

Progetto Genoma 21: una strada verso la scoperta di nuovi approcci terapeutici per la trisomia 21 (sindrome di Down)



Laboratorio di Genomica



Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale
Attività di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata
Università di Bologna

Versione Gennaio 2018

*"La troveremo. E' impossibile che non riusciamo a trovarla.
E' una impresa intellettuale meno difficile che spedire un uomo sulla Luna.
Se trovo come guarire la trisomia 21, allora si aprirà la strada verso la guarigione di tutte le
altre malattie di origine genetica."*

Jérôme Lejeune (sulla terapia per la trisomia 21)

Progetto Genoma 21: una strada verso la scoperta di nuovi approcci terapeutici per la trisomia 21 (sindrome di Down)

1. Premessa

La sindrome di Down (sdD) è una condizione genetica caratterizzata dalla presenza di un cromosoma 21 in più nelle cellule delle persone con tale sindrome.

E' la più frequente anomalia cromosomica dell'uomo, (1 su 400 concepiti e 1 su 700 nati vivi).

Questa anomalia cromosomica causa una "sindrome", cioè un insieme di "tratti" descritti per la prima volta nel 1866 dal medico inglese Jhon L. Down (da cui il nome della sindrome) e che si possono manifestare con combinazioni e grado di severità variabili.

Alcune caratteristiche comuni sono occhi "a mandorla", radice del naso appiattita, bassa statura. La disabilità intellettiva, seppure in grado variabile, è la condizione sempre presente nelle persone con sdD e coinvolge soprattutto la sfera del linguaggio e del pensiero simbolico.

Nel 1959 il Prof. Jérôme Lejeune ha dimostrato che la causa della sindrome è la trisomia 21, ossia una mutazione genetica che comporta la presenza di un cromosoma 21 in tre copie (invece delle normali due) nelle cellule delle persone con sdD (Lejeune et al. 1959).

Il filone di ricerca sulla trisomia 21 è stato portato all'Università di Bologna dalla Prof.ssa Maria Zannotti, ora in pensione, che alla fine degli anni '60 fu allieva a Parigi del Prof. Lejeune. Le ricerche vengono ora portate avanti dal gruppo da lei creato e ora guidato dal Prof. Pierluigi Strippoli.



Parigi, 1969 - La Prof.ssa Maria Zannotti (la seconda da destra) in riunione con il gruppo del Prof. Jérôme Lejeune (seduto al centro).

Lo studio è condotto in collaborazione con il Prof. Guido Cocchi dell'Unità Operativa di Neonatologia del Policlinico S.Orsola-Malpighi, Bologna ed è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico stesso.

Il progetto costituisce, a nostra conoscenza, la più ampia ricerca scientifica clinico-sperimentale sulla sindrome di Down condotta in Italia e mirata alla individuazione di una cura per la disabilità intellettiva causata dalla presenza di un cromosoma 21 in più. Il progetto

riguarderà in tre anni almeno 100 bambini con trisomia 21 tra i 3 e i 16 anni, con ricadute possibili su tutte le persone con trisomia 21 (38.000 solo in Italia), che è la più frequente anomalia genetica dell'uomo.

Caratterizzeremo in dettaglio la regione critica del cromosoma 21 associata alla sindrome di Down e il metaboloma (l'insieme dei metaboliti) di modelli cellulari trisomici e di bambini con la sindrome che saranno anche sottoposti a valutazione clinica e cognitiva accurata. La mole di dati così ottenuti e correlati tra loro sarà utile per individuare specifiche reazioni metaboliche alterate che potrebbero diventare efficaci bersagli terapeutici per la cura della disabilità intellettiva della sindrome di Down.

