

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

di Giulia Vitale

Al termine del primo anno del Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare, che ho svolto 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, ho acquisito competenze teoriche e pratiche atte alla 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 ed i principali geni implicati sono quelli codificanti proteine sarcomeriche quali, ad esempio, la catena pesante della miosina, la proteina C legante la miosina (cMyBP-C) e proteine del filamento sottile, e proprio per questo definita come "malattia del sarcomero".

La CMI è una patologia che interessa prevalentemente il ventricolo sinistro, tuttavia anche gli atri risultano spesso coinvolti. La miopatia atriale, nella CMI, si manifesta con dilatazione atriale e propensione all'aritmogenesi (fibrillazione).

Le proteine sarcomeriche espresse a livello cardiaco presentano una significativa variabilità di espressione tra camere atriali e camere ventricolari. Per quanto riguarda la cMyBP-C e le proteine del filamento sottile non esistono significative differenze di espressione tra le diverse camere. Se la proteina espressa a livello atriale è interessata dalla mutazione (è questo il caso della cMyBP-C) si potrebbe ipotizzare che gli effetti di questa costituiscano il substrato per l'innescarsi del rimodellamento a cui l'atrio va incontro in corso di CMI.

Le mutazioni nel gene codificante per la proteina C legante la miosina, *MYBPC3*, risultano essere una delle cause più frequenti di cardiomiopatia ipertrofica (34%). Tra queste la mutazione missenso E258K, che determina la sostituzione di un residuo di acido glutammico con una lisina in posizione 258 della cMyBP-C, è altamente penetrante ed i soggetti portatori presentano spesso un fenotipo severo con una elevata incidenza di morte improvvisa. Tuttavia i meccanismi molecolari con cui questa mutazione induce il fenotipo patologico non sono ancora conosciuti.

Durante questo primo anno di dottorato ho effettuato esperimenti volti all'individuazione delle alterazioni dei determinanti sarcomerici di generazione della forza in campioni di tessuto cardiaco, sia atriale che ventricolare, isolato da pazienti affetti da CMI con mutazioni della cMyBP-C. Abbiamo confrontato questi risultati con quelli ottenuti su campioni provenienti da pazienti di controllo, ovvero soggetti andati incontro ad un intervento di cardiocirurgia valvolare (ipertrofia secondaria), soggetti HCM negativi per mutazioni in geni codificanti per proteine del sarcomero e donatori.

In particolare, l'obiettivo del lavoro svolto è stato, da una parte quello di studiare gli effetti della mutazione E258K sia sulla meccanica che sull'energetica del sarcomero e dall'altra, quello di vedere se questi effetti potessero essere gli stessi sul miocardio ventricolare e atriale.

Il nostro gruppo di lavoro impiega diversi metodi di indagine atti a comprendere gli alterati meccanismi molecolari alla base della CMI utilizzando vari preparati sperimentali: (i) preparati multicellulari intatti per misurazioni meccaniche, (ii) trabecole demembrate per misure energetiche e meccaniche, (iii) singole miofibrille per studi raffinati di meccanica del sarcomero, incluse le proprietà cinetiche di rilasciamento.

In particolare ho inizialmente svolto studi meccanici utilizzando come preparato sperimentale le miofibrille, la più piccola divisione dell'apparato contrattile intracellulare, isolate mediante omogeneizzazione di una piccola quantità di tessuto muscolare cardiaco demembrato.

La tecnica utilizzata consente di stabilire sia la tensione massima isometrica che le cinetiche di attivazione e di rilasciamento di singole miofibrille grazie ad un metodo di scambio rapido tra due soluzioni, escludendo tutti i meccanismi legati alla gestione del calcio intracellulare.

La procedura utilizzata per ottenere una sospensione di miofibrille da muscolo cardiaco prevede una prima fase in cui piccole strisce di miocardio (100-200 μm di lunghezza e 1-3 mm di lunghezza) vengono demembrate mediante trattamento con Triton- X100 (una notte con 0,5% Triton-X 100). Il preparato viene poi lavato dal Triton- X100 e successivamente omogeneizzato ottenendo piccolissimi fascetti di 2-4 miofibrille (diametro di 3-4 μm), la cui lunghezza è spesso inferiore a 100 μm . Le miofibrille vengono poi trasferite all'interno del set-up sperimentale ($T=15^{\circ}\text{C}$) e montate orizzontalmente (lunghezza iniziale del sarcomero 2.2-2.3 μm) tra due micropipette di vetro di cui, una funziona come trasduttore di forza e l'altra come motore.

