



Borsa di studio attivata ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

Titolo del progetto: Approcci innovativi basati su High Content Imaging e Intelligenza Artificiale nell' identificazione di biomarcatori prognostici e predittivi per le malattie neurodegenerative

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo:
BIOLOGIA CELLULARE E DELLO SVILUPPO

Responsabile scientifico: Rinaldo Cinzia

Area per la quale si presenta la richiesta: INNOVAZIONE

Numero di mensilità da svolgere in azienda: 9

Numero di mensilità da svolgere all'estero: 6 presso University of Sheffield, UK

Azienda: NIKON Holding Europe BV (Campi Bisenzio, Firenze)

Il Dipartimento è disponibile a cofinanziare per un importo pari a euro: 10000 Euro

Dipartimento finanziatore: DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE "CHARLES DARWIN" con delibera del 20/09/2021

Progetto di ricerca:

BACKGROUND. Nei paesi occidentali le malattie neurodegenerative (ND) sono sempre più frequenti perché legate all'aumento dell'aspettativa di vita. Spesso sono caratterizzate da una lenta progressione e talvolta associate a mutazioni geniche. Recentemente, stanno emergendo diverse possibilità terapeutiche; tuttavia, la sfida principale resta l'identificazione di biomarcatori prognostici e predittivi non-invasivi, per effettuare studi longitudinali utili per stratificare i pazienti e migliorare l'efficacia delle cure. Lo sviluppo di metodologie di Intelligenza Artificiale (AI) e High Content imaging (IHC) è una delle più recenti innovazioni nel campo biomedico. La microscopia High Content consente una vastissima caratterizzazione fenotipica su singole cellule, con una enorme capacità informativa. La paraplegia spastica ereditaria (HSP) è una ND caratterizzata da una degenerazione dei neuroni corticospinali con progressiva spasticità degli arti inferiori. La forma più comune è dovuta a mutazioni dominanti del gene SPG4, codificante l'enzima spastina che "taglia" i microtubuli (MT) e controlla trasporto assonale e traffico intracellulare. Le mutazioni di SPG4 portano prevalentemente ad aploinsufficienza; esistono anche mutazioni missenso ma il loro effetto patogenetico non è noto.

In sistemi cellulari modello che mimano l'aploinsufficienza, noi abbiamo recentemente dimostrato che è possibile recuperare difetti neurali tipici della SPG4-HSP utilizzando MNL4924 un farmaco che si è rivelato in grado di aumentare i livelli proteici di spastina e adesso ne stiamo validando l'utilizzo in modelli animali.

DATI PRELIMINARI. Studiando la regolazione di spastina, abbiamo notato un'organizzazione peculiare dei MT citoscheletrici associata ad una ridotta mobilità in cellule linfoblastoidi (LCL) e in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) derivate da pazienti SPG4-HSP rispetto a controlli sani. Inoltre, abbiamo osservato un rescue di questo fenotipo in risposta al trattamento con MNL4924. Tali osservazioni ci hanno portato allo sviluppo di un test basato sull' imaging che consente, utilizzando una opportuna pipeline, di analizzare immagini acquisite in maniera automatizzata e misurare l'organizzazione dei MT in maniera riproducibile e standardizzata. Utilizzando questo test abbiamo analizzato LCL e PBMC stimolati con fitoemoagglutinina da 7 pazienti e da 7 donatori sani e siamo stati in grado di discriminare chiaramente le cellule dei pazienti da quelle dei donatori e di apprezzare il rescue indotto dal trattamento con MNL4924. Risultati simili sono stati ottenuti analizzando PBMC isolati e congelati da un successivo prelievo di sangue (6 mesi dopo), suggerendo che questo fenotipo può essere considerato un marcatore diagnostico e predittivo stabile.

