

# PROPOSTA DI PROGETTO

## PREMESSA

La formazione delle ossa dello scheletro durante il normale sviluppo dell'embrione avviene attraverso un processo di ossificazione chiamata "endocondrale" nel quale si forma inizialmente cartilagine che viene poi sostituita da osso.

Dopo la nascita, l'ossificazione endocondrale si osserva normalmente quando si ripara l'osso in seguito a una frattura, oppure, in maniera patologica, in un gruppo di condizioni in cui si osserva ossificazione eterotopica, cioè ossificazione al di fuori delle sedi appropriate come ad esempio i tessuti molli dei muscoli, dei tendini, dei legamenti.

La condizione patologica più grave è denominata Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP), che è caratterizzata da una malformazione congenita agli alluci osservata alla nascita e da progressiva ossificazione eterotopica che può verificarsi spontaneamente o in seguito a stimoli diversi come traumi, infezioni, manovre mediche. L'ossificazione procede in maniera episodica con periodi di acutizzazione che si alternano a fasi quiescenti.

## BASI RAZIONALI

Una serie di risultati ottenuti negli ultimi 10 anni da chi ha svolto ricerca sulla FOP hanno permesso di comprendere che il processo patologico era dovuto a un'alterazione dei meccanismi cellulari regolati da un gruppo di proteine, denominate Proteine Morfogenetiche dell'Osso (Bone Morphogenetic Proteins, BMP) che agiscono trovando dei recettori specifici sulla superficie delle cellule su cui esercitano il loro effetto. Potremmo esemplificare questa interazione come l'introduzione di una chiave, che si trova al di fuori di una cellula, in una serratura che si trova sulla superficie esterna della cellula. L'interazione tra BMP e recettore stimola una serie di segnalazioni che si trasmettono dalla superficie della cellula, dove appunto recettore e BMP si sono incontrati, all'interno della cellula stessa, e che hanno l'effetto di produrre osso.

La scoperta più importante in questo campo è stata l'individuazione della proteina che è "mutata" nei pazienti con FOP, cioè che ha una variazione nei pazienti rispetto alle persone non affette. Questa proteina è un recettore di BMP, chiamato ACVR1 o anche ALK2, la cui funzione è quella di ricevere lo stimolo di BMP e trasmetterlo in tutte le condizioni in cui questo stimolo è importante che si verifichi. Questo meccanismo è essenziale per molti processi fondamentali per il corretto sviluppo dell'embrione prima della nascita, e anche in alcune situazioni dopo la nascita, come la riparazione delle fratture. La mutazione cambia il meccanismo rendendo questa segnalazione meno controllata, nel senso che diventa eccessiva. Questo "eccesso di funzione" non è molto evidente per quanto riguarda lo sviluppo embrionale, tanto è vero che i bambini che poi manifesteranno la malattia nascono con una piccola malformazione che può anche sfuggire all'osservazione. Esso si rende evidente soprattutto nella vita post natale, quando scatena gli episodi acuti che danno poi luogo alla formazione di osso nei tessuti molli. Si potrebbe dire che i pazienti con FOP hanno un sistema BMP/Recettore che è sempre attivo e quindi particolarmente sensibile e reattivo verso stimoli infiammatori o traumatici che si possono verificare, al contrario delle persone non affette nelle quali il meccanismo è normalmente inattivo e entra in funzione solo in risposta a condizioni in cui esso è appropriato, per esempio quando è necessario riparare una frattura.

Abbiamo parlato di un meccanismo che agisce a livello cellulare, ma in quali cellule? Si ritiene oggi che l'ossificazione non si verifichi nelle cellule dei tessuti che vengono sostituiti da osso: cioè se l'ossificazione si verifica in un muscolo, non sono le cellule muscolari che si trasformano in cellule ossee. Piuttosto, nell'ambito della massa del tessuto muscolare, si trovano cellule, chiamate cellule staminali, che hanno la capacità di produrre osso. Quindi si forma tessuto osseo a partire da queste cellule e quell'osso progressivamente sostituisce il muscolo. Secondo un'altra ipotesi, le cellule staminali, attraverso il circolo sanguigno, potrebbero raggiungere il tessuto molle e, a loro volta, produrre osso. In altre parole la FOP si può considerare come una malattia delle cellule staminali che, sia che si trovino già residenti nel tessuto colpito, sia che lo raggiungano attraverso il circolo sanguigno, sono stimulate a produrre osso a causa del difetto genetico.

Questo è un argomento che è ancora da chiarire e quindi è opportuno che sia oggetto di ricerca.

## ARGOMENTI E OBIETTIVI DELLA RICERCA PROPOSTA

L'obiettivo generale della ricerca è approfondire i meccanismi molecolari, cioè quelli controllati dai geni e dalle proteine, e cellulari, cioè quelli che si verificano a livello dei tessuti, che determinano i processi di ossificazione eterotopica nella FOP.

In questo ambito i punti che saranno affrontati sono descritti di seguito uno a uno.

### 1. Studio dei pazienti

1.1 Ricerca delle mutazioni nel gene ACVR1. Il laboratorio continuerà ad eseguire la ricerca delle mutazioni, naturalmente nei pazienti italiani per i quali si rendesse necessario. Inoltre riproporrà ad altri centri clinici di altri paesi (Francia, Germania, Spagna, Turchia, Israele) di eseguire la stessa ricerca per i pazienti che giungeranno alla loro osservazione. Questa indagine ha valore di ricerca e non solo di diagnosi, come dimostrato dal risultato ottenuto dal gruppo proponente che, oltre a confermare che la grande maggioranza dei pazienti italiani era portatrice della stessa mutazione che si ritrova nella maggioranza dei pazienti conosciuti in tutto il mondo, ha individuato, in un paziente, una mutazione che non è mai stata descritta a livello mondiale. Significa che il processo patologico può essere determinato da difetti diversi la cui conoscenza non solo è opportuna, ma è da approfondire per non lasciare inesplorati aspetti importanti della patologia.

