



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**ORGANOIDI CEREBRALI PER LO STUDIO DI MALATTIE
NEURODEGENERATIVE**

Relatore: Prof. Gianfranco Santovito

Laureanda: Maria Giuseppa Guerra

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 22 settembre 2022

*"Ognuno di noi è un genio.
Ma se si giudica un pesce
dalla sua abilità
di arrampicarsi sugli alberi,
lui passerà tutta la sua vita
a credersi stupido"*

Albert Einstein

Sommario

PREFAZIONE	1
1 INTRODUZIONE.....	3
1.1 IL TESSUTO NERVOSO	3
1.1.1 I NEURONI.....	3
1.1.2 LE CELLULE GLIALI	5
1.2 LA MEMORIA E IL SISTEMA LIMBICO.....	5
2 ORGANOIDI	7
2.1 METODOLOGIE PER LA CREAZIONE DI ORGANOIDI CEREBRALI....	8
2.1.1 METODOLOGIE NON GUIDATE: IL PROTOCOLLO DI LANCASTER ET AL.	8
2.1.2 METODOLOGIE GUIDATE	9
2.2 APPLICAZIONI E STRATEGIE PER L'ANALISI DEGLI ORGANOIDI CEREBRALI	9
3 CASO DI STUDIO: APPLICAZIONE DEGLI ORGANOIDI CEREBRALI IN UN CONTESTO BIOLOGICO	11
3.1 CENNI SULL'ALZHEIMER.....	11
3.1.1 FATTORI DI RISCHIO	12
3.1.2 EZIOLOGIA.....	13
3.2 MODELLIZZAZIONE DELLA MALATTIA DI ALZHEIMER IN ORGANOIDI AFFETTI DA HERPES VIRUS	15
3.2.1 CREAZIONE DEGLI ORGANOIDI PER LA MODELLIZZAZIONE DELL'INFEZIONE DA HSV-1	16
3.2.2 ANALISI FUNZIONALE DEGLI ORGANOIDI INFETTI	18
3.2.3 ANALISI DEI TESSUTI CEREBRALI A SEGUITO DELL'INFEZIONE	19
CONCLUSIONI.....	21
BIBLIOGRAFIA	23

PREFAZIONE

Nell'ultimo secolo l'aspettativa di vita è aumentata notevolmente e con essa sono comparse una serie di problematiche inerenti all'invecchiamento cellulare.

Uno dei problemi principali nella battaglia a queste patologie è dovuto ai metodi di ricerca quali colture in vitro tradizionali e modelli animali che non riescono a rappresentare a pieno la complessità degli organi umani; in particolare del cervello.

Per sopperire a questa problematica è stato necessario indurre le cellule staminali pluripotenti a differenziarsi in tessuti cerebrali diversi; questi, crescendo su particolari scaffold, emulano la struttura 3D dell'organo e vengono definiti organoidi cerebrali. La particolarità delle strutture così formate è dovuta alla loro capacità di auto-aggregarsi e auto-organizzarsi nello spazio.

In questo modo è possibile osservare il decorso della malattia studiando il cervello (simile a quello di un embrione di circa 12 settimane) che viene tenuto "in vita" su una piastra da laboratorio con un terreno liquido che contiene nutrienti, fattori di crescita e molecole segnale.

Alcuni laboratori sono riusciti a tenere in vita i mini-cervelli per oltre un anno ma la durata di questi organoidi dipende in misura maggiore dal tipo di patologia che si sta studiando.

1 INTRODUZIONE

Il sistema nervoso è l'insieme di organi e strutture che permettono la trasmissione di segnali tra le diverse parti del corpo di modo da coordinare funzioni e azioni (volontarie ed involontarie) sia fisiche che psicologiche.

Esso viene organizzato in:

- Sistema nervoso centrale (SNC): formato da encefalo e midollo spinale;
- Sistema nervoso periferico: comprende nervi cranici e nervi spinali che collegano il SNC ad altri sistemi ed apparati e con gli organi di senso.

1.1 IL TESSUTO NERVOSO

Il tessuto nervoso ha il compito di ricevere, elaborare e trasmettere gli impulsi. È composto da due tipi cellulari quali neuroni e cellule della glia o nevroglia.

1.1.1 I NEURONI

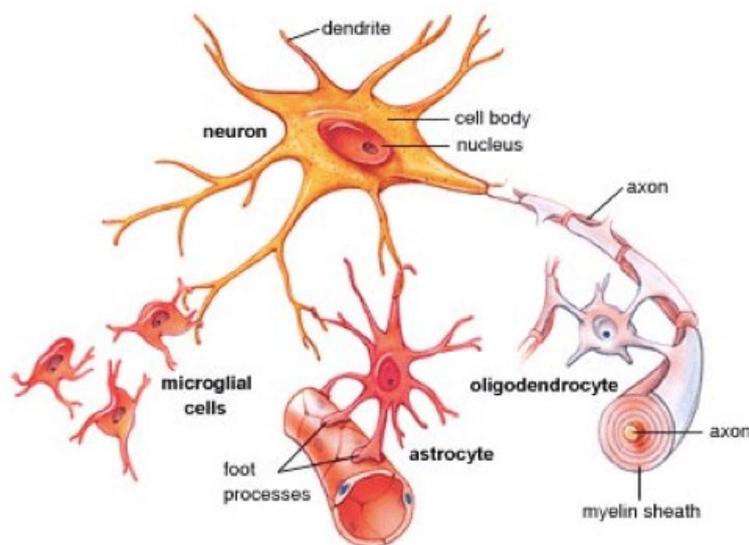


Figura 1: Le cellule del tessuto nervoso: microglia, macroglia e neuroni;
<<https://www.chimica-online.it/biologia/neurone.htm>>

I neuroni rappresentano l'unità funzionale del tessuto nervoso: sono specializzati nella trasmissione di segnali elettrici a lunga distanza, essendo cellule funzionalmente polarizzate, inoltre sono in grado di ricevere segnali di tipo chimico, meccanico ed elettromagnetico ^[1].

I neuroni sono cellule postmitotiche e terminalmente differenziate, quindi non sono in grado di dividersi; tuttavia, sono presenti cellule neuronali staminali in grado di attivare neurogenesi anche se in misura limitata. Sono cellule particolarmente longeve che idealmente rimarrebbero attive per tutta la durata della vita ^{[2], [3]}.

Sono costituiti da:

- Membrana cellulare detta neurolemma.
- Corpo cellulare altresì chiamato pirenoforo che contiene il nucleo e gli organelli quali reticolo endoplasmatico rugoso, mitocondri e apparato di Golgi necessari per la sintesi delle principali funzioni cellulari ^[3].
- Espansioni citoplasmatiche come i dendriti e gli assoni che caratterizzano il neurone e consentono il trasferimento dell'informazione; in particolare i dendriti, corti ed estremamente ramificati, ricevono segnali afferenti e li propagano in direzione del corpo cellulare; gli assoni invece, conducono il segnale in direzione distale, dal pirenoforo verso la propria estremità in cui avviene la sinapsi.

Ogni neurone presenta un solo assone, che parte dal monticolo assonico e spesso si ramifica, generando i collaterali assonici. Gli assoni sono ottimi conduttori grazie alla presenza della guaina mielinica, prodotta dalle cellule di Schwann nel sistema nervoso periferico e dagli oligodendrociti nel sistema nervoso centrale. La guaina mielinica permette al segnale di essere trasportato tramite conduzione saltatoria per cui la corrente salta da un nodo di Ranvier, cioè il punto dell'assone sprovvisto di mielina, all'altro determinando l'aumento della velocità di trasmissione del segnale ^[2].

I neuroni vengono divisi in tre classi funzionali:

- Neuroni afferenti: appartengono al sistema nervoso periferico e possiedono recettori sensoriali in grado di generare un potenziale d'azione in risposta ad un determinato stimolo. Il corpo cellulare di questa classe di neuroni è privo di dendriti e di contatti presinaptici e si trova in prossimità del midollo spinale ^[1];
- Neuroni efferenti: anch'essi localizzati nel sistema nervoso periferico ma con la particolarità che il loro corpo cellulare si trova nel sistema nervoso centrale ove ricevono impulsi presinaptici per influenzare l'azione sugli organi effettori ^[1];
- Interneuroni: localizzati interamente nel sistema nervoso centrale, sono interposti tra i neuroni afferenti e quelli efferenti. Le interconnessioni tra gli interneuroni stessi sono alla base dei fenomeni associati al pensiero, emozioni e memoria ^[1].