2. Risultati raggiunti al Dicembre 2017

2.1 Creazione di **mappe trascrizionali** del cervello, dell'ippocampo, delle cellule del sangue, del cuore e della tiroide per studiare l'attività dei geni umani, in particolare del cromosoma 21, in tessuti nei quali si manifestano gli effetti della trisomia 21. Abbiamo pubblicato in merito cinque articoli su riviste scientifiche internazionali:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25185649>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108741>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25476127>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27345625>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28923001>

2.2 Rianalisi di tutti i casi pubblicati di trisomia 21 parziale ai fini della identificazione, sul cromosoma 21 umano, della **regione critica** responsabile della **sindrome di Down** e in particolare associata alla disabilità intellettiva. I risultati identificano e delimitano tale regione e sono stati pubblicati il 22 Aprile 2016 su *Human Molecular Genetics*:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27106104/>

Inoltre, con la stessa metodologia abbiamo identificato anche la regione critica per la presenza di cardiopatie congenite nella sindrome di Down:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28648597>

2.3 Raccolta di campioni di sangue e di urina da più di 100 bambini con sdD e da più di 50 soggetti di controllo, estrazione del DNA e dell'RNA e costituzione di una **banca di campioni biologici** (plasma, DNA, RNA e urina). Analisi del profilo metabolomico del plasma e delle urine.

Un manoscritto relativo allo studio del metaboloma è già stato inviato per la pubblicazione ed è attualmente in corso di revisione.

3. Nuovi Obiettivi 2018-2020

Lo **scopo** di questo progetto è quello di individuare marcatori specifici per la sindrome di Down che possano diventare bersagli di terapie innovative.

La scoperta della "regione critica" per la sindrome di Down è stato un passo fondamentale per la nostra ricerca e proprio alla luce di questo risultato abbiamo definito nuovi obiettivi.

3.1 Caratterizzazione della regione altamente ristretta critica per la sindrome di Down (*Highly Restricted Down Syndrome Critical Region, HR-DSCR*). Questa parte del progetto si propone di analizzare in dettaglio questa regione allo scopo di identificare **nuovi geni** del cromosoma 21 che ipotizziamo essere essenziali per la manifestazione della sindrome di Down. Nella HR-DSCR ad oggi non sono stati descritti geni funzionali, per individuarli verranno utilizzati modelli cellulari trisomici per il cromosoma 21: fibroblasti e linee linfoblastoidi. Grazie ad una collaborazione internazionale avviata con il gruppo del Prof. Patrick Harrison, University College Cork, Irlanda, verrà eliminata in maniera selettiva la HR-DSCR mediante il sistema CRISPR/Cas9 per studiare le alterazioni imputabili a questa regione.

I metaboliti rilasciati dalle cellule e presenti nel loro terreno di coltura saranno poi dosati mediante analisi metabolomiche di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), in collaborazione con la Prof.ssa Paola Turano, Università di Firenze.

3.2 Profilo metabolomico nei campioni biologici di persone con sindrome di Down. Si proseguirà con l'ampliamento della banca biologica raccogliendo campioni di urina, plasma e sangue. Le reazioni del nostro organismo si possono studiare analizzando tali campioni. Sarà quindi esplorato il "**profilo metabolomico delle urine e del sangue** (plasma) di 30 bambini con sdD e di 30 soggetti di controllo: lo scopo è quello di identificare specifiche alterazioni del metabolismo e di associare queste alterazioni a determinati geni localizzati sul cromosoma 21, in particolare nella "**regione critica**".

Seguendo l'ipotesi del Prof. Lejeune, l'analisi dei profili si focalizzerà sui metaboliti delle vie di segnalazione dei monocarboni (folato), per identificare possibili bersagli di un intervento terapeutico.

I metodi sperimentali sono descritti in dettaglio nell'articolo da noi pubblicato che descrive il Progetto e nei riferimenti bibliografici ivi citati:

<http://www.spp-j.com/spp/1-1/spp.2013.12R0005/>

"Tutta la difficoltà della ricerca è come scoprire il musicista discorde, perché l'orchestra della vita ha circa cinquantamila musicisti" (Jérôme Lejeune)

4. Curriculum vitae del responsabile scientifico - Prof. Pierluigi Strippoli

Il Responsabile scientifico del progetto è il Prof. Pierluigi Strippoli, professore associato di Biologia Applicata presso la Scuola di Medicina e Chirurgia dell'Università di Bologna.

<https://www.unibo.it/sitoweb/pierluigi.strippoli/cv>

5. Gruppo di ricerca

L'Unità Operativa che coordina la ricerca opera nel Laboratorio di Genomica del Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale (Attività di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata) dell'Università di Bologna.

