



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità 1 (A01)

Rendiconto 5 per mille ANNO 2022
Contributo percepito € 356.927,17 In data 24.10.2023

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: NUOVI APPROCCI DI PROTEOMICA SPAZIALE NEL TRAPIANTO

Data di inizio progetto: 01.01.2024	Data di fine progetto: 31.12.2025
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 178.463,59	Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): € 178.463,59

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca	€ 30.000,00	€ 30.000,00
Materiale d’uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	€ 133.463,59	€ 133.463,59
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	€ 15.000,00	€ 15.000,00
Elaborazione dati	€ 0,00	€ 0,00
Spese amministrative	€ 0,00	€ 0,00
Altro (indicare quali)	€ 0,00	€ 0,00
TOTALE	€ 178.463,59	€ 178.463,59

Descrizione - Background del progetto e obiettivi principali della ricerca

Il trapianto è la migliore terapia sostitutiva nella insufficienza d'organo, ma il principale limite è la sopravvivenza del graft a lungo termine minata da meccanismi immunitari e farmaco-correlati che inducono alterazioni infiammatorie e fibrotiche (p.e. inflammaging). La comprensione dei meccanismi di disfunzione del graft è ancora oggi incompleta a causa della conoscenza limitata dei meccanismi eziopatogenetici, sebbene le informazioni fornite dai campioni istologici sia in continuo miglioramento. Inoltre, la difficoltà di applicare le recenti tecnologie "OMICHE" è spesso causata dalla scarsa quantità e qualità dei tessuti disponibili.

I sistemi biologici ed i processi cellulari sono intrinsecamente complessi a causa dell'interazione di migliaia di proteine coinvolte nel corretto funzionamento del graft. Quindi, un'analisi approfondita di questi sistemi richiederebbe un esame simultaneo di una pletera di parametri utili per decifrarne i principi di funzionamento fisiologico e patologico. Nel presente progetto utilizzeremo la tecnologia MACSima Imaging Cyclic staining (MICS) per generare "un atlante proteomico spaziale" in ambito trapiantologico. La MICS è un sistema innovativo che consente l'analisi simultanea di centinaia di marcatori su un singolo campione permettendo di localizzare mediante microscopia a fluorescenza le proteine, valutarne l'espressione quantitativa e la possibile interazione sfruttando appieno le potenzialità della "spatial biology".

In particolare, la tecnologia sarà utilizzata per i seguenti obiettivi:

- Scoprire potenziali meccanismi intracellulari alla base della progressione del danno nel graft
- descrivere una panoramica completa di possibili interazioni molecolari
- fornire una lista di possibili biomarkers con ruoli prognostici di danno (p.e. rigetto d'organo) offrendo il vantaggio di una diagnosi e di un trattamento preventivo
- studiare l'interazione tra cellule residenti e cellule infiltranti il graft con caratterizzazione del fenotipo

Materiali (descrizione dettagliata dei reagenti e delle apparecchiature necessarie per l'esecuzione del progetto)

MACSima Sample preparation

- For frozen samples: acetone, isopentane, cryomold, inclusion reagent (OCT), Cryostat, and dedicated blades and slides or paraffin-embedded sample tissue: paraformaldehyde, alcohol, xylene, inclusion reagent (paraffin), mold, microtomes, and dedicated blades

MACSimaTM Proteomics analysis

1. Instrument: MACSimaTM Imaging System
2. MACSimaTM Starter Kit: MACSima 4k Monitor - MACSima Table - MACSima Buffers - MACSwell Deepwell Plates - MACSwell Four - MACS iQ View Permanent License.
3. MACS iQ View Annual License Academia
4. MACSima reagent for 20 markers panel of validated antibody (FITC, PE, APC, REA_{dye_lease})
- Sample dimension-depending: MACS well One frame (4.7x1.7 cm), Two frames (2.1x1.7cm) or Four frames (0.8 x 1.7 cm)
- 3x Buffers
- Disposables: MACS well sample frames, Deepwell antibodies plates, Aluminium sealing foils
4. Macsima single recombinant antibodies (FITC, PE, APC, REA_{dye_lease})
5. Device for secure Data management

