

Monitoraggio 2021

Nel 2020 sono state realizzate le seguenti infrastrutture di ricerca (€ 626.654,51 fondi MIUR - € 580,48 risorse proprie):

- BIOBANCA (€ 54.180,36)

Sono state definite le misure di sicurezza per il corretto trattamento dei dati personali in conformità alla normativa vigente. Il Responsabile Protezione Dati Personali (RPD) dell'Università

di Torino le ha approvate.

SICUREZZA DATI CLINICI

Per garantire la sicurezza dei dati clinici associati al campione biologico conservato in Biobanca, si è deciso di utilizzare la piattaforma REDCap attivata dalla Scuola di Medicina dell'Università di Torino e già in uso presso altre Università italiane. REDCap crea database per raccolta dati in studi clinici mono o multicentrici, rispettando i principi FAIR (findability, accessibility, interoperability, and reusability) della European Open Science Cloud (EOSC). I dati sono trattati in funzione della realizzazione degli studi clinici in forma anonimizzata o pseudonimizzata. L'accesso al sistema avviene in base a profili attribuiti agli utenti sulla base del singolo studio. Gli utenti sono abilitati ad operare e consultare solo sulle eCRF degli studi cui partecipano. Gli utilizzatori sono di due tipi: i referenti con il compito di progettazione, sviluppo e controllo delle CRF; utenti reclutatori con il compito di inserire i dati nelle CRF sviluppate. Lo sviluppo delle CRF nel sistema RedCap è supportato da strumenti che permettono il disegno di interfacce personalizzate seguendo una logica a moduli a seconda del tipo di studio. Il trattamento dei dati avviene conformemente alle Policy di utilizzo del Servizio di raccolta dati elettronica per la ricerca presso la Scuola di Medicina dell'Università degli Studi di Torino.

SICUREZZA CAMPIONE BIOLOGICO

Per garantire la qualità del campione conservato si è preparato il Laboratory Handbook per la standardizzazione della processazione e conservazione dei campioni. Inoltre, si sta procedendo alla stesura della documentazione per l'adeguamento della Biobanca alla normativa UNI EN ISO 9001:2015, al fine di ottenere la certificazione nel 2021. Ad oggi la Biobanca dispone di 4 unità di crioconservazione (3 congelatori -80°C e uno a -150°C). Tale dotazione strumentale garantisce continuità nella raccolta di campioni. In caso di perdita di energia e/o sbalzi di corrente dei locali in cui sono presenti i congelatori, entra in funzione un generatore di corrente in grado di supportare il guasto per 8-10 ore. Tutta la catena del freddo gestita dalla biobanca è dotata di un sistema di monitoraggio continuo delle temperature.

MONITORAGGIO PROGETTI ATTIVI

La fase attiva di arruolamento prospettico funziona ormai a regime e ad oggi nella Biobanca sono depositati collezioni di vario materiale biologico (plasma, siero, liquidi biologici, ecc..) di oltre 600 partecipanti afferenti ai progetti attivi delle aree tematiche principali del progetto.

- PIATTAFORMA PER L'ANALISI GENOMICA (€ 83.438,71)

Sono stati acquistati ulteriori strumenti utili alle attività previste dalla piattaforma: Eppendorf Concentrator System, Euroclone Thermoshaker e altre piccole strumentazioni. È stato eseguito l'aggiornamento del Software di gestione del sequenziatore NextSeq550 alla versione più recente (NextSeq Control Software versione 4). È ora quindi possibile utilizzare il sequenziatore per la scansione degli array di metilazione (Infinium MethylationEPIC BeadChip, Illumina).

E' stata rinnovata la licenza del software Alamut Visual per l'analisi di varianti genetiche, particolarmente utile per la valutazione delle varianti di splicing. E' stata impegnata la somma necessaria a garantire l'assistenza sulle grosse strumentazioni fino a fine progetto.

La piattaforma Genomica è utilizzata in maniera trasversale da tutte le aree di ricerca del DSM portando all'analisi in NGS di centinaia di campioni, includendo esomi clinici, miRNoma, ampi pannelli genici. Le piattaforme Genomica e Bioinformatica collaborano per la gestione del salvataggio dei dati di NGS e per lo sviluppo di pipeline di analisi di dati NGS. Il Gruppo di Lavoro Core-Lab ha continuato la sua attività portando alla stesura di un primo manuale di tecniche di estrazione di DNA/RNA e di metodiche relative all'analisi NGS di DNA (pannelli, esomi clinici) e di RNA (miRNoma, trascrittoma) a partire da diversi tessuti di partenza.

