



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**PREDIZIONE SUL MORBO DI PARKINSON BASATA SU MODELLI CELLULARI DERIVATI DAI
PAZIENTI**

**MECHANISTIC SUBTYPES OF PARKINSON'S: A PREDICTION BASED ON PATIENT-DERIVED STEM
CELL MODELS**

Tesi di Laurea di:
Vito Di Maso

Docente Referente
Chiar.ma Prof.ssa
Maria Grazia ORTORE

**Sessione
Anno Accademico 2022/2023**

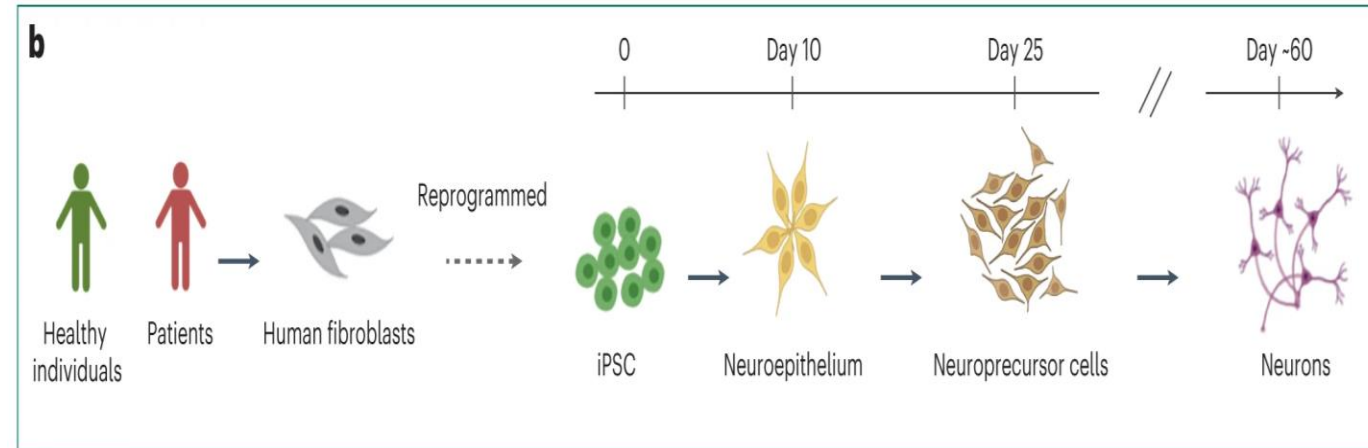
Analisi dell'Eterogeneità Molecolare e Predizione dei Sottotipi di Parkinson

la diagnosi molecolare del sottotipo di PD è difficile:

Il PD si evidenzia con:

1. l'accumulo di aggregati insolubili della proteina α -Syn (che causa una proteinopatia).
2. l'accumulo di mitocondri anomali con funzione bioenergetica compromessa.

La strategia e quella di utilizzare neuroni corticali derivati da cellule staminali pluripotenti indotte di pazienti (iPSC), sono stati definiti quattro sottotipi cellulari che rappresentano differenti aspetti patologici.



SOTTOTIPI

Il **Sottotipo 1** coinvolge pazienti con mutazioni nel gene SNCA, che codifica per α -Syn, sviluppando una forma aggressiva di Parkinson con predominante aggregazione proteica. Neuron derivati da iPSC di pazienti con triplicazione di SNCA sono stati utilizzati per modellare questa proteinopatia familiare.

