

Fondazione Carisbo- Bando *Ricerca scientifica e alta tecnologia 2024*

Titolo del progetto - **“Ruolo regolativo del lncRNA *LINC00520* nella Malattia di Parkinson: analisi in modelli *in vitro* e *in vivo*”**

Proponente - Prof.ssa Flavia Frabetti (DIMEC)

Progetto annuale finanziato dalla Fondazione Carisbo **ID# 21805**

La malattia di Parkinson (MP) è una delle malattie neurodegenerative più diffuse nella popolazione mondiale e si calcola che in Emilia-Romagna vi siano almeno 18.000 malati con un'incidenza dello 0.9% nella sfera delle malattie croniche. La MP è una malattia multifattoriale, legata a età, sesso, fattori ambientali, mutazioni e suscettibilità in loci genici specifici. I principali sintomi motori sono imputabili alla degenerazione dei neuroni dopaminergici a livello della *pars compacta* della *Substantia Nigra* (SNpc) (Braak et al., 2003). A livello delle aree di neurodegenerazione, sono stati evidenziati fenomeni infiammatori sostenuti prevalentemente da microglia attivata e astrociti che di norma hanno un'azione omeostatica nei confronti del tessuto nervoso, ma che se attivati da specifici stimoli proinfiammatori, ne determinano un coinvolgimento nella patogenesi (Jankovic et al., 2020; Calabrese et al., 2018; Obeso et al., 2018).

Dati originali di meta-analisi, condotta con il software Transcriptome Mapper (TRAM), hanno messo in evidenza numerosi loci genici alterati nelle condizioni patologiche rispetto a quelle sane codificanti per long non-coding RNA (lncRNA) (Mariani et al., 2016). È stato infatti osservato che, tra i geni implicati nel corretto sviluppo neuronale e nel mantenimento dell'omeostasi a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC), ma anche in meccanismi neurodegenerativi, i lncRNAs svolgano un ruolo di primaria importanza. Questi trascritti non codificanti proteine, più lunghi di 200 nucleotidi, esplicano la loro azione a livello epigenetico, trascrizionale e post-trascrizionale, con un attivo coinvolgimento nella regolazione dell'espressione genica correlata a proliferazione, differenziamento e morte cellulare (Policarpo et al., 2021). Tra i lncRNA identificati nello studio di meta-analisi sopra citato, LINC00520, in precedenza mai associato alla malattia di Parkinson, è risultato significativamente sovraespresso nella condizione patologica. L'espressione di questo gene è stata preliminarmente confermata in modelli *in vitro* di neuroni dopaminergici (SH-SY5Y) e di cellule microgliali attivate (HMC3). Il trattamento delle due linee cellulari rispettivamente con 6-idrossidopamina (6-OHDA) e stimoli proinfiammatori indotti da interferone- γ e/o rotenone hanno evidenziato un considerevole e significativo aumento dell'espressione del lncRNA oggetto dello studio. Approcci di *loss-of-function* mediati da siRNA, hanno permesso di valutare il coinvolgimento del LINC00520 nella risposta allo stress ossidativo e a stimoli neuroinfiammatori.

Di recente studi condotti su *Danio rerio* (zebrafish) hanno dimostrato come numerosi *lncRNA* presentino oltre che piccole sequenze geniche conservate dalla evoluzione, anche una localizzazione sintenica all'interno del genoma (Ulitsky et al., 2011), utile per identificare possibili ortologi funzionali di lncRNA umani. Da un confronto tra la regione genomica compresa tra i loci genici vicini a quello codificante per LINC00520 di *Homo sapiens* e *Danio rerio* è stato possibile individuare, in modo originale, una regione di sintenia tra il cromosoma 14 umano dove è localizzato LINC00520 e il cromosoma 17 di zebrafish. In questa regione è presente un locus genico codificante per un lncRNA, *LOC100535512*, la cui sequenza risulta al momento predetta e la cui caratterizzazione funzionale potrebbe essere utile alla realizzazione di un modello *in vivo* per la malattia di Parkinson.

Il presente studio ha dunque l'obiettivo di approfondire il ruolo regolativo di *LINC00520* in diversi modelli della MP, sia *in vitro* che *in vivo*. A tale scopo si impiegheranno principalmente linee umane di astrociti e campioni estratti da iPSCs derivati da pazienti con MP vs relativi controlli.

Nelle linee di astrociti immortalizzati, dati preliminari incoraggianti, ci portano a procedere in questo modello con esperimenti di *loss of function* inibendo l'espressione del *LINC00520*, come premessa ad un futuro studio di interferenza genica anche su iPSCs.

Inoltre, è prevista la caratterizzazione del locus codificante per LOC100535512 in zebrafish mediante silenziamento con oligonucleotidi antisenso morfolinati ed analisi di possibili interattori molecolari del lncRNA oggetto dello studio nel modello in vivo.

Complessivamente, riteniamo che l'impiego di innovativi modelli cellulari e di un eventuale modello animale della patologia, costituiscano approcci sinergici e indispensabili nella ricerca, e possano contribuire alla definizione di un nuovo regolatore dell'omeostasi neuronale, permettendo di gettare luce sui meccanismi molecolari alla base di questa patologia e finanche individuando possibili target terapeutici.