

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 Giacomelli, assegnista di ricerca, Università di Genova.
- Dott.ssa Marzia Mura, contrattista Istituto G. Gaslini.
- Serena Cappato, studentessa Corso di Laurea in Scienze Biologiche, biennio specialistico.

INDICE

RELAZIONE ATTIVITA' SVOLTA.....	3
RISULTATI IN RELAZIONE AGLI OBIETTIVI PROPOSTI.....	4
PROPOSTE PER LA CONTINUAZIONE DEL PROGETTO.....	12

RELAZIONE ATTIVITA' SVOLTA

Il progetto presentato a questa Spett.le Associazione ha l'intento di contribuire ad aumentare le conoscenze di base sul gene *ACVR1/ALK2* e sui meccanismi molecolari e cellulari responsabili della Fibrodisplasia Ossificante Progressiva. Abbiamo affrontato queste tematiche con approcci metodologici messi a punto nel nostro gruppo focalizzandoci su alcuni aspetti ad oggi non ancora indagati.

Durante questo anno (2010) abbiamo presentato il nostro lavoro a due congressi internazionali:

- Conferenza annuale della Società Europea di Genetica Umana (European Society of Human Genetics Conference, *ESHG2010*, 12-15 Giugno 2010, Goteborg, Svezia), alla quale abbiamo partecipato presentando un poster (disponibili sul sito dell'Associazione FOP Italia);
- 8^a Conferenza Internazionale sulle Proteine Morfogenetiche dell'osso (8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, 15-18 Settembre, Lovanio, Belgio). A quest'ultima abbiamo partecipato con due poster e, su selezione degli organizzatori della Conferenza, abbiamo potuto esporre i nostri dati in due diverse sessioni di comunicazioni orali. Francesca Giacomelli ha presentato parte del nostro lavoro sulla regolazione dell'espressione di *ACVR1/ALK2* in una comunicazione dal titolo "Study of the *ACVR1/ALK2* gene expression and regulation: the promoter region and the 5'-UTR" (Session 2, Control mechanisms in BMP signaling). Roberto Ravazzolo ha esposto altri dati nella comunicazione intitolata "The role of the 3'UTR region in the regulation of the *ACVR1* expression" (Session 6: BMPs: Hot Topics) (i poster relativi alle comunicazioni indicate sono disponibili sul sito dell'Associazione FOP Italia).

Entrambe le Conferenze, ma particolarmente quella del mese di settembre in Belgio, ci hanno dato la possibilità di incontrare colleghi esperti dell'argomento in campo internazionale e di confrontarci con loro. Questi confronti hanno lo scopo da una parte di verificare se e quanto la ricerca che svolgiamo ha valore e dall'altra di trarre spunti e suggerimenti utili per continuarla.

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 altri 2 pazienti. Uno di questi, proveniente dall'estero (La Réunion, Francia), è stato inviato sulla base di un sospetto clinico poi non confermato a livello molecolare. Il secondo paziente analizzato presenta invece una forma classica di FOP ed è risultato portatore 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 37 pazienti, per 26 dei quali abbiamo potuto confermare la diagnosi clinica (21 con R206H, 4 con R258S, 1 con Q207E). Come già avvenuto in passato, la diagnosi molecolare è stata fornita anche ad alcuni famigliari di pazienti che ne hanno richiesto l'esecuzione.

2 Studio del gene *ACVR1/ALK2*

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 appunto dedicata allo studio della regolazione dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2*, della quale la gran 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, in parte, 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 untranslated transcribed region) (Figura 1).

