



Corso di dottorato in Scienze Biomolecolari
PhD in Biomolecular Sciences
Ciclo 40 / Cycle 40
A.Y. 2024-2025

Reserved scholarship C

Progetti finanziati nell'ambito dei Dipartimenti di Eccellenza 2023-2027.

Curriculum Biologia Quantitativa

Il vincitore sceglierà il progetto di ricerca dall'elenco sottostante.

MUR-funded grants - Departments of Excellence 2023-2027.

Quantitative Biology Curriculum

The winner will choose from the list available below the research project.

Principal Investigator	Project title
1 - Toma Tebaldi & Luca Tiberi	<i>Building a Map of Human Specific Genes with Single-cell resolution (HuMap) / Costruire una mappa di geni "human specific" a risoluzione di singola cellula (HuMap)</i>
2 – Simona Casarosa & Toma Tebaldi	<i>Tears for AMD – A tear film 'omics' study for a better understanding of age-related macular degeneration (AMD) and to inform novel therapeutic approaches / Lacrime per l'AMD - Uno studio 'omico' sul film lacrimale per una migliore comprensione della degenerazione maculare legata all'età (AMD) e per informare nuovi approcci terapeutici</i>
3 – Enrico Domenici & Francesco Asnicar	<i>Exploring the genetic architecture of the oral microbiome diversity by machine learning-assisted genome wide association / Studio della struttura genetica della diversità del microbioma orale tramite associazione genomica su larga scala basata su machine learning</i>



Project 1

One ring to rule them all: circRNA as a common hallmark of neurodegenerative diseases

Costruire una mappa di geni "human specific" a risoluzione di singola cellula (HuMap)

Laboratory:

Laboratory of RNA and Disease Data Science (<https://www.cibio.unitn.it/1349/laboratory-of-rna-and-disease-data-science>)

Principal Investigator: Toma Tebaldi (toma.tebaldi@unitn.it) & Luca Tiberi (luca.tiberi@unitn.it)

Keywords: Single-cell and spatial transcriptomics, cancer

Synthetic description of the activity and expected research outcome

Humans show unique features with respect to the closest living evolutionary species (chimpanzees and bonobos), such as brain size, height, gut, skeleton, immune system and metabolism. Molecular variations underlying these unique features have been evolving over the last 6 million years. Several hundreds of human specific genes, presenting human-specific genomic variations, have been reported in the last few years. Despite their huge relevance for understanding human-specific adaptation, most of human specific genes are currently poorly characterized in terms of their function, cell-type specific expression, regulatory relationships with other genes, and involvement in human diseases.

The HuMap project aims to characterize human specific genes in terms of their genomic features, cell-specific expression, causal relationship with other genes and association to human diseases.

The project will leverage innovative computational biology approaches such as causal network inference methods and integration of high quality up-to-date genomic, transcriptomic and proteomics data, with particular focus on high-resolution single-cell and spatially resolved omics atlases.

The information obtained by the HuMap project will be essential to identify disease-relevant candidates among human specific genes, ideally with a defined tissue or cell-specific expression and with strong causal relationships with disease-critical genes, in order to generate experimental follow-up using organoids and mouse models, where the function of the relevant human specific genes will be explored in-vivo. HuMap data will also be released as the first web server storing information on human specific genes and sharing all the results of the analyses for dissemination.

This proposal combines the complementary expertise of the Tiberi and Tebaldi labs, offers an original platform for studying human biology and has the strategic potential to open up multiple research lines answering the fundamental question of what makes humans unique at a molecular level, as well as addressing diseases occurring mainly in humans, such as brain, blood and bone tumors, or immune diseases.

AIM 1: To obtain a high quality and comprehensive catalogue of human-specific genes and their single-cell expression patterns

Task 1a) Build the full set of human specific genes, including noncoding RNAs.

The starting point of the analysis will be a collection of 856 human specific genes previously published (Bitar et al, 2019). A substantial update of this collection will be performed based on:

- recently released human genome assemblies, in particular the T2T genome assembly (Nurk et al, 2022) and the human PanGenome draft assembly (Liao et al, 2023)
- updated annotation of human genes and transcripts, using the latest Gencode reference. Importantly, the annotation will cover also noncoding RNAs, in order to include noncoding transcriptome variants in the final collection
- recent genome assemblies from the closest living evolutionary species (chimpanzees and bonobos)

The biological impact of human specific genes will be assessed by functional network and pathway analyses.

Task 1b) Define the single-cell expression patterns of human specific genes

Human single cell atlases will be used to explore the expression of human specific genes and identify:

- Human cell types showing the highest expression of human specific genes
 - Human specific genes with tissue or cell-type specific expression. Groups of co-expressed human specific genes will also be identified.
- The analysis will start from pan-tissue human atlases, such as the Tabula Sapiens dataset (Karkadiaz et al, 2022) and the Human Cell Atlas (Regev et al, 2017) and will then focus on organ specific atlases, such as brain and immune atlases (Nieto eta al, 2021; Siletti et al, 2022). The choice of specific datasets will be based on the results obtained in the analysis of pan-tissue atlases. Our preliminary results suggest that several human specific genes are selectively expressed in neuron and immune cell subtypes.

