

MINISTERO DELL'UNIVERSITÀ E DELLA RICERCA
DIREZIONE GENERALE PER IL COORDINAMENTO E LO SVILUPPO DELLA RICERCA
PROGRAMMI DI RICERCA SCIENTIFICA DI RILEVANTE INTERESSE NAZIONALE
RICHIESTA DI COFINANZIAMENTO (DM n. 1175 del 18 settembre 2007)
PROGETTO DI RICERCA - MODELLO A
Anno 2007 - prot. 2007RLLET8

1 - Titolo del Progetto di Ricerca

Meccanismi patogenetici dell'ossificazione eterotopica: il modello della Fibrodisplasia Ossificante Progressiva

2 - Durata del Progetto di Ricerca

24 Mesi

3 - Area Scientifico-disciplinare

*06: Scienze mediche 75% **

05: Scienze biologiche 25%

** Area prescelta ai fini della valutazione*

4 - Settori scientifico-disciplinari interessati dal Progetto di Ricerca

MED/03 - Genetica medica

MED/04 - Patologia generale

BIO/13 - Biologia applicata

5 - Coordinatore Scientifico

RAVAZZOLO ROBERTO

Professore Straordinario 06/02/1947 RVZRRRT47B06D969W

Università degli Studi di GENOVA

Facoltà di MEDICINA e CHIRURGIA

Dipartimento di SCIENZE PEDIATRICHE

010/5636400

(Prefisso e telefono)

010/3779797

(Numero fax)

rravazzo@unige.it

8 - Elenco delle Unità operative

Unità Responsabile dell'Unità di Ricerca Qualifica Ente Impegno

I RAVAZZOLO Roberto Professore Straordinario Università degli Studi di GENOVA

II CURCIO Francesco Professore Straordinario Università degli Studi di UDINE

III TAVELLA Sara Ricercatore confermato Università degli Studi di GENOVA

9 - Abstract del Progetto di Ricerca

L'ossificazione eterotopica, cioè la formazione di osso al di fuori dello scheletro, come per esempio nella cute, nel tessuto sottocutaneo, nei muscoli scheletrici e nei tessuti fibrosi periarticolari, si manifesta come processo anomalo in una serie di condizioni patologiche. La Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) (OMIM 135100) è la malattia più grave e disabilitante con ossificazione eterotopica nell'uomo, causata da mutazioni nel gene ACVR1 che codifica per un

recettore nella via funzionale delle Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). I partecipanti a questo programma di ricerca studieranno i meccanismi patogenetici dell'ossificazione eterotopica considerando la FOP come malattia modello. I risultati attesi dovrebbero fornire maggiori conoscenze utilizzabili per progettare strategie terapeutiche per la FOP e possibilmente anche per altre condizioni patologiche più comuni con ossificazione eterotopica. Le conoscenze su aspetti importanti del processo di ossificazione, d'altra parte, potrebbero essere interessanti per il settore della medicina rigenerativa applicata all'osso per sviluppare nuove terapie rigenerative.

Obiettivi specifici del programma saranno:

- Studi su pazienti con FOP, per continuare la ricerca di mutazioni che serve a indirizzare la ricerca verso difetti in punti chiave della funzione della proteina mutata e della relativa via funzionale. Campioni di denti decidui e di sangue circolante di pazienti saranno utilizzati per isolare con mezzi non invasivi cellule staminali/progenitrici.
- Modelli cellulari, sviluppati per lavorare sui tipi cellulari che sono probabilmente quelli in cui i difetti nelle vie funzionali conducono all'ossificazione eterotopica. Cellule staminali/progenitrici saranno isolate da una varietà di fonti e studiate per le loro proprietà differenziative e per la risposta a stimoli potenzialmente coinvolti nell'indurre l'ossificazione.
- Profilo di espressione del gene ACVR1 per chiarire aspetti che fino ad ora sono stati poco studiati, come possibili diversi siti di inizio della trascrizione, diverse regioni promotrici/enhancer, isoforme causate da splicing alternativo di esoni non tradotti nella regione al 5' del gene.
- Effetto delle mutazioni di ACVR1 sulle proprietà differenziative e sulla risposta a stimoli di cellule in cui viene trasferito il cDNA di ACVR1 mutato. Questo aspetto sarà studiato preparando vettori di espressione che saranno trasferiti in diversi tipi cellulari di interesse.

10 - Parole chiave

1. OSSIFICAZIONE ETEROTOPICA
2. FOP
3. CELLULE STAMINALI
4. BMP
5. ACVR1

11 - Obiettivi finali che il Progetto si propone di raggiungere

Le tre unità partecipanti, indicate secondo le iniziali dei relativi coordinatori come Unità RR (Roberto Ravazzolo), Unità ST (Sara Tavella), Unità FC (Francesco Curcio), affrontano aspetti diversi di una ricerca su meccanismi patogenetici dell'ossificazione eterotopica riferendosi ad un modello di malattia, la Fibrodiplosia Ossificante Progressiva (FOP), per la quale esistono competenze nell'ambito dei partecipanti al progetto. Come obiettivi dell'intero programma di ricerca vengono elencati sotto, punto per punto, sia studi su pazienti con FOP, che studi sperimentali i cui presupposti derivano dal lavoro eseguito sui pazienti, che studi si base volti a chiarire meccanismi fisiopatologici a livello cellulare.

