

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

Relazione II anno



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

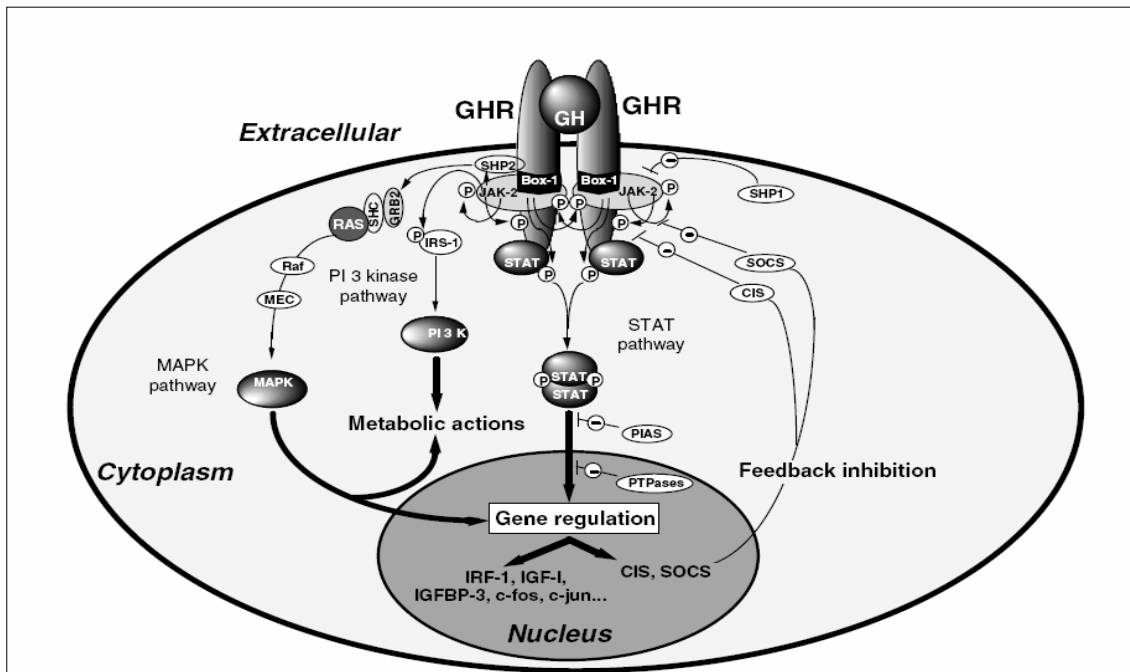


Fig.1: signaling del GHR

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.

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

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

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

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

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

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

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.

Considerando i livelli di IGF1, tra questi soggetti sono stati selezionati 45 (24M/21F) pazienti con bassa secrezione di IGF1 per la valutazione del gene del GHR, è stato utilizzato un gruppo di controllo composto da 40 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 *GHR* è formato da 10 esoni che codificano per una proteina di 620 aminoacidi; la ricerca di variazioni di sequenza è stata effettuata negli esoni e nelle regioni introniche adiacenti. Il DNA genomico, amplificato mediante PCR con primers specifici, è stato analizzato tramite DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography); questa tecnica consente di identificare direttamente gli individui eterozigoti attraverso la formazione di molecole heteroduplex, che vengono eluite dalla colonna ad un tempo di ritenzione minore rispetto alle molecole homoduplex.

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

Studio funzionale

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

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

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

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

Risultati

Analisi del gene GHR

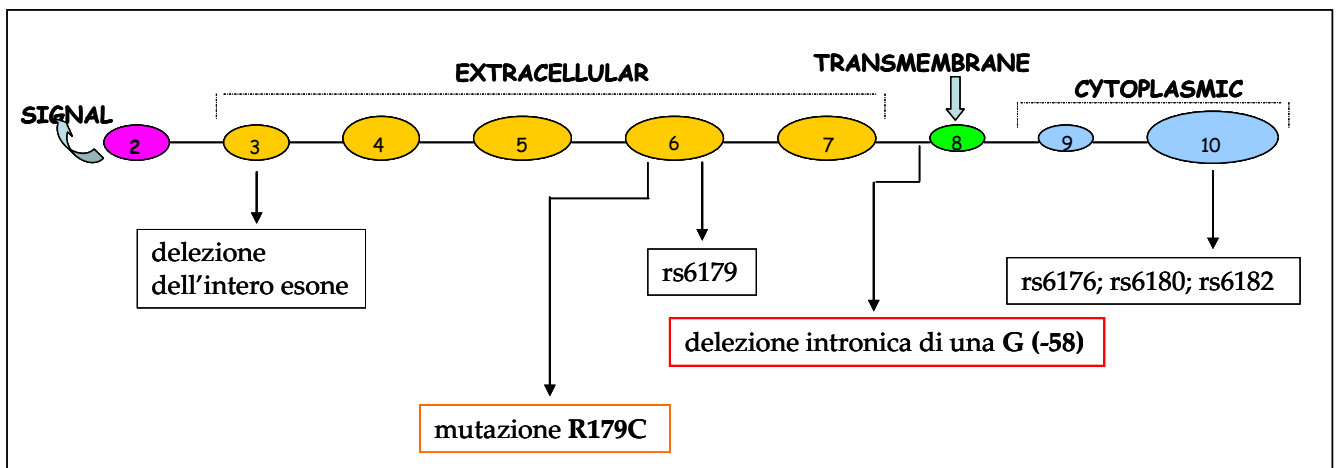
In sintesi, ho evidenziato la presenza di 5 polimorfismi (SNPs) già descritti: rs6179 (A/G) nell'esone 6; rs6176 (C/T), rs6180 (A/C) e rs6182 (G/T) nell'esone 10, tutti in condizioni sia di eterozigosi che di omozigosi; in 5 soggetti è stata identificata la delezione dell'esone 3, ad oggi considerata polimorfica (fig.2). 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 (fig.2), 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).