Task 1c) Characterize human specific cells by integrating multi-species single-cell atlases

Human single-cell atlases will be integrated with single-cell atlases from mouse (Tabula Muris Consortium, 2018; Han et al, 2018) and primates (Zhang et al, 2022; Han et al, 2022). After the integration, cells will be clustered according to transcriptional profiles, and specific clusters composed prevalently or exclusively by human cells will be identified. These human specific cells will be characterized, and the contribution of human specific genes in defining human specific cell types and states will be determined.

AIM 2: Identify human specific genes potentially critical for human diseases

Task 2a Define the involvement of human specific genes in human diseases using spatially resolved expression data



Based on cell type expression patterns collected in Task 1b, we will investigate the spatial expression patterns of the top relevant human specific genes. Given the human-specific morphology of brain regions such as the neocortex, we can anticipate the strategic relevance of collecting spatially resolved datasets available in literature and focusing on brain-related diseases (recently reviewed in Piwecka et al, 2023). Spatially resolved datasets will be analysed in order to identify human-specific genes with spatial expression pathways, possibly connected to alterations in the morphology induced by the pathology.

The most relevant candidates will be selected to generate experimental follow-up using organoids and mouse models, where the function of the relevant human specific genes will be explored in-vivo.

References:

- Amberger JS et al. OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D1038-D1043. doi: 10.1093/nar/gky1151.
- Bitar M, et al. Genes with human-specific features are primarily involved with brain, immune and metabolic evolution. *BMC Bioinformatics.* 2019 Nov 22;20(Suppl 9):406. doi: 10.1186/s12859-019-2886-2.
- Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature.* 2005 Sep 1;437(7055):69-87. doi: 10.1038/nature04072.
- Dutrillaux B. Chromosomal evolution in primates: tentative phylogeny from *Microcebus murinus* (Prosimian) to man. *Hum Genet.* 1979 May 10;48(3):251-314. doi: 10.1007/BF00272830.
- Frankish A et al. GENCODE: reference annotation for the human and mouse genomes in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D942-D949. doi: 10.1093/nar/gkac1071.
- Han L et al. Cell transcriptomic atlas of the non-human primate *Macaca fascicularis*. *Nature.* 2022 Apr;604(7907):723-731. doi: 10.1038/s41586-022-04587-3.
- Han X et al. Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. *Cell.* 2018 Feb 22;172(5):1091-1107.e17. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.001.
- Kundu I et al. GeDiPNet: Online resource of curated gene-disease associations for polypharmacological targets discovery. *Genes Dis.* 2022 Jun 13;10(3):647-649. doi: 10.1016/j.gendis.2022.05.034.
- Liao WW, et al. A draft human pangenome reference. *Nature.* 2023 May;617(7960):312-324. doi: 10.1038/s41586-023-05896-x.
- Nieto P et al. A single-cell tumor immune atlas for precision oncology. *Genome Res.* 2021 Oct;31(10):1913-1926. doi: 10.1101/gr.273300.120.
- Nurk S, et al. The complete sequence of a human genome. *Science.* 2022 Apr;376(6588):44-53. doi: 10.1126/science.abj6987.
- Piwecka M, Rajewsky N, Rybak-Wolf A. Single-cell and spatial transcriptomics: deciphering brain complexity in health and disease. *Nat Rev Neurol.* 2023 Jun;19(6):346-362. doi: 10.1038/s41582-023-00809-y.
- Preuss TM. The human brain: rewired and running hot. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 May;1225 Suppl 1(Suppl 1):E182-91. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06001.x.
- Regev A et al. The Human Cell Atlas. *Elife.* 2017 Dec 5;6:e27041. doi: 10.7554/eLife.27041.
- Siletti K et al. Transcriptomic diversity of cell types across the adult human brain. *bioRxiv* 2022.10.12.511898; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.12.511898>
- Tabula Sapiens Consortium et al. The Tabula Sapiens: A multiple-organ, single-cell transcriptomic atlas of humans. *Science.* 2022 May 13;376(6594):eabl4896. doi: 10.1126/science.abl4896.
- Tabula Muris Consortium et al. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature.* 2018 Oct;562(7727):367-372. doi: 10.1038/s41586-018-0590-4.
- Zhang X et al. Towards a primate single-cell atlas. *Zool Res.* 2022 Jul 18;43(4):691-694. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2022.212.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

Gli esseri umani mostrano caratteristiche uniche rispetto alle specie viventi più vicine dal punto di vista evolutivo (scimpanzé e bonobo), come le dimensioni del cervello, l'altezza, l'intestino, lo scheletro, il sistema immunitario e il metabolismo. Le variazioni molecolari alla base di queste caratteristiche uniche si sono evolute negli ultimi 6 milioni di anni. Negli ultimi anni sono state identificate diverse centinaia di geni specifici dell'uomo, "human specific", che presentano variazioni genomiche specifiche nel genoma umano. Nonostante la loro enorme rilevanza per la comprensione dell'adattamento specifico dell'uomo, la maggior parte dei geni specifici umani sono attualmente scarsamente caratterizzati in termini di funzione, espressione specifica del tipo cellulare, relazioni regolatorie con altri geni e coinvolgimento nelle malattie umane.

