



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA, DELL'AMBIENTE E DELLA VITA (DISTAV)

Classe delle Lauree Magistrali in Biologia LM/6

Corso di Laurea Magistrale in Biologia applicata e sperimentale curriculum
Biosanitario

Caratterizzazione proteomica dinamica della popolazione CD90⁺ derivata
da organoidi retinici umani durante la maturazione e valutazione del suo
potenziale per studi di malattia delle cellule ganglionari retiniche

Candidata:

Dr. Lorenza Cecon

Relatrice:

Prof.ssa Stefania Vernazza

Correlatrice:

Prof.ssa Mariapaola Nitti

ANNO ACCADEMICO 2025-2026

Sommario

1. Introduzione	7
1.1 La retina e le cellule ganglionari retiniche	7
1.2 Sviluppo delle cellule ganglionari retiniche	10
1.3 Le cellule ganglionari retiniche nelle neuropatie ottiche e la necessità di modelli sperimentali umani	12
1.4 Le cellule staminali pluripotenti indotte	14
1.5 Organoidi retinici: sviluppo, organizzazione e applicazioni nello studio delle cellule ganglionari retiniche	15
1.6 Identificazione e isolamento delle cellule ganglionari retiniche	19
1.7 La proteomica come strumento per la caratterizzazione delle popolazioni cellulari isolate	20
2. Scopo della tesi	24
3. Materiali e metodi	25
3.1 Cellule staminali pluripotenti indotte umane	25
3.2 Differenziamento retinico	25
3.3 Preparazione campioni per Il FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)	27
3.4 Preparazione dei campioni per la proteomica	27
3.5 Preparazione dei campioni per Immunofluorescenza	28
3.6 Analisi dei dati	29
4. Risultati	31
4.1 Generazione e maturazione degli organoidi retinici a partire dalle hiPSC	31
4.2 Isolamento delle sottopopolazioni CD90⁺ da organoidi retinici mediante FACS.	32
4.3 Analisi proteomica delle popolazioni CD90⁺ e CD90⁻ post-sorting	33
4.3.1 Analisi fenotipica della popolazione CD90⁺	37
4.4. Morfologia e profilo immunofenotipico delle cellule CD90⁺ dopo una settimana di coltura	42
4.5 Presenza e modulazione temporale di proteine associate al POAG	44
5. Discussione e Conclusioni	46
Bibliografia	50

Abstract (IT)

Le cellule ganglionari retiniche (RGC) rappresentano la principale popolazione neuronale coinvolta nelle neuropatie ottiche, incluso il glaucoma primario ad angolo aperto (POAG). Lo sviluppo di modelli cellulari umani in grado di riprodurre la complessità del microambiente retinico costituisce pertanto uno strumento fondamentale per lo studio dei meccanismi che regolano il differenziamento, la maturazione e la degenerazione delle RGC.

L'obiettivo del presente lavoro è stato caratterizzare il profilo proteomico delle sottopopolazioni CD90⁺ e CD90⁻ derivate da organoidi retinici ottenuti da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC). Le due frazioni cellulari sono state isolate mediante Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) a partire da organoidi differenziati per 28 (T28) e 35 giorni (T35) e sottoposte ad analisi proteomica mediante nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nLC-MS/MS). L'analisi ha evidenziato una progressiva divergenza molecolare tra le popolazioni CD90⁺ e CD90⁻ durante il differenziamento, associata a un marcato aumento delle proteine differenzialmente espresse a T35 rispetto a T28. Nella popolazione CD90⁺ a T35 sono risultati arricchiti processi biologici correlati alla maturazione neuroretinica, allo sviluppo delle proiezioni neuronali, all'organizzazione delle connessioni sinaptiche e al differenziamento neurogliale. L'analisi di marcatori associati alle RGC ha inoltre evidenziato una transizione da un profilo caratterizzato da proteine associate a stadi relativamente precoci del differenziamento verso stadi maturativi più avanzati. Inoltre, la caratterizzazione proteomica ha rivelato la presenza di marcatori molecolari riconducibili ad astrociti e microglia. Tale osservazione è stata confermata mediante immunofluorescenza, che ha evidenziato la presenza di cellule BRN3a⁺/TUBB3⁺, GLAST-1⁺ e IBA1⁺ dopo una settimana di mantenimento in coltura. Questi risultati indicano che la frazione CD90⁺ rappresenta una popolazione neuroretinica complessa, comprendente sia componenti neuronali sia gliali. Infine, l'identificazione di numerose proteine corrispondenti a geni associati al POAG e la loro modulazione temporale suggeriscono che il modello conservi caratteristiche molecolari rilevanti per lo studio della malattia. Nel complesso, i dati ottenuti evidenziano il potenziale degli organoidi retinici derivati da hiPSC come piattaforma sperimentale per lo studio della maturazione delle RGC, delle interazioni neuro-gliali e dei meccanismi coinvolti nelle neuropatie ottiche e in particolare nel glaucoma.

Abstract (EN)

Retinal ganglion cells (RGCs) represent the primary neuronal population affected in optic neuropathies, including primary open-angle glaucoma (POAG). The development of human cellular models capable of recapitulating the complexity of the retinal microenvironment is therefore essential for investigating the molecular mechanisms underlying RGC differentiation, maturation, and degeneration.

The present study aimed to characterize the proteomic profiles of CD90⁺ and CD90⁻ subpopulations derived from retinal organoids generated from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). The two cellular fractions were isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) from retinal organoids differentiated for 28 (T28) and 35 (T35) days and subsequently analyzed using nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nLC-MS/MS).

Proteomic analysis revealed a progressive molecular divergence between the CD90⁺ and CD90⁻ populations throughout differentiation, accompanied by a marked increase in the number of differentially expressed proteins at T35 compared with T28. In the CD90⁺ fraction, proteins enriched at T35 were predominantly associated with biological processes related to neuroretinal maturation, neuronal projection development, synaptic organization, and neuroglial differentiation. Furthermore, analysis of RGC-associated markers revealed a shift from a protein expression profile characteristic of relatively early developmental stages toward a molecular signature consistent with more advanced states of RGC maturation.

Notably, proteomic characterization also identified molecular markers associated with astrocytic and microglial lineages. These findings were further supported by immunofluorescence analysis, which confirmed the presence of BRN3a⁺/TUBB3⁺, GLAST-1⁺, and IBA1⁺ cells following one week of in vitro culture. Collectively, these observations indicate that the CD90⁺ fraction represents a complex neuroretinal population comprising both neuronal and glial components rather than a purely RGC-enriched population. Finally, the identification of multiple proteins corresponding to genes previously associated with POAG, together with their temporal modulation during differentiation, suggests that the model retains molecular features of potential relevance to disease-related studies. Overall, the findings highlight the potential of hiPSC-derived

retinal organoids as a valuable experimental platform for investigating RGC maturation, neuro-glial interactions, and the molecular mechanisms underlying optic neuropathies.

1. Introduzione

1.1 La retina e le cellule ganglionari retiniche

La retina è un tessuto neurale altamente specializzato derivato dal neuroectoderma e rappresenta il primo stadio dell'elaborazione dell'informazione visiva. Essa costituisce una struttura complessa in grado di convertire gli stimoli luminosi in segnali elettrici e di sottoporli a una prima elaborazione prima della trasmissione al cervello. Tale funzione è resa possibile dall'organizzazione altamente ordinata della retina in differenti strati cellulari, nei quali molteplici popolazioni neuronali e gliali interagiscono attraverso circuiti sinaptici specializzati (Figura 1).

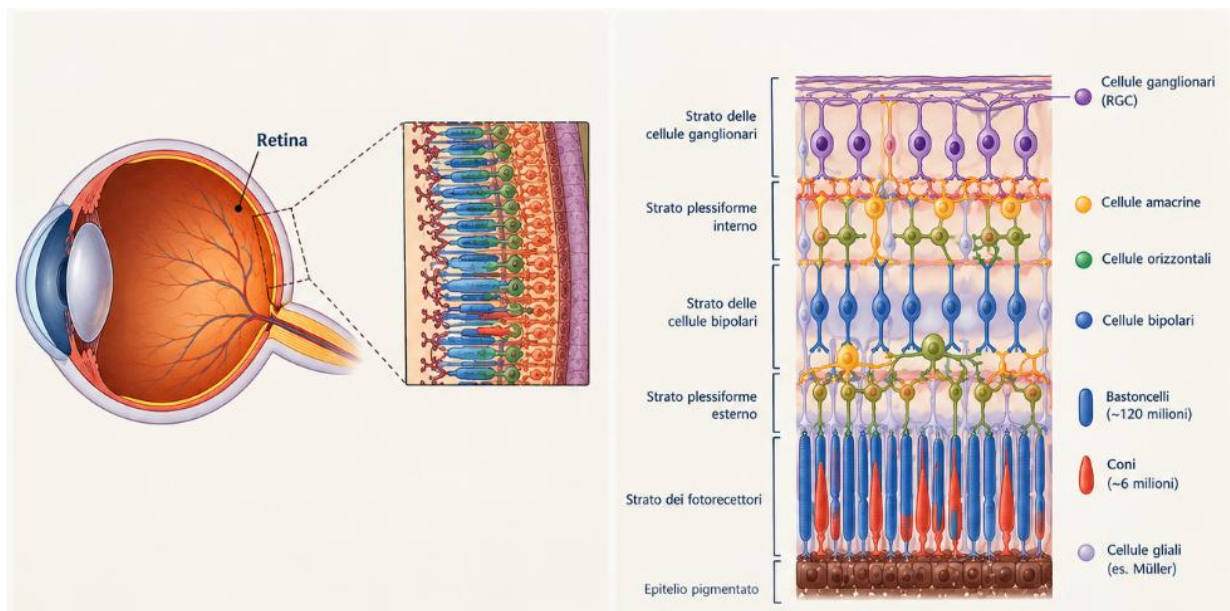


Figura 1. Schematizzazione dell'organizzazione della retina

Nella retina umana sono presenti circa 120 milioni di bastoncelli e 6 milioni di coni, che costituiscono i fotorecettori responsabili rispettivamente della visione scotopica e fotopica. Le informazioni raccolte da queste cellule vengono trasmesse alle cellule bipolari e successivamente elaborate attraverso l'azione modulatrice delle cellule orizzontali e amacrine. Il risultato finale di questa complessa rete di interazioni converge su circa 1,2 milioni di cellule ganglionari retiniche (retinal ganglion cells, RGC), che rappresentano l'unica popolazione neuronale retinica in grado di inviare segnali direttamente al sistema nervoso centrale (Kim et al. 2021; Huang et al. 2024) (Figura 2).

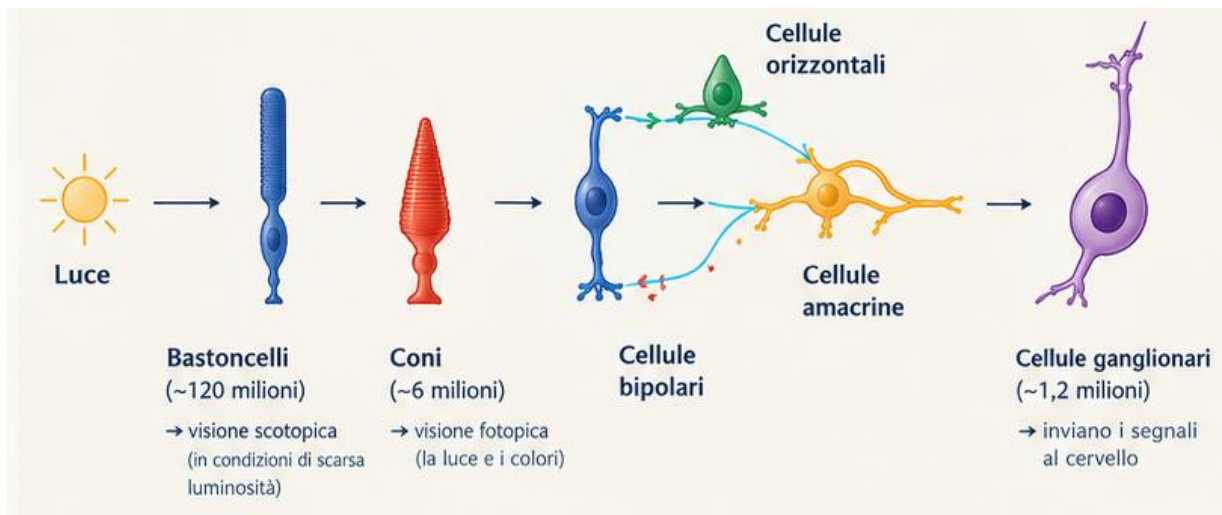


Figura 2. Organizzazione cellulare della retina e trasmissione del segnale visivo.

Le RGC costituiscono pertanto l'output neuronale della retina. I loro assoni decorrono nello strato delle fibre nervose retiniche (retinal nerve fiber layer, RNFL), convergono a livello del disco ottico e formano il nervo ottico, principale via di collegamento tra retina e cervello. Attraverso il nervo ottico, le informazioni visive vengono trasmesse a diverse strutture centrali, tra cui il nucleo genicolato laterale del talamo, il collicolo superiore e nuclei coinvolti nella regolazione dei ritmi circadiani e dei riflessi pupillari (Huang et al. 2024).

Il rapporto numerico tra fotorecettori e RGC è pari a circa 100:1. Questo dato evidenzia come le cellule ganglionari non rappresentino semplicemente dei neuroni di trasmissione, ma costituiscano il risultato di una profonda rielaborazione dell'informazione visiva che avviene già all'interno della retina. Le RGC non trasferiscono infatti al cervello una rappresentazione "pixel per pixel" del mondo esterno; al contrario, estraggono selettivamente caratteristiche specifiche dello stimolo visivo, quali contrasto, colore, movimento, orientamento e variazioni dell'intensità luminosa, distribuendole successivamente lungo differenti vie neurali specializzate (Kim et al. 2021; Huang et al. 2024). Questa organizzazione in canali paralleli è alla base dell'elevata eterogeneità funzionale della popolazione ganglionare. Nel corso degli ultimi decenni, studi anatomici, fisiologici e molecolari hanno progressivamente messo in evidenza che le RGC non costituiscono una popolazione uniforme, bensì comprendono numerosi sottotipi caratterizzati da differenti proprietà morfologiche, profili trascrizionali, pattern di connessione e funzioni biologiche. Le moderne

tecnologie di single-cell RNA sequencing hanno permesso di identificare nella retina umana circa 18 sottotipi principali di RGC, dimostrando che la complessità della popolazione ganglionare è significativamente maggiore di quanto ipotizzato in passato (Kim et al. 2021; Baakdhah e Sivak 2026).

Tra i sottotipi meglio caratterizzati figurano le cellule midget, le cellule parasol, le cellule bistratificate e le cellule ganglionari intrinsecamente fotosensibili (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, ipRGC). Le cellule midget rappresentano il sottotipo quantitativamente predominante e sono coinvolte principalmente nella trasmissione delle informazioni ad alta risoluzione spaziale e nella discriminazione cromatica. Le cellule parasol partecipano invece all'elaborazione del movimento e delle variazioni temporali del contrasto, mentre le cellule bistratificate contribuiscono all'opponenza cromatica blu-giallo. Le ipRGC, caratterizzate dall'espressione della melanopsina, svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dei ritmi circadiani e delle funzioni visive non formanti immagine (Baakdhah e Sivak 2026; Kim et al. 2021; Tapia, Nascimento-dos-Santos, et al. 2022). L'elevata eterogeneità delle RGC riflette l'estrema complessità delle funzioni visive che esse svolgono e rappresenta uno dei principali ostacoli alla loro caratterizzazione sperimentale. La definizione dei diversi sottotipi e dei relativi programmi molecolari costituisce infatti un'area di ricerca ancora in rapida evoluzione, particolarmente rilevante per comprendere sia lo sviluppo della retina sia i meccanismi patologici che interessano il nervo ottico (Figura 3).

