



Consiglio Nazionale delle Ricerche

ISTITUTO DI GENETICA MOLECOLARE

Sezione di Bologna

Via di Barbiano 1/10, Bologna, Italia

Tel: 051 6366394 – Fax: 051 583593

e-mail: aurelio.valmori@cnr.it

Spett.le AIDMED
Via Carlo Alberto Dalla Chiesa 5
Modena

Bologna, 5 Febbraio 2014

OGGETTO:

Richiesta di co-finanziamento per progetto scientifico.

TITOLO DEL PROGETTO.

Le citochine come biomarcatori e bersagli terapeutici nella distrofia muscolare di Emery-Dreifuss.

ABSTRACT

La Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss è una malattia genetica che causa perdita della funzionalità muscolare e del movimento degli arti e cardiomiopatia grave. Colpisce individui in età infantile o giovanile e si aggrava progressivamente. Attualmente non esistono biomarcatori della progressione della Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss, la diagnosi è genetica ed follow-up è basato esclusivamente sui sintomi clinici. La prognosi è difficilissima e non supportata dalle informazioni cliniche o dall'analisi genetica. Lo studio proposto ha lo scopo di determinare i livelli d'espressione e di secrezione delle citochine infiammatorie e in particolare di TGFbeta1 e 2 e interleuchina-6 nel siero e nei mezzi di coltura di cellule di pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss. Ulteriore obiettivo del progetto è l'individuazione dell'efficacia di anticorpi inibitori delle citochine espresse a livelli patologici. I risultati di queste ricerche permetteranno di mettere a punto un protocollo di monitoraggio personalizzato dell'evoluzione della distrofia muscolare di Emery-Dreifuss e di definire la possibilità dell'utilizzo di molecole già esistenti sul mercato dei farmaci inibitori (anticorpi) per il trattamento della Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss, offrendo importanti prospettive terapeutiche.

Ricercatori, titolo, Istituzione, e ruolo del progetto

Giovanna Lattanzi, PhD, Principal Investigator, Consiglio Nazionale delle Ricerche, CNR, Istituto di Genetica Molecolare, Unità di Bologna IOR. Disegno sperimentale, pubblicazione dei risultati, organizzazione workshop.

Elisabetta Mattioli PhD, Consiglio Nazionale delle Ricerche, CNR, Istituto di Genetica Molecolare, Unità di Bologna IOR. Colture cellulari, raccolta terreni e sieri.

Sabino Prencipe, PhD Student, Università di Bologna e CNR, Istituto di Genetica Molecolare, Unità di Bologna IOR. Real Time RT-PCR per test di espressione dell'mRNA delle citochine, test ELISA dei livelli di citochine. Analisi statistica, studi di biologia cellulare, test di attività inibitoria di differenziazione in mioblasti, osteoblasti e adipociti.

Cristina Capanni, PhD, Consiglio Nazionale delle Ricerche, CNR, Istituto di Genetica Molecolare, Unità di Bologna IOR. Analisi immunochimica e proteomica di citochine e



Consiglio Nazionale delle Ricerche

ISTITUTO DI GENETICA MOLECOLARE

Sezione di Bologna

Via di Barbiano 1/10, Bologna, Italia

Tel: 051 6366394 – Fax: 051 583593

e-mail: aurelio.valmori@cnr.it

proteine bersaglio, studi di binding di proteine.

Stefano Squarzoni, MD, Consiglio Nazionale delle Ricerche, CNR, Istituto di Genetica Molecolare, Unità di Bologna IOR, Bologna. Classificazione dei campioni e revisione clinica. Correlazione genotipo-fenotipo.

