

**XXIV ciclo di Dottorato di Ricerca  
in Medicina Molecolare**

Relazione I anno

***BASSA STATURA IDIOPATICA: ANALISI  
MOLECOLARE DEI GENI SOCS2 E GHR***

Candidato: Stefania Riccomagno

Responsabile scientifico: prof. Gianni Bona

## Introduzione

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

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

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

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

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

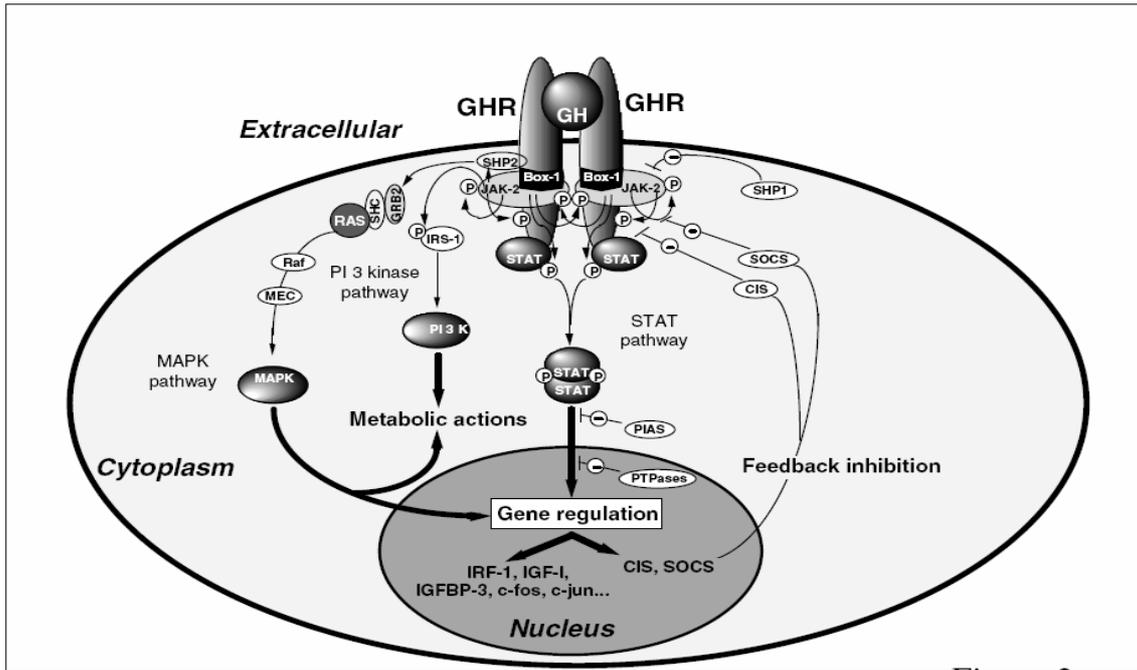


Fig.1: signaling del GHR

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

Recentemente è stato identificato un meccanismo di attenuazione del segnale del GH che coinvolge membri di una famiglia di proteine, denominate soppressori del segnale delle citochine o SOCS (figura 2).[\[4\]](#)

