

ALLEGATI

- Programma di ricerca
- Programma di formazione dell'Assegnista

PROGRAMMA DI RICERCA

Approfondimenti meccanicistici sui segnali molecolari alla base delle funzioni del collagene VI nei muscoli e nei tendini: un passo avanti per le miopatie correlate al COL6

INTRODUZIONE

Nel tessuto muscolo scheletrico, l'organizzazione tridimensionale della matrice extracellulare (ECM) non solo garantisce la trasmissione delle forze meccaniche, ma attiva anche segnali che regolano finemente l'omeostasi delle cellule muscolari e tendinee. Un ruolo chiave in questo senso è svolto dal collagene VI (COL6), una caratteristica proteina ECM che regola una serie di attività cellulari e le cui mutazioni causano le miopatie correlate a COL6 (COL6-RM).

Approfondimenti sui meccanismi patomolecolari delle miopatie COL6-RM sono stati forniti da topi carenti di COL6, consentendo di far luce sugli effetti innescati dalla carenza di COL6 nelle miofibre, nelle cellule satellite e nei tenociti.

D'altra parte, la natura multitasking del COL6 implica che sono necessari ulteriori lavori per ottenere una conoscenza più completa dei difetti patomolecolari e rispondere ad alcune domande chiave aperte. Sebbene sia chiaro che COL6 esercita un ruolo critico nella regolazione della quiescenza delle cellule satellite, i recettori e i trasduttori responsabili di questi effetti rimangono sconosciuti. Inoltre, poiché COL6 regola l'omeostasi dei tendini, sarebbe cruciale capire in che modo una carenza di COL6 influisca sui tendini.

Questo progetto mira a colmare alcune importanti lacune nella conoscenza sulle COL6-RM, concentrandosi su due meccanismi rappresentati dall'asse COL6/ANTXR2 e dal complesso meccanosensitivo del ciglio primario. ANTXR2 è una proteina della superficie cellulare coinvolta nel turnover dell'ECM innescando l'endocitosi del COL6 e condividendo alcune caratteristiche dei meccanotrasduttori. Il ciglio primario è una struttura specializzata della superficie cellulare che funge da sensore per la trasduzione di segnali extracellulari all'interno delle cellule. I nostri dati preliminari supportano fortemente un ruolo per questi mediatori nella trasduzione dei segnali COL6 all'interno dei tenociti.

Pertanto, scopo del progetto è quello di studiare ANTXR2 nelle cellule satellite e di indagare i percorsi di meccanotrasduzione e segnalazione rilevanti in cellule satelliti carenti di COL6 e ANTXR2. Verrà generato un topo knockout con ablazione specifica di ANTXR2 nelle cellule satelliti e verranno caratterizzate le sue caratteristiche fenotipiche in condizioni basali e di rigenerazione. Parallelamente verrà studiato il contributo del ciglio primario nella mediazione dei segnali COL6 nei tenociti e nelle cellule miogeniche, nonché la loro risposta allo stress meccanico, e verrà caratterizzato l'impatto dei difetti COL6 sulle attività correlate al ciglio primario, tra cui la motilità cellulare e l'autofagia. Per avere ulteriori approfondimenti sul ruolo di questi meccanismi nell'eziologia delle COL6-RM, una parte del progetto sarà dedicata a studi su campioni di tessuto e cellule in coltura provenienti da pazienti con diverse mutazioni di COL6 e verrà studiato il contributo di ANTXR2 e del ciglio primario nel rimodellamento dell'ECM.

La realizzazione del progetto consentirà l'identificazione degli attori molecolari che mediano i segnali COL6 nell'unità muscolo-tendine e fornirà una migliore conoscenza sui meccanismi alla base di COL6-RM, con l'identificazione di potenziali nuovi bersagli terapeutici.

OBIETTIVI

Sulla base delle precedenti premesse è stato attivato un progetto di ricerca con i seguenti obiettivi:

Obiettivo primario:

- Studiare l'identificazione degli attori molecolari che mediano i segnali COL6 nell'unità muscolo-tendine

Obiettivo secondario:

- Fornire una migliore conoscenza sui meccanismi alla base di COL6-RM, con l'identificazione di potenziali nuovi bersagli terapeutici.

Disegno dello studio

In una collaborazione tra UNIBO, UNIPD e CNR, lo studio prevede le seguenti fasi:

- 1- Caratterizzazione dei ruoli dell'asse COL6/ANTXR2 nelle cellule satellite
- 2- Stabilire il contributo del COL6 alle attività del ciglio primario nelle cellule tendinee e muscolari
- 3 – Stabilire il ruolo di ANTXR2 e del ciglio primario nel rimodellamento della ECM e nel signaling outside-in in cellule con deficit del COL6

Le procedure dello studio comprendono:

1. Caratterizzazione in vitro dell'asse COL6/ANTXR2 nelle cellule satellite
2. Caratterizzazione in vitro dell'asse COL6/ANTXR2 nelle cellule satellite
3. Indagare l'attività di meccano-trasduzione di ANTXR2 nelle cellule satellite
4. Studiare le risposte molecolari e strutturali del ciglio primario allo stimolo meccanico in cellule con deficit di COL-6
5. Studio del contributo delle vie molecolari dipendenti dal ciglio in cellule tendinee e muscolari con deficit di COL-6
6. Caratterizzazione del pattern di COL6 in campioni di muscoli e tendini di pazienti affetti da COL6-RM.