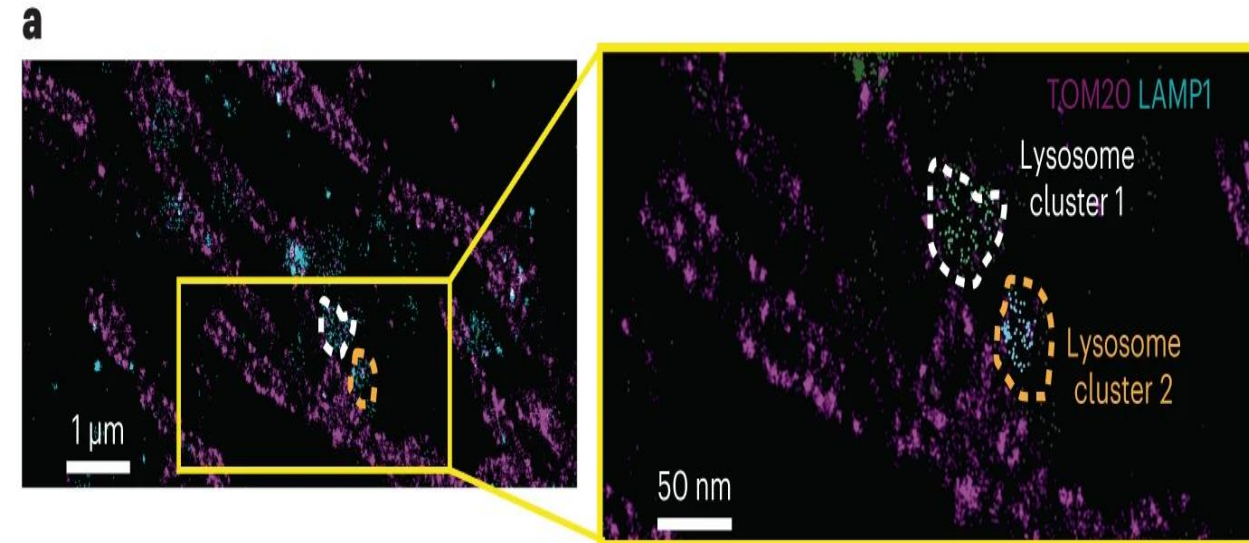
Il **Sottotipo 2** si concentra sull'aggregazione di α -Syn che si diffonde da cellula a cellula, riproducendo la proteinopatia ambientale. Neuron sani derivati da iPSC sono stati esposti ad aggregati di α -Syn per replicare questa condizione.

Il **Sottotipo 3** è associato all'esposizione a pesticidi, in particolare rotenone, che danneggia il complesso 1 mitocondriale, inducendo disfunzione mitocondriale. Questo modello riflette la connessione tra l'esposizione ambientale e la compromissione mitocondriale nei pazienti con PD.

Il **Sottotipo 4** coinvolge mutazioni nei geni PINK1 e PARKIN, causando il PD autosomico recessivo con eliminazione compromessa dei mitocondri danneggiati (mitofagia). È stato applicato uno stress da danneggiamento mitocondriale per creare un modello di disfunzione mitocondriale.

Algoritmo Innovativo utilizza neuroni da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) per Identificare i Sottotipi di Malattia di Parkinson

È stato sviluppato un algoritmo che utilizza dati provenienti da neuroni derivati da iPSC e immagini cellulari in tempo reale. Poi sono stati creati classificatori basati su caratteristiche estratte automaticamente e reti neurali convoluzionali, che sono un tipo di architettura di reti neurali progettate per l'elaborazione efficiente di immagini e video. Queste reti sono particolarmente efficaci nel riconoscimento di modelli spaziali complessi all'interno di dati visivi. In sintesi, questo studio rappresenta un passo significativo verso la comprensione dell'eterogeneità molecolare nel PD.

