

REPORTING SCIENTIFICO ASSEGNO DI RICERCA

Periodo di attività: 01 Maggio 2019 - 30 Novembre 2019

Titolo assegno di ricerca:

Analisi proteomica con tecniche hplc/gel di campioni biologici in pazienti con Colangite Sclerosante Primitiva (PSC).

Struttura di riferimento:

Laboratorio di Proteomica, Istituto di Fisiologia Clinica – Consiglio Nazionale delle Ricerche (Pisa)

Assegnista:

Dott.ssa Elisa Ceccherini, PhD



La Colangite Sclerosante Primitiva (PSC) è una rara malattia epatica ad eziopatogenesi ignota, caratterizzata dall'infiammazione cronica dell'epitelio biliare intra ed extra-epatico, con prevalente coinvolgimento dei dotti epatici di calibro maggiore. Lo stato infiammatorio cronico e la deposizione di tessuto fibrotico che ne consegue sono causa di una progressiva alterazione dei dotti biliari (restringimenti alternati a stenosi, obliterazione dei dotti), colestasi e alterazione cito-architetturale del fegato. L'evoluzione della malattia verso la cirrosi e l'insufficienza epatica è generalmente più rapida se paragonata ad altre epatopatie anche per la mancanza di terapie efficaci e può comportare lo sviluppo di complicanze (insufficienza epatica e ricorrenti episodi colangitici) nonché incrementare il rischio di tumore epatico delle vie biliari. Il 60-80% dei pazienti con PSC è affetto da una malattia cronica intestinale (MICI), in particolare da retto colite ulcerosa (Chung BK et al. 2017; de Vries AB et al. 2015; Horsley-Silva JL et al. 2016). Ad oggi, non esistono dei marcatori bioumorali e/o degli indicatori sierologici, strumentali e clinici in grado di diagnosticare precocemente la patologia, predirne la velocità di evoluzione né di definire a livello del singolo paziente il rischio prognostico. La vera sfida è quindi quella di individuare una serie di marcatori che rappresentino una "fingerprint" della PSC, che possano trovare impiego nella diagnosi precoce nonché nel follow-up dei pazienti. Tali marcatori potrebbero contribuire anche alla conoscenza dei meccanismi molecolari che sono causa della malattia e consentire lo sviluppo di terapie più specifiche ed efficaci. Tra le strategie possibili, l'analisi proteomica è sicuramente tra quelle più promettenti e all'avanguardia. In ambito medico, il fine della proteomica è quello di identificare biomarkers proteici, cioè proteine che cambiano la loro concentrazione, il loro grado di attività o la loro localizzazione in associazione a specifici processi biologici o a stati patologici.

Negli ultimi anni, il mondo scientifico sta esplorando con molta attenzione le potenzialità diagnostiche della proteomica salivare, con particolare riguardo alle vescicole extracellulari, non solo per le patologie strettamente legate al cavo orale ma anche per quelle sistemiche (Hill AF 2019; Xiao Y 2019). Le vescicole extracellulari (corpi apoptotici, microvescicole ed esosomi) (Figura 1) sono vescicole dal diametro di 50-1000µm, contenenti

materiale biologico funzionalmente attivo come proteine, lipidi, mRNA e miRNA, e rilasciate dalle cellule come mediatori della comunicazione intercellulare. In particolare, gli esosomi sono considerati biomarcatori diagnostici e prognostici in talune malattie epatiche (Shen J et al., 2017 Masyuk et al., 2013), in virtù della loro capacità di interagire con le ciglia dei colangiociti influenzandone i meccanismi regolatori (Masyuk AI et al., 2010; Olaizola P et al., 2017). Tenendo conto del ruolo fisiopatologico delle vescicole extracellulari a livello epato-biliare, l'idea progettuale è quella di caratterizzare il proteoma di tali strutture nei pazienti affetti da PSC, in modo da ottenere informazioni circa le vie di segnale coinvolte nello sviluppo e progressione della patologia e identificare possibili marker che trovino impiego diagnostico e/o prognostico. A tal proposito, parte del periodo di attività è stato destinato alla formalizzazione della progettualità sopra esposta, consistente nella stesura della documentazione necessaria alla richiesta del parere del CEAVNO in merito alla conduzione dello

studio “PSC-OMICs”. Tale studio clinico su campioni biologici ha una durata quinquennale e prevede l’Unità di Proteomica (IFC-CNR) come ente promotore, e le UO di Epatologia e Gastroenterologia Universitaria dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, rispettivamente, come sperimentatore principale e centro satellite. I punti salienti del disegno sperimentale sono elencati di seguito, e schematizzati in Figura 2:

