



Ricerca

Focus su attività di neurogenetica e neurobiologia

Davide Mei¹, Valerio Conti², Renzo Guerrini³

¹ Dipartimento di Neuroscienze e Genetica Umana, UOR di Neurogenomica Funzionale e Computazionale, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer IRCCS;

² Dipartimento di Neuroscienze e Genetica Umana, UOR di Neurobiologia Cellulare e Morfofunzionale, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer IRCCS;

³ Direttore Dipartimento di Neuroscienze e Genetica Umana e Direttore Scientifico f.f. Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer IRCCS

Sommario

Le attività di neurogenetica e neurobiologia dell'IRCCS Meyer integrano sequenziamento NGS, genomica computazionale e tecnologie multi-omiche per identificare varianti patogenetiche nelle epilessie e nei disturbi del neurosviluppo. Le UOR svolgono attività di ricerca sia su nuovi geni malattia che su geni noti, mosaicismi somatici e rischio poligenico, e sviluppano e studiano modelli cellulari per chiarire i difetti morfo-funzionali indotti dalle varianti e definire strategie diagnostiche e terapeutiche di precisione.

Le epilessie pediatriche e i disordini del neurosviluppo (NDD) costituiscono entità eterogenee che possono condividere manifestazioni cliniche e, talvolta, meccanismi di patologia comuni. Questo spettro di patologie pediatriche comprende condizioni con gravità variabile da forme di epilessia con remissione spontanea, ad altre molto gravi quali le encefalopatie epilettiche e dello sviluppo (DEE), in cui coesistono epilessia, deficit cognitivo e disturbi del comportamento. Fino a due decenni fa, solo pochi geni, principalmente codificanti per canali ionici, erano stati associati causalmente all'epilessia in grandi famiglie multigenerazionali, portando alla convinzione generale che il numero di geni causativi fosse limitato e che ciascuna delle sindromi epilettiche con ereditarietà mendeliana fosse la conseguenza di varianti patogenetiche a carico di un singolo gene. L'assenza di una storia familiare nella grande maggioranza dei pazienti suggeriva che un'eziologia puramente genetica fosse improbabile. Tuttavia, importanti miglioramenti nella fenotipizzazione e nel riconoscimento di sindromi distintive, lo sviluppo di nuove tecnologie di genetica molecolare e sequenziamento genico, tra cui le metodiche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), hanno portato all'identificazione di molte nuove cause monogeniche, sia ereditarie che *de novo*, sia per le epilessie a eziopatogenesi genetica che per gli NDD. Con il termine *de novo* si indica l'insorgenza di una variante patogenetica (mutazione), che compare per la prima volta in un individuo senza essere ereditata dai genitori. È un'alterazione genetica "nuova", insorta spontaneamente durante la formazione della cellula uovo, dello spermatozoo o nelle primissime fasi di sviluppo dell'embrione. Questo meccanismo è particolarmente frequente nella DEE, per le quali sono state identificate mutazioni *de novo* in una pletora di geni. Negli ultimi anni le mutazioni che insorgono nelle primissime fasi di sviluppo dell'embrione sono state identificate come la causa principale degli NDD causati da malformazioni focali dello sviluppo corticale (principalmente le displasie corticali focali, FCD). Queste mutazioni, che vengono definite mosaici somatici, colpiscono un sottoinsieme di tessuti accomunati dalla stessa origine embrionale o, più frequentemente, un singolo tessuto. Nel caso delle FCD, esse sono presenti solo in una percentuale (variabile da un soggetto all'altro) di cellule e possono essere identificate solo analizzando il tessuto cerebrale displasico rimosso nell'ambito di interventi chirurgici eseguiti per il trattamento dell'epilessia farmaco-resistente. Sebbene siano stati fatti considerevoli progressi nell'identificazione dei geni alla base delle condizioni mendeliane (causate da un singolo gene), il contributo della suscettibilità genetica alle sindromi sporadiche più comuni – come l'epilessia rolandica benigna, l'epilessia con assenza tipica dell'infanzia o i disturbi dello spettro autistico idiopatici – rimane in gran parte da determinare. Importanti novità in questo senso, sebbene in ambiti ancora limitati alla ricerca, arrivano dalla definizione del Polygenic