1.1.2 LE CELLULE GLIALI

Le cellule gliali non sono coinvolte nei processi di trasmissione del segnale ma forniscono ai neuroni il mantenimento dell'ambiente ionico, inoltre modulano la velocità di propagazione dei segnali nervosi e l'attività sinaptica controllando il metabolismo dei neurotrasmettitori a livello della fessura sinaptica e poi donano sostegno strutturale durante lo sviluppo del sistema nervoso, protezione da lesioni e isolamento elettrico. Questa categoria compone il 90% delle cellule del sistema nervoso. Le cellule gliali sembrerebbero essere le uniche cellule con caratteristiche staminali nel cervello adulto essendo in grado di differenziarsi in nuove cellule gliali ma anche meno frequentemente in nuovi neuroni. Nel sistema nervoso centrale riconosciamo tre tipi di cellule gliali:

- **Astrociti:** tipo cellulare più abbondante limitato al sistema nervoso centrale. Sono fondamentali poiché costituiscono la barriera ematoencefalica e mantengono un ambiente adeguato alla trasmissione nervosa regolando la vasocostrizione e la vasodilatazione, i processi metabolici e l'omeostasi di ioni sinaptici ed il pH ^[4].
- **Oligodendrociti:** creano un rivestimento laminare lipidico chiamato mielina attorno agli assoni nel sistema nervoso centrale, fondamentale nella conduzione di segnali elettrici ^[4].
- **Microglia:** cellule staminali ematopoietiche adibite alla fagocitosi di patogeni e detriti derivanti da danni cerebrali o dal ricambio cellulare, inoltre proteggono il sistema nervoso centrale da tossine e agenti infettivi. Sono in grado di rilasciare molecole segnale, in particolare citochine, in grado di modulare l'infiammazione locale e influenzare la sopravvivenza o la morte cellulare ^[4].

1.2 LA MEMORIA E IL SISTEMA LIMBICO

Gli esseri umani immagazzinano le informazioni in due modi qualitativi distinti che sono rappresentati dalla memoria procedurale e dalla memoria dichiarativa.

La memoria procedurale è quella inaccessibile alla coscienza e riguarda abilità motorie, associazioni e logica; d'altra parte, la memoria dichiarativa invece, rappresenta la capacità di recuperare informazioni che possono essere dichiarate, ovvero espresse tramite il linguaggio ^[4].

Del ramo della memoria dichiarativa fa parte la memoria episodica che permette di ricordare quando e dove è accaduto l'avvenimento.

Le strutture che prendono parte a queste funzioni sono comprese nel sistema limbico che è un anello del proencefalo che include i lobi delle corteccie cerebrali, i nuclei della base, il talamo e l'ipotalamo ed è associato alle emozioni, agli schemi comportamentali di base e all'apprendimento.

L'ippocampo in particolare è fondamentale sia nella memoria a breve termine, nell'integrazione degli stimoli, sia nel consolidamento della memoria a lungo termine, ovvero per l'assodamento dei ricordi dichiarativi. Gli individui che hanno subito danni ippocampali sono incapaci di ricordare fatti fondamentali della vita quotidiana ^[1]. Studi sugli animali e sugli esseri umani con lesioni dell'ippocampo e della corteccia para-ippocampale, hanno dimostrato che i neuroni di queste specifiche zone sono coinvolti durante i processi della memoria dichiarativa. L'attivazione neuronale dell'ippocampo e delle aree corticali del lobo temporale e mediale determina il trasferimento delle informazioni dichiarative nella memoria a lungo termine. Danni dell'ippocampo sono stati riscontrati nei pazienti affetti dal morbo di Alzheimer: placche senili e ammassi neurofibrillari si accumulano nei corpi cellulari dei neuroni che secernono acetilcolina e nella corteccia cerebrale, interferendo con i loro sistemi di trasporto vitali. Nei primi stadi della patologia viene coinvolta la memoria a breve termine ma, col progredire della malattia vengono perse anche capacità mentali superiori quali linguaggio, calcolo e scrittura ^[1].

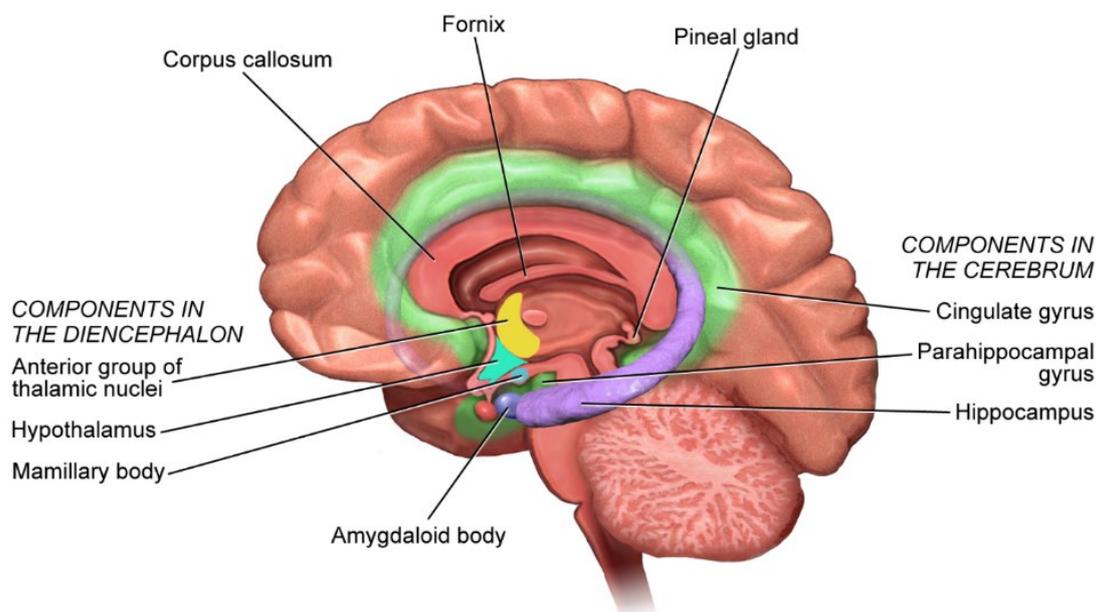


Figura 2: Il sistema limbico, Blausen.com staff (2014), "Medical gallery of Blausen Medical 2014". Wikijournal of Medicine 1.

2 ORGANOIDI

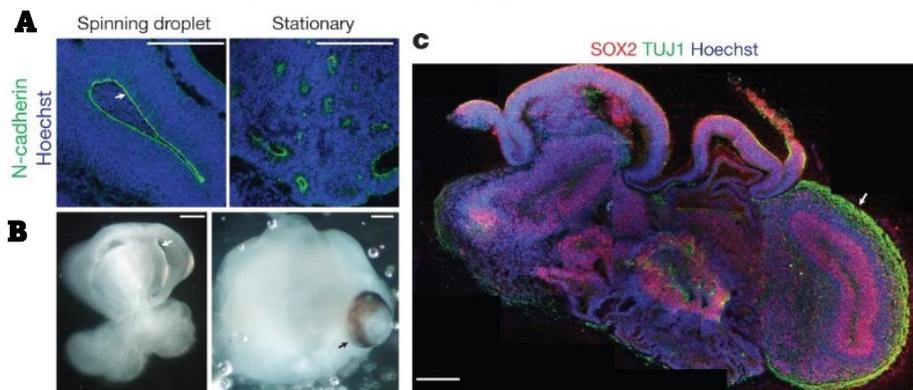


Figura 3: **A.** I tessuti neuroepiteliali (sinistra), generati tramite il protocollo messo a punto da Madleine Lancaster, mostrano grandi cavità piene di liquido. Questi tessuti erano più grandi e più continui dei tessuti cresciuti in sospensione stazionaria senza Matrigel (a destra). **B.** Cavità piene di liquido che ricordano i ventricoli e il tessuto retinico, come indicato dall'epitelio pigmentato retinico (freccia nera) **C.** Sezionamento e l'immunostochimica di un organoide rivela una morfologia complessa con regioni eterogenee contenenti progenitori neurali (SOX2, rosso) e neuroni (TUJ1, verde) [5].

