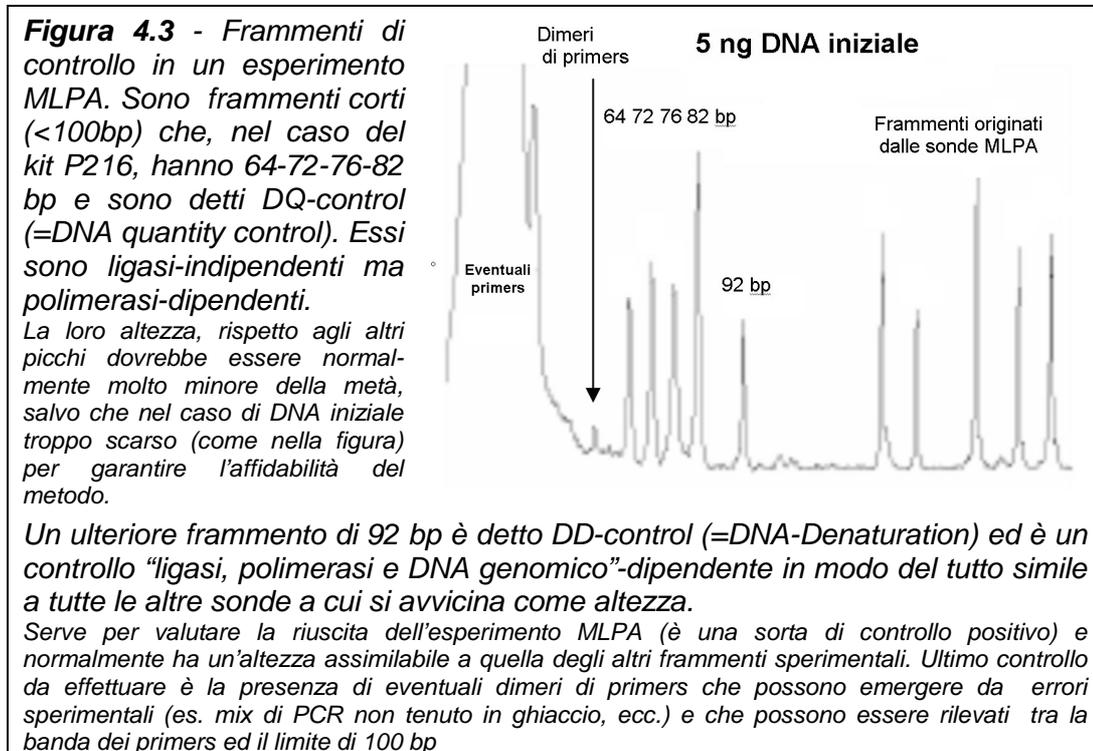
Rielaborazione dei dati grezzi ricavati con il metodo MLPA

Le procedure sperimentali e di calcolo usate, ricalcano i protocolli ed i suggerimenti on-line inseriti alle pagina web <http://www.mrc-holland.com> e <http://www.mlpa.com> in particolare il bollettino *MLPA DNA detection/quantification protocol* ed il bollettino *MLPA step by step* . Per una questione di sintesi, si rimanda a tali documenti per quanto riguarda la denaturazione, l'ibridazione, la ligasi, la PCR e la corsa elettroforetica.

Analisi quantitativa dei dati sperimentali

Questa fase serve per relativizzare i dati sulla base del profilo di dati dei controlli sani. La procedura seguita è la seguente:

- a. Controllo visivo preliminare dell'affidabilità del saggio; a tal scopo, la MRC-Holland ha inserito una serie di frammenti di controllo, come si può rilevare dalla figura 4.3.



- b. Impiego del software FRAGMENT ANALYSIS per analizzare i frammenti e attribuire ad ognuno una lunghezza sulla base del marker standard inserito (da 600 bp max). Assicurarsi che tra i dati esportati in Microsoft Excel non vi siano falsi picchi (es. picchi sdoppiati) risultanti da una corsa non perfetta (tali picchi possono essere ignorati). Esportazione della finestra dei frammenti in Word e dei dati quantitativi (lunghezza dei frammenti insieme ad altezza ed area dei picchi) in Excel.
- c. Rielaborazione dei dati dell'area dei picchi (si può lavorare anche sulle altezze dei picchi, i risultati sono molto simili ma leggermente meno attendibili).
- Calcolo dell'area totale di tutti i picchi per il DNA di un individuo, poi per ogni picco, calcolo dell'area relativa (area/area totale). La procedura è detta **normalizzazione globale**. In alternativa si potrebbe calcolare l'area relativa al picco di controllo da 92 bp (normalizzazione di blocco). La normalizzazione globale è stata

preferita perché il kit di sonde usato vaglia contemporaneamente molti loci su cromosomi diversi, quindi un'eventuale delezione in un locus non modifica sostanzialmente l'area totale di riferimento. Nel caso si usino kit che dosano il copy-number di vari esoni per 1 o 2 geni, è preferibile invece la normalizzazione di blocco.

- Relativizzazione dei dati rispetto ai dati di uno o più controlli sani. Se si stanno studiando mutazioni geniche e delezioni a bassa ricorrenza (come nel caso del mio studio) si possono impiegare come dati di riferimento anche i **valori medi dei picchi** di tutti i soggetti, ottenendo in tal modo una miglior stima dei valori standard sani per via della molteplicità dei dati.

In pratica considerando tutti gli individui si ricavano, i valori medi di area relativa di ogni picco, poi per ogni individuo ed ogni picco si divide la sua area relativa per l'area relativa media.

- Calcolo della **variazione percentuale dei picchi** normalizzati e relativizzati al controllo. Variazioni percentuali negative pari a -100% o -50% indicano rispettivamente una delezione omozigote oppure eterozigote, valori positivi invece riguardano copie esoniche oltre il normale. Notare tuttavia che la tecnica MLPA con le sue svariate varie fasi sperimentali non permette finora di ottenere dei dati molto precisi; fluttuazioni positive o negative del 30-40% possono emergere spesso ed in certi casi l'unico rimedio è ripetere l'esperimento oppure cercare una verifica sperimentale ricorrendo ad altri metodi.
- Visualizzazione dei dati delle variazioni percentuali dei picchi dei soggetti analizzati in un **istogramma** e **valutazione dei dati**. Notare che la tecnica MLPA con le sue svariate varie fasi sperimentali non permette finora di ottenere dei dati molto precisi; fluttuazioni positive o negative del 30-40% possono emergere spesso. Una fluttuazione isolata negativa di -40% può essere una variazione sperimentale ignorabile, tuttavia se la situazione riscontrata per un esone si ripresenta anche in altri esoni vicini si può supporre l'esistenza di una delezione eterozigote. Si potrebbe a questo punto ripetere l'esperimento con un diverso quantitativo di DNA iniziale oppure optare per una verifica sperimentale ricorrendo ad altri metodi.

4.6 Pazienti, materiali e metodi nella tecnica qPCR

La PCR quantitativa è stata impiegata per lo studio di delezioni/duplicazioni per i geni **GH1**, **SOX3** ed **LHX3** di alcuni pazienti come annotato:

- ◇ nel caso del gene **GH1** lo scopo era di testare per la prima volta il metodo della PCR quantitativa sulla nuova macchina Corbett Rotor Gene 6000 sfruttando l'attendibilità della diagnosi di delezione eterozigote del gene per un soggetto (BB) effettuata con due diverse procedure sperimentali (Southern blotting ed MLPA).
- ◇ Si è messo a punto un settaggio di qPCR per indagare su possibili duplicazioni geniche includenti anche il gene **SOX3** ed implicate secondo vari autori^{74, 35} nell'insorgenza di panipopituarismo con possibili anomalie in RM per l'ipofisi (come la neuroipofisi ectopica). I pazienti indagati sono stati 11 maschi CPHD con neuroipofisi ectopica.
- ◇ Si è configurata una qPCR di verifica su un frammento genico di **LHX3** (precisamente nell'introne 5) per il solo paziente GM, essendo risultato positivo per la prima volta alla metodica quantitativa della MLPA con un dosaggio genico dimezzato rispetto alla norma. Il paziente in questione, pur essendo trattato per tanti anni con ormone della crescita, non ha recuperato il deficit staturale (si è fermato all'altezza di 142 cm) pur continuando a svolgere una vita regolare.

Le PCR quantitative sono state eseguite su macchina Corbett Rotor Gene 6000 e il fluoroforo usato è stato l'Eva Green, un intercalante generico per il DNA a doppio filamento con fluorescenza migliorata rispetto al classico SybrGreen ed anche con una minor capacità di inibire la Taq polimerasi.

Real time PCR sul gene GH1

L'esperimento di quantificazione mediante real time PCR è stato eseguito secondo la metodica delle due curve standard (come spiegato nel paragrafo 2.8). I frammenti genici target e reference, insieme ai primers usati sono riportati nella tabella 4.15 , mentre le condizioni di amplificazione dei due frammenti si leggono nelle tabelle 4.16-4.17 .

Tabella 4.15 – frammenti genici target e reference e sequenze dei primers usati negli esperimenti di qPCR sul gene GH1

Tipologia	Frammento	Nome primers	Sequenza primers
gene target	Introne di GH1	GH1-F GH1-R	GAGCCCCACTGACTTTGAGAG CTCCCCTTCAGGGTGTAGAGA
gene reference	Esone di LHX3	120-ex2F 120-ex2R	GCTTCACTGCCTCCTGGTCTAC GGTCCAGAGCCTTGAGGATGA

Nel caso del gene GH1 la progettazione dei primers non è stata molto facile poiché esso appartiene a un cluster di geni con elevata omologia e perciò i primers sono stati progettati in corrispondenza di porzioni più variabili (all'interno di un introne). A tal fine si è sfruttato un utile multiallineamento tra i geni del cluster del GH riportato in un lavoro scientifico recente¹⁰⁴.

Come gene reference inizialmente era stato usato un frammento del gene GAPDH con primers riportati in un articolo letto⁹⁴ sulla real-time PCR, avendo però appurato (dopo una prova fallita) che nella sequenza segnata nell'articolo per il primer forward vi era un errore, si è usato un frammento di 120 bp sull'esone LHX3 che era molto ben amplificabile. Il gene LHX3 infatti è un gene su un autosoma quindi in duplice copia per genoma normale come nel caso di GAPDH e la probabilità che LHX3 esibisca una variazione nel numero di copie proprio quando si indaga su una delezione in GH1 è abbastanza remota.

Tabella 4.16 – Condizioni chimiche e termiche impiegate per la qPCR sul frammento intronico di GH1; kit enzimatico TTH (di Epicentre) con Eva Green

Reagenti	Condizioni finali	Settaggio termico ⁽²⁾ per Corbett Rotor Gene 6000
H ₂ O	qb a 15 µl tot	
Buffer (TTH)	1x	94°C 6 min
MgCl ₂	1,55 mM	
Buff. Betaina	1,2x	95°C 30 s
dNTPs	0,2 mM	60°C 30 s
BSA 100x	1x	70°C 15 s + acquis. Green
Eva Green	1x	
Enzima TTH	0,6 U/15µl	Ripetizione 40 volte
GH1-F	0,3 µM	
GH1-R	0,3 µM	Melt canale Green (70→95°C)
DNA stampo	Da 15 ng a calare	

² sono indicate le temperature reali applicate, nota la calibrazione termica della macchina

Tabella 4.17 – Condizioni chimiche e termiche impiegate per la qPCR sul frammento di LHX3-esone II; kit enzimatico TTH (di Epicentre) con Eva Green

Reagenti	Condizioni finali	Settaggio termico ^(*) per Corbett Rotor Gene 6000
H2O	Qb a 15 µl tot	94°C 6 min 95°C 30 s 61°C 30 s 70°C 15 s + acquis. Green Ripetizione 40 volte Melt canale Green (70→95°C)
Buffer (TTH)	1x	
MgCl ₂	1,55 mM	
Buff. Betaina	1,0x	
dNTPs	0,2 mM	
BSA 100x	1x	
Eva Green	1x	
Enzima TTH	0,6 U/15µl	
120-ex2F	0,28 µM	
120-ex2F	0,52 µM	
DNA stampo	Da 15 ng a calare	

Real time PCR sul gene SOX3

La quantificazione del gene SOX3 è stata svolta, invece impiegando il metodo comparativo legato al calcolo del valore $\Delta\Delta C_T$ secondo la già vista equazione (2.10). Per applicare tale metodo si è dovuto comunque effettuare inizialmente una serie di curve standard per rilevare l'efficienza, e sincerarsi che essa fosse simile tra il gene "target" ed il "reference". Mancando inizialmente tale presupposto, si è cominciato a variare ad una ad una le condizioni della PCR partendo dalla concentrazioni dei primers (tabella 4.18) ed poi coinvolgendo il MgCl₂, i dNTPs ed il buffer. Ognuno di questi componenti (vedi tabella 4.18) infatti gioca un ruolo fondamentale nell'attivare la reazione di polimerizzazione considerando nel contempo che i frammenti amplificati non siano aspecifici.