1 Studio di pazienti

1.1 Ricerca di mutazioni nel gene ACVR1. L'Unità RR studierà il gene mutato nella FOP, ACVR1, eseguendo la diagnosi molecolare dei pazienti. Questa Unità è centro di riferimento italiano per la FOP e ha già sviluppato una notevole esperienza avendo eseguito la diagnosi molecolare di tutti i pazienti italiani conosciuti fino ad ora. L'identificazione di mutazioni nel gene causativo è il presupposto per indagarne l'effetto sulla funzione.

1.2 Isolamento di cellule staminali dalla polpa di denti decidui e di progenitori osteoblastici dal sangue circolante da pazienti con FOP.

2 Modelli cellulari

Partendo dall'ipotesi che i processi patologici dell'ossificazione eterotopica si sviluppano in cellule staminali o comunque progenitrici capaci di differenziare verso la linea osteoblastica, questo obiettivo rappresenta una parte molto sostanziale dell'intero studio. Le Unità ST e FC produrranno molti diversi tipi cellulari in coltura, che saranno a disposizione di tutte e tre le unità.

2.1 Allestimento di colture di cellule mesenchimali staminali da midollo osseo e loro caratterizzazione mediante analisi di marcatori specifici.

2.2 Allestimento di colture di cellule mesenchimali staminali da tessuto adiposo e loro caratterizzazione mediante analisi di marcatori specifici.

2.3 Allestimento di colture di cellule staminali da denti decidui e loro caratterizzazione mediante analisi di marcatori specifici. Potranno essere isolate da pazienti con FOP.

2.4 Isolamento e coltura di cellule progenitrici osteoblastiche circolanti. Potranno essere isolate da pazienti con FOP.

2.5 Induzione delle cellule staminali al differenziamento, mediante stimoli specifici. Sarà valutato in particolare il differenziamento verso la linea osteoblastica, ma anche la capacità di differenziare verso altri tipi cellulari.

3 Espressione del gene ACVR1

Il gene ACVR1 e la proteina da esso codificata sono noti ma non sono conosciute molte caratteristiche dell'espressione del gene, per esempio il profilo di espressione nei tessuti adulti ed embrionali, il promotore, isoforme del trascritto dovute a splicing alternativo. Il coordinamento tra le tre unità partecipanti offre un'opportunità importante di chiarire queste caratteristiche di espressione in una varietà di tipi cellulari (v. obiettivo 2) e in diverse condizioni di stimolazione delle stesse cellule.

3.1 Individuazione dei trascritti di ACVR1 in cellule di tessuti adulti nell'uomo e di tessuti adulti ed embrionali nel topo.

3.2 Verifica della possibile esistenza di siti di inizio di trascrizione multipli e, di conseguenza, di possibili promotori alternativi.

3.3 Verifica della possibile esistenza di isoforme da splicing alternativo di esoni non tradotti all'estremo 5' del gene in tutti i tipi cellulari messi a disposizione dalle Unità partecipanti.

Caratterizzazione della loro composizione relativa nei diversi tipi cellulari.

3.4 Verifica di variazioni di espressione quantitativa e qualitativa (composizione relativa di isoforme) in relazione a diversi stati differenziativi e/o condizioni di stimolazione delle cellule esaminate.

3.5 Verifica delle stesse variazioni di espressione in cellule di pazienti con FOP in condizioni basali e soggette a stimolazione.

4 Effetti delle mutazioni di ACVR1

Gli effetti delle mutazioni nel gene ACVR1 saranno studiati mediante la messa a punto di saggi funzionali in vitro in diversi tipi cellulari e in diverse condizioni di coltura delle cellule. In ogni saggio si studieranno in maniera comparativa le proteine prodotte da costrutti che esprimono il cDNA di ACVR1 selvatico o mutato con due mutazioni: la mutazione ricorrente R206H e una mutazione trovata in un singolo paziente R258S.

4.1 Preparazione di vettori di espressione con cDNA di ACVR1 selvatico e mutato. Verrà anche costruito un vettore retrovirale.

4.2 Trasferimento dei diversi tipi di vettori di espressione a diversi tipi cellulari con una varietà di tecniche di trasferimento inclusa l'infezione con il vettore retrovirale.

4.3 Saggi funzionali nelle cellule in cui viene espresso il cDNA mutato in confronto con il cDNA selvatico di controllo. Si valuteranno le risposte a diversi stimoli e le caratteristiche di

differenziamento.

4.4 Esecuzione dei saggi funzionali nelle colture di cellule derivate dai pazienti con FOP.

4.5 Valutazione della capacità della proteina codificata da ACVR1 di legare la proteina FKBP12 in cellule in cui viene espresso il cDNA di ACVR1 mutato rispetto a quello normale.

12 - Stato dell'arte

L'ossificazione eterotopica consiste nella formazione di osso al di fuori dell'apparato scheletrico (v. McCarthy, 2005, per una revisione). Tale processo patologico può avvenire in diverse sedi quali pelle, tessuti sottocutanei, muscolo scheletrico e tessuto fibroso adiacente alle articolazioni. L'osso può formarsi anche nella parete dei vasi sanguigni e nei legamenti. In alcuni casi, si può formare in sedi intra-addominali quali il mesentere. La presentazione di questa condizione patologica è molto variabile. Le lesioni ad essa associate vanno da piccoli foci clinicamente insignificanti a massicci depositi di osso in tutto il corpo. Quattro fattori sono necessari per innescare il processo di ossificazione eterotopica. In primo luogo un evento "iniziatore". Questo è solitamente costituito da un trauma che può portare alla formazione di un ematoma. Spesso il trauma è minimo e coinvolge poche fibre muscolari o strutture di collagene. Il secondo fattore consiste nella propagazione di un segnale a partire dalla sede del trauma. Il segnale è con tutta probabilità una proteina secreta dalle cellule danneggiate o dalle cellule infiammatorie richiamate in risposta al trauma. Terzo, ci deve essere l'intervento di cellule mesenchimali non ancora pienamente orientate verso un particolare differenziamento.

