

Monitoraggio 2022

Descrizione azioni realizzate nel 2021

BIOBANCA

Da luglio 2021 la Biobanca-TESEO ha ottenuto la certificazione UNI EN ISO 9001:2015 e da febbraio 2021 è parte funzionale del SSD Banche Tessuti e Bioconservatorio dell'AOU Città della Salute e della Scienza di Torino

Sicurezza campione biologico

La Biobanca dispone di 5 unità di crioconservazione (3 congelatori -80°C e 2 frigo-congelatori combinati +4°C/-20°C). Tale dotazione strumentale garantisce continuità nella raccolta di campioni. La “catena del freddo” gestita dalla biobanca è dotata di un sistema di monitoraggio continuo delle temperature e da un sistema di generatori di corrente alternata in caso di perdita di energia e/o sbalzi di corrente. I protocolli per l'accettazione, processazione e la conservazione del campione seguono le “standard operating procedures” (SOPs) della biobanca e sono sottoposti a validazione e a periodici controlli di qualità. E' inoltre effettuato il costante aggiornamento del personale.

Sicurezza dati clinici

La tracciabilità e la rintracciabilità dei campioni biologici sono gestite da un sistema informatico web-based, GDPR compliant, che supporta la gestione dei dati, con un'interfaccia intuitiva e una validazione del dato immesso. La sicurezza dei dati personali dei partecipanti è garantita dall'architettura funzionale del software che è caratterizzato da un modulo “pseudonimizzatore” con la funzione di generare pseudonimi e da un secondo modulo “registrazione campione biologico” separato dal primo, con l'obiettivo di tenere separati i dati identificativi dei partecipanti dai dati biologici che li riguardano. L'accesso al sistema avviene in base a profili che vengono attribuiti agli utenti sulla base del singolo studio. Tutti i dati clinici collegati al campione biologico sono registrati sulla piattaforma REDCap nel rispetto dei principi FAIR (findability, accessibility, interoperability, and reusability) della European Open Science Cloud (EOSC). I dati sono trattati in forma anonimizzata o pseudonimizzata e l'accesso al sistema avviene in base a profili attribuiti agli utenti sulla base del singolo studio.

Monitoraggio Progetti attivi

Ad oggi nella Biobanca-TESEO sono depositati collezioni di vario materiale biologico (plasma, siero, liquidi biologici; etc..) di oltre 1600 partecipanti afferenti a 15 trial clinici attivi.

PIATTAFORMA PER L'ANALISI GENOMICA

La piattaforma genomica, collocata al secondo piano della Palazzina di Genetica, è finalizzata

all'applicazione di tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) e di tecnologie basate sugli array. È costituita da un laboratorio per attività "Pre-PCR" e un laboratorio "Post-PCR". Nel corso del 2022 è stata implementata la strumentazione con l'acquisto della Piattaforma Infinium-Illumina che permetterà la preparazione di array finalizzati alla genotipizzazione (SNP-array) nonché all'analisi della metilazione del DNA (EPIC-array) a livello genomico.

È stata rinnovata la licenza del software Alamut Visual per l'analisi di varianti genetiche, particolarmente utile per la valutazione delle varianti di splicing. È 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 migliaia 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 portato alla stesura di un primo manuale di tecniche di estrazione e controllo qualità di DNA/RNA oltre che 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

L'infrastruttura di calcolo è stata utilizzata in maniera significativa, sia per quanto riguarda la parte Cloud (hpc4ai.unito.it) sia per l'infrastruttura Occam (<https://c3s.unito.it/>), raggiungendo un utilizzo di oltre 110000 ore di calcolo. Inoltre sono stati attivati backup su nastro remoto per diversi gruppi di ricerca e progetti per diversi terabyte di dati. Nell'ultimo periodo si è deciso di utilizzare il residuo per l'acquisto di due workstation Linux e due portatili ad alte prestazioni, per poter pre-processare i dati in locale prima di utilizzare le risorse distribuite, ottimizzando in questo modo l'utilizzo delle risorse per computazioni concorrenti.