- Sono previsti 3 gruppi di studio, così classificabili: pazienti affetti da PSC, pazienti affetti da Colangite Biliare Primitiva (PBC) e pazienti privi di patologia colestatica, che verranno arruolati e monitorati per tutta la durata del follow-up, articolato in 5 anni.
- Con cadenza annuale verrà prelevato un campione salivare ed un campione ematico, necessari alla creazione di una biobanca.
- Da ogni campione verranno isolate le microvescicole e gli esosomi, che saranno caratterizzati dal punto di vista proteomico.
- Analisi bioinformatica dei risultati proteomici, che verrà incrociata con le caratteristiche cliniche dei pazienti, opportunamente sub-classificati in gruppi omogenei per età, sesso, caratterizzazione istopatologica della colangiopatia, eventuale presenza di MICI.

L’attività sperimentale legata allo studio PSC-OMICs è stata incentrata sulla messa a punto di un protocollo di isolamento di microvescicole ed esosomi da due diversi matrici biologiche, rappresentate dalla saliva e dal plasma di 6 volontari sani. La tecnica di isolamento si basa su centrifughe differenziali ad accelerazione centrifuga crescente, e validazione con nanosight ns300. Successivamente, è stata condotta un’analisi proteomica comparativa tra saliva intera e vescicole extracellulari salivari. 100 ug di proteine estratte da entrambi i campioni sono state digerite con tripsina e iniettate in colonna ad una concentrazione di 0.2 ug/ul. I peptidi sono stati separati in una colonna a fase inversa C18 secondo la loro idrofobicità lungo un gradiente lineare di 40 minuti 5-35% acetonitrile. Una volta eluiti i peptidi sono stati ionizzati in una sorgente DuoSpray ESI operante a 5.5 kV e direttamente interfacciata con un Triple TOF 5600 + (AB Sciex). I dati sono stati acquisiti con un metodo dati dipendente o IDA attraverso un range di massa da 250-1250 Th per la MS1 (survey scan) e da 100 -2000 Th per la MS2 (tandem mass acquisition). Gli ioni precursore sono stati frammentati usando la CAD (collisional activated dissociation) con una energia di collisione variabile e dipendente dal rapporto m/z di ciascun ione peptidico. I dati acquisiti sono stati convertiti in liste di picchi di rapporti m/z a intensità per ciascun coppia precursore/frammenti e interrogati contro la banca dati di proteine umane (UniProtKB, 20316 sequences). Carbamidometilazione dei residui di cisteina e l’ossidazione delle metionine sono state selezionate come modificazioni fisse e variabili, rispettivamente. Le proteine vengono considerate identificate con almeno 2 peptidi per sequenza e con un FDR minore del 5%. Un totale di 186 e 534 proteine sono state identificate, rispettivamente, nella saliva intera e nelle vescicole extracellulari salivari. L’analisi di gene ontology (GO) relativa alle componenti cellulari ha evidenziato una distinzione significativa nella localizzazione di proteine esosomiali extracellulari, di vescicole intracellulari e coinvolte nel trafficking e trasporto endosomiale tra il campione di vescicole extracellulari e saliva intera (Figura 3). Un totale di 170 proteine sono state individuate come comuni tra i due campioni e largamente coinvolte nei processi di immunità umorale, attivazione del complemento, fagocitosi e attività antibatterica. Solo 16 proteine sono presenti unicamente nella saliva intera in contrapposizione alle 364 proteine per le vescicole extracellulari salivari (Figura 4). Queste sono state utilizzate per creare un network di interazioni proteina-proteina dal quale sono stati estratti i 4 sub-network più rappresentativi (Figura 5). La network analysis associata alla pathway analysis ha messo in luce diverse vie di segnale piuttosto interessanti, legate al metabolismo cellulare, alla regolazione del sistema immunitario ed alla trascrizione genica. La qualità dei dati ottenuti è estremamente importante, soprattutto nell’ottica della potenziale applicazione ad una patologia complessa e multifattoriale come la PSC. Lo step successivo sarà quello di ripetere l’analisi su un numero congruo di campioni salivari derivanti da pazienti, in accordo ai criteri previsti dal protocollo di studio.

