

VI° Incontro-Convegno A.C.A.R.
11-12-13 aprile 2014

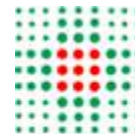
Progetto MATROC (progetto europeo sulle Esostosi Multiple) e stato delle Biobanche

Luca Sangiorgi

SSD di Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche
Istituto Ortopedico Rizzoli - BOLOGNA



ACAR



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA - ROMAGNA
Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico



ESOSTOSI MULTIPLE EREDITARIE (HME)

- Displasia scheletrica a trasmissione autosomica dominante (1/50,000) - **INCIDENZA REALE???**
- Tumori ossei benigni ricoperti da cappuccio cartilagineo (esostosi o osteocondromi)
- Localizzazione: ossa lunghe formate per ossificazione endocondrale
- 1-5% → rischio neoplastico (condrosarcoma periferico secondario) - **INCIDENZA REALE???**

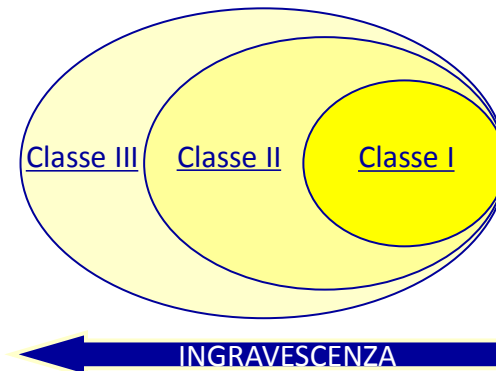
- Grande variabilità di numero, sedi interessate ed evoluzione a livello intra- ed inter-familiare

CLASSIFICAZIONE CLINICA

TABLE I Clinical Classification

Class	Features
I	No deformities and no functional limitations
IA	≤5 sites with exostoses
IB	>5 sites with exostoses
II	Deformities and no functional limitations
IIA	≤5 sites with deformities
IIB	>5 sites with deformities
III	Deformities and functional limitations
IIIA	Functional limitation of 1 site
IIIB	Functional limitation of >1 site

VARIABILITA' CLINICA



Am J Med Genet A. 2013 Mar;161(3):556-60. doi: 10.1002/ajmg.a.35819. Epub 2013 Feb 8.

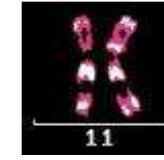
Validation of a new multiple osteochondromas classification through Switching Neural Networks.

Mordanti M, Ferrari E, Pedrini E, Fabbri N, Campanacci L, Muselli M, Sangiorgi L.

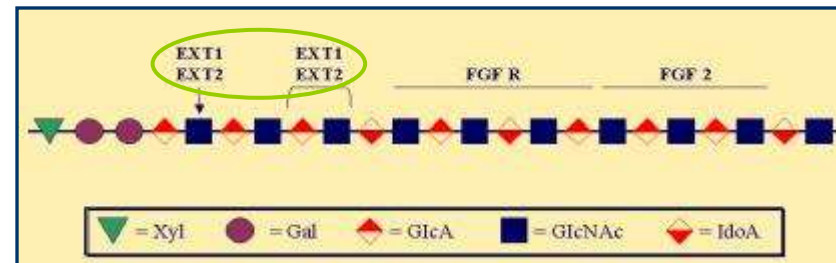
Medical Genetic Department, Rizzoli Orthopaedic Institute (IOR), Bologna, Italy.

Identificati 2 geni principali:

- ✓ **EXT1** (8q24.1-q24.13) – *Esostosina 1*
- ✓ **EXT2** (11p11-p12) – *Esostosina 2*



Ruolo biologico: glicoproteine ad attività glicosil-transferasica coinvolte nella biosintesi delle catene glicosidiche dei proteoglicani eparan-solfati (HSPG), macromolecole implicate nel controllo della crescita cartilaginea



- ~ 90% pazienti con mutazione germinale nei geni EXT (~ 70% EXT1 – 30% EXT2)
- ~ 80-85% mutazioni inattivanti

ETEROGENEITA' ALLELICA

- ✓ Assenza di una correlazione definita tra background genetico e manifestazione clinica
- ✓ Assenza di una correlazione genetica con la degenerazione maligna



FOLLOW-UP PERIODICO SU TUTTI I PAZIENTI

- ✓ Fattori di rischio (sviluppo di una forma clinicamente severa):
 - sesso maschile
 - mutazioni germinali a carico di EXT1
 - numero di sedi scheletriche colpite > 20
- ✓ Fattori protettivi (sviluppo di una forma clinicamente lieve):
 - sesso femminile
 - assenza di mutazioni germinali a carico di EXT1/EXT2
 - mutazioni germinali a carico di EXT2
 - numero di sedi scheletriche colpite < 5
- ✓ Individuazione di gruppi clinicamente e geneticamente omogenei di pazienti

J Bone Joint Surg Am. 2011 Dec 21;93(24):2294-302. doi: 10.2106/JBJS.J.00949.