Nell'ambito del progetto di dottorato afferente al centro di calcolo sono stati esplorati metodi statistici e metodi di machine learning in differenti contesti:

- Nel contesto del progetto H2020Athlete, finalizzazione di uno studio per la caratterizzazione dell'esposoma dei bambini della coorte di nascita NINFEA e per il confronto di differenti metodologie per studiare il ruolo dell'income familiare come driver dell'esposoma nei primi anni di vita.

Metodi utilizzati: modelli di regressione, analisi fattoriale, metodi di clustering (k-prototype, spectral clustering).

- Nel contesto del progetto LifeCycle, da febbraio a giugno 2022 svolgimento di un periodo di formazione presso l'Università di Copenhagen (UCPH). Il lavoro ha riguardato lo studio

finalizzato alla stesura di un articolo metodologico dal titolo: “Causal machine learning applied to life-course epidemiology”. Sono stati esplorati metodi di machine learning applicati a inferenza causale e causal discovery (Targeted Maximum Likelihood Estimation, Augmented Inverse probability weighting, Double Machine Learning, PC algorithm).

AREA CARDIOMETABOLICA

Obiettivo: Identificare biomarcatori diagnostici/prognostici mediante approccio “omico”, e creare una coorte prospettica di pazienti con primo riferimento di DMT2, NAFLD/NASH, ipertensione arteriosa, cardiopatia ischemica e fibrillazione atriale.

EPICOR. Conclusa la replica in RT-qPCR, degli 8 segnali precedentemente validati, in 348 campioni prospettici per CAD appartenenti alla casistica europea KORA e sono in corso le analisi statistiche. Analisi di WES: condotte le analisi su 184 campioni per cui era già stato prodotto il dato degli sncRNAs; sono in corso le analisi bioinformatiche e statistiche. Analisi del metaboloma: effettuate analisi *untargeted* per metaboliti e acidi grassi a catena corta mediante spettrometria di massa (MS).

EPOS. Effettuata l’analisi del secretoma (analisi target di 58 citochine/chemochine/fattori di crescita) su 228 pazienti con NAFLD/NASH. L’analisi WES su un sottogruppo di 154 pazienti (46 NAFL vs 108 NASH) ha permesso di identificare geni con specifici pattern mutazionali nei 2 gruppi di pazienti. Concluse le analisi MS *untargeted* e *targeted* del metaboloma su 157 pazienti; è in corso l’analisi statistica.

EURODIAB-PCS. L’analisi NGS condotta su 376 soggetti con DMT1 ha identificato 229 sncRNAs. 15 sncRNAs erano deregolati nelle microvescicole isolate dal siero di soggetti con complicanze rispetto a quelli esenti. Dieci miRNAs sono stati validati su 50 soggetti/gruppo e di questi 5 miRNAs si sono confermati deregolati nei casi con nefropatia/retinopatia diabetica rispetto ai controlli all’analisi RT-qPCR. Sono in corso le analisi di accuratezza diagnostica.

RECLUTAMENTO COORTI. Arruolati 571 pazienti (315 DMT2 e 256 NAFLD), di cui sono stati raccolti i dati clinico-anamnestici, somministrati questionari, eseguiti esami ematochimici/strumentali, e raccolti i campioni biologici. Sono stati analizzati i dati relativi alle funzioni cognitive (RBANS), cronotipo (MCTQ), dieta (EPIC e MDS) e associati con la severità dell’epatopatia o con le comorbidità associate al DM. Nei soggetti DMT2 è stata identificata un’associazione inversa tra l’adesione alla dieta mediterranea e la steatosi epatica. Nei soggetti con NAFLD, è stata identificata un’associazione fra stadio di fibrosi epatica e marcatori

ecocardiografici di scompenso cardiaco subclinico (E/E' e GLS).

