PROGETTO per ASSEGNO di RICERCA

**Studio della relazione tra la proteina di fusione OPA1, la composizione lipidica della membrana mitocondriale e il mantenimento dei nucleoidi di mtDNA**

**Introduzione**

Il genoma mitocondriale (mtDNA) è una molecola circolare a doppio filamento localizzata nella matrice mitocondriale, dove è presente in un numero elevato di copie (da centinaia a migliaia di copie di mtDNA), organizzato in complessi nucleoproteici chiamati nucleidi, che si pensa siano ancorati al lato interno della membrana mitocondriale interna (IMM)1. Negli ultimi 30 anni, un numero crescente di mutazioni del mtDNA è stato associato a malattie mitocondriali e il meccanismo patologico spesso implica il mantenimento difettoso del mtDNA con deplezione/delezione del genoma mitocondriale2. Il benessere cellulare, infatti, è collegato ad una adeguata quantità e distribuzione delle molecole di mtDNA attraverso la rete articolata e dinamica degli organelli mitocondriali, che subiscono cicli costanti di fusione e fissione, bilanciando mitobiogenesi e mitofagia per mantenere l'omeostasi3,4. OPA1 è una GTPasi localizzata nello spazio intermembranico mitocondriale (IMS), ancorata alla membrana mitocondriale interna (IMM). OPA1 ha un ruolo cruciale nella fusione dell’IMM5 e, insieme con le mitofusine (MFN1 e MFN2) e DRP1, coinvolti rispettivamente nella fusione e nella fissione della membrana mitocondriale esterna (OMM), coordina con precisione la dinamica della rete mitocondriale in risposta alle richieste energetiche della cellula. Mutazioni che influenzano il gene OPA1 sono associati all'atrofia ottica dominante (DOA), una neuropatia ottica ereditaria caratterizzata dalla degenerazione selettiva e progressiva delle cellule gangliari della retina e del nervo ottico che porta alla perdita bilaterale della visione centrale. Ad oggi sono state identificate più di 200 mutazioni, posizionate nell’intera lunghezza del gene, tra le quali circa il 50% genera una proteina tronca inducendo aploinsufficienza, mentre le rimanenti sono mutazioni missenso che esercitano un effetto dominante negativo. In particolare, un gruppo di mutazioni missenso localizzate nel dominio GTPasico di OPA1 sono state associate alla più grave sindrome multisistemica “DOA plus”. Abbiamo descritto questo fenotipo nel 2008, scoprendo che questi pazienti accumulano delezioni multiple di mtDNA nei tessuti post-mitotici, collegando quindi per la prima volta OPA1 con la terapia di mantenimento del mtDNA. Inoltre, è ora noto che OPA1 è anche coinvolto il molte altre funzioni, come l'organizzazione della struttura *cristae*, l’assemblaggio di supercomplessi della catena respiratoria (RCS) e l’efficienza energetica e, infine, la regolazione dell'apoptosi attraverso la compartimentazione del citocromo solubile c all'interno delle *cristae*7.

**Risultati preliminari e scopo del progetto**

Abbiamo recentemente studiato il ruolo svolto dalle 8 isoforme di OPA1 derivate da splicing alternativo8, ed evidenziato come quelle contenenti l’esone 4b potrebbero essere direttamente coinvolte nel mantenimento del mtDNA e nell’ancoraggio dei nucleoidi nella IMM9.Lo scopo principale del progetto sarà quello di chiarire in che modo meccanicamente la proteina di fusione mitocondriale OPA1, la composizione dei fosfolipidi di membrana mitocondriale e il mtDNA interagiscono per regolare il numero di copie del mtDNA, la replicazione e la segregazione dei nuclei di mtDNA ancorati alla membrana.

La prima parte del progetto avrà come obbiettivo quello di chiarire il ruolo dell'OPA1 nella manutenzione del mtDNA, verificando se questa GTPasi ha un ruolo attivo nella regolazione della replica del mtDNA e/o se fa parte dell’ancoraggio meccanico dei nucleidi all'IMM. Verranno utilizzati fibroblasti derivati da pazienti, i precursori neuronali (NPC) differenziati dalle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) derivate da pazienti, ed il modello delle MEF OPA1-/- esprimente l’isoforma 1 mutata, recentemente pubblicato dal nostro gruppo10. Verrà analizzata l'efficienza della replicazione dei nucleodi nei vari modelli cellulari, in condizioni normali e dopo il trattamento con aphidicolin, un inibitore della replicazione del DNA. Valuteremo anche la quantità del mtDNA totale ed il suo tasso di replicazione inducendo la deplezione con incubazione con etidio bromuro (EtBr) e monitorando il tasso di ripopolamento del mtDNA dopo rimozione dell’intercalante. Inoltre, verranno eseguiti esperimenti di co-immunoprecipitazione di OPA1 con i componenti proteici del replisoma, in condizioni normali e dopo l'inibizione della replicazione (afidicolina). Per verificare l’impatto di OPA1 sull'architettura dei nucleidi, evidenziandone l’eventuale ruolo strutturale, studieremo il profilo dei nucleoidi dopo la risoluzione su gradiente di iodixanolo. Considerando che l'attività GTPase è stata dimostrata essenziale per le funzioni OPA111 e che la presenza limitata di precursori per la sintesi del DNA è associata all'instabilità del mtDNA12, quantificheremo il contenuto di mtDNA e i livelli di dNTP mitocondriale. Questi esperimenti saranno condotti in cellule quiescenti, poiché in queste condizioni la sintesi citosolica de novo di dNTPs è inibita, e i nucleotidi per la replicazione del mtDNA sono forniti esclusivamente dalla via di salvataggio mitocondriale. Nel caso in cui i nostri modelli cellulari mostrino una diminuizione del pool di dNTPs mitocondriali, gli esperimenti di deplezione-ripopolamento con etidio bromuro verranno ripetuti, aggiungendo al terreno di coltura deossinucleosidi per migliorare il fenotipo difettoso di bassa velocità di replicazione.

