



Ministero dell'Università e della Ricerca

Direzione generale della ricerca

**FONDO INTEGRATIVO SPECIALE PER LA RICERCA (FISR)**

### FONDO INTEGRATIVO SPECIALE PER LA RICERCA (FISR)

CODICE PROGETTO	FISR2020IP_00725
AREA	Life Sciences
TITOLO DEL PROGETTO	Mini-cuori paziente-specifici per stratificare il rischio di miocardite a seguito di infezione da SARS-CoV-2
ACRONIMO	SASSOON
SOGGETTI PROPONENTI	Università degli Studi di MILANO
	Università degli Studi di PADOVA
IMPORTO AGEVOLAZIONE	56.518,13 €
BREVE DESCRIZIONE	<p>Le principali attività previste dal progetto erano le seguenti:</p> <p>A1: Generare cellule iPSC da pazienti COVID-19 con hs- TnI&gt;99°p con o senza diagnosi di miocardite (UNIMI).</p> <p>A2: Differenziamento di iPSC paziente-specifiche in cardiomiociti (CM), fibroblasti cardiaci (FC) e macrofagi (MP) e costruzione di mini-cuori paziente-specifici (UNIMI, UNIPD- lab1).</p> <p>A3: Infezione con SARS-CoV-2 e caratterizzazione dei suoi effetti (UNIPD-lab2, UNIPD, UNIMI).</p> <p>A4: Correlazione tra dati <i>in vitro</i> sui mini-cuori e sviluppo di miocardite nei pazienti da cui sono stati derivati (UNIMI).</p>

## RISULTATI RAGGIUNTI

### **A1: Generare cellule iPSC da pazienti COVID-19 con hs-TnI >99°p con o senza diagnosi di miocardite.**

Per questo progetto sono stati reclutati un totale di 4 pazienti COVID-19 con hsTnI >99°p nella fase acuta (3 maschi e 1 femmina). Più in dettaglio, sono stati arruolati 2 pazienti con fenotipo di miocardite grave e 2 senza, con un'età media di 64,2 anni. Nella Tabella 1 è riportato il codice che abbiamo assegnato ai soggetti a tutela della privacy, unitamente ad una breve descrizione delle loro caratteristiche.

PAZIENTE	ETA'	SESSO	COVID-19	MIOCARDITE
SAS1	50	Maschio	+	+
SAS2	61	Maschio	+	+
SAS3	84	Maschio	+	-
SAS4	62	Femmina	+	-

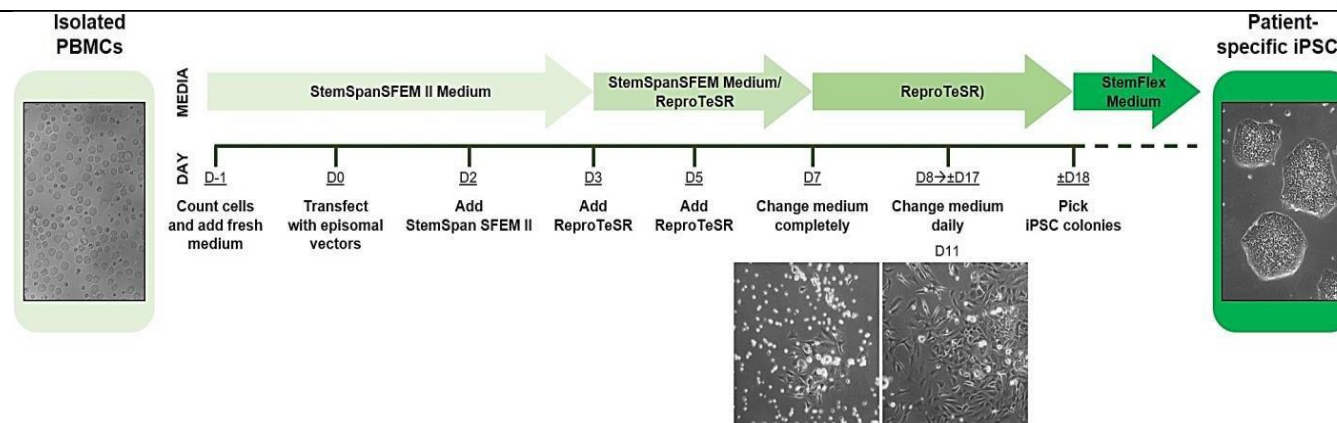
### **Tab. 1: Pazienti arruolati**

Lista e caratteristiche generali di tutti i pazienti arruolati.