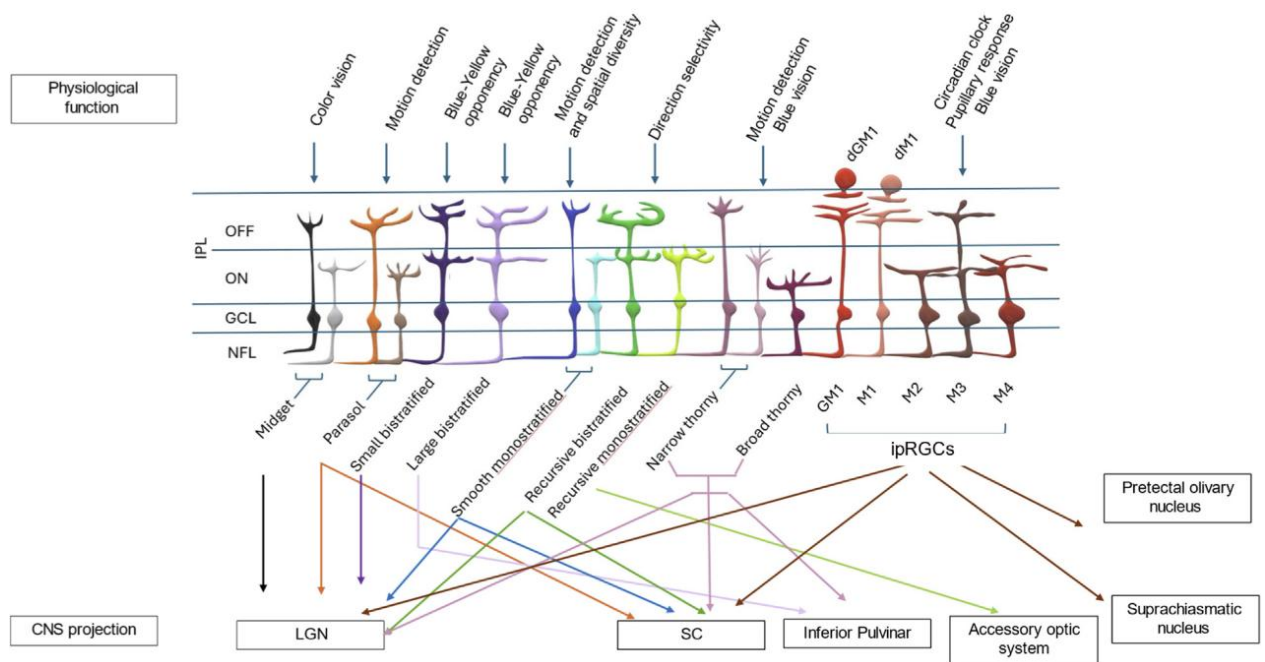


Figura 3. Classificazione dei principali sottotipi di cellule ganglionari retiniche (RGC). La figura illustra i principali sottotipi di RGC identificati nella retina umana e dei primati non umani, evidenziandone la distribuzione dei dendriti nei diversi livelli dello strato plessiforme interno (IPL) e le principali funzioni fisiologiche associate. (Baakdhah e Sivak 2025).

1.2 Sviluppo delle cellule ganglionari retiniche

Durante lo sviluppo embrionale della retina, tutti i principali tipi cellulari neuronali derivano da un pool comune di cellule progenitrici retiniche multipotenti (retinal progenitor cells, RPC). Queste cellule possiedono la capacità di generare l'intero repertorio neuronale e gliale della retina e vanno incontro a una sequenza temporale di differenziamento altamente conservata. Le RGC risultano il primo tipo neuronale a essere prodotto durante la retinogenesi. Nello sviluppo umano, la loro comparsa è osservabile già intorno alla quarta settimana di gestazione e precede la formazione della maggior parte delle altre popolazioni neuronali retiniche. Successivamente, gli assoni delle RGC contribuiscono alla formazione del nervo ottico e all'instaurazione delle prime connessioni con i centri visivi cerebrali (Huang et al. 2024; Wu et al. 2021).

La specificazione del destino ganglionare non rappresenta un evento improvviso, bensì il risultato di un processo graduale durante il quale le cellule progenitrici abbandonano progressivamente lo stato multipotente e acquisiscono programmi trascrizionali sempre più restrittivi. Analisi trascrittomiche a singola cellula hanno evidenziato che le RPC non acquisiscono immediatamente una specializzazione definita. Al contrario, attraversano stati transitori caratterizzati dalla co-espressione di geni associati a differenti programmi

di differenziamento prima della progressiva stabilizzazione dell'identità cellulare finale. In queste cellule possono coesistere temporaneamente fattori che promuovono la differenziazione ganglionare e fattori associati ad altri fenotipi retinici, evidenziando come tali specificazioni emergano da un equilibrio dinamico tra programmi trascrizionali concorrenti (Wu et al. 2021). Al centro di questo processo si trova una rete gerarchica di fattori di trascrizione. Tra essi, Atonal BHLH Transcription Factor 7 (ATOH7) rappresenta uno dei principali regolatori precoci della competenza ganglionare (Wu et al. 2021). L'espressione di ATOH7 contraddistingue una popolazione di progenitori retinici progressivamente indirizzati verso il destino ganglionare e rappresenta uno dei primi segnali molecolari associati alla specificazione delle RGC. L'importanza di ATOH7 è stata dimostrata da numerosi studi di perdita di funzione. Modelli murini knockout hanno evidenziato una drammatica riduzione del numero di RGC in assenza di questo fattore. Tuttavia, tali studi hanno anche dimostrato che ATOH7 non rappresenta l'unico regolatore del processo. Fattori appartenenti alla famiglia SOX, in particolare SOX4 e SOX11, possono infatti compensarne parzialmente la perdita e sostenere alcuni aspetti del differenziamento ganglionare (Wu et al. 2021).

A valle di ATOH7 agiscono altri fattori di trascrizione coinvolti nella determinazione e nella maturazione delle RGC. Tra questi, POU Class 4 Homeobox 2 (POU4F2, noto anche come BRN3B) e ISL LIM Homeobox 1 (ISL1) rivestono un ruolo centrale. Entrambi promuovono l'attivazione di programmi trascrizionali associati alla crescita assonale, all'assemblaggio delle connessioni sinaptiche e alla sopravvivenza neuronale, contribuendo contemporaneamente alla repressione di programmi alternativi incompatibili con l'identità ganglionare (Wu et al. 2021; Agarwal et al. 2023).

La maturazione delle RGC è accompagnata dall'acquisizione progressiva di specifici marcatori molecolari, utilizzati sia per studi di sviluppo sia per applicazioni sperimentali. Tra questi figurano BRN3A, BRN3B, RBPMS, SNCG e altre proteine coinvolte nella fisiologia neuronale e nella crescita assonale (Wu et al. 2021; Agarwal et al. 2023). L'identificazione di tali marcatori ha rappresentato un passaggio fondamentale per lo studio delle RGC durante lo sviluppo e nei moderni modelli derivati da cellule staminali pluripotenti.

1.3 Le cellule ganglionari retiniche nelle neuropatie ottiche e la necessità di modelli sperimentali umani

Le RGC sono coinvolte in numerose patologie neurodegenerative della retina e del nervo ottico. Tra queste, il glaucoma rappresenta la principale causa irreversibile di cecità nel mondo ed è caratterizzato dalla progressiva degenerazione delle RGC e dei loro assoni (Vernazza et al. 2021; McMonnies 2017).

La crescente consapevolezza dell'eterogeneità delle RGC ha modificato l'interpretazione dei processi patologici che le coinvolgono, suggerendo che le diverse popolazioni ganglionari possano presentare suscettibilità differenti nei confronti dello stress cellulare e della neurodegenerazione (Tapia, Nascimento-dos-Santos, et al. 2022). Tra i sottotipi maggiormente studiati, le cellule ganglionari intrinsecamente fotosensibili (ipRGC) sembrano possedere una capacità di sopravvivenza superiore rispetto ad altri in diversi modelli in vivo di lesione assonale (Tapia et al. 2022). Tale fenomeno è stato associato alla presenza di peculiari programmi trascrizionali neuroprotettivi e a specifiche caratteristiche metaboliche. Al contrario, alcune popolazioni di RGC coinvolte nell'elaborazione del movimento e specifici sottotipi OFF transitori risultano particolarmente vulnerabili alla neurodegenerazione (Tapia, Nascimento-dos-Santos, et al. 2022; Kim et al. 2021) (Figura 4).

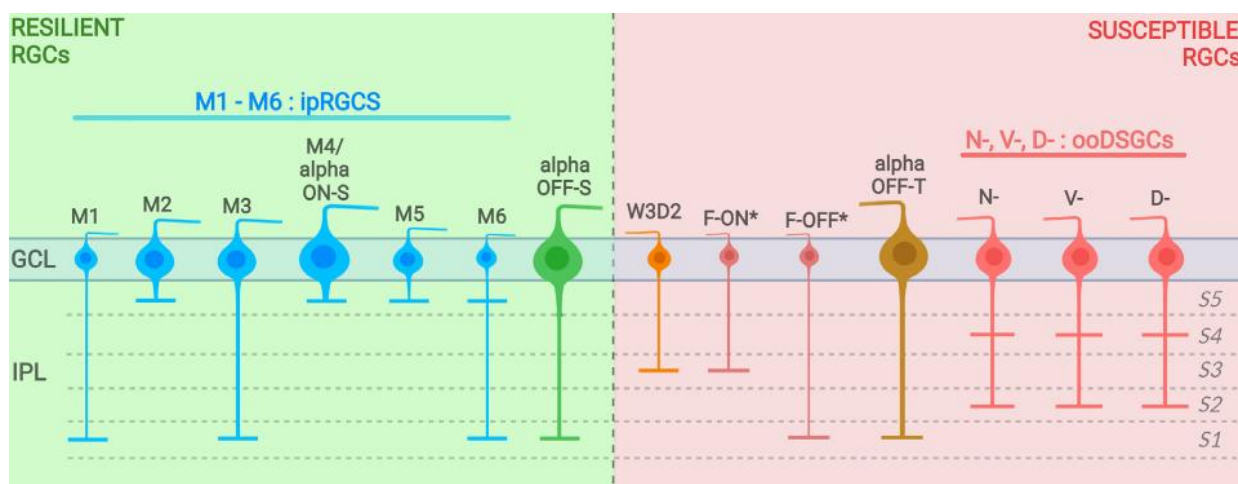


Figura 4. Sottotipi di RGC resistenti e vulnerabili e loro stratificazione dendritica nello strato plessiforme interno (IPL). (Tapia et al. 2022)

In particolare, nel glaucoma il quadro appare ancora più complesso. Diversi studi, come riassunto nella review di Kim et al. (2021), hanno suggerito un coinvolgimento relativamente precoce delle cellule parasol, probabilmente correlato alle loro elevate richieste metaboliche e alle dimensioni particolarmente grandi del soma e dell'assone. Tuttavia, le evidenze attualmente disponibili non consentono ancora di identificare in modo definitivo un singolo sottotipo come bersaglio preferenziale della malattia (Kim et al. 2021). La comprensione dei meccanismi che determinano la suscettibilità differenziale delle diverse popolazioni ganglionari rappresenta pertanto uno dei principali obiettivi della ricerca contemporanea.

Ancora oggi, lo studio diretto delle RGC umane presenta notevoli difficoltà sperimentali. Il tessuto retinico umano vitale è scarsamente disponibile e, quando ottenibile (ad esempio da campioni post-mortem o da biopsie chirurgiche occasionali), è accessibile solo in singoli time-point. Questa limitazione impedisce di seguire in modo longitudinale gli stessi tessuti o le stesse cellule durante i processi di sviluppo, maturazione e degenerazione. Sebbene i modelli animali abbiano fornito contributi fondamentali alla comprensione della biologia delle cellule ganglionari retiniche e dei meccanismi coinvolti nelle neuropatie ottiche, nessuno di essi riproduce completamente le caratteristiche della retina umana. I primati non umani rappresentano il modello più vicino all'uomo dal punto di vista anatomico e funzionale, ma il loro impiego è limitato da importanti considerazioni etiche, economiche e pratiche. Di conseguenza, gran parte della ricerca si basa su roditori, che presentano differenze significative nella composizione cellulare della retina, nell'organizzazione dei circuiti visivi e nei programmi di sviluppo (A. Bouhenni et al. 2012). Tali limitazioni hanno evidenziato la necessità di sviluppare modelli sperimentali umani in grado di colmare il divario tra gli studi preclinici e la fisiologia retinica dell'uomo. In questo contesto, l'avvento delle cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC) ha rappresentato una svolta importante per la ricerca oftalmologica. La possibilità di ottenere cellule neurali retiniche direttamente da materiale biologico umano ha infatti consentito di studiare processi di sviluppo, maturazione e patologia in un contesto geneticamente rilevante e difficilmente accessibile con altri approcci sperimentali (Chamling et al. 2016). L'ulteriore evoluzione di queste tecnologie ha portato allo sviluppo degli organoidi retinici, strutture tridimensionali auto-organizzate capaci di ricapitolare aspetti fondamentali della retinogenesi umana, inclusa la generazione sequenziale delle principali popolazioni cellulari retiniche e l'emergere di RGC con caratteristiche molecolari e funzionali simili

a quelle osservate in vivo (Spirig e Renner 2024). Grazie a queste proprietà, gli organoidi retinici rappresentano oggi una delle piattaforme più promettenti per lo studio della biologia delle RGC e dei meccanismi patogenetici e della caratterizzazione molecolare di specifiche popolazioni retiniche umane.

1.4 Le cellule staminali pluripotenti indotte

Una delle innovazioni più significative della biologia cellulare moderna è stata la dimostrazione che cellule somatiche differenziate possono essere riprogrammate verso uno stato di pluripotenza (Takahashi e Yamanaka 2006). Questa scoperta ha profondamente trasformato lo studio dello sviluppo umano, fornendo l'accesso a cellule con potenzialità embrionali senza la necessità di utilizzare tessuti embrionali e aprendo nuove prospettive per la ricerca biomedica, la medicina rigenerativa e lo studio delle malattie umane. Nel 2006, Takahashi e Yamanaka dimostrarono per la prima volta che fibroblasti murini potevano essere riprogrammati mediante l'espressione forzata di quattro fattori di trascrizione, Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc, successivamente definiti "fattori di Yamanaka" (Takahashi e Yamanaka 2006). L'anno seguente, lo stesso approccio venne applicato con successo a cellule umane adulte, portando alla generazione delle prime hiPSC (Takahashi et al. 2007).

Le hiPSC condividono con le cellule staminali embrionali umane (human embryonic stem cells, hESC) due proprietà fondamentali: la capacità di auto-rinnovamento pressoché illimitato e la pluripotenza, ovvero la possibilità di generare cellule appartenenti a tutti e tre i foglietti embrionali. A differenza delle hESC, tuttavia, le hiPSC possono essere ottenute da cellule somatiche adulte, superando gran parte delle problematiche etiche associate all'utilizzo di embrioni umani e consentendo la generazione di linee cellulari paziente-specifiche (Cerneckis et al. 2024). La possibilità di conservare il patrimonio genetico del donatore ha reso questa tecnologia uno strumento particolarmente utile per lo studio dei meccanismi patologici umani, per la valutazione di nuove strategie terapeutiche e per lo sviluppo di approcci di medicina personalizzata (Daniszewski et al. 2022). Nell'ambito della ricerca retinica, le hiPSC hanno reso possibile la riproduzione in vitro di aspetti fondamentali dello sviluppo della retina umana e la generazione delle principali popolazioni cellulari retiniche, incluse le RGC (Slembrouck-Brec et al. 2018; Daniszewski et al. 2022; Harkin et al. 2024;

Rabesandratana et al. 2020). I primi protocolli di differenziamento erano prevalentemente basati su colture bidimensionali e hanno fornito informazioni fondamentali sui meccanismi che regolano la neurogenesi retinica. Tuttavia, tali sistemi risultavano incapaci di riprodurre l'organizzazione tridimensionale della retina e le complesse interazioni cellulari che caratterizzano la retinogenesi in vivo (Wong et al. 2023; Arthur et al. 2022).

La necessità di superare queste limitazioni ha favorito lo sviluppo di modelli tridimensionali derivati da cellule staminali pluripotenti, culminando nella generazione degli organoidi retinici. Grazie alla loro capacità di auto-organizzarsi e di ricapitolare numerosi aspetti dello sviluppo della retina umana, gli organoidi rappresentano oggi una delle piattaforme sperimentali più promettenti per lo studio dello sviluppo retinico, dei meccanismi patologici e delle strategie di medicina rigenerativa.

1.5 Organoidi retinici: sviluppo, organizzazione e applicazioni nello studio delle cellule ganglionari retiniche

Gli organoidi retinici rappresentano una delle applicazioni più avanzate della tecnologia delle cellule staminali pluripotenti nel campo della biologia dello sviluppo, della medicina rigenerativa e della ricerca oftalmologica. Si tratta di strutture tridimensionali auto-organizzate derivate da hESC o hiPSC che, grazie alla loro intrinseca capacità di seguire programmi di sviluppo conservati, ricapitolano numerosi aspetti della retinogenesi umana sotto il profilo morfologico, cellulare e molecolare. Per questo motivo, gli organoidi retinici sono oggi considerati uno dei modelli sperimentali più rilevanti per lo studio dello sviluppo della retina umana, dei meccanismi fisiopatologici e delle strategie terapeutiche innovative (Afanasyeva et al. 2021; Harkin et al. 2024; Ashworth et al. 2024)

A differenza delle tradizionali colture bidimensionali, nelle quali le cellule differenziate crescono come popolazioni relativamente omogenee prive di una complessa organizzazione spaziale, gli organoidi sviluppano spontaneamente una struttura tridimensionale caratterizzata dalla progressiva segregazione dei diversi tipi cellulari e dalla formazione di domini tissutali che ricordano quelli osservati durante lo sviluppo embrionale della retina. Questa capacità di auto-organizzazione consente di riprodurre non solo l'identità molecolare dei diversi tipi cellulari retinici, ma anche molte delle

interazioni cellulari che accompagnano la retinogenesi in vivo (Ashworth et al. 2024) (Figura 5).