Risultati e prodotti conseguiti

- 1) Sono stati prodotti dati, oggetto di pubblicazione su giornali internazionali con elevato IF, sulle complicanze del trapianto di cellule, tessuti ed organi che impattano sulla QOL dei pazienti
- 2) Una discreta quota delle pubblicazioni del 2022 ha avuto come oggetto le principali complicanze legate al trapianto, con studi osservazionali
- 3) Negli anni precedenti sono stati prodotti dati, oggetto di pubblicazione su giornali con elevato IF, sulla recidiva di alcune patologie dopo trapianto
- 4) Negli anni precedenti sono stati prodotti dati, oggetto di pubblicazione su giornali con elevato IF, sull'evoluzione nei pazienti trapiantati di alcune complicanze maggiori (immunologiche, metaboliche, infettive, neoplastiche, cardiovascolari etc.)
- 5) Sono stati prodotti dati sperimentali, oggetto di pubblicazione su giornali con elevato IF, sui meccanismi patogenetici delle principali complicanze sull'impatto della fragilità nel paziente Trapiantato

Attività previste (metodi-trasferibilità)

Con un approccio di “Spatial Proteomic” si cercherà di rivelare la complessa architettura cellulare all'interno sia dei parenchimi in studio che delle cellule isolate dai fluidi biologici (p.e. urine o liquido di lavaggio bronchiale), ed in particolare:

- variazioni proteiche nelle singole cellule;
- traslocazioni dinamiche di proteine;
- modifiche nelle reti di interazione proteiche;
- localizzazione di proteine all'interno di sub-compartimenti cellulari.

Infatti, la localizzazione subcellulare delle proteine è strettamente controllata e intimamente legata alla funzione proteica. Catturare il proteoma spaziale - cioè le localizzazioni delle proteine e la loro dinamica a livello subcellulare - è quindi essenziale per una comprensione completa della biologia cellulare.

Un ulteriore beneficio che lo strumento garantirebbe ai nostri ricercatori è legato al fatto di essere un sistema “completo”. Si potrà ottenere il dato senza dover aggiungere sistemi complementari né nella fase di preparazione (nessuna purificazione di target-sonda, nessun materiale aggiuntivo ad eccezione degli anticorpi) né in quella di gestione ed analisi dei dati (non richiederà costi aggiuntivi per l'intervento di bioinformatici per l'analisi dei dati).

In definitiva, l'analisi di proteomica spaziale sarà condotta su:

- Materiale biotico proveniente da organi trapiantati (rene, fegato e polmone)
- Cellule isolate da liquidi biologici (p.e. sedimento urinario)
- Materiale proveniente da modelli pre-clinici (p.e. ratto, maiale etc):
 - Modelli di danno da ischemia/riperfusion (rene, fegato e polmone)
 - Modelli di trapianto
- Cellule provenienti da organi sottoposti a “machine perfusion” sia in modelli pre-clinici che da pazienti trapiantati

Altre strutture della Fondazione IRCCS eventualmente coinvolte:

Anatomia Patologica; Endocrinologia; Nefrologia Pediatrica; Anestesia e Rianimazione; Gastroenterologia; Pneumologia

Altri Enti eventualmente coinvolti: Nessuno

Classificazioni IRG-SS:

Es. Digestive, Kidney and Urological System; SS: pathobiology of kidney disease; CVRS-LCMI; SBIB-SAT

Project Background (versione inglese)

Transplantation is the best replacement therapy for organ failure, but the long-term graft survival is primarily hampered by immune and drug-related mechanisms that induce inflammatory and fibrotic alterations (e.g., inflammaging). The understanding of graft dysfunction mechanisms is still incomplete today due to limited knowledge of the etiopathogenetic mechanisms, although information provided by histological samples is continually improving. Furthermore, the difficulty of applying recent "OMICS" technologies is often due to the scarce quantity and quality of available tissues.

Biological systems and cellular processes are inherently complex due to the interaction of thousands of proteins involved in the proper functioning of the graft. Therefore, a comprehensive analysis of these systems would require a simultaneous examination of a plethora of parameters useful for deciphering the principles of both physiological and pathological functioning. In this project, we will use the MACSima Imaging Cyclic Staining (MICS) technology to generate a "spatial proteomic atlas" in the field of transplantation. MICS is an innovative system that allows the simultaneous analysis of hundreds of markers on a single sample, enabling the localization of proteins through fluorescence microscopy, quantitative expression evaluation, and potential interaction assessment, fully harnessing the potential of "spatial biology".