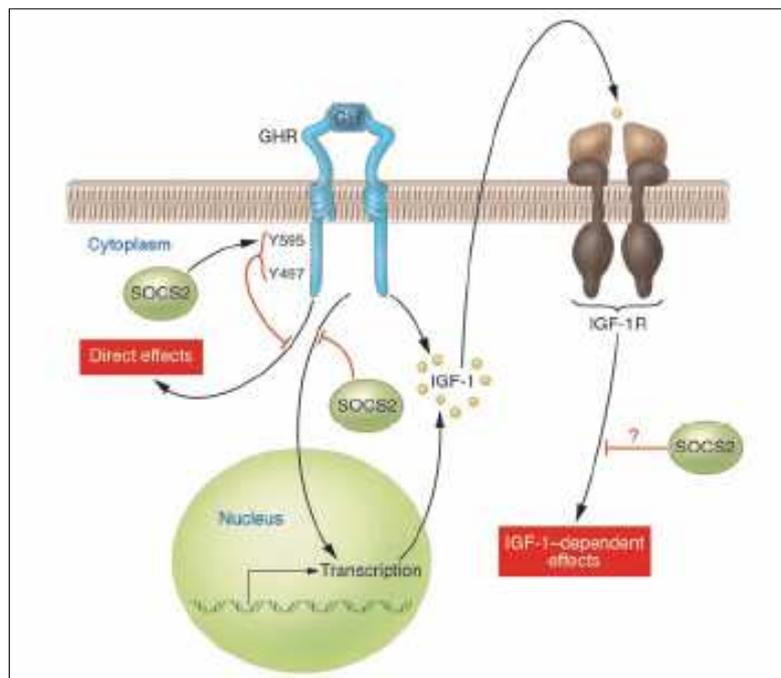


Fig.2: meccanismo d'azione di SOCS2; D.LeRoith et al., The Journal of Clinical Investigation (2005)

La famiglia di SOCS comprende 8 componenti, SOCS 1-7 e CIS, caratterizzati da un dominio SH2 centrale, un dominio SOCS box al C-terminale e un dominio N-terminale variabile (figura 3). Le proteine SOCS sono elementi regolatori negativi che agiscono secondo un meccanismo a feedback negativo, vengono espresse in risposta all'attivazione di un ampio numero di citochine e fattori di crescita, in particolar modo da quelli che trasducono il segnale mediante il sistema JAK/STAT.[5]

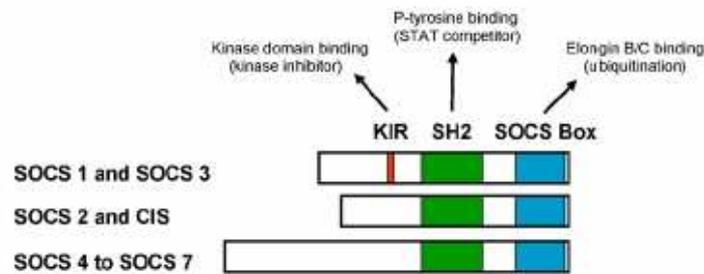


Fig.3: struttura delle proteine SOCS; E.Rico-Bautista, Cytokine & Growth Factor Reviews (2006)

Lo studio del topo knock-out per *SOCS2*<sup>-/-</sup> ha evidenziato il coinvolgimento di tale proteina nella regolazione del segnale del GH, infatti i topi deleti per il gene *SOCS2* manifestavano una forma di gigantismo [6]; inoltre, *SOCS2* interagisce con il recettore del GH a livello degli stessi residui di tirosina (tyr595 e tyr487) che vengono fosforilati da JAK2 durante l'attivazione del segnale. Studi precedenti avevano dimostrato come questi siti fossero importanti per il legame al recettore di SHP2, una fosfatasi coinvolta nella regolazione del segnale del GH, che agisce defosforilando il recettore e/o le molecole di JAK2.

E' stato quindi ipotizzato che *SOCS2* regoli il segnale del GH mediante interazione diretta con il recettore o indirettamente inibendo in maniera competitiva l'azione di SHP2.[7]

Sulla base di tali evidenze, ho svolto l'analisi molecolare del gene *SOCS2* in un gruppo di soggetti in età pediatrica affetti da BSI, al fine di identificare delle possibili variazioni di sequenza nelle regioni regolatorie e codificanti di questo gene, coinvolte nella patogenesi della BSI. *SOCS2*, infatti, potrebbe essere implicato in tutte le condizioni di bassa statura, sia nei soggetti con secrezione normale di GH e bassi livelli di IGF1, in cui sia stato escluso un difetto a livello del GHR, sia nei soggetti che mostrano una secrezione normale di GH e IGF1, visto che *SOCS2* è anche coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale del recettore di IGF1.[8]

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

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

Le forme più gravi di GHI, conosciute come Sindrome di Laron (GHI classica), sono causate da mutazioni omozigoti del *GHR*; i pazienti che mostrano un fenotipo meno severo vengono definiti atipici e sono caratterizzati da BSI. Ad oggi solo il 5% dei pazienti con BSI presenta mutazioni eterozigoti a carico del *GHR*, mentre nella maggior parte dei casi l'eziologia rimane ancora sconosciuta.