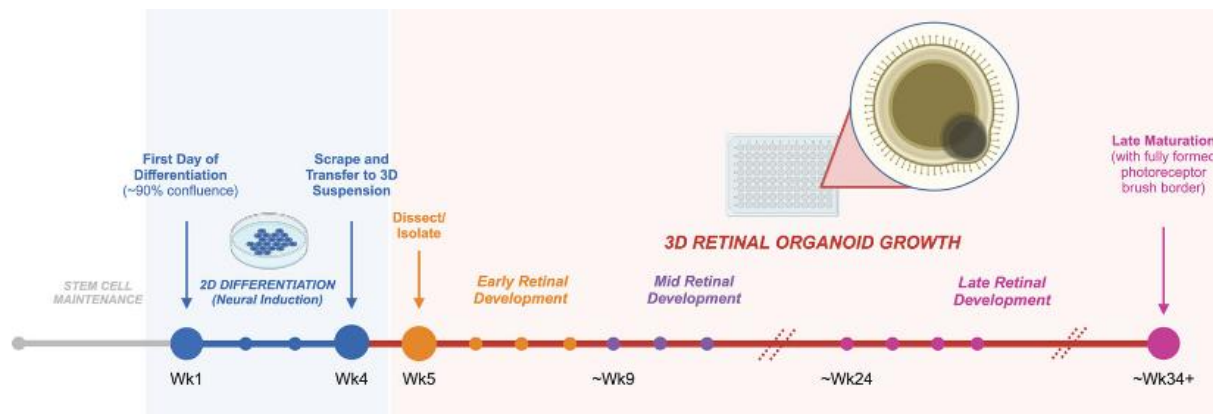


Figura 5. Nell'immagine è rappresentata la progressione del differenziamento degli organoidi retinici mediante un protocollo 2D-to-3D, dallo stadio iniziale delle cellule staminali fino alle fasi avanzate di maturazione. (Ashworth et al. 2024)

Le basi biologiche di questo fenomeno sono state chiarite dagli studi pionieristici di Eiraku e collaboratori, che per primi dimostrarono come aggregati di cellule staminali embrionali murine coltivati in sospensione fossero in grado di auto-organizzarsi spontaneamente in strutture simili alla coppa ottica embrionale. Tali osservazioni evidenziarono che gran parte delle informazioni necessarie alla morfogenesi della retina risiede nei programmi intrinseci delle cellule neuroepiteliali e non richiede necessariamente segnali provenienti da tessuti extraoculari (Eiraku et al. 2011). Durante questo processo, gli aggregati cellulari formano inizialmente una sfera di neuroepitelio polarizzato che si differenzia progressivamente in domini destinati alla retina neurale e all'epitelio pigmentato retinico (RPE). Successivamente, la regione neuroretinica va incontro a fenomeni di invaginazione che portano alla formazione di una struttura assimilabile alla coppa ottica. Questo rimodellamento tridimensionale è guidato da differenze biomeccaniche emergenti tra le diverse popolazioni cellulari e da modificazioni locali delle tensioni tissutali che accompagnano la morfogenesi dell'organoide (Eiraku et al. 2011) (Figura 6).

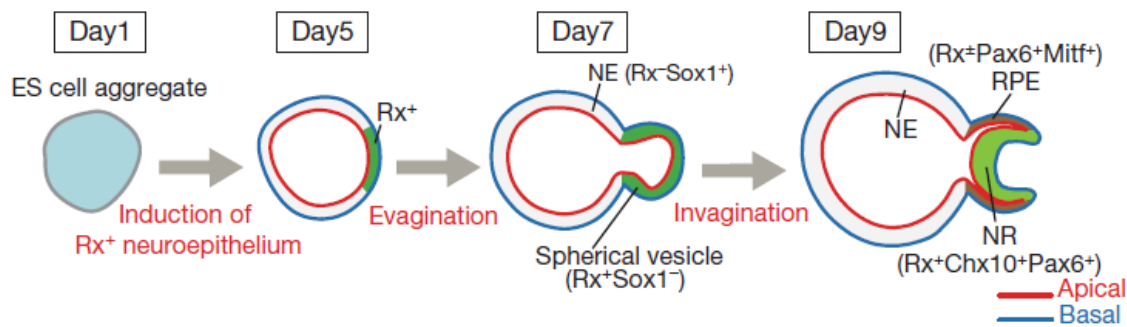


Figura 6. Rappresentazione dell'autoformazione di una struttura simil-coppa ottica in aggregati di cellule staminali embrionali (ES) coltivati in 3D. (Eiraku et al. 2011)

L'applicazione di questi principi alle cellule staminali pluripotenti umane ha permesso di generare modelli che ripercorrono fedelmente numerose tappe dello sviluppo retinico umano. Zhong e collaboratori hanno dimostrato che aggregati derivati da hiPSC possono acquisire un'identità di campo oculare caratterizzata dall'espressione sequenziale di fattori di trascrizione fondamentali per lo sviluppo retinico, tra cui PAX6, RAX, SIX3, SIX6 e LHX2. La cronologia di comparsa di questi marcatori riproduce in maniera sorprendentemente simile quanto osservato durante lo sviluppo embrionale umano, indicando che gran parte dei programmi molecolari che guidano la retinogenesi viene conservata anche nelle condizioni di coltura in vitro (Zhong et al. 2014).

Una delle caratteristiche più rilevanti degli organoidi retinici è la capacità di generare le principali popolazioni cellulari della retina seguendo una sequenza temporale analoga a quella osservata in vivo. Le RGC rappresentano il primo tipo neuronale a differenziarsi, seguite da cellule amacrine, cellule orizzontali, fotorecettori, cellule bipolari e cellule gliali di Müller. Tale successione riproduce fedelmente la cronologia dello sviluppo retinico umano e conferma la capacità degli organoidi di ricapitolare programmi cellulari e molecolari fisiologici (Zhong et al. 2014; Reichman et al. 2014).

Particolarmente rilevante per il presente lavoro è la precoce comparsa delle RGC durante il differenziamento degli organoidi. Nonostante la notevole variabilità dei protocolli di differenziamento sviluppati negli ultimi anni, una caratteristica condivisa dai diversi modelli di organoide retinico è la comparsa precoce delle cellule ganglionari retiniche (RGC), che rappresentano costantemente la prima popolazione neuronale generata durante la retinogenesi in vitro (Harkin et al. 2024; Bellapianta et al. 2022; Capowski et al. 2018; Móvio, De Lima-Vasconcellos, et al. 2023). Questa sequenza temporale riproduce fedelmente quanto osservato nello sviluppo embrionale della

retina umana, nel quale le RGC costituiscono la prima classe neuronale a differenziarsi a partire dai progenitori retinici. Numerosi studi hanno inoltre dimostrato che le RGC derivate da organoidi intraprendono un progressivo percorso di maturazione caratterizzato dall'acquisizione di marcatori specifici della linea ganglionare, tra cui BRN3A, BRN3B, ISL1, SNCG e RBPMS, dall'estensione di neuriti e dalla formazione di connessioni sinaptiche. Con il progredire della coltura, tali cellule sviluppano inoltre proprietà elettrofisiologiche compatibili con quelle delle RGC mature, indicando che gli organoidi sono in grado di ricapitolare non soltanto le fasi iniziali del differenziamento, ma anche aspetti rilevanti della maturazione funzionale delle RGC (Capowski et al. 2018).

La presenza delle RGC all'interno di un microambiente multicellulare che comprende progenitori retinici, altre popolazioni neuronali e cellule gliali rappresenta uno dei principali punti di forza degli organoidi retinici, poiché consente di studiare lo sviluppo delle cellule ganglionari in un contesto più vicino a quello fisiologico. Tuttavia, questa stessa complessità può rendere più difficoltosa l'analisi di specifiche popolazioni cellulari, creando la necessità di strategie che ne consentano l'identificazione e l'arricchimento selettivo. Inoltre, come tutti i sistemi sperimentali in vitro, gli organoidi retinici presentano alcune limitazioni che ne condizionano la capacità di riprodurre integralmente la fisiologia della retina umana. In particolare, durante le fasi più avanzate della coltura è stata frequentemente osservata una progressiva riduzione della popolazione ganglionare, fenomeno generalmente attribuito all'assenza dei bersagli cerebrali normalmente presenti in vivo e del conseguente supporto trofico retrogrado necessario al mantenimento delle RGC mature (Afanasyeva et al. 2021; Vielle et al. 2021). Persistono inoltre ulteriori limitazioni, tra cui l'assenza di una vascolarizzazione funzionale, la ricostruzione incompleta delle interazioni tra retina neurale ed epitelio pigmentato retinico e la variabilità associata alle diverse linee cellulari e ai protocolli di differenziamento utilizzati (Ashworth et al. 2024; Harkin et al. 2024).

Nonostante tali aspetti, gli organoidi retinici costituiscono attualmente il sistema in vitro più completo disponibile per lo studio della biologia delle cellule ganglionari umane. La possibilità di ottenere tessuti retinici derivati da cellule umane e di riprodurre numerose tappe dello sviluppo fisiologico e patologico delle RGC ha reso questi modelli strumenti

di grande interesse per la ricerca di base, la modellizzazione di malattia, lo screening farmacologico e la medicina rigenerativa.

In questo contesto, l'identificazione di marcatori di superficie idonei all'isolamento di cellule vive assume un'importanza centrale. Sebbene numerosi marcatori ganglionari siano utilizzati per la caratterizzazione istologica delle RGC, molti di essi sono localizzati nel nucleo o nel citoplasma e risultano pertanto incompatibili con procedure di immunoselezione. Per questo motivo è stato sviluppato un crescente interesse verso marcatori di membrana utilizzabili per l'arricchimento di popolazioni ganglionari mediante tecniche di *cell sorting*. Tra questi, il più ampiamente impiegato è CD90 (Thy-1), una glicoproteina di superficie utilizzata per l'isolamento di RGC da retina nativa e da organoidi retinici (Kobayashi et al. 2018; Barres et al. 1988; Chintalapudi et al. 2017).

1.6 Identificazione e isolamento delle cellule ganglionari retiniche

Le cellule ganglionari retiniche (RGC) vengono comunemente identificate mediante l'espressione di marcatori intracellulari quali BRN3A (POU4F1), BRN3B (POU4F2), RBPMS, SNCG e NEFL, ampiamente utilizzati per la caratterizzazione istologica e molecolare di questa popolazione cellulare (Wu et al. 2021; Kim et al. 2021; Agarwal et al. 2023). Sebbene tali marcatori presentino un'elevata specificità biologica, la loro localizzazione nucleare o citoplasmatica richiede procedure di fissazione e permeabilizzazione incompatibili con il recupero di cellule vive. Di conseguenza, essi risultano poco adatti per applicazioni che richiedano l'isolamento di RGC destinate a successive analisi funzionali, molecolari o farmacologiche (Chintalapudi et al. 2017; Kobayashi et al. 2018).

Per superare questa limitazione, sono stati sviluppati approcci basati sull'impiego di marcatori di superficie. Tra questi, il più ampiamente utilizzato è CD90 (Thy-1), una glicoproteina di membrana appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline, legata alla membrana plasmatica tramite un'ancora glicosilfosfatidilinositolica (GPI) (Rege e Hagood 2006). Nella retina, CD90 è stato storicamente associato alle RGC ed è stato largamente impiegato in protocolli di immunopanning e *cell sorting* per l'arricchimento di popolazioni ganglionari vitali, sia da retina nativa sia da modelli

derivati da cellule staminali pluripotenti (Riordan et al. 2023; Barres et al. 1988; Chintalapudi et al. 2017).

Tuttavia, l'espressione di CD90 non è esclusiva delle cellule ganglionari. Studi condotti nella retina hanno evidenziato la presenza di cellule CD90-positive appartenenti anche ad altre popolazioni neuronali, incluse specifiche sottopopolazioni di cellule amacrine, mentre in altri tessuti il marcatore è espresso da fibroblasti, cellule stromali e cellule mesenchimali (Raymond et al. 2008; Rege e Hagood 2006). Pertanto, la positività per CD90 deve essere interpretata come indicativa di un arricchimento della componente ganglionare piuttosto che come prova definitiva dell'identità cellulare.

Nonostante tali limitazioni, CD90 rappresenta tuttora il marcatore di superficie più consolidato per l'isolamento di RGC vive da retina nativa e da organoidi retinici. La caratterizzazione delle popolazioni CD90-positive richiede tuttavia approcci complementari in grado di definirne il profilo molecolare complessivo. In questo contesto, le tecnologie omiche, e in particolare la proteomica basata su spettrometria di massa, costituiscono strumenti particolarmente utili per valutare il grado di arricchimento ganglionare e identificare i processi biologici associati alle cellule isolate (Agarwal et al. 2023; Ashworth et al. 2024).

1.7 La proteomica come strumento per la caratterizzazione delle popolazioni cellulari isolate

La corretta identificazione di una popolazione cellulare non può basarsi esclusivamente sull'espressione di uno o pochi marcatori molecolari. Sebbene l'utilizzo di antigeni di superficie come CD90 consenta l'arricchimento di cellule con caratteristiche compatibili con il fenotipo ganglionare, la presenza di popolazioni cellulari biologicamente eterogenee all'interno della frazione selezionata non può essere esclusa a priori. Questa considerazione è particolarmente rilevante nel contesto degli organoidi retinici, che contengono molteplici tipi cellulari derivati da progenitori comuni e caratterizzati da programmi di differenziamento parzialmente sovrapposti. Di conseguenza, la validazione dell'identità cellulare richiede approcci in grado di descrivere in maniera globale il profilo molecolare delle cellule isolate, piuttosto che limitarsi all'analisi di singoli marcatori.

Negli ultimi anni, lo sviluppo delle tecnologie omiche ha profondamente trasformato lo studio delle popolazioni cellulari complesse. Tra queste, trascrittomica e proteomica rappresentano gli strumenti maggiormente utilizzati per definire l'identità cellulare, ricostruire programmi biologici e identificare pathway molecolari associati a specifici stati funzionali. In particolare, l'avvento delle tecniche di single-cell RNA sequencing ha consentito di ridefinire la classificazione delle cellule ganglionari retiniche, rivelando un livello di eterogeneità notevolmente superiore rispetto a quanto precedentemente riconosciuto mediante approcci morfologici ed elettrofisiologici (Kim et al. 2021; Daniszewski et al. 2022; Wu et al. 2021).

Sebbene la trascrittomica costituisca uno strumento estremamente potente per investigare i programmi genetici cellulari, l'espressione dell'RNA non sempre correla direttamente con i livelli delle corrispondenti proteine. Numerosi meccanismi regolatori intervengono infatti tra trascrizione e sintesi proteica, inclusi controllo post-trascrizionale, stabilità degli mRNA, efficienza traduzionale e processi di degradazione proteica. Di conseguenza, il trascrittoma rappresenta principalmente il potenziale espresso da una cellula, mentre il proteoma fornisce una descrizione più diretta delle funzioni biologiche effettivamente in atto in un determinato momento (Vogel e Marcotte 2012).

Le proteine costituiscono infatti gli effettori finali della maggior parte dei processi cellulari. La differenziazione neuronale, l'estensione assonale, la formazione delle sinapsi, il metabolismo energetico e le risposte agli stimoli extracellulari sono tutti fenomeni mediati direttamente dall'attività proteica. Per questo motivo, l'analisi proteomica rappresenta uno strumento particolarmente informativo quando l'obiettivo è comprendere il fenotipo funzionale di una popolazione cellulare e identificare i processi biologici che la caratterizzano.

Lo sviluppo delle piattaforme di spettrometria di massa ad alta risoluzione ha reso possibile l'identificazione e la quantificazione simultanea di migliaia di proteine all'interno di un singolo campione biologico. In particolare, gli approcci proteomici basati sull'accoppiamento della cromatografia liquida su scala nanometrica con la spettrometria di massa tandem (nLC-MS/MS) consentono una caratterizzazione estesa dei proteomi cellulari, permettendo non solo l'identificazione di proteine differenzialmente espresse, ma anche la ricostruzione dei processi biologici e delle reti molecolari associate a specifici stati cellulari. Rispetto ad approcci mirati quali

immunofluorescenza e immunoblotting, limitati all'analisi di proteine selezionate a priori, la proteomica offre una valutazione globale e non supervisionata dell'assetto molecolare del sistema studiato, permettendo di cogliere variazioni biologiche che potrebbero non emergere attraverso l'analisi di singoli marcatori. Nel contesto degli organoidi retinici, la proteomica è stata utilizzata per monitorare i processi di maturazione neuronale, valutare la somiglianza tra organoidi e tessuto retinico umano e caratterizzare le dinamiche molecolari associate alla differenziazione delle principali popolazioni cellulari retiniche. Review e lavori recenti hanno dimostrato come il proteoma degli organoidi evolva progressivamente nel tempo, riflettendo l'attivazione sequenziale dei programmi biologici coinvolti nella neurogenesi, nella formazione delle connessioni sinaptiche e nella maturazione funzionale della retina (Capowski et al. 2018; Afanasyeva et al. 2021).

