



ICGEB

International Centre for Genetic
Engineering and Biotechnology

Mod. G

RELAZIONE FINALE DELLE ATTIVITA' (su carta intestata del soggetto beneficiario)

Obiettivo generale (SOLO Relazione finale)

Descrivere come l'obiettivo generale di progetto sia stato raggiunto.
Compilare la parte sottostante non superando i 2000 caratteri

Obiettivo generale è stato quello di costruire una piattaforma per lo studio predittivo e la formulazione di una terapia personalizzata nei pazienti con scompenso cardiaco, accoppiando il sequenziamento del DNA con lo studio dei cardiomiociti del paziente generati in laboratorio.

E' di fondamentale importanza correlare il fenotipo cellulare con il fenotipo clinico della malattia. La gravità del fenotipo pertanto è direttamente proporzionale al tipo di pathways disturbate, e dall'entità di questo disturbo. L'aploinsufficienza della proteina codificata dal gene mutato si ritiene sia il meccanismo principale di danno molecolare nei cardiomiociti di pazienti con cardiomiopatia dilatativa e scompenso cardiaco. Per riprodurre questa insufficienza proteica sono stati silenziati i geni più frequentemente mutati nei pazienti (*TTN*, *FLNC*, *PKP2*, *MYH7* ed altri) mediante siRNA (short interfering RNA), ovvero una breve sequenza di nucleotidi in grado di inibire selettivamente la trascrizione del mRNA del gene di interesse.

Questo modello consente quindi di simulare ciò che succede nei cardiomiociti dei pazienti con mutazioni troncanti a carico di quei geni, e offre il vantaggio di poter essere modulato per poter variare l'entità del silenziamento. Abbiamo pertanto indotto il silenziamento dei geni di interesse in cardiomiociti neonatali murini ed in cardiomiociti indotti da iPSC. E' emerso come il silenziamento di *TTN* sia in grado di indurre un marcato deficit di forza contrattile da severo disarrangiamento della struttura sarcomerica, con relazione dose-effetto lineare, e parallelamente alterare la proliferazione dei cardiomiociti murini ed indotti da iPSC. Quantificando il deficit di forza contrattile in condizioni di marcata aploinsufficienza di *TTN* indotta da siRNA, è stato possibile definire uno standard di riferimento con cui confrontare il deficit di forza dei cardiomiociti da iPSC di pazienti con mutazioni truncating di *TTN*, per svolgere successive correlazioni tra fenotipo cellulare e fenotipo clinico, ed inoltre per poter testare le varianti classificate come VUS nell'indurre modificazioni alla forza contrattile. Abbiamo valutato l'impatto del silenziamento di *TTN* in cardiomiociti in diverse fasi di maturazione, sia simil-neonatali che adulti, documentando come lo stesso trattamento sia in grado di provocare effetti

ICGEB | Trieste

Tel: +39 040 37571
Fax: +39 040 226555
E-mail: icgeb@icgeb.org

Trieste, ITALY - New Delhi, INDIA - Cape Town, SOUTH AFRICA

opposti sulla proliferazione: non influente o lievemente inibente in caso di cellule neonatali, marcatamente stimolante la proliferazione in caso di cardiomiociti a fenotipo maturo-adulto. Il silenziamento degli altri geni testati non sembra essere in grado, con l'eccezione del silenziamento di *FLNC*, di alterare la proliferazione dei cardiomiociti. Con il fine di descrivere ed analizzare uno dei possibili meccanismi di danno della cardiomiopatia dilatativa da mutazioni troncanti del gene *TTN*, rappresentante la quota epidemiologicamente più rappresentativa dei pazienti con Cardiomiopatia dilatativa ci siamo pertanto focalizzati sull'associazione tra silenziamento di *TTN* e alterazioni della proliferazione dei cardiomiociti. Si sono determinati i livelli di mRNA delle diverse isoforme del gene, (N2BA e N2B) e si è confermata l'efficacia del silenziamento per entrambe le isoforme. Si sono analizzate, con anticorpi specifici, le alterazioni sarcomeriche indotte dal silenziamento, con evidenza di significativa riduzione della presenza di *TTN* e marcata destrutturazione dei sarcomeri. Si è proceduto ad analisi del trascrittoma a diversi tempi per individuare i trascritti mRNA alterati dall'insufficienza di *TTN*, per individuare dei trascritti markers significativi di danno molecolare e per ricostruire il meccanismo di malattia.