Le miofibrille vengono attivate e rilasciate con un sistema di cambio rapido della soluzione di perfusione, infatti attraverso una pipetta a doppio lume, vengono mantenuti due flussi paralleli continui, uno di soluzione rilasciante ($\text{pCa}9$) e l'altro di soluzione attivante ($\text{pCa}3.5$).

Quando una miofibrilla, investita inizialmente da un flusso di soluzione rilasciante, viene repentinamente perfusa dalla soluzione attivante, raggiunge rapidamente il massimo livello di tensione che può sviluppare. La massima tensione isometrica sviluppata (mN/mm^2) viene calcolata come rapporto tra la massima forza sviluppata (mN) normalizzata per l'area della sezione trasversale della miofibrilla (mm^2).

L'andamento temporale dello sviluppo di forza fino al raggiungimento di un livello massimo è mono-esponenziale ed ha una costante apparente di velocità definita k_{ACT} , che riflette la velocità del turn over complessivo dei cross bridges.

Successivamente, la pipetta di perfusione investe nuovamente il preparato con il flusso di soluzione pCa 9; i livelli di calcio tornano così a valori sottomassimali, per cui la miofibrilla si rilascia. L'andamento temporale della caduta di forza avviene in due fasi: una prima fase lenta, isometrica e lineare caratterizzata da una costante di velocità apparente detta slow k_{REL} (s^{-1}), seguita da una seconda fase rapida di rilasciamento di tipo esponenziale caratterizzata da una costante detta fast k_{REL} (s^{-1}).

La slow k_{REL} rappresenta la velocità con cui le teste di miosina lasciano lo stato generante forza, mentre la fast k_{REL} dipende da tutta una serie di dinamiche intra e inter-sarcomeriche che risultano da un iniziale cedimento ("*give*") di uno o più sarcomeri.

I risultati ottenuti su miofibrille E258K, sia atriali che ventricolari, quando confrontate con miofibrille di controllo, mostrano: (i) riduzione della tensione attiva; (ii) aumento della velocità di turn over complessivo dei cross bridges (k_{ACT}); (iii) aumento della cinetica della fase isometrica del rilasciamento (slow k_{REL}).

L'incremento di slow k_{REL} suggerisce un più rapido distacco della miosina dall'actina e quindi un più rapido turnover dei cross bridge e un aumentato costo energetico della contrazione.

Durante questo primo anno di dottorato ho anche avuto modo di approcciare un'altra tecnica che consente la contemporanea misurazione di forza e attività ATPasica su preparati cardiaci demembrati, sfruttando un sistema enzimatico accoppiato e di rilevazione fotometrica. L'idrolisi dell'ATP ad ADP è legata all'ossidazione del NADH_2 a NAD^+ mediante reazioni catalizzate da due enzimi: Piruvato Chinasi e Lattato Deidrogenasi.

Il consumo energetico del preparato e quindi la quantità di ATP idrolizzato è direttamente proporzionale alla quantità di NADH_2 ossidato. La concentrazione di NADH_2 in soluzione viene quantificata grazie alla capacità della molecola di assorbire la radiazione elettromagnetica ad una lunghezza d'onda di 340 nm.

I risultati ottenuti con quest'ultima tecnica mostrano come il consumo energetico della contrazione o *tension cost* è circa 2-3 volte maggiore nei preparati E258K rispetto a quelli di controllo. Questi dati risultano essere in linea con l'incremento della velocità apparente della fase lenta di rilasciamento o slow k_{REL} osservato a livello delle miofibrille.

Concludendo, i risultati ottenuti finora indicano che la mutazione E258K determina sia alterazioni nelle cinetiche di interazione acto-miosinica sia nell'equilibrio energetico del sarcomero.

In vitro questi effetti cinetici ed energetici risultano essere simili sia nell'atrio che nel ventricolo. Tuttavia, il minore impatto della mutazione sulla funzione dell'atrio rispetto a quella del ventricolo sinistro, *in vivo*, potrebbe essere legato alle differenti condizioni di carico in cui le due camere lavorano.

Ho già presentato parte di questi dati all'11esimo "**Annual Meeting of Young Researchers in Physiology**" tenutosi a Firenze lo scorso 25 maggio 2017, con il titolo "*The impact of HCM-associated mutations on cardiac muscle phenotype depends on tissue loading conditions*".

Inoltre, il prossimo 17 febbraio a San Francisco si terrà il "**62nd Annual Meeting of the Biophysical Society**" in cui presenterò il lavoro dal titolo "*The missense E258K-MyBP-C mutation increases the energy cost of tension generation in both ventricular and atrial tissue from HCM patients*".

In fede,

Data 13/10/2017

Dottorando: Giulia Vitale

Supervisor: Prof. Corrado Poggesi