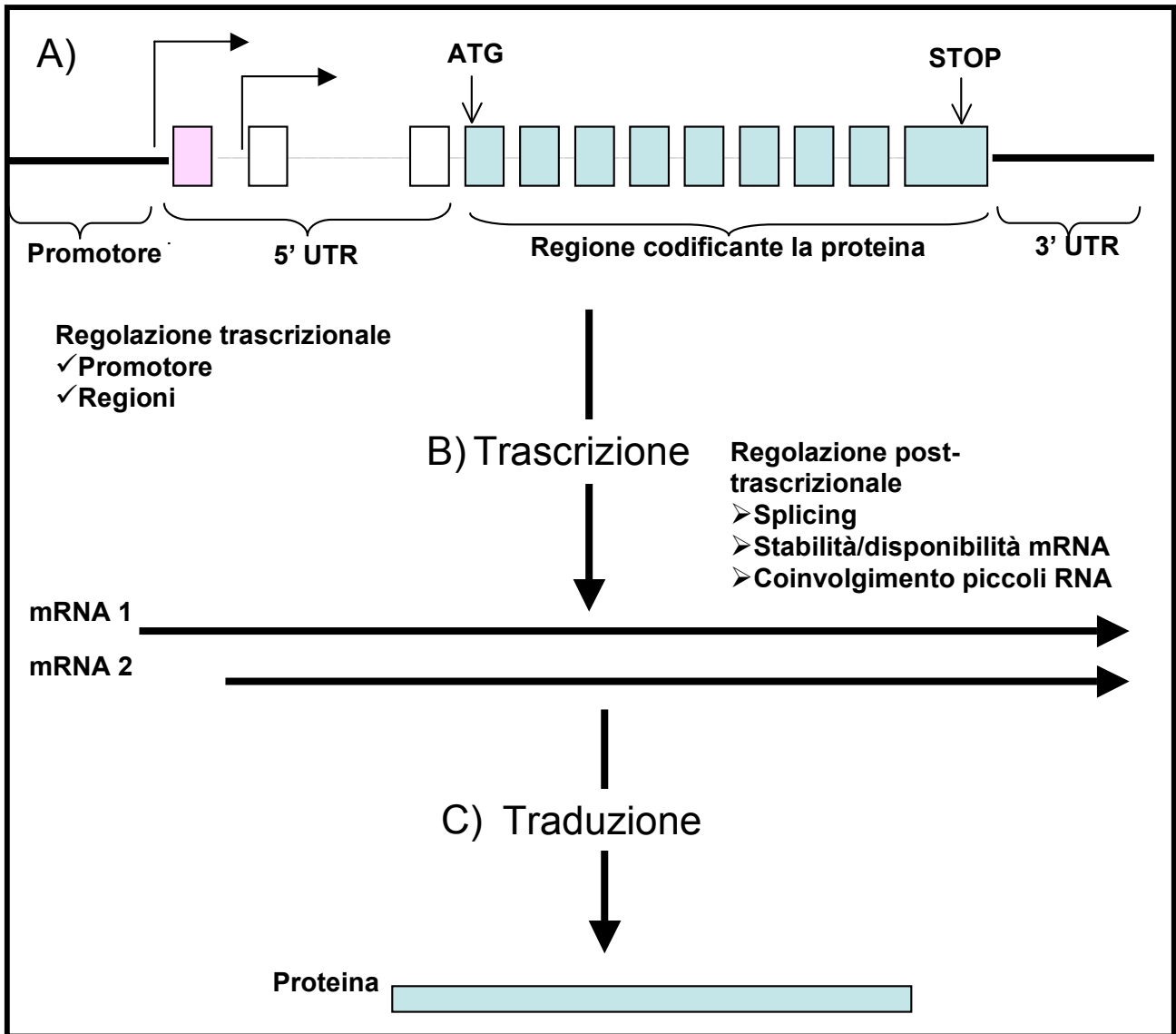


Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura di un gene e dei processi che portano alla sintesi delle proteine.

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.

2.1 Profilo e 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 ovvero è presente sotto forma di mRNA in molti dei tessuti e linee cellulari da noi analizzati.

Per quanto riguarda la regione 5'UTR abbiamo individuato diverse forme (isoforme) che differiscono per la presenza di esoni alternativi. Rispetto ai risultati dello scorso anno, abbiamo messo in evidenza che la situazione all'estremo 5' del gene è molto più complessa di quella inizialmente descritta e, le isoforme da noi identificate e caratterizzate sono diverse e numerose. Non sappiamo ancora 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.

Non tutte le diverse isoforme sono però espresse allo stesso modo. Inoltre, abbiamo dimostrato che il gene ha un messaggero instabile, ovvero non permane a lungo nella cellula una volta sintetizzato. Questo si riflette ovviamente sulla quantità di proteina che può venire prodotta, a parità di messaggero sintetizzato, infatti, se questo è instabile, si avrà una minore traduzione nella proteina corrispondente. Questa caratteristica naturalmente non è esclusiva del messaggero di ACVR1/ALK2, molti altri geni hanno trascritti instabili o addirittura molto instabili. La cosa interessante però è che in tutti i casi si tratta di geni molto importanti per la cellula, in alcuni casi potenzialmente "pericolosi", la cui espressione deve essere finemente controllata.