Obiettivi specifici (SOLO Relazione finale)

Descrivere come gli obiettivi specifici sia siano raggiunti.
Compilare la parte sottostante non superando i 2000 caratteri

- 1) Generare cellule iPS di pazienti con cardiomiopatia primitiva e da queste ottenere cardiomiociti e tessuto contrattile EHT.
Sono stati sviluppati protocolli per il differenziamento di cardiomiociti da cellule iPS e l'ottimizzazione di engineered heart tissue (EHT) per lo sviluppo di modelli di patologie cardiache. E' stata ottimizzata la coltura di cellule iPS mantentendone la pluripotenza. La pluripotenza è stata confermata con saggi di immunofluorescenza e citofluorimetria. Per il differenziamento in senso cardiomiocitario è stato adattato un protocollo in senso mesodermico che permette di ottenere in parallelo cardiomiociti ad alta purezza, ma anche cellule endoteliali umane. Sono stati selezionate le mutazioni di interesse per creare modelli in vitro delle cardiomiopatie più frequenti. Sono stati creati dei modelli di riferimento attraverso il silenziamento dei geni di interesse mediante siRNA
- 2) Sviluppare read out biologici per l'utilizzo dei cardiomiociti e EHT.
Su sistema EHT sono state determinate le alterazioni di forza contrattile dei cardiomiociti con aploinsufficienza a carico dei geni di interesse. Non sono stati determinati i potenziali di azione a livello di membrana cellulare su cardiomiociti isolati, ma si è quantificata la frequenza e la ritmicità dei contrazione spontanea dei cardiomiociti su sistemi EHT come indicatore del funzionamento dei dischi intercalari e quindi della

normale, o alterata, propagazione dell'impulso elettrico.

3) Valutare dell'impatto funzionale delle varianti genetiche di significato sconosciuto (VUS).

I read-out sviluppati sono stati utilizzati al fine di distinguere i polimorfismi benigni dalle varianti rare patologiche e avendo come scopo anche quello di valutare la risposta del tessuto cardiaco ai farmaci, da utilizzare poi in maniera personalizzata nei singoli pazienti e a fini di predittività clinica di espressione della malattia e sua evoluzione. In questo contesto, è stato anche eseguito lo studio del trascrittoma in cellule con aploinsufficienza di uno dei geni di interesse (TTN) al duplice fine di individuare dei trascritti alterati che possano fungere da marcatori significativi di danno molecolare specifico. Dallo studio degli stessi trascritti in cellule con varianti VUS, se alterati in maniera analoga al modello di aploinsufficienza, è possibile avvalorare la loro patogenicità, in caso contrario possono essere considerate non patologiche/verosimilmente benigne.

Obiettivi intermedi raggiunti (Relazione intermedia)

Descrivere come sono stati raggiunti gli obiettivi intermedi

Compilare la parte sottostante non superando i 2000 caratteri

Nel corso del periodo considerato sono emerse 22 varianti patologiche della proteina titina, 6 varianti patologiche della filamina C e 5 varianti patologiche di PKP2. Sulla base dei criteri di gravità sono state selezionate le mutazioni associate per successivo studio su cardiomiociti da iPS.

