

Direzione Didattica e Formazione
Settore Formazione di terzo livello e relazioni internazionali
Ufficio Dottorati di ricerca e scuole di specializzazione

SCHEDA LINEA DI RICERCA
(Ex DM 1061 del 10.08.2021)

Corso di dottorato: SCIENZE DELLA NUTRIZIONE

Tematica

“Dottorati e contratti di ricerca su tematiche dell'innovazione”

“Dottorati su tematiche Green”

Linea di ricerca (coerente con le traiettorie definite dalla Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente (SNSI) 2014-2020, dal Programma nazionale per la ricerca (PNR) 2021-2027. (art. 3, comma 2 del DM 1061/2021.

1. Il progetto, in linea con le direttive europee del fondo REACTEU, si propone di valorizzare il capitale umano impegnato nel progetto attraverso un team multidisciplinare internazionale. Misurabilità dei risultati attesi e impatto potenziale dell'intervento con riferimento alle finalità del REACTEU. Il progetto 3Sgreen consentirà di ottenere target quantificabili e misurabili derivanti dallo studio degli organoidi, inoltre consentirà di sviluppare un modello di piattaforma tecnologica a basso impatto ambientale per lo sviluppo rapido di farmaci innovativi. Grazie a studi di bioinformatica e di intelligenza artificiale saranno inoltre sviluppati modelli predittivi di sviluppo di alterazioni genetiche e strutturali causative di malattie del neurosviluppo.

2. Il progetto proposto con le sue finalità presenta diversi profili di coerenza con l'agenda del più recente Programma Nazionale per la Ricerca 2021-2027- ambito Salute.

La piattaforma grazie alla possibilità di ottenere rapidamente test di più farmaci in contemporanea fornirà elementi che favoriranno non solo vantaggi in termini di salute dei pazienti trattati ma anche la sostenibilità economica del sistema sanitario. La piattaforma di organoidi consentirà di ottenere dei target da applicare poi nei programmi di screening e drug discovery. Questi temi sono coerenti con gli obiettivi strategici del PNR2021-2027 (Articolazioni 1 e 7) di creazione di banche di tessuti e fluidi biologici corredate di dati clinici di pazienti affetti da NCDs (non communicable diseases) e di modelli preclinici di malattia. Inoltre, ci si propone di sviluppare progetti di ricerca clinica basati sulla “real world evidence” e “patient centric” per la verifica dell'efficacia delle terapie. Il progetto proposto è coerente anche con l'obiettivo di voler migliorare la capacità diagnostica e terapeutica

delle malattie della prima infanzia ad origine sconosciuta, delle malattie rare riducendone l'impatto grazie a una migliore comprensione delle stesse e allo sviluppo di tecnologie sanitarie efficaci.

Inoltre il progetto è in linea con gli interventi di valorizzazione del capitale umano del mondo della ricerca e dell'innovazione: il progetto si prefigge di formare e potenziare i giovani ricercatori, favorirà il trasferimento delle conoscenze dal sistema accademico a quello dell'industria e viceversa con un forte impatto sulla cultura dell'intero sistema Paese. Tale processo avverrà utilizzando i tre pilastri del PRN: internazionalizzazione, interdisciplinarietà, intersettorialità. Infatti, il progetto sarà svolto in collaborazione con un'azienda privata che permetterà un percorso anche all'estero per il ricercatore (facoltativo) che verrà effettuato se in linea con le fasi di sviluppo del progetto. Il progetto prevede un team multidisciplinare di personale docente e non che lavorerà a stretto contatto con il ricercatore tra questi genetisti, epigenetisti, pediatri, geriatri e ingegneri informatici. Pertanto, il team coinvolto sarà in grado di garantire l'interdisciplinarietà e intersettorialità del progetto.

