PROGETTO DI RICERCA SUI MECCANISMI MOLECOLARI DELLA FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA

Condotto con il contributo dell'Associazione FOP Italia

Dipartimento di Scienze Pediatriche dell'Università di Genova
S.C. Genetica Molecolare e Citogenetica dell'Istituto G. Gaslini
Direttore Prof. Roberto Ravazzolo

Gruppo di Ricerca

- Dott.ssa Renata Bocciardi, ricercatore universitario, Università di Genova.
- Dott.ssa Francesca Giacopelli, assegnista di ricerca, Università di Genova.
- Dott.ssa Laura Tonachini, assegnista di ricerca, Università di Genova.
- Serena Cappato, dottoranda, Università di Genova.

INDICE

RELAZIONE dell'ATTIVITA' SVOLTA (periodo 1/01/2011 - 31/12/2011).....3

RISULTATI IN RELAZIONE AGLI OBIETTIVI PROPOSTI.....4

1. Studio dei pazienti.....4

2. Studio del gene *ACVR1/ALK2*.....4

2.1 Regolazione dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2*, studio del promotore.....5

2.2 Regolazione dell'espressione: studio della regione terminale al 3' del gene (3'UTR).....7

3. Sistema cellulare.....10

4. Regolazione dell'espressione e sistema immunitario: nuovo approccio e prospettive.....11

PROPOSTE PER LA CONTINUAZIONE DEL PROGETTO.....13

FINANZIAMENTI OTTENUTI SULL'ARGOMENTO.....14

RENDICONTO ECONOMICO DEL FINANZIAMENTO DI FOP ITALIA DEL 2011.....15

DONAZIONE.....15

PERSONALE ATTUALMENTE IMPEGNATO NELLA REALIZZAZIONE DEL PROGETTO.....15

PREVISIONE DI SPESA PER LA REALIZZAZIONE DEI PROGETTI DESCRITTI.....15

ELENCO ALLEGATI.....16

RELAZIONE dell'ATTIVITA' SVOLTA (periodo 1/01/2011 - 31/12/2011)

Durante questo anno di attività abbiamo proseguito il nostro lavoro di ricerca riguardante le conoscenze di base sul gene *ACVR1/ALK2*, con particolare riferimento ai meccanismi molecolari e cellulari che ne regolano l'espressione, e che possono essere rilevanti anche per la comprensione della patogenesi della Fibrodisplasia Ossificante Progressiva. Abbiamo affrontato queste tematiche con approcci metodologici messi a punto nel nostro gruppo e abbiamo affrontato la messa a punto di un sistema cellulare utile all'analisi su larga scala di molecole con potenziale effetto farmacologico.

Nel mese di maggio, abbiamo presentato il nostro lavoro, sotto forma di poster (vedere allegato) ad un congresso internazionale, ovvero alla conferenza annuale della Società Europea di Genetica Umana (European Society of Human Genetics Conference, *ESHG2011*, 28-31 maggio 2011, Amsterdam, Olanda). Recentemente, abbiamo riunito alcuni dei nostri dati riguardanti la regolazione post-trascrizionale del gene *ACVR1/ALK2* in un manoscritto che abbiamo sottomesso per la pubblicazione ad una rivista scientifica internazionale (vedere dettagli nelle sezioni successive) e abbiamo iniziato la preparazione di un secondo manoscritto riguardante la descrizione della regione promotrice del gene e i suoi aspetti funzionali più rilevanti.

RISULTATI IN RELAZIONE AGLI OBIETTIVI PROPOSTI

1 Studio dei pazienti

La ricerca delle mutazioni nel gene *ACVR1/ALK2* è proseguita e, nell'anno trascorso, è stato analizzato il DNA di 4 pazienti italiani. Per tre pazienti si è trattato di un'analisi di esclusione della malattia e, in accordo, il test molecolare è risultato negativo. La quarta paziente, riferitaci con una forte indicazione clinica e una presentazione classica della malattia, è risultata portatrice della mutazione ricorrente R206H.

Nell'insieme, dall'inizio della nostra attività di diagnostica molecolare sui pazienti con diagnosi clinica o sospetto di FOP, abbiamo analizzato 41 pazienti, per 27 dei quali abbiamo confermato la diagnosi clinica (22 con R206H, 4 con R258S, 1 con Q207E).

2 Studio del gene *ACVR1/ALK2*

Poiché una parte importante del nostro lavoro riguarda lo studio della regolazione dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2*, riteniamo opportuno richiamare alcuni concetti introduttivi.

Affinchè l'informazione contenuta nel DNA che forma ciascun gene sia tradotta nella produzione di una proteina che andrà poi ad esplicare le sue funzioni all'interno della cellula e dell'organismo, sono necessari alcuni passaggi che elaborano questa informazione e determinano quella che noi chiamiamo "espressione" del gene (il cui risultato tangibile è ad esempio proprio la produzione della proteina definita da quel dato gene) (Figura 1). Una delle prime fasi di elaborazione, detta trascrizione, consiste nella sintesi di una molecola intermedia detta RNA messaggero (mRNA) o trascritto, che "trascrive" l'informazione contenuta nel gene e la rende utilizzabile dalla cellula. L'mRNA infatti viene "letto" dal macchinario di sintesi della cellula e, con un'operazione successiva detta di traduzione porta alla produzione della proteina.

Tutte le cellule di un organismo hanno lo stesso corredo genetico e contengono gli stessi geni ma non tutte queste informazioni vengono usate dalla cellula nello stesso modo e/o nello stesso momento. In altri termini, cellule diverse o in stadi di sviluppo diversi potranno esprimere geni differenti e in modo diverso (maggiore o minore quantità, forme alternative dello stesso gene).