- CENTRO DI CALCOLO (€ 3.508,72)

Il centro di calcolo per l'analisi di dati omici e big data, ora funziona a regime ed è in grado di offrire un supporto per il calcolo ad alte prestazioni, utilizzando il supercomputer OCCAM (<http://c3s.unito.it/>). Il DSM è parte di C3S e può utilizzare tutte le risorse disponibili con 4 nodi di sola pertinenza del dipartimento. E' stata definita la modalità tecnica di accesso dei ricercatori del DSM in accordo con l'ente gestore del C3S e si basa sull'uso di "coin", ossia risorse utilizzabili tramite prenotazione con una moneta virtuale. La moneta al momento è gratuita e viene distribuita ai ricercatori del DSM a richiesta dal responsabile di gestione (il Prof. Piero Fariselli). Sono state identificate le procedure per la creazione di aree dati con visibilità limitata ai singoli progetti di ricerca, utilizzando il sistema di creazione gruppi e progetti di gitLab. Si è acquistato un sistema di backup remoto ospitato presso il Consorzio TOP-IX (Torino Piemonte Internet Exchange, che include tra i membri l'Università di Torino), che per ragioni geografiche (distanza dal sequenziatore e dal sistema di calcolo Occam) offre una maggiore garanzia nei casi di disaster recovery. Il sistema di backup è stato installato e si sono definite le modalità di trasferimento dati dalle sorgenti stesse (dati da sequenziamento, basi di dati già consolidate, ecc.). È in fase di valutazione un ampliamento delle risorse di calcolo investendo nel nuovo sistema di ateneo HPC4AI (integrato con C3S, ma con modalità di accesso differenziate) Stato di avanzamento delle attività legate agli obiettivi scientifici nelle 4 aree principali di interesse:

- AREA CARDIOMETABOLICA (€ 28.078,87)

Obiettivi: utilizzare la tecnologia NGS per definire una signature di small non coding RNA (sncRNAs), utili a migliorare la diagnosi e prognosi di pazienti con patologie cardiometaboliche.

Tre le casistiche oggetto di studio:

EPOS (Elucidating Pathways of Steatohepatitis): In 228 pazienti con diagnosi istologica di NAFLD/NASH (132 F0/F1, 32 F2, 64 F3/F4) sono stati identificati 47 sncRNA (di cui 17 miRNA) significativamente deregolati in funzione dello stadio di fibrosi epatica. Il modello sviluppato, basato su alcuni sncRNA differenzialmente espressi, ha evidenziato: i) moderata accuratezza diagnostica (AUC=0.75) per l'identificazione della fibrosi significativa

($F \geq 2$); ii) accuratezza superiore agli score non-invasivi di fibrosi utilizzati nella pratica clinica (AUC=0.6-0.7), iii) performance paragonabili all'elastografia epatica (AUC=0.76). E' in corso l'analisi di associazione al fine di delucidare i meccanismi coinvolti nella progressione della malattia epatica e, possibilmente, indentificare nuovi target terapeutici.

EURODIAB (T1D Prospective Complication Study): Per 376 soggetti con e senza complicanze croniche del diabete di tipo 1 (studio caso-controllo nidificato dell'EURODIAB PCS), l'analisi statistica aggiustata per età, sesso, effetto batch, emoglobina glicata, durata del diabete ed ipertensione sono emersi 23 sncRNAs differenzialmente espressi nei soggetti con complicanze rispetto a quelli esenti ($p < 0,05$ p-value FDR). Per singola complicanza sono emersi differenzialmente espressi: 19 sncRNAs per la nefropatia e 4 per la retinopatia semplice. E' in corso l'analisi di associazione tra i sncRNA deregolati e i processi biologici coinvolti nella patogenesi delle complicanze microvascolari del diabete al fine di selezionare sncRNA da validare mediante qPCR.

EPICOR (EPIC Italia Cardiovascolare): Per 92 soggetti pre-diagnostici con malattie coronariche e 92 soggetti esenti da malattia, l'analisi statistica caso-controllo aggiustata per effetto batch, genere, età e fattori di rischio cardiovascolari, sono emersi 44 sncRNAs differenzialmente espressi (p-value FDR < 0.05).

Sono stati selezionati 10 sncRNAs ($\log_2FC > |0.6|$ e p-value FDR < 0.05) per la validazione in qPCR. Attualmente è in corso il disegno dei primers e la messa a punto della metodica. I segnali confermati, saranno indagati nella coorte prospettica europea "KORA AGE" (348 campioni).