Dopo il reclutamento dei pazienti abbiamo proceduto con la raccolta di sangue intero. Nello specifico, per ogni paziente abbiamo raccolto un campione di sangue venoso da cui abbiamo isolato i PBMCs, necessari per la generazione di iPSCs, e il plasma, necessario per la misurazione di fattori specifici non quantificati dai test ospedalieri di routine.

I PBMCs isolati dai pazienti sono stati espansi in coltura e bancati, prima di essere riprogrammati in iPSCs mediante elettroporazione con i fattori di trascrizione umani L-MYC, LIN28, SOX2, KLF4, OCT3/4, contenuti all'interno di vettori episomali non integrativi. Abbiamo impiegato questo metodo di riprogrammazione anziché quello basato sull'uso del Sendai virus (come inizialmente previsto per questo progetto) perché il protocollo era già stato ottimizzato in laboratorio e i reagenti già disponibili; considerando i tempi del progetto, e soprattutto la rimodulazione del budget, non è stato possibile implementare un nuovo protocollo di riprogrammazione.

Nel dettaglio, il protocollo utilizzato è riportato in Fig. 1 e prevede, dopo trasfezione con i vettori sopra citati, un passaggio graduale del mezzo di coltura da StemSpanSFEM II, ideale per i PBMCs, a ReproTeSR, che favorisce la maturazione delle colonie di iPSCs appena formate. A partire dal giorno 7, infatti, il ReproTeSR è stato cambiato quotidianamente fino a quando le colonie non erano pronte per essere raccolte. Dopo 14-21 giorni di riprogrammazione (il tempo è specifico per ogni paziente), siamo stati in grado di selezionare manualmente tra 2 e 11 cloni per ogni paziente e calcolare un'efficienza di riprogrammazione compresa tra 0,001% e 0,008%.



**Fig. 1: Generazione delle iPSCs**

Diagramma di Gantt per la riprogrammazione dei PBMCs in iPSCs: le immagini a contrasto di fase mostrano le cellule in diverse fasi del protocollo.

I cloni appena ottenuti sono stati successivamente sottoposti ad ulteriore espansione fino al passaggio 10 e grandi stock di cellule sono stati congelati ad ogni passaggio. In totale, abbiamo crioconservato 719 fiale di iPSCs COVID-19. La Tabella 3 riassume tutti gli output di riprogrammazione dalle linee di iPSCs generate.

Da notare, la riprogrammazione di SAS4 è stata eseguita 2 volte poiché sono state generate solo poche colonie.