Docente referente della linea di ricerca: Prof. Gianvincenzo Zuccotti

Impresa

Denominazione: A³Cube

N. mesi da svolgere in impresa (minimo 6 mesi massimo 12 mesi): 6 mesi

Riferimento aziendale (numero telefono e indirizzo e-mail):

Periodo di studio e di ricerca all'estero (facoltativo)

N. mesi da svolgere all'estero (minimo 6 mesi massimo 12 mesi): 6 mesi

Indicare se già disponibile la sede di soggiorno all'estero: A³Cube Sede di San Jose - California

Titolo: Piattaforma green di terapie avanzate: sviluppo di organoidi cerebrali come modelli sperimentali Specifici, Sicuri e Sostenibili per lo studio e la cura delle malattie del neurosviluppo – (3Sgreen)

-Title: Green platform of advanced therapies: development of cerebral organoids as Specific, Safe and Sustainable experimental models for the study and treatment of neurodevelopmental diseases - (3Sgreen)

Target (bando): 3Sgreen è focalizzato su temi orientati alla conservazione dell'ecosistema e alla promozione di uno sviluppo sostenibile, quale contributo per promuovere la ripresa verde. Il progetto **3Sgreen** ha l'obiettivo finale di creare una piattaforma innovativa, sicura e sostenibile atta a promuovere la medicina di precisione nell'ambito delle malattie del neurosviluppo generando organoidi e mini-brain per lo sviluppo di terapie avanzate. Al momento non esiste sul territorio nazionale una piattaforma tecnologica così strutturata e con questi obiettivi e finalità. Sarà possibile ottenere informazioni sui meccanismi responsabili di malattie rare e rarissime a carico del cervello di soggetti pediatrici individuando anche nuove possibili risposte terapeutiche senza utilizzare modelli animali agendo inoltre sull'ecosistema in quanto non verranno prodotti scarti derivanti dal mantenimento degli animali. Il progetto 3Sgreen grazie alla sua struttura e ai risultati ottenuti risolverà con un approccio sostenibile una problematica di ricerca ancora aperta nell'ambito SSN quale quella di nuovi farmaci.

Descrizione (3000 caratteri minimo) in italiano
(parole chiave: iPSCs, organoidi, medicina personalizzata)

Background

Le malattie del neurosviluppo comprendono le disabilità intellettive o ritardi dello sviluppo (ID/DD), le malattie dello spettro autistico (ASD, autism spectrum disorders), da deficit dell'attenzione/iperattività (ADHD), la schizofrenia, i disturbi bipolari (BD) e l'epilessie. Studi clinici e epidemiologici evidenziano che i ID esordiscono spesso in concomitanza con altre malattie del neurosviluppo e/o neuropsichiatriche, condividendo con esse segni e sintomi. Le malattie dello sviluppo intellettivo (IDD; acronimo dall'inglese Intellectual Developmental Disorders) comprendono un gruppo di malattie ad esordio pediatrico, caratterizzate da gravi deficit nelle funzioni intellettive e nel comportamento adattivo. Le IDD possono manifestarsi con sintomatologie da lievi a severe e possono insorgere in maniera isolata (non sindromica) o in concomitanza con altre caratteristiche (sindromiche), quali malformazioni congenite, dismorfismi facciali, statura sproporzionata, problemi alla vista/udito o altre diagnosi neurologiche e cliniche. Nello specifico, le malattie dello spettro autistico, le malattie da deficit dell'attenzione e iperattività (ADHD) e l'epilessia sono spesso malattie che insorgono in contemporanea, suggerendo la presenza di fattori eziologici comuni alle diverse malattie del neurosviluppo. Complessivamente le IDD non sono una malattia rara con una prevalenza globale di circa 1% nei Paesi ad alto reddito. Al momento non esiste una terapia farmacologica specifica ed efficace per la maggior parte delle forme di IDD e gli individui affetti necessitano assistenza per tutta la durata della vita. Visto che la loro aspettativa di vita non è ridotta in maniera significativa rispetto alla popolazione generale (a parte l'IDD grave che dimostra un tasso di mortalità molto più alto) è possibile comprendere che l'IDD rappresenta ai giorni nostri uno dei costi socio-sanitari più rilevanti. Negli ultimi 25 anni sono stati fatti enormi progressi nella comprensione dell'eziologia delle malattie del neurosviluppo, neurodegenerative e neurometaboliche evidenziando che la maggior parte di esse hanno causa genetica. Resta una piccola classe di casi con cause non-genetiche quali infezioni, fattori auto-immuni e fattori ambientali.