Fig.2: struttura del gene GHR, le frecce indicano la posizione delle variazioni trovate



Infine, in 4 soggetti ho trovato la mutazione R179C, in condizione di eterozigosi, in posizione 535 nella regione codificante dell'esone 6 (fig.2). 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 (fig.3); tale mutazione non è stata trovata nei 40 soggetti del gruppo di controllo.

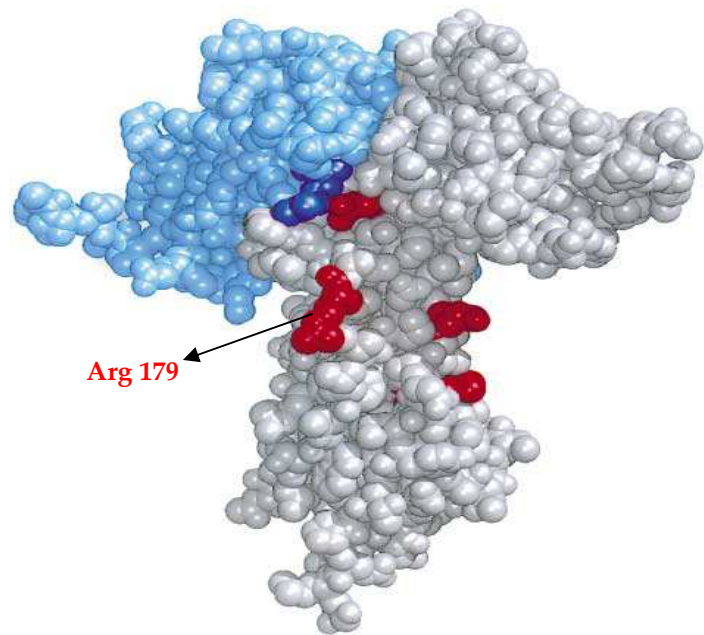
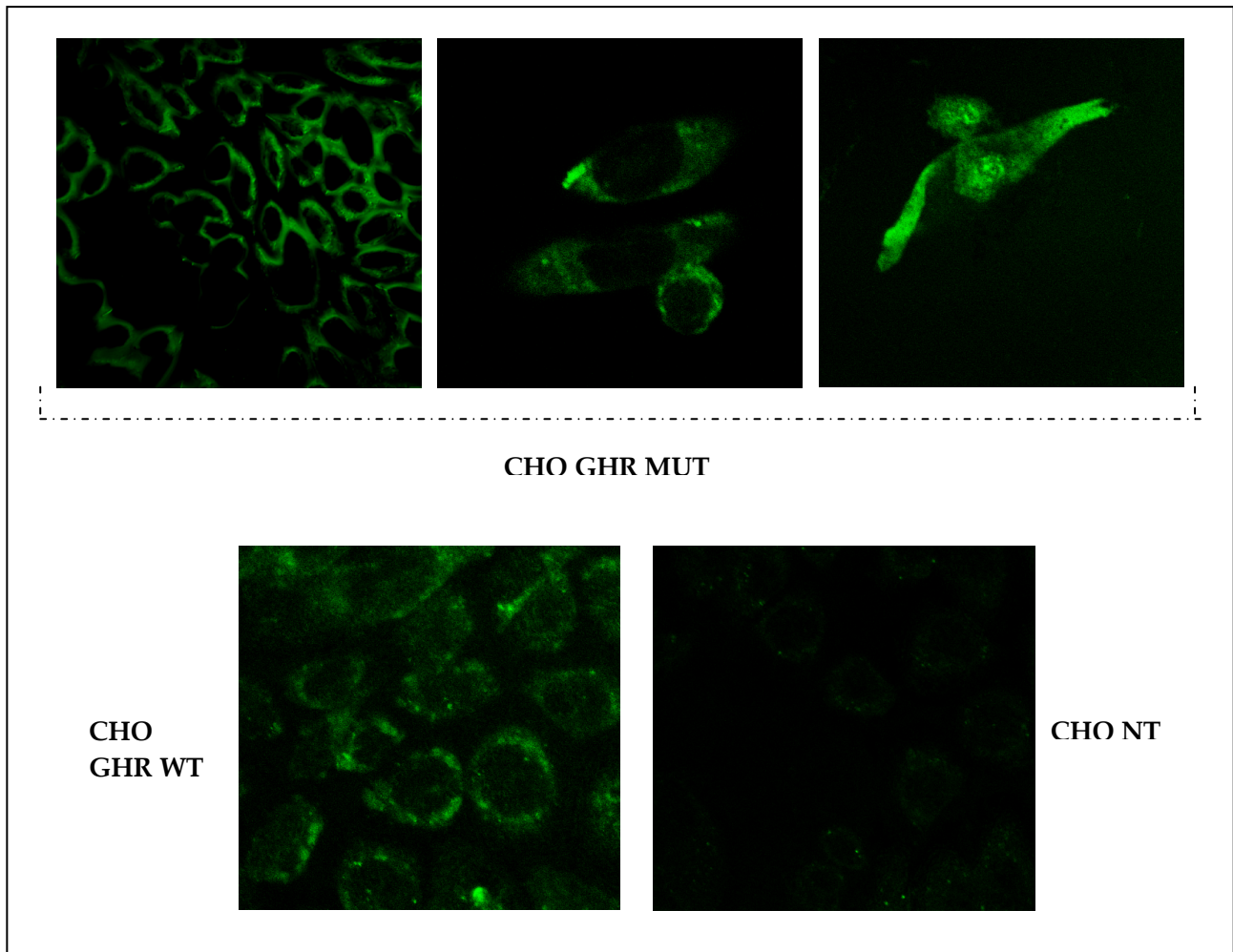