Il progetto HuMap mira a caratterizzare i geni specifici umani in termini di caratteristiche genomiche, espressione cellula-specifica, relazione causale con altri geni e associazione con malattie umane.

Il progetto sfrutterà approcci innovativi di biologia computazionale come metodi di inferenza di rete causale e integrazione di dati genomici, trascrittomici e proteomici aggiornati e di alta qualità, con particolare attenzione agli atlanti omici a singola cellula ad alta risoluzione e risolti spazialmente.

Le informazioni ottenute dal progetto HuMap saranno essenziali per identificare candidati rilevanti per malattie tra i geni specifici umani, idealmente con un'espressione specifica per tessuto o tipo cellulare e con forti relazioni causali con geni critici per malattie, al fine di generare un follow-up sperimentale utilizzando organoidi e modelli murini, in cui la funzione dei geni "human specific" rilevanti sarà esplorata in vivo. I dati HuMap verranno inoltre rilasciati come primo web server che contiene informazioni su geni specifici umani, per la condivisione di tutti i risultati delle analisi.

Questa proposta combina le competenze complementari dei laboratori Tiberi e Tebaldi, offre una piattaforma originale per lo studio della biologia umana e ha il potenziale strategico per aprire molteplici linee di ricerca che rispondono alla domanda fondamentale: cosa rende gli esseri umani unici a livello molecolare? I risultati saranno potenzialmente rilevanti per comprendere malattie che si verificano principalmente negli esseri umani, come tumori al cervello, al sangue e alle ossa o malattie immunitarie.

OBIETTIVO 1: Ottenere un catalogo completo e di alta qualità di geni specifici dell'uomo e dei loro profili di espressione a livello di singola cellula

Obiettivo 1a) Costruire l'insieme completo di geni specifici umani, inclusi gli RNA non codificanti.

Il punto di partenza dell'analisi sarà una raccolta di 856 geni specifici umani precedentemente pubblicati (Bitar et al, 2019). Un aggiornamento sostanziale di questa raccolta verrà effettuato sulla base di:



a) assemblaggi di genoma umano rilasciati di recente, in particolare l'assemblaggio del genoma T2T (Nurk et al, 2022) e il progetto di assemblaggio PanGenome umano (Liao et al, 2023)

b) annotazione aggiornata dei geni e dei trascritti umani, utilizzando l'ultimo riferimento Gencode. È importante sottolineare che l'annotazione coprirà anche gli RNA non codificanti, al fine di includere varianti del trascrittoma non codificante nella raccolta finale

c) recenti assemblaggi di genomi delle specie viventi più vicine all'uomo evolutivamente (scimpanzé e bonobo)

L'impatto biologico dei geni specifici umani sarà valutato mediante analisi funzionali e reti di co-espressione.

Obiettivo 1b) Definire i pattern di espressione "single-cell" dei geni "human specific"

Gli atlanti "single-cell" umani verranno utilizzati per esplorare l'espressione di geni "human specific" e identificare:

a) Tipi cellulari umani che mostrano la massima espressione di geni specifici umani

b) Geni specifici umani con espressione specifica per tessuto o tipo cellulare. Verranno inoltre identificati gruppi di geni specifici umani co-espressi.

L'analisi inizierà da atlanti umani pan-tissutali, come il dataset Tabula Sapiens (Karkadiaz et al, 2022) e lo "Human Cell Atlas" (Regev et al, 2017) e si concentrerà quindi su atlanti specifici per organi, come cervello e sistema immunitario (Nieto et al, 2021; Siletti et al, 2022).

La scelta dei dataset specifici sarà basata sui risultati ottenuti nell'analisi degli atlanti pan-tissutali. I nostri risultati preliminari suggeriscono che diversi geni umani specifici sono espressi selettivamente nei sottotipi di neuroni e cellule immunitarie.

Obiettivo 1c) Caratterizzare cellule umane specifiche integrando atlanti "single-cell" multi-specie

Gli atlanti "single-cell" umani saranno integrati con atlanti "single-cell" di topo (Tabula Muris Consortium, 2018; Han et al, 2018) e di primati (Zhang et al, 2022; Han et al, 2022). Dopo l'integrazione, le cellule verranno raggruppate secondo profili trascrizionali e verranno identificati cluster specifici composti prevalentemente o esclusivamente da cellule umane. Queste cellule umane specifiche verranno caratterizzate e verrà determinato il contributo dei geni specifici umani nella definizione dei tipi e degli stati cellulari specifici dell'uomo.