RECLUTAMENTO COORTI: Arruolati 277 pazienti (165 DMT2, 112 NAFLD) con fattori di rischio cardiometabolici, sottoposti a questionari validati (MDS, EPIC, AUDIT, SF-36, IPAQ, RBANS), esami strumentali (ECG, Ecocardiografia, Elastografia epatica, eco TSA) e prelievo di campioni biologici. I campioni di sangue intero, plasma, siero, PAX RNA, urine e feci sono stati stoccati presso la Biobanca TESEO. Da Ottobre 2020, i pazienti arruolati nello studio vengono testati per la presenza di IgG verso SARS-Cov-2.

- AREA ONCOLOGIA (€ 207.239,66)

CARCINOMA DELLA MAMMELLA (Anatomie Patologiche-Genetica Medica)

a. Profilo mutazionale germline di pazienti con carcinoma triplo negativo. Da una coorte di 292 carcinomi della mammella ormono-negativi che non presentava mutazioni nei geni BRCA1/BRCA2 si è concluso il sequenziamento (Illumina MiSeq) dei casi a fenotipo triplo negativo (n=83) selezionati per l'analisi di 15 geni associati a un moderato-alto rischio di sviluppare tumore della mammella (pannello Haloplex, Agilent). L'analisi ha individuato 5 casi con varianti patogeniche. 64 casi wild-type sono stati sequenziati sulla piattaforma NextSeq550 con pannello TSO500 (Illumina).

b. Carcinomi "HER2-equivoci". E' in corso l'analisi mutazionale con pannello TSO500 sui casi HER2 score 2+/1+ (n=48), che sono stati valutati in precedenza per copy number con metodica CUTseq [PMID: 31628304]. E' stata valutata la possibilità di isolare le singole cellule di questi tumori (tipicamente eterogenei) con tecnologia DEPAarray partendo da campioni fissati in formalina raffreddata [PMID: 32140450]. L'analisi delle sottopopolazioni tumorali di un primo caso analizzato è in corso.

c. Profilo trascrittomico di carcinomi tripli negativi. E' stata completata l'analisi di 44 casi di carcinomi tripli negativi androgeno positivi (pannello NanoString Breast Cancer 360™). La casistica dispone di un follow up clinico che renderà possibili correlazioni clinico-patologiche con il profilo molecolare.

MELANOMA MALIGNO (Dermatologia - Anatomie Patologiche-Genetica Medica)

a. Analisi di mutazioni germinali in pazienti con melanoma multiplo o familiare. E' stato definito un pannello di 21 geni e 256 SNPs associati al rischio di melanoma, da analizzare mediante metodica Agilent SureSelect XT (pannello custom). È stato effettuato il training con l'analisi di 8 campioni. La coorte completa comprenderà 288 casi.

b. Pattern di mutazioni somatiche in campioni pre-terapia. E' stata effettuata la raccolta dei dati clinico-anamnestici dei pazienti affetti da melanomi in stadio IV/III (abc) (database su piattaforma RedCap). È in corso l'analisi NGS di circa 60 campioni fissati in formalina di pazienti con melanoma primitivo trattati con terapia adiuvante. ALTRE PATOLOGIE TUMORALI (Epidemiologia-Dermatologia-Anatomia Patologica) La progettualità è stata estesa a: 1) tumori del capo-collo (collaborazione con progetto europeo HeadSpace); 2) tumore del testicolo (consorzio internazionale TECAC); 3) tumore della prostata; 4) mesotelioma pleurico maligno (completato un progetto mirato alla caratterizzazione del profilo epigenetico di questo tumore, manoscritto in peer review); 5) Linfomi cutanei.

- AREA GENETICA MEDICA E FARMACOGENOMICA (€ 158.349,70)

Genetica Medica

E' continuata l'attività di reclutamento casi con malattie del neurosviluppo, l'analisi dei dati dei casi sequenziati, e l'interpretazione delle varianti. Abbiamo inoltre iniziato a studiare nuovi geni malattia mediante l'utilizzo di cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSCs) ingegnerizzate mediante tecnologia CRISPR/Cas9. Da queste cellule abbiamo poi derivato progenitori neuronali staminali e neuroni glutamatergici maturi, per studi funzionali morfologici, elettrofisiologici e di trascrittomico. Le spese hanno riguardato l'acquisto di materiale di laboratorio (plastiche), reagenti e piccola strumentazione (centrifughe da banco).

Farmacogenomica

Le attività portate avanti sono state le seguenti:

- Analisi delle complicanze neuro cognitive dei pazienti affetti da HIV. Le analisi effettuate sino ad ora hanno coperto ambiti diversi, partendo dalla misurazione dei livelli plasmatici e liquorali dei farmaci anti-HIV, per poi passare all'analisi sia dell'espressione di specifici polimorfismi genetici correlati al loro metabolismo e sia di marker di infiammazione o danno neuronale. I risultati ottenuti fino ad oggi hanno permesso di chiarire la distribuzione dei farmaci anti-HIV nel plasma e nel liquor e la loro abilità di oltrepassare la barriera ematoencefalica.