L'espressione di un gene è quindi un processo piuttosto complesso e ben controllato, sottoposto a diversi livelli e gradi di regolazione, sia in senso positivo (ovvero

attivando o mantenendo attiva l'espressione) che in senso negativo (ovvero spegnendo o mantenendo spenta l'espressione) (Figura 1).

Una parte del nostro lavoro è dedicata allo studio della regolazione dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2*, della quale la maggior parte dei meccanismi sono stati poco indagati fino ad ora. A questo scopo ci siamo focalizzati sullo studio delle regioni potenzialmente implicate nella regolazione della sua espressione, e che sono localizzate agli estremi 5' (dette "a monte "o che precedono il gene) e 3' (dette "a valle" ovvero che seguono). Queste regioni sono costituite da sequenze che, parzialmente, entrano a far parte dell'RNA messaggero e sono spesso importanti per definirne stabilità, disponibilità e traducibilità in proteina, ma non entrano a far parte della proteina vera e propria e per questo sono dette in gergo tecnico sequenze trascritte ma non tradotte o UTR (dall'inglese **U**ntranslated **T**ranscribed **R**egion) (Figura 1).

2.1 Regolazione dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2*, studio del promotore.

La nostra analisi ha messo in evidenza che il gene *ACVR1/ALK2* ha un profilo di espressione molto ampio e che, per quanto riguarda la regione 5'UTR, la situazione è molto complessa con numerose e diverse isoforme da noi identificate e caratterizzate. Benchè non sia ancora chiaro che ruolo possa avere la presenza differenziale di queste sequenze nel messaggero di *ACVR1/ALK2*, in via teorica, possono intervenire nella regolazione fine dell'espressione del gene stesso. Come dimostrato per altri geni, infatti, queste regioni possono modulare la stabilità del messaggero, possono influenzare il processo di traduzione e quindi di produzione della proteina. Inoltre, la presenza di alcune di queste sequenze potrebbe essere importante in presenza di particolari stimoli che arrivano alla cellula e contribuire alla modulazione fine dell'espressione proprio in risposta ad essi.

Per cercare di capire se esistono differenze funzionali tra i vari trascritti identificati, abbiamo terminato il subclonaggio di alcune di queste isoforme, che includono diversi segmenti di sequenza 5'UTR, e le abbiamo indagate mediante saggi funzionali con geni reporter. In effetti, abbiamo potuto osservare che, alcune di queste isoforme, esprimono una minore quantità di proteina rispetto all'isoforma principale indicata in Figura 2 come 067 e potrebbero quindi intervenire in condizioni particolari per modulare negativamente la quantità di recettore presente nella cellula.

Un altro risultato significativo ottenuto e già precedentemente segnalato, riguarda

l'identificazione di una regione promotrice a monte delle diverse isoforme da noi caratterizzate. Si tratta di una regione piuttosto ampia, capace di promuovere in modo molto efficiente la trascrizione di *ACVR1/ALK2*. In questi mesi, abbiamo completato la caratterizzazione funzionale del promotore in diverse linee cellulari e utilizzando frammenti sempre più corti (detti frammenti di delezione) della regione in analisi. In particolare, siamo andati a vedere come varia l'attività del gene reporter diretta dai singoli frammenti, e abbiamo valutato se l'accorciamento progressivo del frammento porti o meno alla perdita di elementi funzionali positivi o negativi, che possano poi essere indagati in maniera specifica. L'analisi per delezione ha messo in evidenza una forte attività trascrizionale diretta dai frammenti più lunghi (Figura 3). L'eliminazione (delezione) di una regione di DNA ben conservata tra la posizione -700 e -300, provoca una forte diminuzione dell'attività promotrice dimostrando che la regione deleta presenta elementi funzionali importanti. Abbiamo poi definito un promotore basale, ovvero la regione minima necessaria a che il gene venga trascritto, si tratta di un frammento di sole 72 bp la cui capacità trascrizionale risulta comunque di rilievo se paragonata a quella di un promotore virale considerato "forte" (Figura 4). Questa regione è caratterizzata dalla presenza di una sequenza particolare, ricca in nucleotidi GC. Questo tipo di sequenza può essere legata da diverse proteine (fattori di trascrizione), tra le quali la proteina SP1. Abbiamo potuto verificare che in effetti il promotore di *ACVR1/ALK2* può essere regolato positivamente da SP1, che ne incrementa l'attività. Alterando in modo specifico la regione di legame per SP1 sul promotore di *ACVR1/ALK2* l'effetto attivatorio indotto dalla proteina si perde (Figura 5 e 6).

L'identificazione di una regione promotrice e l'analisi funzionale che ne è scaturita forniscono la base di partenza per lo studio dei meccanismi e dei fattori che possono intervenire nel regolare l'espressione del gene a livello trascrizionale anche in condizioni particolari, che possono aver attinenza con l'insorgenza o la riacutizzazione della malattia.

L'analisi funzionale riguardante il promotore di *ACVR1/ALK2* è stata effettuata in prima battuta in condizioni di coltura basali e standard, in modo da acquisire delle informazioni funzionali di base circa l'attività di questa regione mai studiata in precedenza. Successivamente abbiamo iniziato la caratterizzazione funzionale in risposta al trattamento delle cellule con alcune sostanze selezionate come i gamma-agonisti dei recettori per l'acido retinoico (*all trans* acido retinoico, atRA, e CD1530), il fenilbutirrato

(PheB) e il Rosiglitazone.
Abbiamo iniziato la preparazione di un manoscritto contenente una parte dei risultati ottenuti da questo studio riguardante l'identificazione del promotore di ACVR1/ALK-2 e la sua regolazione (F. Giacopelli *et al.*, in preparazione). I risultati saranno anche descritti nel prossimo Convegno di Milano.