Dato il segnale opportuno, geni specifici vengono attivati stimolando queste cellule mesenchimali a differenziare in osteoblasti e condroblasti. La ossificazione eterotopica può avvenire ovunque queste cellule non ancora completamente programmate risiedano, per esempio in sedi quali muscolo scheletrico, tessuti perivascolari e tessuti fibrosi. L'ultimo fattore è costituito dal fatto che deve esistere un ambiente appropriato che favorisce la continua produzione di osso eterotopico.

Di questi quattro fattori, la generazione di un segnale biologico sembra essere l'evento più importante nella formazione di osso ectopico, e grandi progressi sono stati fatti nella comprensione di questo fenomeno. Le maggiori responsabili del processo di formazione dell'osso sono le Proteine Morfogenetiche dell'Osso (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) (Chen, 2004). Esistono diversi membri di questa famiglia proteica che, a sua volta, appartiene alla superfamiglia del "transforming growth factor beta (TGF β)", comprendente oltre 40 molecole di segnalazione (Massague, 2006). Le BMP non hanno solo un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'ossificazione eterotopica ma sono anche effettori cruciali durante lo sviluppo embrionale. Non a caso, durante l'embriogenesi le BMP dirigono il differenziamento di vari tessuti e l'asse embrionale. Un gran numero di evidenze indicano che le BMP agiscono come morfogeni durante lo sviluppo dei vertebrati. Un altro gruppo di proteine è importante per l'azione e la modulazione delle BMP, ovvero i recettori e gli antagonisti delle BMP. I recettori delle BMP sono necessari per mediare gli effetti delle BMP, mentre gli antagonisti ne regolano l'azione. Complessi recettoriali eteromerici formati da recettori serina/treonina chinasi di tipo I e II mediano l'effetto delle BMP e la fosforilazione di molecole situate a valle nella cascata di segnalazione quali le proteine Smad (Chen, 2004). Tra i recettori di tipo I c'è l'Activin-receptor Like Kinase 2 (ALK2), noto anche come ACVR1.

La regolazione operata dagli antagonisti si realizza sia a livello di recettore che della cascata a valle di esso. Il legame con la FK506-binding protein 12 (FKBP12) ai recettori di tipo I, quali TGFBR1 e BMPRI, stabilizza il recettore stesso in una conformazione inattiva bloccando la trasduzione del segnale. Dal momento che ACVR1 mostra una elevata omologia con TGFBR1 e BMPRI, è stato ipotizzato che anch'esso possa legare FKBP12, o uno dei suoi omologhi, e che la mutazione tipica della FOP possa interferire con questo legame (Shore, 2006).

La Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) (OMIM 135100) è una delle più severe e invalidanti

malattie da ossificazione eterotopica nell'uomo, e mostra una prevalenza di 1 individuo ogni 2 milioni (Shore, 2006). La neoformazione di osso nella FOP comincia nell'infanzia in risposta ad un trauma o anche senza causa apparente. L'ossificazione è episodica e progressiva e porta ad anchilosi extra-articolare di tutte le articolazioni dello scheletro assiale e appendicolare, fino a rendere impossibile il movimento. Tra le conseguenze della severa invalidità portata dalla FOP c'è la bassa capacità riproduttiva, per questo sono riportati solo pochi casi familiari nei quali la malattia ricorre con ereditarietà autosomica dominante. La maggior parte dei casi è sporadica. Il gene *ACVR1* (vedere sopra) è risultato mutato virtualmente nella totalità dei casi di FOP confermando il ruolo di un difetto di segnalazione delle BMP nella patogenesi della malattia.

La rigenerazione di osso è un processo che deve essere attivo per la riparazione di difetti delle ossa quali quelli causati da traumi o da tumori. Le BMP, in particolare quelle osteogeniche, BMP2, BMP4 e BMP7, sono elementi importanti in questo processo. Esso è indotto in cellule staminali/progenitrici mesenchimali che possono differenziare verso diversi tessuti mesenchimali, come osso, cartilagine, adipe e muscolo. Queste cellule si trovano nel midollo osseo ma sono anche residenti in vari tessuti mesenchimali.

Nella FOP molti tessuti connettivi normali subiscono una profonda metamorfosi in osso maturo attraverso una trasformazione in epoca post-natale (Kaplan, 2007).

Questo processo non consiste di un transdifferenziamento di un tipo cellulare in un altro, per esempio cellule muscolari in cellule ossee, ma è piuttosto un processo patologico nel quale la normale struttura di un tessuto o di un organo è sostituita da quella di un altro. Tessuti connettivi normalmente funzionanti come aponeurosi, fasce, legamenti, tendini e muscoli scheletrici sono rimpiazzati da tessuto osseo eterotopico attraverso un complesso processo che coinvolge infiammazione, degenerazione e morte di cellule muscolari, proliferazione di cellule fibrogeniche a partire da cellule progenitrici finora non identificate, intensa angiogenesi, condensazione di tessuto fibroproliferativo fino a formare cartilagine, calcificazione della cartilagine e sostituzione della stessa con osso eterotopico maturo contenente anche elementi del midollo osseo.