Risk Score (PRS). A differenza delle condizioni mendeliane, in cui una singola mutazione ha un impatto determinante, si ritiene che queste sindromi più comuni siano “poligeniche”, ovvero influenzate dagli effetti combinati di centinaia o migliaia di varianti genetiche comuni distribuite in tutto il nostro genoma. Il Polygenic Risk Score è uno strumento che aggrega tutti questi piccoli contributi genetici in un unico punteggio numerico. Calcolando questo punteggio, è possibile stimare la predisposizione genetica complessiva (o “rischio”) di un individuo a sviluppare una specifica condizione complessa, aiutando così a quantificare quel contributo genetico che finora era difficile da definire.

Ad oggi, l'analisi del DNA mediante sequenziamento NGS consente di identificare un elevato numero di varianti in geni noti e nuovi potenziali geni causativi di numerose malattie neurogenetiche rare. L'analisi che eseguiamo più frequentemente nel Laboratorio di Neurogenetica del Dipartimento di Neuroscienze e Genetica Umana dell'IRCCS Meyer, è quella correlata all'esoma, ovvero il sequenziamento della porzione codificante del genoma e pari circa al 1-2% dei circa 3 miliardi di basi che lo compongono. Limitare l'analisi alla sola porzione codificante ci consente di orientarla alle regioni genomiche (esoni), che più frequentemente sono colpite da varianti patogenetiche. Tuttavia, in pazienti selezionati e per cui non è stato possibile identificare la causa di malattia, procediamo con l'analisi dell'intero genoma. L'analisi dei dati genomici ha un'elevata complessità, in quanto deve permettere l'identificazione della singola variante, o delle poche varianti, causative di malattia, riconoscendole tra tutte le varianti comunemente osservate in ogni individuo (a titolo di esempio, è utile ricordare che in un genoma umano si riscontrano tra i 4 e i 5 milioni di varianti puntiformi, a cui si aggiungono poi qualche migliaio di varianti strutturali).

Una diagnosi genetico-molecolare è oggi possibile nel 30-40% dei pazienti con epilessia e disordini del neurosviluppo, identificando varianti classificabili come probabilmente patogenetiche o patogenetiche in geni malattia noti associarsi a queste condizioni. In molti casi, grazie anche all'attività di ricerca, è possibile identificare varianti a significato incerto (VUS, Variants of Uncertain Significance) sia in geni malattia noti che in geni non ancora associati a patologia umana.

Considerata l'elevata complessità delle indagini genomiche, l'IRCCS Meyer si è dotata di un'Unità Operativa di Ricerca (UOR) specifica, denominata di Neurogenomica Funzionale e Computazionale, che collabora con il Laboratorio di Neurogenetica. Questa UOR ha al suo interno due sottosezioni che svolgono le attività di ricerca traslazionale in sinergia; la sezione di malattie rare del sistema nervoso e la sezione di malattie neurocutanee. La sezione di malattie rare del sistema nervoso agisce su un ampio ventaglio di patologie ed è in particolar modo orientata allo studio delle epilessie genetiche, delle malformazioni cerebrali e dei disordini

del neurosviluppo. La sezione di malattie neurocutanee è focalizzata sullo studio di patologie congenite, spesso ereditarie, che colpiscono principalmente il sistema nervoso e la pelle, e che sono causate da un anomalo sviluppo di cellule durante la vita embrionale, in particolare di quelle che formano questi due tessuti che derivano dallo stesso foglietto embrionale, l'ectoderma.

La UOR di Neurogenomica Funzionale e Computazionale ha nel suo insieme la finalità di fornire strumenti innovativi nel campo della genomica, sviluppando workflow sperimentali e analitici robusti sia per supportare le attività diagnostiche del Laboratorio di Neurogenetica che per esplorare tutte le principali aree della ricerca genomica funzionale e computazionale. A questo fine, la UOR sviluppa metodi e tecnologie innovative, concentrandosi sulla valutazione di nuove tecnologie e strumenti per l'ottimizzazione e la standardizzazione dei protocolli sperimentali, così da garantire l'innovazione necessaria a contrasto della rapida obsolescenza tecnologica che caratterizza questo settore.

