



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Rendiconto 5 per mille ANNO 2020

Contributo percepito € 361.304,38

In data 26.10.2021

Ente della Ricerca Sanitaria

Denominazione Ente:

FONDAZIONE IRCCS CA’ GRANDA OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Codice fiscale: **04724150968**

Sede legale: **Via Francesco Sforza 28 - 20122 MILANO**

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: **protocollo@policlinico.mi.it**

Dati del rappresentante legale: **Dott. Ezio Belleri ***

Titolo del progetto:

LA DISFUNZIONE MITOCONDRIALE IN PAZIENTI AFFETTI DA STEATOEPATITE NON ALCOLICA (NASH): DA UN APPROCCIO “ONE-SIZE-FITS-ALL” AD UNA TERAPIA PERSONALIZZATA

Resp. Scientifico: Dott.ssa Paola Dongiovanni

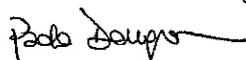
Data di inizio progetto: 01.10.2022	Data di fine progetto: 30.11.2024
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 50.000,00	Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): €

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borse di studio)		
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		€ 10.000,00
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)		€ 40.000,00
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)		

Elaborazione dati		
Spese amministrative		
Altro (indicare quali)		
TOTALE		€ 50.000,00

Il Responsabile del Progetto

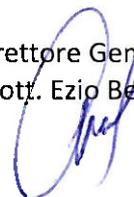
Dott.ssa Paola Dongiovanni



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Direttore Generale *

Dott. Ezio Belleri



Il Direttore Generale*

Dott. Ezio Belleri



* (per conto del Legale Rappresentante Arch. Marco Giachetti - Deliberazione Consiliare n. 21 del 30.4.2019

Titolo	LA DISFUNZIONE MITOCONDRIALE IN PAZIENTI AFFETTI DA STEATOEPATITE NON ALCOLICA (NASH): DA UN APPROCCIO "ONE-SIZE-FITS-ALL" AD UNA TERAPIA PERSONALIZZATA
Background e razionale	<p>La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) è la principale causa di malattia epatica cronica con una prevalenza globale stimata del 25%. È considerata la manifestazione epatica della sindrome metabolica (MetS) ed è strettamente correlata ad obesità e diabete di tipo 2 (T2D). Essa comprende un ampio spettro di condizioni patologiche che vanno dalla semplice steatosi (infiltrazione di trigliceridi (TG) in >5% degli epatociti) alla steatoepatite non alcolica (NASH) che è la sua forma infiammatoria, alla fibrosi, alla cirrosi e al carcinoma epatocellulare (HCC) (Younossi ZM et al, JHEP Rep 2021). Negli ultimi anni, l'aumento della MetS insieme alla riduzione dei casi di epatiti virali dovuta alla vaccinazione HBV e alle terapie antivirali per il trattamento dell'HCV, hanno contribuito a far diventare la NAFLD/NASH una delle principali cause di HCC nei paesi occidentali.</p> <p>La NAFLD ha una forte componente ereditaria e le varianti genetiche coinvolte nel rimodellamento e nella secrezione dei lipidi sono state associate alla sua patogenesi (Meroni M et al, Biomedicines 2021). Il polimorfismo (SNP) rs738409 C>G nel gene <i>Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3)</i> che codifica per la variante I148M, e che riduce la sua attività enzimatica verso i glicerolipidi favorendo così l'accumulo di TG negli epatociti, è stato associato all'intero spettro della NAFLD. Analogamente alla mutazione PNPLA3 I148M, la variante rs641738 C>T nel locus <i>Membrane bound o-acyltransferase domain-containing 7 – Transmembrane channel-like 4 (MBOAT7-TMC4)</i> è stata associata a NAFLD fino a HCC (Mancina R, Dongiovanni P et al, Gastroenterology 2016). Infine, è stato dimostrato che la variante rs58542926 C>T nel gene <i>Transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2)</i>, che codifica per la sostituzione amminoacidica E167K, è stata associata a steatosi epatica e ad aumentato rischio di NASH e fibrosi (Dongiovanni P et al, Hepatology 2015). In particolare, il numero crescente di varianti di rischio <i>PNPLA3</i>, <i>TM6SF2</i> e <i>MBOAT7</i>, tutte coinvolte nel rimodellamento dei lipidi e nella secrezione di lipoproteine, ha predetto in modo significativo il rischio di NAFLD severa, indipendentemente da altri fattori clinici suggerendone l'uso come biomarcatori non invasivi per costruire uno score di rischio personalizzato. Pertanto, le terapie in pazienti con NAFLD potrebbero essere adattate al rischio individuale, piuttosto che attuare un approccio di sorveglianza "one-size-fits-all".</p> <p>E' stato dimostrato che i mitocondri giocano un ruolo chiave nella progressione da steatosi a malattia più severa. Nei pazienti con NAFLD e NASH sono stati descritti un aumento della massa e della biogenesi mitocondriale nel fegato (Longo M et al, Metabolism 2021). Questi dati supportano la teoria secondo cui i mitocondri sono altamente adattativi e modulano il loro numero e la loro attività in presenza di un eccesso di substrato. Nelle prime fasi della NAFLD, l'attività mitocondriale aumenta in risposta all'insulino-resistenza epatica e all'accumulo di acidi grassi liberi (FFA). Al contrario, modelli preclinici e pazienti affetti da NASH presentano una chetogenesi ed una respirazione ridotte, un disaccoppiamento mitocondriale e un'iperattività del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) per compensare la domanda di energia. L'aumentato flusso ossidativo mitocondriale comporta un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) associate ad alterazioni del DNA mitocondriale (mtDNA), stress del reticolo endoplasmico (ER), infiammazione tissutale e morte cellulare che possono contribuire a generare il microambiente circostante che influenza la progressione della NAFLD verso un danno epatico avanzato.</p>