Tabella 4.18 – Effetto della variazione di alcuni componenti della PCR sull'efficienza e sulla specificità della reazione¹⁰⁵

Componente	Azione sulla PCR variando le concentrazioni	Componente	Azione sulla PCR variando le concentrazioni
Primers	Se si aumentano partendo da bassi livelli, si può migliorare l'efficienza, ma bisogna evitare la formazione di aspecifici. Di solito si usano a 0,1-0,5 µM	Buffer	Se i frammenti sono piccoli, un aumento della concentrazione del buffer (ad 1,5x o 2x) può migliorare la specificità
MgCl ₂	La [MgCl ₂] base normalmente è 1,5 mM, se si aumenta, può aumentare l'efficienza ma possono anche comparire aspecifici	Betaina, DMSO	Additivi utili in presenza di alte percentuali di GC, ad alte concentrazioni (per es. DMSO oltre il 10%) agiscono da inibitori
dNTPs	Normalmente tra 0,15 e 0,4 mM, a maggiori concentrazioni sequestrano il MgCl ₂ che dovrebbe attivare la Taq polimerasi	BSA	In certi casi permette di ridurre l'effetto di molecole (estratte insieme al DNA genomico) inibenti la Taq polimerasi

I frammenti genici target e reference, insieme ai primers usati (tutti progettati ex-novo) sono riportati nella tabella 4.19, mentre le condizioni di amplificazione dei due frammenti si leggono nella tabella 4.20.

Tabella 4.19 - frammenti genici target e reference e sequenze dei primers usati negli esperimenti di qPCR sul gene SOX3

Tipologia	Frammento	Nome primers	Sequenza primers
gene target	93bp (SOX3)	(SOX3)-93F (SOX3)-93R	GCCGTGCACATGAAGGAG GCTGGGCAGGGAGTACTTATCTT
gene reference	91bp (GAPDH)	(GAPDH)-91F (GAPDH)-91R	AACAGCGACACCCACTCCT CAGCCACATACCAGGAAATGA

Tabella 4.20 – Condizioni chimiche e settaggio termico per le qPCR su SOX3 e GAPDH; il kit enzimatico usato è stato TTH (di Epicentre) con uso di Eva Green.

Reagenti	Condizioni finali SOX3	Condizioni finali GAPDH	Settaggio termico ⁽³⁾ per ambedue le reazioni su RotorGene 6000
H2O	Qb a 15 µl tot	Qb a 15 µl tot	95° 6 min
Buffer	2,0x	1,7x	94,5°C 30 s
MgCl2	2,2 mM	1,9 mM	57,1°C 30 s
Buf. Betaina	2,0x	2,0x	72,0°C 4 s +fl.Green
dNTPs	0,175 mM	0,2 mM	Ripeti 40 volte
BSA 100x	1x	1x	Melt 70°→94°C (HRM)
EvaGreen	1x	1x	
Enzima TTH	0,45 U/15ul	0,45 U/15ul	
Primer For	0,43 µM	0,12 µM	
Primer Rev	0,27 µM	0,16 µM	
DNA stampo	max 15 ng	max 15 ng	

Real time PCR sul gene LHX3

Anche nel caso di LHX3, per la quantificazione si è usato il metodo comparativo generalizzato dipendente dal valore di $\Delta\Delta C_T$

Nella tabella 4.21 sono indicati i primers per il gene target ed il gene reference mentre nella tabella 4.22 si trovano le condizioni chimiche e termiche per la corretta amplificazione del frammento di LHX3 (introne V) mentre per quanto riguarda il gene reference GAPDH, riferirsi alla tabella 4.20.

Tabella 4.21 – frammenti genici target e reference e sequenze dei primers usati negli esperimenti di qPCR sul gene LHX3

Tipologia	Frammento	Nome primers	Sequenza primers
gene target	Introne V di LHX3	95in5-F 95in5-R	TGGGGTCAGGGAGAGAAGG CAACAGATGGGGACGCAG
gene reference	91bp (GAPDH)	GAPDH-91F GAPDH-91R	AACAGCGACACCCACTCCT CAGCCACATACCAGGAAATGA

³ sono indicate le temperature reali applicate, nota la calibrazione termica della macchina

Tabella 4.22 – Condizioni chimiche e termico per la reazione di amplificazione del frammento di LHX3; kit enzimatico usato: Dynazyme-ext (produttore Finnzyme).

Reagenti	Condizioni finali	Settaggio termico ^(*) per Corbett Rotor Gene 6000
H2O	Qb a 15 µl tot	94°C 6 min 96,0°C 25 s 60,6°C 30 s 72,0°C 15 s + acquis. Green Ripetizione 40 volte Melt fin.canale HRM (70→95°C)
Buffer(Dyn)	1x (MgCl ₂ 1,5 mM)	
MgCl ₂	0,3 mM(in più)	
dNTPs	0,2 mM	
BSA 100x	1x	
Eva Green	1x	
Enzima Dynaz.	0,3 U/15ul	
95in5-F	0,35 µM	
95in5-R	0,35 µM	
DNA stampo	Da 15 ng a calare	

Capitolo 5

Risultati

5.1 Analisi di sequenziamento diretto di 5 geni

Il sequenziamento dei geni GHR e THR in alcuni pazienti (rispettivamente 8 e 2) non ha fornito evidenza di alcuna mutazione e ha portato al riscontro riscontrare solo di alcuni polimorfismi di popolazione. La metodica è stata comunque utile allo scopo di prendere dimestichezza con la metodica di cycle sequencing con la chimica Beckman e la gestione della corsa con il sequenziatore Ceq8000. L'attività svolta ha tra l'altro fatto capire l'importanza della progettazione dei primers per PCR e sequenziamento. Normalmente infatti un buon amplificato è anche facilmente sequenziabile. Inoltre se i primers hanno una simile temperatura di annealing, le varie reazioni di amplificazione possono avvenire sullo stesso termociclatore permettendo risparmio di tempo e di risorse (per l'intero laboratorio). Queste riflessioni hanno guidato il mio lavoro durante la messa a punto per l'amplificazione ed il sequenziamento dei 3 nuovi geni studiati.

Sequenziamento dei geni POU1F1 e SOX3

Il gene **POU1F1** è stato amplificato e sequenziato in 2 soggetti di controllo senza particolari problemi e confermando la sequenza di riferimento in banca dati (EntrezGene5449 NM_000306.2). Dopo che la procedura è stata validata, si sono studiati altri 6 individui in cui sono stati riscontrati solo innocui polimorfismi e nessuna mutazione a carico delle sequenze esoniche codificanti.

L'amplificazione delle porzioni esoniche è stata resa possibile grazie a 5 PCR in quanto l'esone 4 e 5 sono piccoli e vicini e sono stati amplificati dentro lo stesso frammento.

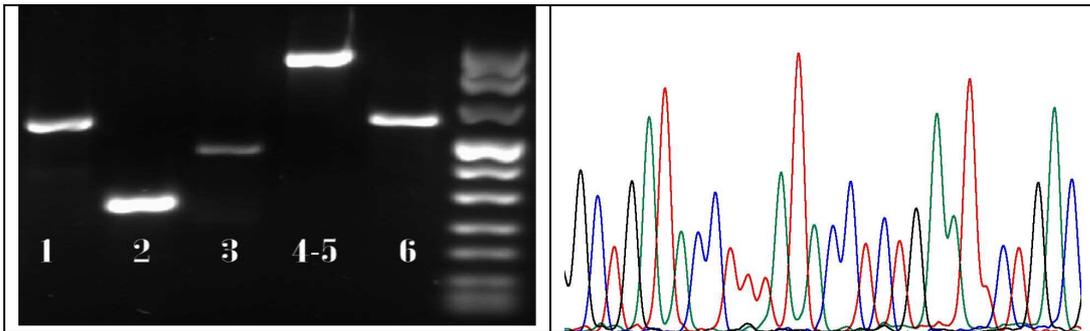


Figura 5.1 – (a sinistra): gel di agarosio (1,9%) colorato con Gel Red per i 5 frammenti genici di POU1F1 amplificati e purificati per il paziente T98 (lunghezza frammenti 620-304-465-1157-586 bp). E' presente anche una ladder di riferimento. (a destra): porzione di elettroferogramma per l'esone I di POU1F1 sequenziato grazie al primer 1F

Nella figura 5.1 (a sinistra) vi è la foto dei 5 frammenti relativi al paziente T98 dopo che essi sono stati purificati con il metodo delle colonnine Qiagen (QIAquick purification kit). La presenza di una ladder (Roche-DNA molecular weight marker VIII) permette il controllo dell'adatta lunghezza dell'amplificato e può anche permettere di quantificare i frammenti stessi. Nella stessa figura (sulla destra) si legge una porzione dell'elettroferogramma relativo all'esone VI del gene stesso. Tutti gli esoni studiati comunque sono facilmente sequenziabili e non è richiesta, per la corsa elettroforetica su capillare, nessuna accortezza speciale rispetto ad altre sequenze. Inoltre si è avuto cura di scegliere primers con simile temperatura di annealing cosicchè i frammenti sono amplificabili nello stesso termociclatore (stesso ragionamento anche per cycle-sequencing).

Il gene **SOX3** è stato invece amplificato in due frammenti con il metodo della Nested PCR. La corretta amplificazione è arrivata dopo serie di prove di primers e procedure ed il risultato è visibile nella figura 5.2 (riquadro a sinistra). Per il sequenziamento, seguendo le avvertenze descritte in "pazienti, materiali e metodi" si ottengono buoni risultati per frammenti fino a 400 bp, se si usano i corretti primers si riescono a sequenziare bene anche le porzioni a maggior percentuale di GC come nel caso degli intervalli che codificano per poliAla (vedi figura 5.2, riquadro a destra), comunque il sequenziamento è ben riuscito sia per un soggetto di controllo sia per un paziente CPHD (che non esibiva mutazioni). E' da notare che la corretta sequenza di riferimento non è la X71135 come menzionato

erroneamente nell'articolo di *Woods et al* 35 ma la GeneBank NM_005634.2

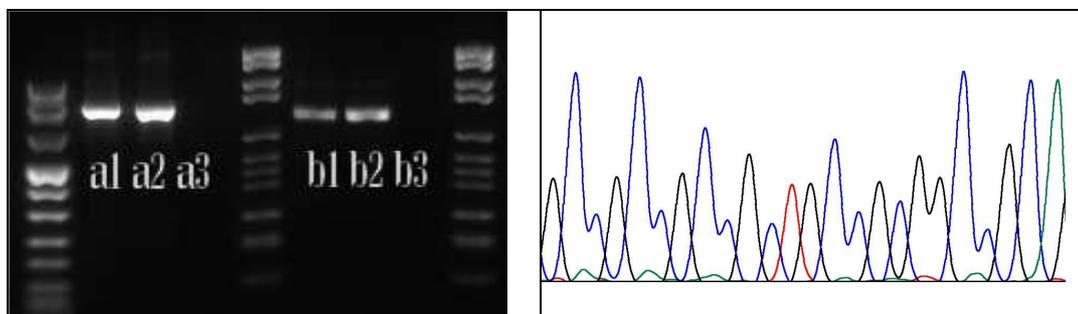


Figura 5.2 – (*a sinistra*): gel di agarosio 1,9% caricato con i frammenti di SOX3 insieme a due diversi tipi di ladder. I frammenti FR-INIZ compaiono nelle corsie a1 ed a2 rispettivamente per il paziente 609 ed il controllo F72 mentre nella corsia a3 si è caricato il controllo negativo, i frammento FR-FIN invece sono nelle corsie b1, b2 e b3 con analogo numerazione. (*a destra*): elettroferogramma per uno degli intervalli più ardui da sequenziare, corrispondente ai nucleotidi cofificanti per le 15 Ala della sequenza proteica.