Gli organoidi cerebrali sono aggregati tridimensionali autoassemblanti, derivanti da cellule staminali pluripotenti, in grado di generare architetture simili allo stadio fetale del cervello umano; in particolare gli organoidi cerebrali vedono come tipi cellulari prevalenti le cellule progenitrici neuronali, le cellule neuronali e le cellule gliali.

Differentemente dalle colture cerebrali bidimensionali tradizionali, gli organoidi cerebrali mostrano similitudini col cervello sia a livello cellulare che a livello strutturale dei tessuti e, proprio a causa di queste, forniscono l'opportunità di modellizzare lo sviluppo e le funzioni del cervello che non possono essere studiate se non tramite sperimentazione diretta in vivo [6], [7].

Già all'inizio degli anni Novanta del Novecento, alcuni scienziati si erano prodigati nell'indurre differenziazione neuronale delle cellule staminali pluripotenti, ad esempio attraverso aggregazioni tridimensionali di diversi tipi cellulari del sistema nervoso centrale derivanti dalle cellule staminali neurali. Questa architettura, definita neurosfera, conteneva vari sottotipi di neuroni e cellule gliali ma non presentava le citoarchitetture distintive del cervello. Si è cercato in seguito di assemblare le cellule staminali neurali artificialmente mediante l'uso di scaffold: in questo modo è stato possibile comporre strutture vantaggiose per la modellizzazione delle interazioni cellula-cellula, senza però sfruttare la capacità delle cellule staminali pluripotenti di auto-assemblarsi e auto-organizzarsi per imitare la citoarchitettura e la capacità di sviluppo presente in vivo [8].

2.1 METODOLOGIE PER LA CREAZIONE DI ORGANOIDI CEREBRALI

I metodi per la sintesi di organoidi cerebrali vengono divisi in due categorie: guidati e non guidati. I metodi non guidati vedono la morfogenesi spontanea delle cellule staminali pluripotenti umane (hPSC) che riescono ad organizzarsi autonomamente per formare tessuti eterogenei simili alle varie regioni cerebrali tipicamente visibili nei crani fetali. I metodi guidati invece, richiedono l'intervento di fattori esterni quali ad esempio fattori di crescita, che inducono le hPSC a differenziarsi nelle linee cellulari desiderate. Gli organoidi non guidati sono adatti per valutare la diversità dei tipi cellulari durante lo sviluppo dell'intero cervello, a differenza degli organoidi guidati che ricapitolano meglio la citoarchitettura cerebrale in modo meno eterogeneo [8].

2.1.1 METODOLOGIE NON GUIDATE: IL PROTOCOLLO DI LANCASTER ET AL.

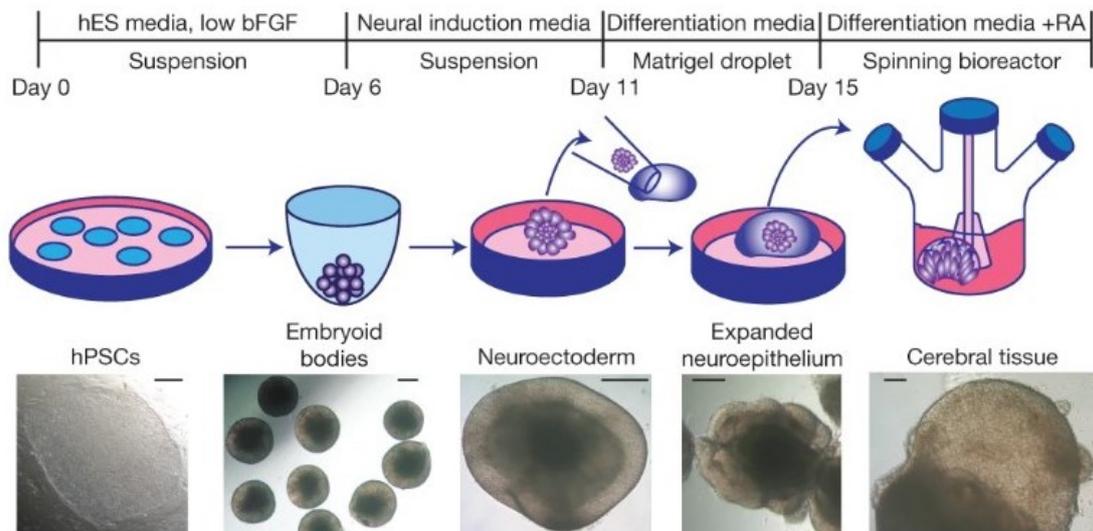


Figura 4: Schema del sistema di cultura del protocollo di Madeline Lancaster et alii. Vengono mostrate immagini di esempio di ciascuna fase [5].

A seguito di questioni etiche legate all'accesso limitato al cervello sia adulto che fetale, Madeleine Lancaster e Juergen Knoblich misero a punto un protocollo per la creazione di organoidi cerebrali sfruttando la capacità delle cellule staminali pluripotenti di aggregarsi e organizzarsi autonomamente [9].

Nel protocollo originario i corpi embrioidi ricavati dagli aggregati di hPSC vengono incorporati in una matrice extracellulare come il Matrigel, matrice basale ricavata dal

sarcoma di topo, e successivamente coltivati in bioreattori rotanti in modo da distribuire meglio l'ossigeno e i nutrienti utili per promuovere l'espansione dei tessuti e la differenziazione neurale.

Tramite questo metodo è stato possibile ottenere diverse linee cellulari di proencefalo, mesencefalo e romboencefalo ma anche retina, plesso coroideo e mesoderma. Il profilo di sequenziamento dell'RNA a cellula singola ha rilevato i diversi tipi cellulari contenuti negli organoidi cerebrali quali progenitori delle cellule gliali, neuroni e interneuroni, astrociti e cellule precursori degli oligodendrociti presenti nel sistema nervoso centrale, ma anche sottotipi neuronali retinici quali epitelii pigmentati e fotorecettori. Adattando il protocollo, ad esempio, ritardando l'incorporamento del Matrigel, è stato possibile addirittura differenziare la microglia a partire da progenitori mesodermici [9], [10]. Nonostante la diversità di tipo cellulare negli organoidi cerebrali offra un'opportunità unica per modellizzare le interazioni tra diverse regioni del cervello, l'elevata variabilità e disomogeneità dei tipi cellulari porta a disposizioni eterogenee delle linee cellulari [8].

2.1.2 METODOLOGIE GUIDATE

I metodi guidati sono stati sviluppati per migliorare la stabilità degli organoidi stessi. Grazie a questo tipo di coltura vengono generati gli sferoidi, aggregati tridimensionali che riproducono le caratteristiche di tessuti cerebrali quali prosencefalo, mesencefalo, corteccia cerebrale, ippocampo, cervelletto e midollo spinale [9]. Durante la fase di differenziazione vengono utilizzate piccole molecole e fattori di crescita in modo da indurre le hPSC a formare cellule e tessuti rappresentativi di una specifica regione cerebrale ma non solo; infatti, aggregando gli sferoidi tra loro, è possibile generare assembloidi molto utili per studiare le interazioni tra regioni cerebrali distinte.

2.2 APPLICAZIONI E STRATEGIE PER L'ANALISI DEGLI ORGANOIDI CEREBRALI

Gli organoidi, grazie alla riproducibilità che li caratterizza, trovano largo impiego in ambito medico e di ricerca. Gli organoidi cerebrali derivanti da cellule staminali pluripotenti umane trovano innumerevoli applicazioni nella modellizzazione dei disturbi cerebrali e neurologici, e si sono rivelati particolarmente performanti nella modellizzazione di malattie congenite o infettive; tuttavia, risulta ancora difficile

modellizzare le malattie neurodegenerative dovute all'invecchiamento poiché gli organoidi riescono a rappresentare il cervello solamente allo stadio embrionale [8].