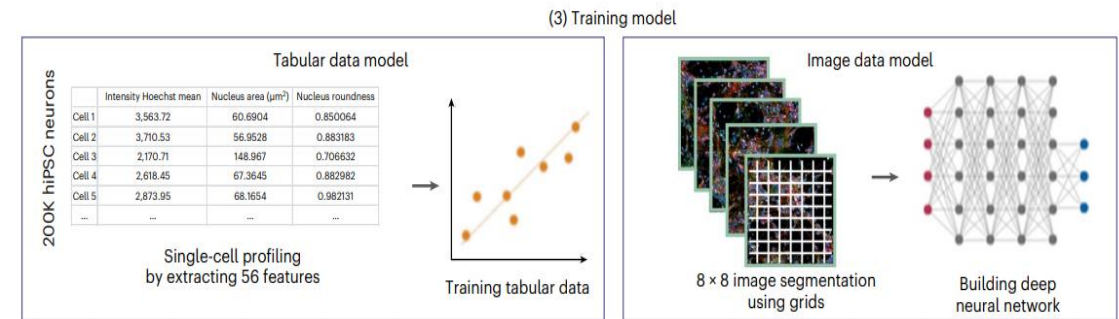
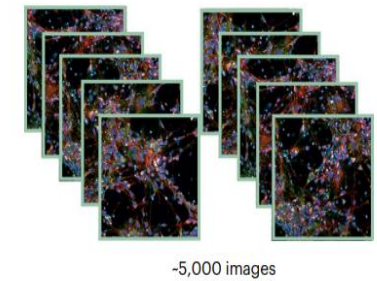
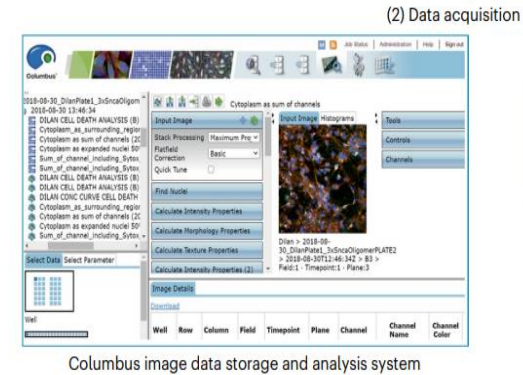
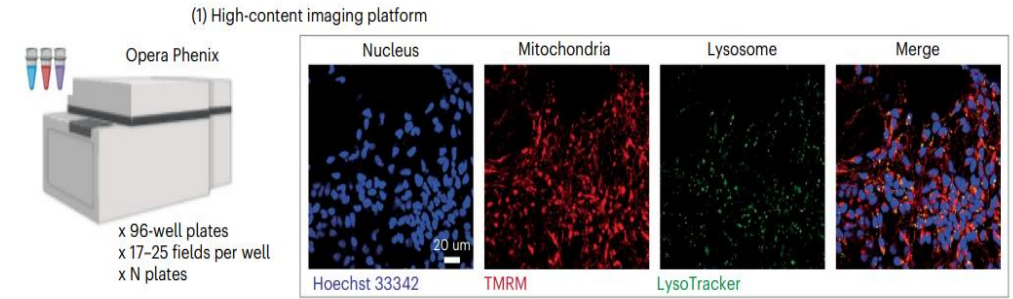


a. Immagini di co-localizzazione mitocondriale e lisosomiale ottenute con microscopia a super-risoluzione per visualizzare il contatto tra mitocondri e lisosomi in PD43. I mitocondri e i lisosomi sono contrassegnati con TOM20 e LAMP1 (n = 2-3 campi visivi, su due linee iPSC indipendenti).

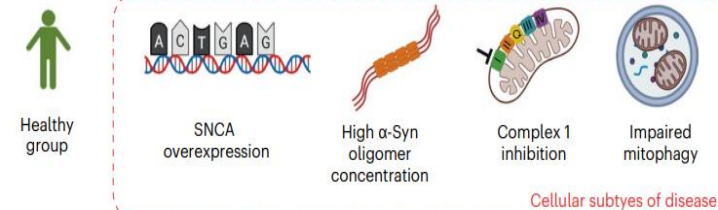
Classificazione Avanzata dei Sottotipi Cellulari nella Malattia di Parkinson attraverso Imaging in Tempo Reale e Analisi Morfologica.

