

**Attività scientifica svolta nel 1° anno di Dottorato, Anno Accademico
2017/2018**

Introduzione

La Cardiomiopatia Ipertrofica (CMI) è la più comune malattia ereditaria cardiaca ed è caratterizzata da un aumento dello spessore del ventricolo sinistro, insufficienza cardiaca, scompenso cardiaco e morte improvvisa. Questa patologia è solitamente associata a mutazioni a carico delle proteine del sarcomero, che possono causare sia alterazioni legate alla funzionalità del sarcomero che ad alterazioni nei meccanismi di regolazione. Il mio progetto di tesi è indirizzato allo studio della mutazione R92Q della Troponina T cardiaca (TNNT2), proteina del miofilamento sottile, che regola la contrazione muscolare. In particolare l'obiettivo di questo progetto di tesi è quello di valutare la possibilità di sviluppare un modello terapeutico di silenziamento allele-specifico mediante la tecnica dell'RNA interference con lo scopo di silenziare in modo selettivo l'allele mutato rispetto all'allele normale. Un secondo obiettivo del progetto è quello di valutare l'espressione e la localizzazione di proteine coinvolte nel meccanismo di rilascio di calcio in biopsie di pazienti affetti da scompenso cardiaco.

Metodiche utilizzate

La sequenza di cDNA della TNNT2 umana è stata clonata nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3 a partire da RNA totale estratto da cardiomiociti umani, retrotrascritto e amplificato mediante PCR utilizzando primers specifici. La mutazione R92Q corrispondente alla sostituzione aminoacidica dell'arginina in glutammina è stata inserita mediante mutagenesi sito-specifica. Per l'applicazione della metodica del silenziamento allele-specifico sono stati disegnati degli small interfering RNAs duplex (siRNA), tali da presentare la variazione nucleotidica corrispondente alla mutazione R92Q.

Per valutare l'espressione delle proteine coinvolte nel meccanismo di rilascio di calcio in biopsie di pazienti affetti da scompenso cardiaco è stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza con anticorpi specifici diretti contro la subunità alfa1C del recettore della diidropiridina, contro il recettore della rianodina e contro la proteina junctophilin 2.

Risultati ottenuti

L'espressione della proteina TNNT2 normale e mutata è stata verificata in seguito a trasfezione di cellule HEK293 e immunofluorescenza con anticorpi specifici.

E' stata messa a punto l'immunofluorescenza su biopsie di campioni di tessuto muscolare cardiaco di soggetti normali e pazienti affetti da scompenso cardiaco. In particolare, sono stati ottimizzati il metodo di taglio delle sezioni dei campioni biotici e la titolazione degli anticorpi.

- Conferenza sulla ricerca nelle Scienze della Vita in Toscana, Siena 14-15 Settembre 2018. Presentazione poster: "Ipertrofia ventricolare sinistra nella patologia vascolare aortica e nella cardiomiopatia ipertrofica: basi genetiche, correlate biofisici e modelli di terapia virale". N. Marchionni, P. Stefano, B. Alterini, A. Marchi, V. Scheggi, F. Barlocco, Katia Baldini, A. Tomberli, R. Zivoli, V. Sorrentino, D. Rossi, L. Migliore, S. Lorenzini, E. Pierantozzi, I. Olivetto