In particolare si occuperanno stabilmente di questo progetto:

| Nome e cognome | Laurea | Ruolo |
|----------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Pierluigi Strippoli | Medicina e Chirurgia | Professore associato confermato |
| Lorenza Vitale | Medicina e Chirurgia | Ricercatore |
| Maria Chiara Pelleri | Biotecnologie | Ricercatore a Tempo Determinato-A |
| Allison Piovesan | Biotecnologie | Assegnista di ricerca |
| Maria Caracausi | Biotecnologie | Assegnista di ricerca |
| Francesca Antonaros | Biotecnologie | Laureato frequentatore |
| Elena Cicchini | Biotecnologie | Borsista part-time |
| Gabriella Mattei | | Tecnico |

Ci avvarremo inoltre della collaborazione della Prof.ssa Maria Zannotti, già Professore associato di Biologia Applicata presso l'Università di Bologna e attualmente in pensione.

6.1 Collaborazioni internazionali e nazionali sul Progetto

Prof. Guido Cocchi

Dott.ssa Chiara Locatelli

Unità Operativa di Neonatologia, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC), Università di Bologna, Bologna, Italia

Prof. Marco Seri

Unità Operativa di Genetica Medica, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC), Università di Bologna, Bologna, Italia

Prof.ssa Paola Turano

Centro di Risonanze Magnetiche (CERM), Università di Firenze, Firenze, Italia.

Prof. Patrick Harrison

Physiology Department, University College Cork, Cork, Irlanda

Dott.ssa Silvia Lanfranchi

Prof. Renzo Vianello

Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione, Università di Padova, Padova, Italia

Dott.ssa Annalisa Radeghieri

Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università di Brescia, Brescia, Italia

7. Finanziamenti

La prima parte del Progetto è durata 4 anni, dall'Estate 2013 all'Estate 2017. Il costo annuale era stato previsto in 150.000,00 Euro, di cui 75.000,00 Euro per borse di studio.

I fondi effettivamente reperiti sono consistiti in media in circa la metà di quelli necessari per il Progetto iniziale. Tuttavia, nel corso dello studio abbiamo ritenuto non prioritaria, in base ai risultati, la parte relativa al sequenziamento massivo ("Next Generation Sequencing"), che richiedeva il 60% dei fondi destinati alla parte sperimentale, per cui gli obiettivi essenziali sono stati comunque raggiunti.

I fondi reperiti sinora sono provenuti per l'85% da libere donazioni e per il 15% da finanziamenti istituzionali sulla base di bandi competitivi. E' stato necessario destinare il 71% dei fondi totali per sostenere i ricercatori non strutturati impegnati nel Progetto (borse di studio per giovani laureati, assegni di ricerca).

Le principali fonti di finanziamento sono state riconosciute nella sezione "Ringraziamenti" ("Acknowledgements") degli articoli pubblicati.

Per il triennio **2018 - 2020**, sulla base dei nuovi obiettivi sopra indicati, prevediamo una spesa di **105.000 Euro/anno** (**70.000 Euro/anno** per borse di studio e **35.000 Euro/anno** per le spese del Laboratorio).

La seguente suddivisione tra le varie voci di spesa è solo indicativa (variabile nel dettaglio a seconda delle esigenze sperimentali emerse nel corso della ricerca) e potrebbe essere integrata dall'acquisto di macchinari (ad es. cappa per colture cellulari):

| Biologia Molecolare/ Spese Accessorie | |
|---|------------------|
| Plastiche e reagenti di laboratorio | 2.500,00 |
| Puntali, provette | 2.500,00 |
| Reagenti per PCR, gel e purificazione del DNA | 3.300,00 |
| Sequenziamento del DNA | 1.200,00 |
| Reagenti per clonaggio in vivo | 2.000,00 |
| RNA e cDNA | 3.500,00 |
| Reagenti per Northern-blot | 2.500,00 |
| Reagenti per "Real-Time" PCR | 2.500,00 |
| Reagenti per saggi funzionali | 5.200,00 |
| Hardware/software per analisi dati | 2.800,00 |
| Spese di pubblicazione dei risultati | 4.000,00 |
| Spese per missioni/collaborazioni [Partecipazioni a congressi e riunioni di lavoro, organizzazione di seminari] | 3.000,00 |
| Totale per un anno | 35.000,00 |

Tutte le donazioni al Laboratorio di Genomica saranno utilizzate per:

1. Finanziare i giovani ricercatori (borsisti, studenti di dottorato, ricercatori post-dottorato e contrattisti) che lavorano sul Progetto.