- Nel contesto della malattia di Parkinson, l'obiettivo è comprendere i differenti sottotipi cellulari utilizzando un approccio di imaging delle cellule in tempo reale. Questo coinvolge due aspetti principali: la depolarizzazione mitocondriale causata dall'inibitore del complesso 1 ovvero il rotenone, e la disfunzione lisosomiale indotta da cloroquina.
- Il processo di costruzione dei modelli inizia con l'imaging delle cellule utilizzando un sistema di screening ad alto contenuto. Le immagini acquisite attraverso tre canali, ognuno etichettato con un marcatore specifico, vengono successivamente analizzate per estrarre 56 caratteristiche morfologiche.
- Successivamente, i modelli predittivi vengono programmati utilizzando dati generati dalle caratteristiche di profilazione cellulare o dalle immagini segmentate. Una volta programmati, i modelli sono in grado di prevedere se una cellula appartiene al gruppo sano o a uno dei quattro sottotipi di malattia di Parkinson.

f Experimental process to build the models

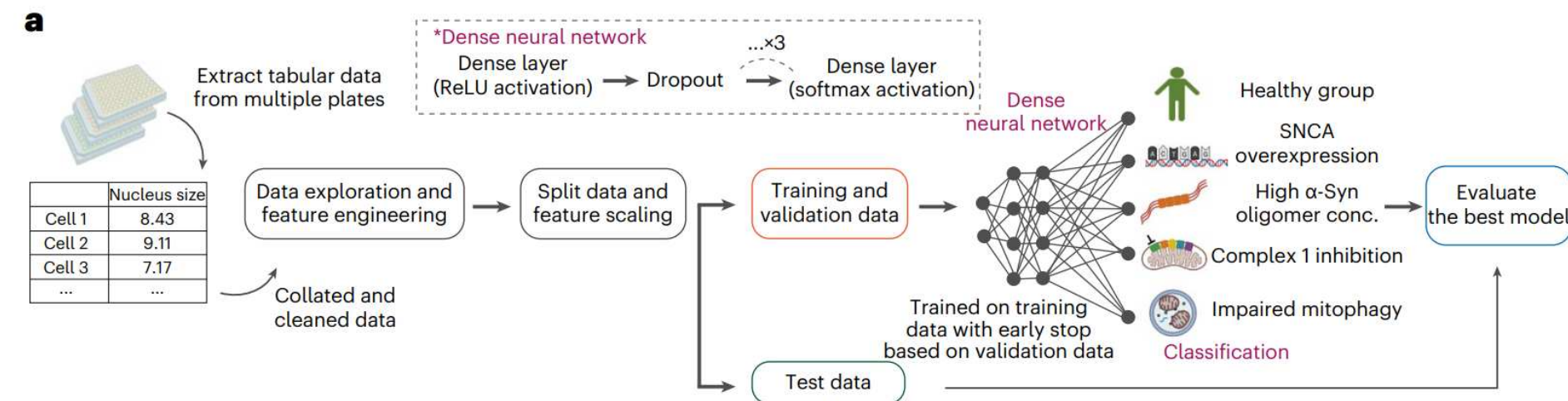


(4) Prediction of disease states



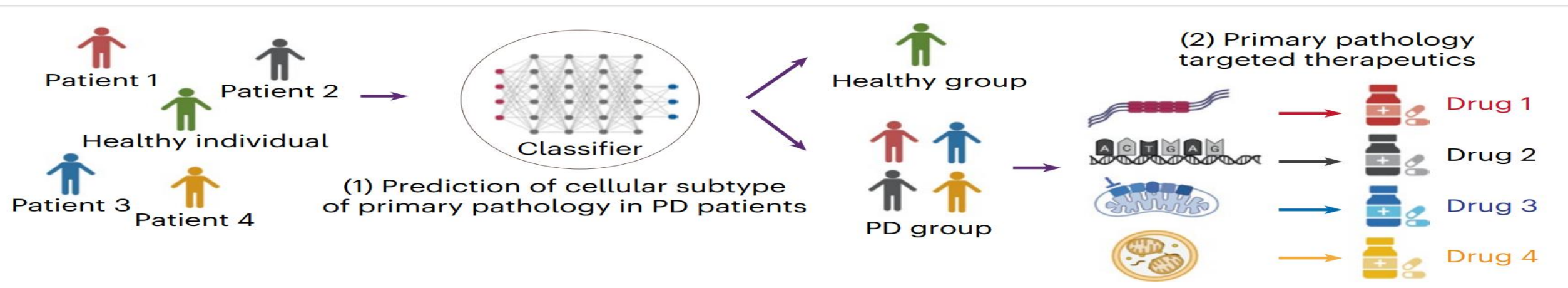
Tipi di classificazione molecolare e predizione organellare