Particolarmente interessante risulta l'applicazione della proteomica allo studio di popolazioni cellulari previamente isolate mediante marcatori di superficie. In questo contesto, il profilo proteico può essere utilizzato come strumento indipendente per valutare il grado di arricchimento ottenuto attraverso la selezione cellulare e per verificare la presenza di firme molecolari compatibili con il fenotipo atteso. L'identificazione di proteine caratteristiche delle RGC, di pathway associati allo sviluppo neuronale o di processi biologici specificamente arricchiti può infatti fornire informazioni importanti sulla composizione biologica della popolazione cellulare isolata.

Nel caso delle cellule CD90-positive derivate da organoidi retinici, l'analisi proteomica assume inoltre un particolare interesse alla luce dei limiti di specificità intrinseci del marcatore. Come discusso in precedenza, CD90 rappresenta uno strumento estremamente efficace per l'arricchimento delle cellule ganglionari vitali, ma non costituisce un indicatore assoluto dell'identità ganglionare. La caratterizzazione del proteoma delle cellule selezionate può pertanto contribuire a definire in maniera più accurata la natura biologica della popolazione CD90+, identificando sia le proteine coerenti con un fenotipo ganglionare sia eventuali componenti molecolari riconducibili ad altre popolazioni retiniche.

In questo contesto, il confronto tra le frazioni CD90+ e CD90- offre l'opportunità di esplorare le differenze molecolari associate alla selezione cellulare e di individuare proteine, pathway e processi biologici specificamente arricchiti nella popolazione positiva. Tale approccio consente non solo di valutare l'efficacia della strategia di

isolamento, ma anche di ottenere nuove informazioni sulla biologia delle cellule ganglionari generate negli organoidi retinici umani.

2. Scopo della tesi

Il presente lavoro si è posto l'obiettivo di caratterizzare il profilo proteomico delle sottopopolazioni CD90⁺ e CD90⁻ derivate da organoidi retinici ottenuti da hiPSC, al fine di valutare se la selezione mediante CD90 consenta di arricchire una popolazione con caratteristiche proteomiche compatibili con quelle delle cellule ganglionari retiniche (RGC). Le due frazioni sono state isolate mediante Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) a partire da organoidi ai giorni 28 (T28) e 35 (T35) di differenziamento e analizzate mediante proteomica basata su nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nLC-MS/MS). In particolare, lo studio ha mirato a:

- I. Caratterizzare e confrontare i profili proteomici delle popolazioni CD90⁺ e CD90⁻ identificandone le principali differenze in termini di proteine espresse, processi biologici e pathway molecolari;
- II. Valutare se la popolazione CD90⁺ presenti caratteristiche compatibili con cellule ganglionari retiniche in maturazione e identificare eventuali componenti cellulari aggiuntive presenti nella frazione selezionata;
- III. Analizzare le variazioni del profilo proteomico della popolazione CD90⁺ tra T28 e T35 durante la maturazione degli organoidi;
- IV. Determinare se le caratteristiche molecolari e fenotipiche identificate nella frazione CD90⁺ siano mantenute nel tempo.

A tale scopo, le cellule CD90⁺ isolate sono state coltivate in condizioni bidimensionali per sette giorni e successivamente sottoposte ad analisi immunofenotipica e morfologica, al fine di valutare la persistenza dei diversi fenotipi cellulari identificati e il loro stato di differenziamento dopo il periodo di coltura.

3. Materiali e metodi

3.1 Cellule staminali pluripotenti indotte umane

Le hiPSC commercialmente disponibili impiegate in questo studio (iPS12-10; Cell Applications, Inc., San Diego, CA, USA), sono state ottenute mediante riprogrammazione di fibroblasti dermici umani provenienti da donatori sani. Le cellule sono state mantenute in condizioni feeder-free e xeno-free al fine di garantire una maggiore standardizzazione sperimentale e minimizzare la variabilità associata all'impiego di componenti di origine animale.

Le hiPSC sono state coltivate in Essential 8® Flex Basal Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplementato con l'1% (v/v) di Essential 8® Flex Supplement, in condizioni standard di incubazione (37° C, 5% CO₂). Le colture sono state espanse in flask da 25 cm² preventivamente rivestite con vitronectina umana ricombinante (rhVTN-N), impiegata come substrato di adesione per il mantenimento dello stato pluripotente. Al raggiungimento di circa il 75% di confluenza, le cellule sono state sottoposte a passaggio cellulare con un rapporto di split pari a 1:3 utilizzando Versene 1X (Gibco), una soluzione chelante a base di EDTA che consente il distacco delle colonie in condizioni non enzimatiche, preservando la vitalità cellulare e le caratteristiche associate allo stato di pluripotenenza.

3.2 Differenziamento retinico

Il differenziamento degli organoidi retinici è stato eseguito secondo il protocollo descritto da Slembrouck-Brec et al. (2018) (Figura 7). Le hiPSC sono state seminate in piastre da 6 pozzetti precedentemente rivestite con vitronectina umana ricombinante (rhVTN-N) e mantenute in Essential 8® Flex Medium fino al raggiungimento di una confluenza del 60-70%. A questo stadio, il mezzo di coltura è stato sostituito con Essential 6® (Gibco) supplementato con 1% (v/v) penicillin-streptomycin (Euroclone), indicato di seguito come BI medium. Il giorno di sostituzione del mezzo è stato definito come giorno 0 (T0) del differenziamento.

Dopo 48 h (T2), il BI medium è stato sostituito con BiN2 medium, costituito da Essential 6® supplementato con 1% (v/v) N2 Supplement (Gibco) e 1% (v/v) penicillin-

streptomycin. Il mezzo è stato rinnovato ogni 2-3 giorni fino al giorno 28 (T28). Durante questo intervallo temporale, le colture hanno sviluppato strutture neuroepiteliali tridimensionali progressivamente organizzate in domini retinici. Al T28, le strutture tridimensionali ottenute, identificate come organoidi retinici (3D retinal organoids, 3D RO), sono state raccolte e trasferite in sospensione in nuove piastre da 6 pozzetti. Gli organoidi sono stati quindi mantenuti in terreno ProB27 (Tabella 1) fino al giorno 35 (T35).

ProB27 medium
DMEM/F-12 Nutrient Mixture (Gibco)
10 ng/mL di FGF-basic umano (PeproTech, USA)
1% (v/v) di MEM NEAA 100X (Gibco)
1% (v/v) di penstrep
2% (v/v) di B27® Supplement (Gibco)

Tabella 1. Composizione del terreno ProB27.

Gli organoidi ai tempi T21, T28 e T35 sono stati dissociati con TrypLE™ Express 10X (Gibco) per le successive analisi.

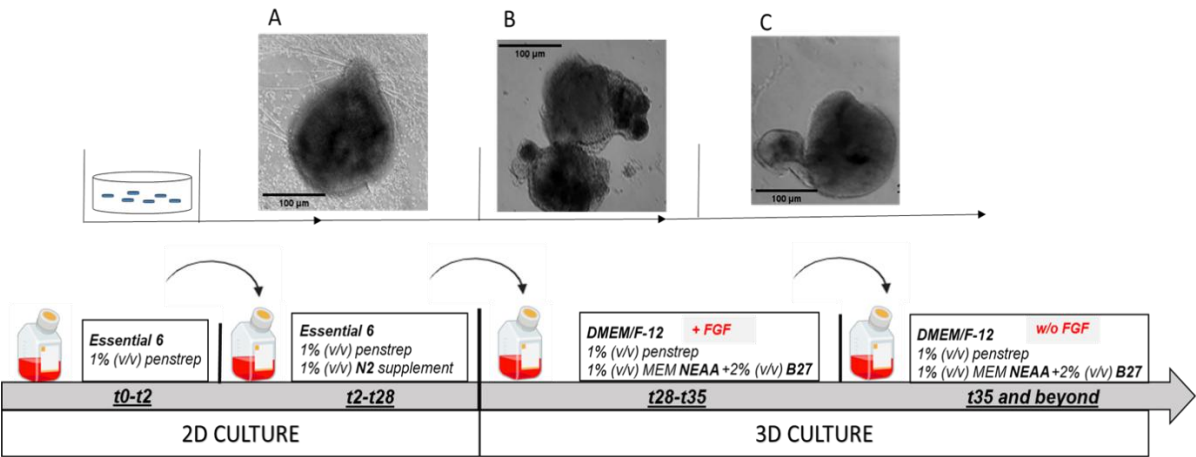


Figura 7. Schematizzazione del protocollo di differenziamento delle hiPSCs verso organoidi retinici.

3.3 Preparazione campioni per Il FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

Gli organoidi retinici ai tempi T28 e T35 sono stati dissociati come descritto nella Sezione 3.2, al fine di ottenere una sospensione cellulare monodispersa da sottoporre a separazione mediante citometria a flusso e cell sorting. Le cellule sono state preliminarmente lavate in PBS. La marcatura è stata effettuata mediante incubazione delle cellule in sospensione per 30 minuti a 4°C con un anticorpo anti-CD90 (Thy-1) coniugato con FITC, diluito in PBS contenente 2 mM EDTA e 0,5% BSA. Al termine dell'incubazione, l'anticorpo in eccesso è stato eliminato mediante tre lavaggi consecutivi con centrifugazione. Le cellule sono state quindi risospese nel medesimo tampone. La separazione delle sottopopolazioni cellulari è stata eseguita presso la Core Facility "Cymacs" dell'Ospedale Policlinico San Martino (Genova) utilizzando un selezionatore cellulare BD FACS Symphony™ S6 (Becton Dickinson, USA) dotato di ugello da 100 µm. Le cellule sono state separate nelle frazioni CD90⁺ e CD90⁻ mediante selezione ad elevata purezza. Al termine della procedura, 6 × 10⁵ cellule per ciascuna frazione (CD90⁺ e CD90⁻; n = 5) sono state recuperate e immediatamente destinate alle analisi proteomiche. Parallelamente, 1 × 10⁵ cellule appartenenti alla popolazione CD90⁺ (n = 3) sono state seminate su chamber slide precedentemente rivestite con poli-D-lisina e laminina e mantenute in coltura per sette giorni prima delle successive analisi immunofenotipiche e morfologiche.

3.4 Preparazione dei campioni per la proteomica

Al fine di identificare le differenze nell'espressione proteica tra le popolazioni CD90⁺ e CD90⁻ isolate mediante citometria a flusso, i campioni sono stati sottoposti a estrazione delle proteine totali e alla successiva caratterizzazione mediante approccio proteomico basato su spettrometria di massa.

Le frazioni cellulari CD90⁺ e CD90⁻ ottenute mediante selezione citofluorimetrica sono state lisate in tampone RIPA (Sigma-Aldrich, Italia) addizionato con un cocktail di inibitori delle proteasi (Complete Tablets, Roche Diagnostics, Mannheim, Germania). Dopo sonificazione, i lisati sono stati centrifugati a 14.000 × g per 15 minuti a 4 °C e il surnatante contenente la frazione proteica solubile è stato recuperato e conservato a -80 °C fino alle analisi successive. La concentrazione proteica totale è stata

determinata mediante saggio dell'acido bicineconinico (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) secondo le istruzioni del produttore.

Al termine delle procedure di estrazione e quantificazione, i campioni sono stati trasferiti alla Core Facility per le Scienze Omiche dell'Istituto Giannina Gaslini (Genova), dove sono state eseguite le successive analisi proteomiche mediante cromatografia liquida su scala nanometrica accoppiata a spettrometria di massa tandem (nLC-MS/MS).

3.5 Preparazione dei campioni per Immunofluorescenza

Al fine di confermare la presenza dei principali fenotipi cellulari identificati mediante l'analisi proteomica delle popolazioni CD90⁺ e CD90⁻, è stata eseguita un'analisi di immunofluorescenza sulla popolazione CD90⁺ mantenuta in coltura per sette giorni dopo la separazione citofluorimetrica. L'espressione di marcatori selezionati è stata valutata per verificare la persistenza delle caratteristiche fenotipiche evidenziate dal profilo proteico e caratterizzare le cellule sopravvissute alla procedura di isolamento. Le cellule CD90⁺ sono state fissate in paraformaldeide (PFA) al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente, seguita da due lavaggi in PBS per rimuovere il fissativo residuo. La permeabilizzazione è stata effettuata mediante incubazione in PBS contenente 0,1% Triton X-100 per 10 minuti. Al fine di ridurre il legame aspecifico degli anticorpi, i campioni sono stati successivamente incubati per 15 minuti in PBS contenente il 5% di albumina sierica bovina (BSA). Al termine del blocco delle interazioni aspecifiche, i campioni sono stati incubati overnight a 4 °C con gli anticorpi primari anti-BRN3A (1:500), anti-TUBB3 (1:200), anti-IBA1 (1:500) e anti-GLAST (1:1000), diluiti in PBS contenente l'1% di BSA. Il giorno successivo, dopo tre lavaggi consecutivi in PBS della durata di 5 minuti ciascuno, le cellule sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente, al buio, con anticorpi secondari coniugati con Alexa Fluor™ 488 e Alexa Fluor™ 647, diluiti in PBS contenente l'1% di BSA. Dopo ulteriori tre lavaggi in PBS (5 minuti ciascuno), i nuclei cellulari sono stati marcati con DAPI (1 µg/mL) per 5 minuti.

Le immagini sono state acquisite mediante microscopio confocale Nikon AX-R equipaggiato con obiettivo ad immersione in olio 60×/1,42 NA. L'acquisizione è stata effettuata mediante scansione sequenziale dei singoli canali di fluorescenza, con pinhole impostato a 1 Airy Unit e zoom ottico pari a 2, al fine di evitare fenomeni di sovrapposizione spettrale tra i fluorocromi utilizzati.

3.6 Analisi dei dati

Per l'analisi proteomica, i report quantitativi generati mediante Spectronaut sono stati importati nel software Perseus. Sono stati esclusi dalle analisi i gruppi proteici con meno del 70% di valori validi nei campioni considerati. Le intensità proteiche sono state trasformate in scala logaritmica base 2 ($\log_2$) e normalizzate mediante quantile normalization per ridurre la variabilità tecnica tra i campioni. I valori mancanti sono stati imputati secondo l'algoritmo implementato in Perseus, assumendo che la mancata quantificazione riflettesse livelli di espressione inferiori al limite di rilevazione della metodica analitica. Le relazioni globali tra i campioni e le sottopopolazioni cellulari sono state investigate mediante Principal Component Analysis (PCA) e analisi di clustering gerarchico non supervisionato. Per tali analisi sono stati utilizzati valori standardizzati (z-score) calcolati per ciascuna proteina.

L'identificazione delle proteine differenzialmente espresse tra le condizioni sperimentali è stata effettuata sui dati $\log_2$ -trasformati mediante test t di Student a due code. Per ciascuna proteina sono stati calcolati i livelli medi di espressione nelle condizioni analizzate, la differenza tra le medie dei valori $\log_2$ ($\log_2FC$) e il relativo p-value. I p-value ottenuti sono stati corretti per confronti multipli mediante il metodo di Benjamini-Hochberg e riportati come False Discovery Rate (FDR). Sono state considerate statisticamente significative le proteine caratterizzate da $FDR < 0,05$.

Al fine di identificare i processi biologici associati alla maturazione della popolazione $CD90^+$, le proteine risultate significativamente aumentate a T35 rispetto a T28 ($\log_2FC > 0$; $FDR < 0,05$) sono state sottoposte ad analisi di arricchimento funzionale dei termini Gene Ontology - Biological Process (GO-BP) mediante la piattaforma ShinyGO v0.86.0.

Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi di espressione differenziale e dall'arricchimento funzionale, è stata successivamente effettuata un'analisi mirata dell'espressione di marcatori associati alle RGC, confrontando le popolazioni $CD90^+$ ai tempi T28 e T35. Analogamente, è stata valutata l'espressione di marcatori associati alle principali popolazioni gliali retiniche, con particolare riferimento ad astrociti e microglia. Tali marcatori sono stati analizzati nelle frazioni $CD90^+$ e $CD90^-$ di ciascun tempo di differenziamento e, successivamente, confrontati tra le popolazioni $CD90^+$

isolate ai tempi T28 e T35 per valutarne le variazioni associate alla progressione del processo differenziativo.