Negli ultimi anni gli scienziati hanno scelto sempre più l'uso della trascrittomiche monocellulare come metodo di analisi per gli organoidi, soprattutto per l'analisi della variabilità dei lignaggi cellulari, della risposta a sostanze chimiche tossiche e mutagene. Questo metodo si basa sull'esaminazione dei singoli geni trascritti da un'ipotetica cellula tramite m-RNA. Per gli organoidi cerebrali in particolare, la trascrittomiche unicellulare si interfaccia con lo studio del cervello fetale umano, sia per conoscerne la composizione cellulare ma anche per quanto riguarda l'espressione genica [21].

3 CASO DI STUDIO: APPLICAZIONE DEGLI ORGANOIDI CEREBRALI IN UN CONTESTO BIOLOGICO

3.1 CENNI SULL'ALZHEIMER

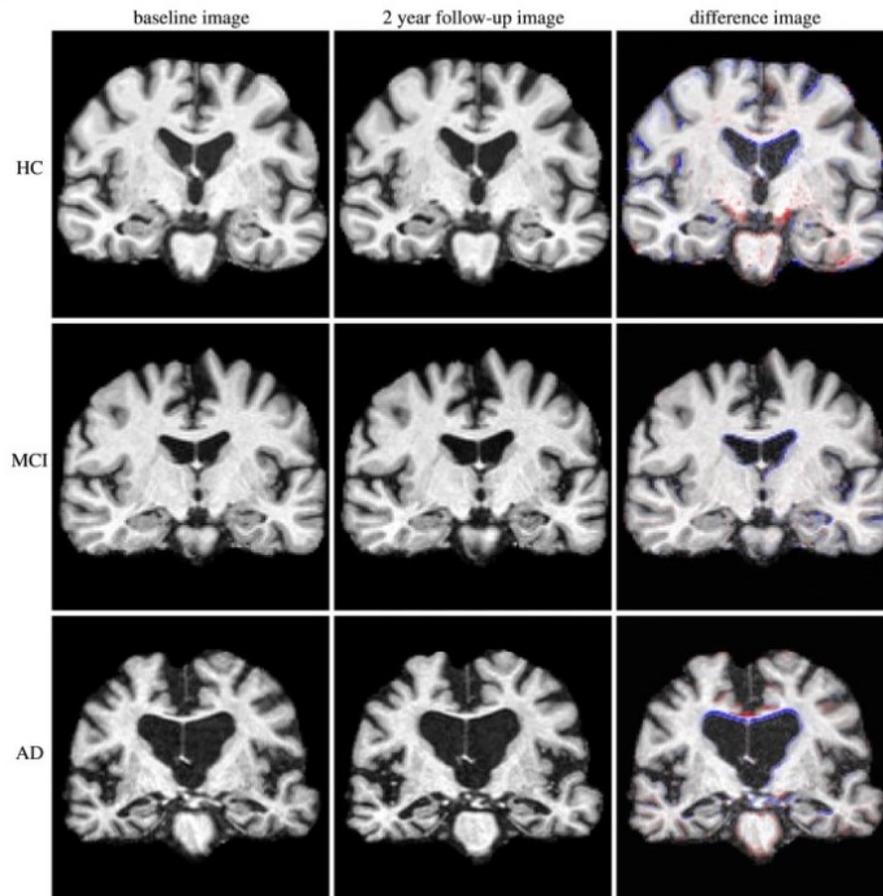


Figura 5: Tre esempi di imaging a risonanza magnetica della sezione coronale del cervello di tre soggetti. Riga superiore: un soggetto di controllo sano (maschio, 84,8 anni); riga centrale: soggetto con disturbo cognitivo lieve (femmina, 71,8 anni) che si è convertito in Alzheimer dopo tre anni; riga inferiore: un paziente con Alzheimer (maschio, 77,5 anni) ^[11].

L'Alzheimer è la forma più comune di demenza neurodegenerativa. Il principale sintomo consiste nella difficoltà nel ricordare eventi recenti e, col progredire della malattia, compaiono sintomi quali disorientamento, afasia, sbalzi di umore, depressione e problemi comportamentali con conseguente perdita delle capacità mentali di base. La causa principale è strettamente correlata alla presenza di placche amiloidi e grovigli neurofibrillari.

3.1.1 FATTORI DI RISCHIO

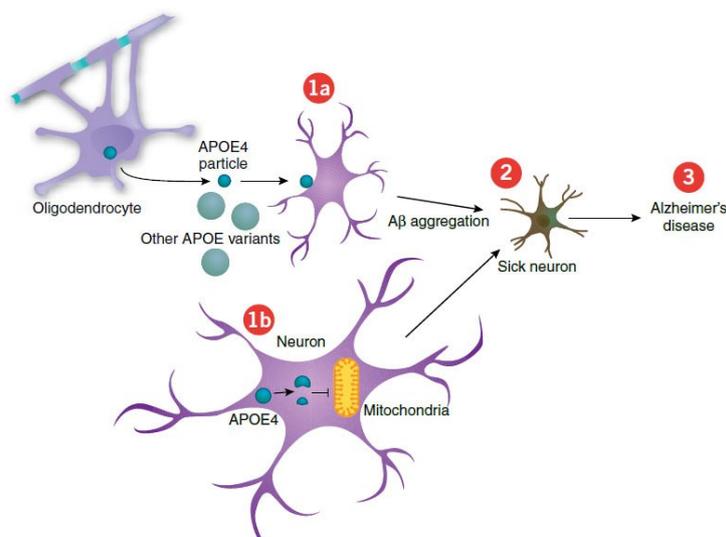


Figura 6: effetto di APOE-ε4 sul neurone < <https://www.medimagazine.it/alzheimer-come-apoe4-mette-in-pericolo-il-cervello/>>

Tra i fattori di rischio l'età rappresenta quello più importante. I fattori di rischio genetico per l'Alzheimer includono rare mutazioni ereditarie dominanti: le mutazioni della proteina precorritrice della β -amiloide (APP), del gene PSEN-1 che codifica per la presenilina-1, e PSEN2 che codifica per la presenilina-2, sono presenti in quasi tutta la totalità dei casi di Alzheimer e sono responsabili della formazione di frammenti di β -amiloide.

Più di 600 geni sono stati studiati come fattori per la predisposizione all'Alzheimer, come ad esempio l'APOE, che risulta essere il più importante fattore di rischio genetico dopo i sessantacinque anni. Il trasporto dell'allele APOE-ε4 aumenta il rischio di demenza; infatti, il 40% delle persone con più di sessantacinque anni soggette ad Alzheimer, presentano almeno un allele ε4 [12].

Nel sistema nervoso centrale, l'apolipoproteina E (APOE) funge da trasportatore di colesterolo, fosfolipidi e solfatidi, elementi fondamentali per la sinaptogenesi e il mantenimento delle connessioni sinaptiche. Nella popolazione umana esistono tre alleli del gene che codifica per APOE: ε2, l'allele che riduce il rischio di contrarre la malattia, ε3, la variante comune, e ε4 un rischio per il morbo di Alzheimer [13].

Sebbene tutte e tre le varianti non mostrino differenze nel trasporto delle sostanze nutritive, ApoE-ε4 è in grado di modificare l'attività della sortilina, un recettore implicato nel catabolismo della β -amiloide. Quando la sortilina lega l'APOE-ε4, essa genera un complesso ligando-substrato: la variante allelica ε4 modifica la conformazione tridimensionale della sortilina, la quale una volta raggiunto il neurone si accumula

incapace di svolgere il processo di esocitosi a seguito del cambio conformazionale. Il neurone va così incontro ad apoptosi per carenza di nutrizione ^[14].

Vi sono poi i fattori di rischio legati all'età, quali fattori metabolici come ipertensione, obesità e diabete mellito, che sono probabilmente i più comuni e importanti per la demenza in età avanzata; essi, infatti, inducono malattie cerebrovascolari che si ritiene influenzino l'espressione clinica della patologia di Alzheimer attraverso gli effetti delle malattie arteriosclerotiche ^[15].

3.1.2 EZIOLOGIA

La causa principale della patologia è ancora in gran parte sconosciuta. Le ipotesi più acclamate sono due e dipendono dalla β -amiloide e dall'iperfosforilazione della proteina Tau.