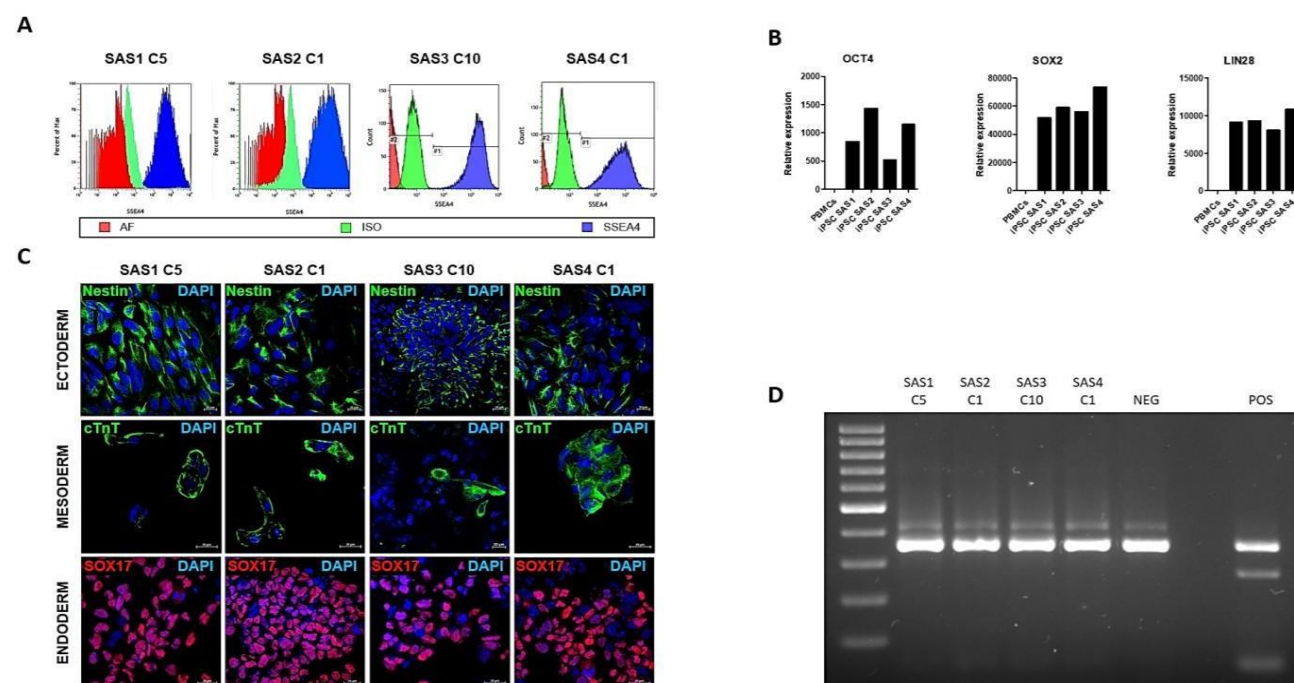
SUBJECT	PBMC ISOLATION	FROZEN VIALS (PBMCs)	REPROGRAMMING	PICKING DAY	N. OF CLONES	REPROGRAMMING EFFICIENCY	FROZEN VIALS (iPSCs)	FACS	MYCO
SAS1	8.000.000 cells	4	OK	Day 14 + Day 17	11	0.008%	275	OK	Free
SAS2	11.000.000 cells	4	OK	Day 17 + Day 21	7	0.005%	199	OK	Free
SAS3	6.460.000 cells	4	OK	Day 17	10	0.007%	177	OK	Free
SAS4	8.533.333 cells	4	1) Few clones 2) Few clones	1) Day 17 2) Day 20	1) 3 2) 2	1) 0.002% 2) 0.001%	68	OK	Free

**Tabella 2: Report della riprogrammazione delle iPSCs COVID 19**

Tabella riepilogativa degli output di riprogrammazione delle iPSC COVID 19 generate.

Una volta che le linee iPSCs generate dai pazienti COVID-19 hanno raggiunto il passaggio 10, abbiamo eseguito per ciascun clone una caratterizzazione di base volta a valutarne la morfologia e l'espressione del fattore di trascrizione di pluripotenza SSEA4. Questa serie di esperimenti ci ha permesso di selezionare per ciascun paziente il miglior clone da portare avanti per una caratterizzazione più approfondita (non prevista in una fase iniziale dello studio) e per gli esperimenti necessari per completare questo progetto. Nello specifico, abbiamo selezionato SAS1 C5, SAS2 C1, SAS3 C10 e SAS4 C1.

I risultati della caratterizzazione più profonda dei cloni selezionati sono riportati in Fig. 2. Come dimostrato dall'analisi FACS e dagli studi di espressione genica, le iPSCs generate esprimono un alto livello dei principali marcatori di superficie e fattori di trascrizione di pluripotenza (SSEA4, OCT4, SOX2, Lin28) (Fig. 2A-B). Inoltre, le iPSCs COVID-19 possiedono la capacità di differenziare verso i lignaggi ectodermici, mesodermici ed endodermici (Fig. 2C) e sono prive di contaminazione da micoplasma (Fig. 2D).