- **Classificatore basato su dati cellulari:** E' stato sviluppato un classificatore utilizzando dati cellulari per prevedere cinque classi di malattie. Il modello e programmato su oltre un milione di cellule, ha raggiunto una precisione complessiva dell'82%, e le caratteristiche mitocondriali, nucleari e lisosomiali sono emerse come elementi chiave nella corretta identificazione delle diverse classi di malattie.
- **Contatti tra organelli:** Abbiamo analizzato i contatti tra mitocondri e lisosomi, indicatori critici dell'omeostasi cellulare. Utilizzando la microscopia a super-risoluzione, abbiamo creato un modello predittivo basato su questi contatti organellari, rivelando informazioni preziose sulla patologia.
- **Classificatore basato su immagini:** Abbiamo implementato un classificatore suddividendo le immagini in mosaici 8x8. Il modello ha dimostrato un'elevata precisione nel distinguere cinque classi di malattie, con un tasso di veri positivi superiore al 90%.
- **Effetto di una mutazione genetica:** Esplorando gli effetti di specifiche mutazioni genetiche (SNCA x3 e PINK1), abbiamo creato un classificatore per prevedere il loro impatto. La valutazione delle caratteristiche mitocondriali e lisosomiali ha evidenziato la rilevanza di tali organelli nella classificazione delle mutazioni e nella comprensione delle patologie associate.