In maniera parallela alla determinazione delle mutazioni dei pazienti, sono stati sviluppati protocolli per il differenziamento di cardiomiociti da cellule iPS e l'ottimizzazione di engineered heart tissue (EHT) per lo sviluppo di modelli di patologie cardiache. È stata ottimizzata la coltura di cellule iPS mantenendone la pluripotenza. La pluripotenza è stata confermata con saggi di immunofluorescenza e citofluorimetria. Per il differenziamento in senso cardiomiocitario è stato adattato un protocollo in senso mesodermico che permette di ottenere in parallelo cardiomiociti ad alta purezza, ma anche cellule endoteliali umane.

Gli EHT sono colture 3D di cellule cardiache che permettono di aumentare il grado di maturazione delle cellule e di effettuare studi a lungo termine focalizzati sulla proliferazione e l'alterazione della contrattilità. Inizialmente sono stati generati EHT utilizzando cellule di ratto per testare la fattibilità di un modello preclinico per effettuare drug screening e test di contrattilità. È stata poi analizzata la forza contrattile dei cardiomiociti in condizioni di base ed in condizioni di riduzione dei livelli cardiomiocitari di Titina (TTN). Tale riduzione è stata indotta a tramite silenziamento mediato da siRNA (short Interfering RNA), ovvero un a breve sequenza di nucleotidi in grado di inibire selettivamente la trascrizione del mRNA di Titina. Questo modello è necessario per standardizzare dei parametri di contrattilità da usare come riferimento nelle fasi successive del progetto, quando verrà testata la forza contrattile di cardiomiociti indotti da iPS con mutazioni di Titina. Lo stesso

schema viene ripetuto anche per gli altri genotipi di interesse.

Risultati raggiunti nello stadio finale di avanzamento progettuale, indicatori e fonti di verifica

Obiettivo Specifico	Risultato Raggiunto (non superare i 1000 caratteri)	Indicatore di valutazione	Fonte di Verifica
---------------------	---	---------------------------	-------------------

<p>1. Identificazione ed arruolamento di pazienti con cardiomiopatia con base genetica</p>	<p>Sono stati selezionati i pazienti con forme clinicamente più severe di fenotipo. La gravità della malattia è stimata sulla base dei seguenti risultati clinici: 1) MVA (Aritmie Ventricolari Maligne: morte cardiaca improvvisa-SCD, SCD abortito, fibrillazione ventricolare-VF, shock ICD appropriati su FV / tachicardia ventricolare-TV, tachicardia ventricolare sostenuta SVT) ; 2) ospedalizzazione o morte per scompenso cardiaco-HFd (SCD in peggioramento di HF, HRd, HTx, dispositivo di assistenza ventricolare sinistra LVAD); 3) risposta alla terapia medica ottimale-OMT misurata come rimodellamento inverso ventricolare sinistro (LVRR). A questo proposito, sono attualmente riportate diverse percentuali di LVRR, ovvero in risposta all'OMT, tra i diversi genotipi: i portatori di TTNtv sperimentano un rimodellamento inverso in quasi il 50-60% dei casi, quelli con mutazioni di FLNC molto più raramente, mentre per PKP2 il dato non è noto.</p>	<p>Selezione dal database clinico-informatico di ASUGI</p>	<p>Sistema informatico di ASUGI, Cardiologia</p>
--	---	--	--

<p>2. Determinazione della sequenza genetica dei pazienti mediante NGS</p>	<p>E' stata determinata la sequenza del genoma di 420 pazienti, affetti da diversi tipi di cardiomiopatie. La patogenicità delle varianti è stabilita secondo i criteri Richards delle linee guida ACMG (American College of Medical Genetics) del 2015: la variante deve essere rara o assente nella popolazione generale, con MAF <0,01%, e, per quanto riguarda il gene Titina, la proteina ne deve risultare troncata (variante nulla: nonsense, framshift/inserzione-delezione, variante di sito di splicing), e riguardare esoni trascritti con PSI (Percentage Spliced In)> 90% nelle isoforme cardiache, per il gene Filamina C deve anche portare a una proteina troncata, mentre per il gene PKP2 deve essere, se variante di singolo nucleotide, in doppia eterozigosi o eterozigosi composta, o essere una larga delezione a carico di uno dei 2 alleli. Infine, per determinare l'eventuale peso di molteplici polimorfismi o VUS nel fenotipo clinico, si è proceduto all'analisi con SNP array del Poligenic Risk Score per Cardiomiopatia Dilatativa.</p>	<p>Informazione genetica, inquadramento clinico</p>	<p>Informazione registrata nell'ambito del follow up diagnostico e terapeutico dei pazienti presso ASUGI</p>
--	---	---	--