**Fig. 2: Caratterizzazione delle iPSCs COVID-19**

A) Istogramma rappresentativo dell'analisi FACS per il marker di pluripotenza SSEA4 nelle iPSCs COVID-19. AF: autofluorescenza; ISO: controllo isotipico. B) qRT-PCR per i principali fattori di trascrizione della pluripotenza, che mostra la loro espressione nelle iPSCs COVID-19 generate. I dati sono relativi ai PBMCs COVID-19 (controllo negativo) e sono stati normalizzati utilizzando GAPDH come gene housekeeping. C) Saggio di immunofluorescenza che mostra la capacità delle iPSCs COVID-19 di differenziare in tutti e tre gli strati germinali: ectoderma (Nestin, verde), mesoderma ( $\alpha$ SMA, rosso), endoderma (Sox17, verde); i nuclei sono stati colorati con DAPI. Scala = 50  $\mu$ m. D) Test del micoplasma che rivela l'assenza di contaminazione da micoplasma nelle iPSC COVID-19 generate.

### **A2: Differenziamento di iPSC paziente-specifiche in CM, FC e macrofagi e costruzione di mini-cuori paziente specifici.**

Una volta completata la caratterizzazione delle linee iPSCs COVID-19, si è proceduto al loro differenziamento nelle principali cellule di interesse cardiaco. Avevamo infatti pianificato di differenziare le iPSCs in cardiomiociti (CMs), fibroblasti cardiaci (FC) e macrofagi. I protocolli per la generazione dei primi due tipi cellulari erano già stabilizzati nel nostro laboratorio; il protocollo per la generazione dei macrofagi, invece, ha richiesto ulteriori ottimizzazioni che ci hanno impedito di generare le cellule per questo progetto. Abbiamo quindi deciso di sostituire i macrofagi con le cellule endoteliali (ECs), sempre differenziate a partire dalle iPSCs COVID-19. Il lavoro di differenziamento delle iPSCs in CMs, ECs e CFs è descritto nei prossimi paragrafi.

Il protocollo per generare iPSC-CMs prevede prima il differenziamento cardiaco tramite modulazione temporale della via di segnalazione Wnt utilizzando piccole molecole, poi la selezione metabolica con lattato per massimizzare l'arricchimento dei CMs. Gli studi sull'espressione genica condotti su iPSC-CM COVID-19 mostrano l'espressione di diversi fattori di trascrizione cardiaca, come MYH6, MYH7,  $\alpha$ -actinina e KCNJ2 (Fig. 3).