Parallelamente allo studio PSC-OMICs sono state gettate le basi per la messa a punto di un modello in vitro di PSC, che permetta di mettere in luce, seppur in forma semplificata, i meccanismi molecolari responsabili della patologia stessa e della sua progressione. A tal proposito sono state realizzate delle colture cellulari di colangiociti umani, che verranno trattate secondo lo schema riportato in Figura 6, in modo da ottenere colangiociti reattivi, in analogia a quanto accade *in vivo*.

Considerando la mancanza di terapie efficaci nel rallentare la progressione del danno epato-biliare della PSC ed allontanare l’eventualità del trapianto, parte dell’attività di ricerca si è concentrata sullo studio sistematico di sostanze naturali, e dei loro meccanismi di azione, che negli anni hanno mostrato attività antifibrotica ed epatoprotettiva. La ricerca ha condotto ad un’ampia varietà di piante e composti fitochimici, tra i quali sono stati selezionati il *Silybum marianum*, la *Curcuma longa*, la *Salvia miltiorrhiza* e la quercetina

per la stesura di una review dal titolo: "The potentiality of herbal remedies in Primary Sclerosing Cholangitis: from in vitro to clinical studies". Il manoscritto è stato inviato alla rivista Frontiers in Pharmacology ed in attesa della conclusione del processo di revisione.

