

**5 PER MILLE 2023**

**Fondi 5 per mille assegnati:**

€ 114.034,29

**Data ricezioni fondi:**

22/10/2024

**Codice Progetto:**

5M-2023-23687145

**Titolo progetto:**

Sviluppo di una piattaforma tecnologica che permetta analisi di trascrittomico e di espressione genica differenziale a livello di single cells: applicazioni nelle malattie rare di interesse cardiovascolare, endocrinologico e neurologico

**Data Inizio Progetto:**

01/01/2026

**Data Fine Progetto:**

31/12/2028

**Responsabile Scientifico Progetto:**

Prof. Pierluigi Meroni

**Abstract Progetto:**

L'analisi di singole cellule e l'analisi subcellulare si riferiscono allo studio di genomica, trascrittomico, proteomica, metabolomica e interazioni cellula-cellula a livello di singola cellula. Il concetto di analisi di singole cellule ha avuto origine negli anni '70. A causa dell'eterogeneità osservata nelle popolazioni cellulari eucariotiche e procariotiche, l'analisi dei processi biochimici e delle caratteristiche di una singola cellula consente di scoprire meccanismi che sono troppo sottili o poco frequenti per essere rilevabili quando si studia una popolazione mista di cellule. Nell'analisi multicellulare convenzionale, questa variabilità è solitamente mascherata dal comportamento medio della popolazione più rappresentata. Tecnologie come il sorting cellulare basato sulla citometria a flusso consentono l'isolamento di singole cellule selezionate da campioni complessi, mentre le tecnologie di partizionamento cellulare consentono l'analisi molecolare simultanea di centinaia o migliaia di singole cellule non-ordinate. Questo è particolarmente utile per l'analisi delle variazioni nell'espressione genica tra cellule genotipicamente identiche e consente la definizione di sottotipi cellulari altrimenti non rilevabili. Lo scopo della trascrittomico monocellulare è determinare quali geni vengono espressi in ogni singola cellula. Il trascrittoma viene spesso utilizzato, al posto della proteomica a causa della difficoltà attualmente associata alla insufficiente amplificazione dei livelli proteici. I motivi principali per cui l'espressione genica è stata studiata utilizzando questa tecnica sono studiare la dinamica genica, lo splicing dell'RNA e la tipizzazione cellulare. La dinamica genica viene solitamente studiata per determinare quali cambiamenti nell'espressione genica influenzino le diverse caratteristiche cellulari. Gli studi sullo splicing dell'RNA si concentrano sulla comprensione della regolazione delle diverse isoforme di trascrizione. La trascrittomico a singola cellula è stata utilizzata anche per la tipizzazione cellulare, dove i geni espressi in una cellula vengono utilizzati per identificare e classificare diversi tipi di cellule e descrivere un profilo immunologico. L'obiettivo

principale della tipizzazione cellulare è identificare cellule che non esprimono marcatori genetici noti. Successivamente alla definizione del trascrittoma a livello di single cellule è possibile, sulla popolazione cellulare di interesse, valutare l'espressione differenziale di trascritti specifici utilizzando la digital (d) PCR che, eseguendo la RTPCR su frazioni molto piccole di campione, ha una sensibilità molto più elevata e consente una determinazione quantitativa. Lo scopo di questo studio è quello di sviluppare una piattaforma che comprenda la single cells analisi e la dPCR per utilizzarle inizialmente in particolari patologie rare di origine reumatologica quali la vasculite a cellule giganti per cui attualmente non esistono biomarcatori diagnostici specifici. In questa patologia l'analisi del trascrittoma e dPCR dei geni di particolare interesse potrebbero portare ad identificare marcatori sierici da utilizzare precocemente in sostituzione di metodiche più invasive quali la biopsia dell'arteria temporale. La trascrittomico monocellulare utilizza tecniche di sequenziamento simili alla genomica monocellulare. Il primo passo nella quantificazione del trascrittoma è la conversione dell'RNA in cDNA mediante trascrittasi inversa, in modo che il contenuto della cellula possa essere sequenziato con metodi NGS, come è stato fatto in genomica. Una volta convertito, non c'è abbastanza cDNA da sequenziare, quindi le stesse tecniche di amplificazione del DNA utilizzate nella genomica monocellulare vengono applicate al cDNA per rendere possibile il sequenziamento. Per la dPCR, viene effettuata una ripartizione del campione in microfrazioni in ciascuna delle quali viene effettuata una quantificazione dei trascritti di interesse.

#### **PIANO DI SPESA DEL PROGETTO**

| <b>Voce di costo</b>                 | <b>Spesa prevista (€)</b> |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Personale di ricerca                 | 40.634,29                 |
| Apparecchiature                      | 62.000,00                 |
| Materiale uso destinato alla ricerca | 0                         |
| Spese di organizzazione              | 0                         |
| Elaborazione dati                    | 0                         |
| Spese amministrative                 | 11.400,00                 |
| Altro (indicare quali)               | 0                         |
| <b>TOTALE</b>                        | <b>114,034,29</b>         |