## Materiali e metodi

### Fase di campionamento

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

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

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

Sono stati reclutati in totale 102 (56M/46F) pazienti, afferenti sia al nostro centro che ai centri partecipanti al progetto, suddivisi in: 77 casi di bassa statura idiopatica, 21 casi di bassa statura familiare 4 casi con ritardo di crescita costituzionale. Questi ultimi sono stati presi in considerazione per la severità del fenotipo, che aveva una forte indicazione ad evolversi in bassa statura. E' stato anche selezionato un gruppo di 80 soggetti sani di statura normale, da utilizzare come gruppo di controllo per il confronto delle frequenze alleliche delle variazioni riscontrate.

Considerando i livelli di IGF1, tra i soggetti con BSI sono stati selezionati 45 (24M/21F) pazienti con bassa secrezione di IGF1 per la valutazione del gene del GHR. In questo caso è stato utilizzato un gruppo di controllo composto da 30 soggetti sani di statura normale.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazioni auxologiche e ormonali. Dal punto di vista auxologico in ciascun soggetto è stata misurata l'altezza con lo statimetro di Harpenden, in modo da ottenere una misura precisa per definire il percentile dell'altezza;

la velocità di crescita è stata valutata utilizzando due misure dell'altezza a distanza di almeno 6 mesi una dall'altra. Sono stati esclusi bambini con: malformazioni congenite, anomalie cromosomiche, malattie croniche e autoimmuni, precedenti terapie con rhGH o steroidi, grave ritardo psicomotorio.

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

#### Analisi molecolare

Il gene *SOCS2* è formato da 3 esoni, di cui solo parte del secondo e il terzo codificanti per una proteina di 198 aminoacidi; il gene *GHR* è formato da 10 esoni, di cui solo il primo non codificante. Per entrambi i geni la ricerca di variazioni di sequenza è stata effettuata negli esoni e nelle regioni introniche adiacenti. Il DNA genomico, amplificato mediante PCR con primers specifici, è stato analizzato tramite DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography); questa tecnica consente di identificare direttamente gli individui eterozigoti attraverso la formazione di molecole heteroduplex, che vengono eluite dalla colonna ad un tempo di ritenzione minore rispetto alle molecole homoduplex.

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

## Risultati

### Analisi del gene *SOCS2*

Dallo screening di 102 pazienti ho identificato due polimorfismi (SNPs) già descritti, rs2200160 C→T e rs1498708 C→T, in condizioni sia di eterozigosi che di omozigosi; entrambi cadono nel primo esone non codificante del gene. Inoltre, in tre soggetti ho trovato una nuova variazione C→G in condizione di eterozigosi, in posizione -172 dal primo codone tradotto. (figura 4)

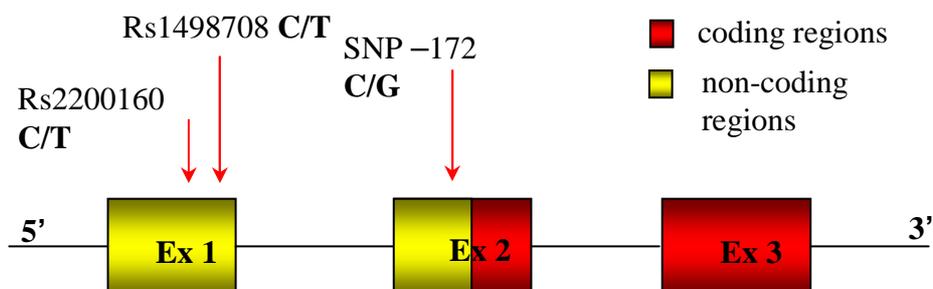


Fig.4: struttura del gene *SOCS2*, le frecce indicano la posizione degli SNP trovati