Genotype-phenotype correlation study in 529 patients with multiple hereditary exostoses: identification of "protective" and "risk" factors.

Pedrini E, Jennes I, Tremosini M, Milanese A, Mordenti M, Parra A, Sqariglia F, Zuntini M, Campanacci L, Fabbri N, Pignotti E, Wuyts W, Sangiorgi L.

Department of Medical Genetics and Skeletal Rare Diseases, Rizzoli Orthopaedic Institute, Bologna, Italy.

Questioni aperte sulla malattia esostosante

- ✓ Cause della variabilità clinica in pazienti affetti da HME
- ✓ Meccanismi alla base della trasformazione maligna
- ✓ Insorgenza della patologia in pazienti privi di mutazioni a carico di EXT1/2 (10% dei casi)
- ✓ Mancanza di marcatori diagnostici e approcci terapeutici alternativi alla chirurgia
- ✓ Base molecolare di formazione delle esostosi poco chiara: quali effetti hanno le mutazioni in EXT1 ed EXT2 sugli eparan-solfati?

**Laboratorio di Genetica
Molecolare**

Diagnosi e Ricerca sulle displasie
scheletriche

CLIBI-Bioinformatica Clinica
Sviluppo di strumenti per la ricerca
biomedica-sanitaria

Dipartimento di Genetica Medica e
Malattie Rare Ortopediche

Genetic Day Clinic

Counseling genetico (visite congiunte)

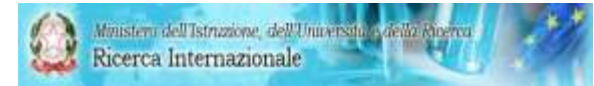
Hub & Spoke

Hub per il Network regionale delle malattie
rare scheletriche

**BIOGEN Biobanca
Genetica (2013)**

Collezione di dati/campioni
(pazienti affetti da displasie
scheletriche)