Scoperta in LHX3b di una nuova mutazione, la sostituzione c.1248A>G

Anche il gene **LHX3** è stato amplificato e sequenziato inizialmente su un soggetto di controllo, l'amplificazione non ha dato particolari problemi (figura 5.3, riquadro a sinistra) mentre per il sequenziamento, a causa di alcune regioni ricche in GC, il settaggio standard del sequenziatore è stato leggermente modificato (vedi “pazienti, materiali e metodi”) usando condizioni più denaturanti per evitare un'alterata corsa dei frammenti. Il gene è stato sequenziato usando i riferimenti in GeneBank (NM_178138.3 per l'isoforma *a* ed NM_014564.2 per l'isoforma *b*) anche in un paziente panipopituitario (in sigla GM) senza trovare alcuna mutazione, cosa che invece è avvenuta in modo straordinario per il campione di controllo CT4 (figura 5.3, riquadro a destra). Siccome il soggetto CT4 è un soggetto sano (una persona che ha lavorato nel laboratorio) a maggior ragione l'analisi è stata ripetuta usando il primer opposto e poi rifacendo tutta l'analisi a partire da un'altra aliquota di DNA genomico, con la PCR ed il sequenziamento. La mutazione è stata confermata in tutte le analisi ed è una sostituzione in eterozigosi nell'esone VI, precisamente, considerando il cDNA di LHX3

(isoforma *b*) la sostituzione è indicabile¹⁰⁶ come c.1248A>G (per LHX3b) e comporta la sostituzione nella sequenza proteica p.T377A di Lhx3b

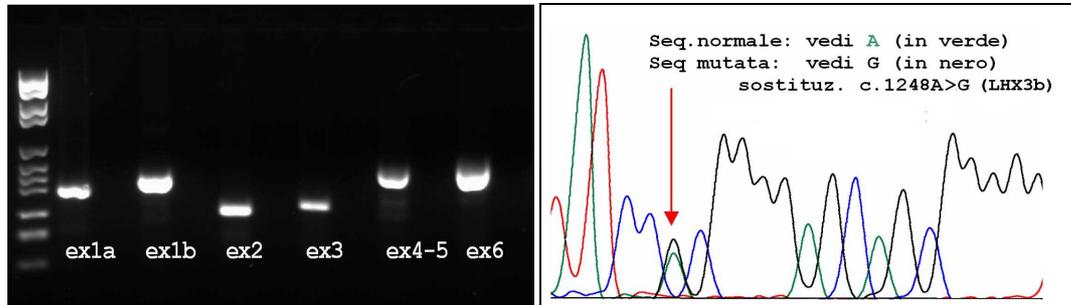


Figura 5.3 – (a sinistra): gel di agarosio (1,9%) con ladder di riferimento e i frammenti amplificati per il gene LHX3 del campione CT11 intervallati da controlli negativi. (a destra): porzione dell'elettroferogramma per l'esone VI di LHX3 in corrispondenza della nuova sostituzione c.1248A>G (trovata nel soggetto CT4)

5.2 La tecnica CAPS può rilevare mutazioni c.1248A>G in LHX3b

La scoperta della sostituzione c.1248A>G (p.T377A) in LHX3b in un soggetto sano ha posto la questione se questa variazione della sequenza abbia un effetto o meno sul fenotipo e se, dal punto di vista della sua frequenza nella popolazione debba intendersi come un polimorfismo o una mutazione. A tal scopo, mancando dati sulla sostituzione in questione e dovendo analizzare almeno una cinquantina di soggetti per stimare la frequenza dell'allele mutato, si è usata la tecnica CAPS (vedi pazienti, materiali e metodi). La PCR è stata eseguita in real time sullo strumento Corbett Rotor Gene 6000 in modo da verificare la corretta amplificazione senza usare gel (figura 5.4). In seguito è stato preparato il mix enzimatico per l'endonucleasi *SacII* e dopo l'incubazione a 37°C si sono caricati i frammenti eventualmente digeriti su gel di agarosio al 2,5%, i risultati sono in figura 5.5. La procedura di taglio selettivo enzimatico è apparsa funzionante poiché nel caso del soggetto con la conosciuta sostituzione eterozigote si notano le bande previste (banda iniziale insieme alle due bande dovute al taglio non completo). Non è stato rintracciato alcun altro soggetto portatore della sostituzione nel gruppo dei 56 controlli, perciò la frequenza stimata dell'allele è stata: $p=1/(2*56) = 0,89\% < 1\%$.

Figura 5.4 – Analisi “melting curve” effettuata con lo strumento per real time PCR sugli ampliconi da 553 bp, prima della digestione enzimatica, allo scopo di individuare se tutti i frammenti amplificati erano specifici. Fluoroforo usato: Eva Green

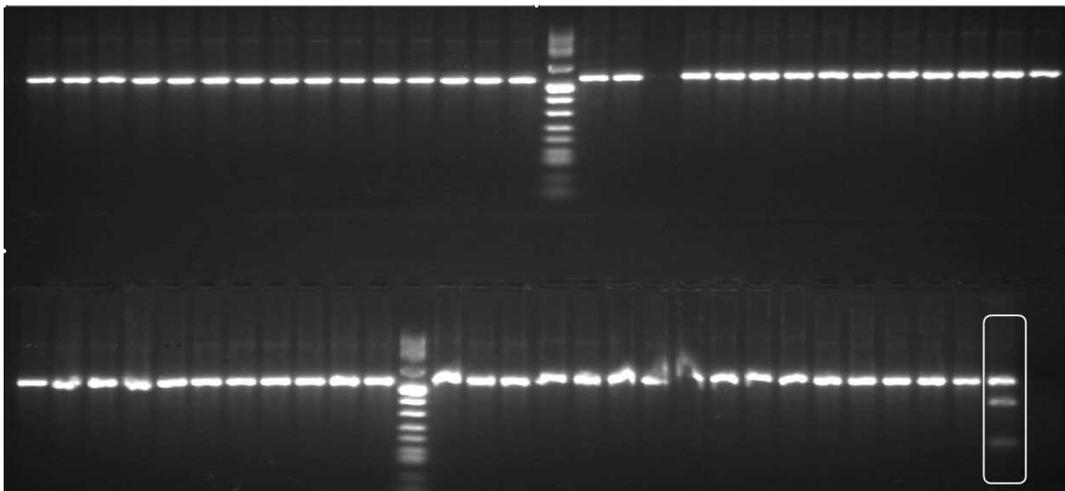
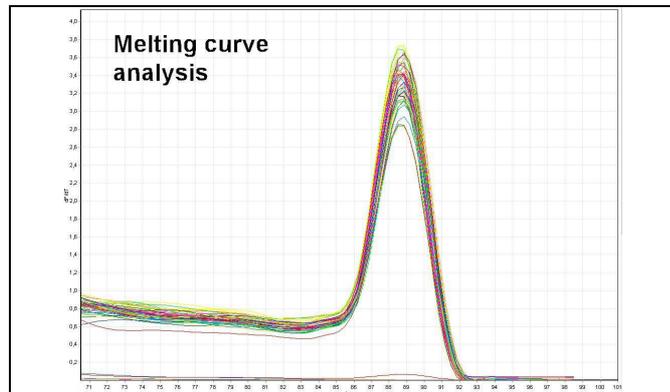


Figura 5.5 – gel di agarosio al 2,5% con i 56 frammenti di LHX3 (esone VI) amplificati ed eventualmente tagliati dall’enzima *SacII*. Sono presenti due “buchi”, uno relativo ad un campione su 57 che non si è amplificato, ed uno per il bianco (controllo negativo). In rilievo entro una cornice rettangolare è il campione CT4, l’unico campione di controllo con la sostituzione in eterozigosi, solo parzialmente digerito.

Essendo quindi la frequenza allelica minore dell’1%, la sostituzione può essere definita una mutazione e non un polimorfismo.

5.3 Nessuna mutazione INDEL rintracciata al momento dentro SOX3

L’analisi di 12 pazienti maschi con panipopituitarismo e neuroipofisi ectopica per quanto riguarda la presenza di INDELs nella sequenza codificante le 15 Alanine è stata condotta con una semplice PCR con appositi nuovi primers seguita da corsa elettroforetica su gel. Da bibliografia, infatti, come già ricordato queste inserzioni/delezioni

interessano come minimo 6 bp di variazione quindi dopo la PCR è bastato l'uso di un gel di agarosio a basso punto di fusione per l'eventuale rilevazione delle stesse. I risultati sono mostrati nella figura 5.6.

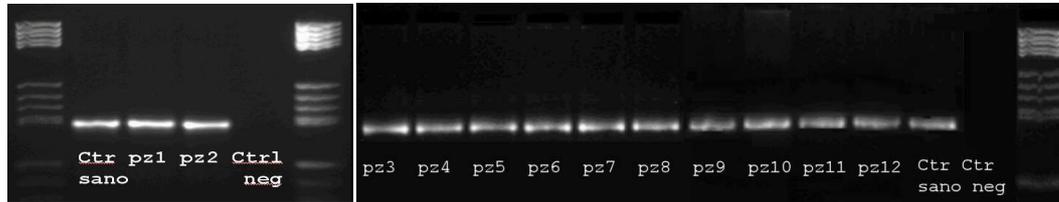


Figura 5.6 – Gel di agarosio (a basso punto di fusione) al 3% e frammenti del gene SOX3 (attorno alla sequenza codificante per le 15 Ala) relativi a 12 pazienti e ad alcuni controlli caricati per rilevare eventuali INDELS. Il frammento amplificato di un soggetto sano di controllo ha la sequenza del (non presenti in questo caso).

La procedura di screening è relativamente semplice e vale la pena di essere compiuta poiché, oltre alla sequenza di lunghezza standard, possono essere rilevate due possibili inserzioni di 21 e 33 bp o due delezioni di 27 e 6 bp.

5.4 L'MLPA rileva alcuni casi di ampie delezioni in GH1 e LHX3

Lo studio MLPA ha interessato 20 pazienti di cui 16 mostravano dati ben analizzabili. A tal proposito, anche prima di effettuare un'analisi dei dati con normalizzazione, una prima occhiata può permettere di scorgere pazienti con nette anomalie, in particolare quando si ha una delezione omozigote in un tratto. E' questo il caso di due pazienti (BT e CJ) già noti per un'ampia delezione omozigote nel gene GH1, in cui il profilo dei frammenti appare interessato da una serie di buchi come nella figura 5.7 relativa al paziente BT.

In generale tuttavia i dati grezzi (in particolare le aree dei picchi dei frammenti) devono essere prima normalizzati secondo la procedura consigliata e già menzionata e poi eventualmente visualizzati con grafici a barre per indicare il numero di copie esoniche rintracciato da ognuna delle 40 sonde relativamente ad ogni individuo.

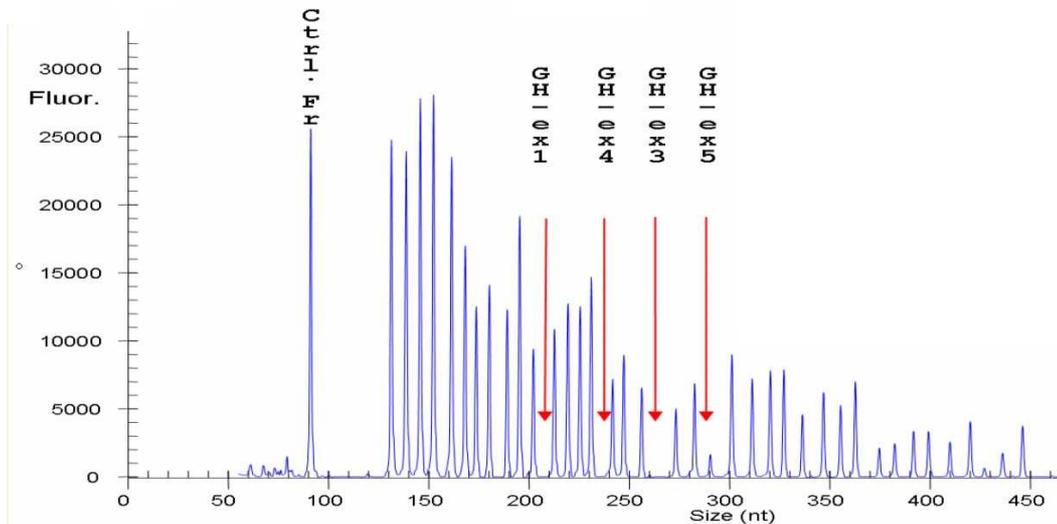


Figura 5.7 – Profilo grezzo dei frammenti MLPA per il paziente BT: si notano già a colpo d'occhio alcuni “buchi” per la mancanza di alcuni frammenti relativi a sonde che si ibridano normalmente con esoni del gene GH1.

Un esempio di tale grafico è riportato nella figura 5.8 che si riferisce (per questioni di chiarezza grafica) a solo 8 dei 16 individui analizzabili. Per i rimanenti pazienti non vi è nulla di particolare da segnalare, quindi per motivi di sintesi, si omette la visualizzazione. In tale grafico a barre, il parametro rappresentato cioè la variazione percentuale delle aree normalizzate rispetto alla media, dovrebbe essere normalmente attorno allo 0%, altrimenti per un gene autosomico si può avere una delle seguenti condizioni:

variazione %	copy-number	anomalia
-100%	0.....	Delezione omozigote
-50%	1.....	Delezione eterozigote
+50%	3.....	Duplicazione
+100%	4.....	Duplicazione

Con queste premesse spiccano intanto i dati di BT e CJ (delezione omozigote in molti esoni del GH1) ma anche i dati di BB, ben noto per essere padre di BT e CJ e portatore della delezione eterozigote sempre in GH1. Quest'ultimo paziente (BB) inoltre ci permette di verificare la capacità dell'MLPA di rilevare anche delezioni in eterozigosi.