OBIETTIVO 2: Identificare geni "human specific" potenzialmente critici per le malattie umane

Attività 2a Definire il coinvolgimento di geni "human specific" nelle malattie umane utilizzando dati di espressione a risoluzione spaziale.

Sulla base dei modelli di espressione dei tipi cellulari raccolti nell'Attività 1b, indagheremo i modelli di espressione spaziale dei principali geni specifici umani rilevanti. Data la morfologia specifica dell'uomo delle regioni del cervello come la neocorteccia, possiamo anticipare la rilevanza strategica della raccolta di set di dati risolti spazialmente disponibili in letteratura e concentrandoci sulle malattie legate al cervello (recentemente esaminate in Piwecka et al, 2023). Verranno analizzati set di dati risolti spazialmente al fine di identificare geni specifici dell'uomo con percorsi di espressione spaziale, possibilmente collegati ad alterazioni nella morfologia indotte dalla patologia.

I candidati più rilevanti verranno selezionati per generare un follow-up sperimentale utilizzando organoidi e modelli murini, in cui la funzione dei geni specifici umani rilevanti verrà esplorata in vivo.

Candidate's profile (skills and competencies)

The ideal candidate has strong interest in exploring the biology and potential pathogenicity of human specific genes, and possibly has previous experience in computational biology, in particular single-cell and spatial omics data.

Profilo del/la candidato/a

Il candidato ideale ha un forte interesse nell'esplorazione della biologia e della potenziale patogenicità di geni "human specific" e possibilmente ha precedenti esperienze in biologia computazionale, in particolare dati omici a risoluzione spaziale e di singola cellula.

Project 2

Tears for AMD – A tear film 'omics' study for a better understanding of age-related macular degeneration (AMD) and to inform novel therapeutic approaches

Lacrime per l'AMD - Uno studio 'omico' sul film lacrimale per una migliore comprensione della degenerazione maculare legata all'età (AMD) e per informare nuovi approcci terapeutici

Laboratory:

Laboratory of Neural Development and Regeneration (<https://www.cibio.unitn.it/222/laboratory-of-neural-development-and-regeneration>)

Principal Investigator: Simona Casarosa (simona.casarosa@unitn.it) & Toma Tebaldi (toma.tebaldi@unitn.it)

Keywords: Immune response, single cell analysis

Synthetic description of the activity and expected research outcome

Age-related macular degeneration (AMD) is a multifactorial eye disease characterized by a gradual degeneration of the macula, the central region of the retina responsible for detailed vision, and is the leading cause of irreversible vision loss in the elderly population in developed



countries (García-Quintanilla et al., 2022, PMID: 36499086). Two forms of advanced AMD exist: geographic atrophic (GA), characterized by localized atrophy of outer retinal tissue, retinal pigment epithelium (RPE) and choriocapillaris, and a fast-blinding neovascular form, also known as "wet" or "exudative" AMD, showing an invasion by vascular and associated tissues into the outer retina, subretinal space, or sub-RPE space (Wei et al., 2023, PMID: 36617586). AMD exerts a tremendous mental health and socio-economic burden in western countries. The available treatments (such as anti-VEGF injections for the "wet" form) only delay the progression of the disease and there is still currently no treatment that can prevent AMD onset nor the progression to the advanced form of the disease.

At the molecular level, the pathogenesis of AMD remains largely unknown. The molecular processes involved in AMD are numerous and complex. A combination of chronic oxidative stress, subsequent impaired autophagy and inflammation leads to dysfunction and degeneration of RPE cells. Dysfunctional RPE cells struggle to perform essential functions, leading to impaired retinal homeostasis and photoreceptor damage (García-Quintanilla et al., 2022, PMID: 36499086). A growing body of evidence suggests that interplay between RPE and innate immune cells maintain retinal homeostasis, and detail how RPE dysfunction and aberrant immune cell recruitment contribute to AMD pathogenesis. RPE dysfunction and the accumulation of drusen drive the infiltration of resident and systemic innate immune cells such as microglia and circulating macrophages into the outer retina (Ascunce et al., 2023, PMID: 36926522). Thus, diminishing inflammation and controlling the immune system within the retina could be helpful therapeutic approaches.