2.2 Regolazione dell'espressione: studio della regione terminale al 3' del gene (3'UTR).

Parte della regolazione del RNA messaggero, in particolare la sua “stabilità”, che significa suscettibilità alla degradazione, viene controllata dalla sequenza che si trova verso l’estremo terminale del gene stesso, definito 3'UTR (Figura 1). Per il gene *ACVR1/ALK2* nessuno ha mai eseguito studi su questo tipo di regolazione detta post-trascrizionale.
Come già descritto in precedenza, il nostro lavoro ha preso inizio con l'analisi bioinformatica della sequenza 3'UTR con programmi specifici disegnati per riconoscere la presenza di sequenze o "motivi strutturali" peculiari e potenzialmente importanti dal punto di vista funzionale. Questo ci aveva permesso di predire l'esistenza di siti di legame per microRNA (miRNA). I miRNA sono piccole molecole di RNA, identificate negli ultimi anni e con importante funzione regolatoria sull'espressione genica. In pratica, queste molecole riconoscono dei siti di ancoraggio sulle regioni 3'UTR dei propri geni bersaglio, si legano ad essi e possono modulare l'espressione del gene in senso negativo o positivo.

Guardando la letteratura scientifica recente risulta chiaro il grande interesse che i miRNA hanno suscitato soprattutto in campo oncologico, ma anche più recentemente per quanto riguarda la biologia delle cellule staminali, dei processi differenziativi e infiammatori. Queste molecole rivestono ruoli significativi sia in condizioni fisiologiche che patologiche, possono avere bersagli e azioni anche molto specifici e per queste ed altre caratteristiche evidenziate sono considerati di interesse anche per lo sviluppo di terapie mirate innovative.
Una parte dello studio riguardante la regolazione post-trascrizionale del gene *ACVR1/ALK2* è stata da noi descritta in un manoscritto sottomesso per la pubblicazione su una rivista scientifica internazionale (M. Mura, F. Giacopelli, S. Cappato, R. Ravazzolo and R. Bocciardi The role of the 3'UTR region in the regulation of the *ACVR1/Alk-2* gene expression. *submitted to Journal of Bone and Mineral Research*)
In particolare, in questo lavoro, abbiamo descritto i risultati ottenuti studiando il ruolo della

sequenza 3'UTR nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2* e l'azione di alcuni microRNA.
Il nostro studio ha messo in evidenza che il trascritto di *ACVR1/ALK2* è instabile, ovvero una volta prodotto, la cellula tende a degradarlo (Figura 7). Una parte di questa instabilità sembra mediata proprio dalla regione 3'UTR che può regolare in maniera negativa l'espressione del gene. Infatti se questa sequenza viene posizionata a valle di un gene reporter, è in grado di indurre una diminuzione dell'espressione anche di quest'ultimo (Figura 7)
Questa regione può essere in via teorica suddivisa in due metà, ovvero in due moduli funzionali. La prima parte, ospita diversi putativi siti di legame per microRNA, la seconda metà, contiene delle sequenze nucleotidiche ricorrenti detti elementi ARE ("AU-rich elements"). Entrambi i moduli possono quindi intervenire nella regolazione negativa dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2*. In questo lavoro, ci siamo focalizzati sull'azione di tre microRNA: miR-365, miR-148b e miR-26a (Figura 7).

Normalmente i microRNA hanno un effetto negativo sull'espressione dei geni bersaglio. I nostri esperimenti hanno messo in evidenza che, in effetti, il miR-148b e il -365 provocano una diminuzione dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2*. Un dato più sorprendente è invece emerso dall'analisi dell'effetto del miR-26a che è risultato regolare in maniera positiva l'espressione di *ACVR1/ALK2*.
L'effetto indotto dai microRNA, si osserva sia in esperimenti con gene reporter che con analisi diretta sul mRNA endogeno della cellula (Figure 8). Inoltre, risulta essere specifico dal momento che la mutagenesi mirata dei siti di legame tra questi microRNA e il gene *ACVR1/ALK2* provoca la perdita dell'effetto osservato, e questo si conferma anche mediante l'utilizzo di microRNA non-specifici (Figura 8 e 9).
Cosa si conosce di questi microRNA? Dati presenti in letteratura indicano che il miR-148b risulta sostenere differenziamento osteogenico delle cellule staminali mesenchimali; regola la proliferazione cellulare e in diverse forme tumorali si comporta da oncosoppressore. Il miR-365 è coinvolto nei processi di controllo della proliferazione e senescenza cellulare, nella tumorigenesi, e nel differenziamento condrocitario. Il miR-26a risulta contribuire al silenziamento della via delle BMP al termine del differenziamento in senso osteogenico di cellule staminali mesenchimali; come il mir-148b si comporta da oncosoppressore in diversi tipi di tumore. Un altro dato molto interessante emergente dalla disamina della letteratura, riguarda l'implicazione di questi tre microRNA nei processi di controllo dell'espressione di molecole implicate nelle diverse fasi dell'infiammazione.

