

## **Titolo divulgativo**

Una prospettiva epigenetica per valutare la risposta alla terapia con ormone della crescita

## **Titolo scientifico**

Ruolo dei miRNA come predittori di risposta all'Ormone della Crescita (GH) in pazienti con deficit di GH

## **Responsabile**

**Sabrina Angelini**, Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna

## **Gruppo di Studio**

**Dr.ssa Maria E Street**, Dipartimento di Ostetricia, Ginecologia e Pediatria, Divisione di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica, Azienda USL-IRCCS di Reggio-Emilia

## **Background**

La terapia sostitutiva con ormone della crescita (GH), effettuata nei casi di deficit di tale ormone, serve a riportare gradualmente la statura del bambino verso il tasso di crescita che avrebbe avuto in condizioni di normalità (Hindmarsh, et al., 2006). L'avvento della terapia con GH ha sicuramente rappresentato una rivoluzione sia in termini clinici, che per la qualità della vita di molti pazienti (bambini). Ad oggi tuttavia, la risposta di crescita nei pazienti in terapia con GH è estremamente variabile poiché influenzata, non soltanto da condizioni basali del paziente, ma anche da una individuale sensibilità innata alla terapia. Frequentemente accade che la velocità di crescita effettiva non coincida con quella prevista e che il grado di correlazione tra parametri clinico-auxologici e dose e picco di GH vari enormemente, sia a livello intra-individuale durante il trattamento che inter-individuale (pazienti di età inferiore ai 3 anni hanno una risposta maggiore nel primo anno di trattamento rispetto a pazienti meno giovani). Si corre il rischio che alcuni pazienti ricevano una dose insufficiente o troppo elevata di GH e che non raggiungano in altezza il target genetico. Attualmente, nel tentare di migliorare la risposta di crescita, si sta provando ad utilizzare nella pratica clinica dei dispositivi medici su piattaforma Web. Tuttavia, questi strumenti interattivi utilizzano algoritmi universali basati su modelli di previsione di crescita costruiti raccogliendo dati clinici depositati su databases internazionali. Di conseguenza, stabilire quale sia la strategia di trattamento più efficace per il singolo paziente e fornire in tempi rapidi previsioni precise circa le prospettive di crescita, rappresenta una sfida considerevole per il medico nella pratica clinica quotidiana. Si rende quindi necessario ottimizzare il trattamento con GH in termini di crescita, sicurezza e costi per ciascun bambino, sia all'inizio della terapia che durante il monitoraggio dell'effetto del trattamento stesso. In questo scenario d'incertezza, la chiave per un miglioramento significativo è la ricerca volta a identificare marcatori di risposta alla terapia con GH. In questo contesto, il progetto, condotto in collaborazione con il Dipartimento di Ostetricia, Ginecologia e Pediatria, Divisione di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica, Azienda USL-IRCCS di Reggio-Emilia, è stato finalizzato alla definizione di un profilo di microRNA (miRNA), piccole molecole endogene di RNA non codificante che agiscono come regolatori post-trascrizionali (Bartel, 2009). Lo studio si basa sull'ipotesi che i livelli sierici di alcuni miRNA cambino in seguito al trattamento con GH e mostrino una correlazione con le misurazioni auxologiche standard e pertanto possano fornire, in prospettiva, indicazioni utili relative alla risposta al trattamento. I miRNA sono lunghi circa 22 nucleotidi e riconoscono, appaiandosi, siti di legame complementari, generalmente localizzati nelle regioni 3' non tradotte (3' UTR) degli mRNA bersaglio (Pillai et., 2007). Dopo essersi legati, i miRNA innescano un processo che può portare o alla degradazione dei trascritti o all'inibizione della loro traduzione (Pillai et al., 2007). Molecole di RNA non codificante si sono rivelate importanti da un punto di vista funzionale; tuttavia, rimane ancora da chiarire il ruolo biologico della maggior parte di essi. Studi recenti hanno evidenziato che i miRNA sono coinvolti nella regolazione di alcune vie metaboliche (Timmonson, 2006; Faghihi et al., 2008). I miRNA, importanti regolatori di vie metaboliche, sono attualmente studiati come biomarcatori di malattia e di risposta al trattamento farmacologico. Recentemente, uno studio ha evidenziato che quattro miRNA cambiano in seguito al trattamento con l'ormone della crescita (GH) (Kelly et al., 2014), ed uno studio *in vitro* ha dimostrato che il recettore del

GH può essere regolato da miRNA specifici suggerendo che questo sistema di regolazione è probabilmente importante per l'asse del GH (Elzein, 2014).

### Obiettivo dello studio

Il progetto ha previsto la valutazione dei livelli di espressione dei miRNA circolanti in pazienti prepuberi con deficit isolato idiopatico di Ormone della Crescita (GH) secondo le indicazioni della Nota AIFA 39. I pazienti sono stati reclutati seguendo adeguati criteri di inclusione ed esclusione e seguiti per un periodo di 12 mesi di trattamento con GH. L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare differenze nei livelli dei miRNA in seguito al trattamento con GH e successivamente di verificare la relazione tra i miRNA selezionati e i parametri auxologici e la velocità di crescita durante il periodo di osservazione.