OBIETTIVI: Il focus di questo progetto di dottorato è sviluppare metodologie innovative di AI e IHC cell profiling per identificare nuovi biomarcatori prognostici e predittivi per HSP. Questo tipo di imaging profiling potrà in futuro essere esteso ad altre ND familiari o sporadiche fornendo strumenti utili nel campo della biomedicina. Per fare ciò, metteremo a frutto da un lato i nostri dati preliminari che indicano che cellule SPG4-HSP mostrano difetti dell'organizzazione dei MT chiaramente distinguibili da cellule di controllo e recuperabili con trattamenti farmacologici e dall'altro il contributo cruciale del ramo Italiano della società NIKON Holding Europe, leader nell'innovazione in microscopia e nello sviluppo di software di analisi di immagini.

In particolare, ci proponiamo di:

1. in collaborazione con NIKON, sviluppare protocolli di acquisizione e analisi di immagini basate su AI e IHC generando profili morfologici dei MT e di altri componenti cellulari;
2. valutare se differenze nell'organizzazione dei MT o di altri componenti correlano con caratteristiche molecolari e cliniche dei pazienti SPG4-HSP, eseguendo un follow-up di due anni, ed effettuando correlazioni con la progressione della malattia. Parallelamente sarà valutata anche la risposta di questi parametri a diversi trattamenti terapeutici;
3. eseguire, in collaborazione con l'Università di Sheffield, studi biochimici sull'attività enzimatica delle varianti patogenetiche missenso di spastina, presenti nella nostra coorte di pazienti SPG4-HSP;
4. estendere le analisi IHC a cellule derivate da pazienti con altri sottotipi di HSP (SPG3A, SPG7 e SPG11, che sono i più comuni dopo SPG4). Come in 3, i dati saranno correlati con caratteristiche molecolari e cliniche e sarà valutata anche la risposta ad eventuali trattamenti farmacologici.

RESEARCH PLAN:

Il progetto di dottorato può essere suddiviso in 4 TASK, con alcune attività che verranno svolte in fasi parzialmente sovrapposte. L'attività sperimentale sarà prevalentemente svolta presso il lab diretto dalla Dr. Cinzia Rinaldo all'Istituto di Biologia e Patologia Molecolare (IBPM-CNR), i cui laboratori ospitati all'interno dell'Università di Roma La Sapienza offrono un ambiente scientifico stimolante e una piattaforma di imaging di ultima generazione. Saranno svolti periodi di formazione presso la sede italiana di NIKON (Campi Bisenzio, Firenze) e presso il dipartimento di chimica dell'Università di Sheffield essenziali per svolgere in collaborazione le attività sperimentali delle seguenti TASK.

TASK1. Ottimizzare i protocolli di imaging e sviluppare pipeline innovative basate su approcci di AI, IHC e machine learning (1-12 mesi ;1-3 presso IBPM e 4-12 presso NIKON)

TASK2. Ottenere un profiling morfologico dei MT e di altri componenti cellulari e correlare i dati ottenuti con caratteristiche molecolari e cliniche -effettuando un follow-up di 2 anni (13-24 +34-36 mesi presso IBPM)

TASK3. Analizzare risposta la risposta del profiling morfologico a potenziali trattamenti terapeutici (13-24 +34-36 mesi presso IBPM)

TASK4 indagare l'attività enzimatica della proteina spastina mutata (25-33 mesi presso Sheffield University)

Verranno utilizzati protocolli di acquisizione automatizzata per ottenere un gran numero di immagini (migliaia per gruppo) e di analisi delle caratteristiche morfologiche delle cellule e di diversi componenti cellulari (>100 caratteristiche per cellula basate su varie misure di dimensioni, forma, intensità, distribuzione) per produrre un profiling di ciascuna cellula acquisita. Gli approcci basati su AI e machine-learning consentiranno di classificare tipici dei profili tipici delle cellule dei pazienti vs controlli e valutare la loro risposta a trattamenti farmacologici. In particolare, utilizzando l'expertise e la strumentazione presso la piattaforma di imaging dell'IBPM

(<https://www.imagingplatformibpmcnr.it>), verranno valutate la morfologia della cellula (immagini a contrasto di fase), dei MT stabili (colorazione di -tubulina acetilata con anticorpi), del nucleo (Hoechst), dei mitocondri (Mitotrack), e dei lipid droplets (Biodipy).