	<p>Dati preliminari del nostro laboratorio hanno dimostrato che il knockout (KO) dei geni <i>MBOAT7</i> e <i>TM6SF2</i> in cellule HepG2 (omozigoti per la variante PNPLA3 I148M) determina un accumulo di lipidi intracellulari, con uno shift da acidi grassi insaturi a saturi (FA), un aumento del numero di mitocondri alterati e un maggiore stress ossidativo. Inoltre, il silenziamento di <i>MBOAT7</i> e <i>TM6SF2</i> ha compromesso l'attività mitocondriale con uno spostamento verso la glicolisi anaerobica, un aumento del rilascio di lattato e dei livelli di LDH, mimando così l'effetto Warburg (Longo M et al, CMGH 2022).</p> <p>In un'ampia coorte di pazienti affetti da NAFLD abbiamo inoltre riscontrato che la compresenza delle 3 varianti di rischio era associata all'intero spettro della NAFLD fino alla cirrosi e HCC, ad alterazioni della morfologia dei mitocondri e ad un aumento delle copie circolanti di D-loop, i cui livelli possono riflettere il numero di mitocondri (Longo M et al, CMGH 2022).</p> <p>Infine, l'analisi del trascrittoma epatico nei pazienti con NAFLD ha rivelato una deregolazione dei complessi della catena respiratoria nei soggetti con malattia avanzata.</p> <p>In sintesi, data la crescente prevalenza della NASH anche in assenza di fibrosi avanzata, esiste la necessità di identificare nuovi biomarcatori e strumenti di stratificazione dei pazienti a rischio che migliorino lo screening e contribuiscano all'introduzione di trattamenti personalizzati.</p> <p>Pertanto, l'obiettivo di questo progetto è quello di valutare se le varianti genetiche precedentemente associate all'intero spettro della NAFLD possano avere un impatto sulla morfologia e sulla funzione mitocondriale in pazienti con NASH e HCC NASH-correlato.</p>
<p>Obiettivi</p>	<p>Obiettivo 1.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Valutare il DNA mitocondriale circolante (ccf-mtDNA) in pazienti affetti da NAFLD e stratificati in base alla severità del danno epatico e alla presenza delle varianti PNPLA3 I148M, TM6SF2 E167K e MBOAT7 rs641738. <p>Recentemente, la scoperta del ccf-mtDNA nel siero di pazienti oncologici ha attirato grande attenzione al fine di poterlo sfruttare a scopo diagnostico. Poiché non esistono strategie efficaci per la diagnosi precoce della NASH e del carcinoma epatocellulare ad essa correlato, l'individuazione di biomarcatori basati sull'mtDNA potrebbe consentire la diagnosi precoce della malattia epatica. Inoltre, la valutazione del ccf-mtDNA circolante rilasciato dalle cellule in condizioni di danno, fornirebbe uno strumento di diagnosi non invasiva in pazienti con malattia epatica più severa. A tale scopo, isoleremo il ccf-mtDNA totale da sieri già disponibili di pazienti con NAFLD (N=500), di cui n=50 affetti da HCC, stratificati in base alla gravità del danno epatico e alla presenza delle 3 varianti di rischio e arruolati presso il servizio ambulatoriale di malattie metaboliche del fegato. Inoltre, il ccf-mtDNA verrà isolato da una coorte di pazienti bariatrici con NAFLD (n=185) stratificati in base alla gravità della malattia, di cui sono disponibili dati di RNAseq sia del tessuto epatico che adiposo.</p> <p>Il ccf-mtDNA verrà isolato da 1 ml di siero utilizzando il kit ChargeSwitch gDNA Serum Kit (ThermoFisher Scientific). Il numero di copie del mtDNA circolante sarà quantificato utilizzando la quantitative-Real Time PCR (qRT-PCR) mediante amplificazione dei geni MT-ND1 e MT-COX3. I livelli di ccf-mtDNA saranno quindi correlati con i dati clinici, istologici, genetici e trascrittomici quando disponibili.</p>

