

Relazione annuale sulle attività formative frequentate e sulle attività di ricerca intraprese

Dott.ssa Giulia Vitale

Attività scientifica svolta nel 2° anno di Dottorato, Anno Accademico: 2017/2018

La cardiomiopatia ipertrofica è una patologia (CMI) 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.

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.

In particolare lo scorso anno ho 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 (mN/mm^2) che le cinetiche di attivazione (k_{ACT} (s^{-1})) e di rilasciamento (slow k_{REL} , (s^{-1}); fast k_{REL} (s^{-1})) di singole miofibrille grazie ad un metodo di scambio rapido tra due soluzioni, escludendo tutti i meccanismi legati alla gestione del calcio intracellulare.

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 secondo anno di dottorato mi sono quindi concentrata sullo studio dell’energetica di campioni cardiaci atriali e ventricolari provenienti da pazienti CMI con mutazione E258K.

Il campione viene omogeneizzato per ottenere piccoli fasci di muscolo, che vengono poi demembrati per mezzo di un detergente (Triton X-100). Successivamente si selezionano accuratamente i fascetti di muscolo per grandezza ottimale (~ 1.7 lunghezza x 0.2 spessore) e omogeneità di tessuto.

L’apparato sperimentale utilizzato consiste in una serie di 3 pozzetti di $80 \mu\text{l}$ l’uno, che vengono riempiti di soluzione rilasciante e preattivante, ed un pozzetto di $30 \mu\text{l}$ dove avviene la registrazione simultanea di forza e attività ATPasica. Alle due estremità della fibra demembrata o strip 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 strip 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 immergiamo il nostro preparato in una soluzione contenente 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 NADH_2 a NAD^+ mediante due reazioni catalizzate dagli enzimi Piruvato Chinasi (PK) e Lattato Deidrogenasi (LDH). La sequenza delle reazioni enzimatiche è bilanciata stechiometricamente, ossia l'idrolisi di 1 mole di ATP porta all'ossidazione di 1 mole di NADH_2 e quindi la determinazione nell'unità di tempo della quantità di 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 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 Ca^{2+} massimali che soluzioni con concentrazione di Ca^{2+} intermedie. Questo ci consente di rilevare la forza sviluppata e il consumo energetico (attività ATPasica) del campione a diverse concentrazioni di Ca^{2+} .

I risultati ottenuti con quest'ultima tecnica mostrano come il consumo energetico della contrazione o *tension cost* è maggiore nei preparati E258K, sia ventricolari che atriali, 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. Quindi i risultati finora ottenuti indicano che *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.

Infine per valutare se il disarray dei cardiomiociti, tipico della cardiomiopatia ipertrofica, potesse aver contribuito ad aumentare artificialmente il tension cost misurato nei preparati HCM, alcune delle strips utilizzate per le misurazioni meccaniche ed energetiche sono state sottoposte ad un protocollo di "clearing" e ad una marcatura indiretta con un anticorpo anti alpha-actinina al fine di effettuare un'analisi strutturale mesoscopica ad alta risoluzione con microscopia a fluorescenza non lineare. Utilizzando un avanzato metodo di clearing del tessuto in combinazione con la microscopia a due fotoni è stato possibile ricostruire un'immagine 3D di ciascuna strip di tessuto con una risoluzione spaziale sub micrometrica. Infine, è stata effettuata un'analisi cito-architettone tridimensionale (3D Fourier Transform) che sfruttando la periodica marcatura delle linee Z dei sarcomeri ci ha permesso di determinare l'orientamento dei cardiomiociti lungo ciascuna strip di tessuto. I dati statistici del disarray, sia locale che globale, sono stati correlati con i dati meccanici ed energetici. I risultati ottenuti non hanno evidenziato differenze strutturali tra i campioni di controllo e quelli mutati portando alla conclusione che, in primis, la mutazione E258K altera le cinetiche dei cross-bridges e l'energetica del sarcomero.

Il prossimo 2-6 Maggio 2019 a Baltimora si terrà il **"63nd Annual Meeting of the Biophysical Society"** in cui presenterò il lavoro dal titolo *"Advanced morpho-functional analysis on ventricular and atrial tissue reveals cross-bridge kinetics alterations and sarcomere energetic impairment in HCM patients"*.

Inoltre trascorrerò il terzo anno di dottorato nel laboratorio del Professor Henk Granzier, University of Arizona, Tucson (USA), dove mi concentrerò sullo studio di mutazioni di un'altra proteina sarcomerica, la titina, coinvolte nella patogenesi della cardiomiopatia dilatativa.

• **Abstracts e partecipazione a congressi e corsi: autori, titolo della presentazione, nome e date del congresso**

"Annual Meeting of Young Researchers in Physiology" *"The impact of HCM-associated mutations on cardiac muscle phenotype depends on tissue loading conditions"*. 25-27 Maggio 2017, Firenze

"62nd Annual Meeting of the Biophysical Society" *"The missense E258K-MyBP-C mutation increases the energy cost of tension generation in both ventricular and atrial tissue from HCM patients"* 17-21 Febbraio 2018, San Francisco.

"Annual Meeting of Young Researchers in Physiology" *"The missense E258K-MyBP-C mutation increases the energy cost of tension generation in both ventricular and atrial tissue from HCM patients"*. 3-5 Maggio 2018, Anacapri

“69 Congresso della Società Italiana di Fisiologia” *“The missense E258K-MyBP-C mutation increases the energy cost of tension generation in both ventricular and atrial tissue from HCM patients”*. 19-21 Settembre 2018, Firenze

In fede,

Data 11/10/2018

Dottorando: Giulia Vitale

Supervisor: Prof. Corrado Poggesi