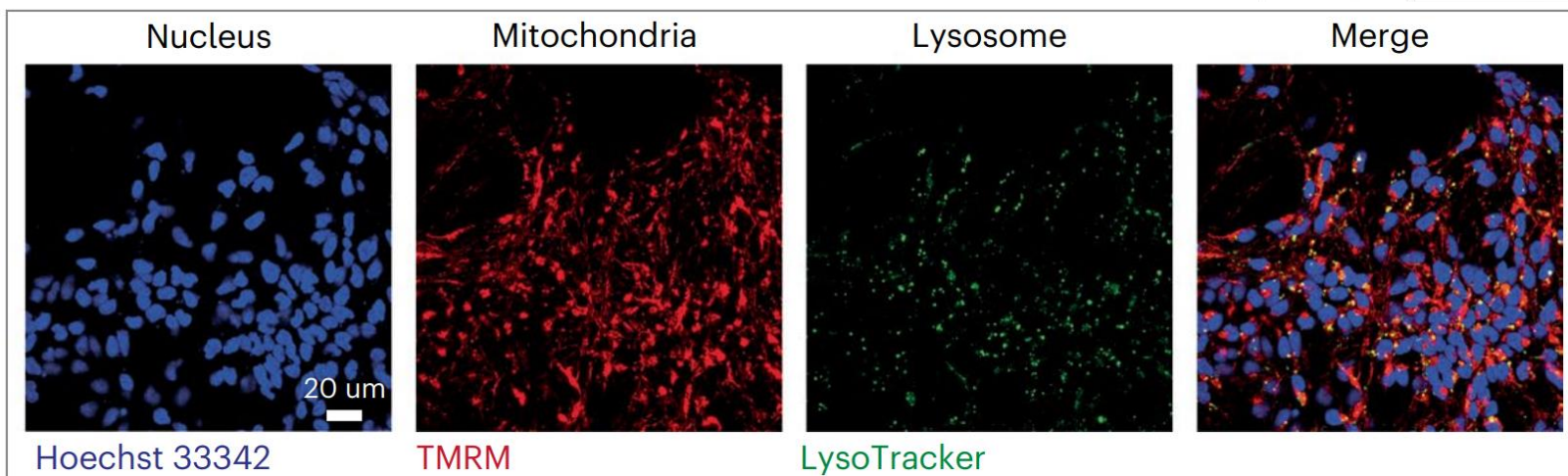
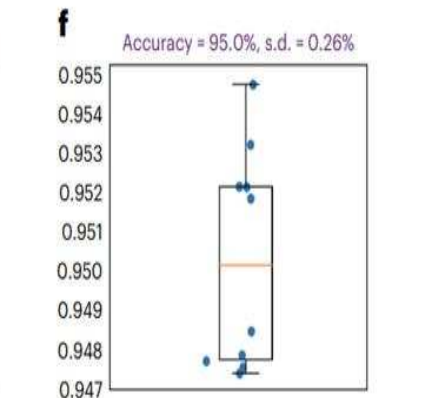
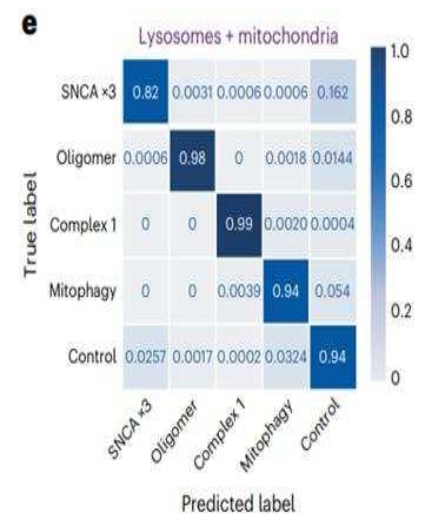
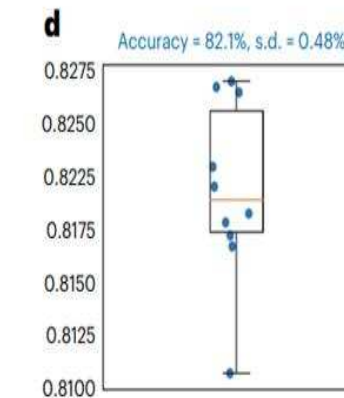
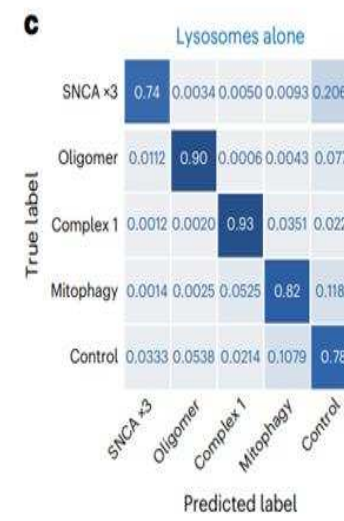
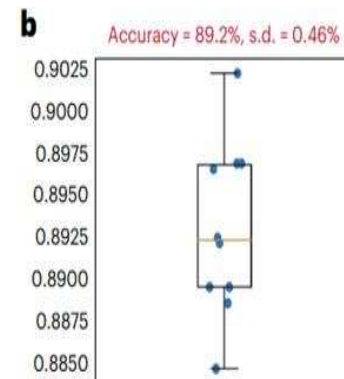
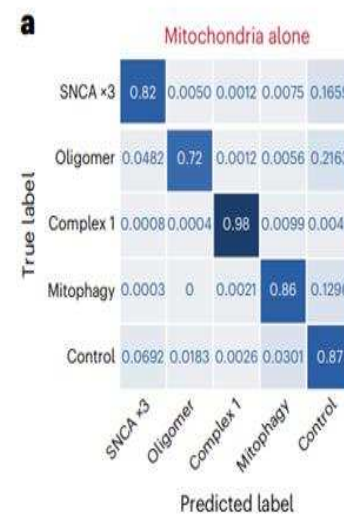
Studio sui classificatori basati sull'apprendimento automatico