Le frequenze alleliche delle varianti polimorfiche trovate nei pazienti sono risultate del tutto sovrapponibili a quelle trovate nel gruppo di controllo; infatti la frequenza di T per lo SNP rs2200160 è pari a 0,13 nei pazienti e 0,15 nei controlli. Per lo SNP rs1498708 la frequenza allelica di T è pari a 0,27 e 0,22 rispettivamente nelle BS e nei controlli. Anche la frequenza di G in -172 da ATG è sovrapponibile tra BS e controlli, essendo rispettivamente pari a 0,015 e 0,01.

### Analisi del gene *GHR*

In sintesi, ho evidenziato la presenza di 5 polimorfismi (SNPs) già descritti: rs6179 (A/G) nell'esone 6; rs6176 (C/T), rs6180 (A/C) e rs6182 (G/T) nell'esone 10, tutti in condizioni sia di eterozigosi che di omozigosi; in 5 soggetti è stata identificata la delezione dell'esone 3.

Le frequenze alleliche di questi SNPs risultano sovrapponibili a quelle trovate nel gruppo di controllo. (tabella 1)

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

Tab.1: frequenze alleliche

Inoltre in 30 soggetti ho trovato una nuova delezione di una G nell'IVS7 del gene, in posizione -58 dall'ATG dell'esone 8, sia in eterozigosi che in omozigosi, con una frequenza di 0,53 per l'allele G nei pazienti. La stessa delezione è stata trovata anche nei controlli con una frequenza simile (G=0,58).

Infine, in 4 soggetti ho trovato la mutazione R179C, in condizione di eterozigosi, in posizione 535 nella regione codificante dell'esone 6. Questa singola mutazione non-sinonima determina una sostituzione aminoacidica Arg→Cys (CGC>TGC) in posizione 179 della proteina, a livello del dominio extracellulare del recettore; tale mutazione non è stata trovata nei 30 soggetti del gruppo di controllo.

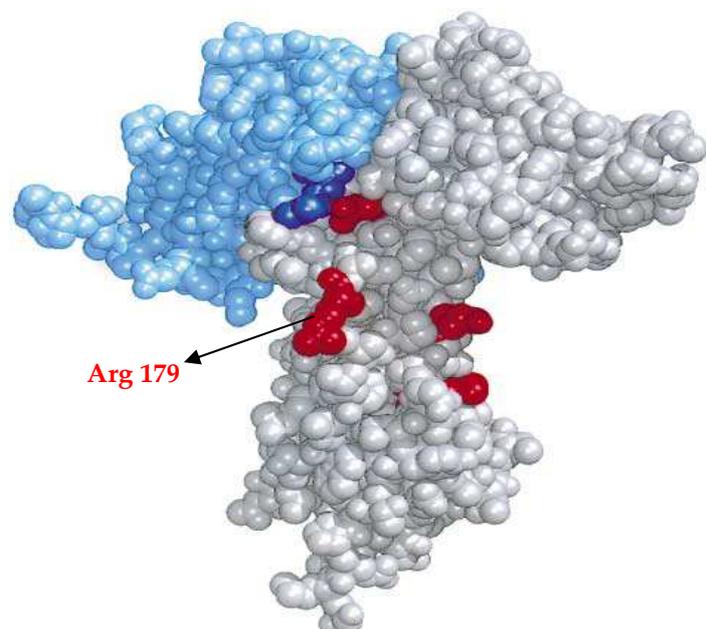


Fig.5: struttura tridimensionale del complesso GH-GHR (blu-grigio), in rosso è indicata la posizione delle mutazioni associate alla BSI; A.D.Goddard, The New England Journal of Medicine (1995)

