

# Progetto Pegaso Medicina Molecolare, MedMol

## Relazione annuale sulle attività formative frequentate, sulle attività di ricerca intraprese e sul grado di soddisfazione

### Di Lorenzo Santini

Durante il secondo anno del Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare ho effettuato studi sui meccanismi patogenetici alla base della disfunzione diastolica individuabile nella cardiomiopatia ipertrofica (HCM). La cardiomiopatia ipertrofica rappresenta una patologia monogenica ereditaria che può essere causata da più di 1400 mutazioni in 11 o più geni codificanti proteine del sarcomero cardiaco. I pazienti affetti da tale patologia mostrano un progressivo deterioramento delle funzioni cardiache ed un’evoluzione verso l’insufficienza cardiaca sistolica associata a gravi alterazioni della funzione diastolica. Tale condizione patologica, oltre che da una spiccata eterogeneità sul piano genetico, risulta caratterizzata anche da una notevole variabilità sia fenotipica che clinica. Infatti, in letteratura è possibile individuare numerosi casi di famiglie in cui membri diversi, affetti dalla medesima condizione patologica, mostravano un quadro clinico notevolmente diversificato. Nel laboratorio della Professoressa Elisabetta Cerbai, sotto la supervisione del Dottor Raffaele Coppini, abbiamo condotto un progetto il cui scopo era quello di valutare, in cardiomiociti murini, attraverso lo studio delle anomalie elettro-fisiologiche in essi riscontrati, se nella cardiomiopatia ipertrofica, l’efficacia di farmaci bloccanti della corrente Late al  $\text{Na}^+$ , che risulta essere incrementata nella HCM, come Ranolazina e GS967, possa essere in qualche modo influenzata dalla variabilità genetica che identifica la condizione patologica in esame. I risultati raccolti in un precedente lavoro (condotto su campioni umani, ottenuti da mieotomie di pazienti HCM operati ad uno stadio severo della patologia) del nostro gruppo di ricerca (Coppini et al., Circulation 2013) mostrano come Ranolazina fosse capace di migliorare la disfunzione elettro-meccanica riscontrabile nel miocardio di pazienti HCM. Nello specifico, Ranolazina risultava abile nel bloccare la corrente Late al  $\text{Na}^+$ , nell’accorciare la durata del potenziale d’azione cardiaco e nell’abolire le aritmie cellulari. Infine, tale farmaco accelerava la fase di rilassamento. A partire da questi dati, sono stati messi a punto 2 studi clinici in cui venivano testati Ranolazina ed Eleclazina (un farmaco molto simile a GS967) su pazienti affetti da HCM. In questi 2 studi, la selezione dei pazienti non è stata effettuata sulla base del genotipo. In questo anno, insieme al mio gruppo di ricerca, ho cercato di determinare se il diverso background genetico, nella HCM, può influenzare l’efficacia di Ranolazina e GS967. Infatti, la presenza di una specifica mutazione, potrebbe rendere un determinato paziente più o meno sensibile ad un dato trattamento farmacologico. A tale scopo, abbiamo messo a punto uno studio su 2 modelli murini transgenici di cardiomiopatia ipertrofica, chiamati rispettivamente R92Q e E163R (in collaborazione con Jil Tardiff, University of Arizona). I 2 modelli animali utilizzati sono caratterizzati da 2 diverse mutazioni a carico del gene codificante la Troponina T.