2. Acquistare materiali, reagenti, strumenti e servizi necessari al lavoro sperimentale e sostenere le **spese** generali di ricerca (pubblicazioni, missioni ecc.).

8. Bibliografia

- Caracausi M, Vitale L, Pelleri MC, Piovesan A, Bruno S, Strippoli P. A quantitative transcriptome reference map of the normal human brain. *Neurogenetics*. 2014; 15: 267-287.
- Caracausi M, Rigon V, Piovesan A, Strippoli P, Vitale L, Pelleri MC. A quantitative transcriptome reference map of the normal human hippocampus. *Hippocampus*. 2016; 26: 13-26.
- Epstein CJ. Down syndrome, trisomy 21. In: Scriver CR, Beaudet al. Sly WS, Valle D. *Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, NY, 1989. Pp. 291-326.
- Gardiner K, Costa AC. The proteins of human chromosome 21. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2006, 142C:196-205.
- Gardiner KJ. Molecular basis of pharmacotherapies for cognition in Down syndrome. *Trends Pharmacol Sci*, 2010, 31:66-73.
- Korenberg JR. Down syndrome: the crucible for treating genomic imbalance. *Genet Med*, 2009, 11:617-619.
- Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 1959, 248:1721-1722.
- Lenzi L, Facchin F, Piva F, Giulietti M, Pelleri MC, Frabetti F, Vitale L, Casadei R, Canaider S, Bortoluzzi S, Coppe A, Danieli GA, Principato G, Ferrari S, Strippoli P. TRAM (Transcriptome Mapper): database-driven creation and analysis of transcriptome maps from multiple sources. *BMC Genomics*, 2011, 12:121.
- Letourneau A, Antonarakis SE. Genomic determinants in the phenotypic variability of Down syndrome. *Prog Brain Res*, 2012, 197:15-28.
- Mégarbané A, Ravel A, Mircher C, Sturtz F, Grattau Y, Rethoré MO, Delabar JM, Mobley WC. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: the past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genet Med*, 2009, 11:611-616.
- Patterson D. Molecular genetic analysis of Down syndrome. *Hum Genet*, 2009, 126:195-214.
- Pelleri MC, Piovesan A, Caracausi M, Berardi AC, Vitale L, Strippoli P. Integrated differential transcriptome maps of Acute Megakaryoblastic Leukemia (AMKL) in children with or without Down Syndrome (DS). *BMC Med Genomics*. 2014; 7:63.
- Pelleri MC, Cicchini E, Locatelli C, Vitale L, Caracausi M, Piovesan A, Rocca A, Poletti G, Seri M, Strippoli P, Cocchi G. Systematic reanalysis of partial trisomy 21 cases with or without Down syndrome suggests a small region on 21q22.13 as critical to the phenotype. *Hum Mol Genet*. 2016 Apr 22. pii: ddw116. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27106104.
- Pritchard M, Reeves RH, Dierssen M, Patterson D, Gardiner KJ. Down syndrome and the genes of human chromosome 21: current knowledge and future potentials. Report on the Expert workshop on the biology of chromosome 21 genes: towards gene-phenotype correlations in Down syndrome. Washington D.C., September 28-October 1, 2007. *Cytogenet Genome Res*, 2008, 121:67-77.
- Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet*, 2003, 361:1281-1289.
- Roper RJ, Reeves RH. Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. *PLoS Genet*, 2006, 2:e50.
- Sinet PM, Allard D, Lejeune J, Jerome H. Letter: Gene dosage effect in trisomy 21. *Lancet*, 1975, 1:276.
- Strippoli P, Pelleri MC, Caracausi M, Vitale L, Piovesan A, Locatelli C, Mimmi MC, Berardi AC, Ricotta D, Radeghieri A, Barisani D, Basik M, Monaco MC, Ghezzi A, Seri M, Cocchi G. An integrated route to identifying new pathogenesis-based therapeutic approaches for trisomy 21 (Down Syndrome) following the thought of Jérôme Lejeune. *Sci. Postprint*, 1(1): e00010