To understand AMD etiology and progression, the tear film could play an important role. Although cellular degeneration occurs in the RPE and retina, changes can be observed in the anterior segment of the eye, specifically in readily accessible fluids such as the tear film (Valencia et al., 2022, PMID: 35426907). This thin fluid layer contains an extremely complex biological mixture of proteins, lipids, metabolites, salts, is very rich in released particles such as extracellular vesicles (EVs), and has been shown to be a very promising source for biomarker discovery in eye diseases (García-Quintanilla et al., 2022, PMID: 36499086). EVs are membrane-enclosed particles carrying a vast repertoire of proteins and nucleic acids, and as such, tear fluid EVs could represent a precious source of biomarker panels in AMD. Proteomics and metabolomics studies of eye biological fluids have already proven to be useful for the identification of prognostic and diagnostic markers in different retinal diseases such as diabetic retinopathy and reghmatogenous detachment (Haines et al., 2008, PMID: 29877085; our unpublished data). We also have generated preliminary data showing the reliability of a proteomics approach to analyze free protein content in tear film. However, tear films allow to extract only low liquid volumes (up to 20 ul). So, to analyze the tear EVs molecular cargos we will need to overcome the limits imposed by standard approaches, thus needing scalable methods. In this project, we will address this challenge by adapting a nickel-based isolation (NBI) procedure to recover EVs from 10-20 ul of tears, in collaboration with the group of prof. D'Agostino (CIBIO) (Notarangelo et al., 2019, PMID: 31047861). This bead-based procedure can be combined with nanoparticle tracking analysis profiling and ultrasensitive mass spectrometry or transcriptomic approaches to describe the tear - EV molecular cargoes, offering a comprehensive and powerful approach to better elucidate the molecular basis of AMD. It can help identify specific molecules that are significantly altered in AMD and that can therefore be used as biomarkers for early diagnosis and to monitor disease progression and treatment effectiveness. We will place a special focus on inflammatory and innate immunity involvement, as RNA-seq data from human RPE of healthy control and AMD samples indicates changes in expression in a range of immune factors occurring in late-stage disease (Saddala et al., 2019; PMID: 30894217).

The subsets of photoreceptor and/or RPE cell types that are responsible for the onset and progression of the disease, and for the pathological interactions between RPE and the immune system, are not yet known. Once we identify key (inflammatory) networks and signaling pathways, we will localize these molecules – by single cell imaging and spatial transcriptomics in both human and murine retinae – to the specific cells responsible for their production, allowing us to design more precisely targeted therapeutic approaches.

Objectives

We aim to conduct a cross-sectional comparative study that analyzes and compares the composition of tear film EVs in healthy individuals and those affected by different types of AMD, in collaboration with the Ophthalmology Unit of the Azienda Provinciale per I Servizi Sanitari. Our study design involves the comparison of 5 different groups:

- healthy controls
- geographic atrophy
- newly diagnosed macular neovascularization (MNV) without prior treatment (treatment naïve)
- inactive macular neovascularization (MNV)
- active macular neovascularization (MNV)

The main aims of the project will be:

- to compare geographic atrophy and MNV, in order to highlight molecular changes and possibly different pathways that could explain why starting from the same intermediate AMD lesions (i.e. drusen and SDDs) can give rise to such different advanced AMD forms;
- to compare treatment naïve MNV with MNV already treated with anti-VEGF intravitreal injections, in order to understand the effects of the anti-VEGF treatments;
- to compare inactive vs active MNV. If differential expression of specific markers is observed, this could guide subsequent treatment protocols;
- to identify inflammatory and immune response pathways implicated in disease onset and progression;
- to identify the specific subsets of photoreceptors and/or RPE cells responsible for the onset and progression of the disease.

We will undertake a comprehensive analysis of new biomarkers to deepen our understanding of the pathophysiology of wet and dry AMD, with the goal of unraveling the underlying molecular pathways that drive these conditions and to identify the subsets of cells specifically implicated in the generation of the phenotype. In all our analyses, we will pay particular attention to inflammatory and innate immunity



changes and altered pathways, as they have already been shown to be promising potential therapeutic targets. Additionally, we anticipate that our research will allow us to identify markers that can highlight the transition between different AMD conditions, and will yield novel insights into the mechanisms of action of presently available therapies. This approach will provide valuable insights into the pathophysiology of AMD and the impact of anti-VEGF therapy on biomarkers, presenting a new perspective that was not encompassed in previous studies. By identifying novel biomarkers in tear samples that indicate the transition between these states, we can enhance treatment planning and monitoring, optimizing patient outcomes while minimizing resource utilization within healthcare facilities

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

La degenerazione maculare legata all'età (AMD) è una malattia retinica multifattoriale caratterizzata da una graduale degenerazione della macula, la regione centrale della retina responsabile della visione distinta (puntiforme), ed è la principale causa di perdita irreversibile della vista nella popolazione anziana dei Paesi sviluppati (García-Quintanilla et al., 2022, PMID: 36499086). Esistono due forme di AMD avanzata: la forma atrofica geografica (GA), caratterizzata da un'atrofia localizzata del tessuto retinico esterno, dell'epitelio pigmentato retinico (RPE) e della lamina corioidale, e la forma neovascolare rapidamente accecante, nota anche come AMD "umida" o "essudativa", che mostra un'invasione da parte dei tessuti vascolari e associati nella retina esterna, nello spazio sottoretinico o nello spazio sub-RPE (Wei et al., 2023, PMID: 36617586). Nei Paesi occidentali, l'AMD esercita un enorme costo socioeconomico e un enorme peso sulla salute mentale dei pazienti. I trattamenti disponibili (come le iniezioni di anti-VEGF per la forma "umida") ritardano solo la progressione della malattia e attualmente non esiste ancora un trattamento in grado di prevenire l'insorgenza dell'AMD né la progressione verso la forma avanzata della malattia.