- AREA ONCOLOGICA

Il gruppo dell'Oncologia ha portato a termine lavori sia di studi cd "proof of principle", sia di caratterizzazione di nuove coorti, come di seguito dettagliato:

- studio di caratterizzazione somatica e germinale di multiple neoplasie a carico di giovane paziente: pubblicazione dei risultati della descrizione di una nuova sindrome di collisione POLE/PMS2 a marzo 2022 (PMID: 35260767);
- studi di carcinomi mammari "HER2-low": risultati di caratterizzazione genomica integrata, mutazionale e di espressione genica, pubblicati ad agosto 2022 (PMID: 36038884);
- studio dell'espressione del retrotrasposone L1 nel carcinoma della mammella: risultati di correlazione con la prognosi pubblicati a giugno 2022 (PMID: 35741073);
- studio di eterogeneità dell'instabilità microsatellitare in casi di carcinoma del colon con campi di perdita completa delle 4 proteine del mismatch repair: risultati dell'analisi mutazionale e di espressione genica "in press" a novembre 2022.
- studio di pazienti con melanoma multiplo/familiare e relativi parenti (306 pazienti), su cui sono state effettuate indagini per l'individuazione di mutazioni a livello dei geni di suscettibilità per melanoma e raccolti dati di esposizione UV, life-style, caratteristiche clinico-dermoscopiche dei nei e fattori di rischio associati. Individuate mutazioni eterogenee, CDKN2A nel 7,8% dei casi, casi wild-type con varianti patogene nei geni MC1R, OCA2, PTEN, TYR e SLC45A2 (PMID 34442055, 36045597, update risultati in press 2023)
- studio di pazienti affetti da melanoma metastatico sia disease-free dopo chirurgia sia metastatici (n=120), in trattamento con i nuovi farmaci a bersaglio molecolare e immunoterapici. Questi pazienti sono stati studiati con tecniche NGS su piattaforma Illumina per valutare il pattern di mutazione somatica a livello tissutale e circolante. Individuati 89 geni mutati, tra i più rappresentati PTEN, MAP2K1, LRP1B, ROS1, PRKDC, PTPRT, GRIN2A, nessuno di questi è risultato associato a progressione clinica (PMID 32580236, PMID 31266597, PMID 33925387, PMID 34768517)
- studio di valutazione del profilo di metilazione del DNA per la diagnosi del mesotelioma pleurico. Sulla base dei dati ottenuti, il profilo di metilazione del DNA è risultato essere un marker specifico che consente di distinguere il mesotelioma pleurico sia da entità benigne che neoplastiche frequentemente presente in considerazione durante il processo di diagnosi differenziale (PMID 33887463)

Inoltre, sono al momento in corso diversi studi che prevedono il reclutamento di coorti prospettiche e retrospettive tra cui:

- una coorte di pazienti con tumore della testa collo; il reclutamento è proseguito per tutto il 2022
- una coorte di pazienti con tumore del testicolo; il reclutamento è proseguito per tutto il 2022, è stata pubblicato nel 2022 un articolo sulle varianti geniche coinvolte nella metilazione del DNA (PMID: 35700037)
- una coorte retrospettiva di pazienti con tumore della prostata; l'assemblamento della coorte è proseguita per tutto il 2022.

AREA GENETICA MEDICA E FARMACOGENOMICA

Gruppo di lavoro Genetica Medica: Nel corso della quinta annualità, il gruppo si è concentrato sull'analisi dei genetici, l'interpretazione delle varianti in casi con malattie del neurosviluppo e la definizione di nuovi geni malattia attraverso modelli cellulari in vitro di cellule neuronali, quali CAPRIN1, RPH3A. L'uso di modelli cellulari ha permesso studi funzionali morfologici, elettrofisiologici e di trascrittomica. Le spese hanno riguardato l'acquisto di materiale di laboratorio (plastiche), reagenti e piccola strumentazione.

Gruppo di lavoro Farmacogenomica: Nel corso della quinta annualità sono state effettuate ulteriori analisi, questa volta di tipo soprattutto genetico, per i marcatori di danno neurologico e infiammazione, come ad esempio tau o p-tau, in aggiunta ai neurofilamenti; sono stati valutati altri biomarkers, come per esempio mmp9, sia dal punto di vista quantitativo che genetico. Si è continuato anche a valutare l'impatto di altri marcatori/modulatori come la vitamina D sia sulle concentrazioni plasmatiche che sui biomarkers di infiammazione, considerando anche la medicina di genere. Le spese residue hanno riguardato l'acquisto di Kits per le analisi dei diversi biomarkers, inclusi quelli genetici.