<p>3. Cultura di linee iPS e differenziamento in cardiomiociti</p>	<p>Sono stati ottimizzati protocolli di differenziamento di cellule iPS in cardiomiociti. La linea di IPSCs WTC-11 è stata utilizzata per ottenere cardiomiociti umani. Le cellule IPS sono state mantenute in uno stato indifferenziato in un terreno di coltura specifico arricchito con inibitori della proteina Rock (Y27632) ad ogni passaggio per aumentarne la vitalità. Versene EDTA o Accutase sono stati utilizzati per passare le cellule a confluenza. Le cellule iPS sono sempre state mantenute in piastre di coltura trattate con Matrigel per favorirne la crescita mantenendone lo stato di pluripotenza. Per il differenziamento in senso cardiomiocitario è stato adattato un protocollo in senso mesodermico che permette di ottenere in parallelo cardiomiociti ad alta purezza e anche cellule endoteliali umane.</p>	<p>Acquisizione di competenza sperimentale</p>	<p>Protocolli di laboratorio presso ICGEB</p>
<p>4. Generazione di Engineered Heart Tissue a partire da cardiomiociti</p>	<p>Per creare EHT, sono stati utilizzati speciali stampi per la semina delle cellule. Gli EHT generati hanno dimostrato di contrarsi in modo sincrono entro il quinto giorno. E' stato quindi ottimizzato un metodo per misurare la contrazione degli EHT basata su analisi video e analizzare la frequenza e la regolarità del battito nei diversi distretti dei costrutti. E' stata analizzata la forza contrattile dei cardiomiociti in condizioni di base ed in condizioni di riduzione dei livelli cardiomiocitari di Titina e degli altri geni. Tale riduzione è stata indotta a tramite silenziamento mediato da siRNA (short Interfering RNA). Questo modello è necessario per standardizzare dei parametri di contrattilità da usare come riferimento.</p>	<p>Acquisizione di competenza sperimentale</p>	<p>Protocolli di laboratorio presso ICGEB</p>

Quadro delle attività svolte (dal tempo zero a scadenza finale)

Descrivere sinteticamente i contenuti delle attività progettuali svolte, indicando la durata ed i soggetti coinvolti nell'implementazione Compilare per ogni fase progettuale non superando 1000 caratteri per fase					
Fase progettuale	Data prevista di inizio	Data prevista di fine	Attività svolta (non superare 1000 caratteri)	Eventuali criticità riscontrate (non superare 1000 caratteri)	Soggetti coinvolti nella fase progettuale
I Definizione di una coorte di pazienti con cardiomiopatia	aprile 2019	giugno 2020	Identificazione di una coorte di pazienti con cardiomiopatia geneticamente determinata secondo i criteri di sopra elencati	Nessuno	Soggetto beneficiario: ASUGI Partner: ICGEB
II Determinazione della sequenza genetica dei pazienti selezionati	luglio 2019	dicembre 2021	Estrazione del DNA e sequenziamento del genoma dei pazienti selezionati, analisi delle sequenze generiche e definizione delle mutazioni secondo i criteri specificati,	Nessuno. Il costo per il sequenziamento è stato in gran parte generato da altri fondi nel frattempo resisi disponibili.	Soggetto beneficiario: ASUGI Partner: ICGEB