A livello molecolare, la patogenesi dell'AMD rimane in gran parte sconosciuta. I processi molecolari coinvolti nell'AMD sono numerosi e complessi. Una combinazione di stress ossidativo cronico, conseguente compromissione dell'autofagia e infiammazione porta alla disfunzione e alla degenerazione delle cellule RPE. Le cellule RPE disfunzionali faticano a svolgere le funzioni essenziali, con conseguente compromissione dell'omeostasi retinica e danno ai fotorecettori (García-Quintanilla et al., 2022, PMID: 36499086). Un numero crescente di evidenze suggerisce che l'interazione tra RPE e cellule immunitarie innate mantenga l'omeostasi retinica e spiega come la disfunzione dell'RPE e il reclutamento aberrante di cellule immunitarie contribuiscano alla patogenesi dell'AMD. La disfunzione del RPE e l'accumulo di drusen favoriscono l'infiltrazione nella retina esterna di cellule immunitarie innate residenti e sistemiche, come la microglia e i macrofagi circolanti (Ascunze et al., 2023, PMID: 36926522). Pertanto, la riduzione dell'infiammazione e il controllo del sistema immunitario all'interno della retina potrebbero essere approcci terapeutici utili. Per comprendere l'eziologia e la progressione dell'AMD, il film lacrimale potrebbe svolgere un ruolo importante. Sebbene la degenerazione cellulare avvenga nell'RPE e nella retina, i cambiamenti possono essere osservati nel segmento anteriore dell'occhio, in particolare nei fluidi facilmente accessibili come il film lacrimale (Valencia et al., 2022, PMID: 35426907). Questo sottile strato fluido contiene una miscela biologica estremamente complessa di proteine, lipidi, metaboliti e sali, è molto ricco di particelle rilasciate come le vescicole extracellulari (EVs) e ha dimostrato di essere una fonte molto promettente per la scoperta di biomarcatori nelle malattie oculari (García-Quintanilla et al., 2022, PMID: 36499086). Le EV sono particelle racchiuse da membrana che trasportano un vasto repertorio di proteine e acidi nucleici. Pertanto, le EV del liquido lacrimale potrebbero rappresentare una fonte preziosa di biomarcatori nell'AMD. Gli studi di proteomica e metabolomica dei fluidi biologici dell'occhio si sono già dimostrati utili per l'identificazione di marcatori prognostici e diagnostici in diverse patologie retiniche come la retinopatia diabetica e il distacco regmatogeno (Haines et al., 2008, PMID: 29877085; nostri dati non pubblicati). Abbiamo inoltre ottenuto dati preliminari che dimostrano l'affidabilità di un approccio proteomico per analizzare il contenuto di proteine libere nel film lacrimale. Tuttavia, i film lacrimali consentono di estrarre solo bassi volumi di liquido (fino a 20 µl). Quindi, per analizzare i carichi molecolari delle EV lacrimali dovremo superare i limiti imposti dagli approcci standard, necessitando di metodi scalabili. In questo progetto, affronteremo questa sfida adattando una procedura di isolamento a base di nichel (NBI) per recuperare le EV da 10-20 µl di lacrime, in collaborazione con il gruppo del prof. D'Agostino (CIBIO) (Notarangelo et al., 2019, PMID: 31047861). Questa procedura basata sulle microsfeere può essere combinata con un'analisi di tracciamento delle nanoparticelle, e con approcci di spettrometria di massa ultrasensibile o di trascrittomica, per descrivere il carico molecolare delle EV lacrimali, offrendo un approccio completo e potente per chiarire meglio le basi molecolari dell'AMD.

Questo approccio sperimentale ci permetterà di identificare specifiche molecole significativamente alterate nell'AMD e che possono quindi essere utilizzate come biomarcatori per la diagnosi precoce e per monitorare la progressione della malattia e l'efficacia del trattamento - con particolare attenzione al coinvolgimento dell'immunità infiammatoria e innata, poiché dati di RNA-seq provenienti da RPE umano di campioni di controllo sani e di AMD indicano cambiamenti nell'espressione di una serie di fattori immunitari che si verificano nella malattia in fase avanzata (Saddala et al., 2019; PMID: 30894217).