Durata del progetto: 2 anni

INTRODUZIONE:

La lamina A / C è un costituente della lamina nucleare implicato in una serie di malattie ereditarie denominate laminopathies, che colpiscono muscoli, tessuto adiposo, ossa e nervi o causano invecchiamento precoce. Circa 400 mutazioni LMNA sono state identificate e sette geni lamina A- correlati sono stati associati a malattie. La maggior parte delle laminopatie sindromiche (lipodistrofia familiare parziale, Displasia Mandibuloacrale, Progeria di Hutchinson-Gilford e sindrome di Werner atipica) presentano lipodistrofia parziale, invecchiamento accelerato e osteolisi. Il coinvolgimento muscolare è predominante nella distrofia muscolare di Emery-Dreifuss e nella cardiomiopatia dilatativa con difetto di conduzione da mutazione della lamina A/C. A parte l'accumulo di prelamina A nelle laminopatie progeroidi e nelle lipodistrofie, non esistono biomarcatori di malattia per la maggior parte delle laminopatie. Nel nostro laboratorio, abbiamo dimostrato alterati livelli di TGFbeta2 e osteoprotegerina nelle cellule di pazienti affetti da una laminopatia, la Displasia Mandibuloacrale, causata da mutazioni omozigoti del gene *LMNA*. E' stato anche dimostrato un ruolo di TGFbeta2 nell'attività d'innesco del riassorbimento osseo, che può essere inibita da anticorpi neutralizzanti diretti contro il TGFbeta stesso (Avnet et al., 2011). Altri laboratori hanno recentemente riportato aumentata espressione di osteoprotegerina in progeria di Hutchinson-Gilford (Plasilova et al., 2011). Inoltre, nostri dati preliminari hanno mostrato chiaramente un drammatico aumento di interleuchina 6 (IL-6) nelle cellule di pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss. Analoghi dati sono stati recentemente ottenuti in mioblasti di pazienti laminopatici. Tuttavia, un'analisi completa dei pattern di espressione delle citochine e degli effetti biologici in nelle laminopatie e in particolare nella Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss non è stata effettuata.

OBIETTIVI:

Lo scopo di questo studio è determinare se le citochine, mediatori di infiammazione, e in particolare l'IL-6, sono aumentate nelle cellule e nel sangue di pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss, correlano con la gravità della malattia, e possono essere utilizzate come biomarcatori di progressione della malattia e/o bersagli terapeutici nei pazienti.

PIANO SPERIMENTALE:

Il piano sperimentale è diviso in 5 punti (Workpackages, WP).

WP1: raccogliere e classificare i campioni biologici (colture cellulari, tessuti e siero) da 50 pazienti affetti da laminopatie diverse. Raggruppare i campioni per mutazione, tipo di malattia, gravità della malattia. Nel caso di colture cellulari, la classificazione terrà conto anche del numero di passaggi in coltura.

WP2: Verrà valutata l'espressione di mRNA una serie di 80 geni implicati nella risposta



Consiglio Nazionale delle Ricerche

ISTITUTO DI GENETICA MOLECOLARE

Sezione di Bologna

Via di Barbiano 1/10, Bologna, Italia

Tel: 051 6366394 – Fax: 051 583593

e-mail: aurelio.valmori@cnr.it

immunitaria (tra cui citochine e loro recettori).

WP3: Verranno valutati i livelli di citochine in campioni biologici. Un gruppo di 90 proteine saranno esaminate in terreni di coltura, cellule e siero del paziente. Proteine alterate in modo significativo saranno testate in Western blot o in immunofluorescenza.

WP4: Il ruolo biologico degli alterati livelli di citochine verrà chiarito mediante l'uso di modelli sperimentali, tra cui: mioblasti C2C12 e mioblasti umani. Mezzi condizionati da colture di cellule laminopatiche verranno testati come induttori/inibitori di differenziamento.

WP5: Verranno testati anticorpi neutralizzanti e anti-infiammatori non steroidei potenzialmente in grado di inibire l'attività delle citochine sovraesprese. Il recupero del potenziale di differenziamento normale di ciascun modello sperimentale sarà considerato come parametro per testare i trattamenti farmacologici citati.

Dati preliminari:

50 campioni di materiale biologico da pazienti laminopatici sono stati già raccolti e testati in esperimenti preliminari per l'espressione delle citochine. I livelli di TGFbeta 2 e osteoprotegerina si sono risultati aumentati in fibroblasti da displasia Mandibuloacrale, progeria di Hutchinson-Gilford e Lipodistrofia familiare parziale (FPLD2). Il livello di espressione di IL-6, una citochina coinvolta nel processo di invecchiamento, è stato trovato significativamente aumentato in diverse laminopatie. I nostri risultati preliminari suggeriscono una correlazione tra la gravità della malattia e produzione di citochine tra cui TGFbeta2 e IL-6 ed una potenziale efficacia terapeutica degli anticorpi neutralizzanti.