Per cercare di capire se esistono differenze funzionali tra i vari trascritti identificati, abbiamo clonato 5 diverse isoforme, e altre 2 sono in corso di preparazione, in modo da poter disporre di un pannello di vettori plasmidici che includono diversi segmenti di sequenza 5' UTR da indagare mediante saggi funzionali con geni reporter.

Un altro risultato significativo ottenuto recentemente è 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*. L'identificazione di una regione con queste caratteristiche funzionali è sicuramente un risultato di rilievo. In primo luogo il promotore di *ACVR1/ALK2* non era mai stato descritto in precedenza, inoltre, cosa ancor più sostanziale, apre diverse opportunità di approfondimento circa i meccanismi e i fattori che possono intervenire nel regolarne l'espressione a livello trascrizionale. Dopo una fase di caratterizzazione funzionale preliminare, stiamo procedendo con l'analisi di diversi costrutti di delezione, ovvero frammenti di DNA della regione a monte di *ACVR1/ALK2* dalla quale vengono progressivamente eliminati pezzi di sequenza dal lato 5'. Questo lavoro consente di vedere come varia l'attività del gene reporter diretta dai singoli frammenti, e valutare se l'accorciamento progressivo del frammento porta o meno alla perdita di elementi funzionali positivi o negativi, che possono poi essere indagati in maniera specifica. Questo tipo di analisi consente di identificare quello che tecnicamente definiamo come promotore minimo del gene, ovvero quella sequenza assolutamente necessaria per dirigere la trascrizione basale del gene e senza la quale questa non può avvenire.

Sottolineiamo inoltre che la preparazione e la disponibilità di molti costrutti ci permette di indagare anche sull'effetto che viene esercitato sul gene da parte di numerosi e diversi stimoli, in particolare quelli mediati dal sistema immunitario e quelli di natura infiammatoria, che sicuramente hanno un ruolo nel causare le acutizzazioni della malattia.

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.

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 ha 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 e i processi differenziativi. 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.

Come accennato sopra, il nostro lavoro ha messo in evidenza la presenza di diversi siti di legame per miRNA e noi abbiamo focalizzato l'attenzione su tre di questi chiamati miR-365, miR-148b e miR-26a. Il primo dei tre sembra implicato nel controllo della crescita cellulare e gran parte delle informazioni che lo riguardano derivano dalla ricerca oncologica. miR-148b e -26a, sono invece implicati in vario modo, anche nei processi di differenziamento cellulare in senso osteoblastico, e sono dal nostro punto di vista molto interessanti.

I nostri esperimenti hanno messo in evidenza che il miR-148b e il -365 provocano una diminuzione dell'espressione del gene ACVR1/ALK2, che invece risulta attivata in presenza del miR-26a. Sono attualmente in corso esperimenti volti a determinare la specificità di questa azione e a chiarire i meccanismi responsabili di questo tipo di regolazione.

3 Sistema cellulare

Nella relazione dello scorso anno avevamo parlato 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. Il pieno sviluppo di questa parte di lavoro avrebbe la necessità di finanziamenti *ad hoc* dati i costi e l'impegno in termini di tempo da dedicare. E' per questo che è stata oggetto di richieste di finanziamenti specifici che, purtroppo, fino ad ora non sono stati accordati.

Tuttavia, abbiamo fatto qualche progresso in tal senso e, grazie alla collaborazione con il Dott. Daga dell'IST, abbiamo ottenuto 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). Entrambe le forme sono state marcate inserendo una sorta di etichetta molecolare (detta "flag") che rende la proteina espressa facilmente

rilevabile mediante anticorpi specifici. 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 passaggio di trasfezione (vedere rappresentazione schematica in Figura 2).

Attualmente il sistema è stato saggiato in forma transiente e adattato alla coltura in micropiastre da 96 pozzetti (le stesse utilizzabili per lo screening farmacologico) (Figura 2).

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, essendo questi argomenti del tutto originali e non indagati da parte di altri gruppi nel mondo, per quanto ci risulta fino ad ora. Tuttavia, ci sono altre tematiche che meritano di essere prese in considerazione e affrontate.

1) EFFETTO DI FARMACI

Uno dei nostri obiettivi è quello di sviluppare 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. Questo sistema cellulare è in corso di messa a punto.