Infine si rileva una **possibile nuova mutazione per il paziente GM**, una delezione eterozigote per il **gene LHX3**.

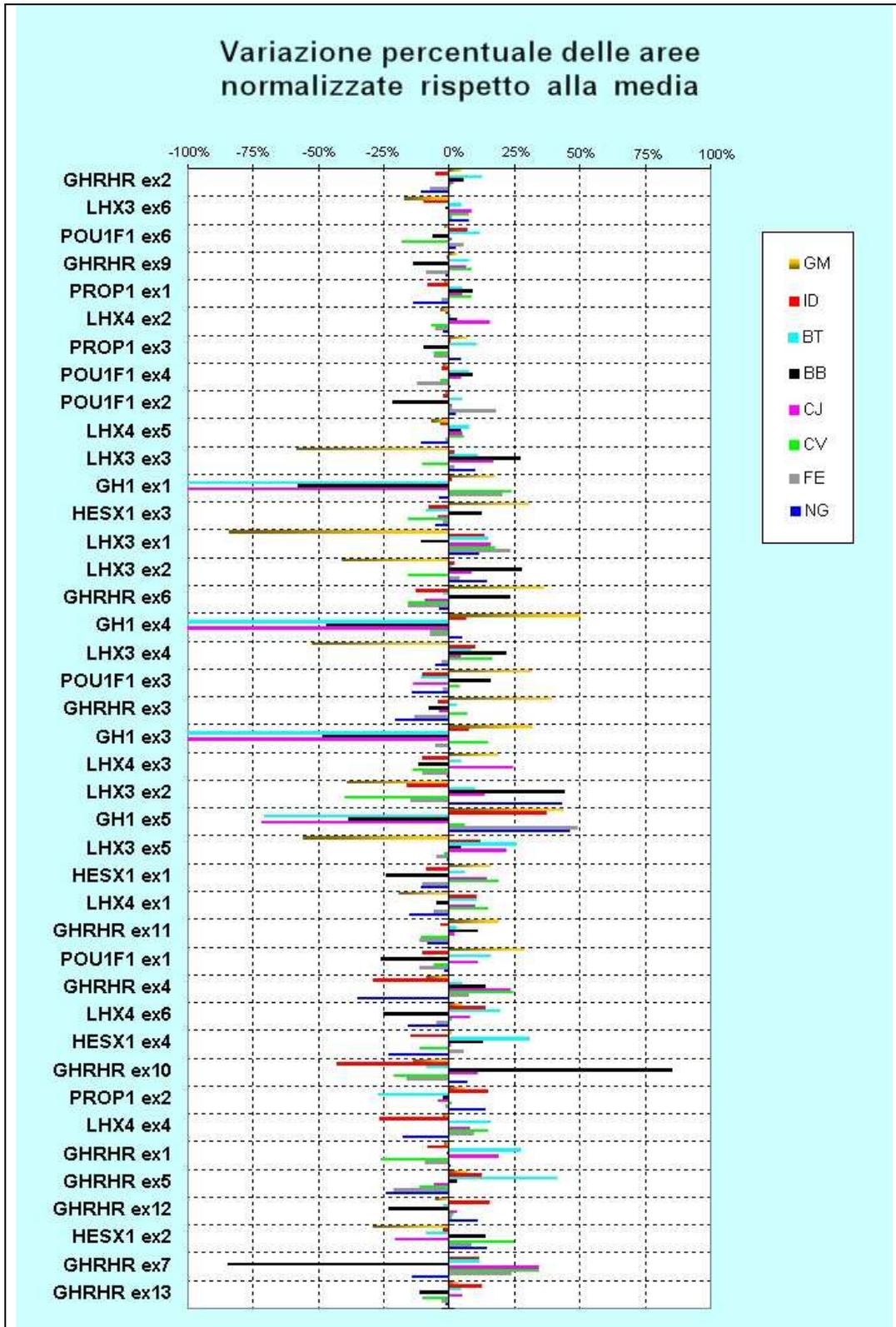


Figura 5.8 – Grafico a barre relativo a 8 pazienti in cui si evidenzia la variazione percentuale delle aree normalizzate (dei picchi elettroforetici) rispetto alla media. Questo parametro è connesso al copy-number degli esoni disposti verticalmente.

Questa mutazione in GM deve essere ovviamente verificata anche con un'altra tecnica visto che l'MLPA non è finora certificata in ambito di diagnostica medica e in essa bisogna considerare un certo margine di incertezza. E' anche per questo motivo che si possono ritrovare molti dati in un intervallo (-25% ; +25%) abbastanza ampio ma tali dati possono essere ignorati. Inoltre non è insolito notare singole sonde amplificate relative ad esoni che "emergono" oltre il 40% in positivo o in negativo. Se tuttavia altri esoni dello stesso gene di appartenenza sono a livelli standard, si è pensato di considerare tali variazioni solo degli errori isolati. anche se è chiaro che, con le dovute motivazioni di un progetto di ricerca mirato e di maggiori fondi, in tutti i casi dubbi si dovrebbe almeno ripetere un paio di volte lo stesso esperimento.

Certamente i dati relativi ai pazienti GM, BT, CJ, BB meritano di essere analizzati anche con un'altro metodo quantitativo come la real time PCR.

5.5 Impiego della qPCR come conferma dei dati dell'MLPA

La real time PCR è stata usata inizialmente per lo studio quantitativo del copy-number del gene GH1 allo scopo di prendere confidenza con il metodo nell'analisi dei 3 pazienti "storici" BT, CJ, BB ed usando il nuovo strumento Corbett Rotor Gene 6000. L'esperimento ha avuto esito positivo e allo scopo è stato impiegato il metodo delle due curve standard come illustrato e brevemente spiegato in figura 5.9.

Una volta costruite le due rette di calibrazione, si sono proiettati su di esse i valori di CT trovati per il paziente BB, rintracciando due valori di concentrazione relativi, espressi in log su base 2 come si può notare nella figura suddetta.

A questo punto il calcolo è abbastanza semplice:

- ◆ si calcola il valore della concentrazione relativa per il gene target (GH1)
quantità di DNA per GH1= $2^{-2,43}=0,186x$ (rispetto al DNA di controllo)
- ◆ si calcola il valore della concentr. relativa per il gene reference (LHX3)
quantità di DNA per LHX3= $2^{-1,39}=0,382x$ (rispetto al DNA di controllo)

◆ si ricava il copy number di GH1 rispetto al copy number di LHX3 relativizzando (normalizzando) il valore di GH1 (gene target) al valore di LHX3 (gene reference)

$$\text{copy-number di GH1 (rispetto al gene reference)} = 0,186 / 0,382 = \mathbf{0,486}$$

Il dato ricavato di 0,48 copie di GH1 rispetto al gene reference significa che se quest'ultimo si presenta normalmente con 2 copie per genoma, GH1 invece esibisce solo 1 copia. Perciò tale risultato conferma appieno le analisi precedenti sia del southern blotting che dell'MLPA.

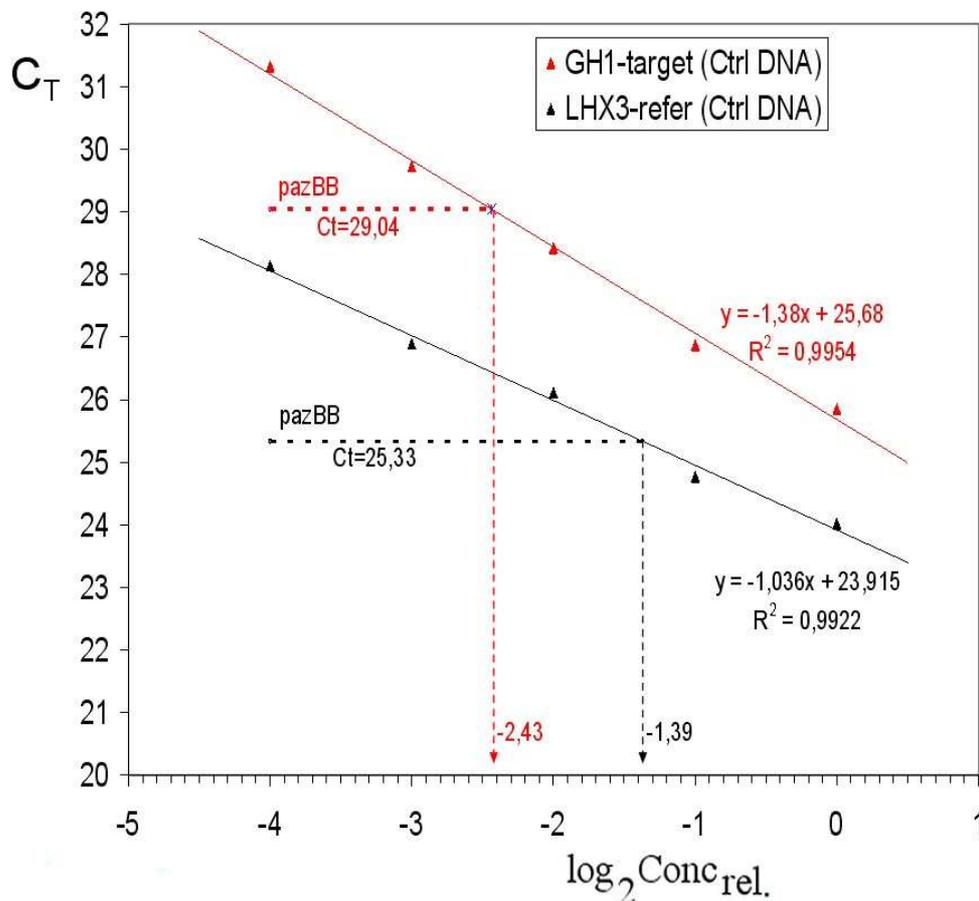


Figura 5.9 – Rilevamento del copy number per il gene GH1 (gene target) rispetto al gene LHX3 (gene reference) impiegando il metodo delle due curve standard. Un controllo o campione standard, diluito in modo seriale (come indicato nell'asse delle ascisse) e soggetto a qPCR relativamente ai due geni, genera varie curve di amplificazione i cui CT sono inseriti come ordinate nel grafico stesso. Ne risultano due rette di regressione calbranti utili per calcolare i valori di concentrazione relativi del DNA dei geni per un paziente (in questo caso BB)

Si fa notare che, allo scopo di avere la massima certezza del risultato, i frammenti amplificati dalla qPCR sono stati analizzati per la cosiddetta “melting curve” (curva di denaturazione) e comunque sono stati visualizzati anche su gel di agarosio 2,5% ed infine si è compiuto un sequenziamento su un campione di frammento di gene target e di gene reference per essere sicuri che il prodotto di amplificazione fosse quello desiderato.

Riguardo ai pazienti BT e CJ, essi sono stati analizzati con qPCR insieme al paziente BB senza dare origine ad alcuna amplificazione per il frammento target poiché entrambi sono soggetti alla delezione omozigote del gene GH1. Il dato non è comunque banale poiché non è facile progettare primers altamente specifici per GH1 e un'amplificazione indesiderata di un gene del cluster del GH potrebbe essere un'eventualità non improbabile.

Per quanto riguarda il paziente GM e l'eventuale delezione eterozigote nel gene LHX3, è stata progettata una qPCR allo scopo di trovare il copy-number con il metodo comparativo ($\Delta\Delta C_T$). Sono state settate le condizioni sia per il gene target (LHX3) che per il gene reference (GAPDH) in modo che entrambe le PCR esibissero la stessa efficienza, eseguendo una calibrazione per LHX3 e per GAPDH con un campione di controllo sano. Le due rette di regressione erano parallele e l'efficienza ricavata era di circa 0,95%. Al momento di compiere l'esperienza finale impiegando anche il DNA del paziente sono emersi dati spuri che probabilmente sono da mettere in relazione ad un effetto di inibizione del DNA suddetto. Anche la curva di melt del paziente relativamente al GAPDH è poco pulita e ciò è un possibile indice della presenza di DNA con inibitori. La qPCR, in effetti è molto sensibile alla presenza di alcune molecole (tipo ematina, sali, fenolo) che non sono state efficacemente rimosse durante i passaggi dell'estrazione¹⁰⁷ del DNA. (tra l'altro effettuata molti anni fa, negli anni 90).

Si è tentato perciò di effettuare una purificazione del DNA con un metodo impiegante delle microsferiche magnetiche (metodo Magna Rack) ma anche ulteriori esperimenti non sono venuti molto bene. Si è pensato perciò di passare allo studio con qPCR di altri pazienti, come segnalato dai risultati inseriti nel prossimo paragrafo.