7. Caratterizzazione dell'espressione e localizzazione di ANTXR2 in biopsie e cellule primarie di pazienti COL6-RM.

8. Studio del ruolo del ciglio primario nel rimodellamento dell'ECM delle colture di tendini di pazienti di controllo e COL6-RM.

MATERIALI E METODI

Lo studio rappresenta una collaborazione tra tre centri:

- UNIPD: Coordina il progetto, gestisce la generazione e caratterizzazione di topi knockout, mantiene colonie di topi WT e Col6a1^{-/-}, isola e caratterizza cellule satellite muscolari, e conduce studi su autofagia e espressione di ANTXR2.

- CNR: Studia il ruolo del ciglio primario nelle colture di muscolo e tendini, si occupa della creazione di colture cellulari primarie e di studi di microscopia elettronica.

- UNIBO: Fornisce biopsie muscolari e tendinee da pazienti e controlli, supporta la preparazione di colture cellulari primarie e studi biochimici e molecolari.,

Criteria di inclusione e di esclusione

Per quanto riguarda UNIBO, quindi, verranno effettuati prelievi di tessuto muscolare tendineo su pazienti affetti da miopatie correlate al COL-6 e da controlli sani, sottoposti ad interventi chirurgici ortopedici presso la Clinica Ortopedica e Traumatologica 1 dell'Istituto Ortopedico Rizzoli.

CRITERI DI INCLUSIONE:

1. Pazienti affetti da miopatie correlate al COL-6
2. Sottoposti a procedure chirurgiche ortopediche per eventi traumatici (sintesi fratture) o per problematiche ortopediche in elezione (scoliosi, deformità degli arti, artrosi).

3. Controlli sani matchati per età sottoposti a procedure chirurgiche ortopediche per eventi traumatici (sintesi di fratture) o problematiche ortopediche in elezione (scoliosi, deformità degli arti, artrosi).

CRITERI DI ESCLUSIONE:

1. Impossibilità alla raccolta del consenso
2. Processi infettivi in atto a carico dei tessuti in cui si deve eseguire la biopsia
3. Pregressa irradiazione nella sede di prelievo

ASPETTI ETICI ED AMMINISTRATIVI

Consenso informato

Ad ogni potenziale partecipante sarà spiegato in modo esaustivo lo svolgimento dello studio e sarà data la possibilità di fare domande e ricevere risposte ad ogni suo dubbio. Il modulo di consenso informato deve essere firmato dal partecipante o da un suo rappresentante legalmente autorizzato prima della sua partecipazione ad una qualunque delle procedure previste dallo studio. La documentazione relativa al paziente deve essere in grado di dimostrare che il consenso è stato espresso prima della partecipazione allo studio. Una copia del modulo di consenso informato deve essere lasciato al paziente. Il modulo di consenso, firmato dal paziente, deve essere conservato.

Approvazione del comitato etico

Questo protocollo, il modulo di consenso informato e tutte le informazioni rilevanti sono state sottoposte a valutazione del Comitato Etico e approvate con il protocollo n. 3D-MTU/2021/Sper/IOR/357/2021/Sper/IOR. Lo studio sarà inoltre condotto in accordo con gli standard internazionali ISO 14:155, con la Good Clinical Practice e con le leggi nazionali in vigore.

PROGRAMMA DI FORMAZIONE DELL'ASSEGNISTA

Formazione e compiti dell'assegnista di ricerca

L'assegnista di ricerca durante l'anno avrà il compito di:

1. Effettuare una revisione della letteratura disponibile in merito alle tematiche del progetto
2. Partecipare alle fasi di sviluppo ed esecuzione dello studio previste in relazione alla valutazione della letteratura e del materiale reperito riguardo alle tematiche di interesse, in particolare: creazione di database, archiviazione dei dati, gestione logistica
3. Parallelamente al progredire del progetto, l'assegnista sarà a disposizione per contribuire al reclutamento dei pazienti e alla raccolta, organizzazione e catalogazione della documentazione scientifica
4. Al completamento delle ricerche e delle varie fasi di sviluppo dello studio l'assegnista parteciperà alla stesura di manoscritti inerenti i risultati principali evidenziati.
5. Partecipare alle attività clinico/chirurgiche della Clinica di riferimento, con particolare rimando ai pazienti affetti patologie ortopediche conseguenti a deficit del COL-6