Fig.3: struttura tridimensionale del complesso GH-GHR (blu-grigio), in rosso è indicata la posizione delle mutazioni note associate alla BSI; A.D.Goddard, The New England Journal of Medicine (1995)

Analisi al microscopio confocale

Per valutare i possibili effetti della mutazione sulla traslocazione in membrana del recettore, ho analizzato al confocale i vetrini con CHO/ghr wilde-type (wt), CHO/ghr mutato (mut) e CHO non trasfettate (nt); dalle immagini, acquisite in tre diversi esperimenti, risulta evidente che non ci sono differenze significative nell'espressione di GHR nelle CHO mut rispetto alle CHO wt, mentre si nota la mancanza di fluorescenza nelle CHO nt (fig.4).

Fig.4: immagini al confocale di cellule CHO

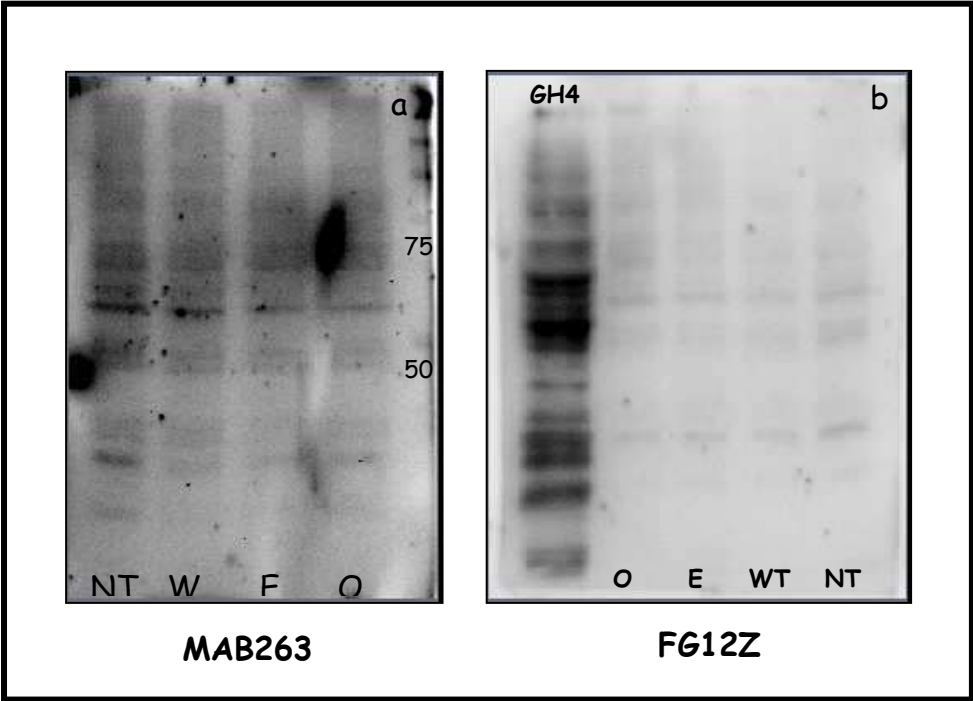


Western Blotting

Per verificare la corretta espressione di GHR, e la possibile presenza di variazioni dovute alla mutazione, ho analizzato con western blotting i lisati totali delle CHO trasfettate, utilizzando due diversi anticorpi: MAB263 (mouse monoclonale), che riconosce la proteina intera (fig.5a), e FG12Z (mouse monoclonale), che lega il dominio extracellulare del recettore (fig.5b). Ho utilizzato CHO non trasfettate come controllo negativo e cellule ipofisarie di topo GH4 come controllo positivo.

I risultati ottenuti non sono significativi, entrambi gli anticorpi mostrano attività aspecifica, senza differenze tra le diverse condizioni sperimentali; inoltre, sono assenti le bande a 85kDa e 115-135 kDa, corrispondenti al GHR (fig.5).

Fig5: immagini SDS-PAGE; NT= CHO non trasfettate, WT= CHO trasfettate con ghr wilde type, E= CHO trasfettate con mutazione R179C in eterozigosi, O= CHO trasfettate con mutazione R179C in omozigosi.



Discussione

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

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

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

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

Sulla base di tali evidenze, si è deciso di focalizzare l'attenzione sul meccanismo di trasduzione del segnale del GH, in particolare sull'attività del recettore del GH (GHR); in 45 pazienti BSI con bassa secrezione di IGF1 è stato fatto uno screening mutazionale per il

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

L'analisi delle sequenze esoniche ed introniche ha rilevato la presenza di 5 polimorfismi già noti e di una variazione intronica non ancora descritta.