Non sono ancora noti i sottoinsiemi di fotorecettori e/o di tipi di cellule RPE responsabili dell'insorgenza e della progressione della malattia e delle interazioni patologiche tra RPE e sistema immunitario. Una volta identificate le reti (infiammatorie) e le vie di segnalazione chiave, localizzeremo queste molecole - attraverso l'imaging di singole cellule e la trascrittomica spaziale in retine umane e murine - alle cellule specifiche responsabili della loro produzione, consentendoci di progettare approcci terapeutici più mirati.

Obiettivi

Ci proponiamo di condurre uno studio comparativo trasversale che analizzi e confronti la composizione delle EV del film lacrimale in individui sani e in pazienti affetti da diversi tipi di AMD, in collaborazione con l'Unità multizonale di Oculistica dell'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari.

Il nostro disegno sperimentale prevede il confronto tra 5 gruppi diversi:

- controlli sani



- atrofia geografica
- neovascolarizzazione maculare (MNV) di nuova diagnosi senza precedente trattamento (naïve al trattamento)
- neovascolarizzazione maculare inattiva (MNV)
- neovascolarizzazione maculare attiva (MNV)

Gli obiettivi principali del progetto saranno:

- confrontare l'atrofia geografica e la MNV, al fine di evidenziare i cambiamenti molecolari ed eventualmente le diverse vie che potrebbero spiegare perché partendo dalle stesse lesioni intermedie della AMD (cioè drusen e SDDs) si possa dare origine a forme di AMD avanzata così diverse;
 - confrontare MNV naïve al trattamento con MNV già trattati con iniezioni intravitreali di anti-VEGF, al fine di comprendere gli effetti dei trattamenti anti-VEGF;
 - confrontare i MNV inattivi con quelli attivi. Se si osserva l'espressione differenziale di marcatori specifici, ciò potrebbe guidare i successivi protocolli di trattamento;
 - identificare le vie di segnalazione infiammatorie e immunitarie implicate nell'insorgenza e nella progressione della malattia;
 - identificare le sottopopolazioni specifiche di fotorecettori e/o cellule RPE responsabili dell'insorgenza e della progressione della malattia.
- Intraprenderemo un'analisi completa di nuovi biomarcatori per migliorare la nostra comprensione della fisiopatologia dell'AMD umida e secca, con l'obiettivo di svelare le vie molecolari che guidano queste condizioni e di identificare le sottopopolazioni di cellule specificamente implicate nella generazione del fenotipo. In tutte le nostre analisi, presteremo particolare attenzione ai cambiamenti e alle alterazioni infiammatorie e dell'immunità innata, in quanto hanno già dimostrato di essere nuovi potenziali bersagli terapeutici molto promettenti. Inoltre, prevediamo che la nostra ricerca ci consentirà di identificare i marcatori che possono evidenziare la transizione tra le diverse condizioni di AMD e fornirà nuove conoscenze sui meccanismi d'azione delle terapie attualmente disponibili. Questo approccio fornirà preziose indicazioni sulla fisiopatologia dell'AMD e sull'impatto della terapia anti-VEGF sui biomarcatori, presentando una nuova prospettiva non contemplata negli studi precedenti. Identificando, nei campioni di lacrime, nuovi biomarcatori che indicano la transizione tra questi stati, possiamo migliorare la pianificazione e il monitoraggio del trattamento, ottimizzando la cura dei pazienti e riducendo al minimo l'utilizzo delle risorse nelle strutture sanitarie.

Candidate's profile (skills and competencies)

The candidate must have a solid molecular biology background and bioinformatics skills, with particular attention to the context of neurodegenerative and retinal diseases

Profilo del/la candidato/a

Il candidato deve avere un solido background di biologia molecolare e competenze bioinformatiche, con particolare attenzione al contesto delle malattie neurodegenerative e retiniche.

Project 3

Exploring the genetic architecture of the oral microbiome diversity by machine learning-assisted genome wide association

Studio della struttura genetica della diversità del microbioma orale tramite associazione genomica su larga scala basata su machine learning

Laboratory:

Laboratory of Neurogenomic Biomarkers (<https://www.cibio.unitn.it/302/laboratory-of-neurogenomic-biomarkers>)

Principal Investigator: Enrico Domenici (enrico.domenici@unitn.it) & Francesco Asnicar (f.asnicar@unitn.it)

Keywords: Microbiology (Computational Microbiology)

Synthetic description of the activity and expected research outcome

The oral microbiome, a complex and dynamic ecosystem of bacteria, archaea, fungi, eukaryotes, and viruses, has been linked to both host health and disease due to the intricate relationships between host and microbes in the oral mucosa, which can influence host metabolic and physiological processes.

Recent genome-wide association studies have highlighted the influence of host genetics on the composition and function of the gut microbiome across different human body sites. This reciprocal relationship suggests that microbiome composition and function can directly affect health and disease through metabolites and indirectly by influencing host genes and proteins expression. With the growing availability of metagenomic data from large cohorts, genomewide associations offer the potential to understand the diversity of the microbiome based on the genomic portrait of individual subjects, providing insights into health and disease risks.