Con le pipeline sviluppate nella TASK1 saranno analizzati PBMC da:

- i) Famiglie di pazienti SPG4-HSP (database italiano di pazienti il cui tipo di mutazione, età di insorgenza, sintomi all'esordio e caratteristiche cliniche sono annotate; 98 pazienti appartenenti a 15 famiglie - circa 7 membri per ogni famiglia compresi anche portatori asintomatici)
- ii) pazienti con mutazioni in altri geni HSP (>10 pazienti SPG3a; >10 SPG7 e >10 SPG11)

e saranno eseguite correlazioni con i dati clinici e molecolari.

PBMC e LCL saranno ottenuti grazie alla collaborazione già in corso con i clinici Dr. Carlo Casali (Università Sapienza, Roma) e Dr. Filippo M. Santorelli (IRCCS Stella Maris, Pisa). L'arruolamento dei pazienti e il primo ciclo di raccolta del sangue sono già iniziati. Alle prossime visite annuali di follow-up, i clinici isoleranno e congeleranno le cellule del sangue dei pazienti, come già fatto per il primo ciclo.

I dati di imaging saranno correlati con le caratteristiche molecolari (tipo di mutazione, dimensione del prodotto proteico) e cliniche (eg, test dell'andatura funzionale, scala di valutazione della paraplegia spastica (SPRS) e tasso di progressione della malattia- calcolato come $SPRS2-SPRS1/\text{numero di anni tra } SPRS2 \text{ e } SPRS1$; dove $SPRS1$ e $SPRS2$ sono i valori alla prima e all'ultima valutazione clinica). Verrà inoltre analizzata la risposta a diversi trattamenti che contrastano comuni meccanismi disfunzionali (eg, agenti anti-tubulinici, inibitori mitocondriali o modulatori lipidici). Nei pazienti SPG4-HSP, sarà utilizzato anche il trattamento con MNL4924 che noi abbiamo recentemente dimostrato essere capace di elevare i livelli di spastina.

Saggi biochimici per analizzare le varianti patogenetiche di spastina verranno eseguiti all'Università di Sheffield, durante il periodo svolto presso il team diretto dalla nostra collaboratrice Dr Barbara Ciani, che studia come le modifiche chimiche regolano l'attività delle proteine AAA-ATPasi, come la spastina. Il crosstalk tra le modificazioni chimiche e l'attività di taglio sui MT delle proteine mutate sarà analizzato, valutando la capacità di legame al substrato, lo stato di oligomerizzazione e l'attività ATPasica utilizzando saggi biochimici e biofisici (eg, cromatografia ad esclusione dimensionale e saggi ATPasici in vitro).

RISULTATI ATTESI

- 1.Sviluppo di protocolli innovativi di IHC per acquisire e classificare differenti profili cellulari, misurando diversi parametri morfologici che potranno essere utilizzati come readout anche per futuri drug screening
- 2.Sviluppo di test prognostici e predittivi innovativi e non invasivi per HSP
- 3.Effettuare nuove correlazioni tra dati molecolari e di imaging con parametri clinici
- 4.Ampliare la conoscenza degli effetti sull'attività enzimatica e sulla capacità di legame dei MT delle mutazioni missenso di spastina
- 5.Formare una figura professionale all'interfaccia tra impresa e ricerca biomedica con tecnologie abilitanti innovative per applicazioni basate su analisi di imaging a supporto di drug screening e trial clinici.