Il dato più significativo, però, è la presenza della mutazione R179C, trovata in quattro pazienti in condizioni di eterozigosi; questa mutazione puntiforme determina una sostituzione aminoacidica da Arginina (R) a Cisteina (C) in posizione 179 nel dominio extracellulare del recettore, responsabile del legame con GH.

E' stata trovata per la prima volta nel 1993 in un paziente con Sindrome di Laron e poi descritta in un paziente BSI nel 1995, ma finora in letteratura esistono solo ipotesi relative ai possibili effetti di tale mutazione sul funzionamento di GHR.

Considerando la posizione critica di tale mutazione, è possibile che l'introduzione di una cisteina dispare "spaiata" determini cambiamenti conformazionali nel recettore, con conseguente alterazione della dimerizzazione di GHR e ridotta affinità di legame per il GH. Per verificare tale ipotesi, è stato fatto uno studio funzionale della mutazione R179C, tuttora in corso.

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

I risultati dell'analisi con western blotting sono incompleti, ma comunque non significativi, probabilmente a causa dell'utilizzo di anticorpi non adeguati alle condizioni sperimentali.

In conclusione, restano da chiarire i possibili effetti della mutazione sulla cascata di segnalazione del GHR; quindi le prospettive future di questo progetto sono: il completamento degli studi funzionali per la mutazione R179C, con saggi di binding con GH radioattivo e analisi con western blotting di CHO mut stimulate con GH; l'aumento del numero di pazienti e controlli analizzati.

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

14-10-09 prof. Camaschella
04-11-09 prof. Ongini
17-11-09 prof. Inghirami
30-11-09 prof. Mermod
14-12-09 prof. Grassi
20-01-10 prof. Battaglioli
28-12-10 prof. Maiuri
09-02-10 prof. Baldi
11-02-10 prof. Garzino
17-02-10 prof. Pieraccini
03-03-10 prof. Cucca
29-04-10 prof. Prodam
26-05-10 prof. Tafer
04-06-10 prof. Senna
14-06-10 prof. Schiffer
15-06-10 prof. Ponzetto
17-06-10 prof. Ellis
28-06-10 prof. Zamboni
30-06-10 prof. Novelli
05-07-10 prof. Camoletto

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
- Riccomagno S, Moia S, Bellone S, Petri A, Trovato L, Prodam F, Walker G.E, Salerno M, Valenzise M.C, Bona G. *“Analisi molecolare del gene GH-R in bambini con bassa statura idiopatica e parziale insensibilità al GH”* XVII Congresso Nazionale SIEDP Napoli, 5-7 novembre 2009

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
- XVII Congresso Nazionale Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica (SIEDP) Napoli, 5-7 Novembre 2009
- 49th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) Prague- Czech Republic 22-25 September 2010