5.6 Analisi qPCR per rintracciare possibili duplicazioni di SOX3

E' stata settata con successo una qPCR per l'analisi di possibili duplicazioni di frammenti genomici includenti l'intero gene SOX3, visto che la duplicazione appare associata, come già ricordato^{74, 35}, alla comparsa di fenotipo mutato. Il metodo è stato quello del CT comparativo ($\Delta\Delta C_T$) ed ha richiesto un attento settaggio del gene target (con il frammento SOX3-93bp) e del gene reference (GAPDH-91bp) in modo da ottenere una simile efficienza di PCR. L'efficienza è stata rilevata effettuando, per un campione di controllo, una serie di diluizioni seriali per ambedue i geni, acquisendo le relative curve di amplificazione e poi costruendo le rette di calibrazione per ogni tipo di frammento genico amplificato.

Nella figura 5.10 sono visualizzabile le curve di amplificazione per il gene GAPDH con 6 diluizioni seriali ed una soglia di threshold di 0,035.

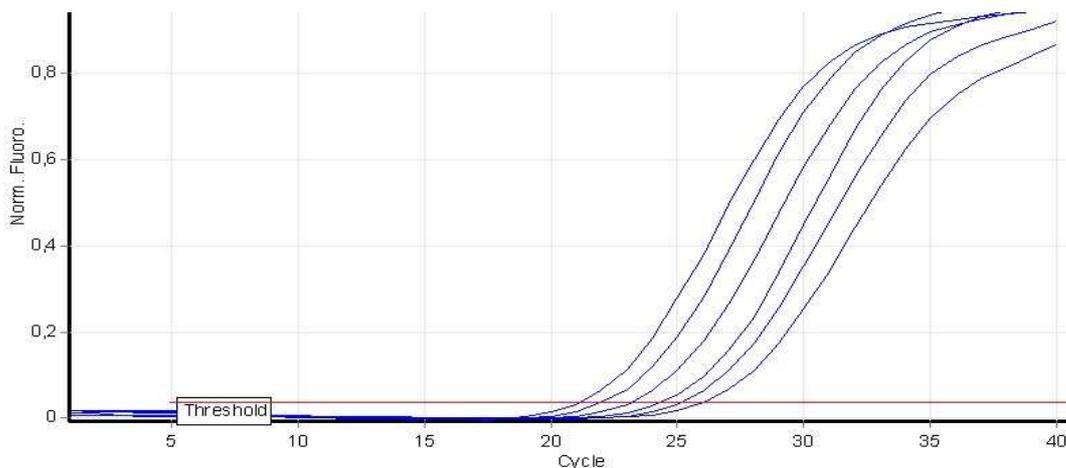


Figura 5.10 – Cinetica di amplificazione di 6 campioni serialmente diluiti ed amplificati secondo la PCR del gene reference (frammento GAPDH-91bp)

Nella figura 5.11 invece si riportano le due rette di calibrazione ottenute dal campione di controllo diluito serialmente allo scopo di verificare il parallelismo delle rette e valutare l'efficienza comune di PCR. Se si impiega il coefficiente angolare nel caso della PCR sul gene SOX3 esso è $m = -1,23$ da cui (avendo usato i logaritmi in base 2) si ricava l'efficienza:

$$\text{Efficienza di PCR} = 2^{(1/-m)} - 1 = 2^{(0,813)} - 1 = 1,76 - 1 = 0,76 = 76\%$$

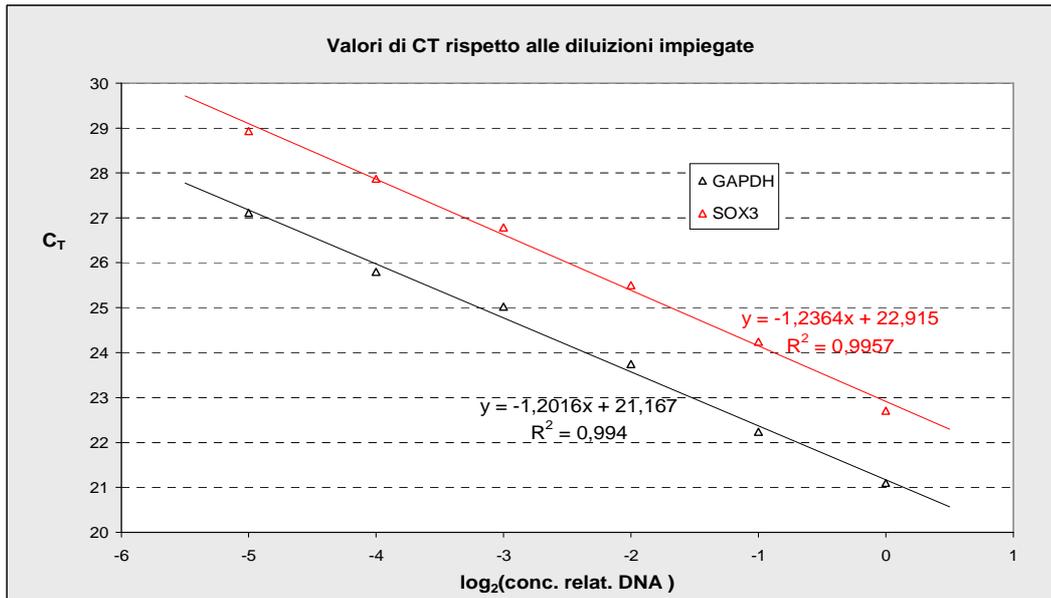


Figura 5.11 – Grafico dei valori di C_T rispetto alle diluizioni seriali effettuate. Sia il frammento genico di GAPDH che quello di SOX3 esibiscono simile efficienza poiché le due rette hanno simili coefficienti angolari

Infine nella tabella 5.1 si riportano i calcoli per stabilire la quantificazione del numero di copie di SOX3 (che è sul cromosoma X), convenuto che il numero di copie standard in un genoma femminile è il 100%. Essendo gli individui di sesso maschile, la situazione normale prevede che i dati siano attorno allo 0,50. Siccome tutti i dati spaziano tra 0,4 e 0,6 (con l’eccezione di un valore pari a 0,34) e sono molto distanti dal valore 1, si può dire che nessun DNA analizzato presenta anomalità nel numero di copie

Tabella 5.1 – Elaborazione dei dati relativi a 11 pazienti di sesso maschile, analizzati per la possibile presenza di duplicazioni del gene SOX3. Il metodo impiegato è il metodo $\Delta\Delta C_T$ espresso in forma generalizzata con efficienza di PCR=0,76

campione	CT (GAPDH).	CT (SOX3)	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	Quantificaz
CTRL(femmina)	22,34	24,04	1,70	0	1,00
paz.669 (maschio)	23,05	26,02	2,97	1,27	0,48
paz.596 (maschio)	22,45	26,08	3,63	1,93	0,34
paz.590 (maschio)	23,7	26,95	3,25	1,55	0,41
paz.570 (maschio)	23,41	26,72	3,31	1,61	0,40
paz.621 (maschio)	24,98	27,96	2,98	1,28	0,49
paz.607 (maschio)	22,04	25,17	3,13	1,43	0,44
paz.886 (maschio)	23,41	26,57	3,16	1,46	0,43
paz.810 (maschio)	23,13	25,91	2,78	1,08	0,54
paz.701 (maschio)	22,55	25,55	3,01	1,31	0,47
paz.609 (maschio)	24,65	27,94	3,29	1,59	0,41
paz.647 (maschio)	23,48	26,08	2,60	0,90	0,60

Capitolo 6

Discussione

Il presente lavoro scientifico ha affrontato lo studio di possibili varianti patologiche in alcuni geni regolanti lo sviluppo ipofisario con il seguente triplice approccio:

- rinvenimento di sostituzioni e piccole delezioni tramite la metodica del sequenziamento,
- impiego di metodi di screening delle mutazioni suddette con metodi alternativi basati sulla PCR e sull'uso di endonucleasi di restrizione concentrandosi su punti precisi delle sequenze geniche,
- ricerca di variazioni copy-number (CNV) relativamente a frammenti genici con i metodi della MLPA e della real time PCR.

Per quanto riguarda il primo punto, sono stati settate e verificate le condizioni ottimali per l'amplificazione ed il sequenziamento di frammenti contenenti gli esoni per i geni POU1F1, LHX3 e SOX3. Nella ricerca delle condizioni ottimali di PCR si è cercato di impiegare primers il più possibile idonei dal punto di vista termodinamico, scartando primers arrecanti arpine o dimeri di primers. Ad alcuni primers segnalati in articoli scientifici sono stati aggiunti molti altri primers in modo da avere comunque una serie il più possibile omogenea dal punto di vista della temperatura di dissociazione. Tale settaggio è tra l'altro utile a livello di laboratorio perché diminuisce i tempi di esecuzione e comporta un minor impiego di termociclatori diversi. I risultati delle PCR per POU1F1 ed LHX3 sono stati buoni fin dalle prime prove, mentre un discorso a parte è da fare per il caso del gene SOX3 in cui, come già indicato, il corretto settaggio è stato un obiettivo più arduo sia per l'alta percentuale in nucleotidi GC della sequenza sia per l'omologia della stessa con quella di altri geni della stessa famiglia (famiglia genica SOX). L'impiego di una PCR tipo "nested" (allo scopo di ottenere una maggior specificità) ha permesso comunque di amplificare efficacemente il gene.

Per il sequenziamento, una volta ottenuti prodotti di amplificazione validi dal punto di vista qualitativo e quantitativo, non si segnalano particolari problemi, eccettuato forse qualche tratto ad alto contenuto di GC di SOX3 in cui sono state adottate semplici procedure alternative segnate nel capitolo “materiali e metodi”. Nel limitato numero di pazienti CPHD per i quali è stato permesso il sequenziamento dei nuovi geni, non sono state riscontrate mutazioni ma la concordanza delle sequenze di controllo effettuate con le sequenze di riferimento in banca dati permetterà al personale del laboratorio di effettuare altri sequenziamenti su pazienti qualora richiesti. L’unica mutazione riscontrata nei nuovi geni studiati è stata rinvenuta in eterozigosi non in un paziente ma in uno dei due controlli usati per il gene LHX3. Si tratta di una sostituzione nucleotidica comportante una sostituzione nella sequenza proteica (p.T377A) (quindi una mutazione missenso) ed evidentemente l’allele mutato ha un carattere recessivo poichè il soggetto analizzato è una persona che ha lavorato nel laboratorio ed è fenotipicamente sana come anche il relativo figlio. La frequenza dell’allele alterato è stata studiata in un gruppo di altri 52 controlli tramite metodo CAPS senza trovare alcuna altra occorrenza. La frequenza dell’allele trovato è perciò minore dell’1% e ciò attesta che la variante è una mutazione e non un polimorfismo. Una questione da chiarire è come potrebbe apparire il fenotipo qualora la mutazione fosse riscontrata in omozigosi. In una mutazione missenso infatti non sempre il cambiamento di un residuo aminoacidico comporta effetti visibili, soprattutto quando l’aminoacido non è in una posizione “critica” per la struttura e funzionalità della proteina e se il cambiamento aminoacidico non è molto drastico. Per esempio il cambiamento di una leucina con una valina (aa apolare contro aa apolare) non sempre è avvertito. Nel caso in questione invece il cambiamento coinvolge una treonina a favore di una alanina e quindi si ha il passaggio da un residuo polare ad uno apolare. Inoltre la sostituzione cade all’interno di una porzione della proteina LHX3 che normalmente è molto conservata cioè il dominio LSD (LHX3 Specific Domain). Questa porzione della proteina è conservata considerando l’uomo, il topo e il maiale come risulta dal multiallineamento delle rispettive sequenze da un lavoro scientifico di Sloop et al¹⁷ quindi una mutazione in tale zona potrebbe avere effetti notevoli. Visto che, come risulta da uno studio citato⁶⁶, alcune