Considerando il ruolo chiave esercitato dalla cardiolipina nella fusione mitocondriale attraverso le interazioni OPA113, il secondo obbiettivo del progetto sarà quello di studiare la composizione lipidica delle membrane mitocondriali nel contesto dei nostri modelli cellulari e nelle diverse condizioni metaboliche. In particolare, il profilo delle cardiolipine IMM, di altre classi di

glicerofosfolipidi mitocondriali e del coenzima Q saranno quantificati in modelli di cellule OPA1 nulle e mutanti. La caratterizzazione delle membrane cellulari e la quantificazione dei lipidi verranno effettuate grazie alla collaborazione con il laboratorio dell’ Università of Bari “Aldo Moro” (Prof. Ilario Losito). Come controparte, studieremo su come si riflette la perturbazione della composizione lipidica sulle funzioni mitocondriali dopo il silenziamento/sovraespressione degli enzimi chiave della sintesi dei lipidi, con focus sulle funzioni OPA1 e sul mantenimento del mtDNA.

Infine, la tecnologia di editing del genoma CRISPR/Cas9 verrà applicata alle iPSC umane per creare una linea cellulare OPA1 KO e ri-esprimeremo ciascuna delle singole isoforme, come precedentemente fatto8, e differenziate in neuroni. Questa strategia consentirà di comprendere appieno la multifunzionalità di OPA1 nel controllo dell'omeostasi mitocondriale e del mantenimento del mtDNA nei neuroni, le cellule target della malattia.

Il progetto sarà svolto preminentemente presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e NeuroMotorie (DIBINEM) dell'Università di Bologna, sotto la supervisione del Prof. Valerio Carelli.

***Referenze***

1. Lee SR, Han J (2017) Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxid Med Cell Longev*. doi: 10.1155/2017/8060949.
2. Wallace DC. Mitochondrial genetic medicine (2018) *Nat Genet.* doi: 10.1038/s41588-018-0264-z.
3. Friedman and Nunnari (2014) Mitochondrial form and function. *Nature.* doi: 10.1038/nature12985.
4. Chan (2012) Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. *Annu. Rev. Genet.* doi:10.1146/annurev-genet-110410-132529
5. Olichon A, et al. (2003) Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*. 278(10):7743
6. Amati-Bonneau et al. (2008) OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. Brain
7. Del Dotto V, et al. (2018) OPA1: How much do we know to approach therapy? *Pharmacol Res*. doi:10.1016/j.phrs.2018.02.018.
8. Del Dotto V, et al. (2017). OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. *Cell Rep*. doi: 10.1016/j.celrep.2017.05.073.
9. Elachouri et al. (2011) OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res.* doi: 10.1101/gr.108696.110
10. Del Dotto V, et al. (2018) Deciphering OPA1 mutations pathogenicity by combined analysis of human, mouse and yeast cell models. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.08.004.
11. Ban T, et al. (2010) OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum Mol Genet*. doi:10.1093/hmg/ddq088.
12. Spinazzola A,et al. (2002) Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem*. 277(6):4128-33.
13. Ban T, et Al (2017) Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat Cell Biol*. doi:10.1038/ncb3560.

**Piano formativo dell’assegnista**

In relazione al progetto di ricerca il piano di formazione permetterà all’assegnista di acquisire conoscenze tecniche e scientifiche in un ambito multidisciplinare che comprende la genetica, la biochimica, la biologia molecolare e la biologia cellulare.

Specificamente il piano di formazione prevede che il candidato perfezioni tecniche già apprese e acquisisca esperienze riguardanti principalmente:

* analisi di espressione genica via estrazione dell’ RNA messaggero, la trascrizione inversa a cDNA
* quantificazione del DNA mitocondriale tramite Real-Time PCR
* analisi della morfologia mitocondriale e immunofluorescenza mediante microscopio a fluorescenza e confocale, analisi di immagini
* coimmunoprecipitazione per la valutazione dell’interazione tra le proteine coinvolte nella repliazione del mtDNA ed nel sistema fusione-fissione mitocondriale
* tecniche biochimiche per la valutazione della funzionalità mitocondriale (potenziale di membrana, consumo di ossigeno, sintesi ATP)
* colture cellulari, trasfezioni con vettori plasmidici ed infezioni con vettori lentivirali
* analisi dell’espressione della proteina tramite la tecnica del western blot
* analisi dei complessi e supercomplessi della OXPHOS mediante Blue-Native Page
* preparazione di frazioni mitocondriali mediante centrifugazione differenziale
* tecniche di biologia molecolare per l’espressione di proteine mutate
* analisi dei ROS mediante spettrometria di massa