



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI FARMACIA
E BIOTECNOLOGIE

Oggetto della ricerca

Titolo: Rilevamento dell'editing nel trascrittoma: decifrare gli esiti dell'editing genetico nella distrofia muscolare di Duchenne tramite sequenziamento di RNA su singoli nuclei.

Introduzione

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una grave patologia neuromuscolare causata da mutazioni nel gene della distrofina, che porta a cicli ripetuti di degenerazione e rigenerazione delle miofibre [1]. L'editing genico tramite CRISPR-Cas9, e in particolare il base editing, rappresenta una strategia terapeutica promettente per un trattamento permanente della DMD, capace di indurre lo skipping esonico attraverso la modifica mirata dei siti di splicing [2, 3]. Gli studi preclinici hanno dimostrato che i vettori virali adeno-associati (AAV) sono attualmente il metodo più efficiente per veicolare i componenti di editing al muscolo. Tuttavia, rimangono importanti lacune nella nostra comprensione della distribuzione di tali componenti tra i molteplici mionuclei di una singola miofibra e delle risposte trascrizionali specifiche di ciascun tipo cellulare all'intervento. Alla luce di questi elementi, il presente progetto mira a colmare queste lacune applicando il sequenziamento dell'RNA a singolo nucleo (snRNA-seq) per analizzare ad alta risoluzione gli esiti dell'editing genico nel muscolo distrofico. L'obiettivo finale è comprendere l'interazione tra i percorsi cellulari e il microambiente tissutale in seguito all'editing, ponendo le basi per ottimizzare l'efficacia e la sicurezza delle future terapie geniche per i disturbi muscolari.

Bibliografia

- [1] Chemello, F., et al. (2020). Degenerative and regenerative pathways underlying Duchenne muscular dystrophy revealed by single-nucleus RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 29691-29701.
- [2] Chemello, F., et al. (2021). Precise correction of Duchenne muscular dystrophy exon deletion mutations by base and prime editing. *Sci. Adv.* 7, eabg4910.
- [3] Chai, A.C., Chemello, F., et al. (2023). Single-swap editing for the correction of common Duchenne muscular dystrophy mutations. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 32, 522-535.

PROF. FRANCESCO CHEMELLO

Via Francesco Selmi 3 | 40126 Bologna | Italia | francesco.chemello2@unibo.it



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI FARMACIA
E BIOTECNOLOGIE

Piano esecutivo e di formazione borsa #1:

Generazione e validazione in vivo del sistema di base editing e preparazione librerie snRNA-seq. La prima linea di lavoro prevede l'ottimizzazione di un sistema di base editing per ripristinare la distrofina in un modello murino preclinico di DMD. A seguito della somministrazione sistemica dei vettori, il borsista valuterà l'efficienza di editing tramite sequenziamento Sanger e il ripristino proteico mediante Western blot e immunofluorescenza. Condurrà inoltre analisi istologiche (colorazione H&E e Picrosirius red) per valutare l'architettura muscolare e la fibrosi. Successivamente, procederà all'isolamento dei nuclei dai muscoli tibiali anteriori utilizzando il kit Chromium di 10X Genomics. Si occuperà quindi della generazione delle librerie snRNA-seq, includendo la libreria per l'espressione genica, la libreria CRISPR per tracciare sgRNA e base editor, e gli ampliconi full-length del trascritto Dmd da sequenziare con tecnologia PacBio. L'attività sarà seguita attraverso incontri periodici con il team di ricerca per monitorare i progressi, discutere difficoltà e favorire la crescita scientifica e professionale.

Piano esecutivo e di formazione borsa #2:

Analisi bioinformatica dei dati snRNA-seq del muscolo distrofico. La seconda linea di lavoro si concentrerà sull'analisi computazionale dei dati trascrittomici per identificare le risposte specifiche dei singoli nuclei e tipi cellulari all'intervento di gene editing. Il borsista utilizzerà la suite CellRanger per il preprocessing, il demultiplexing e l'allineamento delle sequenze. Rimuoverà la contaminazione da RNA ambientale tramite il pacchetto SoupX e condurrà le analisi a valle, inclusi clustering, analisi dell'espressione differenziale e generazione di plot UMAP, utilizzando Seurat. Una fase cruciale sarà l'integrazione dei dati di sequenziamento PacBio per correlare l'avvenuto exon skipping con le alterazioni trascrizionali nelle diverse popolazioni nucleari. L'attività sarà seguita attraverso incontri periodici con il team di ricerca per monitorare i progressi, discutere difficoltà e favorire la crescita scientifica e professionale.

PROF. FRANCESCO CHEMELLO

Via Francesco Selmi 3 | 40126 Bologna | Italia | francesco.chemello2@unibo.it