Titolo del progetto (inglese): High-content imaging-based approaches to develop prognostic and predictive biomarkers in neurodegenerative diseases

Progetto di ricerca (inglese):

BACKGROUND: Neurodegenerative diseases (ND) represent a major threat to human health. Typically, they are slow-progressive disorders associated with genetic mutations. The ability to identify non-invasive biomarkers, such as blood imaging-based markers, is an emerging challenge for ND therapy. This type of biomarkers can be analyzed longitudinally and used to track the efficacy of a proposed treatment, opening the possibility to predict and detect the ND presymptomatically and to give therapies the best chance of working. The development of Artificial Intelligence (AI)-based imaging approaches is among the main recent innovations in the biomedical field. High-Content microscopy enables rich and deep phenotypic characterization at the single-cell level, providing unique information. Hereditary spastic paraplegias (HSP) are ND characterized by progressive spasticity of the lower extremities, due to degeneration of corticospinal neurons. The most common type of HSP is due to dominant mutations in the SPG4 gene, encoding spastin, a microtubule (MT) severing protein, controlling axonal transport and intra-organelle trafficking. As other ND, SPG4-HSP shows considerable inter- and intra- familiar variation. SPG4 mutations are mostly truncating ones and lead to pathogenesis by a haplo-insufficiency mechanism; missense mutations are less frequent and their effects on the activity of the protein are largely unknown. We recently showed rescue of neurite defects by pharmacologically elevating spastin levels in cells recapitulating SPG4-HSP defects. We are now validating

different spastin-elevating drugs in SPG4 haploinsufficient cell and animal models.

PRELIMINARY DATA: While studying the mechanism underlying spastin regulation, we observed distinctive MT cytoskeleton organization defects associated to impaired migration capability in lymphoblastoid cells (LCLs) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from SPG4-HSP patients. Notably, we found that these defects, suggestive of morphological cell changes, were rescued by pharmacologically elevating spastin levels. To obtain a reproducible and standardized imaging-based test, we have developed a specific workflow and an opportune pipeline for automated acquisition and image analysis to standardize the measurements of the SPG4-HSP distinctive MT defects and to evaluate their restoration after drug treatments. By using this pipeline, we have analysed LCLs and in phytohemagglutinin (PHA)-stimulated PBMC from 7 patients vs control donors, clearly discriminating pathological and healthy cells and appreciating the effects of a spastin-elevating drug. Similar results were obtained by analysing PBMC isolated and frozen from a second blood collection occurred 6 months later, suggestive of stability for this phenotype.

AIMS: The focus of this PhD project is to develop innovative AI-based imaging profiling methodologies for the identification of new prognostic and predictive biomarkers for HSP. We expect that imaging profiling, if successful, can be extended in future studies to additional NDs, providing new valuable tools for biomedical research in this field. To do this, we will capitalize on the key contribution of the NIKON Holding Europe BV company-Italian branch, leader in innovation in microscopy and imaging-analyses software development, and on our preliminary data indicating that SPG4-HSP patient's derived cells show distinctive MT defects, that are rescued by spastin-elevating drugs. In particular, we will

- 1 upgrade and corroborate our acquisition and imaging protocols to perform AI-based high-content imaging (IHC) to generate a morphological profiling of the MT and of other cellular components, in collaboration with NIKON;
- 2 assess if differences in the morphological profiles of MT and other cellular components of SPG4-HSP patient derived cells correlate with molecular and clinical features, and perform a 2-year follow-up to carry-out disease progression correlations. In parallel, the response of the morphological profiles to spastin elevating approaches or other putative therapeutic treatments will be also evaluated.
- 3 perform, in collaboration with Sheffield University, biochemical studies on the enzymatic activity of spastin protein carrying the pathogenic missense mutations present in our SPG4-HSP patient cohorts;
4. extend IHC to cells deriving from patients with other HSP subtypes (such as, SPG3A, SPG7 and SPG11). The results will be correlated with molecular, clinical and therapeutic features. If opportune, we will evaluate also the response to drug treatments.

RESEARCH PLAN and METHODOLOGY: The PhD project can be subdivided in 4 tasks, with some activities which will be executed in partially overlapping phases. Experimental activity will be done in Dr Cinzia Rinaldo's lab at the Institute of Molecular Biology and Pathology (IBPM-CNR), whose laboratories -hosted within the University of Rome La Sapienza- offers a stimulating scientific environment and last generation imaging platform for this proposal. Key training periods will be carried-out at the Italy branch of NIKON Holding Europe, based at Campi Bisenzio (Fi), and abroad at the Chemical Department of Sheffield University, UK.