			analisi del PGS per cardiomiopatia dilatativa		
III Definizione delle condizioni di coltura e differenziamento di cellula iPS umane	maggio 2020	marzo 2022	Sviluppo delle tecniche di coltura, media, fattori di crescita, matrici cellulari per la coltura di cellule iPS umane in condizioni indifferenziate e il loro differenziamento in cardiomiociti. Caratterizzazione dei cardiomiociti ottenuti in termini fenotipici e funzionali. Determinazione ed analisi delle alterazioni proliferative indotte da aploinsufficienza dei geni di interesse.	Nessuno dal punto di vista sperimentale. L'attività è risultata rallentata nel periodo marzo 2020-marzo 2021 dal limitato accesso ai laboratori a causa della pandemia da SARS-CoV-2	Soggetto beneficiario: ICGEB Partner: ASUGI

IV Sviluppo di un sistema EHT	1 settembre 2020	marzo 2022	Sviluppo di un apparato per la generazione di EHT e visualizzazione quantitativa della loro efficienza di contrazione. Studio e standardizzazione parametri di contrattilità per ogni genotipo di interesse (Titina, Filamina, Plakofillina2). Analisi trascrittomiche dei cardiomiociti con aploinsufficienza da TTN per individuare trascritti da utilizzare come "marker" gene-specifici di danno molecolare	Nessuno dal punto di vista sperimentale. L'attività è risultata rallentata nel periodo marzo 2020-marzo 2021 dal limitato accesso ai laboratori a causa della pandemia da SARS-CoV-2	Soggetto beneficiario: ICGEB Partner: ASUGI
-------------------------------	------------------	------------	---	--	--

Diffusione dei Risultati, trasferimento delle conoscenze

Descrivere come la ricerca è stata divulgata e con quali mezzi
 Compilare la parte sottostante non superando i 2000 caratteri

Le informazioni ottenute dalla genotipizzazione dei pazienti sono state oggetto di pubblicazioni scientifica (Merlo, M, et al. 2020. Eur J Heart Fail, M.Akhtar, M. Dal Ferro M et al, Circ. Heart Fail. 2020; Gigli M, Stolfo D., Dal Ferro M et al, Circulation 2021; Paldino A, Dal Ferro M et al, Under Revision JACC 2022) e sono state presentate al pubblico nell'occasione di uno degli incontri di Science & The City, organizzato a Trieste dall'ICGEB, ed in occasione del congresso Advances in Heart Failure, Cardiomyopathies and Cardiac Disease, Trieste, 22-23 Aprile 2022.

Trasferibilità dei risultati e sostenibilità (SOLO relazione finale)

Descrivere come i risultati siano trasferibili e le caratteristiche di sostenibilità del progetto
Compilare la parte sottostante non superando i 3000 caratteri

La collaborazione tra i 2 partners del progetto, centri di eccellenza internazionale nei rispettivi ambiti di competenza (ricerca di base e ricerca ed assistenza clinica), consente di sviluppare e mantenere un centro collaborativo di ricerca traslazionale in grado di rispondere alle esigenze dei malati di malattie cardiovascolari. Queste esigenze sono molteplici: sia allo scopo di ottenere una migliore definizione diagnostica e prognostica della malattia di cui sono affetti, ma soprattutto per le prospettive terapeutiche. Grazie allo studio progressivamente sistematico di modelli di malattia in grado di fornire informazioni sui meccanismi molecolari di danno, è possibile perseguire la ricerca di bersagli terapeutici specifici, in grado di modificare o prevenire il decorso della malattia. La ricerca in ognuno di questi ambiti ha generato interesse da parte dei pazienti anche fuori regione FVG e da parte di imprese interessate a facilitare lo sviluppo industriale di eventuali farmaci di medicina personalizzata. Il progresso di conoscenza, inoltre, ha rivestito indubbio valore formativo nel confronti della rete universitario-ospedaliera.