La "paradossale" osservazione che il miR-26a opera una regolazione positiva dell'espressione di ACVR1 ci ha portato a fare ricerche specifiche ed è emerso che il controllo operato dai miR, solitamente di tipo inibitorio, può trasformarsi in un segnale di regolazione positiva analogo a quello da noi osservato in condizioni specifiche. È quanto è risultato ad esempio per il gene codificante il TNFa. Quest'ultimo è un fattore molto importante nella risposta immunitaria ed è soggetto ad una regolazione di tipo post-trascrizionale molto fine e rilevante. La struttura della regione 3'UTR di questo gene presenta omologie strutturali sorprendenti con quella del gene ACVR1, ovvero possiede una metà particolarmente ricca di siti di legame per microRNA e una regione con elementi ARE. Il TNFa ha un messaggero abbastanza instabile, una parte di questa instabilità e da imputarsi alla presenza degli elementi ARE presenti nel suo 3'UTR. In condizioni di coltura in assenza di siero, l'espressione del TNFa a livello di proteina aumenta significativamente e questo avviene perché il suo mRNA risulta più stabile e quindi maggiormente disponibile per la cellula. La stabilizzazione avviene grazie al legame con uno specifico miR, il cui sito di legame è all'interno di una delle regioni contenenti elementi ARE. In questo contesto, l'interazione tra elementi funzionali diversi (ARE e microRNA), trasforma un segnale normalmente inibitorio, come quello mediato dai microRNA, in segnale positivo di aumento dell'espressione genica.
Questi dati e le nostre osservazioni sulla regolazione post-trascrizionale di ACVR1, ci sono sembrati estremamente interessanti e rilevanti, tenendo presente le caratteristiche cliniche salienti delle fase acute nella FOP, e aprono nuove prospettive di studio.
Diversi sono i geni implicati nei processi infiammatori e nella risposta immunitaria innata, che risultano fortemente regolati dalla cellula a livello post-trascrizionale. Il messaggero di questi geni è spesso presente nella cellula, ma risulta molto instabile, quindi le cellule, in definitiva esprimono poca proteina corrispondente. In presenza di stimoli opportuni, come ad esempio quelli infiammatori, l'interazione tra il messaggero instabile ed alcune proteine specifiche viene regolata in modo da stabilizzare il mRNA e renderlo disponibile per la sintesi della proteina, la cui quantità aumenta in modo proporzionale nella cellula. Una volta esaurito lo stimolo, ad esempio nella fase di risoluzione dell'infiammazione, l'espressione della proteina viene rapidamente diminuita, in quanto il relativo mRNA torna ad essere instabile. Per la cellula, questo sistema è molto utile in quanto la regolazione trascrizionale per il passaggio da DNA a RNA di un dato gene, può essere un processo che necessita di tempi più lunghi. Per alcuni geni, invece, può essere necessario un controllo stretto (si pensi ad esempio al pericolo di una reazione infiammatoria troppo forte

o protratta) e veloce dell'espressione della proteina. In tal caso, per la cellula è più conveniente avere un mRNA disponibile ma instabile (produce poca o niente proteina) che può rapidamente essere stabilizzato e reso disponibile (stabilizzato) grazie ad un meccanismo di controllo post-trascrizionale della sua espressione.

3 Sistema cellulare

Abbiamo parlato in precedenza della necessità e del nostro interesse circa la generazione di un sistema cellulare utile allo studio della via di segnalazione mediata dalle BMP e allo screening su larga scala di piccole molecole con potenziale effetto farmacologico. Nella scorsa relazione avevamo mostrato una prima parte di lavoro che ci ha permesso di ottenere delle linee cellulari nelle quali è stato trasferito in modo stabile il gene *ACVR1/ALK2*, sia nella forma normale che quella recante la mutazione ricorrente nella FOP (R206H). Tale sistema cellulare prevede un ulteriore passaggio in quanto le stesse cellule dovranno anche esprimere in modo stabile un gene chimerico responsivo alle BMP, con funzione di reporter e che verrà introdotto al loro interno mediante un'ulteriore trasfezione.

Tuttavia, in questi ultimi mesi, sia confrontandoci con i colleghi incontrati a Roma durante il meeting annuale dell'Associazione, sia guardando la letteratura scientifica recente, ci siamo resi conto che diversi aspetti del nostro lavoro riguardante lo studio della regolazione dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2*, supportano l'idea che possa essere utile individuare molecole in grado di influenzare l'espressione del gene stesso, intervenendo sulla cascata cellulare da esso mediata sin dal suo inizio, ovvero modulando la quantità di recettore presente nella cellula. Abbiamo quindi pensato di generare un sistema cellulare a partire da alcuni strumenti molecolari da noi prodotti durante lo studio di identificazione e caratterizzazione della regione promotrice del gene.

Il nuovo sistema cellulare consiste nella generazione di una linea cellulare che esprima in modo stabile un gene reporter, quindi tracciabile e misurabile, la cui attività sia diretta dalla regione promotrice del gene *ACVR1/ALK2* da noi isolata. In questo modo, si può valutare l'effetto di sostanze e composti sulla regolazione trascrizionale del gene *ACVR1/ALK2*, ovvero su uno dei meccanismi primari di regolazione dell'espressione di un gene (Figura 10).

Poiché abbiamo a disposizione diversi frammenti provenienti dal promotore di ACVR1 dei quali cominciamo a conoscere alcune delle caratteristiche funzionali, per sviluppare questo nuovo sistema cellulare, abbiamo scelto di utilizzare un costrutto

contenente l'intero promotore del gene (PrACVR1-2.9) ed uno contenente un frammento intermedio (PrACVR1-1.2). Queste regioni sono clonate a monte del gene per la Luciferasi che funziona come gene reporter. L'attività di quest'ultimo è rilevabile e misurabile mediante l'uso di un luminometro.

In questi mesi abbiamo quindi inserito i frammenti del promotore in nostro possesso in un vettore di espressione luciferasico di nuova generazione (pGL4- basic vector Promega). I costrutti sono stati poi saggiati in trasfezioni transienti per verificarne la funzionalità, e quindi utilizzati per la generazione di linee stabili. Per iniziare abbiamo deciso di utilizzare le cellule ATDC5, usate recentemente in alcuni interessanti esperimenti per saggiare l'effetto dei retinoidi sui processi di differenziamento endocondrale da parte del gruppo del Dott. Pacifici.

Al momento abbiamo ottenuto cloni trasfettanti stabili per il costrutto contenente il Promotore intero di *ACVR1/ALK2*, mentre i cloni per il frammento intermedio sono in corso di selezione.

I cloni cellulari già disponibili sono stati più volte saggiati per l'attività del gene reporter che risulta stabile, ben rilevabile e misurabile. Siamo quindi pronti per iniziare la fase di messa a punto del sistema nelle micropiastre e per cominciare a saggiare l'effetto di molecole selezionate.