Within the context of a larger project aimed at characterizing the role of the oral microbiome in complex diseases from large cohorts, the goal of this PhD project is to perform large-scale associations between the oral microbiome taxa and function with host genetic variants, focusing on both common and rare variants data derived from whole genome sequences. We have already implemented and validated a machine learning pipeline, which allow to conduct genome-wide associations with high computational efficiency for both quantitative and binary traits, and shown its ability to identify genetic loci displaying a significant association with microbiome composition at both taxa and functional levels. Given recent evidence on the horizontal transmission of oral microbiome species within family members based on metagenomic strain-profiling, the genetic contribution to microbiome transmission will also be investigated. Finally, we will employ a novel pipeline for the extraction of viral genomes from metagenomic data to investigate for the first time the host genomic contribution to the viral fraction of the microbiome.

Given the large sample size and the depth of the sequencing data, our work can set the basis for a characterization of the oral microbiome with an unprecedented resolution. The resulting metagenome-GWAS will provide a framework for understanding the genetic regulation of the oral microbiome on a large scale, and investigate the causal role of the oral microbiome in disease development.

Descrizione sintetica dell'attività e dei risultati attesi

Il microbioma orale, un ecosistema complesso e dinamico costituito da batteri, archaea, funghi, eucarioti e virus, è stato messo in relazione sia allo stato di salute che di malattia a causa delle molteplici interazioni tra ospite e microrganismi presenti sulla mucosa orale, che possono influenzare i processi metabolici e fisiologici dell'ospite. Recenti studi di associazione a livello genomico hanno evidenziato l'influenza della genetica dell'ospite sulla composizione e la funzione del microbioma intestinale in vari siti del corpo umano. Questa relazione reciproca suggerisce che la composizione del microbioma possa influenzare direttamente la salute e la malattia attraverso i metaboliti e indirettamente influenzando l'espressione genica e proteica dell'ospite. Con la crescente disponibilità di dati metagenomici da ampie coorti, le associazioni a livello genomico offrono il potenziale per comprendere la diversità del microbioma basandosi sul profilo genomico dei singoli individui, fornendo così informazioni sui rischi per la salute e le malattie.

Nel contesto di un progetto più ampio finalizzato alla caratterizzazione completa del microbioma orale e alla sua interazione con malattie complesse in grandi coorti, il progetto di dottorato avrà come obiettivo l'associazione su larga scala della composizione e delle funzioni del microbioma orale con le varianti genetiche dell'ospite, sia a livello di varianti comuni che rare, integrando i dati metagenomici salivari e dati umani provenienti dalle sequenze del genoma completo. Abbiamo già implementato una pipeline basata su machine learning automatico che consente di condurre studi di associazione con alta efficienza computazionale su scala genomica sia per tratti quantitativi che binari, e ne abbiamo dimostrato la capacità di identificare loci genetici che mostrano un'associazione significativa con la composizione del microbioma sia a livello tassonomico che funzionale. Data l'evidenza di trasmissione orizzontale del microbioma orale all'interno di famiglie, basati sulla profilazione metagenomica a livello di strains, verrà anche indagato il contributo genetico alla trasmissione del microbioma. Infine, utilizzeremo una nuova pipeline per l'estrazione di genomi virali dai dati metagenomici per investigare per la prima volta il contributo genomico dell'ospite alla frazione virale del virale.

Dati la grande dimensione del campione e la profondità dei dati di sequenziamento, il nostro lavoro può creare le basi per una caratterizzazione del microbioma orale con una risoluzione senza precedenti. Il metagenome-GWAS risultante fornirà un quadro per la comprensione della regolazione genetica del microbioma orale su larga scala, e per indagare il possibile ruolo causale del microbioma orale nello sviluppo delle malattie.

Candidate's profile (skills and competencies)

The ideal candidate will have:

- Master of Science degree in Bioinformatics, Computational Biology, Biotechnology (or equivalent)
- good programming skills
- knowledge in biostatistics or data science
- good communication skills (written and oral) and self-motivation
- very good knowledge of the English language.
- experience in machine learning methods and in the analysis of large genomic data are desirable

Profilo del/la candidato/a

Il candidato ideale avrà:

- Laurea magistrale in Bioinformatica, Biologia Computazionale, Biotecnologia (o equivalente)
- Buone competenze di programmazione
- Conoscenza in biostatistica o data science
- Buone capacità di comunicazione (scritte e orali) e auto-motivazione
- Conoscenza molto buona della lingua inglese.
- esperienza in metodi di machine learning e nell'analisi di dati genomici sono desiderabili.



**UNIVERSITÀ
DI TRENTO**

Dipartimento di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata - CIBIO
Corso di Dottorato in Scienze Biomolecolari