In questo senso le tecnologie di sequenziamento parallelo massivo (Massive Parallel Sequencing, MPS precedentemente denominato Next Generation Sequencing) ha rivoluzionato la diagnosi con la scoperta di nuove varianti geniche associate ai fenotipi e a portato all'identificazione di un numero molto rilevante di geni possibilmente implicati [23]. Queste scoperte hanno invertito l'approccio medico dall'assioma "dal fenotipo al genotipo" (piuttosto improduttivo data la grande variabilità clinica e la rarità di entità sindromiche facilmente identificabili) a "dal genotipo al fenotipo". L'approccio MPS è basato su screening di massa che riguardano la parte codificante del nostro genoma (Whole Exon Sequencing, WES) o addirittura tutto il genoma (Whole Genome Sequencing, WGS), alla ricerca di varianti geniche che potrebbero essere responsabili del fenotipo. Da questi studi sono emerse diverse considerazioni importanti: 1) le cause

monogeniche sono responsabili di circa il 40% di tutti i casi di IDD ed è probabile che questo numero aumenti con la scoperta di nuovi geni; 2) la maggioranza dei pazienti (specialmente nel caso di IDD grave) presentano varianti eterozigoti de novo mai descritte [24]; 3) vi è un'estrema eterogeneità genetica, con più di 700 geni associati a malattie del neurosviluppo, nessuno dei quali singolarmente spiega più del 0.1-0.5% dei casi; 4) molti geni sono noti causare fenotipi multipli) dando una sovrapposizione genetica tra le varie malattie talvolta clinicamente differenti tra loro; 5) le malattie neurodegenerative e neurometaboliche sono solitamente multigeniche.

In questo variegato contesto genetico e clinico si colloca la reale importanza dei modelli sperimentali "personalizzati". La capacità di riprogrammare cellule somatiche umane in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) e differenziarle direttamente verso uno specifico tipo cellulare ha rivoluzionato lo studio dei meccanismi patogenetici. I maggiori progressi nella comprensione dei programmi di sviluppo e il miglioramento dei protocolli in vitro per il differenziamento di iPSCs sono culminati con lo sviluppo di tecnologie per l'ottenimento di "organoidi". La generazione degli organoidi si basa sull'abilità di cellule staminali e progenitrici di organizzarsi in maniera autonoma per formare complesse strutture tissutali. Pertanto, gli organoidi sono strutture che assomigliano, almeno parzialmente, agli organi reali. Nel caso dei "mini-cervelli (mini-brains)", queste strutture possono contenere delle aree che assomigliano a diverse regioni cerebrali e in questo caso sono denominate "organoidi cerebrali", rispecchiando la presenza di vaste identità regionali. Lo sviluppo di mini-organi umanizzati con approcci di biotecnologia integrata potrà superare il divario traslazionale tra i sistemi in vitro, ex vivo e in vivo per lo sviluppo di modelli sperimentali di validazione di bersagli farmacologici.

L'obiettivo finale del progetto è di creare una piattaforma innovativa, sicura e sostenibile atta a promuovere la medicina di precisione nell'ambito delle malattie del neurosviluppo. Il progetto si propone di generare organoidi 3D per sviluppare nuovi marcatori per la diagnosi e come target di terapia

Disegno Sperimentale

Il piano sperimentale si avvale dello sviluppo di iPSCs derivanti da pazienti affetti da IDD e NDD geneticamente determinate verranno differenziate in cellule staminali neurali (NSC). Inoltre, le NSC saranno utilizzate per la generazione di organoidi cerebrali. Questi modelli verranno caratterizzati con marker specifici tramite tecniche di microscopia confocale ed elettrofisiologia. I read-out patologici verranno studiati con tecniche come western blot (WB), immunofluorescenza (IF) e Real Time. Un approccio omico (trascrittomica, lipidomica, proteomica, epigenomica) rispetto al controllo sano permetterà l'identificazione di nuovi target molecolari.