A questo proposito ci preme sottolineare l'importanza dello strumento GloMAX recentemente donato al nostro Laboratorio dalla Vs Associazione. Si tratta di un lettore per micropiastre da 96-pozzetti, che consente la misurazione della Luminescenza emessa da un lisato cellulare e adattabile all'analisi su vasta scala. Lo strumento è dotato di due iniettori e questo consente la semi-automazione delle reazioni necessarie alla rilevazione e misurazione della luminescenza.

4 Regolazione dell'espressione e sistema immunitario: nuovo approccio e prospettive.

Come è ben noto il sistema immunitario riveste un ruolo importante nella patogenesi della malattia. Abbiamo quindi sempre considerato rilevante cercare degli approcci che consentissero di studiare le possibili interazioni tra cellule del sistema immunitario, in particolare linfociti e monociti, l'espressione del gene *ACVR1/ALK2* e lo stato di attivazione della via delle BMP.

Data la nostra formazione e le nostre competenze, questo tipo di studio deve essere basato sulla collaborazione con gruppi che si occupano in maniera specifica di

problematiche riguardanti infiammazione e sistema immunitario.
Nei mesi scorsi abbiamo avuto l'opportunità di discutere di questi aspetti e del legame con la patogenesi della FOP con la Dott.ssa Silvia Brunelli e la Dott.ssa Paola Zordan della Divisione di Medicina Rigenerativa, Cellule Staminali e Terapia Genica (Fondazione San Raffaele, Milano)
Il gruppo della Dott.ssa Brunelli è da anni impegnato nello studio dei meccanismi patogenetici alla base di malattie genetiche neuromuscolari, e sulle cellule staminali che potrebbero intervenire nelle fasi di rigenerazione. I dati più recenti sembrano indicare che anche in queste di patologie che pur hanno una necessaria e primaria causa genetica, la componente infiammatoria e immunitaria sia molto importante nell'evoluzione della malattia. La Dott.ssa Brunelli sta quindi portando avanti degli studi *in vivo* su questo argomento utilizzando un modello murino le cui cellule sono tracciabili (perché dotate di un gene reporter fluorescente). Questo topo viene trattato con sostanze diverse, ad esempio il clodronato, che provocano una distruzione selettiva (deplezione) di alcune popolazioni di cellule del sistema immunitario, in questo caso i monociti, che costituiscono la prima linea di difesa dell'organismo ad un'aggressione esterna (danno tissutale, patogeni *etc.*). A tempi diversi dal trattamento, viene poi indotto un danno al muscolo femorale o tibiale dell'animale, danno che va a mimare la situazione di degenerazione delle fibre muscolari che si osserva nelle malattie neuromuscolari. In questo modo si può verificare quali siano le cellule che concorrano alla rigenerazione del muscolo danneggiato e in che modo l'alterazione del sistema immunitario influenzi questo processo. Parlando con la Dott.ssa Brunelli, abbiamo capito che con le opportune modificazioni questo tipo di esperimento poteva essere utile anche per avviare uno studio sul ruolo della componente infiammatoria nel meccanismo di ossificazione eterotopica. In tal caso, nei topi trattati con clodronato e, quindi con deplezione di monociti, viene poi impiantato a livello di muscolo femorale e tibiale del matrigel con BMP, in modo da indurre ossificazione ectopica e poi studiarne fasi ed evoluzione rispetto ad un animale con sistema immunitario intatto. Alcuni esperimenti preliminari sono stati fatti, altri sono in corso e alcuni dati verranno presentati nel prossimo convegno di Milano.
A questa parte svolta dal gruppo della Dott.ssa Brunelli si affiancherà il nostro studio centrato su ACVR1/ALK-2, in quanto le indicazioni ottenute in vivo circa i meccanismi, il tipo di stimolo e molecole infiammatorie coinvolte, verranno da noi sfruttate e saggiate per vedere in che modo possono alterare l'espressione o il percorso cellulare mediato da ACVR1/ALK-2 stesso.

PROPOSTE PER LA CONTINUAZIONE DEL PROGETTO

Il nostro lavoro proseguirà mantenendo l'attenzione sullo studio della regolazione trascrizionale e post-trascrizionale dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2* e sui meccanismi cellulari che ne sono responsabili. Questi argomenti sono del tutto originali e non indagati da parte di altri gruppi nel mondo, per quanto ci risulta fino ad ora e potranno essere utili ai colleghi che, anche all'estero lavorano sui meccanismi patogenetici della FOP. Inoltre, per quanto ci riguarda direttamente, questa tematica verrà sviluppata tenendo presente gli aspetti di applicabilità delle informazioni che ne derivano, con particolare attenzione allo sviluppo del sistema cellulare per analisi su vasta scala di farmaci e molecole diverse.

Consideriamo fondamentale continuare a cercare un approccio utile allo studio del ruolo di infiammazione e sistema immunitario nelle fasi acute della malattia.

I nostri obiettivi per il 2012 sono quindi sintetizzabili nei seguenti punti

- **Approfondimento dello studio riguardante la regolazione dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2* a livello trascrizionale e post-trascrizionale**
- **Sviluppo del sistema cellulare ed effetto di farmaci**
- **Regolazione dell'espressione e sistema immunitario**

Lo sviluppo di questo lavoro necessita di finanziamenti dedicati e per questo abbiamo preso accordi con la Dott.ssa Brunelli per poter sottomettere un progetto di ricerca collaborativo partecipando al bando PRIN pubblicato a fine anno dal Ministero dell'Università e della Ricerca (MIUR) e in scadenza nei prossimi mesi.