4. Risultati

4.1 Generazione e maturazione degli organoidi retinici a partire dalle hiPSC

L'osservazione in contrasto di fase di organoidi retinici ottenuti mediante un protocollo di differenziamento non guidato (unguided), in cui la specificazione retinica avviene prevalentemente attraverso meccanismi di auto-organizzazione cellulare in assenza di segnali esogeni diretti verso specifici destini cellulari, documenta una progressione morfologica coerente con le tappe iniziali della retinogenesi umana in vitro (Figura 8). A T4 si evidenziano microaggregati compatti con perdita della morfologia pluripotente e avvio della compattazione neuroectodermica; tra T7 e T9 gli aggregati aumentano di dimensione, presentando contorni più regolari e un'organizzazione interna più omogenea, caratteristiche compatibili con la progressiva acquisizione della polarità epiteliale. A T14 sono presenti sferoidi più coesi, caratterizzati da margini ben definiti e da una maggiore omogeneità strutturale, mentre a T21 si osservano strutture sferoidali od ovoidali chiaramente distinguibili, talvolta associate a un lieve gradiente di contrasto tra periferia e centro, compatibile con l'avvio di un'organizzazione neuroepiteliale orientata. La fase compresa tra T25 e T28 è caratterizzata da un ulteriore incremento dimensionale e dalla comparsa di una regione centrale relativamente più chiara circondata da una periferia più densa, una configurazione morfologica compatibile con la transizione verso strutture assimilabili alla vescicola ottica e alla coppa ottica precoce. A T35 si osservano molteplici sferoidi ben conservati, caratterizzati dal mantenimento della coesione strutturale e da un incremento complessivo della complessità tridimensionale. Nel complesso, la progressione morfologica osservata risulta coerente con quella descritta nei modelli di organoidi retinici derivati da hiPSC ottenuti mediante protocolli non guidati, nei quali la transizione dalla compattazione neuroectodermica alla formazione di domini neuroepiteliali organizzati culmina nella comparsa di strutture assimilabili alla coppa ottica e ricapitola le fasi precoci dello sviluppo retinico umano in vitro.

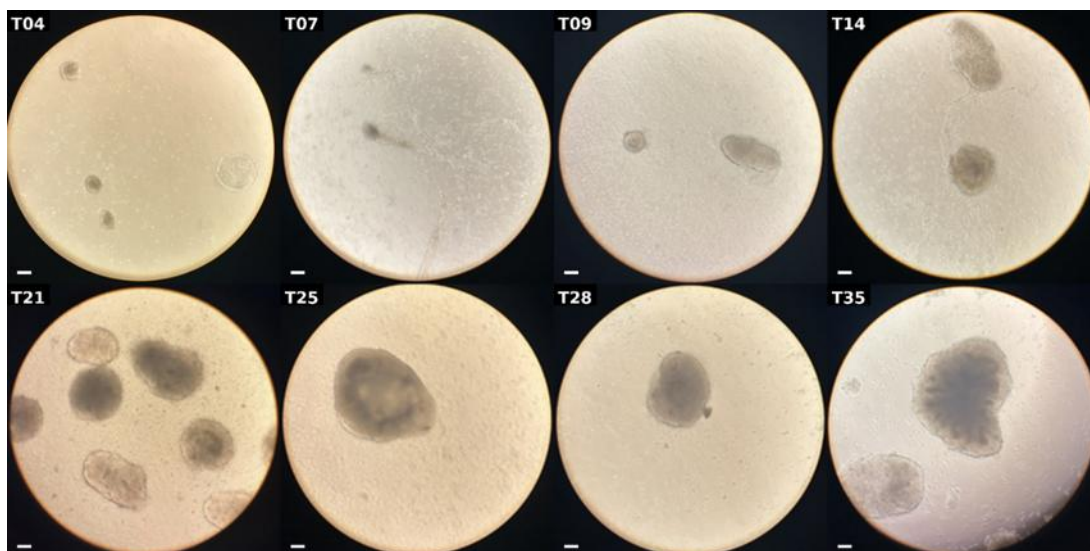


Figura 8. Morfologia degli organoidi retinici derivati da hiPSC (T04–T35). Immagini in contrasto di fase acquisite con obiettivo Phaco 10×/0.25 mostrano la progressione da micro-aggregati neuroectodermici iniziali (T04–T09) a sferoidi coesi (T14–T21), seguiti da aumento dimensionale e maggiore organizzazione interna (T25–T28) fino a strutture più mature a T35. Barra di scala: 100 μ m.

4.2 Isolamento delle sottopopolazioni CD90⁺ da organoidi retinici mediante FACS.

L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato la presenza di una distinta popolazione CD90⁺ sia a T28 sia a T35 (Figura 9). L'applicazione della strategia di gating ha permesso di identificare una frazione CD90⁺ pari a circa il 41,8% della popolazione analizzata a T28, percentuale che aumentava al 59,5% a T35. Parallelamente, l'overlay degli istogrammi di fluorescenza mostrava uno spostamento della distribuzione del segnale CD90-FITC verso valori più elevati a T35, suggerendo un incremento sia della frequenza delle cellule positive sia dell'intensità di espressione del marcatore.

Questi dati documentano un progressivo arricchimento della frazione CD90⁺ durante il differenziamento e costituiscono il presupposto per le successive analisi proteomiche finalizzate alla sua caratterizzazione molecolare.

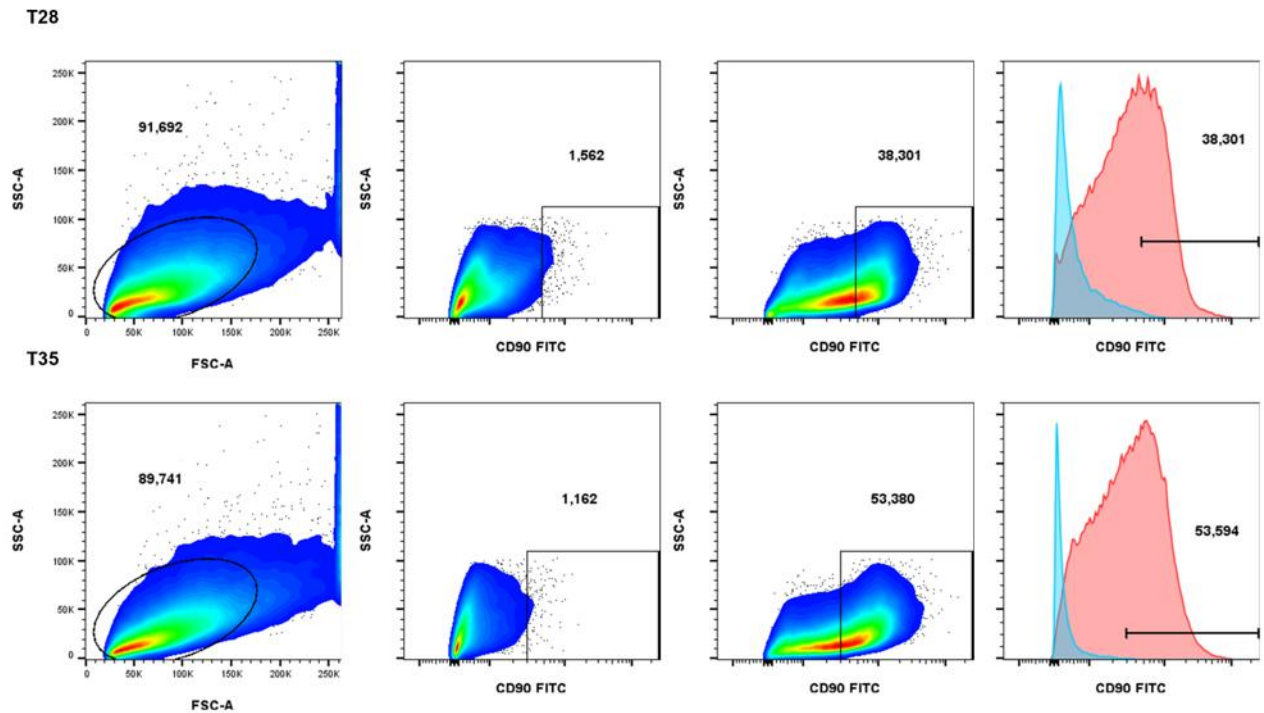


Figura 9. Identificazione della popolazione CD90⁺ in cellule derivate da organoidi retinici differenziati ai tempi T28 e T35. Rappresentazione della strategia di gating impiegata per la selezione della popolazione cellulare e l'identificazione delle cellule CD90⁺ mediante marcatura con anti-CD90-FITC. I pannelli mostrano la selezione FSC-A/SSC-A, la definizione del gate di positività mediante controllo negativo e la distribuzione del segnale di fluorescenza nei campioni analizzati.

4.3 Analisi proteomica delle popolazioni CD90⁺ e CD90⁻ post-sorting

L'analisi delle componenti principali (PCA) ha evidenziato una chiara segregazione dei campioni in funzione sia del tempo di differenziamento sia della selezione basata sull'espressione di CD90 (Figura 10A). I replicati biologici di ciascuna condizione risultano raggruppati in cluster distinti e ben separati, indicando una buona omogeneità intra-gruppo e profili proteomici differenti tra le popolazioni analizzate. Le prime due componenti principali spiegano complessivamente il 44,8% della varianza totale (PC1: 27,3%; PC2: 17,5%). In particolare, la separazione tra le frazioni CD90⁺ e CD90⁻ appare più pronunciata a T35 rispetto a T28, indicando una maggiore differenziazione dei rispettivi profili proteomici con l'avanzare del differenziamento.

Il confronto tra le frazioni CD90⁺ e CD90⁻ a T28 ha identificato 105 proteine significativamente aumentate nella popolazione CD90⁺ e 149 proteine aumentate nella popolazione CD90⁻ (Figura 10B). A T35, il numero di proteine differenzialmente espresse risulta marcatamente superiore, con 1960 proteine aumentate nella frazione

CD90⁺ e 584 aumentate nella frazione CD90⁻ (Figura 10C). Le heatmap confermano la riproducibilità dei replicati biologici all'interno di ciascun gruppo e mostrano pattern di espressione distinti tra le popolazioni CD90⁺ e CD90⁻. In particolare, a T35 si osserva un numero sostanzialmente maggiore di proteine differenzialmente espresse rispetto a T28, accompagnato da una più netta segregazione dei profili di espressione tra le due frazioni cellulari. Globalmente, i dati mostrano un aumento della divergenza proteomica tra le frazioni CD90⁺ e CD90⁻ nel corso della maturazione, particolarmente evidente a T35.

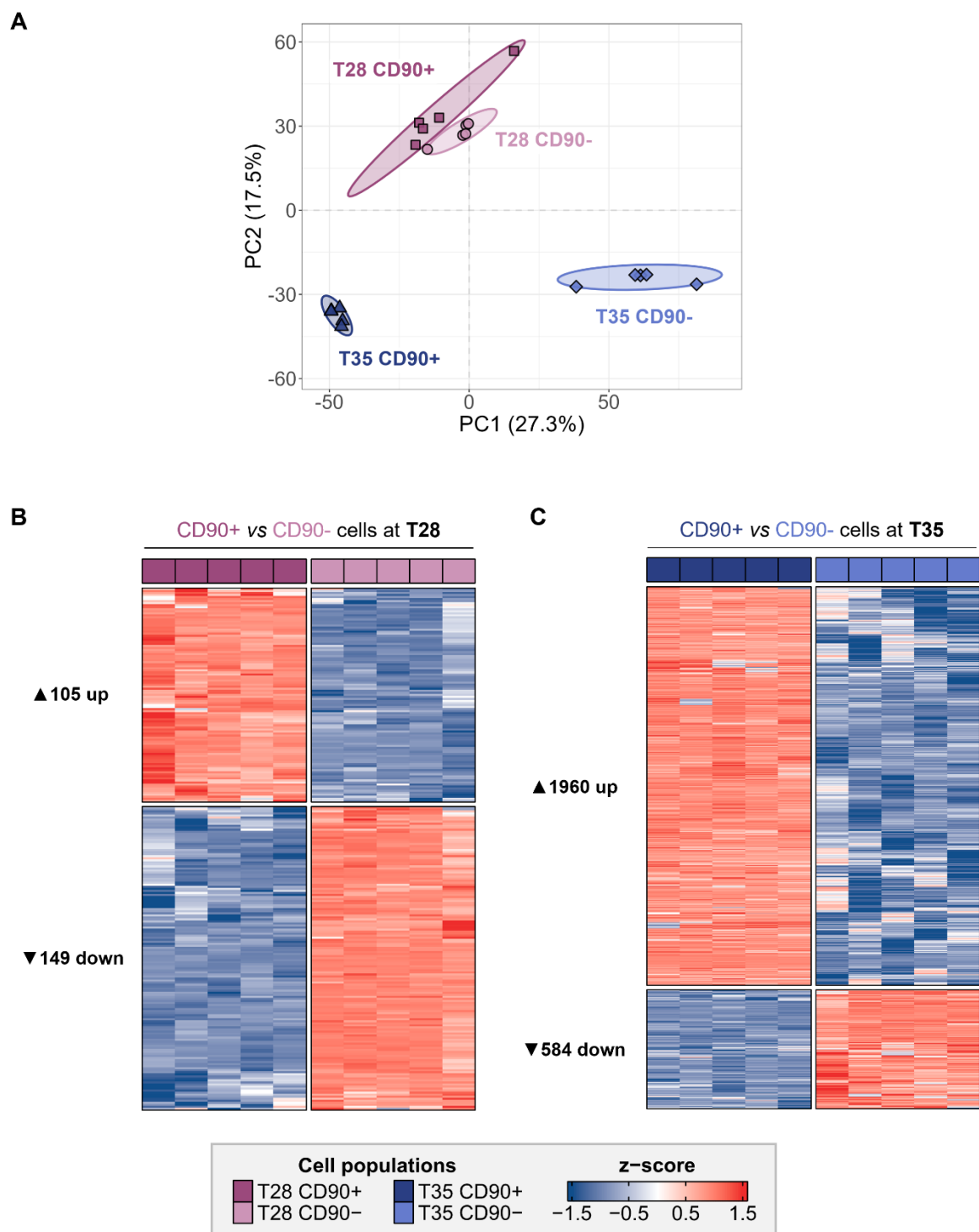


Figura 10. Analisi proteomica comparativa delle popolazioni CD90⁺ e CD90⁻ isolate da cellule derivate da organoidi retinici ai tempi T28 e T35. (A) Analisi delle componenti principali (PCA) eseguita sui dati proteomici normalizzati e log₂-trasformati. Le percentuali riportate sugli assi indicano la quota di varianza spiegata da PC1 e PC2. Ogni punto rappresenta un replicato biologico; le ellissi identificano il raggruppamento dei campioni all'interno di ciascun gruppo sperimentale. **(B-C)** Heatmap delle proteine differenzialmente espresse tra le frazioni CD90⁺ e CD90⁻ a T28 **(B)** e T35 **(C)**. I livelli di abbondanza delle proteine differenzialmente espresse sono visualizzati come z-score dell'abbondanza proteica normalizzata, dove il rosso indica livelli relativamente più elevati e il blu livelli relativamente più

bassi. Il numero di proteine significativamente aumentate o ridotte nella frazione CD90⁺ rispetto alla frazione CD90⁻ è riportato a lato di ciascuna heatmap.

Al fine di caratterizzare i cambiamenti funzionali associati alla maturazione della popolazione CD90⁺, le proteine significativamente sovraesprese nelle cellule CD90⁺ a T35 rispetto alle corrispondenti cellule CD90⁺ a T28 sono state sottoposte ad analisi di arricchimento Gene Ontology (GO) per la categoria Biological Process mediante ShinyGO. I termini significativamente arricchiti sono riportati in Figura 11, dove l'asse delle ascisse rappresenta il fold enrichment, la colorazione dei punti la significatività statistica ($-\log_{10}$ FDR) e la loro dimensione il numero di proteine associate a ciascun processo biologico. L'analisi ha evidenziato un significativo arricchimento di termini associati allo sviluppo e alla maturazione del sistema nervoso. Tra i termini maggiormente rappresentati è emersa “gliogenesis”, che presenta il più elevato fold enrichment ed è associata al maggior numero di proteine arricchite, insieme al termine “glial cell differentiation”, indicando una marcata rappresentazione di processi coinvolti nello sviluppo e nella maturazione delle componenti gliali. Risultano inoltre significativamente arricchiti processi coinvolti nello sviluppo delle proiezioni neuronali, tra cui “regulation of neuron projection development”, “axonogenesis” e “neuron projection guidance”, indicando una sovra-rappresentazione di proteine associate alla formazione, all'estensione e all'organizzazione dei prolungamenti neuronali.

Tra i termini arricchiti, “regulation of synapse organization” indica una sovra-rappresentazione di proteine coinvolte nell'assemblaggio, nel mantenimento e nel rimodellamento delle connessioni sinaptiche, suggerendo l'attivazione di programmi molecolari associati alla progressiva acquisizione di caratteristiche funzionali neuronali. Le proteine maggiormente espresse nella popolazione CD90⁺ a T35 risultano associate prevalentemente a processi di sviluppo neuroectodermico, organizzazione delle proiezioni neuronali, maturazione delle connessioni sinaptiche e differenziamento neurogliale. Nel loro insieme, questi risultati delineano una progressiva specializzazione del profilo proteomico della frazione CD90⁺ tra T28 e T35, coerente con l'avanzamento dei programmi di maturazione neuroretinica.