Obiettivo 1 – Sviluppo e caratterizzazione di organoidi cerebrali ottenuti da iPSCs

Disegno sperimentale. Le cellule polimorfonucleate (PBMCs) o biopsie di cute di pazienti affetti da IDD e NDD verranno riprogrammati a iPSCs. Gli organoidi cerebrali verranno generati con l'uso di un agitatore orbitale. Gli organoidi derivati da pazienti vs controlli verranno caratterizzati fenotipicamente misurando le loro dimensioni. Inoltre, l'analisi immunoistochimica e immunofluorescenza con microscopia a confocale permetterà l'identificazione di cluster neuronali distinti nelle diverse fasi della crescita e i relativi fenotipi (es. sopravvivenza a condizioni di stress, lunghezza neuritica etc.). La maturazione degli organoidi verrà inoltre valutata con l'espressione di marker specifici con Real Time PCR. I dati quantitativi verranno valutati con il test non-parametrico "Wilcoxon signed-rank".

Obiettivo 2 – Trascrittomica ed epigenomica

Disegno sperimentale. In questa sezione del progetto saranno paragonati i profili trascrittomici di organoidi "malattia" e di controllo con tecnologia RNA-seq con la quale sarà possibile studiare l'espressione dell'RNA totale (mRNA, lncRNA, microRNA e circRNA). I target più deregolati verranno validati con Real Time PCR. Studieremo anche gli RNA non-codificanti, con un focus particolare su una piccola classe di lncRNAs correlati con la regolazione dello sviluppo neurale. Un approccio simile verrà espletato per studiare il miRNoma. Per investigare il ruolo dei regolatori cromatinici, modificazioni istoniche quali acetilazione, metilazione e fosforilazione verranno studiate con Alpha-Technology. L'analisi statistica verrà eseguita seguendo le linee guida ENCODE e del consorzio modENCODE.

Obiettivo 3 – Trattamenti personalizzati basati su approcci molecolari

Disegno sperimentale. Cercheremo di correggere specifici difetti genici utilizzando strumenti molecolari in organoidi ottenuti da pazienti. Questo approccio ci darà la possibilità di valutare la possibile efficacia dei farmaci disponibili nei pazienti. Ci permetterà inoltre di sviluppare un approccio terapeutico che va ad

alterare la causa della malattia. A seconda delle mutazioni identificate verranno utilizzati diversi approcci molecolari: 1) oligomeri basati su morfolini per il silenziamento e l'inibizione genica; 2) Oligonucleotidi Antisenso (ASO) che interferiscono con l'espressione genica e prevengono errori nello splicing; 3) Long non-coding RNA sintetici (SINEUPs) per aumentare in maniera specifica la traduzione proteica del gene di interesse in modo da correggere il difetto genico causato da aploinsufficienza.

Valuteremo se il tentativo di correzione molecolare avrà portato ad un miglioramento fenotipico (es. ripristino della corretta morfologia o corretta espressione genica dei diversi marcatori dello sviluppo). I risultati saranno espressi come media \pm SD da esperimenti ottenuti in triplicate e con tre esperimenti indipendenti. Il test t-Student o l'ANOVA a una via saranno usati per valutare le differenze tra controllo e trattamento (Graphpad Prism 5.0, GraphPad Software).

- Lettera di intenti dell'azienda per 1) ospitare, 2) eventualmente cofinanziare il dottorando
target: nostri uffici

- Descrizione del progetto da pubblicare sul sito (Dottorato o Ateneo) in Italiano e inglese