porzioni del dominio HD (homeodomain) e dell'estremità C-terminale sembrano implicate nel segnale di ingresso della proteina LHX3 al nucleo, una possibile conseguenza di tale mutazione, in omozigosi, potrebbe essere un'errata localizzazione della proteina, nel citoplasma invece che nel nucleo, con la conseguente inibizione dell'attività di regolazione genica che compete ad LHX3. E' da notare che finora sono state trovate solo 8 diverse mutazioni in LHX3 (per un totale di 13 pazienti totali) e tutte erano recessive. Il gene LHX3 non è certamente un gene ad alta frequenza di mutazioni, tuttavia il fatto di aver ritrovato una mutazione in eterozigosi in un soggetto del cosiddetto gruppo di controllo potrebbe essere un indizio di poter ritrovare in futuro il gene in un altro individuo in forma omozigote e fenotipicamente rilevante. E' raro infatti che la mutazione si sia prodotta proprio a partire dal soggetto in questione senza ulteriori alleli mutati presenti nella popolazione. In generale comunque potrebbe essere utile verificare la presenza della mutazione in forma omozigote su tutti i pazienti CPHD con fenotipo compatibile con il quadro di mutazioni in LHX3, impiegando metodiche di screening "puntate" sulla mutazione in questione come la metodica CAPS già settata o con altre metodiche. L'impiego di queste tecniche risulta abbastanza utile quando si disponga di un discreto numero di pazienti panipopituitarici da saggiare, poiché, se ammettiamo che l'allele mutato abbia una frequenza minore dell'1% nella popolazione, la probabilità di avere un genotipo mutato omozigote è minore dell'1% di 1% cioè è minore di 1 su 10000 nella popolazione generica. Il metodo impiegato per saggiare in modo mirato la mutazione puntiforme, è molto affidabile visto la precisione del riconoscimento di siti bersaglio da parte delle endonucleasi di restrizione. Un metodo alternativo, inizialmente oggetto di maggior verifica sperimentale ma poi molto valido in termini di rapidità di impiego, potrebbe sfruttare la capacità di rilevamento di sequenze mutate dello strumento della real time PCR configurato per l'analisi HRM ovvero "high resolution melting". Quando piccoli frammenti di DNA sono portati a temperature via via maggiori, ad un certo punto si denaturano poichè le interazioni tra nucleotidi opposti nella doppia elica vengono meno. A seconda della lunghezza del frammento e della percentuale in GC, si ha una temperatura tipica (indicata come T_m o T melting) corrispondente al punto in cui la frazione di molecole native è

uguale alla frazione di molecole dissociate. Un esempio di analisi della curva di melting (o di dissociazione) è riportato nella figura 5.4, effettuata proprio sui frammenti amplificati prima della digestione enzimatica. Un'analisi HRM valida anche per rilevare mutazioni puntiformi tuttavia necessita di frammenti più corti e di salti di temperatura ancora più piccoli (con lo strumento Rotor Gene 6000 sono possibili cambiamenti di temperatura di 0.05°C). Tramite una buona progettazione di primers delimitanti un intervallo di 100-150 bp, ed una verifica della tecnica su DNA normale e DNA mutato, sulla base del profilo della curva di melt si possono distinguere polimorfismi del DNA come singole sostituzioni nucleotidiche o inserzioni/delezioni anche in eterozigosi^{108 109}. L'impiego dell'analisi della melting curve può far diventare ancora più semplice la rilevazione di polimorfismi o mutazioni quando esse sono INDELs coinvolgenti molti nucleotidi, come nel caso della ricerca di INDELs all'interno del gene SOX3 (figura 5.6). Nonostante in questo caso dopo la PCR è stato necessario effettuare solo una corsa su agarosio ad alta risoluzione, l'impiego della HRM-curves avrebbe potuto evidenziare una possibile mutazione in un tempo molto più ridotto. Nel caso delle possibili inserzioni/delezioni all'interno di SOX3, la separazione dei frammenti su gel è una tecnica classica che può essere ben impiegata poiché l'intervallo amplificato delimitante i possibili INDELs, grazie ad opportuna progettazione dei primers è di soli 176 bp (quindi anche molto meno delle 550 bp dell'intervallo amplificato da Laumonier et al.⁷⁶) perciò un gel ad alta risoluzione al 3-4% di agarosio speciale può evidenziare anche delezioni di 6bp (quali sono le mutazioni trovate da Salemi et al.⁷⁸).

Il terzo aspetto considerato nella tesi, la rilevazione di variazioni del numero di copie geniche, si rende necessario per il fatto che, per alcuni geni, anche una delezione eterozigote (che lascia un gene o una serie di esoni in condizioni di emizigosi) può comportare un fenotipo mutato. Queste delezioni eterozigoti, poi, se sono piuttosto lunghe e non circoscritte nell'ambito dell'intervallo di una coppia di primers per la PCR, riescono a passare inosservate sia per la PCR che per il sequenziamento (in cui le informazioni saranno prodotte solo dalla molecola di DNA residua). Nel presente lavoro, per studiare le variazioni nel numero di copie geniche sono state impiegati i metodi (relativamente recenti) detti MLPA e real time

PCR. La tecnica MLPA può fruire di kit commerciali con reagenti e sonde e non necessita perciò di accurati settaggi a priori. Permette, la visualizzazione in contemporanea del copy-number di una quarantina di siti bersaglio con un'ottima rivelazione delle delezioni omozigoti. Anche nel caso di una delezione eterozigote in GH1 per un paziente storico (paziente BB) dopo aver rielaborato i dati grezzi la rilevazione è stata efficace, tuttavia, come si può notare dalla figura 5.8, la fluttuazione dei dati finali è relativamente alta e talvolta alcuni segnali sembrano dei falsi positivi. Dopo quasi dieci anni il metodo non è ancora garantito in ambito di diagnostica medica e questo può significare che ancora non ha una sensibilità sufficiente per l'acquisizione di dati con basso margine di errore.

Per quanto riguarda la presenza di singoli picchi spuri, fortunatamente vengono prodotti anche molti dati relativi ad esoni vicini che possono o relativizzare il singolo dato oppure confermare un'anomala variazione del numero di copie. In generale tuttavia un'ipotetica regione soggetta a delezione o duplicazione andrebbe verificata con un'altra tecnica indipendente. Secondo *Seller et al*¹¹⁰, un possibile svantaggio dell'MLPA rispetto al rilevamento del numero di copie è la limitata lunghezza delle sonde (20-30 bp relativamente alla zona intereressata dall'ibridazione) che potrebbero non ibridarsi in presenza di un mismatch segnalando una delezione quando invece si è in presenza di uno SNP (single nucleotide polymorphism). L'autore consiglia perciò di validare i dati dell'MLPA con un'altra tecnica.

Nonostante alcuni limiti del metodo MLPA, la possibilità di effettuare una serie di test in contemporanea su oltre 40 siti senza particolari settaggi rende questa tecnica comunque abbastanza utile, eventuali copy-number variations rilevate poi devono essere confermate con altri metodi.

A tal proposito il metodo della real time PCR (o qPCR) è riconosciuto in molti articoli come una tecnica molto efficace non solo per valutare i livelli di espressione genica (nell'applicazione della RT-real time PCR dove RT sta per Reverse Transcriptase) ma anche per ottenere dati affidabili di gene copy-number⁹⁰. Un indubbio vantaggio della real-time PCR è il fatto di ottenere dati sperimentali in *una sola fase* sperimentale data dalla PCR, con adatto fluoroforo, su una macchina che produce dati ad ogni ciclo "in diretta". Se ciò può essere un indubbio punto a favore dell'affidabilità della

qPCR, è il modello stesso di amplificazione del DNA cioè la tipica crescita esponenziale, che limita in parte gli aspetti positivi del metodo. Semplificando la questione, due reazioni di PCR con la stessa quantità di DNA iniziale e con le stesse condizioni possono differire moltissimo nei livelli di DNA amplificato appurato a 20-30 cicli solo a causa di una lieve differenza nell'efficienza della PCR. Quindi la pianificazione di una nuova real-time PCR prevede una buona conoscenza dei reagenti della PCR e delle loro funzioni, un'ottima progettazione dei primers e una scrupolosità nell'esecuzione e nell'analisi di alcuni parametri finali che indicano quanto l'esperimento effettuato sia affidabile.

Nel presente lavoro sono indicati in modo preciso i migliori settaggi della qPCR allo scopo di studiare variazioni nel numero di copie per il gene GH1 e per il gene SOX3. Gli esperimenti hanno avuto un buon esito e ciò si può notare tra l'altro dal coefficiente di correlazione lineare R^2 riferito alle due curve di calibrazione (per il gene target ed il gene reference) impiegando diluizioni seriali del DNA iniziale del campione di controllo (figure 5.9 e 5.11). Anche il profilo della "melting-curve" relativo ai campioni impiegati negli esperimenti mostrava un'amplificazione specifica (dati non mostrati ma simili a quelli della figura 5.4) oltre al fatto che un campione di amplificato per il gene GH1 e un campione per il gene SOX3 sono stati sequenziati con esito positivo. Perciò i settaggi proposti appaiono appropriati e future necessità del laboratorio di controllare eventuali anomalie nel numero di copie geniche potranno essere soddisfatte in breve tempo con dati affidabili. In effetti, dopo un accurato settaggio, sia impiegando la qPCR nell'approccio con le 2 curve standard (come per il gene GH1) che nella procedura comparativa " $\Delta\Delta C_t$ " (come per il gene SOX3) sono stati ottenuti dati molto prossimi al valore previsto e che non permettono equivoci.

Un discorso a parte invece va fatto per quanto riguarda la verifica di una possibile delezione eterozigote nel gene LHX3 per il paziente GM. In più di un caso ci si è accorti che il profilo della melting curve era interessato da alterazioni indicanti la presenza di dimeri di primers, mentre il soggetto di controllo non evidenziava ciò. Inoltre in una prova si è tentato di acquisire dati di C_T a diluizioni seriali anche per il paziente e si osservava un

coefficiente R^2 minore di 0,95 ed un'efficienza di PCR anormalmente alta, data in realtà da un probabile effetto di inibizione per i punti a maggior concentrazione di DNA iniziale. Tutti questi dati portano a pensare che il DNA del paziente GM contenga uno o più tipi di molecole ad azione inibitoria sulla PCR probabilmente a seguito di un'estrazione del DNA non accurata o altri motivi sconosciuti (il DNA è stato estratto 15 anni fa). A tal proposito si ricorda che la sensibilità della real time PCR ad inibitori è così alta che alcuni gruppi di ricerca hanno usato la qPCR proprio per rilevare e capire possibili contaminanti ed inibitori della PCR¹⁰⁷. Probabilmente un'ulteriore ottimizzazione della qPCR per LHX3, unitamente all'uso di sonde fluorescenti specifiche potrebbe migliorare molto la riproducibilità del metodo per riuscire a verificare o meno la presunta delezione eterozigote per il paziente GM.

In conclusione, il lavoro relativo a questa tesi ha permesso di predisporre un preciso settaggio delle condizioni di PCR e sequenziamento per 3 nuovi geni importanti per regolare la corretta differenziazione delle linee cellulari ipofisarie, di proporre ed eseguire alcuni metodi di screening alternativi su alcune mutazioni rintracciate o desunte dalla bibliografia ed infine di studiare e settare metodi quantitativi come l'MLPA e la real-time PCR per ricavare il gene copy-number.

L'impiego di una tale varietà di approcci è motivato dal fatto di dover far luce su una serie di mutazioni abbastanza rare. Si spera che l'utile sinergia tra le competenze del medico clinico, del radiologo e del genetista possano entro breve aumentare le conoscenze di base per ridurre la percentuale di casi di pazienti CPHD attualmente definiti **idiopatici** a favore di una più precisa eziologia su base **genetica**.

Appendice matematica

Negli articoli scientifici esaminati non sono quasi mai presenti tutti i passaggi matematici che portano alle espressioni finali oppure sono difficilmente comprensibili. Di seguito espongo una dimostrazione delle relazioni matematiche (2.9)-(2.10)- (2.11) sulla base degli accenni e dei passaggi trovati negli articoli scientifici.

Simbologia:

- N=quantità di DNA o RNA
- 0 (posto all'apice)=iniziale
- Ex= experimental
- Ctr=control
- tar=target gene
- ref=reference gene

Se si esegue un esperimento su un gene target considerando livelli soglia N e cicli soglia CT si ha:

$$N_{Ex,tar} = N_{0,Ex,tar} \times (1 + E_{tar})^{CT_{Ex,tar}} \quad (6.1)$$

$$N_{Ctr,tar} = N_{0,Ctr,tar} \times (1 + E_{tar})^{CT_{Ctr,tar}}$$

Notare che $N_{Ex,tar}$ e $N_{Ctr,tar}$ sono i livelli di molecole di DNA amplificato allo stesso livello soglia impostato. Perciò $N_{Ex,tar} = N_{Ctr,tar}$, da cui, dividendo fra loro i membri delle due uguaglianze, si ricava :

$$1 = \frac{N_{0,Ex,tar}}{N_{0,Ctr,tar}} \times (1 + E_{tar})^{(CT_{Ex,tar} - CT_{Ctr,tar})} \quad (6.2)$$

A noi serve il numero di copie geniche iniziali per il gene target del campione sperimentale rispetto alla situazione del controllo, ovvero:

$$\frac{N_{0,Ex,tar}}{N_{0,Ctr,tar}} = 1 / (1 + E_{tar})^{(CT_{Ex,tar} - CT_{Ctr,tar})} \quad \text{cioè:} \quad (6.3)$$

$$\frac{N_{0,Ex,tar}}{N_{0,Ctr,tar}} = (1 + E_{tar})^{- (CT_{Ex,tar} - CT_{Ctr,tar})}$$

Questo rapporto non è quasi mai 1, perchè dipende da vari fattori:

- nel campione sperimentale il frammento genico target può essere presente con un numero di copie nel genoma diverso dal numero di copie del campione sperimentale
- il DNA estratto dal campione sperimentale ha quasi sempre un valore di concentrazione di base diverso dal DNA di controllo.