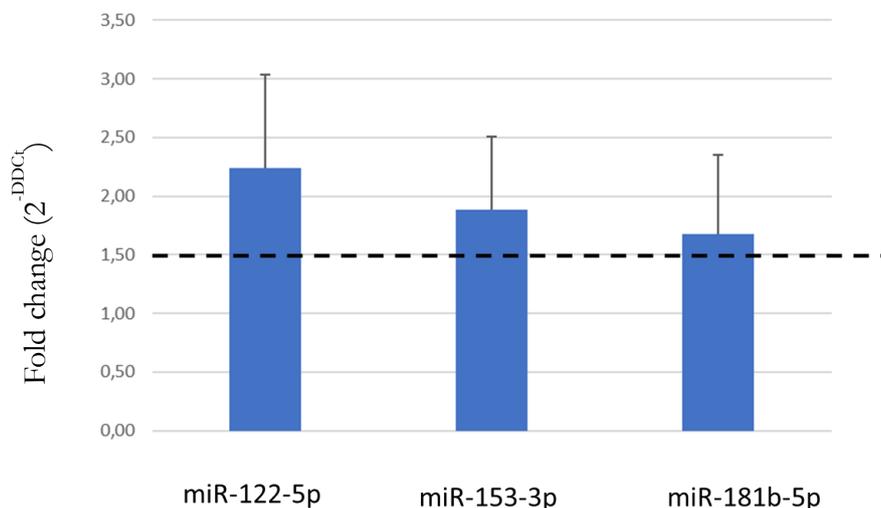
### Metodologia e analisi statistica

Nella prima fase del progetto è stato iniziato il reclutamento e, ad oggi, sono stati arruolati 25 pazienti (12 M, età:  $9,68 \pm 0,54$  anni; 13 F, età:  $13 \pm 0,92$  anni) nei quali è confermata la diagnosi di deficit isolato idiopatico di GH (Nota AIFA 39). I livelli dei miRNA sono stati valutati tramite un approccio di Global Profiling utilizzando le TaqMan Advanced Human microRNA Card A. L'analisi di global profiling è stata effettuata su 3 pazienti, due maschi e una femmina, e per ognuno sono stati valutati i campioni prelevati a due tempi pre-terapia (3 mesi prima -  $T_{-3}$  e prima d'iniziare -  $T_0$ ) ed un campione prelevato 3 mesi dopo l'inizio della terapia ( $T_{+3}$ ). I due campioni pre-terapia sono stati valutati per escludere quei miRNA che variano indipendentemente dalla terapia (miRNA associati alla malattia); ed il campione post-terapia è stato analizzato per vedere quali miRNA variassero precocemente in seguito alla terapia con GH. I risultati del global profiling sono stati normalizzati per il controllo endogeno (16S). I miRNA sono stati definiti deregolati (up- o down-regolati) in seguito alla terapia in base al cambiamento d'espressione calcolato secondo la regola  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . In particolare sono stati selezionati i miRNA up- o down-regolati definiti come  $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1,5$  o  $2^{-\Delta\Delta Ct} < -1,5$  rispettivamente. I miRNA identificati come differenzialmente espressi sono stati analizzati *in silico* mediante l'utilizzo delle banche dati TargetScan e miRDB per valutare quali fossero i loro geni target validati e selezionare i miRNA da validare in una popolazione più ampia.

### Risultati e discussione

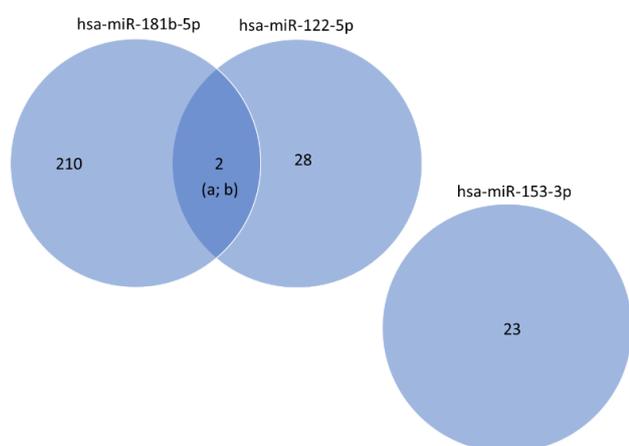
*Analisi dei miRNA* - Complessivamente sono stati identificati 25 miRNA deregolati (15 up-regolati e 5 down-regolati). Tra questi, l'analisi *in silico* ha evidenziato che tre miRNA - miR-122-5p, miR-153-3p e miR-181b-5p - hanno come target validati geni coinvolti nel processo di accrescimento. In particolare, È importante notare che i geni targettati da miR-122-5p, miR-153-3p e miR-181b-5p sono coinvolti nel rimodellamento dell'osso e nella via di segnalazione del GH.