- Analisi su larga scala di molecole con potenziale effetto farmacologico sulla via della BMP mediata da ACVR1/Alk2. In questo studio, verranno utilizzate diverse "librerie" contenenti migliaia di composti di sintesi rappresentanti di diverse classi di molecole, composti naturali e principi attivi già approvati per l'uso farmaceutico, che verranno utilizzati parallelamente agli opportuni controlli.
- Analisi mirata dell'effetto di molecole/farmaci candidati come ad esempio il Rosiglitazone o altri principi attivi appartenenti alla stessa classe di molecole (vedi Pioglitazone etc). Nell'ultimo anno è emersa la proposta di realizzare uno studio clinico volto a valutare la possibilità di impiego di un farmaco anti-diabetico, il Rosiglitazone (RSG), nel trattamento della FOP, in virtù di alcuni noti effetti collaterali sul metabolismo osseo e sull'infiammazione. Questa proposta ha preso spunto dai risultati descritti dal gruppo del Dott. Davide Gatti a Verona, a proposito del trattamento con questo farmaco di una paziente affetta da FOP e ha fatto scaturire l'interesse per uno studio volto ad indagare l'effetto del RSG sulla via funzionale delle BMP e su ACVR1/ALK2 in particolare. Obiettivo fondamentale è quello di chiarire se tale effetto influenzi una via funzionale significativamente coinvolta nel processo di ossificazione.
- Analisi dell'effetto del RSG sulla regolazione dell'espressione del gene ACVR1/ALK2. Grazie all'identificazione del promotore di ACVR1/ALK2 e al fatto di avere generato diversi costrutti che lo contengono disponiamo di strumenti utili a verificare se esiste o meno un effetto diretto sulla trascrizione di ACVR1/ALK2 da

parte del RSG o eventualmente di altre molecole/farmaci candidati. In alternativa, l'effetto potrebbe essere indiretto influenzando regolatori di ACVR1/ALK2 o di altri membri appartenenti alla stessa via funzionale.

2) REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE E SISTEMA IMMUNITARIO

Come emerge dalla letteratura e dalle caratteristiche delle lesioni precoci tipiche della FOP, il sistema immunitario riveste sicuramente un ruolo importante nella patogenesi della malattia. Abbiamo quindi pensato di iniziare a 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.

- Analisi delle possibili interazioni tra le cellule del sistema immunitario e modulazione dell'espressione del gene *ACVR1/ALK2*. Come accennato sopra, la regione promotrice è stata opportunamente isolata e clonata a monte del gene della Luciferasi usato come reporter, in questo modo le potenzialità funzionali della regione sono evidenziabili in termini di attività del gene reporter, attività che è rilevabile e misurabile. Questo costrutto viene introdotto (trasfettato) all'interno di diverse linee cellulari. Le cellule trasfettate vengono poi messe in contatto (co-coltura) con alcuni tipi di cellule del sistema immunitario, quali linfociti quiescenti, così come vengono isolati dal circolo sanguigno di un individuo sano; linfociti cosiddetti "attivati", ovvero che hanno ricevuto uno stimolo proliferativo non specifico (come accade quando il sistema immunitario "reagisce" ad uno stimolo); monociti, che costituiscono la prima linea di difesa del sistema immunitario innato. I linfociti potranno anche essere "attivati" con stimoli diversi e più specifici, mirati ad esempio a mimare l'effetto di infezioni batteriche e/o virali etc. Al termine della co-coltura le cellule vengono raccolte, sottoposte a lisi e si effettua la misurazione dell'attività del gene reporter. Se le cellule utilizzate producono sostanze in grado di modificare l'attività del gene reporter rispetto ad opportuni controlli, si può dedurre che queste molecole agiscono sull'espressione di *ACVR1/ALK2* promuovendone o spegnendone la trascrizione.
- Analisi delle possibili interazioni tra le cellule del sistema immunitario e modulazione della via delle BMP SMAD-dipendente. Questo tipo di studio sfrutta l'esperimento di co-coltura sopradescritto andando però a valutare l'attività di un gene reporter sotto il controllo di elementi responsivi alle BMP, in questo caso si valuterà l'effetto di queste cellule e delle molecole da esse prodotte sulla via di

attivazione delle BMP *in toto*.

- Gli esperimenti sopradescritti potranno essere ripetuti allo scopo di analizzare gli effetti di cellule del sistema immunitario di pazienti FOP rispetto a quelle di individui non affetti. A questo scopo le cellule si possono isolare a partire da un prelievo di sangue periferico e, se l'Associazione FOP Italia e i suoi associati aderiranno a questa ricerca, si dovranno organizzare e predisporre le opportune misure di prelievo del sangue.