AREA TRAPIANTI DI ORGANO SOLIDO

L'area trapianti era articolata in due progetti principali.

1) IDENTIFICAZIONE DI MARCATORI PRECOCI DI RIGETTO NEI TRAPIANTATI DI RENE

Nel corso del V anno di attività, il metodo analitico messo a punto dal gruppo per misurare il DNA libero circolante nei sieri dei pazienti trapiantati è stato brevettato. Anche grazie a un finanziamento competitivo "POC_Instrument" vinto all'inizio del 2022, della durata di 6 mesi (da maggio a ottobre 2022) e del valore di 50.000 euro, è stato possibile preparare un prototipo di test per uso clinico (il prototipo è stato brevettato). Sono al momento in corso trattative con un'azienda leader del settore per avviare le procedure di certificazione e di preparazione del kit per uso

diagnostico.

2) IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE DI MUTAZIONI GENETICHE RESPONSABILI D'INSUFFICIENZA D'ORGANO

Durante la quinta annualità, il gruppo si è dedicato alla preparazione di modelli per studio genotipo-fenotipo del rene policistico autosomico dominante, preparando modelli cellulari in cui riprodurre varianti di interesse nel gene PKD1. Usando la tecnica di CRISPR/Cas9, abbiamo generato un modello di HEK293T knock-out (sia eterozigoti sia omozigoti) introducendo varianti nonsense sull'esone 15 come confermato da sequenziamento Sanger. Abbiamo in seguito validato il modello cellulare confermando un difetto di polimerizzazione dell'actina, una riduzione nella capacità di migrazione, un'aumentata resistenza all'apoptosi delle cellule knock-out. I cloni eterozigoti sono quindi stati usati per introdurre una seconda variante nel gene sfruttando una nuova tecnologia di editing genomico (base editors) che si è rivelata molto efficace. Sono state introdotte 3 seconde varianti diverse in altrettanti modelli cellulari e sono in corso i primi saggi funzionali volti a determinarne il fenotipo.

Descrizione azioni realizzate nel 2022

QUADRO D.5 D.5 Infrastrutture

Nel 2022 sono state realizzate le seguenti infrastrutture di ricerca (€ 375.813,42 fondi MUR):

-BIOBANCA

Da luglio 2021 la Biobanca-TESEO ha ottenuto la certificazione UNI EN ISO 9001:2015 e da febbraio 2021 è parte funzionale del SSD Banche Tessuti e Bioconservatorio dell'AOU Città della Salute e della Scienza di Torino. E' ancora in fase di stesura la documentazione per l'iscrizione della Biobanca all'infrastruttura BBMRI.

Sicurezza campione biologico

La Biobanca dispone di 5 unità di crioconservazione (3 congelatori -80°C e 2 frigo-congelatori combinati +4°C/-20°C). Tale dotazione strumentale garantisce continuità nella raccolta di campioni. La "catena del freddo" gestita dalla biobanca è dotata di un sistema di monitoraggio continuo delle temperature e da un sistema di generatori di corrente alternata in caso di perdita di energia e/o sbalzi di corrente. I protocolli per l'accettazione, processazione e la conservazione del campione seguono le "standard operating procedures" (SOPs) della biobanca e sono sottoposti a validazione e a periodici controlli di qualità. E' inoltre effettuato il costante aggiornamento del personale.

Sicurezza dati clinici

La tracciabilità e la rintracciabilità dei campioni biologici sono gestite da un sistema informatico web-based, GDPR compliant, che supporta la gestione dei dati, con un'interfaccia intuitiva

e una validazione del dato immesso. La sicurezza dei dati personali dei partecipanti è garantita dall'architettura funzionale del software che è caratterizzato da un modulo "pseudonimizzatore" con la funzione di generare pseudonimi e da un secondo modulo "registrazione campione biologico" separato dal primo, con l'obiettivo di tenere separati i dati identificativi dei partecipanti dai dati biologici che li riguardano. L'accesso al sistema avviene in base a profili che vengono attribuiti agli utenti sulla base del singolo studio. Tutti i dati clinici collegati al campione biologico sono registrati sulla piattaforma REDCap nel rispetto dei principi FAIR (findability, accessibility, interoperability, and reusability) della European Open Science Cloud (EOSC). I dati sono trattati in forma anonimizzata o pseudonimizzata e l'accesso al sistema avviene in base a profili attribuiti agli utenti sulla base del singolo studio.