1.2 Ricerca sulle cellule staminali circolanti. Si è accennato sopra che la FOP è una malattia delle cellule staminali. Non è facile studiare le cellule staminali dei pazienti senza utilizzare procedure invasive che potrebbero essere dannose. I proponenti hanno scelto una procedura di estrazione delle cellule staminali dal sangue circolante, nel quale esse sono presenti anche se in quantità piccola. Sarà messo a punto un protocollo di estrazione su individui normali e di successiva caratterizzazione di queste cellule, quindi il protocollo sarà disponibile per estrarre le cellule staminali dai pazienti con FOP. È opinione dei proponenti che questa procedura si rivelerà più utile e più semplice rispetto ad altre, come l'estrazione dai denti da latte. La disponibilità delle cellule staminali dei pazienti sarà importante per le indagini molecolari e cellulari descritte in seguito.

### 2. Studio del gene ACVR1

2.1 Regolazione dell'espressione, studio del promotore. Ogni gene dell'organismo è soggetto a una regolazione che dirige la sua capacità di "esprimersi", cioè di produrre prima RNA messaggero e poi proteina. Questo meccanismo regola l'espressione durante la vita, per esempio per certi geni l'espressione si verifica in certe cellule mentre l'embrione si sviluppa e poi si spegne in quelle stesse cellule dopo questa fase embrionale, oppure si verifica in determinati tessuti e non in altri anche nella vita post natale. Il meccanismo è complesso e, per il gene ACVR1 è poco conosciuto. Questo sarà argomento della ricerca proposta con particolare attenzione alla regolazione della produzione di RNA messaggero. A questo scopo sarà analizzata la sequenza che agisce come "promotore" del gene, verificando se essa è unica o se ne esiste più di una con funzioni diverse in tipi di cellule diverse. A questo scopo sarà costruito un gene "ibrido" composto dal promotore di ACVR1 fuso a un gene detto "reporter", cioè segnale, la cui espressione può essere messa in evidenza con una colorazione blu. La sperimentazione prevede come risultato finale di una serie di passaggi che non descrivo in dettaglio, l'osservazione dei tessuti colorati in blu, nei quali la colorazione si manifesta sotto il controllo della sequenza di ACVR1. Questo è possibile introducendo il gene ibrido in un topo da esperimento, che viene chiamato topo transgenico, con una tecnologia che i proponenti hanno già utilizzato in passato.

Lo scopo di questa sperimentazione è l'individuazione delle sequenze di ACVR1 che ne regolano l'espressione, fino ad ora non descritte in alcun articolo scientifico, e delle cellule e dei tessuti in cui questa regolazione ha luogo, utilizzando un modello animale. La conoscenza di tali caratteristiche del gene permetterà di avere bersagli mirati se si progetteranno strategie di intervento a livello della regolazione della produzione di RNA messaggero.

2.2 Regolazione dell'espressione, studio della regione terminale al 3' del gene. 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. Per ACVR1 nessuno ha mai eseguito studi su questa regolazione e pertanto il programma di ricerca si propone come obiettivo di iniziare a lavorare su questo aspetto della regolazione. In questo caso la sperimentazione sarà condotta "in vitro", cioè su cellule coltivate. Si utilizzeranno, anche in questo caso, geni costruiti da noi in laboratorio nei quali la parte terminale riprodurrà le sequenze di ACVR1 che si ipotizzano capaci di regolazione. Questi geni artificiali saranno introdotti in diversi tipi di cellule coltivate in vitro per verificare l'ipotesi di partenza. Anche in questo caso, i risultati potranno fornire conoscenze su un altro possibile bersaglio di intervento.

### 3. Studio di cellule staminali

3.1 Preparazione di cellule staminali da diverse fonti. Le cellule staminali, cioè cellule capaci di formare diversi tipi di tessuti, incluso ovviamente il tessuto osseo, saranno preparate a partire da midollo osseo, tessuto adiposo e sangue circolante. Per ciascuna delle tre fonti di materiale cellulare saranno messi a punto i metodi per ottenere le cellule staminali. Questi metodi sono in parte già noti e utilizzati e in parte da sviluppare. In particolare il metodo di preparazione dal sangue circolante è fondamentale per ottenere cellule staminali da pazienti con FOP, quindi cellule in cui si trova il gene ACVR1 con la mutazione.

3.2 Differenziamento delle cellule staminali. Questo tipo di cellule è in grado di "differenziarsi", cioè di produrre cellule specifiche di un determinato tessuto. Si studierà il differenziamento in senso condrogenico, cioè cellule della cartilagine, e osteoblastico, cioè cellule dell'osso, sotto lo stimolo di BMP e di altre proteine che stimolano il differenziamento in condizioni fisiologiche. Inoltre si studierà lo stesso differenziamento in presenza di stimoli che mimano le condizioni che si verificano nei tessuti colpiti dalla FOP, come lo stress meccanico e l'ipossia. Tutta questa sperimentazione, i cui dettagli non vengono descritti qui, sarà condotta su cellule coltivate in vitro, incluse quelle estratte dai pazienti, una volta che tutta la metodologia sarà messa a punto e funzionante.

Gli argomenti trattati nel punto 3 sono oggetto di ricerca in diversi laboratori, che però utilizzano vari approcci metodologici. La presente proposta intende affrontare il problema con approcci metodologici propri, con l'intento di contribuire ad aumentare le conoscenze sui meccanismi cellulari della patologia che sono fino ad ora poco compresi.