

ANALISI DELLE DINAMICHE CELLULARI NEI PROCESSI NEURO E METABOLICO-DEGENERATIVI EVOLUTIVAMENTE CONSERVATI

Tra i principali elementi che contraddistinguono l'uomo dai suoi progenitori vi è lo sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC). L'aspetto anatomicamente più evidente è il progressivo aumento di massa e connessioni neuronali nella componente corticale sia cerebrale che cerebellare. La transizione tra paleo, archi e neocorteccia ha caratterizzato un'evoluzione della propriecezione che è passata dal semplice istinto di reazione e fuga ad elementi più elevati quali lo sviluppo di emozioni e di una memoria a lungo termine, culminando infine nella complessità costituita da coscienza, ragionamento e linguaggio. Questo processo, durato milioni di anni, si è accompagnato ad un repentino aumento nell'aspettativa di vita: ciò ha condotto all'emersione di processi neurodegenerativi, un tempo raramente evidenti, caratterizzati da una regressione delle facoltà cognitive e motorie. Nonostante i notevoli progressi compiuti negli ultimi decenni, il processo di involuzione neuronale è ancora limitatamente esplorato, così come è meritevole di approfondimento il legame tra l'invecchiamento cellulare ed altre patologie neurologiche tra le quali si annoverano sclerosi laterale amiotrofica, malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson, corea di Huntington, atassia di Friedreich, sindrome di Lowe (Azam et Al., 2021). Sono numerosi gli aspetti elusivi di questa classe di patologie: spesso è sconosciuta l'etiologia così come il processo patogenetico e ancor più le componenti ambientali (qualità della vita, esposizione professionale, inquinanti) che possono innescare la comparsa o favorirne la progressione. Instabilità genomica, alterazioni epigenetiche, squilibri metabolici e disfunzioni mitocondriali sono alcuni dei più promettenti oggetti di studio che possono fornire elementi utili all'identificazione di nuovi approcci terapeutici (Hou et Al., 2019).

Al fine di caratterizzare le modificazioni cellulari, tissutali e sistemiche in corso di patologia neurodegenerativa si vogliono utilizzare le più recenti tecnologie di sequenziamento del genoma. Con l'avvento delle tecniche "NGS" (*Next Generation Sequencing*) è infatti possibile sequenziare massivamente e parallelamente interi genomi con tempi e costi contenuti. Una delle più innovative metodiche NGS è il sequenziamento dell'RNA da singole cellule o "*single-cell RNA sequencing*" (Tang et Al., 2009). Questa procedura consente di rilevare tutti gli mRNA trascritti nel tessuto in esame risalendo, inoltre, alla cellula di provenienza. Ciò è reso possibile grazie ad un raffinato sistema di cattura attraverso il quale le cellule del tessuto in studio vengono singolarmente isolate e i relativi RNA messaggeri etichettati con "codici a barre" nucleotidici che, dopo opportuna retrotrascrizione, amplificazione e sequenziamento, consentono la corretta identificazione e quantificazione dei geni espressi. Le successive fasi prevedono un'articolata analisi bioinformatica dei dati grezzi attraverso l'utilizzo di differenti pacchetti software negli ambienti di sviluppo R e Python. Grazie all'utilizzo di software dedicati come Seurat (Satija et Al., 2015), tali dati vengono filtrati secondo stringenti criteri di qualità e ridotti di complessità attraverso una serie di passi successivi (normalizzazione, PCA, riduzione dimensionale). L'oggetto così costituito ben si presta ad un'approfondita analisi biologica: in primo luogo è possibile riconoscere e quantificare ogni tipo cellulare presente nel tessuto e quindi individuare i rapporti numerici tra diverse tipologie, confrontando la condizione di normalità a quelle in corso di involuzione; in tal modo si possono evidenziare i tipi cellulari che vanno incontro ad iperplasia (o deplezione) col progredire della malattia e rilevare gli eventuali infiltrati di cellule immunitarie, caratterizzandone ruolo e funzione. L'analisi dei geni

differentemente espressi permette di risalire ai processi cellulari e metabolici attivati o silenziati in ognuna delle migliaia di cellule componenti il saggio e, in aggiunta, è possibile rilevare quali sono i mediatori del processo patologico, individuando enzimi o fattori favorenti la patogenesi o, all'estremo, evidenziando i singoli geni che possono rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico (Ximerakis et Al., 2019). Le coppie ligando-recettore possono essere individuate al fine di ipotizzare canali comunicativi tra cellule sia attraverso mediatori che per contatto diretto. Un ulteriore algoritmo bioinformatico consente di rilevare le velocità e le traiettorie cellulari, ovvero di ricostruire le transizioni maturative da uno stato biologico ad un altro.

La metodologia appena descritta si vuole applicare allo studio del SNC in ogni componente cellulare (neuroni, cellule di supporto, stromali ed immunitarie) in diverse condizioni fisiopatologiche (invecchiamento e neurodegenerazione) e di stress ambientali (tossine, inquinanti). Tale studio si articola essenzialmente in tre fasi:

- preliminarmente, per un periodo di 12 mesi, si vogliono analizzare i set di dati già presenti in letteratura e nei database biologici (sia umani che di organismi modello quali *Danio rerio* e *Mus musculus*) eseguendo una completa elaborazione *de novo* dei diversi stati fisiopatologici connessi al processo evolutivo;
- le evidenze raccolte saranno propedeutiche alla seconda parte dello studio, da realizzarsi nei successivi 12 mesi, nella quale si andranno a disegnare esperimenti *single-cell* originali per ampliare ed approfondire le evidenze rilevate;
- conclusivamente si dedicheranno 6 mesi per sintetizzare i risultati ottenuti con approccio bioinformatico e di apprendimento automatico (*machine-learning*), validandoli con metodologie sperimentali quali la microscopia, la citometria a flusso e l'immunofluorescenza. Saranno quindi impiegati ulteriori 6 mesi per la compilazione della tesi e la disseminazione dei risultati.



Azam, S., Haque, M. E., Balakrishnan, R., Kim, I. S., and Choi, D. K. (2021). The Ageing Brain: Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration. *Front. Cell. Dev. Biol.* 9, 683459.

Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., and Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* 15, 565-581.

Satija, R., Farrell, J.A., Gennert, D., Schier, A.F., and Regev, A. (2015). Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat. Biotechnol.* 33, 495-502.

Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B. B., Siddiqui, A., Lao, K., and Surani, M. A. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature methods* 6, 377–382.

Ximerakis, M., Lipnick, S. L., Innes, B. T., Simmons, S. K., Adiconis, X., Dionne, D., Mayweather, B. A., Nguyen, L., Niziolek, Z., Ozek, C., Butty, V. L., Isserlin, R., Buchanan, S. M., Levine, S. S., Regev, A., Bader, G. D., Levin, J. Z., and Rubin, L. L. (2019). Single-cell transcriptomic profiling of the aging mouse brain. *Nat. Neurosci.* 22, 1696-1708.