Si ipotizza che mutazioni nel gene *ACVR1/ALK2* alterino la proteina codificata nella sua regolazione di base e sensibilità dipendente dalle proteine ligande, BMP, della segnalazione intracellulare in cellule progenitrici del tessuto connettivale. Queste cellule staminali/progenitrici devono essere alla base del processo di ossificazione eterotopica sebbene non sia ancora chiarito di quali cellule si tratti. Molte sorgenti di cellule pluripotenti o progenitrici possono contribuire alla formazione di uno scheletro ectopico, comprese quelle residenti nei muscoli scheletrici e nei tessuti connettivali ad essi associati, che possono appartenere a diverse linee differenziative di progenitori, come per esempio quelli dell'endotelio, del muscolo, di cellule satelliti, nervose o altre ancora di tipo connettivale. Inoltre, possono partecipare al processo progenitori osteoblastici circolanti richiamati nei tessuti affetti.

Riferimenti bibliografici

- Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41.
- Kaplan FS, Groppe J, Pignolo RJ, Shore EM. Morphogen Receptor Genes and Metamorphogenesis: Skeleton Keys to the Metamorphosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Sep 13; [Epub ahead of print]
- Massague J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*. 2006 May 22;580(12):2811-20.
- McCarthy EF, Sundaram M. Heterotopic ossification: a review. *Skeletal Radiol*. 2005 Oct;34(10):609-19
- Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Cho TJ, Choi IH, Connor JM, Delai P, Glaser DL, LeMerrer M, Morhart R, Rogers JG, Smith R, Triffitt JT, Urtizberea JA, Zasloff M, Brown MA, Kaplan FS. A recurrent mutation in the BMP type I receptor *ACVR1* causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet*. 2006 May;38(5):525-7.

13 - Articolazione del Progetto e tempi di realizzazione

Le tre Unità partecipanti, definite secondo le iniziali dei rispettivi coordinatori come Unità RR (Roberto Ravazzolo), Unità ST (Sara Tavella), Unità FC (Francesco Curcio), collaboreranno in un programma di ricerca mirato ad approfondire la conoscenza dei meccanismi patogenetici dell'ossificazione eterotopica. Questa collaborazione consentirà lo scambio di cellule, reagenti e metodologie che renderanno il programma complessivo un sistema di studio integrato su problematiche relative alla biologia dell'osso. L'organizzazione temporale del lavoro viene sotto indicata in relazione agli obiettivi dettagliati nell'apposita sezione "Obiettivi".

NELL'INTERO PERIODO DI DUE ANNI

Obiettivo 1.1

Studio clinico e diagnostico dei pazienti affetti da FOP. Questo studio coinvolgerà nuovi pazienti Italiani o provenienti da altri paesi e inviati al Centro Italiano di riferimento per la FOP, istituito a Genova presso il laboratorio della Unità RR. I nuovi pazienti potranno essere riferiti verso questo centro grazie alla creazione di una rete di gruppi europei interessati alla FOP. Quest'analisi sui pazienti è una sorgente di informazioni sulle mutazioni a carico del gene ACVR1, che hanno alcune caratteristiche fondamentali: la sostituzione R206H nel dominio GS della proteina è presente in oltre il 95% dei pazienti provenienti da tutto il mondo, indipendentemente dall'origine etnica; in alcuni rari casi sono invece presenti mutazioni a carico di altre regioni della proteina. Una di queste, la R258S mappa nel dominio chinasi di ACVR1 ed è stata identificata nel laboratorio dell'Unità RR. Le mutazioni rilevate nei pazienti FOP potranno essere esaminate in vitro per valutare il loro effetto sulla funzionalità della proteina e sul percorso di segnalazione da essa mediato come descritto nelle sezioni apposite.

Obiettivo 1.2

Isolamento di cellule dalla polpa dei denti decidui: sarà effettuato ogni volta che si renda disponibile il materiale grazie all'esperienza maturata dall'Unità FC.

PRIMO ANNO

Obiettivi 2.1, 2.2, 2.3

L'Unità ST metterà a punto sistemi di coltura di cellule staminali/progenitrici provenienti da midollo osseo prelevato da creste iliache o da tessuto adiposo proveniente da lipoaspirazione, in entrambi i casi da donatori sani. Questo laboratorio ha una comprovata esperienza nel mantenimento in coltura di cellule progenitrici di osteoblasti e provvederà fin dall'inizio di questo programma di studio a rendere disponibili queste cellule, coltivate in condizioni basali, per l'Unità RR, allo scopo di studiare l'espressione del gene ACVR1 (vedere sotto). L'Unità FC metterà a punto colture di cellule simil-staminali a partire dalla polpa dei denti decidui, grazie a procedure standardizzate presenti in quel laboratorio. Anche queste colture verranno realizzate fin dall'inizio del programma di ricerca. Tutti i tipi cellulari verranno opportunamente caratterizzati per monitorare la presenza di marcatori specifici per lo stato differenziativo.

Obiettivo 2.5

Questo obiettivo è piuttosto complesso dal momento che le due Unità coinvolte, ST ed FC, si propongono di ottenere un'accurata caratterizzazione delle diverse capacità differenziative mostrate da cellule staminali/progenitrici coltivate. Nella fase iniziale del programma proposto le due Unità saranno per lo più impegnate nel mantenimento di queste cellule in uno stato indifferenziato e nel monitoraggio di marcatori specifici di questo stato. Inoltre, saranno impegnate nella standardizzazione di metodiche volte a consentire il congelamento di queste cellule nel loro stato indifferenziato e a ripristinarne la coltura, nelle stesse condizioni, dopo scongelamento. Queste procedure saranno essenziali per consentire lo scambio di cellule tra i laboratori partecipanti al progetto, e per consentire l'estrazione di RNA e proteine per lo studio di espressione.

