Laureando: Marco Cristani

Numero di matricola: 328430

Titolo della Tesi: "SARS-CoV-2 e disturbi neurologici: studio sperimentale su sistemi cellulari"

Relatore: Prof. Roberto Ferrari

Correlatori: Prof.ssa Laura Calzà, Dott. Vito Antonio Baldassarro

Ente esterno: Fondazione IRET – Tecnopolo di Bologna-Ozzano "Rita Levi Montalcini"

Durante l'attività di tirocinio (6 CFU) e il laboratorio di ricerca in preparazione alla prova finale (25 CFU), svolti presso i laboratori della Fondazione IRET, ho seguito progetti nell'ambito della Biologia Cellulare con successive analisi della morfologia cellulare tramite immunofluorescenza ed espressione genica tramite qPCR.

Durante l'anno di Tesi ho avuto modo di lavorare con quattro colture cellulari primarie diverse: la coltura pura di hBMEC (*Human Brain Microvascular Endothelial Cells*), e le colture primarie di origine murina di cellule staminali neurali, di OPC (*Oligodendrocyte Precursor Cells*) e di neuroni/astrociti corticali. Le cellule staminali neurali, da cui è derivata anche la coltura di OPC, e la coltura di neuroni/astrociti sono state ottenute, rispettivamente, tramite isolamento del prosencefalo e delle cortecce cerebrali di embrioni di topo a 13.5 giorni di gestazione.

Per valutare gli effetti dei peptidi strutturali principali di SARS-CoV-2 su questi diversi *lineage* cellulari, tutte e quattro le colture sono state trattate con il *PepTivator*, un pool di peptidi specifico di tre proteine strutturali del coronavirus, rispettivamente la glicoproteina transmembrana Spike, la glicoproteina di membrana e la proteina del nucleocapside.

Successivamente al trattamento, sono seguiti esperimenti di immunofluorescenza indiretta e, per analizzare la positività delle cellule a specifici marcatori di interesse, è stata eseguita l'analisi tramite HCS (*cell-based High Content Screening*). Inoltre, per valutare la morfologia delle BMEC e degli astrociti è stato utilizzato il *software* ImageJ.

Al fine di analizzare l'espressione di determinati geni delle hBMEC, dei neuroni e degli astrociti corticali, è stato estratto l'RNA totale, è stata eseguita la retrotrascrizione e la *Real Time* qPCR. Per la quantificazione relativa dell'amplificato è stato considerato come gene *housekeeping* la GAPDH ed è stato utilizzato il metodo di semi-quantificazione basato sulla formula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Infine, per le analisi statistiche e per la preparazione dei grafici è stato utilizzato il *software* GraphPad Prism.