- Valutazioni di biomarkers neurologici come markers di danno neuronale: tra i vari, la valutazione dei neurofilamenti, analizzati con lo strumento SIMOA SR-X (Quanterix), acquisito con i fondi del progetto. Inoltre sono state poste le basi, con l'acquisizione di un congelatore dedicato e materiale, per una sede distaccata della Biobanca del Dipartimento di Scienze Mediche presso il Laboratorio di Farmacologia Clinica e Farmacogenetica

dell'Ospedale Amedeo di Savoia. E' attualmente in corso la stesura delle procedure e della documentazione allineata alla ISO 20387 per l'autorizzazione al CE. Le spese principali affrontate sono state effettuate per: un congelatore -80°C, consumabile ed attrezzatura la biobanca; reattivi, materiale consumabile ed attrezzatura per avviare lo strumento SIMOA; licenza software per le valutazioni PK/PD.

- AREA TRAPIANTI DI ORGANO SOLIDO (€ 91858,49 Fondi MIUR - € 580,48 risorse proprie)

Organizzata in due filoni principali:

Filone 1: identificazione di varianti genetiche causative di insufficienza d'organo. L'obiettivo è la identificazione delle varianti genetiche responsabili di insufficienza d'organo, rene, fegato e cuore, con l'obiettivo di raggiungere la diagnosi e migliorare la gestione clinica del paziente. La metodica di analisi è rappresentata dal sequenziamento massivo parallelo di un pannello di 6,700 geni (Illumina TruSight One Expanded, anche denominato esoma clinico) e si avvale di una piattaforma analitica, basata su pannelli genici in silico che comprendono categorie di geni responsabili di forme clinicamente distinte di patologia renale. E' stata organizzata una piattaforma informatica per la gestione e il reclutamento dei pazienti, sfruttando la rete nefrologica regionale che opera intorno al Centro Regionale Trapianti (Regione Piemonte e Valle D'Aosta). Dal 2018 sono stati reclutati circa 700 pazienti. Vista la buona applicabilità del sistema, nel corso del 2019 è stata estesa l'analisi a malattie monogeniche epatiche, in collaborazione con il Dott P. Calvo (Città della Salute e della Scienza, OIRM) e all'inizio del 2020 anche cardiache, in collaborazione con il Prof G.M. DeFerrari (Città della Salute e della Scienza). Recentemente questo filone del progetto è stato ampliato con studi di validazione funzionale delle varianti genetiche identificate mediante sequenziamento NGS.

L'obiettivo è di utilizzare diversi modelli sperimentali per riprodurre specifiche varianti genetiche e analizzarne l'impatto funzionale. Parte di questi dati sono stati inclusi in un paper pubblicato su "Journal of Nephrology" (2020) e sono stati inclusi in diversi abstract congressuali.

Filone 2: identificazione precoce di marcatori di rigetto di trapianto.

Il secondo filone in cui è organizzata l'area concerne l'identificazione di marcatori precoci di rigetto d'organo solido. Allo scopo, abbiamo richiesto e ottenuto l'approvazione del Comitato

Etico aziendale per il progetto "Medicina di precisione nel monitoraggio nei pazienti con trapianto di cuore o polmone: verso la biopsia liquida basata sul mismatch HLA?". Tale progetto si basa sull'ipotesi che la quantità di DNA libero circolante di origine del donatore possa essere un marcatore indiretto di danno d'organo e quindi, entro certi limiti, anche di rigetto. Per discriminare il DNA proveniente dal donatore rispetto a quello del ricevente, ci siamo basati sui polimorfismi HLA (locus DRB1) dei due soggetti, già noti al momento del trapianto.

Nell'ambito di questo progetto nel periodo tra luglio 2019 e Agosto 2020 è stata reclutata una coorte iniziale composta da 37 pazienti trapiantati di cuore, 34 pazienti trapiantati di polmone e un trapianto combinato cuore/polmone. Il reclutamento è in fase attiva. La percentuale di DNA circolante proveniente dal donatore è confrontata con le informazioni cliniche disponibili per ciascun paziente per stabilire una correlazione tra i risultati ottenuti e la probabilità di sviluppare rigetto. I risultati ottenuti dall'analisi di una coorte pilota riceventi trapianto di cuore mostrano una correlazione significativa tra livelli di DNA circolante e rigetto acuto, in linea

con i dati riportati in letteratura. Questi dati sono stati oggetto di un paper inviato a "Journal of Heart and Lung Transplantation" (in revisione) e sono stati inclusi in diversi abstract congressuali.