

## Attività scientifica svolta nel 2° anno di Dottorato in Medicina Molecolare

### Anno Accademico 2014/2015

#### *- Introduzione*

Il Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare, che svolgo presso il laboratorio della Sezione di Scienze Fisiologiche del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica dell'Università di Firenze sotto la supervisione del Professor Corrado Poggesi, mi vede partecipare ad un progetto che si occupa della comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base della disfunzione contrattile nella Cardiomiopatia Ipertrofica (CMI).

La cardiomiopatia ipertrofica è una patologia clinica su base genetica (autosomica dominante) caratterizzata da ipertrofia ventricolare asimmetrica, disfunzione contrattile e morte improvvisa. Questa patologia ha una prevalenza di circa 1:500, i principali geni implicati sono quelli codificanti le proteine sarcomeriche: la catena pesante della miosina, la proteina C legante la miosina e la Troponina T (TnT), e proprio per questo definita anche come una "malattia del sarcomero". Tali mutazioni possono causare sia alterazioni legate alla funzionalità del sarcomero stesso che alterazioni di altri meccanismi di regolazione tra cui l'accoppiamento eccitazione-contrazione. Le mutazioni da noi studiate (R92Q, E163R, delta160E), associate a CMI, sono localizzate nel gene (TNNT2) che codifica per la troponina T.

I risultati raccolti da un precedente lavoro del nostro gruppo sui campioni umani di CMI avevano identificato la corrente tardiva del sodio ( $I_{Na-L}$ ) come potenziale bersaglio farmacologico per il trattamento della patologia (Coppini et al., 2013). Anche su trabecole dissezzionate da topi transgenici per la mutazione R92Q, la Ranolazina si è rilevata capace di migliorare alcune di queste alterazioni elettromeccaniche, come gli eventi aritmogenici e il ridotto effetto inotropo positivo dell'isoproterenolo. Lo scorso anno, inoltre, abbiamo testato l'effetto in vivo di un trattamento cronico con la Ranolazina, caratterizzando e comparando 3 gruppi di topi di un anno di età: WT, topi R92Q non trattati, topi R92Q trattati con la ranolazina sin dalla nascita. I dati ottenuti hanno confermato l'efficacia della Ranolazina sul ripristinare la riserva contrattile e sul ridurre i fenomeni di aritmogenesi nelle trabecole intatte di topi R92Q-trattati.

Ho presentato i risultati di questo lavoro al "59esimo incontro annuale della Biophysical Society" dal titolo "LIFE-LONG TREATMENT WITH LATE SODIUM CURRENT BLOCKER REDUCES MYOCARDIAL DYSFUNCTION AND REMODELING IN A MOUSE MODEL OF HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY", tenutosi lo scorso 9 Febbraio in Baltimora.

#### *- Metodi e obiettivi*

A differenza dello scorso anno, durante il quale ho utilizzato preparati multicellulare intatti per misure meccaniche, quest'anno ho appreso un'altra tecnica che permette di effettuare misurazioni meccaniche ed energetiche da preparati cardiaci demembranati. A tale scopo ho trascorso sei mesi a Chicago nel Laboratorio del Professor Pieter de Tombe, uno dei massimi esperti in questo campo, presso il Dipartimento di Fisiologia Cellulare e Molecolare dell'Università di Loyola.

L'obiettivo di questo secondo anno di dottorato è stato: (i) acquisire competenze pratiche e teoriche di questa nuova tecnica, (ii) caratterizzare le tre mutazioni su citate, da un punto di vista energetico e meccanico, in un modello umano di CMI.

Per questi esperimenti sono stati utilizzati delle miectomie di pazienti operati per problemi cardiaci ma non affetti da CMI. Il campione viene omogeneizzato per ottenere piccoli fasci di muscolo, che vengono poi demembranati per mezzo di un detergente (Triton X-100). Successivamente si selezionano accuratamente i fascetti di muscolo che, per grandezza ottimale (~ 1.7 lunghezza x 0.2 spessore) e omogeneità di tessuto, saranno quindi pronti per il successivo passaggio: lo *scambio di proteina*. Quest'ultimo processo permette di sostituire il complesso troponinico endogeno sano, ossia privo di mutazione, con quello contenente la mutazione di interesse. Le proteine ricombinanti utilizzate per gli esperimenti sono state prodotte con un nuovo metodo di sintesi descritto da Zhang M. et al, 2015 Am J Physiol, in grado di ottimizzare tempi e costi di produzione e al tempo stesso incrementare l'efficienza di produzione.

L'apparato sperimentale utilizzato consiste in una serie di 3 pozetti di 80  $\mu\text{l}$  l'uno, che vengono riempiti di soluzione rilasciante, preattivante ed un pozzetto di 30  $\mu\text{l}$  dove avviene la registrazione simultanea di forza e attività ATPasica.

Alle due estremità della fibra demembranata vengono applicate delle clips in alluminio che hanno una forma a T ed un foro nella parte centrale che consentirà il montaggio del preparato tra l'uncino di un trasduttore di forza da un lato e l'uncino di un motore dall'altro. La fibra viene spostata manualmente prima nella soluzione rilasciante, poi nella

soluzione preattivante e infine nella soluzione attivante dove verranno effettuate simultaneamente le misurazioni di forza e di attività ATPasica. La forza viene misurata in condizioni isometriche, ossia mantenendo il preparato a lunghezza costante e controllata durante tutto l'esperimento. Lo sviluppo di forza avviene ogni qualvolta immersiamo il nostro preparato in una soluzione contenente  $\text{Ca}^{2+}$ , il mediatore intracellulare che innesca il meccanismo della contrazione.