Per raggiungere questi obiettivi, sono state quindi sviluppate macroaree di azione strettamente interconnesse tra loro e che vedono la collaborazione tra la UOR e il Laboratorio di Neurogenetica.

Sequenziamento ad alta processività

Sequenziamento ad alta processività per analisi genomiche (esomi e genomi), trascrittomiche ed epigenomiche, con protocolli avanzati per l'elaborazione dei campioni mediante sistemi automatizzati e piattaforme di sequenziamento NGS. Per effettuare queste analisi, sono utilizzati sistemi di liquid-handling automatizzati, in particolare per la preparazione delle librerie genomiche con protocolli condivisi e standardizzati. Le librerie così ottenute sono poi sottoposte a sequenziamento utilizzando la strumentazione ad alta processività recentemente messa in funzione presso il nostro ospedale (NovaSeq 6000DX).

Genomica computazionale

I dati prodotti con il sequenziamento ad alta processività devono essere processati *in silico* e resi utilizzabili sia ai fini diagnostici che di ricerca. Per far questo, un gruppo di bioinformatici si occupa dello sviluppo, implementazione e mantenimento di pipeline automatizzate per il pre-processing, l'analisi primaria, secondaria e terziaria dei dati di sequenziamento. Questa attività garantisce che le pipeline computazionali, che rappresentano un insieme di processi consecutivi e controllati di analisi del dato, siano ottimali e sempre adattate all'evoluzione delle tecnologie utilizzate nella diagnostica e ricerca genomica.

Tecnologie multi-omiche

Il nostro orientamento alla ricerca traslazionale ci ha spinto a utilizzare tecnologie multi-omiche innovative che stanno offrendo importanti risultati di ricerca e stanno potenziando la nostra capacità diagnostica, specialmente in pazienti complessi rimasti privi di diagnosi dopo analisi già avanzate come l'esoma. In particolare, rientrano in quest'area di interesse gli approcci di trascrittomica (bulk, ovvero su un insieme di cellule di partenza, o a livello di singola cellula), la mappatura ottica del genoma (OGM) e il sequenziamento di terza generazione basato sulle long reads, che permette di migliorare la nostra capacità di identificare i riarrangiamenti strutturali di ogni dimensione, così come le variazioni patologiche del numero di sequenze ripetute presenti nel nostro genoma. L'OGM è una tecnologia avanzata che analizza la struttura del genoma su larga scala. A differenza del sequenziamento tradizionale (che legge le singole "lettere" del DNA), l'OGM crea una sorta di "codice a barre" ad altissima risoluzione visualizzando molecole di DNA estremamente lunghe. Il suo scopo principale è di identificare le grandi variazioni strutturali (SV), come traslocazioni (parti di cromosoma scambiate), inversioni, delezioni o inserzioni complesse. Si tratta di una tecnologia complementare molto utile per scoprire riarrangiamenti del DNA che altre tecniche spesso non riescono a rilevare. Anche il sequenziamento basato su nanoporo è una tecnologia di "terza generazione", che permette la lettura della sequenza del DNA (o RNA) in modo diretto e in tempo reale. Funziona forzando un singolo filamento di DNA, anche molto lungo, ad attraversare un poro di dimensioni nanoscopiche (un "nanoporo"). Quando ogni singola base azotata (A, C, G, T) passa attraverso il poro, crea una specifica alterazione in una corrente elettrica. Questa alterazione viene misurata e tradotta istantaneamente nella sequenza del DNA. Il suo scopo principale è produrre "letture" estremamente lunghe (long reads) del genoma. Questo risultato è cruciale per assemblare genomi complessi (come tessere di un puzzle con pezzi grandissimi invece che piccolissimi), identificare grandi variazioni strutturali e analizzare direttamente le modificazioni chimiche (epigenetiche) che sono presenti sia sull'RNA che sul DNA, rendendo possibile lo studio dei meccanismi che regolano l'attività dei geni (epigenomica) e delle modificazioni che influenzano la funzione delle molecole di RNA (epitranscrittomica).