Figura 1

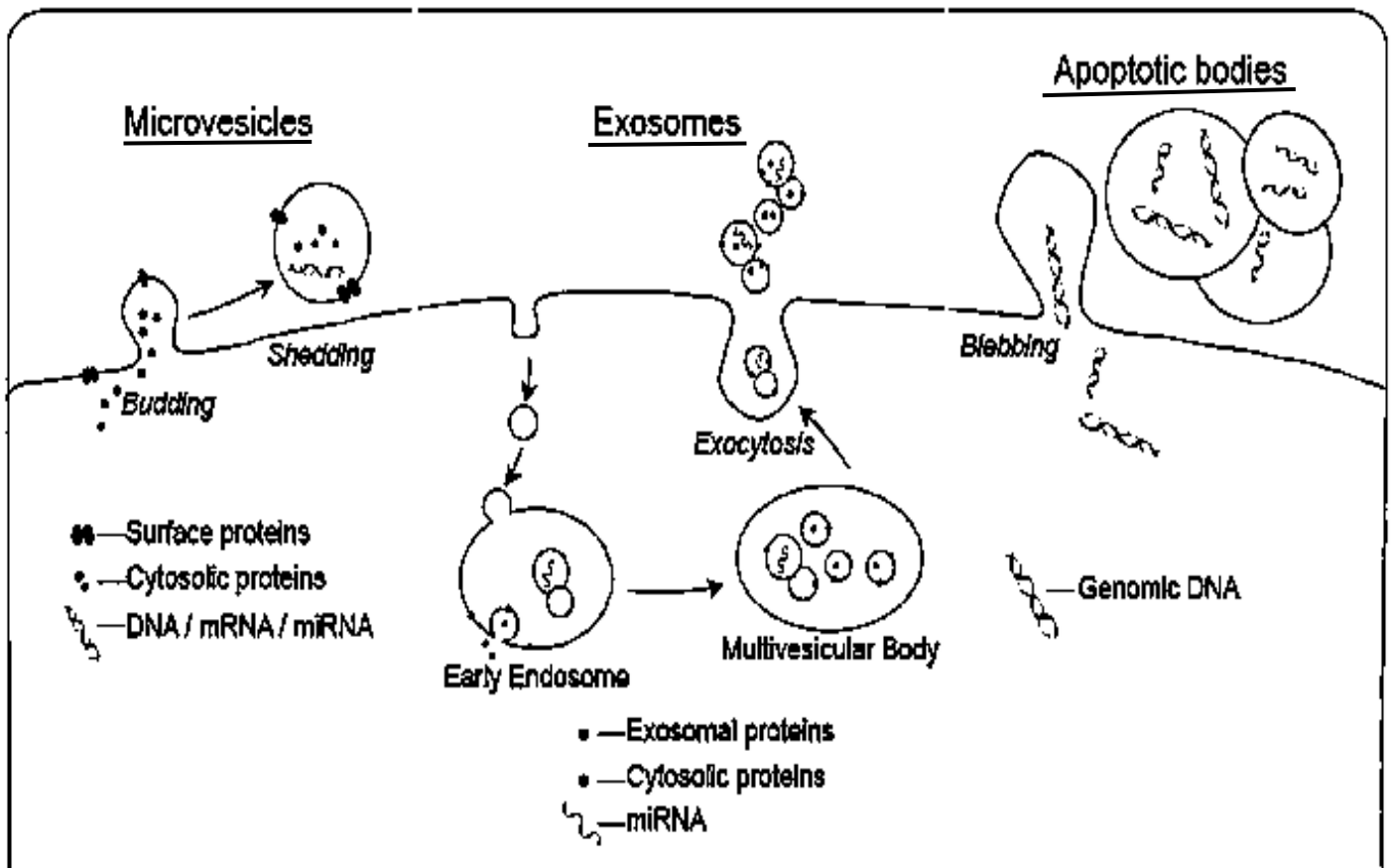


Figura 2

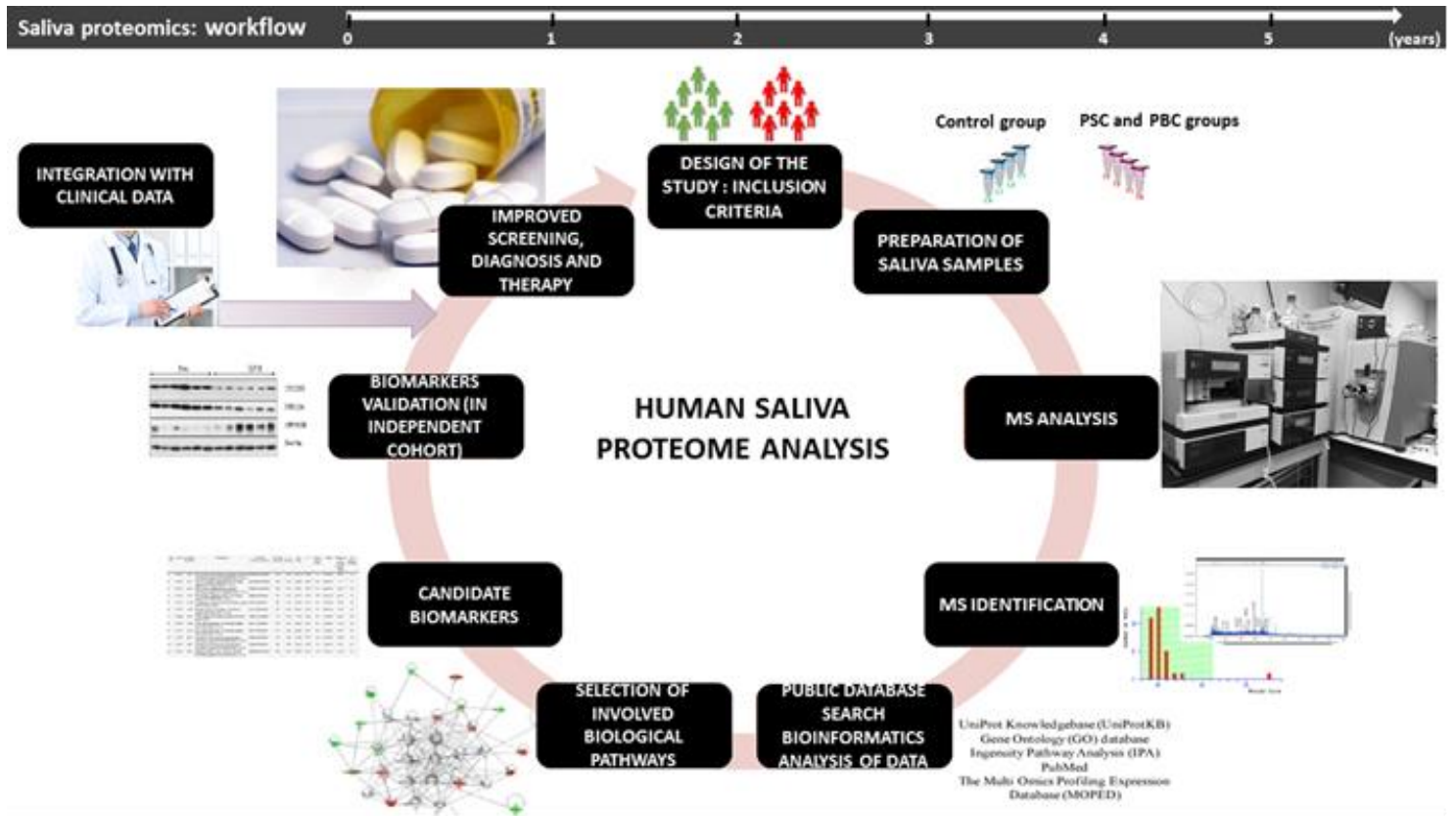


Figura 3

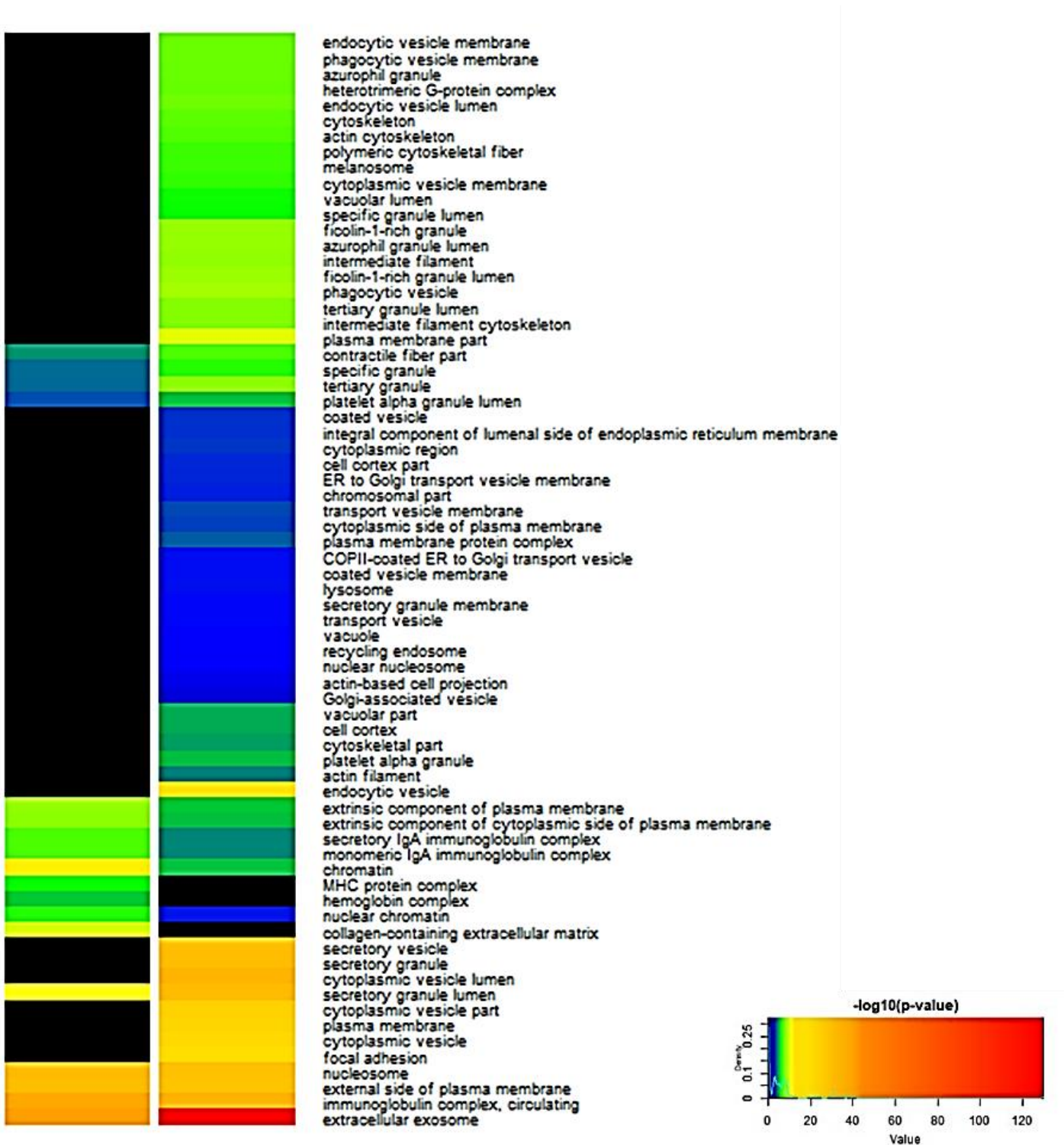


Figura 4

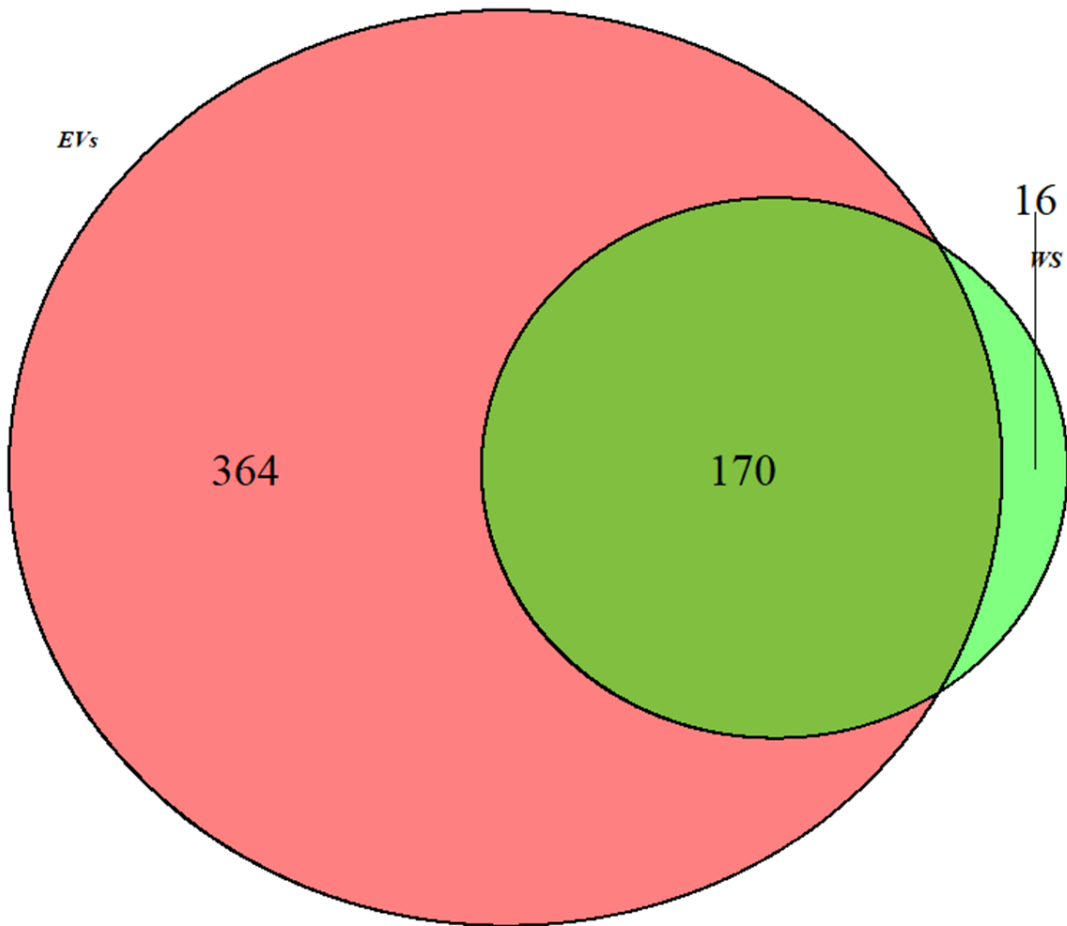


Figura 5

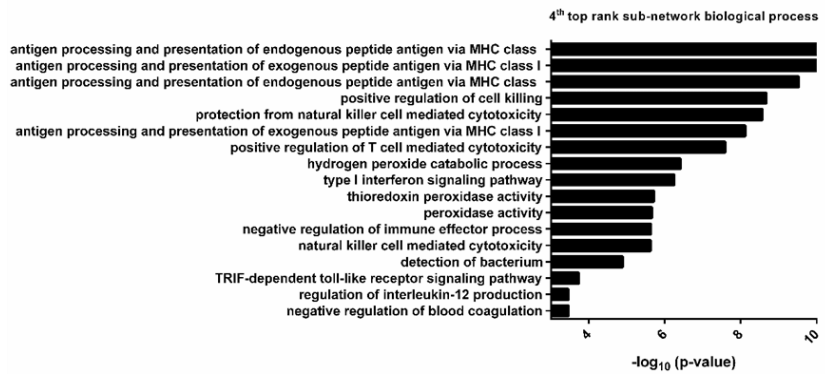
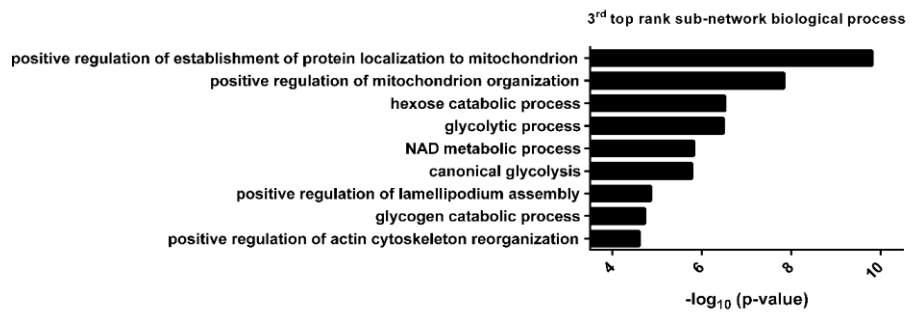
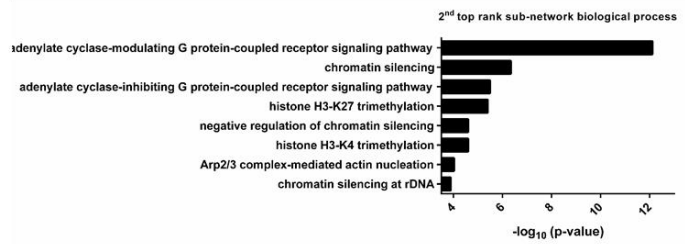