Monitoraggio Progetti attivi

Ad oggi nella Biobanca-TESEO sono depositati collezioni di vario materiale biologico (plasma, siero, liquidi biologici; etc..) di oltre 1600 partecipanti afferenti a 15 trial clinici attivi.

-PIATTAFORMA PER L'ANALISI GENOMICA

La piattaforma genomica, collocata al secondo piano della Palazzina di Genetica, è finalizzata all'applicazione di tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) e di tecnologie basate sugli array. È costituita da un laboratorio per attività "Pre-PCR" e un laboratorio "Post-PCR". Nel corso del 2022 è stata implementata la strumentazione con l'acquisto della Piattaforma Infinium-Illumina che permetterà la preparazione di array finalizzati alla genotipizzazione (SNP-array) nonché all'analisi della metilazione del DNA (EPIC-array) a livello genomico.

È stata rinnovata la licenza del software Alamut Visual per l'analisi di varianti genetiche, particolarmente utile per la valutazione delle varianti di splicing. È 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 migliaia 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 portato alla stesura di un primo manuale di tecniche di estrazione e controllo qualità di DNA/RNA oltre che 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

L'infrastruttura di calcolo è stata utilizzata in maniera significativa, sia per quanto riguarda la parte Cloud (<https://hcp4ai.unito.it/>) sia per l'infrastruttura Occam (<https://c3s.unito.it/>), raggiungendo un utilizzo di oltre 110000 ore di calcolo. Inoltre sono stati attivati backup su nastro remoto per diversi gruppi di ricerca e progetti per diversi terabyte di dati. Nell'ultimo periodo si è deciso di utilizzare il residuo per l'acquisto di due workstation Linux e due portatili ad alte prestazioni, per poter pre-processare i dati in locale prima di utilizzare le risorse distribuite, ottimizzando in questo modo l'utilizzo delle risorse per computazioni concorrenti. Nell'ambito del progetto di dottorato afferente al centro di calcolo sono stati esplorati metodi statistici e metodi di machine learning in differenti contesti:

- Nel contesto del progetto H2020Athlete, finalizzazione di uno studio per la caratterizzazione dell'esposoma dei bambini della coorte di nascita NINFEA e per il confronto di differenti metodologie per studiare il ruolo dell'income familiare come driver dell' esposoma nei primi anni di vita. Metodi utilizzati: modelli di regressione, analisi fattoriale, metodi di clustering (k-prototype, spectral clustering).

- Nel contesto del progetto LifeCycle, da febbraio a giugno 2022 svolgimento di un periodo di formazione presso l' Università di Copenhagen (UCPH). Il lavoro ha riguardato lo studio finalizzato alla stesura di un articolo metodologico dal titolo: "Causal machine learning applied to life-course epidemiology". Sono stati esplorati metodi di machine learning applicati a inferenza causale e causal discovery (Targeted Maximum Likelihood Estimation, Augmented Inverse probability weighting, Double Machine Learning, PC algorithm).

-AREA CARDIOMETABOLICA

Obiettivo: Identificare biomarcatori diagnostici/prognostici mediante approccio “omico”, e creare una coorte prospettica di pazienti con primo riferimento di DMT2, NAFLD/NASH, ipertensione arteriosa, cardiopatia ischemica e fibrillazione atriale. EPICOR. Conclusa la replica in RT-qPCR, degli 8 segnali precedentemente validati, in 348 campioni prospettici per CAD appartenenti alla casistica europea KORA e sono in corso le analisi statistiche. Analisi di WES: condotte le analisi su 184 campioni per cui era già stato prodotto il dato degli sncRNAs; sono in corso le analisi bioinformatiche e statistiche. Analisi del metaboloma: effettuate analisi untargeted per metaboliti e acidi grassi a catena corta mediante spettrometria di massa (MS).