FINANZIAMENTI OTTENUTI SULL'ARGOMENTO

- ✓ Programma strategico del Ministero della Salute su "Identificazione e studio di fattori di rischio per la prevenzione, la diagnosi e la cura della morbilità materna e infantile. Basi genetiche di difetti congeniti". Il progetto riguarda diverse malattie genetiche e parte del finanziamento è stato dedicato a studi sulla FOP. Progetto terminato nel Dicembre 2011.

- ✓ Progetto di Ricerca di Ateneo 2010, Università di Genova - Bando riservato a ricercatori di età inferiore ai 45 anni al 31/12/2010. Titolo della ricerca: Meccanismi di ossificazione eteroropica e Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP): approcci terapeutici. Progetto terminato nel Dicembre 2011.

- ✓ Assegno di Ricerca annuale per la Dott.ssa Laura Tonachini (vedere *CV* allegato) impegnata a tempo pieno nello svolgimento del progetto in oggetto, Progetto FIRB del MIUR.

RENDICONTO ECONOMICO DEL FINANZIAMENTO DI FOP ITALIA DEL 2011

Finanziamenti (Euro)	Erogati da	Utilizzo
20 000	*FOP Italia*	Impegnati per il rinnovo dell'Assegno di Ricerca della Dott.ssa F. Giacopelli
5 000	*FOP Italia*	Impegnati per l'acquisto di reagenti inerenti allo svolgimento del progetto
5 000	CARIPARMA per *FOP Italia*	Impegnati per l'acquisto di reagenti inerenti allo svolgimento del progetto
Totale 30 000		

DONAZIONE

Grazie alla generosità della Vostra Associazione, il nostro Laboratorio ha potuto acquisire uno strumento di grande utilità per il proseguo del nostro lavoro e per la realizzazione del progetto riguardante l'analisi su vasta scala di molecole con potenziale effetto farmacologico, da saggiare sul sistema cellulare in corso di messa a punto.

Si tratta di un Luminometro utilizzabile con micropiastre da 96-pozzetti e dotato di due iniettori che rendono possibile l'automazione del processo di rilevazione della luminescenza (GloMAX Multi+ Detection System, Promega).

PERSONALE ATTUALMENTE IMPEGNATO NELLA REALIZZAZIONE DEL PROGETTO

Personale	***Contratto***	***Ente***	
Renata Bocciardi	**Ricercatore**	**Università di Genova**	**Tempo ind**
Francesca Giacopelli	**Assegno di Ricerca**	**Università di Genova (su fondi FOP Italia)**	**1/07/2011 - 30/06/2012**
Laura Tonachini	**Assegno di Ricerca**	**Università di Genova (su fondi FIRB)**	**1/09/2011 - 31/08/2012**
Serena Cappato	**Dottoranda (titolare di Borsa di studio)**	**Università di Genova**	**1/01/2012 - 31/12/2015**

PREVISIONE DI SPESA PER LA REALIZZAZIONE DEI PROGETTI DESCRITTI

Prevediamo che la prosecuzione del nostro programma di lavoro richieda risorse umane e materiali di consumo che possono essere specificati e dettagliati.

ELENCO ALLEGATI

Allegato 1 poster presentato al congresso annuale della Società Europea di Genetica Umana (European Society of Human Genetics Conference, *ESHG2011*, 28-31 Maggio 2011, Amsterdam, Olanda) (*all1 ESHG2011.pdf*).

Allegato 2 *Curriculum vitae et studiorum* della Dott.ssa Laura Tonachini (*all2 LT cv.pdf*).

Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura di un gene e dei processi che portano alla sintesi delle proteine.

I geni sono formati da tratti più o meno lunghi di DNA. Ogni gene contiene sia tratti (o sequenze) di DNA che forniscono (ovvero codificano) le informazioni per la sintesi della proteina che tratti o sequenze con funzione regolatoria, ovvero forniscono alla cellula le informazioni necessarie a "capire" quando è necessario produrre una proteina, in che quantità etc. I geni si presentano perciò con una struttura discontinua (A) nella quale regioni regolatorie e non codificanti sono inframmezzate alle sequenze contenenti le informazioni per sintetizzare la proteina corrispondente (indicate in alto in A) con rettangoli). Per arrivare alla proteina è necessario che l'informazione genica venga copiata (trascritta) in una molecola intermedia (RNA messaggero, mRNA) e rielaborata (B). Questa rielaborazione porta alla eliminazione di tutte le parti non codificanti fatta eccezione per alcune sequenze situate a monte e a valle (5'UTR e 3'UTR) che sono necessarie alla stabilità del trascritto e possono essere sede di meccanismi di controllo da parte della cellula. L'mRNA viene quindi "tradotto" in proteina. Ognuno di questi processi può essere sottoposto a diversi livelli e meccanismi di controllo.

Figura 2. Il gene ACVR1 viene trascritto in diverse isoforme con regioni 5'UTR alternative che possono intervenire nel modularel'espressione della proteina

Figura 3. Studio funzionale sitematico del promotore di ACVR1

Figura 4

Definizione del Promotore basale di ACVR1. La sequenza compresa tra -308 to +1 (istogramma fucsia) mostra ancora un'attività promotrice consistente che si mantiene significativa anche in un frammento di sole 72 bp monte dell'inizio di trascrizione (istogramma giallo). In rosso è l'attività del promotore virale di controllo.