Dopo una fase iniziale volta ad ottenere una standardizzazione metodologica per le colture in

condizioni basali, le due Unità svilupperanno protocolli per indurre la differenziazione osteoblastica. A tale scopo, verranno utilizzati opportuni fattori di crescita, chemochine, e citochine, verranno applicati specifici sistemi di colorazione e verranno utilizzati specifici marcatori e mezzi fisici per verificare l'appropriato stato differenziativo.

In questa fase sarà molto interessante seguire il profilo di espressione (mRNA e proteine) di BMP2, BMP4 e del recettore ACVR1, così come quello di molecole situate a valle nella via di trasduzione da quest'ultimo mediata. L'analisi verrà effettuata sia sulle cellule indifferenziate che sugli osteoblasti da esse derivati. Un altro compito delle due Unità principalmente implicate negli studi cellulari sarà quello di saggiare vari metodi utili al trasferimento di vettori di espressione all'interno delle cellule di interesse, inizialmente facendo uso di cDNA che esprimono proteine "traccianti", ad esempio proteine fluorescenti facilmente rilevabili una volta inserite nella cellula.

Obiettivi 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5

Gli studi riguardanti il profilo di espressione del gene ACVR1 cominceranno nell'Unità RR con l'inizio del programma di ricerca, mediante l'analisi di pannelli di cDNA provenienti da tessuti umani adulti e tessuti embrionali e adulti di topo. Questo gruppo verificherà se i diversi trascritti riportati in Banche Dati siano il prodotto di processamenti alternativi del messaggero, a carico degli esoni trascritti ma non tradotti localizzati al 5' del gene. Dal momento che apparentemente non c'è differenza di composizione a livello di sequenza codificante, l'interesse è rivolto alla possibile esistenza di promotori/enhancers alternativi che possano regolare l'espressione del gene in modo tessuto- o stadio differenziativo- specifico.

Questo aspetto della regolazione trascrizionale di ACVR1 non è stato ancora esplorato fino ad ora, per questo la collaborazione proposta tra le tre Unità partecipanti fornirà l'opportunità di esaminare l'espressione di ACVR1 in un'ampia varietà di cellule staminali/progenitrici e dei corrispondenti tipi cellulari differenziati. Lo studio procederà in modo progressivo a partire dalla messa a punto di reazioni di PCR specifiche per la caratterizzazione di inizi di trascrizione potenzialmente diversi, di processamenti alternativi del messaggero e per la quantificazione della composizione relativa delle varie isoforme. La ricerca proseguirà ulteriormente con l'analisi quantitativa del messaggero di ACVR1 in tutti i tipi cellulari resi disponibili dalle altre Unità, comprese cellule ottenute dai pazienti affetti da FOP.

Obiettivi 4.1, 4.2

L'unità RR procederà alla preparazione di costrutti di espressione contenenti il cDNA di ACVR1, sia selvatico che mutato, recante le mutazioni individuate nei pazienti FOP. Inizialmente verranno introdotte la mutazione ricorrente nella maggior parte dei casi FOP, la R206H situata nel dominio GS della proteina, e la R258S, identificata recentemente e localizzata nel dominio chinasi del recettore. In stretta collaborazione con gli altri gruppi, l'Unità RR suggerirà diversi metodi per trasferire il cDNA nelle varie cellule di interesse. Questo consentirà di effettuare esperimenti in cellule trasfettate in transiente. Tuttavia, dal momento che non è ovvio che metodiche di trasferimento del DNA convenzionali, quali agenti trasfettanti commerciali o elettroporazione, siano efficaci nel trasferimento genico e allo scopo di generare linee nelle quali il cDNA di ACVR1 sia stabilmente integrato, questa Unità procederà alla preparazione di vettori retrovirali. Questa parte di ricerca verrà realizzata in collaborazione con l'Unità ST e con il Laboratorio del Prof. Giorgio Corte situato all'IST a Genova, nel quale è stata maturata esperienza in questo campo e nel quale tali procedure sono autorizzate.

SECONDO ANNO

Obiettivo 2.4

L'unità ST metterà a punto una metodologia per isolare cellule progenitrici osteoblastiche circolanti. Una volta sviluppato, questo metodo verrà utilizzato per isolare cellule da pazienti FOP e questo potrebbe rappresentare un modo poco invasivo e più ampiamente utilizzabile per poter esaminare progenitori osteoblastici da pazienti FOP. Si sottolinea che questo programma di ricerca propone due

metodi per rendere accessibili a successivi studi funzionali i tipi cellulari più appropriati e utili derivanti da pazienti affetti da FOP.

Obiettivo 2.5

Le Unità ST ed FC procederanno nello studio della differenziazione di cellule staminali/progenitrici mediante diversi approcci e forniranno cellule a vari gradi di differenziazione per il successivo studio di espressione di ACVR1 e dell'effetto delle sue mutazioni. Questa fase richiederà una stretta collaborazione tra le Unità. I due gruppi principalmente coinvolti nello studio della biologia delle cellule staminali si occuperanno di caratterizzare le capacità differenziative delle cellule nelle diverse linee nei loro rispettivi sistemi di coltura. Questa problematica non si applica solo agli aspetti patologici dell'ossificazione eterotopica, ma anche alla fisiologia della rigenerazione ossea necessaria per la riparazione della fratture ossee, nella quale la via delle BMP riveste un ruolo fondamentale all'interno delle cellule mesenchimali staminali/progenitrici.