## Discussione

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

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

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

Negli ultimi anni sono state chiarite le basi genetiche in alcune forme di bassa statura da deficit di GH isolato o associato a deficit ipofisari multipli, mentre restano ancora da definire i meccanismi alla base dei ritardi di crescita GH-indipendenti. Studi sui topi knockout hanno dimostrato l'importanza del ruolo svolto dai fattori di crescita insulino-simili nello sviluppo fetale e postnatale; si è quindi ipotizzato che minime alterazioni dei mediatori dei segnali intra ed extracellulari del sistema GH-IGFs possano essere responsabili di alcuni casi di BSI.<sup>[11]</sup>

Sulla base di tali evidenze, si è deciso di focalizzare l'attenzione sui meccanismi post-recettoriali della trasduzione del segnale di GH. In particolare, per lo studio dei mediatori coinvolti nella regolazione negativa del signaling di GHR abbiamo effettuato uno

screening mutazionale del gene *SOCS2*, con l'obiettivo di trovare variazioni di sequenza significative, che potessero rappresentare la causa molecolare della BSI.

Come illustrato nei risultati, per il gene *SOCS2* sono stati identificati tre polimorfismi di cui uno solo non ancora descritto in letteratura; dalle frequenze alleliche di tali SNPs risulta però evidente che non ci sono differenze tra i pazienti e i controlli. Inoltre non sono state trovate mutazioni in questo gene.

In conclusione, i dati ottenuti suggeriscono che non esiste un'associazione significativa tra le variazioni identificate e la condizione di bassa statura; *SOCS2* quindi non sembra essere coinvolto nella patogenesi della BSI.

Per quanto riguarda l'analisi del gene *GHR*, i risultati sono incompleti perché lo screening mutazionale è ancora in corso. Fino ad ora, l'unico dato significativo è la presenza della mutazione R179C, trovata in quattro pazienti in condizioni di eterozigosi; per chiarire gli effetti di tale mutazione sto pianificando studi funzionali in vitro.

## **Bibliografia**

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

## **Partecipazione a seminari interni al Dipartimento di Scienze Mediche**

05-12-08 prof. L. Santi  
12-12-08 prof. A. Uccelli  
09-01-09 prof. R. Troncone  
13-01-09 prof. F. Zaja  
27-01-09 prof. M. Salvetti  
10-02-09 prof. A. Musarò  
20-02-09 prof. G. Del Sal  
26-02-09 prof. M. Maccarone  
18-03-09 prof. P. Pucci  
19-03-09 prof. G. Peluso  
09-04-09 prof. S. Mantero  
22-04-09 prof. D. Schiffer  
30-04-09 prof. A. Sica  
05-05-09 prof. A. Columbano  
06-05-09 prof. B. Palazzo  
11-05-09 prof. B. Gopalakrishnan  
12-05-09 prof. G. Poli  
12-05-09 prof. A. Poletti  
14-05-09 prof. S. Gustincich

**Corsi frequentati:** journal club in lingua inglese, prof. Mara Giordano

## Comunicazioni a congressi

### Poster:

- Riccomagno S., Moia S., Bellone S., Petri A., Vivenza D., Godi M., Prodam F., Corneli G., Valenzise M., Giordano M., Momigliano-Richiardi P., Bona G. *“Role of SOCS2 in regulating GH signaling: screening of variations associated with idiopathic short stature, preliminary data”*; 47° Annual Meeting of ESPE 2008, 20-23 settembre Istanbul
- Riccomagno S., Moia S., Bellone S., Petri A., Trovato L., Prodam F., Walker G.E., Salerno M., Valenzise M., Bona G. *“Molecular analysis of GHR gene in children with idiopathic short stature and partial GH insensitivity”*; 91° Annual Meeting of ENDO 2009, 10-13 giugno Washington DC

## Congressi frequentati

- *“Le obesità genetiche: dalla fisiopatologia alla clinica”*, 2 ottobre 2009, Villa Caramora Verbania
- *“Trattamento con IGF1 ricombinante: aspetti fisiopatologici e clinici”*, 9 ottobre 2009, Villa Caramora Verbania