EPOS. Effettuata l'analisi del secretoma (analisi target di 58 citochine/chemochine/fattori di crescita) su 228 pazienti con NAFLD/NASH. L'analisi WES su un sottogruppo di 154 pazienti (46 NAFL vs 108 NASH) ha permesso di identificare geni con specifici pattern mutazionali nei 2 gruppi di pazienti. Concluse le analisi MS untargeted e targeted del metaboloma su 157 pazienti; è in corso l'analisi statistica.

EURODIAB-PCS. L'analisi NGS condotta su 376 soggetti con DMT1 ha identificato 229 sncRNAs. 15 sncRNAs erano deregolati nelle microvescicole isolate dal siero di soggetti con complicanze rispetto a quelli esenti. Dieci miRNAs sono stati validati su 50 soggetti/gruppo e di questi 5 miRNAs si sono confermati deregolati nei casi con nefropatia/retinopatia diabetica rispetto ai controlli all'analisi RT-qPCR. Sono in corso le analisi di accuratezza diagnostica.

RECLUTAMENTO COORTI. Arruolati 571 pazienti (315 DMT2 e 256 NAFLD), di cui sono stati raccolti i dati clinico-anamnestici, somministrati questionari, eseguiti esami

ematochimici/strumentali, e raccolti i campioni biologici. Sono stati analizzati i dati relativi alle funzioni cognitive (RBANS), cronotipo (MCTQ), dieta (EPIC e MDS) e associati con la severità dell'epatopatia o con le comorbidità associate al DM. Nei soggetti DMT2 è stata identificata un'associazione inversa tra l'adesione alla dieta mediterranea e la steatosi epatica. Nei soggetti con NAFLD, è stata identificata un'associazione fra stadio di fibrosi epatica e marcatori ecocardiografici di scompenso cardiaco subclinico (E/E' e GLS).

-AREA ONCOLOGICA

Il gruppo dell'Oncologia ha portato a termine lavori sia di studi "proof of principle", sia di caratterizzazione di nuove coorti, come di seguito dettagliato:

>studio di caratterizzazione somatica e germinale di multiple neoplasie a carico di giovane paziente: pubblicazione dei risultati della descrizione di una nuova sindrome di collisione POLE/PMS2 a marzo 2022 (PMID: 35260767);

>studi di carcinomi mammari "HER2-low": risultati di caratterizzazione genomica integrata, mutazionale e di espressione genica, pubblicati ad agosto 2022 (PMID: 36038884);

>studio dell'espressione del retrotrasposone L1 nel carcinoma della mammella: risultati di correlazione con la prognosi pubblicati a giugno 2022 (PMID: 35741073);

>studio di eterogeneità dell'instabilità microsatellitare in casi di carcinoma del colon con campi di perdita completa delle 4 proteine del mismatch repair: risultati dell'analisi mutazionale e di espressione genica "in press" a novembre 2022.

>studio di pazienti con melanoma multiplo/familiare e relativi parenti (306 pazienti), su cui sono state effettuate indagini per l'individuazione di mutazioni a livello dei geni di suscettibilità per melanoma e raccolti dati di esposizione UV, life-style, caratteristiche clinico-dermoscopiche dei nei e fattori di rischio associati. Individuate mutazioni eterogenee, CDKN2A nel 7,8% dei casi, casi wild-type con varianti patogene nei geni MC1R, OCA2, PTEN, TYR e SLC45A2 (PMID 34442055, 36045597, update risultati in press 2023)

>studio di pazienti affetti da melanoma metastatico sia disease-free dopo chirurgia sia metastatici (n=120), in trattamento con i nuovi farmaci a bersaglio molecolare e immunoterapici. Questi pazienti sono stati studiati con tecniche NGS su piattaforma Illumina per valutare il pattern di mutazione somatica a livello tissutale e circolante. Individuati 89 geni mutati, tra i più rappresentati PTEN, MAP2K1, LRP1B, ROS1, PRKDC, PTPRT, GRIN2A, nessuno di questi è risultato associato a progressione clinica (PMID 32580236, PMID 31266597, PMID 33925387, PMID 34768517)