Uno degli aspetti più importanti del processo di ossificazione eterotopica, e particolarmente nella FOP, è la progressiva espansione della neoformazione di osso nei tessuti molli che si presenta sotto forma di episodi acuti per i quali sarebbe molto importante conoscere e, tuttavia, ancora poco è chiaro, la natura e la tipologia degli stimoli e dei fattori che ne inducono la progressione. In questa prospettiva le Unità ST ed FC sottoporranno le cellule a stress meccanici, ipossia, LPS, IL, TNF e studieranno anche la via di segnalazione a valle del recettore ACVR1 attivato (p38, Smad). Diverse condizioni di coltura e di stimolazione verranno applicate anche a cellule derivanti da pazienti FOP per verificare il tipo di risposta evocato rispetto a cellule di individui di controllo, con particolare riferimento al differenziamento in osso.

Obiettivi 3.4, 3.5, 4.4

Strettamente correlato agli studi sopra descritti circa le capacità e le caratteristiche differenziative delle cellule staminali/progenitrici, sarà l'analisi quantitativa dell'espressione di ACVR1, la determinazione della composizione delle varie potenziali isoforme ed eventuali cambiamenti relativi nell'abbondanza di queste ultime.

Questo studio verrà esteso a tutti i tipi cellulari forniti dalle Unità ST ed FC e alle cellule isolate dai pazienti FOP.

Obiettivo 4.2

Il cDNA selvatico e mutato di ACVR1 verranno trasferiti in cellule staminali/progenitrici fornite dalle Unità ST e FC e ottenute da midollo osseo, tessuto adiposo, polpa dei denti decidui, sangue periferico, mediante infezione retrovirale. Questo consentirà di ottenere linee con il cDNA integrato in modo permanente. Questa procedura verrà estesa anche a cellule isolate dai pazienti FOP.

Obiettivo 4.3

Verranno realizzati test funzionali mirati allo studio dell'attività delle componenti della via di trasduzione delle BMP, della capacità differenziativa e della risposta ai vari stimoli in cellule trasfettate con il cDNA mutato di ACVR1 rispetto a cellule di controllo trasfettate con il cDNA selvatico.

Obiettivo 4.5

E' stato postulato che l'interazione tra ACVR1 e la proteina FKBP12 possa essere uno dei meccanismi in grado di mantenere il recettore inattivo e che la mutazione ricorrente nella FOP possa in qualche modo interferire con questa azione. Dal momento che ad oggi non sono ancora disponibili evidenze dirette di una interazione tra ACVR1 e FKBP12, l'Unità RR si occuperà di testare questa ipotesi in primo luogo trasfettando delle cellule che esprimono FKBP12 con il cDNA specifico per ACVR1 fuso ad un epitopo opportunamente riconoscibile da un anticorpo. Questo fornirà dati sulla possibile interazione in condizioni basali. Lo stesso test verrà realizzato trasfettando le cellule con cDNA mutato di ACVR1 per verificare l'effetto della mutazione. Questo tipo di studio verrà ripetuto in tutti i tipi cellulari che si renderanno disponibili (cellule staminali/progenitrici e cellule derivate/differenziate).

14 - Ruolo di ciascuna unità operativa in funzione degli obiettivi previsti e relative modalità di integrazione e collaborazione

Questo programma di ricerca è caratterizzato da ruoli ben identificabili per le tre Unità partecipanti, indicate, come nelle precedenti sezioni, come Unità RR, ST, FC.

Sarà poi assicurato uno stretto coordinamento del lavoro per permettere lo scambio di cellule e di tecniche necessarie per eseguire le ricerche proposte.

I ruoli possono essere ben compresi dalla descrizione riportata nella sezione dell'Articolazione del programma e vengono riassunti qui di seguito.

UNITÀ RR

Questa Unità coincide con il Centro di Riferimento Italiano per la FOP. Si trova all'interno dell'Istituto G. Gaslini nel quale operano gli esperti per la diagnosi clinica e il Laboratorio di Genetica Molecolare che esegue la diagnosi molecolare attraverso la ricerca di mutazioni nel gene ACVR1. Questo gruppo ha promosso varie iniziative collaborando con l'Associazione FOP Italia costituita dai pazienti con FOP e loro familiari: a) ha eseguito la diagnosi molecolare di tutti i pazienti italiani conosciuti fino ad ora; b) ha organizzato il Primo Convegno Italiano sulla FOP nel Marzo 2007; c) ha promosso la creazione di una rete europea per la ricerca clinica e sperimentale sulla FOP attraverso la quale è possibile che si faccia la diagnosi su pazienti provenienti da altri paesi. Questa Unità quindi eseguirà lo studio dei pazienti e organizzerà, insieme con l'Associazione FOP Italia, la raccolta dei campioni biologici, denti decidui e sangue circolante, che saranno messi a disposizione delle Unità FC e ST rispettivamente. La raccolta dei campioni biologici sarà fatta dopo consenso informato seguendo le regole stabilite dal Comitato Etico dell'Istituto Gaslini.

Per quanto riguarda il lavoro sperimentale, questa Unità sarà impegnata in:

A) Lo studio dell'espressione di ACVR1. L'espressione di mRNA verrà esaminata in tessuti adulti umani e murini e in tessuti embrionali murini. Nel laboratorio dell'Unità RR si trovano persone che lavorano su modelli animali (topi) che collaboreranno per la raccolta di campioni di tessuti a diversi stadi embrionali. La caratterizzazione molecolare comprenderà saggi quantitativi e la caratterizzazione di isoforme da splicing alternativo come descritto in altre sezioni.

B) La produzione di plasmidi di espressione con cDNA di ACVR1 selvatico e mutato e la produzione di vettori retrovirali, anch'essi con cDNA di ACVR1 selvatico e mutato. I vettori retrovirali saranno preparati in collaborazione con l'Unità ST e con il Prof. Giorgio Corte del IST di Genova.