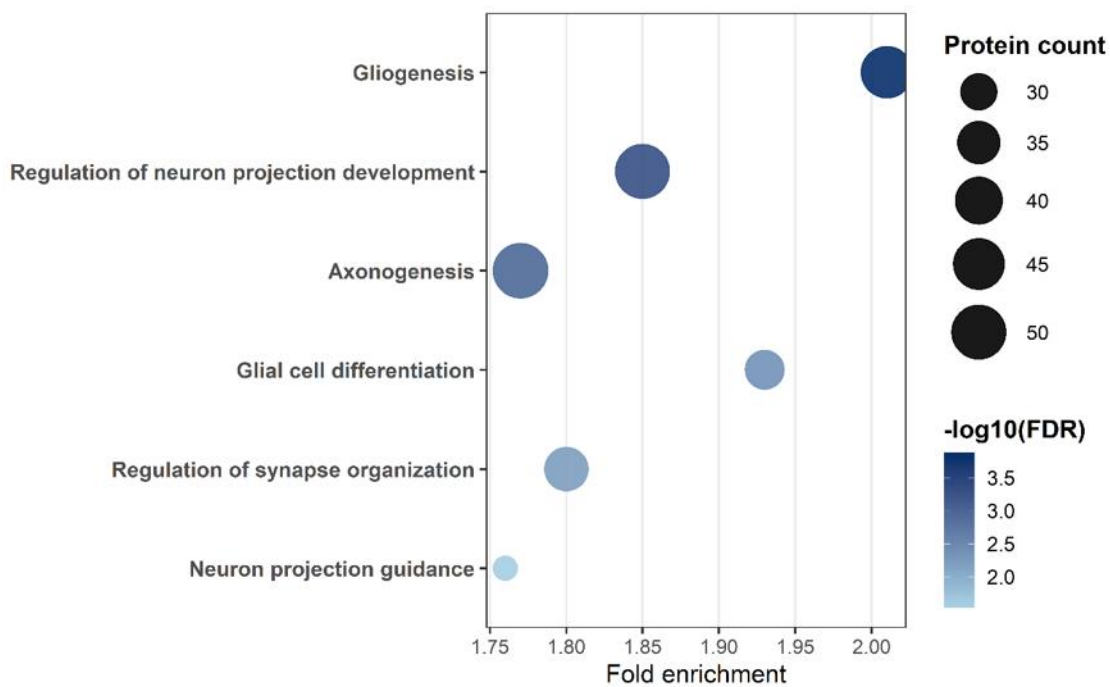


Figura 11. Analisi di arricchimento Gene Ontology (GO) dei processi biologici associati alle proteine significativamente sovraesprese nella popolazione CD90⁺ a T35 rispetto a T28. L'analisi di arricchimento è stata eseguita mediante ShinyGO utilizzando i termini della categoria Biological Process. Il dot plot riporta i termini GO significativamente arricchiti ordinati in funzione del fold enrichment. L'asse delle ascisse rappresenta il fold enrichment, definito come il rapporto tra il numero di proteine osservate e il numero di proteine attese per ciascun termine GO. La dimensione dei punti è proporzionale al numero di proteine associate a ciascun processo biologico, mentre l'intensità della colorazione riflette la significatività statistica dell'arricchimento espressa come $-\log_{10}(\text{FDR})$. I termini mostrati includono processi associati allo sviluppo neurogliale (gliogenesis, glial cell differentiation), alla formazione e organizzazione delle proiezioni neuronali (regulation of neuron projection development, axonogenesis, neuron projection guidance) e all'organizzazione delle connessioni sinaptiche (regulation of synapse organization).

4.3.1 Analisi fenotipica della popolazione CD90⁺

Considerato il progressivo arricchimento, nella popolazione CD90⁺ a T35, di processi biologici associati alla maturazione neuronale, è stata inizialmente valutata l'espressione di proteine corrispondenti a geni associati alle RGC al fine di definire più accuratamente lo stato maturativo della popolazione arricchita. A questo scopo sono stati considerati i geni identificati da Daniszewski et al. (2022) come marcatori delle RGC umane mediante analisi di single-cell RNA sequencing; i corrispondenti prodotti proteici sono stati quindi ricercati nel dataset proteomico ottenuto dalle popolazioni CD90⁺ isolate ai tempi T28 e T35.

L'analisi ha evidenziato una distribuzione differenziale dei marcatori associati alle RGC tra le due tempistiche (Figura 11). In particolare, la frazione CD90⁺ a T28 risulta caratterizzata dalla maggiore rappresentazione di proteine associate a stati relativamente precoci del programma differenziativo delle RGC, tra cui FABP7, TUBB2A, CXADR, NFIB, SEMA6A e GPC2. Al contrario, la popolazione CD90⁺ a T35 mostra una maggiore rappresentazione di marcatori compatibili con stati più avanzati di maturazione delle RGC, tra cui RBPMS, nonché di proteine coinvolte nella crescita e nell'organizzazione delle proiezioni neuronali, quali GAP43, MAP1B, DPYSL3, DPYSL4, KLC1, DYNC1LI1, INA ed EPHB3. Tra le proteine maggiormente rappresentate a T35 figurava RBPMS, insieme a diverse proteine coinvolte nella crescita assonale, nell'organizzazione del citoscheletro neuronale e nel trasporto intracellulare. Complessivamente, il confronto tra T28 e T35 evidenzia una transizione da un profilo arricchito in marcatori associati a stadi relativamente precoci della differenziazione delle RGC verso una maggiore rappresentazione di proteine riconducibili alla maturazione neuronale e ganglionare.

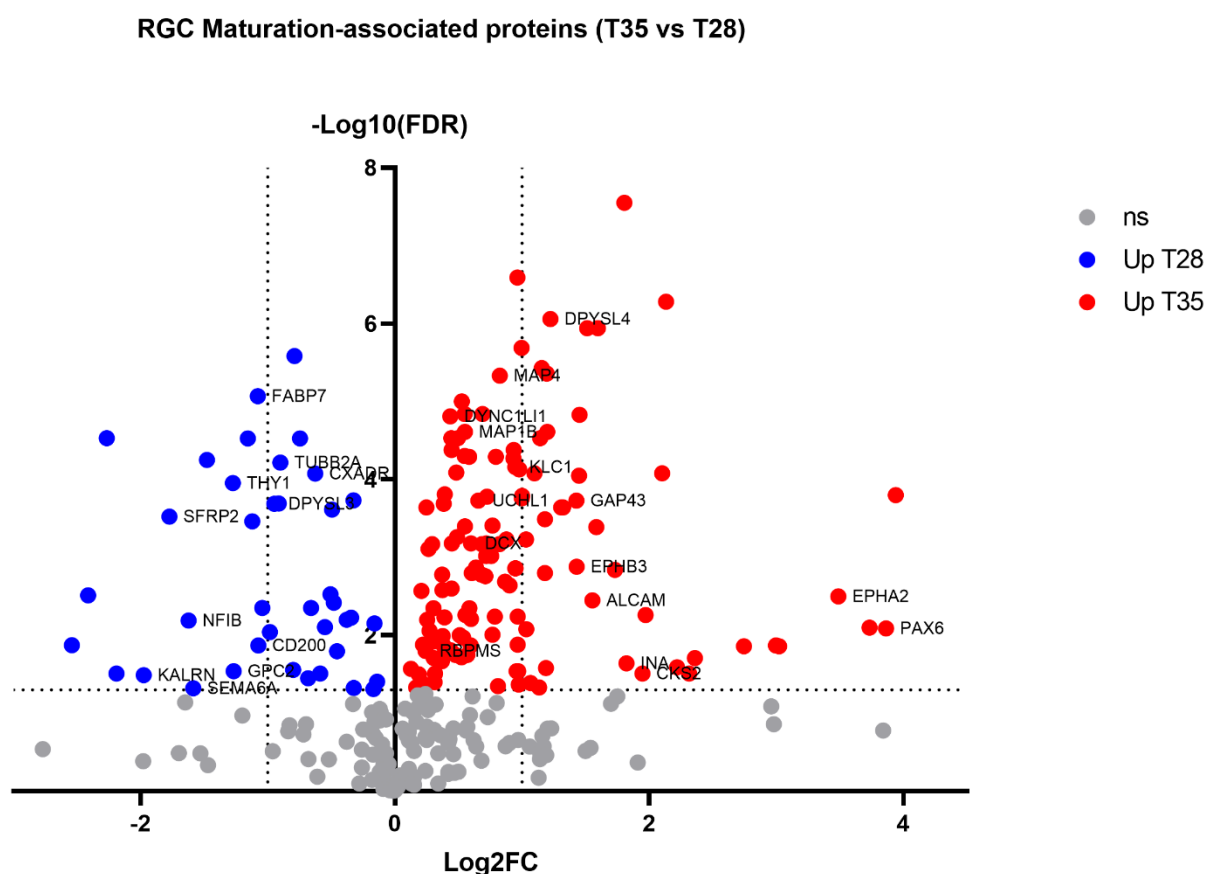


Figura 11. Analisi differenziale dei marcatori associati alle RGC tra T35 e T28. Per ciascuna proteina è riportato il valore di Log₂ Fold Change (T35 vs T28) e la relativa

significatività statistica espressa come $-\text{Log}_{10}(\text{FDR})$. Le proteine significativamente arricchite a T35 sono indicate in rosso, quelle arricchite a T28 in blu e le proteine non significative in grigio. La linea orizzontale tratteggiata rappresenta la soglia di significatività statistica ($\text{FDR} = 0,05$), mentre le linee verticali tratteggiate indicano le soglie di $\text{Log}_2\text{FC} = \pm 1$. Sono riportati i marcatori RGC più rilevanti per la valutazione dello stato maturativo della popolazione CD90^+ .

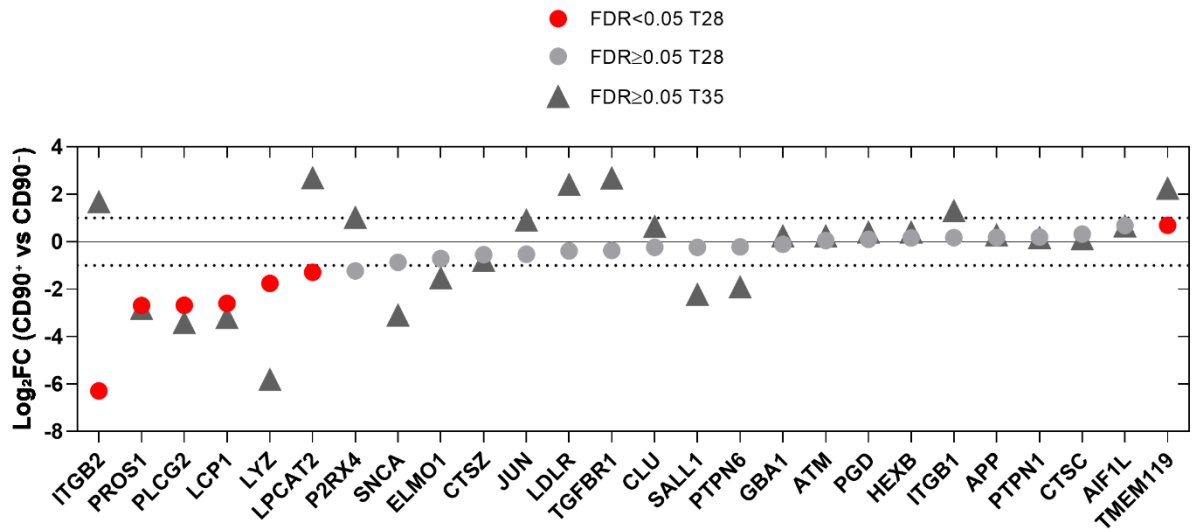
Successivamente, siccome l'analisi di arricchimento funzionale aveva evidenziato, nella frazione CD90^+ a T35, una significativa rappresentazione di processi biologici associati alla gliogenesi e al differenziamento delle cellule gliali, è stata valutata l'espressione di marcatori proteici associati a microglia e astrociti nelle frazioni CD90^+ e CD90^- ai tempi T28 e T35, per approfondire questo aspetto (Figura 12).

Per quanto riguarda i marcatori microgliali, a T28 diverse proteine, tra cui *ITGB2*, *PROS1*, *PLCG2*, *LCP1*, *LYZ* e *LPCAT2*, risultavano significativamente più abbondanti nella frazione CD90^- rispetto alla corrispondente popolazione CD90^+ . Nessuno dei marcatori analizzati mostrava invece differenze statisticamente significative tra le due frazioni a T35. Questi risultati indicano che la separazione tra le popolazioni CD90^+ e CD90^- sulla base dei marcatori microgliali è evidente a T28, ma non più rilevabile statisticamente a T35.

L'analisi dei marcatori astrocitari ha evidenziato un quadro differente rispetto a quello osservato per i marcatori microgliali. A T28 solo un numero limitato di proteine mostrava differenze statisticamente significative tra le popolazioni CD90^+ e CD90^- , mentre la maggior parte dei marcatori non risultava differenzialmente espressa tra le due frazioni. A T35, invece, aumentava il numero di marcatori statisticamente significativi tra le due popolazioni e diverse proteine risultavano più abbondanti nella frazione CD90^+ . Questi dati indicano che le differenze nell'espressione dei marcatori astrocitari tra le frazioni CD90^+ e CD90^- emergono principalmente a T35.

L'insieme dei risultati ottenuti delinea pattern differenti di espressione dei marcatori microgliali e astrocitari tra le popolazioni CD90^+ e CD90^- . Le differenze statisticamente significative per i marcatori microgliali risultano prevalenti a T28, mentre quelle relative ai marcatori astrocitari sono osservate principalmente a T35. Nel loro insieme, i dati evidenziano dinamiche temporali distinte per i marcatori microgliali e astrocitari nelle frazioni CD90^+ e CD90^- .

A. Microglia



B. Astrocytes

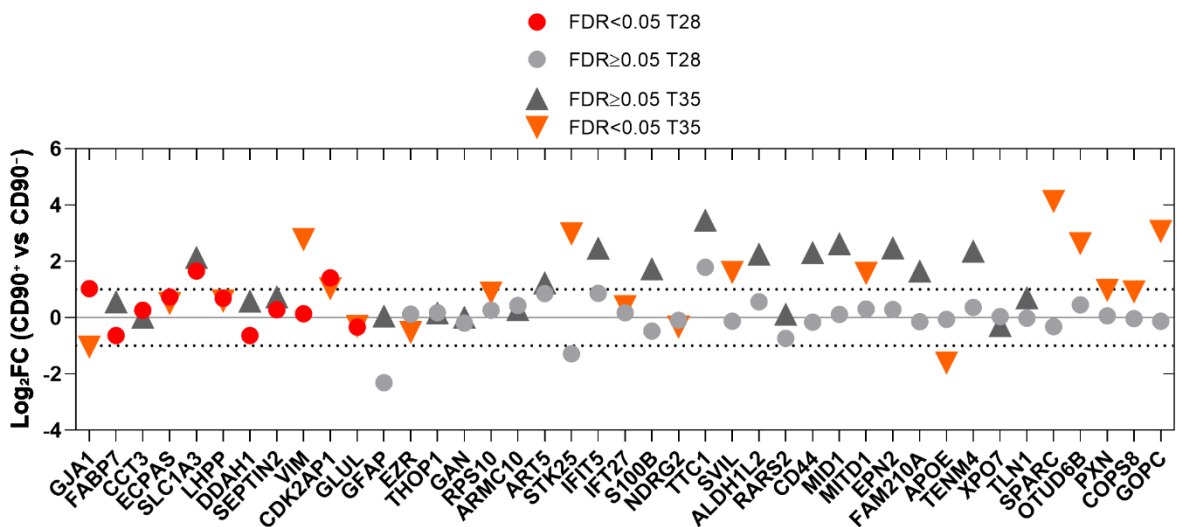
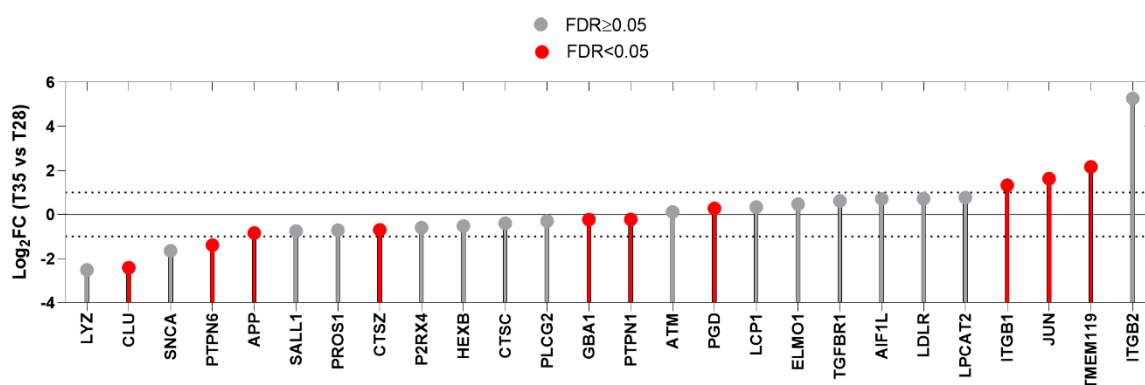


Figura 12. Confronto dell'espressione dei marcatori microgliali e astrocitari tra le frazioni CD90⁺ e CD90⁻ a T28 e T35. (A) Marcatori associati alla microglia. (B) Marcatori associati agli astrociti. Per ciascuna proteina è riportato il valore di Log₂FC calcolato come rapporto tra l'abbondanza proteica nella frazione CD90⁺ e quella nella corrispondente frazione CD90⁻ (Log₂FC CD90⁺ vs CD90⁻). I marcatori sono ordinati in base ai valori di Log₂FC osservati a T28. I cerchi rappresentano i risultati ottenuti a T28, mentre i triangoli rappresentano quelli ottenuti a T35. I punti colorati identificano le proteine significativamente differenziali tra le due frazioni (FDR < 0,05), mentre i punti grigi indicano proteine non significative (FDR ≥ 0,05) dopo correzione per confronti multipli mediante procedura di Benjamini-Hochberg. La linea orizzontale continua corrisponde a Log₂FC = 0, mentre le linee tratteggiate indicano le soglie di Log₂FC = ±1. Valori positivi indicano una maggiore abbondanza relativa nella popolazione

CD90⁺, mentre valori negativi indicano una maggiore abbondanza relativa nella popolazione CD90⁻.