Inoltre, per verificare la possibilità che la quantificazione del numero di copie di ccf-mtDNA nel siero possa essere utile per identificare precocemente l'HCC nei pazienti con NASH, eseguiremo la costruzione di curve ROC.

Obiettivo 2.

- **Esplorare la funzionalità mitocondriale e i livelli di mtDNA in biopsie epatiche congelate di pazienti con NAFLD stratificati in base alla gravità del danno epatico e alla presenza di varianti genetiche PNPLA3 I148M, TM6SF2 E167K e MBOAT7 rs641738.**

I campioni biopsici epatici congelati o inclusi in paraffina per la valutazione istologica sono già disponibili per un'ampia coorte di pazienti con NAFLD (N=500) nei sieri dei quali misureremo il ccf-mtDNA. Sulle biopsie epatiche congelate valuteremo il mtDNA (attraverso la quantificazione del numero di copie del frammento non codificante D-loop), i complessi OXPHOS (I, III, IV) e il dinamismo mitocondriale (fissione e fusione).

L'mtDNA verrà isolato dal tessuto epatico utilizzando il kit di purificazione del DNA genomico PureLink™ Pro 96 (ThermoFisher Scientific) e l'mtDNA sarà amplificato mediante qRT-PCR. L'OXPHOS e il dinamismo mitocondriale saranno analizzati tramite la valutazione dell'espressione di geni e proteine coinvolte nell'assemblaggio dei complessi della catena respiratoria mitocondriale, nella fissione (FIS1, MFF, INF2, DNMI1 e MIEF1), nella fusione (MFN1, MFN2 e OPA1) e nella mitofagia (PINK1, Parkin). La localizzazione lobulare di specifici marcatori di mitobiogenesi e mitofagia sarà valutata mediante immunisto chimica in biopsie incluse in paraffina.

Obiettivo 3.

- **Valutare l'impatto del milieu epatico sullo sviluppo di HCC, tramite esecuzione del sequenziamento di RNA a singola cellula (scRNA-seq) sulle resezioni epatiche di pazienti affetti da NASH-HCC.**

Dal momento che l'attivazione delle cellule non parenchimali (NPC; cellule di Kupffer, cellule stellate epatiche, cellule dendritiche, cellule sinusoidali epatiche, cellule immunitarie) accelera ulteriormente la progressione della malattia e l'insorgenza di tumore, eseguiremo una analisi trascrittomica su singole cellule isolate (scRNA-seq) al fine di individuare il ruolo degli epatociti e delle cellule NPC in tessuti intra (n=6) ed extra (n=6) neoplastici ottenuti da fegati espantati o resecati da pazienti affetti da HCC correlato a NASH. Questo approccio ci permetterà di valutare se la disfunzione mitocondriale negli epatociti, osservata nei portatori delle 3 varianti di rischio, possa avere un impatto sulle cellule NPC circostanti o se anche quest'ultime mostrino una de-regolazione dei complessi OXPHOS ed uno shift verso la glicolisi anaerobica.

