

Studio del ruolo dell'autofagia della Fibrodiplosia Ossificante Progressiva (FOP)



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin"
Corso di laurea magistrale in Genetica e Biologia Molecolare

Laureando: Laura Coculo

Relatore interno: Prof.ssa Loretta Tuosto

Relatore esterno: Dott.ssa Venturina Stagni

A.A. 2021/2022



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Studio del ruolo dell'autofagia nella Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP)

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin"
Corso di laurea in Genetica e Biologia Molecolare

Laura Coculo
Matricola 1345086

Relatore
Prof.ssa Loretta Tuosto

Relatore esterno
Dott.ssa Venturina Stagni

A.A. 2021-2022

Ad Aurora e Leonardo.

“Il fatto che l'attività svolta in modo così imperfetto sia stata e sia tuttora per me fonte inesauribile di gioia, mi fa ritenere che l'imperfezione nell'eseguire il compito che ci siamo prefissi, o che ci è stato assegnato, sia più consona alla natura umana così imperfetta che non la perfezione.”

Elogio dell'imperfezione, Rita Levi Montalcini

INDICE

ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	7
1. Fibrodisplasia ossificante progressiva (FOP)	7
Ossificazione eterotopica (OE)	11
Vie di segnalazione coinvolte nel processo di ossificazione eterotopica	15
2. Basi molecolari della FOP: il recettore ACVR1/ALK2	19
2.1 ACVR1/ALK2: segnalazione BMP/TGF- β nella FOP	22
3. FOP: approcci terapeutici	26
3.1 Attuali <i>trials</i> clinici	30
4. Autofagia	33
Autofagia: <i>pathway</i> molecolare	34
Regolazione della macroautofagia	41
Il processo autofagico durante il differenziamento dei condrociti	42
Ruolo di mTOR nella FOP	46
SCOPO DELLA TESI	48
MATERIALI E METODI	50
Colture cellulari	50
Saggio di differenziamento	51
Citometria a flusso	52
Estrazione proteica	52
Determinazione della concentrazione proteica	53
Elettroforesi e Western blot	53
Immunofluorescenza	55
Estrazione RNA	56
Retrotrascrizione RNA	56
Real-time PCR	56

Batteri competenti	57
Trasformazione batterica.....	58
Purificazione plasmidi.....	59
Elettroforesi su gel di agarosio	59
Analisi statistiche.....	60
RISULTATI	61
Sistema modello cellulare <i>in vitro</i> di FOP	61
1. Validazione del modello cellulare per studiare il fenotipo FOP	62
2. Generazione di un sistema modello per studiare il flusso autofagico <i>in vitro</i>	65
3. I livelli proteici del <i>marker</i> autofagico p62 sono più alti nelle cellule ATDC5 ACVR1- R206H rispetto alle cellule WT in condizioni di deprivazione di siero	69
4. Il flusso autofagico è compromesso nelle cellule ECFC (Endothelial colony forming cells) derivate dai pazienti FOP	71
5. Analisi dei <i>markers</i> autofagici p62 ed LC3II in seguito a trattamento con activina A..	73
6. Il trattamento con activina A induce autofagia nelle cellule ATDC5 ACVR1-WT	74
7. Ruolo dell'autofagia nel differenziamento dei condrociti.....	75
8. Analisi dei <i>markers</i> autofagici nelle cellule ECFC derivate da pazienti FOP trattate con induttori dell'autofagia.....	77
DISCUSSIONE	80
BIBLIOGRAFIA.....	85

ABSTRACT

La Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP; MIM135100) è una rarissima (1 caso ogni 2.000.000) forma ereditaria di ossificazione eterotopica (OE). È una patologia estremamente invalidante che provoca immobilità attraverso la trasformazione del tessuto muscoloscheletrico e del tessuto connettivo molle in un secondo scheletro di osso eterotopico.

Recentemente è stata scoperta la causa genetica della FOP. Si tratta di una mutazione eterozigote a guadagno di funzione nel gene *ACVR1* che codifica per il recettore dell'attivina A di tipo I/ chinasi 2 simile all'attivina (*ACVR1/ALK2*).

ACVR1 è un recettore delle proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs). La mutazione caratteristica della FOP (R206H) causa, in aggiunta all'attivazione costitutiva ligando-indipendente del recettore, una risposta potenziata ai ligandi e la capacità di risposta a ligandi non canonici. Da questa deregolazione nella risposta del recettore deriva una segnalazione aberrante, correlata ad un differenziamento accelerato dei condrociti, che sostiene la formazione di osso eterotopico, caratteristica della FOP.

La cartilagine è un tessuto avascolare, con uno scarso apporto di ossigeno e un basso tasso di replicazione cellulare. In tali condizioni l'autofagia risulta essere un processo fondamentale, necessario per mantenere l'omeostasi del tessuto cartilagineo e la sopravvivenza dei condrociti.

Nonostante sia noto che le mutazioni a guadagno di funzione di *ACVR1* siano la causa di OE nella FOP, non è stato ancora chiarito il meccanismo molecolare implicato nell'adattamento all'ambiente ipossico e che contribuisce alla segnalazione indotta dal recettore *ACVR1* mutato nella FOP.

In questo progetto abbiamo ipotizzato che la via di segnalazione autofagica possa essere coinvolta nel sostenere l'ossificazione eterotopica e il segnale di *ACVR1* mutato nella FOP.

Per valutare la nostra ipotesi, abbiamo utilizzato le cellule ATDC5 che esprimono stabilmente ACVR1-WT e ACVR1-R206H fusi al tag nanoluc (NanoLuc®, Promega) che ci ha fornito il nostro collaboratore Prof. G. Sánchez-Duffhues (LUMC, Paesi Bassi), essendo tale linea un buon sistema modello per studiare la condrogenesi *in vitro*.

Tramite l'utilizzo di tecniche di biologia cellulare, molecolare e biochimica abbiamo valutato diversi parametri correlati all'andamento del flusso autofagico, abbiamo studiato il differenziamento dei condrociti in presenza di modulatori di autofagia e infine abbiamo validato e confermato i dati in cellule derivate da pazienti FOP.

I risultati ottenuti ci suggeriscono che la mutazione nel recettore causa un blocco nel flusso autofagico e che la riattivazione di tale *pathway* possa ripristinare la normale segnalazione del recettore.

Basandoci su questi dati, questo studio potrebbe contribuire alla scoperta di nuove vie molecolari coinvolte nella progressione della patologia e potrebbe quindi portare alla scoperta di nuove terapie molecolari per la FOP.