L'ipotesi affermata è quella che riguarda le placche amiloidi e attribuisce la malattia ad una diffusa distruzione di neuroni ad opera della β -amiloide, una proteina che depositandosi tra i neuroni agisce come collante, inglobando placche e grovigli neurofibrillari causando una forte diminuzione di acetilcolina nel cervello ^[12].

Conseguentemente a questo status, il neurone non è più in grado di trasmettere impulsi nervosi andando incontro a morte, generando complessivamente una situazione di atrofia progressiva del cervello. A livello neurologico macroscopico, la malattia è caratterizzata da una diminuzione nel peso e nel volume del cervello, dovuta ad atrofia corticale. In questo stato vi è un visibile allargamento dei solchi cui corrisponde l'appiattimento delle circonvoluzioni mentre, a livello microscopico e cellulare sono riscontrabili ammassi neurofibrillari e placche senili, dette anche placche amiloidi ^[12].

La Proteina Progenitrice dell'Amiloide (APP) viene degradata durante un processo che vede coinvolti tre enzimi che operano tagli proteolitici: la α -secretasi, la β -secretasi e, successivamente, la γ -secretasi. Attraverso due tagli successivi, operati prima dall' α -secretasi e poi dalla γ -secretasi, viene prodotto un peptide innocuo chiamato p3. La β -secretasi opera un taglio che porta alla produzione di due β -amiloidi che differiscono nel numero di amminoacidi presenti nella catena: $A\beta$ -40 e $A\beta$ -42. Nei soggetti sani, il processo di degradazione della APP sembra essere operato principalmente dalla α -secretasi; al contrario, nei soggetti malati, si è osservato che l'enzima che interviene è la β -secretasi, con una larga produzione di proteina β -amiloide: tale forma ha un effetto tossico sul neurone. Alla morte del neurone, i frammenti della proteina amiloide vengono liberati nello spazio extracellulare cementificandosi in aggregati fibrillari insolubili via

via sempre più grandi, in grado di formare placche amiloidi rilevabili solo ed esclusivamente attraverso esame istologico. Tali placche neuronali innescano un processo reattivo infiammatorio mediato da astrociti e microglia che attivano una risposta immunitaria la quale richiama macrofagi e neutrofilo, che produrranno interleuchine e citochine, tra cui $TNF-\alpha$, in grado di danneggiare irreversibilmente i neuroni [16].

Nei malati di Alzheimer interviene un ulteriore meccanismo patologico: all'interno dei neuroni viene accumulata in maniera anomala la forma iperfosforilata della proteina Tau in grado di formare aggregati neurofibrillari. In condizioni fisiologiche questa proteina si presenta in forma altamente solubile ed è in grado di reagire con la tubulina promuovendone l'assemblaggio in microtubuli, stabilizzando la struttura. La fosforilazione della proteina Tau consente ai neuroni di sfuggire all'apoptosi ed esercita un ruolo essenziale nell'equilibrio del trasporto assonale microtubulo-dipendente di organelli e biomolecole. La proteina Tau iperfosforilata risulta avere meno affinità per i microtubuli e mostra una maggiore resistenza verso le proteasi calcio-dipendenti. Aggregati di proteine Tau iperfosforilate sono responsabili della formazione di grovigli neurofibrillari [17].

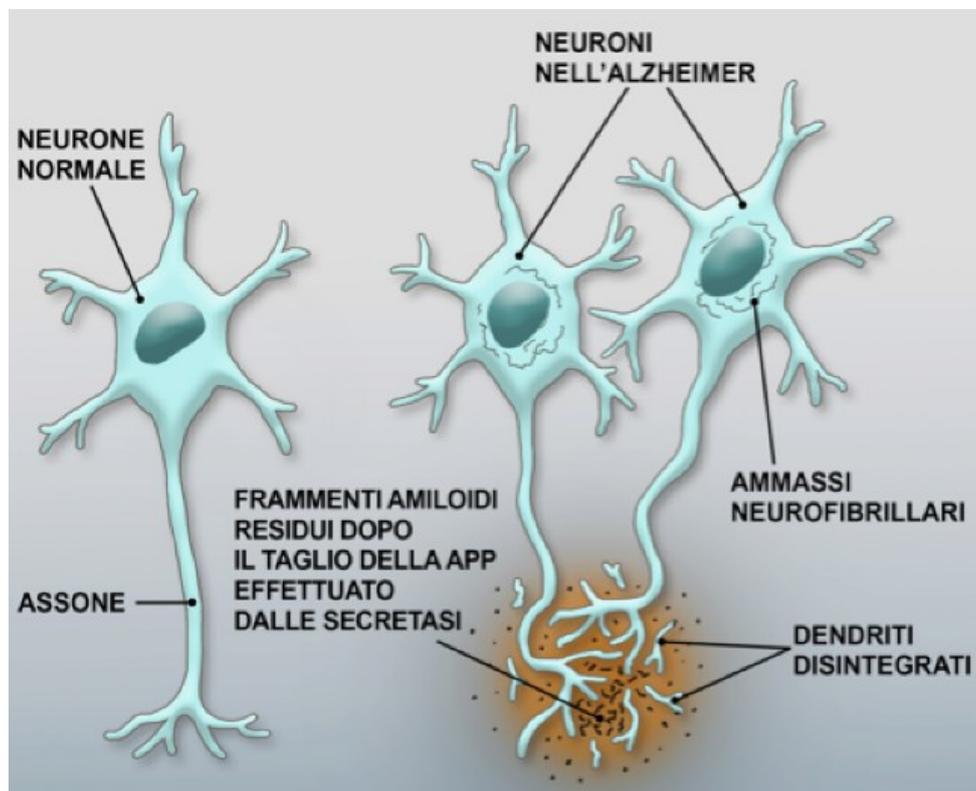


Figura 7: differenza schematica tra i neuroni sani e neuroni di un cervello affetto da Alzheimer <<http://www.oculisticatv.it/wp/occhio-e-alzheimer>>

3.2 MODELLIZZAZIONE DELLA MALATTIA DI ALZHEIMER IN ORGANOIDI AFFETTI DA HERPES VIRUS

L'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) è uno dei virus patogeni più comuni al mondo. Dopo la replicazione primaria nelle cellule epiteliali il virus è in grado di raggiungere i gangli del trigemino, ove permane in uno stato latente. Indagini condotte tramite analisi post-mortem hanno inoltre dimostrato che il virus non è presente solo nel trigemino, ma più in generale in tutto il cervello. Sono state osservate principalmente due forme patogene legate all'infezione da HSV-1: l'infezione litica in grado di causare encefalite e, in forma sporadica, l'Alzheimer [18]. Negli ultimi anni l'HSV-1 è stato soggetto di studi legati alla patogenesi dell'Alzheimer a causa di ritrovamenti di DNA virale nelle placche amiloidi [19].

A seguito di ricerche condotte da Graham A. Jamieson et alii nel 1991, analizzando i cervelli di due gruppi di persone anziane, un gruppo di controllo e uno di patologia, è emerso che il DNA dell'HSV-1 era rilevabile in entrambi [20]. La differenza sostanziale sussisteva nel fatto che la maggior parte dei malati erano portatori dell'allele APOE- ϵ 4. Questi pazienti subivano un danno virale maggiore oppure erano soggetti ad una riparazione più scarsa di tale danno. Infiammazioni dovute all'HSV-1, che agisce in presenza dell'allele APOE- ϵ 4, potrebbero verificarsi attraverso la capacità del virus di causare accumulo di β -amiloide e proteina Tau che sono i componenti caratteristici di placche e grovigli neurofibrillari nei cervelli soggetti ad Alzheimer.

Percentuali di DNA virale in giovani e bambini erano presenti in misura ridotta o addirittura assente; questo ha fatto intuire che l'accumulo di HSV-1 è associato al deterioramento del sistema immunitario dovuto all'età [6].

Nello studio di Agnieszka Rybak-Wolf et al. sono stati proposti gli organoidi cerebrali come opportunità per studiare gli aspetti fondamentali dell'interazione tra HSV-1 e tessuto cerebrale a livello molecolare; tuttavia, il SNC è costituito da molti tipi cellulari e non è ancora ben chiaro con quale efficienza il virus si replichi in essi e se questi tipi cellulari rispondano in modo diverso all'infezione [18].