La misura dell'attività ATPasica sfrutta un sistema enzimatico accoppiato. L'idrolisi dell'ATP ad ADP durante la contrazione, infatti, è legata all'ossidazione del  $\text{NADH}_2$  a  $\text{NAD}^+$  mediante due reazioni catalizzate dagli enzimi Piruvato Chinasi (PK) e Lattato Deidrogenasi (LDH). La sequenza delle reazioni enzimatiche è bilanciata stocasticamente, ossia l'idrolisi di 1 mole di ATP porta all'ossidazione di 1 mole di  $\text{NADH}_2$  e quindi la determinazione nell'unità di tempo della quantità di  $\text{NADH}_2$  che viene ossidato è un indicatore della quantità di ATP che viene idrolizzata ad ADP durante la contrazione. La determinazione della concentrazione del  $\text{NADH}_2$  in soluzione viene determinata fotometricamente sfruttando la capacità della molecola di assorbire la radiazione elettromagnetica ad una lunghezza d'onda di 340nm. Le misurazioni vengono effettuate utilizzando sia soluzioni a concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  massimali che soluzioni con concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  intermedie. Questo ci consente di rilevare la forza sviluppata e il consumo energetico (attività ATPasica) del campione a diverse concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### - Risultati

I dati preliminari fin'ora ottenuti sottolineano, negli R92Q, un aumento della  $\text{Ca}^{2+}$  sensibilità e un consumo energetico pari al controllo, confermando sia i dati riportati in letteratura (Chandra et al., 2001) che i risultati di precedenti studi condotti, su modelli murini, nel nostro laboratorio. Per le mutazioni E163R e delta160 vi è un aumento della  $\text{Ca}^{2+}$  sensibilità, mentre non ben chiari sono i dati sul consumo energetico. Questo per il numero ristretto di esperimenti condotti sin'ora.

Il nostro obiettivo quindi è quello di continuare ad indagare sulle disfunzioni elettromeccaniche ed energetiche alla base della Cardiomiopatia ipertrofica, per le mutazioni della Troponina T, incrementando il numero di esperimenti e continuando ad utilizzare la tecnica dello scambio di proteina.

#### Abstracts e partecipazione a congressi:

- Francesca Gentile, Raffaele Coppini, Cecilia Ferrantini, Luca Mazzoni, Manuel J Pioner, Benedetta Tosi, Beatrice Scellini, Alessandro Mugelli, Elisabetta Cerbai, Jill Tardif, Chiara Tesi, Corrado Poggesi. **Life-Long Treatment with Late Sodium Current Blocker Reduces Myocardial Dysfunction and Remodeling in a Mouse Model of Hypertrophic Cardiomyopathy.** Biophysical Society 59° annual meeting, Baltimore (7-11 Febbrario 2015).
- Raffaele Coppini, Cecilia Ferrantini, Francesca Gentile, Luca Mazzoni, Benedetta Tosi, Manuel J. Pioner, Beatrice Scellini, Nicoletta Piroddi, Jil C. Tardiff, Chiara Tesi, Elisabetta Cerbai, Corrado Poggesi. **Myocardial Dysfunction in Hypertrophic Cardiomyopathy: Primary Effects of Sarcomeric Mutations Versus Secondary EC-Coupling Remodelling.** Biophysical Society 59° annual meeting, Baltimore (7-11 Febbrario 2015)
- Cecilia Ferrantini, Raffaele Coppini, Manuel J. Pioner, Gentile Francesca, Tosi Benedetta, Luca Mazzoni, Luiz Belardinelli, Chiara Tesi, Elisabetta Cerbai, Alessandro Mugelli ,Corrado Poggesi. **Mechanical Effects of Late Na-Current Blockers in Human Hypertrophic Cardiomyopathy Myocardium.** Biophysical Society 59° annual meeting, Baltimore (7-11 Febbrario 2015)

- Josè Manuel Pioner, Francesca Gentile, Raffaele Coppini, Beatrice Scellini, Jil Tardiff, Chiara Tesi, Corrado Poggesi, Cecilia Ferrantini. **Mechanical remodeling of atrial myocardium in HCM mouse models carrying cTnT mutations.** Biophysical Society 60° annual meeting, Los Angeles (27febbraio-2Marzo 2016).

#### Pubblicazioni:

- Maraula G, Lana D, Coppi E, Gentile F, Mello T, Melani A, Galli A, Giovannini MG, Pedata F, Pugliese AM. **The selective antagonism of P2X7 and P2Y1 receptors prevents synaptic failure and affects cell proliferation induced by oxygen and glucose deprivation in rat dentate gyrus.** PLoS One, 2014 Dec 19;9(12):e115273. doi: 10.1371/journal.pone.0115273. eCollection 2014.

#### Soggiorni in altri laboratori italiani o esteri

Soggiorno di 6 mesi presso:

Dipartimento di Fisiologia Cellulare e Molecolare, Università di Loyola, Chicago (Illinois, USA). Supervisore: Prof. Pieter de Tombe.