Lo studio descrive l'implementazione di un algoritmo basato sull'apprendimento approfondito che utilizza dati derivati da neuroni ottenuti mediante iPSC (cellule staminali pluripotenti indotte) e immagini cellulari in tempo reale. Sono stati sviluppati classificatori per mitocondri e lisosomi, dimostrando la capacità di identificare specifiche caratteristiche cellulari predittive dei differenti sottotipi di malattia di Parkinson (PD). Inoltre, un classificatore genetico a tre classi (SNCA ×3, PINK1 e CTRL) ha mostrato un'accuratezza complessiva del 80,7% su un set di test non visto. Infine, il lavoro suggerisce un'applicazione pratica, indicando come i classificatori basati sull'apprendimento automatico potrebbero migliorare l'approccio alle terapie del PD, consentendo la suddivisione degli individui in gruppi PD e sani e la classificazione ulteriore in base ai sottotipi meccanicistici per un trattamento mirato.



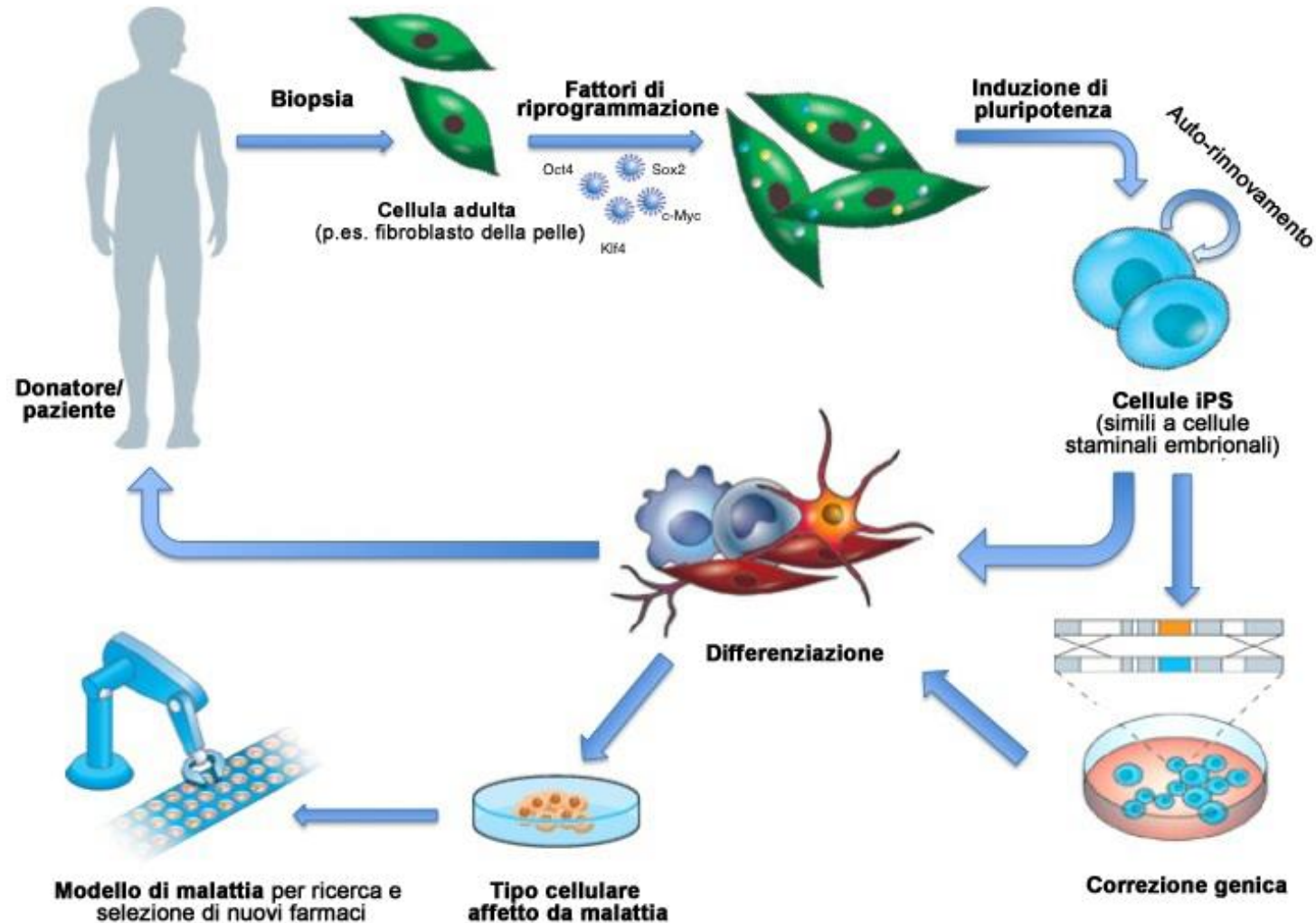
Classificazione usando immagini di mitocondri e lisosomi:

