

PROGETTO DI RICERCA A VALERE SU Fondi:

Piano di Sostegno alla Ricerca (PSR) 2019 : F-AdR

TITOLO: Aritmie cardiache congenite: Next Generation Sequencing e caratterizzazione funzionale di nuove mutazioni.

DURATA: 12 mesi.

STRUTTURE: Presso i laboratori di UNISI - DMMS in via Aldo Moro 2, 53100 Siena (Prof. Sorrentino).

COORDINATORE SCIENTIFICO: Prof. Vincenzo Sorrentino, DMMS, Università di Siena.

Aritmie cardiache congenite: Next Generation Sequencing e caratterizzazione funzionale di nuove mutazioni.

introduzione

Le aritmie congenite sono una causa importante di morte improvvisa, clinicamente definita come un evento imprevisto che si verifica in individui apparentemente sani, soprattutto nei giovani. Esse sono collegate a cardiomiopatie in cui mutazioni in geni che codificano proteine sarcomeriche o citoscheletriche inducono anomalie strutturali del muscolo cardiaco (cardiomiopatia ipertrofica, dilatativa o aritmogenica), o a canalopatie, dovute a mutazioni in geni che codificano per canali ionici o proteine regolatrici, usualmente non associate a cambiamenti strutturali nel cuore.

Lo screening genetico ha rivelato che molte aritmie congenite sono di solito monogeniche. Tuttavia, nonostante lo sviluppo di nuove tecniche di sequenziamento, ancora oggi, a seconda del sottotipo di malattia, dal 15 al 75% dei pazienti rimane ancora senza una diagnosi genetica. Inoltre, sia l'elevata variabilità e che la penetranza incompleta osservate in queste malattie suggeriscono che altri fattori genetici o non genetici possono influenzare il fenotipo clinico. A tale riguardo è stato recentemente dimostrato che l'associazione con varianti in geni diversi da quelli attualmente identificati come causativi può influenzare la manifestazione della malattia .

Le aritmie genetiche includono la sindrome del QT lungo (LQTS), la sindrome del QT breve (SQTS), la tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPTV), la sindrome di Brugada (Br) e la fibrillazione ventricolare idiopatica (IVF).

Attività di ricerca

Il miglioramento dei test genetici predittivi per le sindromi aritmiche ereditarie può potenziare gli strumenti di diagnosi e gestione dei pazienti e dei loro familiari per prevenire l'insorgenza di arresto cardiaco, specialmente nei giovani. Sono stati identificati molti geni associati ad aritmie cardiache congenite. Tuttavia, la maggior parte dei casi rimane ancora senza una diagnosi genetica. Lo sviluppo della metodologia NGS ha aperto nuove possibilità nella rapida e accurata identificazione di nuove varianti genetiche in una grande percentuale di pazienti. Inoltre, la definizione del background genetico dei singoli pazienti unitamente alla caratterizzazione funzionale delle mutazioni identificate può aiutare a gettare luce sulla variabilità e penetranza incompleta osservata in queste malattie, ponendo le basi per interventi terapeutici mirati.

Dati preliminari

Recentemente il gruppo del proponente ha identificato una nuova mutazione in triadina TRDN in un paziente affetto da una forma grave di aritmia cardiaca con frequente fibrillazione ventricolare e prolungamento dell'intervallo QT. TRDN è una proteina transmembrana che, attraverso il suo legame con calsequestrina e RyR, contribuisce alla regolazione del meccanismo di accoppiamento eccitazione-contrazione (35). Mutazioni in TRDN sono state identificate in pazienti affetti da una forma di aritmia cardiaca il cui fenotipo si sovrappone ai tratti tipici della sindrome del QT lungo, tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPVT) e cardiomiopatia ventricolare destra aritmogena (36). Poiché tutte le mutazioni identificate finora in TRDN determinano l'assenza di espressione della proteina, la malattia cardiaca associata a TRDN viene spesso definita "sindrome da triadina-knockout". È interessante notare che studi preliminari eseguiti nelle cellule HEK293T hanno rivelato che, a differenza di tutte le altre mutazioni in TRDN identificate finora, la nuova mutazione in TRDN non influisce sull'espressione, ma altera la mobilità della proteina nelle membrane del reticolo endoplasmatico e il rilascio di Ca^{2+} indotto dai canali RyR2.

Obiettivo specifico 1: screening genetico mediante NGS per identificare nuove mutazioni in pazienti affetti da sindromi aritmiche ereditarie. Per identificare nuove varianti geniche verranno applicate la metodologia NGS.

Obiettivo specifico 2: espressione e caratterizzazione di nuove mutazioni causative di aritmie genetiche

In base ai risultati ottenuti nell'ambito dell'obiettivo 2, le nuove varianti geniche identificate saranno caratterizzate, in primo luogo, mediante analisi preliminare in silico. Le varianti più significative saranno quindi caratterizzate mediante studi funzionali e biochimici basati sull'espressione delle proteine mutate in cardiomiociti.

Quando disponibili, in collaborazione con il Prof. Maurilio Sampaolesi dell'Università di Leuven, Belgio, verranno generate e caratterizzate le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) di pazienti affetti da sindromi aritmiche ereditarie. La disponibilità di queste cellule ne permetterà l'utilizzo come modello di malattia.

Ruolo specifico dell'assegnista di ricerca nel progetto di ricerca.

l'assegnista di ricerca per il quale viene presentata questa proposta di finanziamento

All'interno di questo progetto, svolto insieme al gruppo di lavoro del coordinatore della ricerca, l'assegnista parteciperà alla fase di screening NGS del DNA di pazienti affetti da sindromi aritmiche ereditarie e parteciperà alla caratterizzazione funzionale delle mutazioni mediante espressione delle proteine in cellule in coltura e, quando disponibili, in cellule iPS.

STRUMENTI E ATTREZZATURE: Stanze e dotazioni per la stabulazione e l'allevamento degli animali sono disponibili presso i preposti locali di UNISI. Tutte le strumentazioni necessarie allo sviluppo del progetto sono disponibili nei laboratori del Prof. Sorrentino presso il Dipartimento di Medicina Molecolare e dello Sviluppo.