Materiali e metodi:

Raccolta di campioni biologici e clinici e classificazione

I dati clinici già disponibili per 50 campioni e nuove cartelle cliniche saranno valutati complessivamente. I campioni biologici saranno classificati sulla base del tipo di malattia, gravità, sesso e mutazione del gene LMNA.

Campioni: fibroblasti cutanei, mioblasti, muscolo scheletrico, sangue, siero. Lisati cellulari e terreni di coltura raccolti da cellule patologiche (fibroblasti, mioblasti, osteoblasti).

Test ELISA ad elevato throughput (90 proteine, studio in collaborazione con Istituto Neurologico C. Besta IRCCS Milano).

Test ELISA per TGFbeta e IL-6.

Analisi Western blot di cellule e tessuti utilizzando anticorpi per citochine selezionate.

Immunolocalizzazione di citochine selezionate in tessuti selezionati.

Modelli sperimentali per testare l'attività delle citochine in presenza di mezzi condizionati: mioblasti C2C12 o mioblasti primari umani in grado di differenziare in miotubicardiomiociti derivati da cellule staminali indotte ottenute da fibroblasti Emery-Dreifuss.

Test di anticorpi neutralizzanti e farmaci inibitori: anticorpi neutralizzanti TGFbeta 2, IL-6 e altre citochine selezionate. Il trattamento sarà testato in termini di recupero di attività di differenziamento corretta.

Principali Risultati attesi e impatto:

Risultati attesi:

1) Identificazione di citochine differenzialmente espresse nella distrofia muscolare di Emery-



Consiglio Nazionale delle Ricerche

ISTITUTO DI GENETICA MOLECOLARE

Sezione di Bologna

Via di Barbiano 1/10, Bologna, Italia

Tel: 051 6366394 – Fax: 051 583593

e-mail: aurelio.valmori@cnr.it

Dreifuss.

- 2) Individuazione degli effetti biologici di up/down-regolazione di citochine in termini di potenziale differenziativo alterato delle cellule bersaglio.
- 3) Identificazione di biomarcatori delle malattie.
- 4) Individuazione di anticorpi neutralizzanti e farmaci in grado di favorire il recupero del fenotipo non patologico.

Impatto previsto:

- 1) migliore conoscenza dei meccanismi patogenetici nelle laminopatie muscolari.**
- 2) Identificazione di biomarcatori per diagnosi precoce e prognosi delle malattie.**
- 3) Identificazione di farmaci in grado di contrastare il deterioramento muscolare e il malfunzionamento cardiaco.**

Significato e rilevanza:

La gestione clinica di pazienti affetti da laminopatie è ostacolata dalla limitata conoscenza dei biomarcatori delle malattie. Il follow-up dei pazienti con Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss è essenzialmente basato su test clinici, ma risulta difficile quantificare l'avanzamento della malattia a causa della mancanza di biomarcatori serici. Le prospettive prognostiche e terapeutiche beneficieranno dell'individuazione di biomarcatori quali le citochine facilmente dosabili in siero. Questo studio porterà anche alla progettazione di approcci terapeutici basati sull'uso di anticorpi inibitori (neutralizzanti) da utilizzarsi per contrastare e se possibile abolire l'evoluzione della distrofia muscolare di Emery-Dreifuss.

DETTAGLIO SPESE PREVISTE in euro:

Anticorpi monoclonali e policlonali	1500 euro
Kit per test ELISA	2500 euro
Terreni di coltura e materiale da laboratorio	500 euro
Spedizione campioni e conservazione	500 euro
Totale	5000 euro

Dr. Giovanna Lattanzi

Responsabile del Progetto

Dr. Giovanna Lattanzi

Primo Ricercatore, Responsabile Unità Operativa

CNR - Istituto di Genetica Molecolare – Unità di Bologna

Via di Barbiano 1/10 - Bologna

e-mail: giovanna.lattanzi@cnr.it

sito web: <http://www.igm.cnr.it/?id=379>

Network Italiano Laminopatie (Distrofia Muscolare di Emery-Dreifuss):

<http://www.igm.cnr.it/laminopatie/>