Per normalizzare i dati e far fronte a quest'ultimo inconveniente, è necessario eseguire un ulteriore esperimento di PCR real time partendo dai campioni (Exper, Ctr) ed amplificando un frammento genico di riferimento, possibilmente un gene costitutivo o housekeeping (es. GAPDH, Myc, Actin)

$$\frac{N_{0, Ex, ref}}{N_{0, Ctr, ref}} = \left(1 + E_{ref}\right)^{-\left(CT_{Ex, ref} - CT_{Ctr, ref}\right)} \quad (6.4)$$

Avendo ora un punto ulteriore di riferimento possiamo normalizzare i dati trovati relativizzando il valore basale del gene target su quello del gene reference; posto infatti

$$\frac{\frac{N_{0, Ex, tar}}{N_{0, Ctr, tar}}}{\frac{N_{0, Ex, ref}}{N_{0, Ctr, ref}}} = N_{0, Norm, tar} \quad (6.5)$$

$$\text{si ricava: } N_{0, Norm, tar} = \frac{\left(1 + E_{tar}\right)^{-\left(CT_{Ex, tar} - CT_{Ctr, tar}\right)}}{\left(1 + E_{ref}\right)^{-\left(CT_{Ex, ref} - CT_{Ctr, ref}\right)}} \quad (6.6)$$

Tale espressione è generalizzata, prevedendo che le efficienze del gene target e reference non siano uguali ad 1 e non siano neanche tra loro uguali. Per tenere a mente più agevolmente tale espressione, la si può scrivere anche sotto quest'altra forma:

$$N_{0, Norm, tar} = \frac{\left(1 + E_{tar}\right)^{-\Delta CT_{tar}(Ctr \rightarrow Ex)}}{\left(1 + E_{ref}\right)^{-\Delta CT_{ref}(Ctr \rightarrow Ex)}} \quad (6.7)$$

Questa scrittura coincide con l'espressione (2.11) del modello di Pfaffl.

Nel caso si abbia, (amplificando il gene reference) $CT_{Ctr}=CT_{Ex}$ (in pratica quando i livelli basali del reference sono uguali sia nel campione che nel controllo) allora tutto ciò che è al denominatore diventa 1 e perciò l'espressione diventa molto più semplice:

$$N_{0, Norm, tar} = \left(1 + E_{tar}\right)^{-\Delta CT_{tar, (Ctr \rightarrow Ex)}} \quad (6.8)$$

Nell'assunzione che si abbia $E_{tar}=E_{ref}=E$ (non necessariamente uguale a 1) l'espressione si può così semplificare:

$$\begin{aligned} N_{0, Norm, tar} &= (1 + E) \left(-CT_{Ex, tar} + CT_{Ctr, tar} + CT_{Ex, ref} - CT_{Ctr, ref} \right) = \\ &= (1 + E) \left(-CT_{Ex, tar} + CT_{Ex, ref} + CT_{Ctr, tar} - CT_{Ctr, ref} \right) = \\ &= (1 + E) \left(-\Delta CT_{Ex, (ref \rightarrow tar)} + \Delta CT_{Ctr, (ref \rightarrow tar)} \right) = \\ &= (1 + E) \left(\Delta CT_{Ex, (ref \rightarrow tar)} - \Delta CT_{Ctr, (ref \rightarrow tar)} \right) = \\ &= (1 + E)^{-\Delta \Delta CT} \end{aligned} \quad (6.9)$$

Tale espressione corrisponde all'espressione (2.10) "generalizzata per l'efficienza" del metodo comparativo ($\Delta \Delta C_T$). Qualora il valore dell'efficienza sia molto prossima al 100%, allora $(1+E) \approx 1$ e perciò:

$$N_{0, Norm, tar} = 2^{-\Delta \Delta CT} \quad (6.10)$$

In tal modo si è dimostrata la formula classica (2.9) del metodo del Ct comparativo.

Bibliografia

- 1 Bernasconi S, Bona G, Bozzola M, Buzi F, De Luca F, Inghetti L, Loche S, Rondini G, Weber G. – La crescita patologica. Capitolo 2 in Bernasconi S, Lorenzo I, Ghizzoni L. *Endocrinologia pediatrica*. McGraw-Hill Companies 2000
- 2 Karlberg JP, Albertsson-Wikland K, Kwan EY, Lam BC, Low LC. The timing of early postnatal catch-up growth in normal, full-term infants born short for gestational age. *Horm Res*. 1997 ;**48** (suppl 1) :17–24.
- 3 Rona RJ, Tanner JM. Aetiology of idiopathic growth hormone deficiency in England and Wales. *Arch Dis Child*. 1977;**52**(3):197-208.
- 4 Thomas M, Massa G, Craen M, de Zegher F, Bourguignon JP, Heinrichs C, De Schepper J, Du Caju M, Thiry-Counson G, Maes M. Prevalence and demographic features of childhood growth hormone deficiency in Belgium during the period 1986-2001. *Eur J Endocrinol*. 2004;**151**:67-72.
- 5 Dattani MT. Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter? *Clinical endocrinology* 2005; **63**: 121-130.
- 6 Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, et all. Multistep control of pituitary organogenesis. *Sciences* 1997; **278**: 1809-12
- 7 Rizzoti K, Lovell-Badge R. Early development of the pituitary gland: induction and shaping of Rathke's pouch. *Rev Endocr. Metab. Disord*. 2005; **6**: 161-72.
- 8 Alatzoglou KS, Dattani MT. Genetic forms of hypopituitarism and their manifestation in the neonatal period. *Early Human Development* 2009; **85**; 705-712.
- 9 Savage JJ, Yaden BC, kiratipranon P, Rhodes SJ. Transcriptional control during mammalian anterior pituitary development. *Gene* 2003; **319**: 1-19.
- 10 Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, Treier M, Gleiberman AS, Szeto DP, Hooshmand F, Aggarwal AK, Rosenfeld MG. Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell*. 1999; **97**(5):587-98.
- 11 Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, Pfaff SL, Westphal H, Kimura S, Mahon KA. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development*. 1998; **125**(23):4835-40.
- 12 Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, Chuang PT, McMahan AP, Rosenfeld MG. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development*. 2001; **128**(3):377-86.
- 13 Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev*. 1999;**13**(4):484-94.
- 14 Amendt BA, Sutherland LB, Russo AF. Multifunctional role of the Pitx2 homeodomain protein C-terminal tail. *Mol Cell Biol*. 1999; **19**(10):7001-10.
- 15 Suszko MI, Lo DJ, Suh H, Camper SA, Woodruff TK. Regulation of the rat follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter by activin. *Mol Endocrinol*. 2003; **17**(3):318-32.

- 16 Hobert O, Westphal H. Functions of the LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* 2000; **16**:75-83.
- 17 Sloop KW, Meier BC, Bridwell JL, Parker GE, Schiller AM, Rhodes SJ. Differential activation of pituitary hormone genes by human Lhx3 isoforms with distinct DNA binding properties. *Mol Endocrinol.* 1999; **13**(12):2212-25.
- 18 Sloop KW, Showalter AD, Von Kap-Herr C, Pettenati MJ, Rhodes SJ. Analysis of the human LHX3 neuroendocrine transcription factor gene and mapping to the subtelomeric region of chromosome 9. *Gene.* 2000; **245**(2):237-43.
- 19 Sloop KW, Parker GE, Rhodes SJ. Transcriptional regulation in mammalian pituitary development and disease. *Current Genomics* 2001; **2**: 379-398.
- 20 Netchine I, Sobrier ML, Krude H, Schnabel D, Maghnie M, Marcos E, Duriez B, Cacheux V, Moers A, Goossens M, Grüters A, Amselem S. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet.* 2000; **25**(2):182-6.
- 21 Sobrier ML, Attié-Bitach T, Netchine I, Encha-Razavi F, Vekemans M, Amselem S. Pathophysiology of syndromic combined pituitary hormone deficiency due to a LHX3 defect in light of LHX3 and LHX4 expression during early human development. *Gene Expr Patterns.* 2004; **5**(2):279-84.
- 22 Machinis K, Pantel J, Netchine I, Léger 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. *Am J Hum Genet.* 2001; **69**(5):961-8.
- 23 Pfaeffle RW, Hunter CS, Savage JJ, Duran-Prado M, Mullen RD, Neeb ZP, Eiholzer U, Hesse V, Haddad NG, Stobbe HM, Blum WF, Weigel JF, Rhodes SJ. Three novel missense mutations within the LHX4 gene are associated with variable pituitary hormone deficiencies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; **93**(3):1062-71.
- 24 Machinis K, Amselem S. Functional relationship between LHX4 and POU1F1 in light of the LHX4 mutation identified in patients with pituitary defects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**: 5456-62.
- 25 Bentley CA, Zidehsarai MP, Grindley JC, Parlow AF, Barth-Hall S, Roberts VJ. Pax6 is implicated in murine pituitary endocrine function. *Endocrine.* 1999; **10**(2):171-7.
- 26 Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Vargas F, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M. Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum Mol Genet.* 1997; **6**(11):1847-53.
- 27 Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillessen-Kaesbach G, Roeder ER, Ming JE, Ruiz i Altaba A, Muenke M. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; **100**(23):13424-9.
- 28 Aijaz S, Clark BJ, Williamson K, van Heyningen V, Morrison D, Fitzpatrick D, Collin R, Ragge N, Christoforou A, Brown A, Hanson I. Absence of SIX6 mutations in microphthalmia, anophthalmia, and coloboma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; **45**(11):3871-6.
- 29 Dasen JS, Barbera JP, Herman TS, Connell SO, Olson L, Ju B, Tollkuhn J, Baek SH, Rose DW, Rosenfeld MG. Temporal regulation of a paired-like homeodomain

- repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev.* 2001; **15**(23):3193-207.
- 30 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 septo-optic dysplasia. *Hum Mol Genet.* 2001;**10**(1):39-45.
- 31 Chou SJ, Hermes E, Hatta T, Feltner D, El-Hodiri HM, Jamrich M, Mahon K. Conserved regulatory elements establish the dynamic expression of Rpx/HesxI in early vertebrate development. *Dev Biol.* 2006;**292**(2):533-45.
- 32 Scaffidi P, Bianchi ME. Spatially precise DNA bending is an essential activity of the sox2 transcription factor. *J Biol Chem.* 2001;**276**(50):47296-302.
- 33 Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, Chong WK, Kirk JM, Achermann JC, Ross R, Carmignac D, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest.* 2006;**116**(9):2442-55.
- 34 Kelberman D, Dattani MT. Hypothalamic and pituitary development: novel insight into the aetiology. *European Journal of Endocrinology* 2007; **157**: S3-S14.
- 35 Woods KS, Cundall M, Turton J, Rizzotti 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. *Am. J. Hum. Genet.* 2005; **76**: 833-849
- 36 Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev.* 2009;**30**(7):790-829.
- 37 Tatsumi K, Miyai K, Notomi T, Kaibe K, Amino N, Mizuno Y, Kohno H. Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nature Genet.* 1992; **1**: 56-58.
- 38 Olson LE, Dasen JS, Ju BG, Tollkuhn J, Rosenfeld MG. Paired-like repression/activation in pituitary development. *Recent Prog Horm Res.* 2003;**58**:249-61.
- 39 Vesper AH, Raetzman LT, Camper SA. Role of prophet of Pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. *Endocrinology.* 2006; **147**(4):1654-63.
- 40 Showalter AD, Smith TP, Bennett GL, Sloop KW, Whitsett JA, Rhodes SJ. Differential conservation of transcriptional domains of mammalian Prophet of Pit-1 proteins revealed by structural studies of the bovine gene and comparative functional analysis of the protein. *Gene.* 2002; **291**(1-2):211-21.
- 41 Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carrière C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature.* 1996; **384**(6607):327-33.
- 42 Cushman LJ, Showalter AD, Rhodes SJ. Genetic defects in the development and function of the anterior pituitary gland. *Ann Med.* 2002;**34**(3):179-91.