1. ERA-NET on Translational Cancer Research (TRANSCAN)



2. Regione Emilia-Romagna – PROGETTO GIOVANI RICERCATORI A.LIBERATI - “Rare Diseases, Genomic medicine”



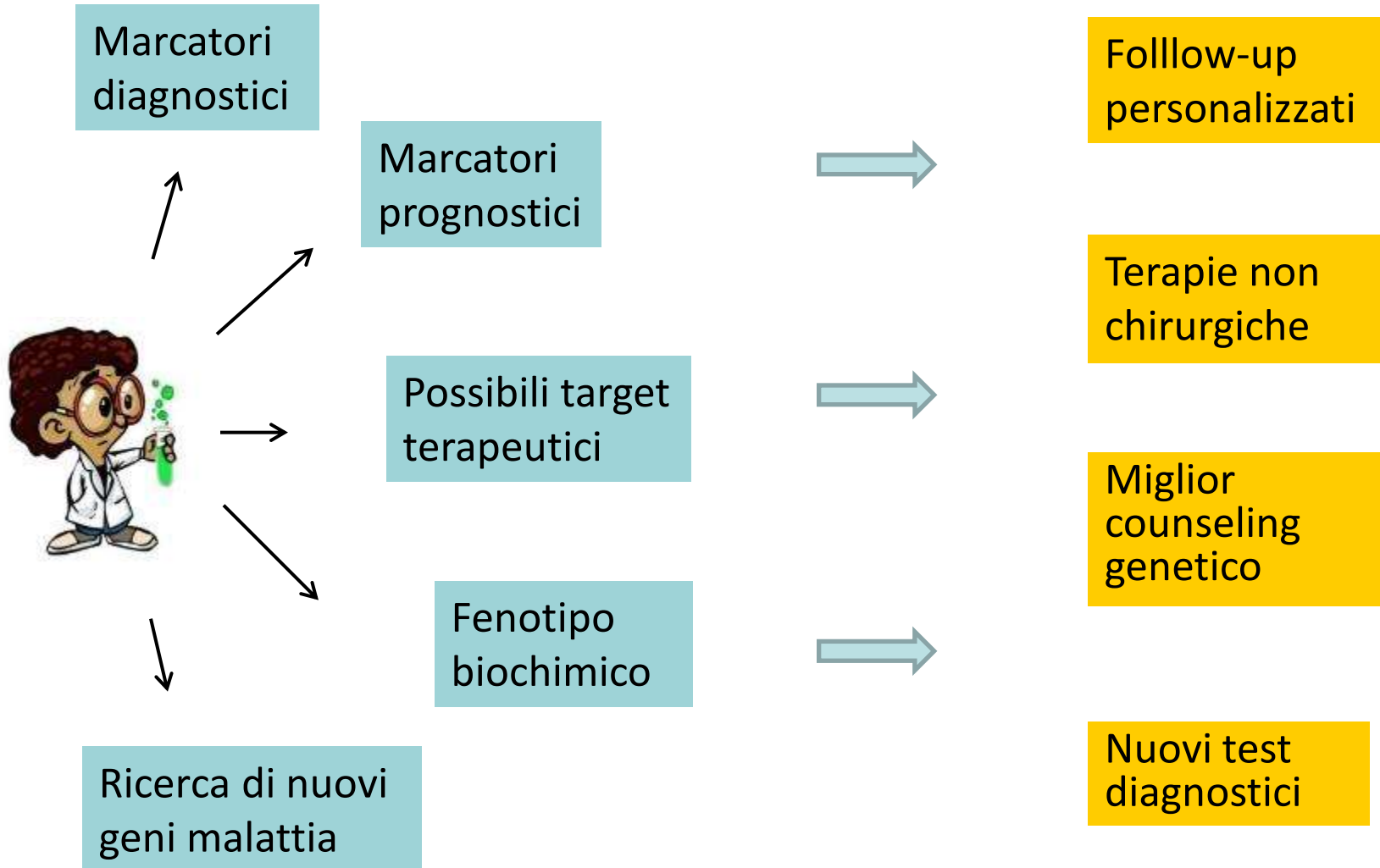
3. Ministero degli Affari Esteri - JOINT RESEARCH PROJECTS AS PART OF SCIENCE AND TECHNOLOGY COOPERATION BETWEEN ITALY AND THE UNITED STATES OF AMERICA FOR THE YEARS 2014 - 2015



Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca

4. BBMRI – Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure





1. ERA-NET on Translational Cancer Research (TRANSCAN)



“Translational research on primary and secondary prevention of cancer”

**IDENTIFICATION OF MOLECULAR THERAPEUTIC TARGETS AND
DIAGNOSTIC/PROGNOSTIC BIOMARKERS FOR MALIGNANT
TRANSFORMATION OF OSTEOCHONDROMAS - MaTrOC**

COLLABORATORI:

Department of Medical Genetics, IOR Bologna - ITALY

Department of Orthopedic Surgery – Amsterdam – NETHERLANDS

Pediatric Genetics – University Hospital of Freiburg – GERMANY

Medical genetics - Hopital Necker, Paris – FRANCE

Department of Orthopedic Surgery, Jerusalem – ISRAEL

Departments of medical genetics, Antwerp - BELGIUM

SCOPO DEL PROGETTO:

Lo scopo primario dello studio consiste nel colmare la mancanza di informazioni attualmente disponibili sugli aspetti molecolari e sulle cause responsabili della trasformazione maligna delle esostosi in condrosarcoma periferico; il chiarimento delle basi molecolari/biochimiche responsabili della formazione neoplastica permetterà di individuare target prognostici correlati ad un maggiore rischio neoplastico e target terapeutici che possano aprire la strada ad approcci alternativi alla chirurgia.