C) Il saggio di interazione tra il recettore ACVR1/ALK2, selvatico e mutato, e la proteina FKBP12 (v. altre sezioni per i dettagli).

UNITÀ ST

Questa Unità lavora sulla ricerca di meccanismi dell'ossificazione endocondrale da molti anni, pertanto ha competenza nella coltura di cellule staminali/progenitrici, caratterizzazione di tipi cellulari, condizioni di coltura per il differenziamento, saggi sulle vie di trasduzione del segnale. Pertanto il suo compito sarà principalmente quello di studiare i meccanismi patogenetici della FOP partendo dal livello cellulare.

Il ruolo dell'Unità nel lavoro sperimentale sarà il seguente:

A) Coltivare cellule staminali/progenitrici derivate da diverse fonti, in particolare cellule staminali mesenchimali da midollo osseo e tessuto adiposo, e cellule progenitrici osteoblastiche circolanti.

B) Induzione delle cellule staminali/progenitrici verso condrociti, osteoblasti e verso il differenziamento muscolare; caratterizzazione della via di segnalazione delle BMP nelle suddette cellule durante il loro programma differenziativo.

C) Studio delle stesse caratteristiche di cui al punto B) in cellule in cui il cDNA di ACVR1, selvatico e mutato, è stato trasferito. Questa parte sarà fatta in stretta collaborazione con l'Unità RR e comprenderà il trasferimento mediante infezione retrovirale.

D) Studio delle capacità differenziative e della via di segnalazione delle BMP sulle cellule

staminali/progenitrici derivate da pazienti con FOP. In particolare questa Unità si dedicherà alle cellule progenitrici osteoblastiche isolate da sangue circolante.

UNITÀ FC

L'Unità FC ha sviluppato un metodo per tenere in coltura cellule staminali isolate da denti decidui. Cellule proliferanti della polpa dentale, in condizioni di coltura appropriate, possono essere indotte a differenziare verso diverse linee, inclusi muscolo scheletrico e cardiaco, condrociti e osso. Questa sarà una delle tecniche utilizzate per isolare e coltivare cellule staminali/progenitrici da pazienti con FOP. Il lavoro sperimentale comprenderà:

A) Standardizzazione dei metodi già sviluppati per coltivare cellule staminali dalla polpa di denti decidui di individui normali, per conservare le cellule congelate e rimettere in coltura le cellule conservate.

B) Caratterizzazione delle capacità differenziative di queste cellule utilizzando una varietà di marcatori e profili di espressione di proteine specifiche.

C) In collaborazione con le altre due Unità, ricerca di metodi di trasferimento di vettori di espressione, inclusa l'infezione retrovirale. Caratterizzazione delle cellule in cui è trasferito il cDNA di ACVR1 mutato.

D) Applicazione dei metodi di cui sopra per la coltura delle cellule derivate da pazienti con FOP, standardizzazione delle procedure per la raccolta dei campioni e caratterizzazione delle loro proprietà.

LAVORO COLLABORATIVO

Come descritto nella sezione dell'Articolazione, molti degli esperimenti descritti richiederanno la collaborazione tra le tre Unità, soprattutto lo scambio di cellule in coltura, di vettori di espressione e di metodi per saggi funzionali applicabili alla caratterizzazione del differenziamento, delle vie funzionali, dell'espressione di geni e di proteine.

15 - Risultati attesi dalla ricerca, il loro interesse per l'avanzamento della conoscenza e le eventuali potenzialità applicative

Come introduzione a questa sezione sui risultati attesi del programma di ricerca, si sottolineano due concetti generali, riportati qui di seguito:

A) La ricerca sulla FOP, dopo la scoperta del gene mutato, non solo ha raggiunto un punto critico che permette di eseguire la diagnosi molecolare della malattia, ma ha anche aperto prospettive terapeutiche per la FOP. L'identificazione di mutazioni in un recettore della via funzionale di segnalazione intracellulare del TGF-beta/BMP suggerisce con forza che un bersaglio/i di farmaci possa essere individuato in questa via funzionale. Pertanto c'è una grande speranza che la ricerca in questo campo possa fornire informazioni importanti per studiare strategie terapeutiche, per esempio mediante lo sviluppo di inibitori della trasduzione del segnale da parte del recettore ACVR1/ALK2. Questi approcci potrebbero essere anche efficaci per altre condizioni più comuni di ossificazione eterotopica.

B) D'altra parte, i risultati di una ricerca su meccanismi fisiopatologici dell'ossificazione eterotopica possono diventare particolarmente attraenti nel campo della medicina rigenerativa applicata all'osso fornendo conoscenze per sviluppare nuove terapie di rigenerazione per fratture ossee e, forse, anche per processi rigenerativi in altri tessuti.

Con riferimento agli obiettivi riportati nella sezione specifica e alla sezione dell'Articolazione della ricerca, i risultati attesi sono elencati punto per punto.

STUDIO DEI PAZIENTI CON FOP

Ci si aspetta che altri pazienti giungano all'osservazione per la ricerca di mutazioni nel gene ACVR1, grazie alla rete stabilita in Italia e anche in altri paesi europei.

Sebbene una stessa mutazione, R206H, ricorra in oltre il 95% dei pazienti, alcune altre rare mutazioni

sono state identificate. La mutazione ricorrente e quelle rare indirizzano la ricerca verso meccanismi funzionali che, a loro volta, aiuteranno a capire punti critici nell'azione del recettore.