Figura 5. SP1 e promotore basale *ACVR1*

La mutagenesi dei siti SP1 provoca una riduzione dell'attiviità del promotore basale nelle diverse linee cellulari saggiate, l'effetto è però di minore entità nelle cellulle ATDC5 rispetto alle altre due linee cellulari usate

Figura 6. SP1 e promotore basale *ACVR1*

- **La presenza di SP1 provoca un'induzione dell'attività del promotore basale di ACVR1**
- **Questo effetto si perde se si mutagenizzano i siti di legame della proteina**

Figura 7

Il trascritto di ACVR1 è instabile in presenza di inibitori della trascrizione (pannello di sinistra A, B). La regione 3'UTR è molto conservata tra le specie (C) e ospita diversi putativi siti di legame per microRNA. La sequenza e la posizione dei siti consenso per i microRNA studiati nel nostro lavoro sono indicati nel pannello centrale. L'effetto inibitorio della regione 3'UTR

Figura 8

Effetto dei microRNA selezionati sull'espressione del gene ACVR1 in esperimenti con reporter luciferasico (pannello di sinistra) e con misurazione dell'effetto sul messaggero endogeno (pannello di destra)

Figura 9
L'effetto dei microRNA selezionati sull'espressione di ACVR1 è specifico e viene perso mutagenizzando i corrispondenti siti di legame presenti nella regione 3'UTR del gene

Figura 10 Schema del modello cellulare per lo screening di composti con potenziale effetto farmacologico

European Journal of Human Genetics

Volume 19 Supplement 2 May 2011 www.nature.com/ejhg

European Human Genetics Conference 2011

May 28 - 31, 2011
Amsterdam, The Netherlands

Abstracts

nature publishing group

P11.002

Study of the ACVR1 gene expression and regulation: the 5'UTR and the promoter region

F. Giacopelli[1], S. Cappato[2], M. Mura[2], R. Ravazzolo[1,2], R. Bocciardi[1];
[1]University of Genoa and CEBR, Genova, Italy, [2]G. Gaslini Institute Laboratory of Molecular Genetics, Genova, Italy.

ACVR1 encodes a BMP type I receptor mutated in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva, a severe form of heterotopic ossification. Mechanisms regulating ACVR1 expression are still unknown. According to our analysis, the 5' genomic region of ACVR1 is subjected to alternative splicing generating several transcripts in which different 5'UTR exons are combined to a common coding sequence, with different expression profiles according to cell type. As assessed by cell transfection with different full length cDNA constructs and western blot analysis, we observed that different splicing isoforms correlated with different quantitative expression of the protein.

Moreover, with the aim to identify regulatory elements involved in the transcriptional control of ACVR1 expression, we focused on a genomic region spanning around 2.9 kb, from position -2.893 to +32 upstream of transcription start site (tss, +1). This region is highly conserved and particularly rich in GC nucleotides. A functional characterization of the ACVR1 promoter was obtained by subcloning the whole fragment and a series of derived deletion segments in a Luciferase expression vector and transfection in different cell lines. The strongest promoter activity was displayed by a 700 bp fragment upstream of tss, but a residual and quite significant activity was still present in a 100 bp fragment.

Our data suggest that besides the transcriptional control of ACVR1 expression operated by the promoter region, other mechanisms involving the 5'UTR region, in particular translational regulation, can take place.

Supported by RFPS-4-631972 grant "Genetic Bases of Birth Defects" from the Italian Ministry of Health.

CURRICULUM VITAE

DATI ANAGRAFICI

Nome e cognome: Laura Tonachini
Data e luogo di nascita: 10/08/1971, Genova
Cittadinanza: italiana
Indirizzo: Via Salgari371/9A, Genova
tel. 3496615345

TITOLI DI STUDIO

1990 Maturità scientifica conseguita presso il Liceo Scientifico Statale “G.D.Cassini” di Genova.

22/11/1995 Laurea in Scienze Biologiche presso l’Università degli Studi di Genova, con indirizzo bio-molecolare, discutendo la tesi sperimentale “Caratterizzazione e valutazione della Poli(ADP-RIBOSIO)polimerasi in cellule di adenocarcinoma mammario (MCF-7) in coltura”. Votazione conseguita 110/110 e lode.

1997 Abilitazione all’esercizio della professione di Biologo

02/02/2001 Conseguimento del titolo di dottore di ricerca “Biologia umana: basi molecolari e cellulari"presso l'Università degli Studi di Torino.

ESPERIENZA PRE-POSTLAUREA

1993-1995 Studentessa interna presso l’Istituto di Fisiologia Generale dell’ Università degli Studi di Genova, Laboratorio di Biologia Molecolare, diretto dal Prof. M.Orunesu.

15/1-15/3/96 Frequentatrice volontaria presso il Laboratorio di Differenziamento Cellulare, diretto dal Prof. R. Cancedda, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova, presso il Centro di Biotecnologie Avanzate.

15/3/96-15/3/97 Tirocinante IST presso il Laboratorio Medicina Rigenerativa (Prof Cancedda - Lab Patrizio Castagnola)

1/11/97-31/10/2000 dottorato di ricerca in “Biologia umana: basi molecolari e cellulari” dell’Università degli Studi di Torino, svolto presso il Laboratorio Medicina Rigenerativa (Prof Cancedda - Lab Patrizio Castagnola)

2000-2011 attività di ricerca presso il Laboratorio di Medicina Rigenerativa Rigenerativa (Prof Cancedda - Lab Patrizio Castagnola).

9/09/2002-9/10/2002 Attività di ricerca presso l'Institute for Stem Cell Research dell'Università di Edimburgo (Prof. A. Medvinsky).

1/09/2011- ad oggi Assegno di ricerca dell'Università di Genova, presso il Laboratorio di Genetica Molecolare dell'Istituto G. Gaslini diretto dal Prof. Ravazzolo.

ESPERIENZA TECNICA

Esperienza in colture cellulari (marcature metaboliche, trasfezioni).
Saggi di immunoprecipitazione.
Elettroforesi su gel di poliacrilammide .
Elettroforesi su gel di agarosio.
Analisi di proteine mediante Western Blot.
Tecniche di immunoistochimica ed immunofluorescenza.
Purificazione di proteine tramite cromatografia di affinità su sefarosio.
Saggi immunologici: ELISA.
Analisi di acidi nucleici: Southern e Northern blotting, plastic arrays.
Sequenziamento del DNA
Produzione di proteine ricombinanti batteriche.
PCR, RT-PCR, Real time PCR.