Trasformazione maligna delle esostosi in condrosarcomi: *cosa si sa?*

DALLA LETTERATURA SCIENTIFICA:

- Incidenza: 0.5–5% dei pazienti affetti da Esostosi Multiple Ereditarie
- Coinvolge principalmente esostosi localizzate a livello pelvico e nella spalla
- Avviene, nella maggior parte dei casi, tra la terza e la quinta decade di vita anche se i dati presenti in letteratura sono spesso discordanti

- Necessità di valutare la reale incidenza dell'evento
- Valutare l'età media di insorgenza e il range di età a maggiore rischio
- Identificare i potenziali fattori di rischio (genetici e non)

Aspetti diagnostici:

- La trasformazione maligna di un'esostosi è generalmente ipotizzabile in caso di:
 - ripresa della crescita di un'esostosi dopo la maturità scheletrica
 - dolore
 - spessore del cappuccio cartilagineo > 1 cm (valutazione istologica)
- Conferma diagnostica tramite esami radiologici e istologici

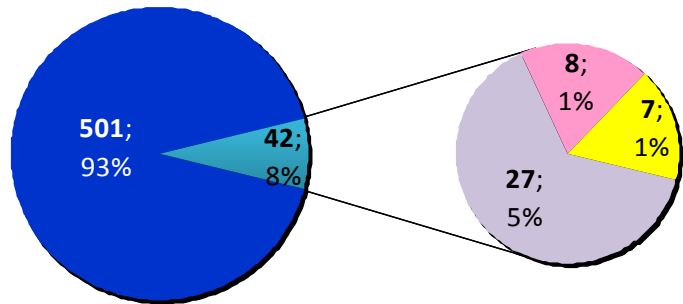


Trasformazione maligna delle esostosi in condrosarcomi: ***cosa si sa?***

CASISTICA IOR:

	N° CSP/adult patient	Class I	Class II	Class III	NA class	EXT1	EXT2	Negative	To be analysed
CSP	42/543 8%	15	8	12	7	24	16	1	1
≤30y	15/543	6	3	3	1	6	6		

543 adult MO



- MO no CSP
- CSP after 30y
- CSP before (?) 30y (only clinical history referred)
- CSP before (?) 30y and confirmed with histological analysis

- Incidenza: **8%** (42/543 pazienti) - valore più alto dell' atteso!!!
- Età di insorgenza variabile: in particolare 15/42 pazienti sviluppano un condrosarcoma prima dei 30 anni di età



Età di insorgenza anticipata rispetto a quanto precedentemente riportato?

ASPETTO DA VALUTARE !!!



Trasformazione maligna delle esostosi: *aspetti molecolari*

Cosa causa la trasformazione di un' esostosi in condrosarcoma?

FATTORI GENETICI ?

L' inattivazione biallelica di EXT1/2 è necessaria per la degenerazione di un' esostosi?



12 tessuti di condrosarcoma analizzati: il 50% presenta una seconda mutazione somatica nei geni EXT1/2 (causa o effetto della trasformazione?)

[Oncogene](#). 2010 Jul 1;29(26):3827-34. doi: 10.1038/onc.2010.135. Epub 2010 Apr 26.

Genetic models of osteochondroma onset and neoplastic progression: evidence for mechanisms alternative to EXT genes inactivation.

[Zuntini M](#), [Pedrini E](#), [Parra A](#), [Sgariglia F](#), [Gentile FV](#), [Pandolfi M](#), [Alberghini M](#), [Sangiorqi L](#).

Department of Medical Genetics and Skeletal Rare Diseases, Rizzoli Orthopaedic Institute, Bologna, Italy.



Meccanismi molecolari alternativi ai geni EXT sono probabilmente coinvolti nella trasformazione maligna:

- Mutazioni in sequenze regolatorie?
- Meccanismi di controllo post-trascrizionali?
- Altri geni coinvolti?

DA VALUTARE !!!

Trasformazione maligna delle esostosi: *aspetti molecolari*

Cosa causa la trasformazione di un' esostosi in condrosarcoma?

FATTORI EPIGENETICI ?

- I microRNA sono piccoli RNA non codificanti che regolano l' espressione genica a livello trascrizionale e/o traduzionale
- la correlazione tra specifici pattern di espressione di microRNA e determinate condizioni patologiche (es. infiammatorie o tumorali) è già ampiamente documentata in letteratura
- Studi preliminari effettuati presso la SSD di Genetica Medica hanno evidenziato un gruppo di microRNA in grado di distinguere tessuti sani da tessuti di esostosi

[Clin Genet](#), 2010 Dec;78(6):507-16. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01490.x.

MicroRNA profiling of multiple osteochondromas: identification of disease-specific and normal cartilage signatures.

[Zuntini M](#), [Salvatore M](#), [Pedrini E](#), [Parra A](#), [Sgariglia F](#), [Maurelli A](#), [Taruscio D](#), [Sangiorci L](#).