Un punto molto qualificante di questo programma di ricerca è la proposta di mettere in coltura cellule staminali/progenitrici isolate da pazienti con FOP. Poiché questa malattia è caratterizzata da fasi di acutizzazione scatenate da traumi, anche minimi come una vaccinazione o un'iniezione intramuscolare, ci si aspetta che le metodologie proposte per isolare le cellule mesenchimali progenitrici con mezzi non invasivi permetta di studiare i tipi cellulari più interessanti, cioè i progenitori osteoblastici, derivati direttamente dai pazienti. Questo progetto fornirà protocolli standardizzati per l'isolamento di cellule staminali/progenitrici sia da denti decidui che da sangue circolante.

MODELLI CELLULARI

I risultati attesi in questa parte del programma sono i seguenti:

- Metodi per la coltura e la caratterizzazione di cellule staminali mesenchimali da midollo osseo e loro applicazione alla ricerca proposta.*
- Metodi per la coltura e la caratterizzazione di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo e loro applicazione alla ricerca proposta.*
- Metodi per la coltura e la caratterizzazione di cellule staminali da denti decidui e loro applicazione alla ricerca proposta e all'isolamento da pazienti con FOP.*
- Metodi per la coltura e la caratterizzazione di cellule progenitrici osteoblastiche da sangue circolante e loro applicazione alla ricerca proposta e all'isolamento da pazienti con FOP.*
- Metodi per indurre il differenziamento in senso osteoblastico e verso altre linee differenziative nei vari tipi di cellule staminali/progenitrici.*
- Metodi per valutare la risposta a diversi stimoli potenzialmente osteogenici nei vari tipi di cellule staminali/progenitrici.*
- Linee cellulari ottenute per infezione retrovirale, che esprimono il cDNA selvatico e mutato di ACVR1.*

ESPRESSIONE DEL GENE ACVR1

I risultati attesi in questa parte del programma sono i seguenti:

- Accurata caratterizzazione dei trascritti di ACVR1 in tessuti adulti umani e murini e in tessuti embrionali di topo, e individuazione di possibili siti multipli di inizio di trascrizione e promotori alternativi.*
- Caratterizzazione dell'espressione quantitativa di ACVR1, delle sue possibili isoforme e della loro composizione relativa in diversi tipi cellulari in condizioni non stimolanti e in condizioni di induzione al differenziamento e di diversi tipi di stimolazione.*
- Caratterizzazione dell'espressione quantitativa di ACVR1, delle sue possibili isoforme e della loro composizione relativa in cellule isolate da pazienti con FOP in diverse condizioni di differenziamento e di stimolazione.*

EFFETTO DELLE MUTAZIONI DI ACVR1

I risultati attesi in questa parte del programma sono i seguenti:

- Produzione di plasmidi di espressione che hanno incorporato il cDNA di ACVR1 selvatico o mutato.*
- Produzione di vettori retrovirali che hanno incorporato il cDNA di ACVR1 selvatico o mutato.*
- Metodi per il trasferimento dei sopra citati vettori nei diversi tipi cellulari di interesse.*
- Caratterizzazione degli effetti del trasferimento del cDNA mutato di ACVR1 sul differenziamento cellulare e sulla risposta a diversi stimoli, in tutti i tipi cellulari esaminati.*
- Caratterizzazione delle proprietà di differenziamento cellulare e della risposta a diversi stimoli delle cellule staminali/progenitrici derivate da pazienti con FOP..*
- Caratterizzazione della capacità della proteina codificata da ACVR1 di legare la proteina FKBP12 in cellule in cui si esprime il cDNA mutato, in confronto con cellule di controllo in cui è espresso il*

cDNA selvatico.

16 - Elementi e criteri proposti per la verifica dei risultati raggiunti

Testo italiano

Il più importante e qualificante criterio di verifica dei risultati dell'intero programma di ricerca saranno le pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali indicizzate (JCR).

La verifica del procedere del lavoro in corso verrà facilmente fatta attraverso frequenti aggiornamenti tramite comunicazioni per e-mail e telefoniche. In maniera più formale, alla fine del primo anno di attività, in una riunione di due giorni che si terrà a Genova saranno discussi i risultati ottenuti dalle tre Unità partecipanti. I partecipanti al programma di ricerca avranno anche l'opportunità di incontrarsi e di presentare il progetto in occasione del Secondo Convegno Italiano sulla FOP che si terrà a Trento dal 11 al 12 Aprile 2008.

Oltre agli articoli scientifici e agli incontri, altre verifiche verranno dall'acquisizione e dalla validazione di prodotti della ricerca:

- Protocolli

- a) Per la raccolta di denti decidui da pazienti con FOP e l'isolamento e la coltura di cellule staminali;*
- b) Per la raccolta di campioni di sangue circolante da pazienti con FOP e l'isolamento di progenitori osteoblastici.*

- Metodi

- a) Per coltura di cellule staminali mesenchimali da midollo osseo;*
- b) Per coltura di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo;*
- c) Per coltura di cellule staminali da denti decidui;*
- d) Per coltura di progenitori osteoblastici da sangue circolante;*
- e) Per il differenziamento delle cellule staminali/progenitrici di cui sopra;*
- f) Per il trattamento delle cellule con stimoli che possono portare a ossificazione.*

- Reagenti e Linee Cellulari

- a) Plasmidi di espressione contenenti il cDNA, selvatico e mutato, di ACVR1;*
- b) Vettori retrovirali contenenti il cDNA, selvatico e mutato, di ACVR1;*
- c) Linee cellulari che esprimono permanentemente il cDNA, selvatico e mutato, di ACVR1.*