In seguito, l'espressione dei marcatori microgliali e astrocitari è stata confrontata tra T35 e T28 all'interno della popolazione CD90⁺ (Figura 13). I marcatori microgliali mostravano un numero limitato di proteine significativamente modulate tra le due tempistiche, mentre i marcatori astrocitari presentavano un numero maggiore di differenze statisticamente significative. Complessivamente, il confronto temporale ha evidenziato una rimodulazione più estesa dei marcatori astrocitari rispetto a quelli microgliali all'interno della popolazione CD90⁺.

A. Microglia



B. Astrocytes

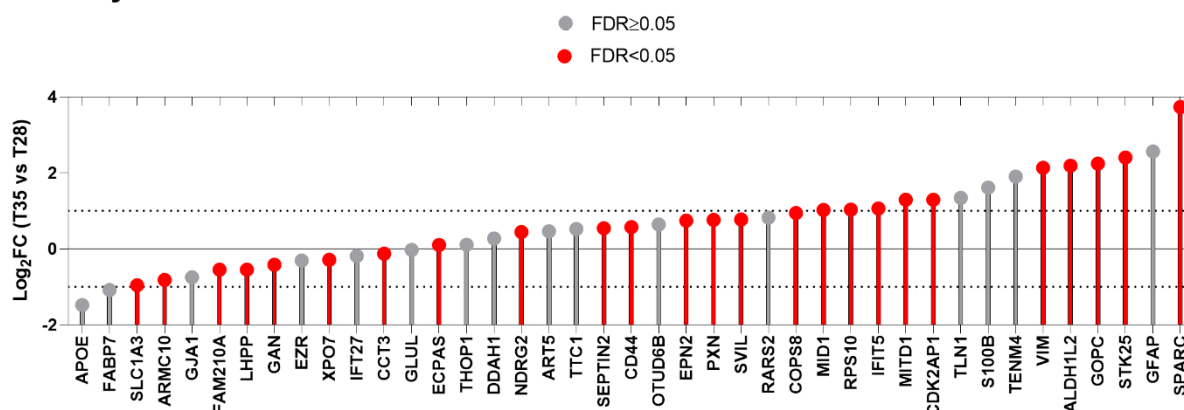


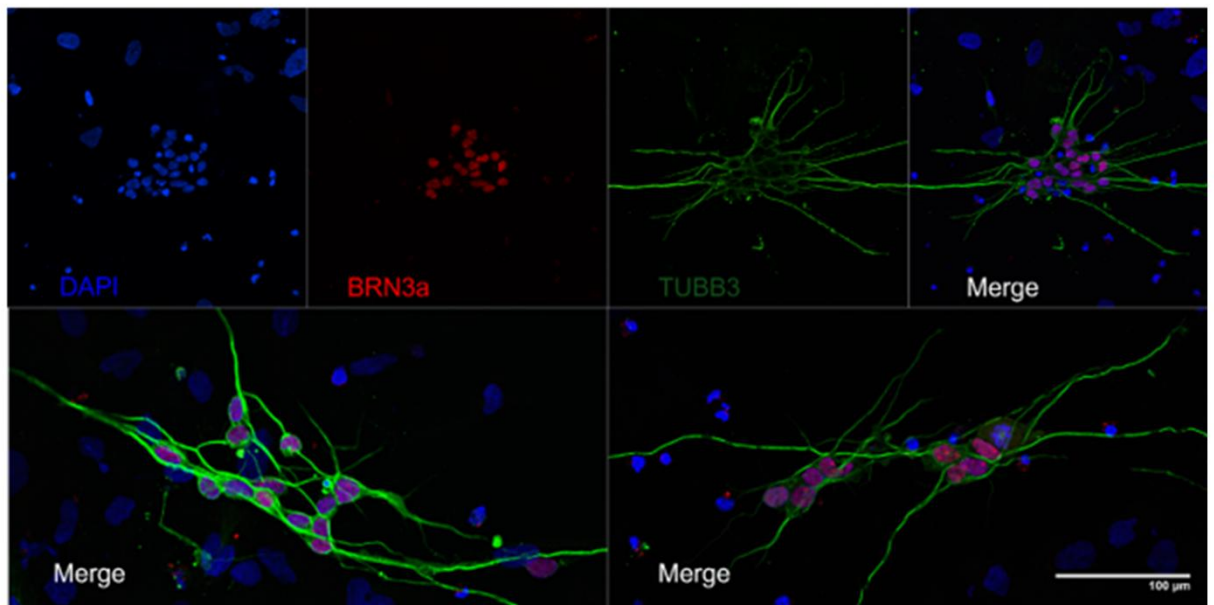
Figura 13. Analisi delle variazioni temporali dei marcatori microgliali e astrocitari nella popolazione CD90⁺. (A) Marcatori associati alla microglia. (B) Marcatori associati agli astrociti. Per ciascuna proteina è riportato il valore di Log₂FC calcolato confrontando la popolazione CD90⁺ a T35 con la corrispondente popolazione CD90⁺ a T28 [Log₂FC (T35 vs T28)]. I marcatori sono ordinati in base ai valori di Log₂FC. I punti rappresentano il valore di Log₂FC per ciascuna proteina, mentre le linee verticali ne evidenziano lo scostamento rispetto al valore

di riferimento pari a 0. I punti rossi identificano le proteine significativamente differenziali tra le due tempistiche ($FDR < 0,05$), mentre i punti grigi indicano proteine non significative ($FDR \geq 0,05$) dopo correzione per confronti multipli mediante procedura di Benjamini-Hochberg. La linea orizzontale continua indica $\text{Log}_2\text{FC} = 0$, mentre le linee tratteggiate corrispondono a $\text{Log}_2\text{FC} = \pm 1$. Valori positivi indicano una maggiore abbondanza relativa a T35 rispetto a T28, mentre valori negativi indicano una maggiore abbondanza relativa a T28 rispetto a T35.

4.4. Morfologia e profilo immunofenotipico delle cellule CD90⁺ dopo una settimana di coltura

A supporto dei risultati ottenuti mediante proteomica, la popolazione CD90⁺ è stata caratterizzata mediante immunofluorescenza confocale dopo una settimana di mantenimento in coltura (Figura 14). L'analisi è stata condotta sulla sola popolazione isolata a T35, poiché le cellule ottenute a T28 non hanno mostrato una sopravvivenza sufficiente in coltura. Le immagini hanno evidenziato cellule positive per BRN3a e TUBB3, indicative della presenza di RGCs, caratterizzate da corpi cellulari organizzati in piccoli cluster e da estesi prolungamenti neuritici immunoreattivi per TUBB3, compatibili con una morfologia neuronale differenziata. Sono state inoltre osservate cellule immunoreattive per GLAST-1 e IBA1, associate rispettivamente ad astrociti e microglia.

A.



B.

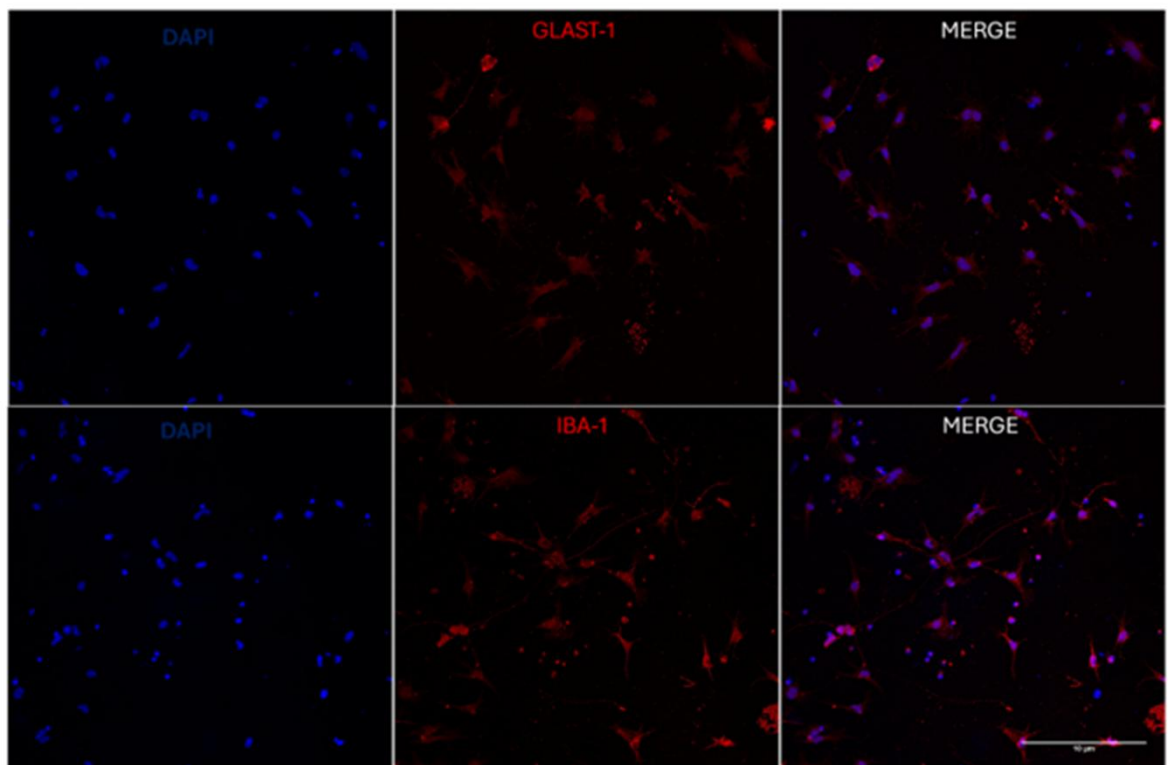


Figura 14. Caratterizzazione immunofluorescente della popolazione CD90⁺ isolata a T35 e mantenuta in coltura per una settimana. (A) Immunofluorescenza confocale per i marcatori delle RGC BRN3a (rosso) e TUBB3 (verde); i nuclei sono stati marcati con DAPI (blu). Sono mostrati i singoli canali e le immagini merge a diverso ingrandimento. **(B)** Immunofluorescenza confocale per il marcatore astrocitario GLAST-1 (rosso) e per il marcatore microgliale IBA1 (rosso); i nuclei sono stati marcati con DAPI (blu). Per ciascun marcatore sono riportati i relativi

canali singoli e le immagini merge. L'analisi è stata eseguita esclusivamente sulla popolazione CD90⁺ isolata a T35, in quanto le cellule ottenute a T28 non hanno mostrato una sopravvivenza sufficiente al mantenimento in coltura. Barre di scala: 100 μ m (A) e 10 μ m (B).

Tali osservazioni confermano la compresenza di componenti neuronali e gliali all'interno della frazione CD90⁺.

4.5 Presenza e modulazione temporale di proteine associate al POAG

Infine, data la presenza congiunta di componenti neuronali e gliali nella popolazione CD90⁺, è stata successivamente valutata l'espressione di proteine corrispondenti a disease-associated genes (DAGs) associati al glaucoma primario ad angolo aperto (POAG). A tal fine, sono stati analizzati i corrispondenti prodotti proteici identificati nel dataset proteomico e confrontati tra T28 e T35 (Figura 15). L'analisi ha evidenziato la presenza di numerosi prodotti proteici corrispondenti a DAGs associati al POAG, confermando che il modello esprime già in condizioni basali componenti molecolari rilevanti per la patologia. Tra le proteine maggiormente arricchite a T35 figuravano TAGLN, VIM, CALD1, SDHC e RBM3, mentre APOA2, APOE, FABP7 ed ENO2 mostravano livelli significativamente più elevati a T28. Il volcano plot evidenzia un'estesa rimodulazione temporale di proteine associate a geni implicati nel POAG, con un numero prevalente di target aumentati a T35 rispetto a T28.

Pur essendo stato caratterizzato in condizioni fisiologiche, il modello esprime numerose proteine corrispondenti a geni precedentemente associati al POAG e ne mostra una significativa modulazione temporale. Considerata anche la presenza di componenti neuronali e gliali all'interno della frazione CD90⁺, questi risultati supportano il potenziale impiego della tricoltura come piattaforma sperimentale per future indagini sui meccanismi coinvolti nella patogenesi del glaucoma.

5. Discussione e Conclusioni

Il presente lavoro ha consentito di ottenere organoidi retinici derivati da hiPSC mediante un protocollo di differenziamento non guidato e di caratterizzarne la progressiva maturazione attraverso approcci morfologici, proteomici e immunofenotipici. La progressione osservata nel corso del differenziamento è risultata coerente con le principali tappe dello sviluppo neuroretinico descritte nei modelli di organoidi retinici derivati da cellule staminali pluripotenti umane, culminando nella formazione di strutture organizzate e nell'espansione di una popolazione cellulare CD90⁺ progressivamente arricchita tra T28 e T35 (Harkin et al. 2024; Móvio, De Lima-Vasconcellos, et al. 2023; Capowski et al. 2018).

La caratterizzazione proteomica delle popolazioni CD90⁺ e CD90⁻ ha rivelato una crescente divergenza molecolare tra le due frazioni durante il differenziamento, più marcata a T35, suggerendo una progressiva specializzazione della popolazione CD90⁺. L'arricchimento di processi associati allo sviluppo delle proiezioni neuronali e all'organizzazione delle connessioni sinaptiche suggerisce che questa popolazione non si limita a esprimere marcatori ganglionari, ma intraprenda un vero e proprio programma di maturazione neuroretinica (Afanasyeva et al. 2021). Parallelamente, l'analisi dei marcatori derivati da studi di single-cell RNA sequencing delle RGC ha mostrato una transizione da un profilo associato a stadi differenziativi relativamente precoci verso una maggiore rappresentazione di proteine di stati maturativi più avanzati. La presenza di RBPMS, insieme all'arricchimento di proteine coinvolte nella crescita neuritica, nell'organizzazione del citoscheletro neuronale e nel trasporto intracellulare, supporta l'acquisizione di caratteristiche compatibili con una progressiva maturazione della componente ganglionare retinica, in accordo con i programmi molecolari descritti per le RGC umane da Daniszewski et al. (2022).

Un aspetto centrale emerso dallo studio riguarda la natura della popolazione selezionata mediante CD90. Sebbene questa frazione risulti chiaramente arricchita in marcatori e programmi molecolari compatibili con l'identità delle RGC, l'analisi proteomica ha evidenziato che essa non è costituita esclusivamente da cellule ganglionari retiniche. La presenza di processi associati alla gliogenesi e al differenziamento gliale, insieme a marcatori riconducibili a linee astrocitarie e

microgliali, indica una complessità biologica superiore a quella generalmente attribuita a questa strategia di arricchimento. Questi dati sono coerenti con evidenze recenti che descrivono la comparsa spontanea di cellule microglia-like durante il differenziamento di organoidi retinici e sottolineano l'interesse verso modelli multicellulari in grado di riprodurre più fedelmente la complessità cellulare del tessuto retinico umano (Harkin et al. 2025; Bartalska et al. 2022). La coesistenza di componenti neuronali e gliali è stata ulteriormente confermata mediante immunofluorescenza dopo una settimana di mantenimento in coltura: cellule BRN3a⁺/TUBB3⁺ con morfologia neuronale differenziata ed estesi prolungamenti neuritici sono state osservate insieme a cellule positive per GLAST-1 e IBA1. Questi risultati suggeriscono che le diverse componenti cellulari identificate a livello proteomico persistono dopo l'isolamento e il mantenimento in coltura, suggerendo che la frazione CD90⁺ rappresenti un sistema multicellulare relativamente stabile.

Un ulteriore elemento di rilievo è rappresentato dall'identificazione di numerose proteine corrispondenti a geni precedentemente associati al glaucoma primario ad angolo aperto (POAG). Sebbene il modello sia stato caratterizzato in condizioni fisiologiche, la presenza e la modulazione temporale di tali proteine suggeriscono che il sistema conservi caratteristiche molecolari rilevanti per lo studio della malattia. In quest'ottica, la coesistenza di componenti neuronali, astrocitarie e microgliali assume particolare interesse alla luce delle crescenti evidenze che attribuiscono alle interazioni neuro-gliali un ruolo centrale nella fisiopatologia del glaucoma (Vernazza et al. 2020).