Department of Medical Genetics and Skeletal Rare Diseases, Rizzoli Orthopaedic Institute, 40136 Bologna, Italy.



- Ruolo dei microRNA nel processo di trasformazione maligna?
 - E' possibile intervenire sull'espressione dei microRNA per modularne l'effetto?
 - microRNA come potenziali target terapeutici?

DA VALUTARE !!!

Trasformazione maligna delle esostosi: *aspetti molecolari*

Esistono dei marker prognostici per la diagnosi precoce?

- Negli ultimi anni è stata dimostrata la presenza dei microRNA non solo a livello del tessuto patologico ma anche nel siero, grazie alla stabilità di questi piccoli RNA nel sangue periferico, facendone assumere un potenziale ruolo diagnostico/prognostico.
- Il livello o la presenza di specifici microRNA nel siero dei pazienti viene ad oggi utilizzato per la diagnosi/prognosi di un certo numero di patologie.



Utilizzo dei microRNA sierici come marker prognostici/diagnostici della trasformazione maligna delle esostosi?

DA VALUTARE !!!



Trasformazione maligna delle esostosi: *aspetti molecolari*

Esistono dei fattori di rischio (genetici e non) per la determinazione del rischio individuale?

- Un **polimorfismo a singolo nucleotide (SNP)** è una variazione del materiale genico a carico di un unico nucleotide che risulta presente nella popolazione in una proporzione superiore all'1%.
- Variazioni anche di singoli nucleotidi possono influenzare lo sviluppo delle patologie e rappresentare dei fattori predisponenti
- Uno studio effettuato ha mostrato come un polimorfismo a livello del promotore di EXT1 risulti essere un potenziale modificatore della variabilità clinica

[Gene](#). 2012 Jan 15;492(1):148-59. doi: 10.1016/j.gene.2011.10.034. Epub 2011 Oct 19.

Identification and functional characterization of the human EXT1 promoter region.

[Jennes I](#), [Zuntini M](#), [Mees K](#), [Palaqani A](#), [Pedrini E](#), [De Cock G](#), [Fransen E](#), [Vanden Berghe W](#), [Sangiorgi L](#), [Wuyts W](#).

Department of Medical Genetics, University of Antwerp, and Antwerp University Hospital, Edegem, Belgium.



- Esistono specifici SNPs correlati ad un aumentato rischio di degenerazione maligna?
- SNPs come fattori prognostici?

DA VALUTARE !!!



Trasformazione maligna delle esostosi: *aspetti molecolari*

Cosa avviene a livello biochimico nelle esostosi in trasformazione? E' possibile intervenire per bloccarne la crescita?

- EXT1 ed EXT2 sono geni coinvolti nella crescita delle catene glucidiche degli epara-solfati (HS), a loro volta importanti regolatori della crescita cartilaginea
- Al momento non esiste alcuna caratterizzazione degli HS nella cartilagine umana, fattore che impedisce di comprendere realmente quale sia l' effetto biologico delle mutazioni di EXT1 ed EXT2 sul tessuto lesionato
- La recente messa a punto di un protocollo per l' estrazione, l' isolamento e l' analisi degli HS da tessuto cartilagineo, ci permetterà di chiarire questo aspetto

[Glycobiology](#). 2012 Feb;22(2):248-57. doi: 10.1093/glycob/cwr143. Epub 2011 Sep 20.

Heparin-like heparan sulfate from rabbit cartilage.

[Parra A](#), [Veraldi N](#), [Locatelli M](#), [Fini M](#), [Martini L](#), [Torri G](#), [Sangiorqi L](#), [Bisio A](#).

S.S.D. Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche, Istituto Ortopedico Rizzoli, via di Barbiano 1/10, Bologna, Italy.



- Ci sono delle differenze nella struttura degli eparan solfati tra esostosi e condrosarcomi?
- In quale modo si può intervenire per ripristinare il corretto funzionamento cellulare?

DA VALUTARE !!!