In sintesi, la UOR di Neurogenomica Funzionale e Computazionale e il Laboratorio di Neurogenetica del Dipartimento di Neuroscienze e Genetica Umana, oltre a sostenere una diagnostica genomica avanzata, contribuiscono alla ricerca biomedica identificando nuove varianti genetiche o nuovi meccanismi di malattia molecolare in geni non ancora associati a malattia umana, ma candidati a essere associati a patologie neurologiche, alimentando

così l'attività della neurobiologia e fornendo nuovi potenziali target per approcci di medicina personalizzata.

Studi funzionali con modelli e metodologie di indagine all'avanguardia

Per stabilire la possibile patogenicità delle VUS e chiarire gli effetti morfo-funzionali di varianti patogenetiche identificate nei pazienti attraverso gli approcci di genetica molecolare sopra descritti e sviluppare trattamenti mirati, sono necessari studi funzionali *in vitro* e/o *in vivo* su modelli in grado di replicare fedelmente quello che accade nelle cellule e nei tessuti colpiti dalla malattia. Per le malattie neurologiche, questi studi funzionali ricadono nell'ambito della neurobiologia, il ramo della biologia che studia il sistema nervoso, cioè l'insieme di cellule, tessuti e strutture che permettono al nostro corpo di percepire, elaborare e rispondere agli stimoli interni ed esterni.

Presso l'IRCCS Meyer questi studi si collocano nel contesto della UOR di Neurobiologia Cellulare e Morfofunzionale. Questa UOR è composta da tre sottosezioni (riprogrammazione ed elettrofisiologia cellulare; patologia neuronale metabolica; istopatologia e biologia molecolare delle lesioni neoplastiche e non neoplastiche del sistema nervoso centrale e periferico). Le tre sottosezioni svolgono la propria attività di ricerca in maniera fortemente integrata, perseguendo l'obiettivo comune di delineare i difetti morfo-funzionali e i meccanismi fisiopatologici alla base di differenti patologie del sistema nervoso. In particolare, l'attività della UOR si focalizza su tre principali aree di studio: i disturbi del neurosviluppo epilettogeni, le malattie neurometaboliche e le patologie neoplastiche del sistema nervoso.

L'obiettivo finale dell'attività della UOR di Neurobiologia Cellulare e Morfofunzionale è la definizione di strategie diagnostiche più efficienti, la caratterizzazione dei meccanismi fisiopatologici alla base delle patologie oggetto di studio e il possibile sviluppo di approcci terapeutici personalizzati orientati alla medicina di precisione. Per questo motivo, questa UOR opera in stretta collaborazione con la Clinica di Neurologia Pediatrica, il laboratorio di Neurogenetica e l'Unità di Neurochirurgia dell'IRCCS Meyer per la scelta delle varianti genetiche più interessanti da studiare e l'organizzazione dei prelievi dei campioni biologici.

Le tre sottosezioni della UOR eseguono i propri studi su diverse tipologie di campioni, che includono colture bidimensionali di neuroni umani differenziati a partire da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC), campioni istologici cerebrali prelevati in sede chirurgica, biopsie cutanee e muscolari. Presso i laboratori afferenti alla UOR è anche in corso la messa a punto di tecniche per la coltivazione e lo studio di organoidi cerebrali, mini

cervelli coltivati in tre dimensioni a partire da hiPSC, in grado di riprodurre strutture e funzioni fondamentali del tessuto cerebrale, anche se in forma semplificata, che permettono di eseguire studi più complessi rispetto a quelli possibili su colture bidimensionali, in un contesto più realistico e fisiologicamente rilevante.