>studio di valutazione del profilo di metilazione del DNA per la diagnosi del mesotelioma pleurico. Sulla base dei dati ottenuti, il profilo di metilazione del DNA è risultato essere un marker specifico che consente di distinguere il mesotelioma pleurico sia da entità benigne che neoplastiche frequentemente presente in considerazione durante il processo di diagnosi differenziale (PMID 33887463) Inoltre, sono al momento in corso diversi studi che prevedono il reclutamento di coorti prospettiche e retrospettive tra cui:

>una coorte di pazienti con tumore della testa collo; il reclutamento è proseguito per tutto il 2022

>una coorte di pazienti con tumore del testicolo; il reclutamento è proseguito per tutto il 2022, è stata pubblicato nel 2022 un articolo sulle varianti geniche coinvolte nella metilazione del DNA (PMID: 35700037)

>una coorte retrospettiva di pazienti con tumore della prostata; l'assemblamento della coorte è proseguita per tutto il 2022.

-AREA GENETICA MEDICA E FARMACOGENOMICA

Gruppo di lavoro Genetica Medica: Nel corso della quinta annualità, il gruppo si è concentrato sull'analisi dei genetici, l'interpretazione delle varianti in casi con malattie del neurosviluppo e la definizione di nuovi geni malattia attraverso modelli cellulari in vitro di cellule neuronali, quali CAPRIN1, RPH3A. L'uso di modelli cellulari ha permesso studi funzionali morfologici, elettrofisiologici e di trascrittomica. Le spese hanno riguardato l'acquisto di materiale di laboratorio (plasticheria), reagenti e piccola strumentazione.

Gruppo di lavoro Farmacogenomica: Nel corso della quinta annualità sono state effettuate ulteriori analisi, questa volta di tipo soprattutto genetico, per i marcatori di danno neurologico e infiammazione, come ad esempio tau o p-tau, in aggiunta ai neurofilamenti; sono stati valutati altri biomarkers, come per esempio mmp9, sia dal punto di vista quantitativo che genetico. Si è continuato anche a valutare l'impatto di altri marcatori/modulatori come la vitamina D sia sulle concentrazioni plasmatiche che sui biomarkers di infiammazione, considerando anche la medicina di genere. Le spese residue hanno riguardato l'acquisto di Kits per le analisi dei diversi biomarkers, inclusi quelli genetici.

-AREA TRAPIANTI DI ORGANO SOLIDO

L'area trapianti era articolata in due progetti principali.

IDENTIFICAZIONE DI MARCATORI PRECOCI DI RIGETTO NEI TRAPIANTATI DI RENE

Nel corso del V anno di attività, il metodo analitico messo a punto dal gruppo per misurare il DNA libero circolante nei sieri dei pazienti trapiantati è stato brevettato. Anche grazie a un finanziamento competitivo "POC_Instrument" vinto all'inizio del 2022, della durata di 6 mesi (da maggio a ottobre 2022) e del valore di 50.000 euro, è stato possibile preparare un prototipo di test per uso clinico (il prototipo di test è stato brevettato). Sono al momento in corso trattative con un'azienda leader del settore per avviare le procedure di certificazione e di preparazione del kit per uso diagnostico.

IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE DI MUTAZIONI GENETICHE RESPONSABILI D'INSUFFICIENZA D'ORGANO

Durante la quinta annualità, il gruppo si è dedicato alla preparazione di modelli per studio genotipo-fenotipo nel rene policistico autosomico dominante, preparando modelli cellulari in cui riprodurre varianti di interesse nel gene PKD1. Usando la tecnica di CRISPR/Cas9, abbiamo generato un modello di HEK293T knock-out (sia eterozigoti sia omozigoti) introducendo varianti nonsense sull'esone 15 come confermato da sequenziamento Sanger. Abbiamo in seguito validato il modello cellulare confermando un difetto di polimerizzazione dell'actina, una riduzione nella capacità di migrazione, un'aumentata resistenza all'apoptosi delle cellule knock-out. I cloni eterozigoti sono quindi stati usati per introdurre una seconda variante nel gene sfruttando una nuova tecnologia di editing genomico (base editors) che si è rivelata molto efficace. Sono state introdotte 3 seconde varianti diverse in altrettanti modelli cellulari e sono incorso i primi saggi funzionali volti a determinarne il fenotipo.