Il progetto è organizzato in 4 workpackages, ognuno con le seguenti finalità:

WP1- Studi clinici e screening molecolare

CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO: lo studio effettuato su pazienti provenienti dai 6 centri partecipanti al progetto permetterà di confermare o meno i risultati preliminari individuando eventuali elementi genetici correlati ad un maggiore rischio di degenerazione maligna

WP2- Valutazione del ruolo dei microRNA nella degenerazione maligna e di un eventuale utilizzo diagnostico/prognostico

ANALISI DEI microRNA TISSUTALI: valutazione del ruolo dei microRNA nel processo neoplastico

ANALISI DEI microRNA SIERICI: valutazione della presenza nei pazienti affetti da degenerazione maligna di microRNA alterati a livello sierico e quindi utilizzabili come marker diagnostici/prognostici

WP3- Identificazione di geni causativi o modificatori coinvolti nel processo patogenetico di trasformazione maligna

ANALISI DEI POLIMORFISMI (SNPs): individuare specifici SNPs predisponenti la trasformazione maligna

WHOLE GENOME SEQUENCING (WGS): analisi genica su larga scala per individuare geni coinvolti nella progressione maligna delle esostosi

WP4- Valutazione dei livelli e della struttura dei glicosaminoglicani – eparan solfati nei tessuti di condrosarcoma

ANALISI BIOCHIMICHE: Valutare le differenze che creano il discrimine tra patologia ‘benigna’ e trasformazione neoplastica

INDIVIDUAZIONE DI TARGET TERAPEUTICI: ipotizzare la modalità di correzione attuabile per ripristinare il corretto funzionamento biologico.

2. Regione Emilia-Romagna – PROGETTO GIOVANI RICERCATORI A.LIBERATI - “Rare Diseases, Genomic medicine”



DIAGNOSTIC ACCURACY AND COST-EFFECTIVENESS OF NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) STRATEGIES IN THE GENETIC TESTING OF RARE ORTHOPAEDIC DISEASES

SCOPO DEL PROGETTO:

Lo scopo dello studio consiste nella messa a punto e validazione di un nuovo sistema diagnostico per lo screening genetico di due displasie scheletriche (tra cui la malattia esostosante) basato sull' utilizzo di tecniche innovative per il sequenziamento massivo (**Next Generation Sequencing - NGS**)

TECNICHE CONVENZIONALI: viene analizzato un gene per volta

TECNICHE NGS: consentono di analizzare più geni contemporaneamente



**RIDUZIONE CONSISTENTE DEI
TEMPI DI ANALISI**

3. Ministero degli Affari Esteri - JOINT RESEARCH PROJECTS AS PART OF SCIENCE AND TECHNOLOGY COOPERATION BETWEEN ITALY AND THE UNITED STATES OF AMERICA FOR THE YEARS 2014 - 2015



Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca



MALIGNANT DEGENERATION IN MULTIPLE OSTEOCHONDROMAS: MURINE MODELS FOR THERAPEUTICAL APPROACH IN CARTILAGINOUS DISEASES

COLLABORATORI:

- **Department of Medical Genetics, IOR Bologna - ITALY**
- Children Hospital of Philadelphia - Division of Orthopedic Surgery–
Philadelphia – USA

**SCOPO DEL PROGETTO:**

L'assenza di un modello murino efficace da utilizzare per lo studio di un approccio terapeutico alternativo alla chirurgia per la malattia esostosante, è causato dalla mancanza di informazioni chiare sulle basi molecolari e biochimiche della patologia stessa. Per ovviare a ciò, questo studio si prefigge di caratterizzare i players biochimici e molecolari correlati alla crescita delle esostosi e alla degenerazione maligna, elementi essenziali per poi procedere alla creazione di un modello murino adeguato.

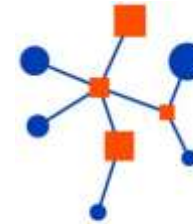
Obiettivi specifici:

- ✓ Validazione dei risultati ottenuti nel progetto europeo TRANSCAN:
 - basi genetiche/epigenetiche della patologia
 - alterazioni strutturali degli eparan-solfati a livello tissutale
- ✓ Creazione di un modello murino
- ✓ Studi in vitro per valutare l'effetto di nuovi approcci terapeutici



BBMRI - Biobanking and Biomolecular
Resources Research Infrastructure

<http://bbmri.eu/>



BBMRI
Biobanking and
Biomolecular
Resources Research
Infrastructure

E' un consorzio composto da:

→ più di 50 membri

→ più di 250 organizzazioni (in gran parte biobanche)

→ più di 30 paesi (per l' Italia BBMRI-IT)

Questo lo rende **l' infrastruttura di ricerca più ampia in Europa**

Nel novembre 2013, a BBMRI è stato ufficialmente assegnato il quadro giuridico di infrastruttura europea di ricerca (European Research Infrastructure Consortium - ERIC). Questa forma giuridica specifica è stata progettata per facilitare la costituzione e la gestione comune di infrastrutture di ricerca di interesse europeo.