- 43 Raetzman LT, Ward R, Camper SA. Lhx4 and Prop1 are required for cell survival and expansion of the pituitary primordia. *Development*. 2002;**129**(18):4229-39.
- 44 Lin SC, Li S, Drolet DW, Rosenfeld MG. Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development*. 1994;**120**(3):515-22.
- 45 Kollias SS, Ball WS, Prenger EC. Review of the embryologic development of the pituitary gland and report of a case of hypophyseal duplication detected by MRI. *Neuroradiology* 1995; **37**:3-12.
- 46 Tillmann V, Tang VWM, Hughes DG, Wright NB, Clayton PE. Magnetic resonance imaging of the hypothalamic-pituitary axis in the diagnosis of growth hormone deficiency. *J. Pediatr. Endocrin. Metab.* 2000; **13**: 1577-1583.
- 47 Kornreich L, Horev G, Lazar L, Schwarz M, Sulkes J, Pertzalan A. MR findings in growth hormone deficiency: correlation with severity of hypopituitarism. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1998;**19**(8):1495-9.
- 48 Voutetakis A, Argyropoulou M, Sertedaki A, Livadas S, Xekouki P, Maniati-Christidi M, Bossis I, Thalassinou N, Patronas N, Dacou-Voutetakis C. Pituitary magnetic resonance imaging in 15 patients with Prop1 gene mutations: pituitary enlargement may originate from the intermediate lobe. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 ;**89**(5):2200-2206.
- 49 Léger J, Danner S, Simon D, Garel C, Czernichow P. Do all patients with childhood-onset growth hormone deficiency (GHD) and ectopic neurohypophysis have persistent GHD in adulthood? *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; **90**(2):650-6. (Epub 2004 Nov 16.)
- 50 Bozzola M, Mengarda F, Sartirana P, Tatò L, Chaussain JL. Long-term follow-up evaluation of magnetic resonance imaging in the prognosis of permanent GH deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2000;**143**(4):493-6.
- 51 Chen S, Léger J, Garel C, Hassan M, Czernichow P. Growth hormone deficiency with ectopic neurohypophysis: anatomical variations and relationship between the visibility of the pituitary stalk asserted by magnetic resonance imaging and anterior pituitary function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;**84**(7):2408-13.
- 52 Fujisawa I, Kikuchi K, Nishimura K, Togashi K, Itoh K, Noma S, Minami S, Sagoh T, Hiraoka T, Momoi T, et al. Transection of the pituitary stalk: development of an ectopic posterior lobe assessed with MR imaging. *Radiology.* 1987;**165**(2):487-9.
- 53 Simon D, Hadjiathanasiou C, Garel C, Czernichow P, Léger J. Phenotypic variability in children with growth hormone deficiency associated with posterior pituitary ectopia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;**64**(4):416-22.
- 54 Garel C, Léger J. Contribution of magnetic resonance imaging in non-tumoral hypopituitarism in children. *Horm Res.* 2007;**67**(4):194-202.
- 55 Castinetti F, Reynaud R, Saveanu A, Quentien MH, Albarel F, Barlier A, Enjalbert A, Brue T. Clinical and genetic aspects of combined pituitary hormone deficiencies *Ann Endocrinol (Paris).* 2008; **69**(1):7-17.
- 56 Herr W, Sturm RA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, Ingraham HA, Rosenfeld MG, Finney M, Ruvkun G, et al. The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes Dev.* 1988; **2**:1513-6.

-
- 57 Turton JP, Reynaud R, Mehta A, Torpiano J, Saveanu A, Woods KS, Tiulpakov A, Zdravkovic V, Hamilton J, Attard-Montalto S, Parascandolo R, Vella C, Clayton PE, Shalet S, Barton J, Brue T, Dattani MT. Novel mutations within the POU1F1 gene associated with variable combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; **90**:4762-70.
- 58 Ohta K, Nobukuni Y; Mitsubuchi H; Ohta T; Tohma T; Jinno Y; Endo F; Matsuda I. Characterization of the gene encoding human pituitary-specific transcription factor, Pit-1. *Gene* 1992; **122**: 387-388.
- 59 Coya R, Vela A, Pérez de Nanclares G, Rica I, Castano L, Busturia MA, Martul P. Panhypopituitarism: genetic versus acquired etiological factors. *J. Pediatr Endocrinol Metab* 2007; **20**: 27-36.
- 60 Cohen RN, Brue T, Naik K, Houlihan CA, Wondisford FE, Radovick S. The role of CPB/p300 interactions and Pit-1 dimerization in the pathophysiological mechanism of combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 239-247.
- 61 Scully KM, Jacobson EM, Jepsen K, Lunyak V, Viadiu H, Carrière C, Rose DW, Hooshmand F, Aggarwal AK, Rosenfeld MG. Allosteric effects of Pit-1 DNA sites on long-term repression in cell type specification. *Science.* 2000 Nov 10; **290**(5494):1127-31.
- 62 Quentien MH, Manfroid I, Moncet D, Gunz G, Muller M, Grino M, Enjalbert A, Pellegrini I. Pitx factors are involved in basal and hormone-regulated activity of the human prolactin promoter. *J Biol Chem.* 2002 ; **277**(46):44408-16.
- 63 Bach I, Rhodes SJ, Pearse RV 2nd, 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 synergizes with Pit-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; **92**(7):2720-4.
- 64 DiMattia GE, Rhodes SJ, Kronen A, Carrière C, O'Connell S, Kalla K, Arias C, Sawchenko P, Rosenfeld MG. The Pit-1 gene is regulated by distinct early and late pituitary-specific enhancers. *Dev Biol.* 1997 ; **182**(1):180-90.
- 65 Zhadanov AB, Bertuzzi S, Taira M, Dawid IB, Westphal H. Expression pattern of the murine LIM class homeobox gene Lhx3 in subsets of neural and neuroendocrine tissues. *Dev Dyn.* 1995; **202**(4):354-64.
- 66 Parker GE, Sandoval RM, Feister HA, Bidwell JP, Rhodes SJ. The homeodomain coordinates nuclear entry of the Lhx3 neuroendocrine transcription factor and association with the nuclear matrix. *J Biol Chem.* 2000; **275**(31):23891-8.
- 67 Rajab A, Kelberman D, de Castro SC, Biebermann H, Shaikh H, Pearce K, Hall CM, Shaikh G, Gerrelli D, Grueters A, Krude H, Dattani MT. Novel mutations in LHX3 are associated with hypopituitarism and sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet.* 2008; **17**(14):2150-9.
- 68 Bhangoo AP, Hunter CS, Savage JJ, Anhalt H, Pavlakis S, Walvoord EC, Ten S, Rhodes SJ. Clinical case seminar: a novel LHX3 mutation presenting as combined pituitary hormonal deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; **91**(3):747-53.
- 69 Pfaeffle RW, Savage JJ, Hunter CS, Palme C, Ahlmann M, Kumar P, Bellone J, Schoenau E, Korsch E, Brämswig JH, Stobbe HM, Blum WF, Rhodes SJ. Four novel mutations of the LHX3 gene cause combined pituitary hormone deficiencies with or without limited neck rotation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; **92**(5):1909-19.

- 70 Kriström B, Zdunek AM, Rydh A, Jonsson H, Sehlin P, Escher SA. A novel mutation in the LIM homeobox 3 gene is responsible for combined pituitary hormone deficiency, hearing impairment, and vertebral malformations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; **94**(4):1154-61.
- 71 Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development.* 1996; **122**(2):509-20.
- 72 Pevny L, Placzek M. Sox genes and neural progenitor identity. *Current Opinion in Neurobiology* 2005; **15**: 7-13.
- 73 Rizzoti K, Brunelli S, Carmignac D, Thomas PQ, Robinson IC, Lovell-Badge R. SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nat Genet.* 2004; **36**(3):247-55.
- 74 Solomon NM, Ross SA, Morgan T, Belsky JL, Hol FA, Karnes PS, Hopwood NJ, Myers SE, Tan AS, Warne GL, Forrest SM, Thomas PQ. Array comparative genomic hybridisation analysis of boys with X linked hypopituitarism identifies a 3.9 Mb duplicated critical region at Xq27 containing SOX3. *J Med Genet.* 2004; **41**(9):669-78.
- 75 Stankiewicz P, Thiele H, Schlicker M, Cseke-Friedrich A, Bartel-Friedrich S, Yatsenko SA, Lupski JR, Hansmann I. Duplication of Xq26.2-q27.1, including SOX3, in a mother and daughter with short stature and dyslalia. *Am J Med Genet A.* 2005; **138**(1):11-7.
- 76 Laumonier F, Ronce N, Hamel BCJ, 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. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; **71**:1450–1455.
- 77 Albrecht AN, Kornak U, Böddrich A, Süring K, Robinson PN, Stiege AC, Lurz R, Stricker S, Wanker EE, Mundlos S. A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Hum Mol Genet.* 2004; **13**(20):2351-9.
- 78 Salemi M, Romano C, Ragusa L, Di Vita G, Salluzzo R, Oteri I, Trovato ML, Romano C, Caraci F, Nicoletti F, Bosco P. A new 6-bp SOX-3 polyalanine tract deletion does not segregate with mental retardation. *Genet Test.* 2007; **11**(2): 124-7.
- 79 Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 2007; **131** (7): 1235–1247.
- 80 Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome". *Science* 2004; **305**: 525–528.
- 81 Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C.. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature Genetics* 2004; **36**: 949-51.
- 82 Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002; **30**(12): e57.

-
- 83 Rutledge RG, Côté. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research* 2003; **31**: No. 16 e93
- 84 Rasmussen R. (2001) Quantification on the LightCycler. In Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K.(eds) *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg, pp21-34
- 85 Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 2002; **30**: 503-512.
- 86 Integrated solutions - Real time PCR applications Critical factor for successful Real time PCR Qiagen 01/2004
- 87 Absolute quantitation using standard curve-getting started guide - Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Part Number 4347825 Rev.E 07/2006
- 88 User Bulletin No. 2. (1997) ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Revision A, pp. 11–13.
- 89 Johnson MR, Wang K, Smith JB, Heslin MJ, Diasio RB. Quantitation of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Expression by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* 2000; **278**: 175–184
- 90 Bubner B, Baldwin IB. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 2004; **23**:263–271.
- 91 Applied Biosystems: Relative Quantitation of Gene Expression. User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System 2001
- 92 Mason G, Provero P, Vaira AM, Accotto GP. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnology* 2002; **2**:20
- 93 Shou HX, Frame BR, Whitham SA, Wang K (2004) Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Breed* 2004; **13**:201–208
- 94 Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Comaret V, Puiseux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on Sybr-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BioMed Central Biotechnology* 2003; **3**:18
- 95 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001; **25**:402–408
- 96 Pfaffl MW. A new mathematical for relative quantification in real time RT-PCR *Nucleic acids research*, 2001; **29** No. 9 00
- 97 Cikos S, Bukovská A, Koppel J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology* 2007; **8**:113
- 98 Breslauer KJ, Frank R, Blöcker H, Marky LA. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1986; **83**:3746-50
- 99 Aurelius E, Johansson B, Sköldenberg B, Staland A, Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet.* 1991; **337**(8735):189-92.
- 100 Konieczny A, Ausubel FM. – A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 1993; **4**: 403-410.

- 101 Komori T, Nitta N. Utilization of the CAPS/dCAPS method to convert rice SNPs into PCR-based markers. *Breeding Sciences* 2005; **55**: 93-98.
- 102 Pein CD, Reuter M, Meisel A, Cech D, Krüger DH. Activation of restriction endonuclease EcoRII does not depend on the cleavage of stimulator DNA. *Nucleic Acids Res.* 1991; **19**:5139-42.
- 103 Baroncini C, Baldazzi L, Pirazzoli P, Marchetti G, Capelli M, Cacciari E, Bernardi F. Deletion breakpoints in a 32 bp perfect repeat located 45.1 Kb apart in the human growth hormone gene cluster. *Human Molecular Genetics* 1993; **2**(12):2151-3.
- 104 Esteban C, Audí L, Carrascosa A, Fernández-Cancio M, Pérez-Arroyo A, Ulied A, Andaluz P, Arjona R, Albisu M, Clemente M, Gussinyé M, Yeste D. Human growth hormone (GH1) gene polymorphism map in a normal-statured adult population. *Clinical Endocrinology* 2007; **66**: 258–268.
- 105 Autori vari – PCR technology-principles and applications for DNA amplification – Henry A. Erlich Editor 1989 (libro)
- 106 den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Human genetics* 2001; **109**: 121-124
- 107 Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J. forensic Sciences* 2010; **55**: 25-33
- 108 Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem.* 2004; **50**(7):1156-64.
- 109 Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2006; **6**:295.
- 110 Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Human mutation* 2004; **23**: 413-419.

Un ringraziamento di cuore

...a mia moglie Aurora che, con infinita pazienza, mi ha sempre sostenuto ed incoraggiato anche quando gli esperimenti non venivano ed tornavo a casa tardi ... e mi ha donato il piccolo Francesco, che, nonostante le notti insonni, è stato certamente il miglior "esperimento" compiuto durante il dottorato.