Hypothesis and Significance

Using a "Spatial Proteomic" approach, we aim to unveil the complex cellular architecture within both the parenchyma and cells isolated from biological fluids (e.g., urine or bronchial lavage fluid), and in particular:

- Protein variations within individual cells
- Dynamic protein translocations
- Changes in protein interaction networks
- Protein localization within subcellular compartments

Indeed, the subcellular localization of proteins is tightly regulated and intimately linked to their protein function. Capturing the spatial proteome—i.e., protein localizations and their dynamics at the subcellular level—is therefore essential for a comprehensive understanding of cellular biology. An additional benefit that this tool would provide to our researchers is its status as a "comprehensive" system. Data can be obtained without the need for additional complementary systems, neither in the preparation phase (no purification of target probes, no additional materials except for antibodies) nor in the management and data analysis phase (it will not require additional costs for bioinformatic analysis).

In summary, spatial proteomic analysis will be conducted on:

- Biopsied material from transplanted organs (kidney, liver, and lung).
- Cells isolated from biological fluids (e.g., urinary sediment).
- Material from preclinical models (e.g., rats, pigs, etc.):
 - Models of ischemia/reperfusion injury (kidney, liver, and lung)
 - Transplantation models.
- Cells from organs subjected to "machine perfusion," both in preclinical models and from transplanted patients.

Specific Aims (versione inglese)

In particular, the technology will be used for the following objectives:

- Discover potential intracellular mechanisms underlying graft damage progression
- Describe a comprehensive overview of possible molecular interactions
- Provide a list of potential biomarkers with prognostic roles in graft damage (e.g., organ rejection), offering the advantage of diagnosis and preventive treatment.
- Study the interaction between resident cells and infiltrating graft cells with phenotype characterization

Expected Outcomes

The identification of pathogenetic mechanisms underlying peri- and post-transplantation complications can have several expected outcomes. First, it can lead to the development of new biomarkers that can be used to predict and diagnose these complications at an early stage. This can enable clinicians and surgeons to intervene early, preventing the complications from progressing and improving patient outcomes.

Second, understanding the underlying mechanisms of transplant complications can help researchers identify new therapeutic targets. This can lead to the development of more effective treatments for transplant-related complications, which can ultimately improve patient survival rates and quality of life.

Finally, identifying the pathogenetic mechanisms of transplant complications can help improve our understanding of the immune system and its response to transplanted tissues, organs, and cells. This knowledge can be applied to other areas of immunology and transplantation, leading to advances in the field and improved patient outcomes across a range of diseases and conditions.

Significance and Innovation

The identification of pathogenic mechanisms underlying transplant complications is significant and innovative for several reasons.

Firstly, it can help us gain a better understanding of the underlying causes of complications and potentially identify new therapeutic targets that can be used to develop more effective treatment options. This can ultimately improve patient outcomes, such as survival rates, and reduce the burden of long-term complications associated with transplantation.

Secondly, the identification of pathogenic mechanisms can lead to the development of new diagnostic tools and biomarkers, which can help clinicians diagnose transplant-related complications at an earlier stage. This can facilitate earlier interventions and reduce the risk of complications progressing and resulting in poor patient outcomes.

Thirdly, the identification of pathogenic mechanisms can lead to the development of new technologies and innovative approaches to transplantation, such as the use of personalized medicine and precision medicine approaches, that can optimize outcomes for individual patients.

Translational Relevance and Impact for the National Health System (SSN)

The identification of pathogenic mechanisms underlying transplant complications has significant translational relevance and impact for the National Health System (NHS) in several ways.

Firstly, it can lead to the development of new and more effective therapies for transplant-related complications, which can reduce the overall burden on the NHS in terms of long-term care and follow-up treatments for patients.

Secondly, the development of new diagnostic tools and biomarkers can lead to earlier detection of transplant-related complications, which can reduce the need for costly and invasive diagnostic procedures and facilitate earlier interventions.

Thirdly, the identification of pathogenic mechanisms can lead to the development of personalized medicine and precision medicine approaches, which can optimize outcomes for individual patients and reduce the need for expensive and resource-intensive treatments.

In addition, the identification of pathogenic mechanisms can lead to a better understanding of the immune system and its response to transplanted tissues and organs. This can ultimately lead to the development of new strategies for preventing transplant-related complications and improving the long-term outcomes for transplant patients.

Il Responsabile del Progetto
Prof. Giuseppe Castellano

Il Direttore Generale *
Dott. Ezio Belleri

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

Il Direttore Generale*
Dott. Ezio Belleri

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