Data la difficoltà di reperimento di tessuto cerebrale epilettogeno, ottenibile solo in seguito a interventi chirurgici per il trattamento dell'epilessia farmaco-resistente o da biopsie, molto invasive e raramente eseguibili, lo studio di modelli cellulari derivati da hiPSC, sia bidimensionali che tridimensionali, rappresenta uno degli approcci più avanzati per l'analisi delle patologie del sistema nervoso. Una volta identificata la variante genetica da caratterizzare, e ottenuto il campione dal paziente portatore della variante, i ricercatori iniziano il processo di sviluppo dei neuroni umani da studiare. Per prima cosa i fibroblasti, cellule del tessuto connettivo ottenibili mediante biopsia cutanea, vengono coltivati e riprogrammati in hiPSC, cellule in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari del corpo umano. Una volta ottenute le hiPSC, queste vengono fatte differenziare in neuroni cerebrali uguali a quelli presenti nel sistema nervoso del paziente. Questi neuroni vengono quindi analizzati utilizzando diverse metodologie di indagine (ad esempio biochimiche, di biologia molecolare, di microscopia confocale a fluorescenza ed elettronica e di elettrofisiologia su singola cellula e di network neurale) al fine di valutare eventuali anomalie di sviluppo e maturazione cellulare, morfologiche e funzionali indotte dalla variante oggetto di studio. Quando possibile, i neuroni vengono analizzati prima e dopo il trattamento con farmaci specifici al fine di valutarne gli effetti sulle anomalie identificate in queste cellule e sviluppare possibili trattamenti mirati.

I campioni istologici prelevati in sede chirurgica sono invece di particolare importanza per lo studio delle malformazioni focali dello sviluppo corticale (e in particolare delle FCD) e dei tumori cerebrali pediatrici. I campioni prelevati da pazienti con FCD vengono infatti utilizzati, in collaborazione con la UOR di Neurogenomica Funzionale e Computazionale e con il laboratorio di Neurogenetica dell'IRCCS Meyer, per la ricerca di varianti patogenetiche presenti in forma di mosaicismi somatici (condizione in cui le varianti sono presenti solo in una bassa percentuale di cellule e solo nel tessuto cerebrale malato) e per la caratterizzazione del trascrittoma (ovvero dell'insieme di tutte le molecole di RNA prodotte da una cellula in un determinato momento). I campioni tumorali vengono invece utilizzati per analisi volte a determinarne il profilo genetico e metilomico, una sorta di "mappa chimica" del DNA che mostra quali geni sono accesi e quali sono spenti in una cellula. Questa analisi è oggi di particolare interesse in quanto anche se tutte le cellule del nostro corpo hanno lo stesso DNA, non tutte usano le stesse

istruzioni e ogni tumore cerebrale può essere diverso da un altro. Anche se due soggetti hanno ricevuto una diagnosi simile, le cellule tumorali possono funzionare in modo molto diverso e la metilazione del DNA rappresenta una sorta di “firma chimica” del tumore, che può dare indicazioni importanti verso trattamenti terapeutici personalizzati.

L'utilizzo del modello biologico più appropriato per il tipo di studi funzionali da eseguire per la caratterizzazione dei meccanismi fisiopatologici alla base di una patologia e la possibile identificazione di terapie personalizzate deve accompagnarsi a quello della strumentazione più adatta per rispondere al quesito biologico proposto. Per questo motivo, grazie a un importante finanziamento ottenuto *ad hoc*, la UOR di Neurobiologia Cellulare e Morfofunzionale sta acquisendo attrezzature all'avanguardia per implementare e ampliare il tipo di analisi morfo-funzionali eseguibili. Nei prossimi mesi saranno infatti installate presso i laboratori della UOR, afferenti al Dipartimento di Neuroscienze e Genetica Umana dell'IRCCS Meyer, diverse attrezzature all'avanguardia tra cui uno strumento per analisi di patch clamp automatizzato per analisi elettrofisiologiche su più cellule in parallelo e in grado di comparare, in un singolo esperimento, i risultati ottenuti dall'analisi cellule di controllo e cellule di pazienti trattate o meno con farmaci, un sistema per elettrofisiologia manuale in grado di effettuare misure correlative su cellule e fettine di tessuto mediante tecniche sperimentali di patch clamp, ion imaging e optogenetica, uno strumento per analisi elettrofisiologiche multielettrodo (MEA), che permetterà di analizzare diversi sistemi *in vitro* tra cui neuroni derivati da iPSC umane, fettine di tessuto cerebrale, organoidi e assembloidi (un insieme di più organoidi) e uno strumento per analisi multiomiche che permetterà l'esecuzione di analisi di trascrittomica e proteomica spaziale simultanea con una risoluzione subcellulare.

© Copyright by Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer IRCCS



OPEN ACCESS

L'articolo è OPEN ACCESS e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

Pubblicato nel mese di dicembre 2025