Le matrici di confusione e la validazione incrociata stratificata mostrano elevate prestazioni predittive solo utilizzando i mitocondri (a-b), risultati simili sono stati ottenuti anche utilizzando solo immagini di lisosomi (c-d) e utilizzando mitocondri e lisosomi insieme (e-f).



METODO UTILIZZATO PER GENERARE LE HIPSC

La generazione di neuroni derivati da (HIPSC) provenienti da diversi donatori, inclusi pazienti affetti da morbo di Parkinson con mutazioni specifiche (SNCA ×3), sono stati ottenuti da biopsie cutanee nel contesto di un programma finanziato dall'Unione Europea IMI, Stem-BANCC. Le linee di controllo sono state ottenute da donatori sani, una delle quali è stata generata attraverso l'editing genetico. Alcune linee sono state acquistate dal NINDS Human Genetics Resource Center e le procedure sperimentali hanno ottenuto l'approvazione da parte delle autorità etiche e di ricerca.



CONCLUSIONE

L'integrazione avanzata di apprendimento automatico, utilizzando dati tabulari e immagini, ha fornito una piattaforma predittiva sofisticata per comprendere e classificare i sottotipi meccanicistici della malattia di Parkinson. Attraverso l'impiego di neuroni corticali derivati da cellule staminali umane, il lavoro ha identificato loci genetici correlati a processi cellulari nelle malattie sporadiche. L'approccio metodologico ha coinvolto l'utilizzo di immagini ad alto contenuto per tracciare i meccanismi di malattia, sviluppando classificatori basati su dati tabulari e immagini. Le caratteristiche cellulari, tra cui intensità, morfologia e testualità di mitocondri, lisosomi e nuclei, sono state impiegate per programmare modelli, evidenziando l'importanza delle caratteristiche mitocondriali e lisosomiali nella predizione dei sottotipi di malattia. L'implementazione di classificatori basati su reti neurali convoluzionali (CNN) ha dimostrato elevate precisioni, fornendo un approccio robusto per distinguere stati di malattia e controllo sano. Le applicazioni cliniche future comprendono il potenziale impatto nella diagnosi e nel trattamento personalizzato, guidato dall'identificazione dei meccanismi cellulari specifici. Tuttavia, è necessario considerare le limitazioni, come la spiegabilità e generalizzabilità dei modelli basati su dati tabulari, la varietà genetica dei pazienti e l'eterogeneità della malattia nel mondo reale. In sintesi, questo studio rappresenta un notevole progresso nel comprendere la malattia di Parkinson attraverso un approccio multidisciplinare, aprendo prospettive significative per l'avanzamento nella diagnosi personalizzata e nello sviluppo di terapie mirate.

nature machine intelligence. Published online: 10 August 2023

Prediction of mechanistic subtypes of Parkinson's using patient-derived stem cell models,
<https://doi.org/10.1038/s42256-023-00702-9>.

Karishma D'Sa, James R. Evans, Gurvir S. Virdi, Giulia Vecchi, Alexander Adam, Ottavia Bertolli, James Fleming, Hojong Chang, Craig Leighton, Mathew H. Horrocks, Dilan Athauda, Minee L. Choi, Sonia Gandhi,