3.2.1 CREAZIONE DEGLI ORGANOIDI PER LA MODELLIZZAZIONE DELL'INFEZIONE DA HSV-1

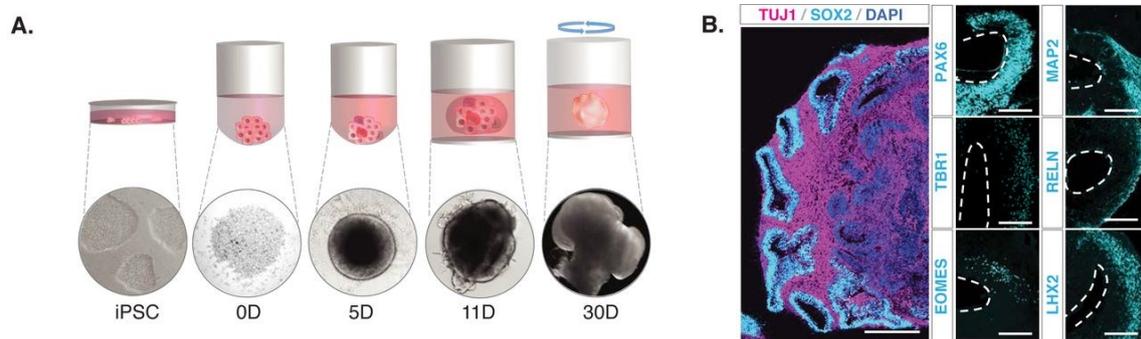


Figura 8: **A.** Panoramica schematica protocollo di Lancaster. **B.** Immunohistochemica esemplare di organoide cerebrale non infetto di 60 giorni che mostra la posizione dei progenitori neuronali (SOX2-ciano) e dei neuroni (TUJ1-magenta).

Gli organoidi cerebrali sono stati ottenuti da due linee di cellule staminali pluripotenti secondo il protocollo sviluppato da Lancaster et alii. Gli organoidi ottenuti presentavano la regione del proencefalo dorsale contenente più strutture ventricolari formate da:

- Progenitori neurali: positivi ai marcatori SOX2, essenziale per mantenere la pluripotenza delle cellule staminali embrionali indifferenziate, e PAX6, che funge da modello di coordinamento per la differenziazione e la proliferazione nei processi di neurogenesi e oculogenesi [4], [18].
- Progenitori intermedi: positivi al marcatore EOMES che circondano i progenitori neurali.
- Struttura simile alla corteccia: formata da neuroni positivi a MAP2, TUJ1 e LHX2 [18].

Il sessantesimo giorno gli astrociti hanno iniziato ad emergere mentre la zona sub-ventricolare esterna e gli strati neuronali hanno iniziato ad espandersi. Tutto questo è visibile tramite l'espressione del marcatore della glia radiale HOPX e ai differenti marcatori neuronali, tra cui TBR1 e RELN [18].

Tutto ciò dimostra come gli organoidi cerebrali sono capaci di generare i principali tipi cellulari presenti nella fase iniziale dello sviluppo cerebrale. In particolare, gli organoidi derivanti dalla linea iPSC-1 mostravano la promozione delle linee cellulari mesodermiche, mentre quelli derivanti dalla linea iPSC-2 mostravano lo sviluppo verso il proencefalo dorsale.

Tramite analisi trascrittomiche spaziali è stato possibile valutare la popolazione cellulare nelle varie regioni degli organoidi, come è possibile vedere in figura 9.

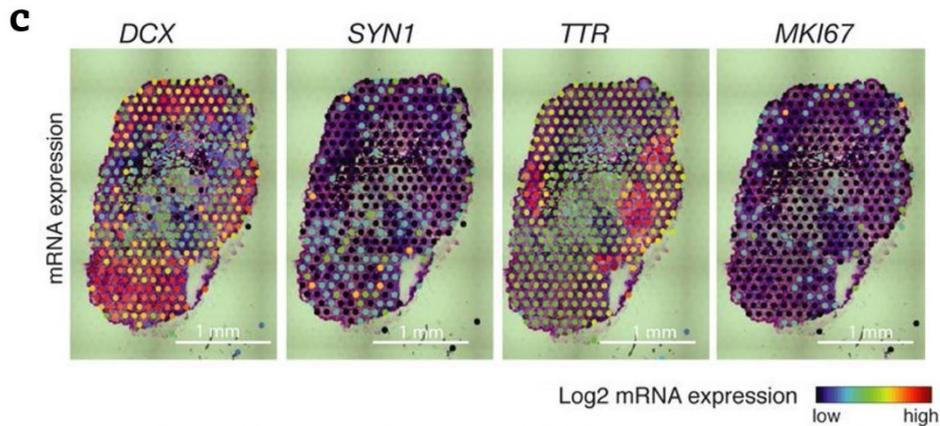


Figura 9: C. Immagini rappresentative dall'analisi della trascrittomiche spaziale di organoidi di 60 giorni per marcatori: DCX per i neuroni, SYN1 per le sinapsi, TTR per il plesso coroideo, MKI67 per la glia radiale proliferante. I colori indicano i livelli di espressione dell'm-RNA log2.

Successivamente, gli organoidi cerebrali di 60 giorni sono stati infettati col virus HSV-1-GFP (che codifica per la Green Fluorescent Proteina) e testati per studiarne i cambiamenti molecolari, cellulari e fisiologici [18].

In particolare, grazie all'analisi trascrittomiche spaziale dell'm-RNA della proteina GFP e immunohistochemica per la proteina GFP, è stato possibile rilevare l'RNA virale all'interno dell'intero dell'organoide già tre giorni dopo l'infezione, dimostrando la diffusione del virus dall'esterno all'interno [18] (figura 10).

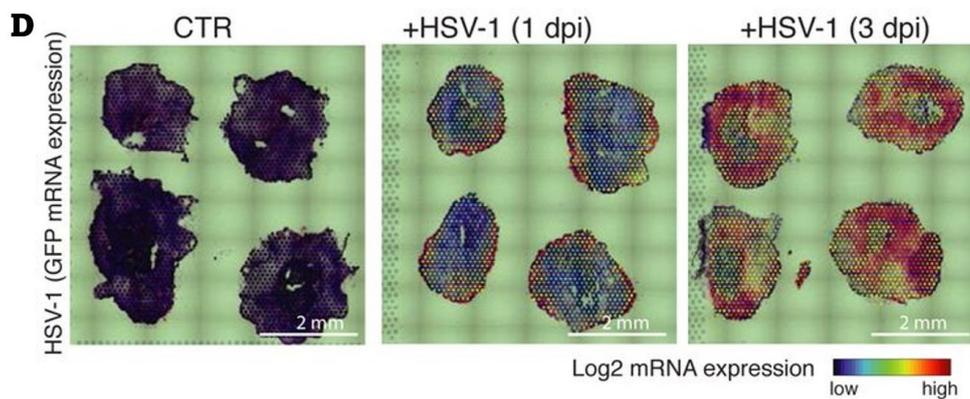


Figura 10: D. Analisi della trascrittomiche spaziale dell'espressione GFP di HSV-1 in non infetti (CTR) a 1 e 3 giorni dopo l'infezione. I colori indicano l'espressione dell'm-RNA di log2 GFP.

ANALISI FUNZIONALE DEGLI ORGANOIDI INFETTI

Per accertare l'entità dei danni mutageni causati da HSV-1 sono state condotte analisi tramite due approcci indipendenti, al fine di verificare le conseguenze funzionali dell'infezione [18].

Mediante il primo approccio basato su array multi-elettrodi, gli organoidi di 60 giorni di vita sono stati collocati su un vettore contenente 64 micro-elettrodi, abbastanza sensibili da rilevare l'attività dei neuroni stessi. Per avere un riscontro visivo sono state tracciate le heatmap, in cui il livello 1 rappresenta i picchi di attività nervosa e lo 0 rappresenta l'assenza di segnale. Come è possibile vedere, già dopo 20 ore si osserva una drastica riduzione del numero di picchi rispetto agli organoidi non infetti che hanno mantenuto la loro attività come mostrato in figura 11 [18].