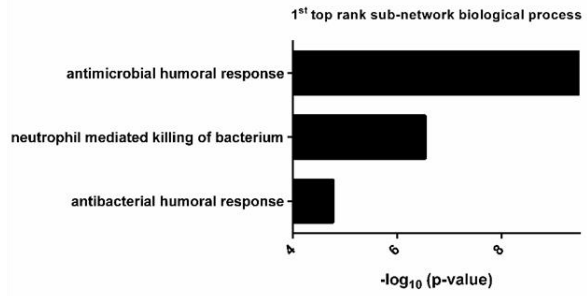
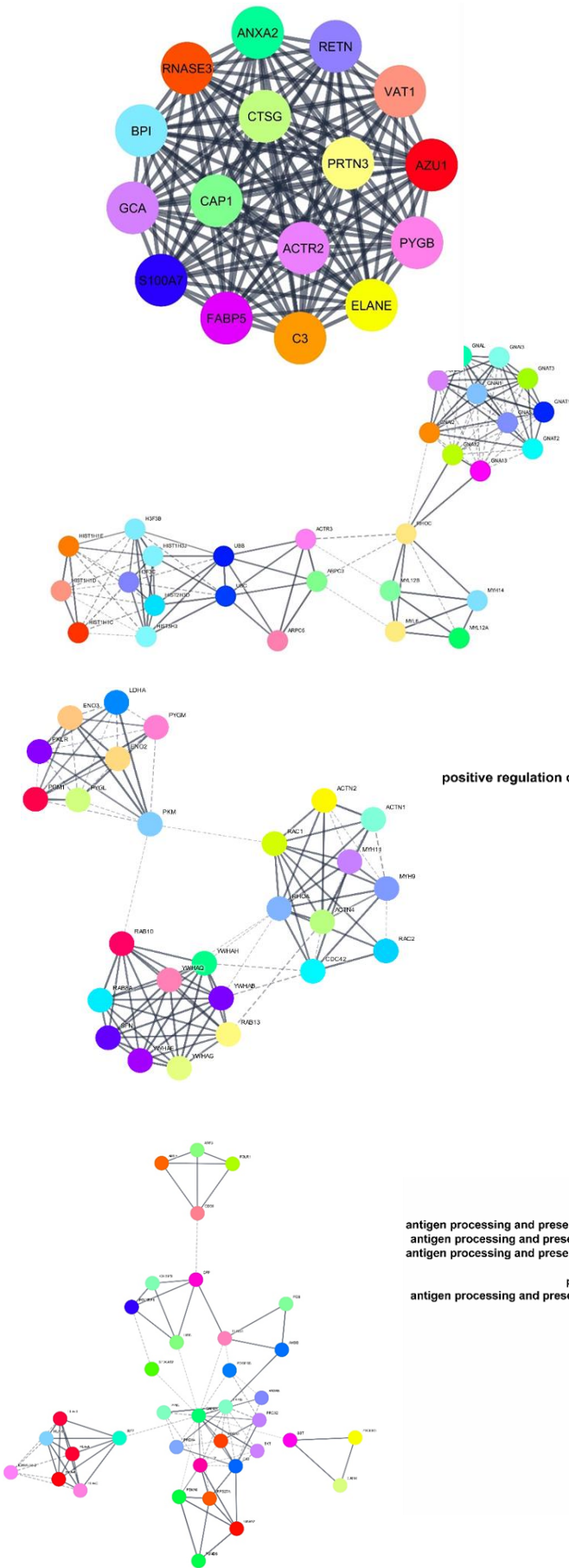
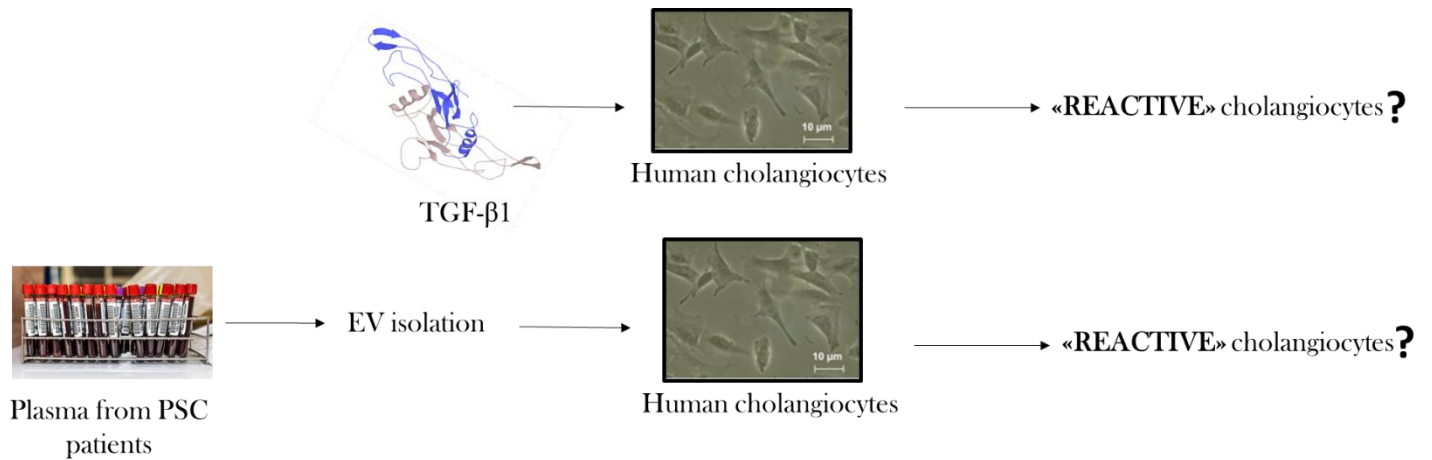


Figura 6



References:

Chung BK, 2017. Immunogenetics in primary sclerosing cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol.*, 33(2):93-98.

de Vries AB, 2015. Distinctive inflammatory bowel disease phenotype in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol.*, 21(6):1956-71.

Hill AF., 2019. Extracellular Vesicles and Neurodegenerative Diseases. *J Neurosci.*, 39(47):9269-9273.

Horsley-Silva JL, 2016. Advances in primary sclerosing cholangitis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.*, 1(1):68-77.

Masyuk AI, 2010. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299(4):G990-9.

Masyuk AI, 2013. Exosomes in the pathogenesis, diagnostics and therapeutics of liver diseases. *J Hepatol.* 59(3):621-5.

Olaizola P, 2018. MicroRNAs and extracellular vesicles in cholangiopathies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*, 1864(4 Pt B):1293-1307.

Shen J, 2017. The role of exosomes in hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med.* 21(5):986-992.

Xiao Y, 2019. Extracellular vesicles in type 2 diabetes mellitus: key roles in pathogenesis, complications, and therapy. *J Extracell Vesicles.*, 8(1):1625677.