Tutti i campioni che rientreranno nello studio saranno selezionati poiché negativi per l'antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg) e per l'RNA del virus dell'epatite C (HCV). Saranno inclusi in questo studio campioni provenienti da donatori di tutte le età con steatosi e grado di fibrosi variabili.

I tessuti epatici saranno conservati a 4°C e processati entro 3 ore dalla resezione. Le cellule epatiche saranno isolate seguendo un protocollo di digestione a due fasi con EDTA e collagenasi. Le cellule singole vitali verranno caricate sullo strumento Chromium Single Cell (10x Genomics). Le librerie per il sequenziamento verranno preparate utilizzando il protocollo del Chromium Single Cell Library Construction kit (10x Genomics). Il sequenziamento verrà eseguito tramite piattaforma NextSeq 2000 in modalità paired-end.

Calcolo della numerosità campionaria

Per tutti i pazienti verranno raccolti dati clinici, caratteristiche demografiche, antropometriche, parametri biochimici e genetici. In tutti i pazienti arruolati per sospetta NASH è stata eseguita una biopsia epatica ecoguidata e la severità della malattia è stata valutata secondo il NAFLD activity score (NAS), mentre la fibrosi è stata stadiata secondo la NAFLD Clinical Research Network (Kleiner DE et al, Hepatology 2005). La NASH è stata diagnosticata in presenza di steatosi, infiammazione lobulare e ballooning. Il consenso informato è stato ottenuto da ogni paziente secondo le regole legali ed etiche stabilite dal Comitato Etico della Fondazione IRCCS Cà Granda.

La genotipizzazione delle varianti genetiche è stata effettuata mediante saggi Taqman. I livelli di Ccf-mtDNA e di mtDNA epatico da campioni congelati saranno valutati in 500 pazienti con NAFLD di cui sono già disponibili campioni di siero e DNA. Questo numero di casi ci permetterà di osservare una differenza di 2 volte tra i pazienti non NASH (n=350) e NASH (n=150) con una potenza statistica >80% e un α -errore=0,05.

Il numero di campioni inclusi nell'analisi scRNA-seq è stato stabilito considerando che la percentuale di pazienti con HCC portatori delle 3 mutazioni è dell'11,5% rispetto al 6% di quelli senza tumore. Pertanto, ci aspettiamo di trovare un arricchimento di pazienti portatori delle 3 varianti di rischio tra i soggetti che saranno sottoposti a trapianto di fegato. Inoltre, per eseguire un'analisi comparativa tra i campioni intra ed extra tumorali, abbineremo i pazienti con 2-3 varianti a rischio a quelli con 0-1 mutazioni.

Valutazione statistica

L'associazione tra mtDNA circolante/epatico, parametri biochimici e danno epatico nei pazienti con NAFLD, stratificati in base alla presenza delle varianti PNPLA3 I148M, TM6SF2 E167K e MBOAT7 rs641738, sarà studiata mediante ANOVA a due vie o χ^2 test, ove appropriato (JMP 16.0). I modelli lineari generali saranno applicati per esaminare i tratti continui, mentre i modelli di regressione logistica e ordinale per esaminare i tratti binari o ordinali. Le correlazioni saranno valutate mediante analisi bivariate o multivariate, dopo l'aggiustamento per i fattori confondenti. I valori di $P < 0,05$ saranno considerati statisticamente significativi. La sensibilità e la specificità con gli intervalli di confidenza al 95% saranno calcolate per diversi livelli di cut-off di ccf-mtDNA, che saranno tracciati sulle curve ROC.