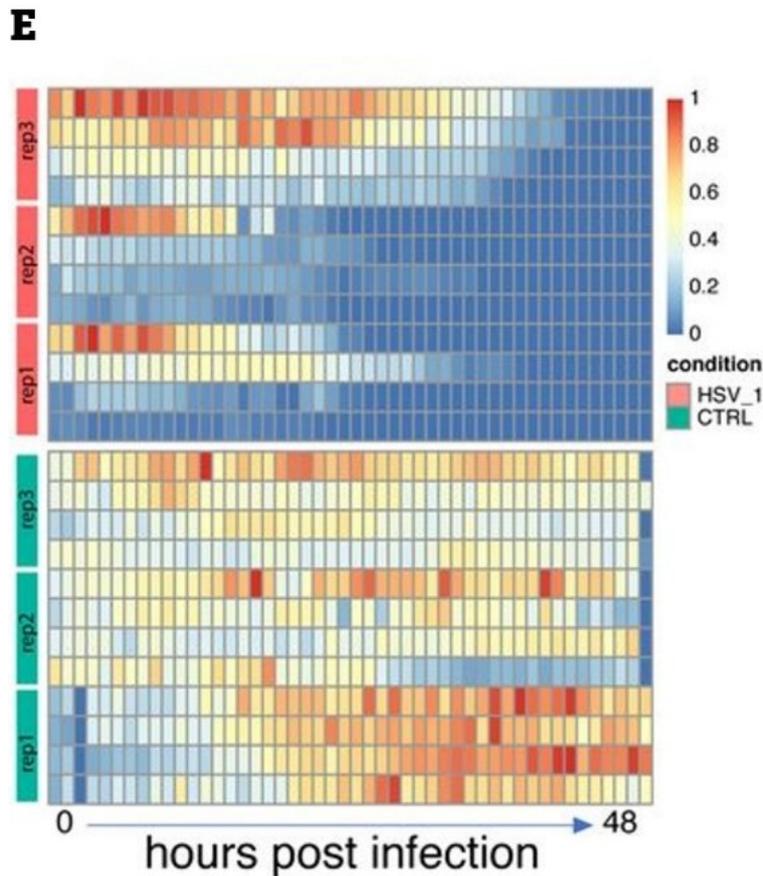


Figura 11: E. Heatmap tiene traccia del numero di picchi catturati dagli elettrodi più attivi di ciascuna replica ($n = 3$) in organoide non infetto (CTR, verde) e infetto da HSV-1-GFP (+ HSV-1, rosso) in 48 ore.

Nel secondo approccio tramite imaging del calcio, si è andati a rilevare l'attività del calcio nei potenziali d'azione degli organoidi. Nel campione di controllo l'espressione del calcio è nella norma, al contrario dei campioni infetti da HSV-1 in cui, tra le 24 e le 48 ore successive all'infezione, è preponderante l'espressione del virus.

Dopo 48 ore, negli organoidi infetti da HSV-1 non era rilevabile più alcuna attività: il numero di neuriti è stato chiaramente ridotto e i rimanenti mostravano un'attività limitata e non coordinata come visibile in figura 12 [18].

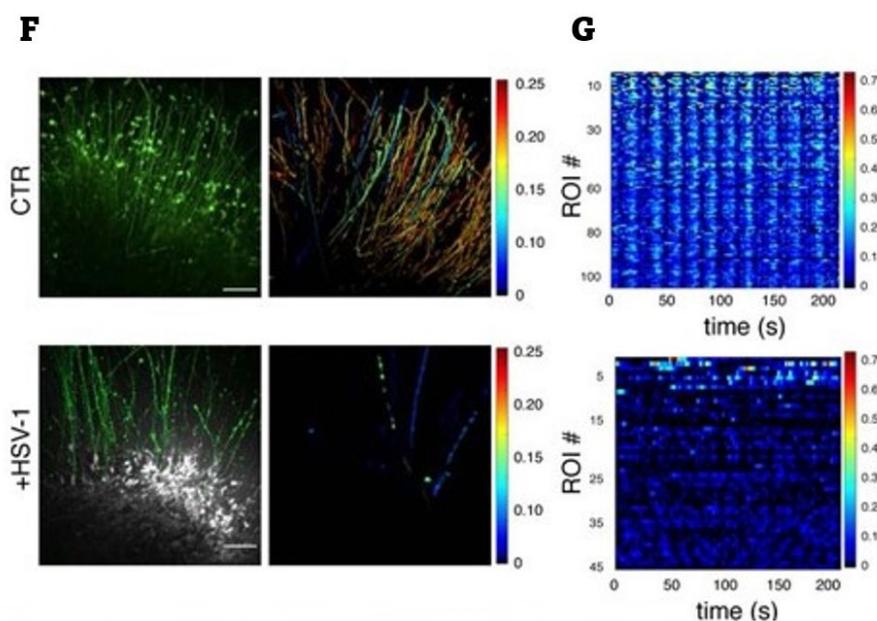


Figura 12: F. Immagine rappresentativa dell'imaging del calcio che mostra l'espressione del virus GFP (grigio) a 48 ore dopo l'infezione (destra). Immagini con codice colore che illustrano la frequenza dei picchi (pannello di destra). G. Grafico di rilevamento del picco per tutte le regioni di interesse in organoidi non infetti (CTR - pannello superiore)

I risultati dei test svolti su organoidi cellulari certificano la correlazione tra HSV-1 e la riduzione dell'attività neuronale.

3.2.2 ANALISI DEI TESSUTI CEREBRALI A SEGUITO DELL'INFEZIONE

Uno dei risultati più interessanti osservati dopo l'infezione è rappresentato dall'interruzione dell'integrità dei tessuti negli organoidi infetti, che si evince analizzando le componenti della matrice extracellulare.

Dalle analisi effettuate si intuisce che l'infezione da HSV-1 influisce fortemente sull'espressione dei componenti della matrice extracellulare che potrebbero innescare processi di degenerazione ed essere associati a profondi cambiamenti osservati nella morfologia organoide e nell'integrità dei tessuti.

La progressiva perdita della struttura e della funzione neuronale è dovuta a significative alterazioni cellulari. Nel sistema preso in considerazione è stato possibile osservare

diversi cambiamenti molecolari collegati direttamente ai processi di neurodegenerazione:

- La disregolazione dei geni della matrice extracellulare e l'interruzione della matrice stessa possono portare alla perdita sinaptica e neuronale, promuovendo la neurodegenerazione [4], [19].

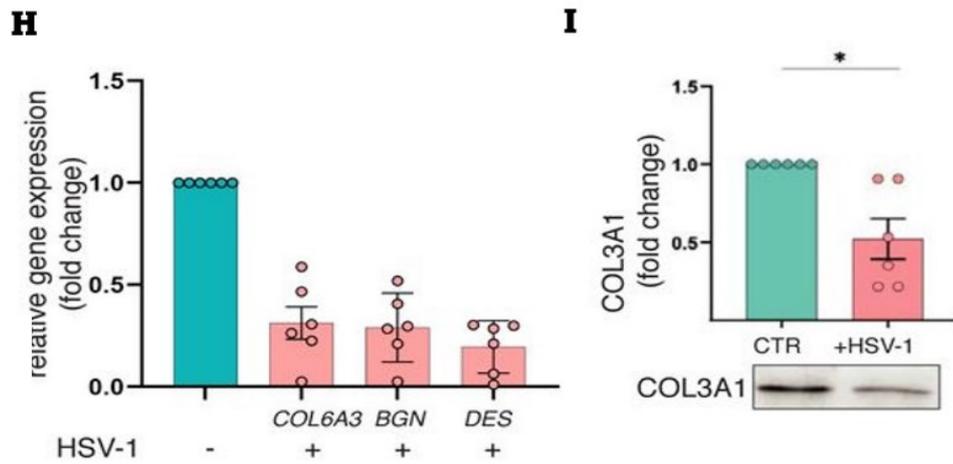


Figura 13: **H.** Analisi PCR quantitativa in tempo reale dell'espressione della trascrizione COL6A3, BGN e DES in organoidi derivati da due linee iPSC, 3 giorni dopo l'infezione (3 dpi). **I.** Western blot rappresentativi e relativa espressione proteica semi-quantificata mediante analisi densitometrica del collagene di tipo 3A1 (COL3A1) di organoidi non infetti (CTR) e 3 dpi infetti (+ HSV-1).