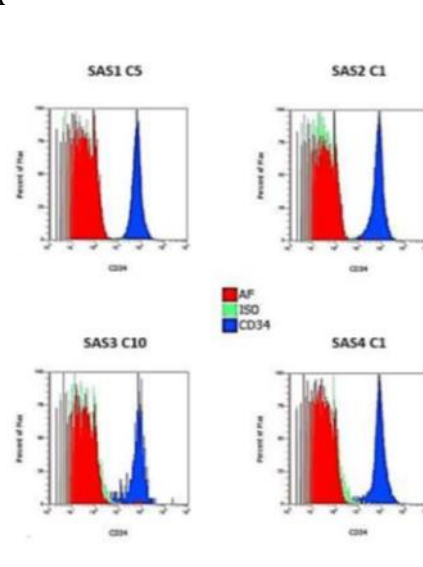


**Fig. 3: Differenziamento cardiaco delle iPSCs COVID-19**

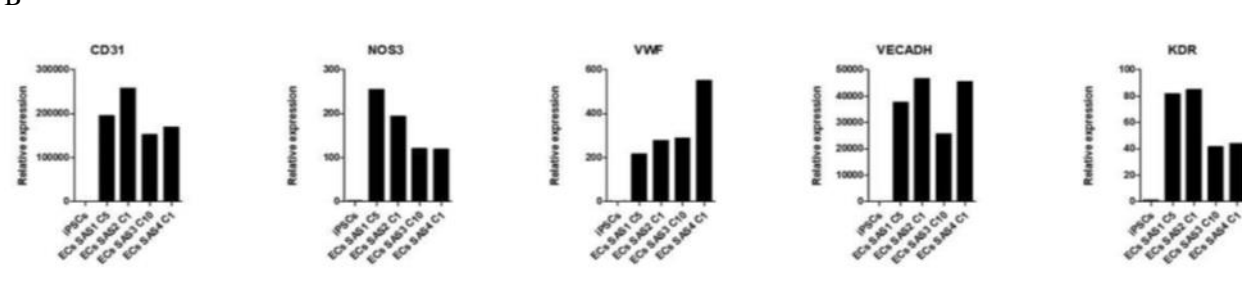
qRT-PCR per alcuni geni specifici del cuore, che mostra la loro espressione nei iPSC-CMs COVID-19 generati. I dati sono relativi alle iPSC COVID-19 (controllo negativo) e sono stati normalizzati utilizzando GAPDH come gene housekeeping.

Il protocollo per generare le iPSC-ECs prevede l'induzione del mesoderma cardiaco con un cocktail di citochine specifiche, seguita dalla specificazione del destino dell'endotelio e dalla selezione immunomagnetica per CD34, un marker di progenitori endoteliali, al giorno 6. Come mostrato, quasi il 100% delle cellule ottenute dopo la selezione è positivo per CD34 (Fig.4A). Inoltre, le iPSC-ECs COVID-19 esprimono un alto livello di diversi marcatori endoteliali specifici (CD31, NOS3, VWF, VECADH e KDR) rispetto alle iPSCs COVID-19, utilizzate come controllo negativo (Fig. 4B).

A



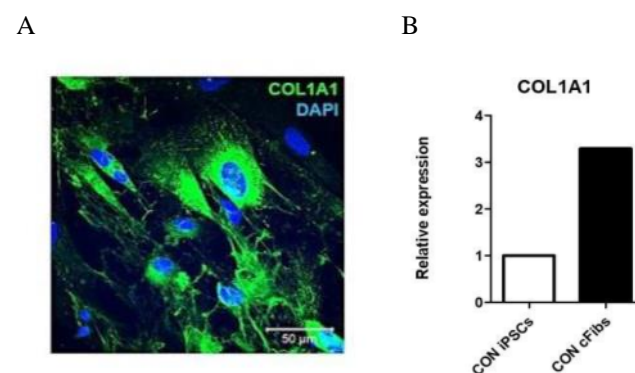
B



**Fig. 4: Differenziamento endoteliale delle iPSCs**

A) Istogramma rappresentativo dell'analisi FACS per il marcatore di differenziamento delle cellule endoteliali CD34 in iPSC-ECs COVID-19. ISO: controllo isotipico. B) qRT-PCR per alcuni geni endoteliali specifici, che mostra la loro espressione nelle iPSC-ECs COVID-19 generate. I dati sono relativi alle iPSC (controllo negativo) e sono stati normalizzati utilizzando GAPDH come gene housekeeping.

Il protocollo per generare iPSC-FC include prima, il differenziamento delle iPSCs in cellule epicardiche attraverso l'uso di piccole molecole, e poi il differenziamento delle cellule ottenute in FC. Considerando i lunghi tempi per la generazione di questo tipo cellulare, abbiamo fornito a UNIPD FC differenziati a partire da una linea di controllo, perché erano già disponibili e caratterizzati per l'espressione dello specifico marcatore di fibroblasti COL1A1 sia a livello genico che proteico (Fig. 5A-B). I collaboratori hanno così potuto procedere al settaggio delle condizioni per l'infezione di questo tipo cellulare con SARS-CoV-2.



**Fig. 5: Differenziamento delle iPSCs in CFs**

A) Immagine rappresentativa di IF su iPSC-CFs colorati per COL1A1 (verde), uno specifico marcatore di fibroblasti. I nuclei sono stati colorati con DAPI. Scala: 50 μm. B) qRT-PCR specifica per COL1A1, che mostra la sua espressione nei CON iPSC-CFs generati. I dati sono relativi alle iPSCs (controllo negativo) e sono stati normalizzati utilizzando GAPDH come gene housekeeping.