Questa proposta progettuale è focalizzata sullo sviluppo di modelli sperimentali complessi derivanti da cellule umane di pazienti e controlli per supportare la comprensione dei meccanismi patogenetici e lo sviluppo di nuovi farmaci nel sistema nervoso centrale. Ad oggi, i meccanismi patogenetici di base della maggior parte delle patologie infantili del sistema nervoso centrale sono ancora per la maggior parte ignoti a causa della mancanza di modelli sperimentali adeguati. Infatti, il limite principale per lo studio delle malattie che coinvolgono il sistema nervoso centrale, siano esse neurodegenerative (NDD) o del neurosviluppo (IDD) è la mancanza di un modello di studio realistico simile alla complessità del tessuto neuronale vivente umano. Questo ha prodotto un notevole ritardo anche nello sviluppo di cure appropriate e di farmaci efficaci. Pertanto, negli ultimi anni molti sforzi sono stati fatti per sviluppare dei sistemi biologici in grado di ricapitolare la patogenesi e le caratteristiche distintive di questi disturbi in un ambiente simile a quello fisiologico. In questo tentativo sono da leggere i progressi nel campo delle cellule staminali indotte alla pluripotenza (iPSCs) che permettono di ottenere neuroni maturi a partire da cellule somatiche (fibroblasti o cellule mononucleate del sangue). Le iPSC sono attualmente la base per produrre modelli cellulari più complessi, tridimensionali come gli organoidi. La forza di questi modelli è rappresentata dalla personalizzazione dell'approccio, grazie all'utilizzo di cellule "private" derivanti da pazienti e controlli. In questo senso i modelli 3D sono molto utili per lo studio di varianti genetiche di significato incerto o nuove varianti derivanti dall'utilizzo di tecniche di sequenziamento massivo parallelo nella diagnostica clinica. Ciò permette lo sviluppo di una medicina personalizzata basata sull'utilizzo di modellistica 3D per lo sviluppo di farmaci specifici.

I risultati di questo progetto porteranno quindi alla generazione di modelli 3D e alla loro successiva caratterizzazione per malattie del neurosviluppo, neurometaboliche neurodegenerative infantili. L'utilizzo di modellistica 3D permetterà di caratterizzare approfonditamente l'effetto di farmaci, anche quelli innovativi a base di RNA (es. ASO). Questa tecnologia è considerata alla base della moderna ricerca traslazionale e aiuterà lo sviluppo di sistemi fisiologici umanizzati di piccole dimensioni definiti "organoidi" o "mini-organi". Questa tecnologia potrà essere sviluppata anche per altri organi e permetterà sia di studiare la fiso-patologia della malattia sia di identificare nuovi potenziali target terapeutici. I mini-organi potranno inoltre diventare una piattaforma innovativa per creare in vitro e in maniera personalizzata modelli di malattia ed essere usati al fine di sviluppare un approccio di medicina di precisione.

This project proposal is focused on the development of complex experimental models derived from human cells of patients and controls to support the understanding of pathogenetic mechanisms and the development of new drugs in the central nervous system. To date, the underlying pathogenetic mechanisms of most childhood diseases of the central nervous system are still largely unknown due to the lack of adequate experimental models. This has also led to a significant delay in the development of appropriate treatments and effective drugs. In this project, the progress in the field of stem cells induced to pluripotency (iPSCs) which allow to obtain mature neurons starting from somatic cells (fibroblasts or mononuclear cells of the blood) will be used to obtain three-dimensional cell models such as **organoids**. The strength of these models is represented by the personalization of the personal approach, thanks to the use of "private" cells deriving from patients and controls.

The results of this project will then lead to the generation of 3D models and their subsequent characterization for neurodevelopmental, neurometabolic, neurodegenerative childhood diseases. The use of 3D modeling will allow to deeply characterize the effect of drugs, even innovative ones based on RNA (eg ASO).

Target candidato: Il candidato ideale dovrebbe avere conoscenze di base nel campo delle colture cellulari, delle cellule staminali, del differenziamento e caratterizzazione cellulare. La capacità di trattare e maneggiare cellule in camera sterile e di indurre differenziamento sarà parte fondamentale per lo studio nel progetto. Saranno necessarie conoscenze tecniche nell'ambito delle tecnologie di base per lo studio del differenziamento cellulare e della caratterizzazione dei costrutti cellulari ottenuti. Particolarmente apprezzate saranno conoscenze nel campo della formazione di iPSCs e di organoidi.