TASK1 Optimize imaging protocols and develop new pipelines based on machine-learning approaches (timeframe 1-12 months; 1-3 at IBPM + 4-12 at NIKON)

TASK2 Assess morphological profiles of MT and other cellular components in patient cells and perform data correlation with molecular and clinical patient features by scheduling a 2 year follow-up (13-24+34-36 months at IBPM)

TASK3 Analyze the morphological profiles of patient cells in response to promising therapeutic treatments (13-24+34-36 months at IBPM)

TASK4 Investigate the enzymatic activity of spastin mutated protein (25-33 months at Sheffield University).

In particular, automated image acquisition will be used to capture large numbers of images of individual cells (thousands per group) from which we will extract and quantify, making use of AI/machine-learning approaches, morphological features of cells and different cell components (>100 features per cell based on various measures of

size, shape, texture, intensity, distribution pattern) to produce a rich profile of each cell. This will enable us to classify disease cases from controls and to evaluate the effects following treatments. Cell and cell component morphologies will be assessed: nucleus (Hoechst), stable MT (acetylated -tubulin staining with specific antibodies), mitochondria (Mitotrack) lipid droplets (Biodipy) and cell morphology (phase contrast images). These activities will be performed taking advantage of expertise and instrumentation at the IBPM imaging platform (<https://www.imagingplatformibpmcnr.it>).

By using the pipelines developed in the Task1 we will analyze PBMC cells from:

- i) SPG4-HSP patient families (from Italian data base, n=98 patients whose type of mutation, age of onset, symptoms at onset, and clinical features are fully annotated, selected from 13 families - approximately 7 members for each family including also asymptomatic carriers).
- ii) patients carrying mutations in other HSP genes (>10 SPG3a patients; >10 SPG7 and >10 SPG11) and perform clinical and molecular data correlation.

PBMC and LCLs will be obtained thanks to an ongoing collaboration with the clinicians: Dr. Carlo Casali at Sapienza University-Roma, and Dr. Filippo M. Santorelli, at IRCCS Stella Maris -Pisa. Patient enrolment and first round of blood collection are already started. At the next scheduled follow-up annual visits, the clinicians will freeze patient samples, as for the first round.

Imaging data will be correlated with molecular (e.g., type of mutation, size of protein product) and clinical features such as functional gait tests, Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS) and Disease Progression Rate (calculated as $SPRS2-SPRS1/\text{number of years between } SPRS2 \text{ and } SPRS1$; where SPRS1 and SPRS2 are the values at the first and last clinical evaluation, respectively). Response to different pathway-based treatments counteracting common dysfunctional mechanisms, such as anti-tubulin agents, mitochondria inhibitors or lipid modulators, will be also analyzed. In SPG4-HSP patient cells carrying truncating mutations, MNL4924 treatment that we have recently identified as a spastin-elevating drug will be also used. The efficacy of the treatments will be confirmed also by biochemical assays.

Biochemical assays on spastin proteins carrying pathogenetic mutations will be performed at Sheffield University where is based our long-standing collaborator Dr Barbara Ciani, studying how do chemical modifications regulate the activity of AAA-ATPases, such as spastin. According to this area of interest and expertise, the crosstalk between chemical modification and MT-severing activity of spastin mutated proteins will be analysed to identify new actionable targets in HSP. Specifically, we will assess substrate binding ability, oligomerization state and ATPase activity of spastin and its pathogenetic mutants using a combination of native PAGE, size exclusion chromatography and standard enzyme-coupled ATPase assays, with/without MT substrate.

EXPECTED RESULTS

1. to develop innovative acquisition and imaging protocols to perform morphological profiling and categorize different single cell phenotypes as a readout defining cell state, that can be used also as a parameter for drug screenings to set-up non-invasive prognostic and predictive tests for HSP
2. to correlate imaging/molecular data with clinical parameters
3. to extend the knowledge on spastin missense pathogenic mutations
4. to train a professional figure at the interface between industry and clinical research with key enabling technologies in the emerging field of AI applications to the biomedicine.