- La sottoregolazione di STATHMIN-2, regolatore della stabilità dei microtubuli, fondamentale per la normale crescita e rigenerazione assonale, è associata a disturbi neurodegenerativi come mostrato in figura 14.

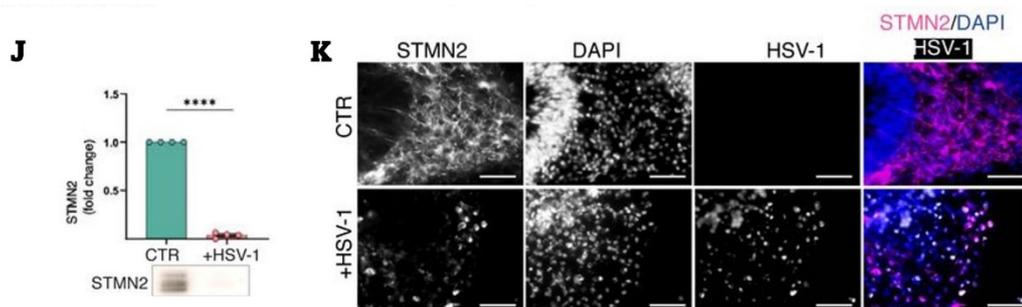


Figura 14: **J.** Western blot rappresentativi e relativa espressione proteica semi-quantificata mediante analisi densitometrica di STMN2 di organoidi non infetti (CTR) e a 3 giorni dopo l'infezione (+ HSV-1). **K.** Immunofluorescenza per neuroni (STMN2 - bianco/ciano), nuclei (DAPI - bianco/blu) e HSV-1 (GFP - bianco) in organoidi non infetti (CTR) e infetti a tre giorni dopo l'infezione (+HSV-1).

Questi risultati suggeriscono che ci sono diversi cambiamenti molecolari negli organoidi infetti da HSV-1 che potrebbero essere collegati alla neurodegenerazione e contribuire a successivi cambiamenti patologici.

CONCLUSIONI

Il campo degli organoidi cerebrali, sebbene illustri solamente una piccola parte della complessità del cervello umano, fa progressi sempre più rapidi rendendosi indispensabile per cogliere aspetti sempre più dettagliati della biologia umana.

Grazie alla loro replicabilità, gli organoidi possono essere sfruttati per capire meccanismi patologici altrimenti inaccessibili. Uno degli usi più frequenti, infatti, è la modellizzazione: gli organoidi sono in grado di fungere da modello per lo screening di composti, farmaci o vaccini, in contesti preclinici prevenendo l'infezione o trattando le conseguenze funzionali.

La limitazione principale, però, consiste nell'impossibilità di ottenere modelli duraturi per studiare la neurodegenerazione.

La sfida maggiore è data dal fatto che le cellule al centro del modello sono meno esposte all'ossigeno rispetto a quelle esterne; inoltre, un'altra limitazione importante sta nell'assenza di vascolarizzazione e di cellule immunitarie.

Si prevede nei prossimi anni un miglioramento delle condizioni di vita degli organoidi ma, ad oggi, nuovi studi sono necessari.

BIBLIOGRAFIA

- [1]. Sherwood, L., & Bodega, F. (2012). *Fondamenti di Fisiologia Umana*. Padova: Piccin Nuova Libreria.
- [2]. Barbatelli, G. (2018). *Anatomia Umana: Fondamenti: Con Istituzioni di Istologia*. Milano: Edi.Ermes.
- [3]. Martini, F. H., Tallitsch, R. B., Nath, J. L., Ober, W. C., Garrison, C. W., Welch, K., . . . Tallitsch, R. B. (2019). *Anatomia Umana*. Napoli: EdiSES Università.
- [4]. Fadiga, L., & Purves, D. (2021). *Neuroscienze*. Bologna: Zanichelli.
- [5]. Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., . . . Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development
- [6]. Itzhaki, R. F., & Wozniak, M. A. (2012). Could antivirals be used to treat Alzheimer's disease? *Future Microbiology*, 7(3), 307-309. doi: 10.2217/fmb.12.10
- [7]. Pelechano, V., & Steinmetz, L. M. (2013). Gene regulation by antisense transcription. *Nature Reviews Genetics*, 14(12), 880-893. doi: 10.1038/nrg3594
- [8]. Qian, X., Song, H., & Ming, G. (2019). Brain organoids: Advances, applications and challenges. *Development*, 146(8). doi: 10.1242/dev.166074
- [9]. Tambalo, M., & Lodato, S. (2020). Brain organoids: Human 3D models to investigate neuronal circuits assembly, function and dysfunction. *Brain Research*, 1746, 147028. doi: 10.1016/j.brainres.2020.147028
- [10]. Ormel, P. R., Vieira de Sá, R., Van Bodegraven, E. J., Karst, H., Harschnitz, O., Sneuboer, M. A., . . . Pasterkamp, R. J. (2018). Microglia innately develop within cerebral organoids. *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-06684-2
- [11]. Ledig, C., Schuh, A., Guerrero, R., Heckemann, R. A., & Rueckert, D. (2018). Structural Brain Imaging in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment:

- Biomarker Analysis and shared Morphometry Database. *Scientific Reports*, 8(1).
doi: 10.1038/s41598-018-29295-9
- [12]. Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Thal, L. J., & Corey-Bloom, J. (2004). The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of ad. *Neurology*, 62(11), 1984-1989. doi: 10.1212/01.wnl.0000129697.01779.0a
- [13]. Carlo, A. (2013). Sortilin, a novel APOE receptor implicated in Alzheimer disease. *Prion*, 7(5), 378-382. doi: 10.4161/pri.26746
- [14]. Asaro, A., Carlo-Spiewok, A., Malik, A. R., Rothe, M., Schipke, C. G., Peters, O., . . . Willnow, T. E. (2020). Apolipoprotein E4 disrupts the neuroprotective action of sortilin in neuronal lipid metabolism and endocannabinoid signaling. *Alzheimer's & Dementia*, 16(9), 1248-1258. doi: 10.1002/alz.12121
- [15]. Wozniak, M. A., Shipley, S. J., Combrinck, M., Wilcock, G. K., & Itzhaki, R. F. (2004). Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients. *Journal of Medical Virology*, 75(2), 300-306. doi: 10.1002/jmv.20271
- [16]. Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chételat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., . . . Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). doi: 10.1038/s41572-021-00269-y
- [17]. Medeiros, R., Baglietto-Vargas, D., & LaFerla, F. M. (2010). The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 17(5), 514-524. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00177.x
- [18]. Rybak-Wolf, A., Wyler, E., Legnini, I., Loewa, A., Glažar, P., Kim, S. J., . . . Rajewsky, N. (2021). Neurodegeneration in human brain organoids infected with herpes simplex virus type 1. doi: 10.1101/2021.03.05.434122

- [19]. Itzhaki, R. F. (2014). Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: Increasing evidence for a major role of the virus. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6. doi: 10.3389/fnagi.2014.00202
- [20]. Jamieson, G. A., Maitland, N. J., Wilcock, G. K., Craske, J., & Itzhaki, R. F. (1991). Latent herpes simplex virus type 1 in normal and Alzheimer's disease brains. *Journal of Medical Virology*, 33(4), 224-227. doi: 10.1002/jmv.1890330403
- [21]. Corsini, N. S., & Knoblich, J. A. (2022). Human organoids: New strategies and methods for analyzing human development and disease. *Cell*, 185(15), 2756-2769. doi: 10.1016/j.cell.2022.06.051
- [22]. Wyler, E., Menegatti, J., Franke, V., Kocks, C., Boltengagen, A., Hennig, T., . . . Landthaler, M. (2017). Widespread activation of antisense transcription of the host genome during Herpes simplex virus 1 infection. *Genome Biology*, 18(1). doi: 10.1186/s13059-017-1329-5