L'utilizzo di 2 diversi modelli murini ci consente di analizzare in maniera approfondita sia i meccanismi patogenetici alla base della patologia umana che l'effetto differenziale di mutazioni diverse. A tale scopo, mediante un apposito protocollo, abbiamo isolato cellule cardiomiocitarie a partire dai cuori murini, iniziando la procedura con una dissociazione enzimatica e proseguendo con una digestione meccanica; una volta ottenuti, abbiamo trattato i cardiomiociti con Ranolazina (10  $\mu$ M) ed Eleclazina (0,5  $\mu$ M), effettuando analisi sui transienti di  $Ca^{2+}$ , sul potenziale di membrana e sulla corrente Late al  $Na^+$ . Inoltre abbiamo valutato la capacità aritmogenica propria delle 2 mutazioni. I dati raccolti insieme al mio gruppo di ricerca mostrano che Ranolazina risulta capace, nel modello R92Q, di ridurre in maniera significativa l'entità della corrente Late al  $Na^+$ , promuovendo quindi una riduzione della concentrazione intracellulare di  $Na^+$  ed un accorciamento significativo della durata del potenziale d'azione. Questi effetti appena citati, richiamano quelli che Ranolazina risulta capace di mediare su campioni umani. Nello stesso modello sperimentale, Ranolazina risulta abile nell'accelerare le cinetiche dei transienti dello ione  $Ca^{2+}$ , a frequenze di stimolazione sia basali che più elevate. Abbiamo osservato un effetto simile sottoponendo il modello R92Q al trattamento con GS967. Inoltre, i dati da noi raccolti mostrano come i 2 bloccanti della corrente Late al  $Na^+$  possano ridurre in maniera significativa la concentrazione diastolica dello ione  $Ca^{2+}$ , che risultava incrementata in entrambi i modelli sperimentali da noi utilizzati. Le analisi condotte sull'altro modello sperimentale mostrano invece come né Ranolazina né GS967 possano accelerare le cinetiche dei transienti di  $Ca^{2+}$ ; dobbiamo però considerare che in questo modello sperimentale le cinetiche dei transienti di  $Ca^{2+}$  risultavano paragonabili a quelle proprie dei topi WT. Inoltre, nella mutazione E163R le 2 molecole da noi testate non hanno la capacità di ridurre la durata del potenziale d'azione cardiaco. Un'ulteriore osservazione effettuata da nostro gruppo di ricerca consiste nel fatto che, a differenza dell'altro modello utilizzato, Ranolazina e GS967 riducono la concentrazione del  $Ca^{2+}$  diastolico esclusivamente ad elevate frequenze di stimolazione. Relativamente ai fenomeni aritmogenici, abbiamo osservato che entrambi i modelli murini utilizzati presentano una spiccata attività aritmogenica, sia in termini di onde di  $Ca^{2+}$  premature che di transienti di  $Ca^{2+}$  spontanei. Per registrare l'attività arritmica spontanea, inizialmente stimoliamo le cellule ad elevate frequenze, successivamente interrompiamo la stimolazione e durante tale pausa iniziamo la registrazione degli eventi spontanei; la registrazione viene effettuata in condizioni basali ed in presenza di Isoproterenolo, uno stimolante beta-adrenergico che ha il compito di mimare una condizione di sforzo fisico. Le nostre analisi ci consentono di affermare che entrambi i bloccanti della corrente Late al  $Na^+$  sono abili nel ridurre in maniera significativa l'attività aritmogenica che caratterizza le 2 mutazioni. I dati precedentemente mostrati sono stati inseriti in una presentazione orale da me esposta lo scorso 4 Settembre al 40° incontro "EWGCCE", tenutosi presso l'università di Glasgow. L'insieme dei dati ottenuti, a cui ho contribuito in prima persona, ci consente di affermare che nel modello R92Q, così come nella HCM umana, gli effetti benefici di Ranolazina rappresentano la diretta conseguenza dell'inibizione della corrente Late al  $Na^+$ . Nel modello E163R invece, le alterazioni cardiache non risultano accompagnate da un rimodellamento delle correnti ioniche, ma appaiono piuttosto come una conseguenza diretta dell'incrementata sensibilità al  $Ca^{2+}$  dei miosillamenti o di anomalie a carico dei RyR2. Quanto appena affermato sembra dimostrare che i meccanismi patogenetici alla base dei 2 modelli animali sono sostanzialmente diversi: il

fenotipo è simile ma la base patogenetica varia. Durante il 2° anno del dottorato di ricerca ho anche iniziato a lavorare su IPSC-CMs; nello specifico, lo scopo del mio gruppo di ricerca è quello di effettuare una caratterizzazione elettro-fisiologica di cardiomiociti ottenuti a partire da IPSC di controllo. Si tratta di cardiomiociti di controllo su cui valutare i cambiamenti elettro-fisiologici che si realizzano con l'avanzare del processo maturativo. I IPSC-CMs vengono forniti al mio gruppo di ricerca da un'azienda, nello stato di congelamento. Una volta ricevute le vial contenenti i IPSC-CMs, procedo con lo scongelamento e la piastratura (circa 60.000 cellule per mL di soluzione). Una volta piastrate, i cardiomiociti vengono lasciati maturare e a step ben definiti (ogni 15 giorni ed ogni 30 giorni) effettuo valutazioni elettro-fisiologiche relative allo stato di maturazione cellulare. Nello specifico, utilizzando un colorante capace di legare il Calcio (Cal520), effettuo valutazioni sulle cinematiche dei transienti di calcio e sulla concentrazione diastolica del calcio stesso. I vari esperimenti realizzati a step maturativi successivi (fino a 100 giorni) ci hanno consentito di osservare come, con il procedere della maturazione, le cinematiche dei transienti di calcio vadano incontro a delle variazioni significative (aumento della durata del transiente, fase di salita più rapida, fase di discesa rallentata). La caratterizzazione elettro-fisiologica è stata realizzata anche mediante esperimenti di patch clamp, mediante i quali ho registrato il potenziale d'azione cellulare sotto diverse condizioni sperimentali. Tali esperimenti mi hanno consentito di osservare che la maturazione cellulare fa sì che il potenziale d'azione aumenti in durata, con una fase di discesa che si fa più graduale. Inoltre, il potenziale di riposo diventa più negativo con il procedere della maturazione. Sempre mediante esperimenti di patch clamp, ho osservato che la maturazione riduce l'attività spontanea dei cardiomiociti: lo step "day 60" mostra come l'attività spontanea dei cardiomiociti sia notevolmente inferiore rispetto a quella che si osserva allo step "day15". L'obiettivo per il 3° anno di Dottorato sarà quello di concludere i progetti avviati, partecipare a nuove iniziative e trascorrere un periodo di soggiorno all'estero (University of Glasgow), come previsto dal mio programma di Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare. Durante questo soggiorno, il mio obiettivo sarà quello di sviluppare nuove conoscenze teoriche e pratiche nell'ambito delle malattie cardiovascolari, con la speranza, una volta fatto ritorno a Firenze, di poter applicare quanto appreso agli studi condotti nel laboratorio fiorentino di Neurofarba.

Data 26/9/2017

Dottorando: Lorenzo Santini

Supervisore: Prof.ssa Elisabetta Cerbai