I protocolli di differenziamento delle iPSCs in CMs, ECs e FCs sono stati eseguiti almeno 4 volte per ogni linea cellulare, in modo da avere un numero adeguato di replicati biologici per l'esecuzione degli esperimenti di questo progetto. Le cellule ottenute sono poi state congelate e spedite a UNIPD per la costruzione dei mini-cuori paziente-specifici e la loro successiva infezione con SARS-CoV-2.

### **A3: Infezione con SARS-CoV-2 e caratterizzazione dei suoi effetti**

Le infezioni delle cellule generate a partire dai pazienti COVID-19 sono state eseguite da UNIPD (cfr. rendicontazione specifica). La caratterizzazione degli effetti di tali infezioni non è stata ancora effettuata a causa della rimodulazione del budget che non ha permesso l'arruolamento di una figura dedicata allo svolgimento del progetto e a ritardi nella consegna di alcuni reagenti necessari.

### **A4: Correlazione tra dati in vitro sui mini-cuori e sviluppo di miocardite nei pazienti da cui sono stati derivati**

Una volta inviate a UNIPD le cellule differenziate dalle iPSCs COVID-19 e, nell'attesa che venissero generati e infettati i mini-cuori paziente-specifici, ci siamo portati avanti con la raccolta dei dati clinici dei pazienti arruolati. La Tabella 3 riporta alcuni dati che saranno poi correlati con i dati in vitro sui mini-cuori infettati.



	SAS1	SAS2	SAS3	SAS4
ETA' (anni)	49	60	83	67
STORIA FAMILIARE DI MALATTIA CORONARICA	0	0	0	0
PREGRESSO IM	0	0	0	0
PREGRESSA MIOCARDITE	0	0	0	0
ACE-INIBITORI	1	1	0	1
SARTANI	0	0	0	0
BETA-BLOCCANTI	0	1	0	1
MINERALCORTICOIDI	0	1	0	0
AMINOSALICILATI	0	1	0	1
STATINE	1	1	0	1
HS-TnI picco (ng/l)	7132	21	2179	22
CRP (mg/l)	6	0,6	11,4	245,8

**Tab. 3: Dati clinici dei pazienti arruolati.**

Lista dei dati clinici raccolti, relativi a storia clinica, patologie pregresse, terapie in corso e dosaggio dei marcatori di danno cardiaco e di infiammazione. IM: infarto miocardico; ACE-INIBITORI: Inibitori dell'Enzima di Conversione dell'Angiotensina; HS-TnI: Troponina ad alta sensibilità; CRP: Proteina C reattiva.

IMPATTI	<p>L' impatto scientifico consiste principalmente nella creazione di mini-cuori paziente-specifici a partire da pazienti che hanno avuto il Covid-19 e che hanno sviluppato o meno miocardite come conseguenza dell'infezione. Abbiamo dimostrato che questi mini-cuori si possono formare in vitro, si possono infettare con SARS-CoV2 e usare per studiare le conseguenze dell'infezione con diversi parametri. Tali modelli potranno essere utilizzati, oltre che per studiare le conseguenze dell'infezione da SARS-CoV2 su diversi tipi cellulari coltivati in 3D anche per la ricerca di nuovi farmaci antivirali consentendo di valutare, oltre all'effetto antivirale, anche eventuali fenomeni di cardiotossicità.</p> <p>Il modello sviluppato in questo progetto potrà essere adottato da aziende farmaceutiche o biotecnologiche come modello di screening per suscettibilità da infezione SARS-CoV2 e da altri virus cardiotropici, questo risulterà nel possibile sviluppo o identificazione di nuovi farmaci antivirali, oppure protettivi per il cuore.</p> <p>Inoltre, questo modello paziente-specifico potrà anche essere adottato in futuro – quando la tecnologia e la robotica lo permetterà – per predizioni circa la risposta all'infezione da SARS-CoV2.</p>
---------	---