LINGUE STRANIERE
Lingua inglese.

ESPERIENZA DIDATTICA

Esercitazioni di biologia per gli studenti del I anno di medicina (anno 1997/98)

Attività di supporto alla didattica nel corso integrativo “Biologia e genetica” per il diploma universitario in Scienze Infermieristiche (anni: 1998/1999; 1999/2000)

Professore a contratto per il diploma universitario in Scienze infermieristiche e DU per fisioterapisti, nel corso “Biologia e genetica”. Articolo 32, 2000/2001.

Professore a contratto per il diploma universitario in Scienze infermieristiche e DU per fisioterapisti, nel corso “Biologia e genetica”. Articolo 32, 2001/2002.

Professore a contratto per il diploma universitario in Scienze infermieristiche e DU per fisioterapisti, nel corso “Biologia e genetica”. Articolo 32, 2002/2003.

Professore a contratto per il diploma universitario in Scienze infermieristiche e DU per fisioterapisti, nel corso “Biologia e genetica”. Articolo 32, 2003/20034.

PUBBLICAZIONI

1. Castagnola P., Gennari M., Morello R., Tonachini L., Marin O., Gaggero A., and Cancedda R. “Cartilage associated protein (CASP) is a novel developmentally regulated chick embryo protein” J.Cell.Sci. 110:1351-1359,1997

2..Morello R., Tonachini L., Monticone M., Viggiano L., Rocchi M., Cancedda R., Castagnola P.”cDNA cloning, characterization and chromosome mapping of Crtap encoding the mouse Cartilage Associated Protein” Matrix Biology 18:319-324,1999

3. Tonachini L., Morello R., Monticone M., Huizenga J., Skaug J., Sherer S., Cancedda R. and Castagnola P. “cDNA cloning, characterization and chromosome mapping of the gene encoding human cartilage associated protein (CRTAP)”Cytogenetic and cell genetics 87:191-194(1999)

4. Tonachini L., Monticone M., Di Marco E., Zerega B., Cancedda R., Castagnola P.“Chondrocyte Protein with a Poly-proline Region (CHPPR) is a novel protein expressed by chondrocytes in vitro and in vivo”. BBA 1577(2002)421-429.

5. Tonachini L., Monticone M., Puri C., Tacchetti C., Pinton P., Rizzuto R., Cancedda R., Tavella S., Castagnola P. ”Chondrocyte protein with a poly-proline region (CHPPR) is a novel mitochondrial protein and promotes mitochondrial fission.”. J Cell Physiol. 2004 Dec;201(3):470-82.

6. Monticone M.,Liu Y., Tonachini L., Mastrogiacomo M., Parodi S., Quarto R., Cancedda R. and Castagnola P. “Gene expression profile of human bone marrow stromal cells determined by restriction fragment differential display”.J Cell Biochem. 2004 Jul 1;92(4):733-44.

7. Liu Y., Monticone M., Tonachini L., Mastrogiacomo M., Marigo V., Cancedda R., Castagnola P. "Gene URB expressed in vitro by human bone marrow stromal cells is developmentally regulated in mouse embryo." Biochem Biophys Res Commun. 2004 Sep 17;322(2):497-507.

8. Ganfornina MD, Sanchez D, Pagano A, Tonachini L, Descalzi-Cancedda F, Martinez S. “Molecular characterization and developmental expression pattern of the chicken apolipoprotein D gene: Implications for the evolution of vertebrate lipocalins.”
Dev Dyn. 2005 Jan;232(1):191-9.

9 Pagano A, Tonachini L, Monticone M, Tortelli F, Castelnuovo M, Randazzo N, Tavella S, Di Marco E, Cancedda R, Castagnola P. “Proliferative arrest and activation of apoptosis related genes in Rolly Protein-silenced cells.”
Gene. 2006 Nov 1;382:79-87. Epub2006 Jul 14.

10. Morello R, Bertin TK, Chen Y, Hicks J, Tonachini L, Monticone M, Castagnola P, Rauch F, Glorieux FH, Vranka J, Bachinger HP, Pace JM, Schwarze U, Byers PH, Weis M, Fernandes RJ, Eyre DR, Yao Z, Boyce BF, Lee B. “CRTAP is required for prolyl 3-hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta”.

Cell. 2006 Oct 20;127(2):291-304.

11. Monticone M, Tonachini L, Tavella S, Degan P, Biticchi R, Palombi F, Puglisi R, Boitani C, Cancedda R, Castagnola P. “Impaired expression of genes coding for reactive oxygen species scavenging enzymes in testes of Mtfr1/Chppr-deficient mice.” Reproduction. 2007 Sep;134(3):483-92.”

12. In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells. Marcoli M, Candiani S, Tonachini L, Monticone M, Mastrogiacomo M, Ottonello A, Cervetto C, Paluzzi P, Maura G, Pestarino M, Cancedda R, Castagnola P. Pharmacol Res. 2008 May;57(5):374-82

13. The nuclear genes Mtfr1 and Dufd1 regulate mitochondrial dynamic and cellular respiration. Monticone M, Panfoli I, Ravera S, Puglisi R, Jiang MM, Morello R, Candiani S, Tonachini L, Biticchi R, Fabiano A, Cancedda R, Boitani C, Castagnola P. J Cell Physiol. 2010 Nov;225(3):767-76.

14. Platelet lysate induces in vitro wound healing of human keratinocytes associated with a strong pro-inflammatory response. El Backly R., Ulivi V., Tonachini L., Cancedda R., Descalzi F. and Mastrogiacomo M. Tissue Eng Part A. 2011 Jul;17(13-14):1787-800.