Al di là degli aspetti biologici emersi, un aspetto critico rilevante emerso nel corso di questo lavoro è rappresentato dall'elevata variabilità intrinseca del processo di differenziamento degli organoidi retinici. Nonostante l'adozione di un protocollo definito, le diverse repliche sperimentali hanno mostrato differenze sostanziali nella tempistica e nella qualità dello sviluppo: in alcuni casi le strutture retiniche si sono formate in anticipo rispetto alle tempistiche attese, in altri in ritardo, mentre in alcune prove il differenziamento non ha portato alla comparsa di organoidi morfologicamente riconoscibili. Questa variabilità è coerente con quanto riportato in letteratura, dove la generazione di organoidi retinici da hiPSC è descritta come un processo sensibile a molteplici fattori, tra cui la linea cellulare utilizzata, il numero di passaggi, la densità di semina iniziale e le condizioni di coltura (Capowski et al. 2018; Harkin et al. 2024; Afanasyeva et al. 2021).

In particolare, sono emerse criticità legate allo stato delle hiPSC al momento dell'avvio del differenziamento. L'uso di cellule con un numero elevato di passaggi sembra essere associato a una maggiore instabilità del differenziamento e a una minore riproducibilità tra le diverse repliche, suggerendo che, per questo tipo di applicazioni, sia preferibile impiegare linee con un basso numero di passaggi (Capowski et al. 2018; Harkin et al. 2024). Anche il grado di confluenza al momento dell'induzione del differenziamento si è rivelato un parametro critico: quando le cellule venivano portate a confluenza prima dell'avvio del protocollo, si osservava frequentemente il distacco spontaneo del monolayer, probabilmente a causa di un eccessivo affollamento cellulare e di alterazioni nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. Al contrario, l'induzione del differenziamento a confluenza parziale ha consentito di ottenere monolayer più stabili e una formazione più regolare degli aggregati iniziali, in accordo con le indicazioni riportate in diversi protocolli di differenziamento non guidato (Harkin et al. 2024; Móvio et al. 2023). Questi dati sottolineano come la generazione di organoidi retinici rimanga un processo tecnicamente impegnativo e caratterizzato da una significativa variabilità batch-to-batch, che rappresenta una delle principali sfide per l'adozione di questi modelli in contesti ad alto rendimento o di screening farmacologico, dove la riproducibilità è un requisito fondamentale (Capowski et al. 2018; Afanasyeva et al. 2021).

Il lavoro presenta alcuni limiti. In primo luogo, il protocollo di differenziamento non guidato, pur consentendo la generazione di una varietà di popolazioni retiniche, non permette un controllo fine della tempistica e della proporzione delle diverse linee cellulari, rendendo difficile standardizzare la composizione degli organoidi tra diversi esperimenti. Inoltre, la caratterizzazione funzionale delle cellule CD90⁺ si è basata su approcci proteomici, morfologici e immunofenotipici, senza includere una valutazione diretta delle proprietà elettrofisiologiche delle RGC; l'implementazione di registrazioni elettrofisiologiche rappresenta uno dei prossimi passaggi previsti per i futuri differenziamenti, al fine di confermare la maturazione funzionale della componente ganglionare.

Nonostante questi limiti, i risultati ottenuti indicano che la frazione CD90⁺ rappresenta un modello promettente per lo studio delle interazioni neuro-gliali in un contesto umano. La sua composizione multicellulare suggerisce che la popolazione selezionata conservi alcuni degli elementi cellulari coinvolti nella fisiopatologia del glaucoma. Considerando

inoltre l'identificazione di numerose proteine associate al POAG, questo sistema potrebbe rappresentare una piattaforma sperimentale utile per investigare i meccanismi molecolari che regolano la comunicazione tra neuroni e glia e il loro contributo ai processi neurodegenerativi che caratterizzano la malattia.

La variabilità osservata nel differenziamento sottolinea inoltre la necessità di ottimizzare ulteriormente i protocolli, definendo criteri più stringenti per la selezione delle linee di hiPSC (ad esempio in termini di numero di passaggi e stabilità del cariotipo), per la densità di semina e per i tempi di induzione del differenziamento, al fine di migliorare la riproducibilità del modello e avvicinarlo agli standard richiesti per applicazioni di screening e di medicina personalizzata.

In conclusione, il presente studio dimostra che la selezione mediante CD90 consente l'arricchimento di una popolazione neuroretinica caratterizzata da una progressiva maturazione della componente ganglionare, ma non identifica una popolazione esclusivamente costituita da RGC. Al contrario, la frazione CD90⁺ presenta una composizione multicellulare comprendente anche componenti astrocitarie e microgliali, confermate sia a livello proteomico sia mediante caratterizzazione immunofenotipica. L'integrazione dei dati ottenuti evidenzia quindi il potenziale di questo modello come piattaforma sperimentale per lo studio dello sviluppo neuroretinico e delle interazioni neuro-gliali, nonché per future applicazioni rivolte alla comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari coinvolti nelle neuropatie ottiche e, in particolare, nel glaucoma.

Bibliografia

- A. Bouhenni, Rachida, Jeffrey Dunmire, Abby Sewell, e Deepak P. Edward. 2012. «Animal Models of Glaucoma». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/692609>.
- Afanasyeva, Tess A. V., Julio C. Corral-Serrano, Alejandro Garanto, Ronald Roepman, Michael E. Cheetham, e Rob W. J. Collin. 2021. «A Look into Retinal Organoids: Methods, Analytical Techniques, and Applications». *Cellular and Molecular Life Sciences* 78 (19–20): 6505–32. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03917-4>.
- Agarwal, Devansh, Nicholas Dash, Kevin W. Mazo, et al. 2023. «Human Retinal Ganglion Cell Neurons Generated by Synchronous BMP Inhibition and Transcription Factor Mediated Reprogramming». *Npj Regenerative Medicine* 8 (1): 55. <https://doi.org/10.1038/s41536-023-00327-x>.
- Arthur, Peggy, Laureana Muok, Aakash Nathani, et al. 2022. «Bioengineering Human Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Organoids and Optic Vesicle-Containing Brain Organoids for Ocular Diseases». *Cells* 11 (21): 3429. <https://doi.org/10.3390/cells11213429>.
- Ashworth, Kristen E., Jessica Weisbrod, e Brian G. Ballios. 2024. «Inherited Retinal Diseases and Retinal Organoids as Preclinical Cell Models for Inherited Retinal Disease Research». *Genes* 15 (6): 705. <https://doi.org/10.3390/genes15060705>.
- Baakdhah, Tahani W., e Jeremy M. Sivak. 2025. «In Vitro Retinal Ganglion Cell Differentiation and Enrichment under the Scope: Do Subtypes Matter?» *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 13: 1750142. <https://doi.org/10.3389/fcell.2025.1750142>.
- Baakdhah, Tahani W., e Jeremy M. Sivak. 2026. «In Vitro retinal ganglion cell differentiation and enrichment under the scope: do subtypes matter?» *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 13 (febbraio): 1750142. <https://doi.org/10.3389/fcell.2025.1750142>.
- Barres, Barbara A., Bruce E. Silverstein, David P. Corey, e Linda L. Y. Chun. 1988. «Immunological, Morphological, and Electrophysiological Variation among Retinal Ganglion Cells Purified by Panning». *Neuron* 1 (9): 791–803. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90127-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90127-4).
- Bartalska, Katarina, Verena Hübschmann, Medina Korkut-Demirbaş, et al. 2022. «A Systematic Characterization of Microglia-like Cell Occurrence during Retinal Organoid Differentiation». *iScience* 25 (7): 104580. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104580>.
- Bellapianta, Alessandro, Ana Cetkovic, Matthias Bolz, e Ahmad Salti. 2022. «Retinal Organoids and Retinal Prostheses: An Overview». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (6): 2922. <https://doi.org/10.3390/ijms23062922>.

- Capowski, Elizabeth E., Kayvan Samimi, Steven J. Mayerl, et al. 2018. «Reproducibility and Staging of 3D Human Retinal Organoids across Multiple Pluripotent Stem Cell Lines». *Development*, gennaio 1, dev.171686. <https://doi.org/10.1242/dev.171686>.
- Cerneckis, Jonas, Hongxia Cai, e Yanhong Shi. 2024. «Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): Molecular Mechanisms of Induction and Applications». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9 (1): 112. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01809-0>.
- Chamling, Xitiz, Valentin M. Sluch, e Donald J. Zack. 2016. «The Potential of Human Stem Cells for the Study and Treatment of Glaucoma». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57 (5): ORSFi1. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18590>.
- Chintalapudi, Sumana R., Need N. Patel, Zachary K. Goldsmith, et al. 2017. «Isolation of Primary Murine Retinal Ganglion Cells (RGCs) by Flow Cytometry». *Journal of Visualized Experiments*, fasc. 125 (luglio): 55785. <https://doi.org/10.3791/55785>.
- Daniszewski, Maciej, Anne Senabouth, Helena H. Liang, et al. 2022. «Retinal Ganglion Cell-Specific Genetic Regulation in Primary Open-Angle Glaucoma». *Cell Genomics* 2 (6): 100142. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100142>.
- Eiraku, Mototsugu, Nozomu Takata, Hiroki Ishibashi, et al. 2011. «Self-Organizing Optic-Cup Morphogenesis in Three-Dimensional Culture». *Nature* 472 (7341): 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature09941>.
- Harkin, Jade, Cátia Gomes, Kaylee D. Tutrow, et al. 2025. «A Human Pluripotent Stem Cell Tri-Culture Platform to Elucidate Microglial Regulation of Retinal Ganglion Cells in Neuroinflammation». 2025.07.01.662573. Preprint, bioRxiv: The Preprint Server for Biology, luglio 4. <https://doi.org/10.1101/2025.07.01.662573>.
- Harkin, Jade, Kiersten H. Peña, Cátia Gomes, et al. 2024. «A Highly Reproducible and Efficient Method for Retinal Organoid Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 121 (25): e2317285121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2317285121>.
- Huang, Kang-Chieh, Mohamed Tawfik, e Melanie A. Samuel. 2024. «Retinal Ganglion Cell Circuits and Glial Interactions in Humans and Mice». *Trends in Neurosciences* 47 (12): 994–1013. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2024.09.010>.
- Kim, Ungsoo Samuel, Omar A. Mahroo, John D. Mollon, e Patrick Yu-Wai-Man. 2021. «Retinal Ganglion Cells—Diversity of Cell Types and Clinical Relevance». *Frontiers in Neurology* 12 (maggio): 661938. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.661938>.
- Kobayashi, Wataru, Akishi Onishi, Hung-Ya Tu, et al. 2018. «Culture Systems of Dissociated Mouse and Human Pluripotent Stem Cell–Derived Retinal Ganglion Cells Purified by Two-Step Immunopanning». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59 (2): 776. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22406>.
- McMonnies, Charles W. 2017. «Glaucoma History and Risk Factors». *Journal of Optometry* 10 (2): 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.optom.2016.02.003>.

- Móvio, Marília Inês, Théo Henrique De Lima-Vasconcellos, Gabrieli Bovi Dos Santos, et al. 2023. «Retinal Organoids from Human-Induced Pluripotent Stem Cells: From Studying Retinal Dystrophies to Early Diagnosis of Alzheimer's and Parkinson's Disease». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 144 (luglio): 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2022.09.011>.
- Móvio, Marília Inês, Théo Henrique de Lima-Vasconcellos, Gabrieli Bovi Dos Santos, et al. 2023. «Retinal Organoids from Human-Induced Pluripotent Stem Cells: From Studying Retinal Dystrophies to Early Diagnosis of Alzheimer's and Parkinson's Disease». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 144 (luglio): 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2022.09.011>.
- Rabesandratana, Oriane, Antoine Chaffiol, Antoine Mialot, et al. 2020. «Generation of a Transplantable Population of Human iPSC-Derived Retinal Ganglion Cells». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (ottobre): 585675. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.585675>.
- Raymond, Iona D., Alejandro Vila, Uyen-Chi N. Huynh, e Nicholas C. Brecha. 2008. «Cyan Fluorescent Protein Expression in Ganglion and Amacrine Cells in a Thy1-CFP Transgenic Mouse Retina». *Molecular Vision* 14 (agosto): 1559–74.
- Rege, Tanya A., e James S. Hagood. 2006. «Thy-1 as a Regulator of Cell-cell and Cell-matrix Interactions in Axon Regeneration, Apoptosis, Adhesion, Migration, Cancer, and Fibrosis». *The FASEB Journal* 20 (8): 1045–54. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5460rev>.
- Reichman, Sacha, Angélique Terray, Amélie Slembrouck, et al. 2014. «From Confluent Human iPS Cells to Self-Forming Neural Retina and Retinal Pigmented Epithelium». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (23): 8518–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324212111>.
- Riordan, Sean M., Afnan M. Aladdad, Kiran J. McLoughlin, e Karl E. Kador. 2023. «Purification of Retinal Ganglion Cells from Differentiation Through Adult via Immunopanning and Low-Pressure Flow Cytometry». *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 2708: 11–24. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3409-7_2.
- Slembrouck-Brec, Amélie, Céline Nanteau, José-Alain Sahel, Olivier Goureau, e Sacha Reichman. 2018. «Defined Xeno-Free and Feeder-Free Culture Conditions for the Generation of Human iPSC-Derived Retinal Cell Models». *Journal of Visualized Experiments*, fasc. 139 (settembre): 57795. <https://doi.org/10.3791/57795>.
- Spirig, Stefan Erich, e Magdalena Renner. 2024. «Toward Retinal Organoids in High-Throughput». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 14 (3): a041275. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041275>.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, et al. 2007. «Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors». *Cell* 131 (5): 861–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.

- Takahashi, Kazutoshi, e Shinya Yamanaka. 2006. «Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors». *Cell* 126 (4): 663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Tapia, Mary L., Gabriel Nascimento-dos-Santos, e Kevin K. Park. 2022. «Subtype-specific survival and regeneration of retinal ganglion cells in response to injury». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 (agosto): 956279. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.956279>.
- Tapia, Mary L., Gabriel Nascimento-Dos-Santos, e Kevin K. Park. 2022. «Subtype-Specific Survival and Regeneration of Retinal Ganglion Cells in Response to Injury». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 956279. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.956279>.
- Vernazza, Stefania, Francesco Oddone, Sara Tirendi, e Anna Maria Bassi. 2021. «Risk Factors for Retinal Ganglion Cell Distress in Glaucoma and Neuroprotective Potential Intervention». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (15): 7994. <https://doi.org/10.3390/ijms22157994>.
- Vernazza, Stefania, Sara Tirendi, Anna Maria Bassi, Carlo Enrico Traverso, e Sergio Claudio Saccà. 2020. «Neuroinflammation in Primary Open-Angle Glaucoma». *Journal of Clinical Medicine* 9 (10): 3172. <https://doi.org/10.3390/jcm9103172>.
- Vielle, Anne, Yuna K. Park, Conner Secora, e M. Natalia Vergara. 2021. «Organoids for the Study of Retinal Development and Developmental Abnormalities». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15 (maggio): 667880. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.667880>.
- Vogel, Christine, e Edward M. Marcotte. 2012. «Insights into the Regulation of Protein Abundance from Proteomic and Transcriptomic Analyses». *Nature Reviews Genetics* 13 (4): 227–32. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>.
- Wong, Nonthaphat Kent, Shea Ping Yip, e Chien-Ling Huang. 2023. «Establishing Functional Retina in a Dish: Progress and Promises of Induced Pluripotent Stem Cell-Based Retinal Neuron Differentiation». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (17): 13652. <https://doi.org/10.3390/ijms241713652>.
- Wu, Fuguo, Jonathan E. Bard, Julien Kann, et al. 2021. «Single Cell Transcriptomics Reveals Lineage Trajectory of Retinal Ganglion Cells in Wild-Type and Atoh7-Null Retinas». *Nature Communications* 12 (1): 1465. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21704-4>.
- Zhong, Xiufeng, Christian Gutierrez, Tian Xue, et al. 2014. «Generation of Three-Dimensional Retinal Tissue with Functional Photoreceptors from Human iPSCs». *Nature Communications* 5 (1): 4047. <https://doi.org/10.1038/ncomms5047>.

La conclusione di questo lavoro rappresenta un'occasione per esprimere la mia gratitudine alle persone che hanno contribuito a questo percorso.

Desidero ringraziare profondamente la Prof.ssa Stefania Vernazza per la guida, il supporto e le indicazioni fornite durante il percorso di tesi e la stesura di questo elaborato.

Un sincero ringraziamento alla Prof.ssa Nitti per aver accettato di affiancare questo lavoro in qualità di correlatrice e per la professionalità dimostrata.

Un ringraziamento particolare alla Dott.ssa Sara Tirendi per avermi affiancata durante il tirocinio, per il tempo dedicatomi, la pazienza e la disponibilità dimostrate che mi hanno permesso di acquisire nuove conoscenze e sviluppare una maggiore autonomia nel lavoro di laboratorio.