Questi tre miRNA, tutti up-regolati ( $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1,5$ ); sono stati successivamente validati in 10 pazienti pediatrici in trattamento con GH da 6 mesi. L'analisi ha confermato che questi tre miRNA sono up-regolati (Fig 1).



**Figura 1.** miRNA up-regolati dopo 6 mesi di trattamento con GH in 10 pazienti.

L'analisi in silico ha evidenziato miR-122-5p presenta 28 target validati, miR-153-3p 23 target e miR-181b-5p 210 target. Da un'analisi più approfondita è emerso che miR-181b-5p e miR-122-5p hanno 2 geni target in comune (NFAT5 e NPEPPS) (Fig 2).



**Figura 2.** Numero di geni target validati per i miRNA analizzati;

a. NFAT5: Nuclear Factor of Activated T Cells 5;  
b. NPEPPS: Aminopeptidase Puromycin Sensitive.

NFAT5 codifica per una proteina della famiglia dei fattori di trascrizione nuclear factors of activated T cells. Le proteine che appartengono a questa famiglia svolgono un ruolo chiave nella trascrizione inducibile dei geni durante la risposta immunitaria. Inoltre, questa proteina regola l'espressione genica indotta dallo stress osmotico nelle cellule dei mammiferi.

NPEPPS codifica per l'amminopeptidasi uromicina-sensibile, una zinco-metallopeptidasi che idrolizza gli amminoacidi a partire dall'N-terminale del substrato. Questa proteina è localizzata sia nel citoplasma che nelle membrane cellulari. L'enzima degrada le encefaline nel cervello ed è emerso, da studi sul modello animale (topo), che possa essere involta negli eventi proteolitici che regolano il ciclo cellulare.

Dall'analisi con il software KEGG sono stati identificati tra gli altri 5 pathways, nei quali rientrano anche i geni target regolati dai tre miRNA up-regolati selezionati. In particolare i geni target sono coinvolti nell' Extracellular matrix (ECM)-Receptor Interactions pathway, nel PI3K-AKT signaling pathway, nel TGF-beta signaling pathway, nell' AMPK signaling pathway, e nel FOXO signaling pathway. L'analisi di gene-ontology (GO) ha messo in evidenza che i geni target di questi miRNA up-regolati sono coinvolti nella via di segnalazione JAK-STAT e nel disassemblaggio della matrice extracellulare.

*miRNA e risposta alla terapia* - I 10 pazienti analizzati durante i primi 6 mesi di trattamento con GH hanno mostrato un aumento significativo nell'altezza dei pazienti maschi rispetto alle femmine (height SDS:  $-2,43 \pm 0,16$  vs  $-2,14 \pm 0,16$ ; P: 0,001) e nella velocità di crescita ( $-1,60 \pm 0,31$  vs  $1,72 \pm 0,49$ ; P: 0,002). In questi pazienti in particolare, due dei tre miRNA validati - miR-122-5p e miR-181b-5p - sono aumentati significativamente dopo la terapia rispetto alla baseline (P < 0.01 per entrambi). L'analisi ha anche evidenziato che l'età cronologica correlava con i livelli d'espressione del miR-181b-5p all'inizio del trattamento (R:0,83; P:0,01). Analogamente, l'età ossea e l'altezza all'inizio del trattamento correlava con i livelli di miR-181b-5p alla baseline (R: 0,83, P: 0,02 e R: 0,86, P: 0,007 rispettivamente). Inoltre, l'altezza all'inizio del trattamento correlava con i livelli di miR-153-3p alla baseline (R:0,905; P: 0,02) e con miR-122-5p dopo i primi 3 mesi di trattamento (R:-0,77; P:0,02). La variazione in altezza ( $\Delta$ Height) dopo 6 mesi di trattamento correlava con mir-122-5p alla baseline (R:0,86; P: 0,05), mentre l'altezza dopo 6 mesi di trattamento correlava con miR-153-3p alla baseline (R:0,76; P: 0,04).

### Conclusioni e prospettive future

Lo studio ha evidenziato differenze di genere nella risposta alla terapia con ormone della crescita, tuttavia il dato non è robusto, considerato che il profiling è stato svolto solo su 2 pazienti maschi e 1 femmina. Per confermare il dato quindi sarà necessario estendere il global profiling, arrivando ad analizzare complessivamente 10 pazienti (5 maschi e 5 femmine). Questo permetterà di rafforzare il dato ed

eventualmente di mettere in evidenza ulteriori miRNA deregolati, anche sulla base del genere, che saranno validati su una popolazione più ampia (30 pazienti). Un ulteriore dato significativo è la correlazione tra il miglioramento di alcuni parametri clinico-auxologici e i miRNA al baseline: questo evidenzia la possibilità che questi miRNA possano essere validi biomarcatori predittivi di risposta a 3 e 6 mesi di trattamento con GH.