Il nodo italiano coinvolge:

- ✓ Istituto Superiore di Sanità
- ✓ CNR
- ✓ 18 Università
- ✓ 22 IRCCS
- ✓ 8 associazioni di pazienti

E include più di **90 Biobanche!!**



La SSD di Genetica Medica (Istituto Ortopedico Rizzoli)
partecipa al nodo italiano con la Biobanca Genetica delle
Malattie Rare

BIOGEN



Che cos'è una biobanca?

Le collezioni di campioni biologici sono definite come “sistemi che permettono la conservazione di uno o più tipi diversi di tessuti biologici per analisi da condurre in tempi successivi alla loro raccolta per testare singole o multiple ipotesi”



Se alla collezione di campioni associamo una **raccolta ordinata di informazioni relative al campione (data del prelievo, temperatura di stoccaggio, ecc) e di dati clinici, genetici, familiari del paziente...**



...otteniamo una **BIOBANCA**



Con il termine **BIOBANCA** si definisce una raccolta organizzata non solo di di materiale biologico, ma anche dei dati a esso associati

VANTAGGI

- ✓ Elevata qualità del materiale raccolto (identificazione di linee guida per la gestione dei campioni e sistemi di certificazione)
- ✓ Stabilità nel tempo del materiale collezionato e sicurezza dei dati raccolti
- ✓ Possibilità di scambio di bio-campioni tra ospedali e centri di ricerca (molto importante per le malattie rare!)

FINALITA'

- ✓ Approcci diagnostici innovativi
- ✓ Studi di ricerca più completi, grazie ad un dataset più ampio
- ✓ Individuazione di coorti di pazienti per studi mirati (ad es. trasformazione maligna)
- ✓ Contribuzione allo sviluppo di farmaci, terapie o strumenti diagnostici
- ✓ Aumentare le conoscenze su **patologie orfane**



BIOGEN (Biobanca Genetica) è il nome della biobanca istituita presso al SSD di Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche finalizzata alla raccolta di campioni provenienti da pazienti affetti da Malattie Rare



Che campioni vengono raccolti?

- Sangue
- DNA
- RNA
- Linee cellulari
- Siero
- Linfociti
- Tessuti (bioptici e operatori)

Il tipo di campione viene individuato per facilità di raccolta, stabilità nel tempo, utilità a fini diagnostici o di ricerca



Scheda informativa e Consenso Informato per la biobanca **BIOGEN** approvati dal Comitato Etico IOR

Istituto Ortopedico Rizzoli	Allegato 4 - Scheda informativa e consenso informato	Comitato Etico MOD 06 PG-01/DG REV 01
-----------------------------	---	---

SCHEDA INFORMATIVA E DICHIARAZIONE DI CONSENSO

(per un soggetto capace di dare personalmente il consenso)

SCHEDA INFORMATIVA

Gentile Signora/e _____

presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli IRCCS di Bologna è in programma una ricerca medico-scientifica dal titolo

Istituzione di una Biobanca Genetica diagnostica e di ricerca presso la S.S.D. di Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche

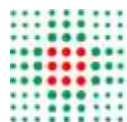
Questa ricerca si svolge esclusivamente in questa struttura

Per realizzare la Biobanca Genetica diagnostica e di ricerca abbiamo bisogno della collaborazione e disponibilità di persone che, come Lei, soddisfano i requisiti scientifici idonei alla valutazione che verrà eseguita. Comunque, prima che Lei prenda la decisione di accettare o rifiutare di partecipare, La preghiamo di leggere con attenzione, prendendo tutto il tempo che Le necessita, queste pagine e di chiederci chiarimenti qualora non comprendesse o avesse bisogno di ulteriori precisazioni. Inoltre, qualora lo desiderasse, prima di decidere, può chiedere un parere ai suoi familiari o ad un suo medico di fiducia.



**SSD di Genetica
Medica e Malattie
Rare Ortopediche
ISTITUTO
ORTOPEDICO RIZZOLI**

Thank you!



**SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA - ROMAGNA**
Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico



ACAR