

BUDGET INTEGRATO 2021 – SCHEDA RICHIESTA ASSEGNO COFINANZIATO

Il richiedente **Valentina Giorgio**

valutazione VRA 2019: **X NO** SI

I richiedenti che sono stati sottoposti a VRA 2019 dovranno inserire MAX 4 PUBBLICAZIONI per il biennio 2019-2020 nello schema “Scheda pubblicazioni”.

*I richiedenti che **non sono mai stati sottoposti a VRA** dovranno inserire MAX 12 PUBBLICAZIONI per gli anni 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020 nello schema “Scheda pubblicazioni”.*

X Nuovo

rinnovo dott. _____ in scadenza il _____

- durata **12** mesi
- titolo del progetto di ricerca **“La proteina inibitrice IF1 di ATP sintasi lega un nuovo sito dell’enzima e promuove la tumorigenesi: rimozione dell’interazione proteica come strategia anti-cancro”**
- attività assistenziale **X NO** SI’ (indicare l’azienda di riferimento)
- costo totale lordo previsto (**26500 euro lordo ente** o 21576,99 lordo percipiente)
- finanziamento a disposizione del tutor (quota minima pari a 6 mensilità/anno) **14606,00 euro** su fondi **AIRC_20316_GIORGIO_2021 (PI - Dott.ssa Giorgio)**
- cofinanziamento richiesto (si ricorda che il consiglio ha deliberato di cofinanziare massimo 6 mensilità ad importo minimo) **€ 11894,00** pari a **n. 5,3 mensilità**
- Commissione proposta (3 commissari esperti della materia + 1 supplente)

Alessandra Baracca, Gianluca Sgarbi, Valentina Giorgio, supplente Vitaliano Tugnoli

SCHEMA PUBBLICAZIONI

- Pubblicazioni del proponente, che provvederà a fornire sotto sua responsabilità la classificazione

N.	Estremi bibliografici completi	Categoria ISI (JCR/TR)	Impact Factor	Rank ISI JCR 2019 (comunque la più recente al momento chiusura domanda) ovvero Q1, Q2, Q3, Q4	Punti (a cura della Commissione)
1.	Rossi A, Rigotto G, Valente G, Giorgio V, Basso E, Filadi R, Pizzo P (2020) Defective Mitochondrial Pyruvate Flux Affects Cell Bioenergetics in Alzheimer's Disease-Related Models, Cell Rep 30(7):2332-2348.	CELL BIOLOGY -- SCIE	8.109	Q1	
2.	Urbani A, Giorgio V, Carrer A, Franchin C, Arrigoni G, Jiko C, Abe K, Maeda S, Shinzawa-Itoh K, Bogers JFM, McMillan DGG, Gerle C, Szabò I, Bernardi P (2019) Purified F-ATP synthase forms a Ca ²⁺ -dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore, Nat Commun 10(1):4341.	MULTIDISCIPLINARY SCIENCES -- SCIE	12.121	Q1	
3	Giorgio V, Fogolari F, Lippe G, Bernardi P (2019) OSCP subunit of mitochondrial ATP synthase: Role in regulation of enzyme function and of its transition to a pore, Br J Pharmacol 176:4247-4257.	PHARMACOLOGY & PHARMACY -- SCIE	7.73	Q1	
4	De Col V, Petrusa E, Casolo V, Braidot E, Lippe G, Filippi A, Peresson C, Patui S, Bertolini A, Giorgio V, Checchetto V, Vianello A, Bernardi P and Zancani M (2018) Properties of the Permeability Transition of Pea Stem Mitochondria, Frontiers in Physiology 9:1626.	PHYSIOLOGY -- SCIE	3.367	Q1	
5	Carraro M, Checchetto V, Sartori G, Kucharczyk R, di Rago JP, Minervini G, Franchin C, Arrigoni G, Giorgio V, Petronilli V, Tosatto SCE, Lippe G, Szabó I, Bernardi P (2018) High-Conductance Channel Formation in	PHYSIOLOGY -- SCIE	5.5	Q1	

	Yeast Mitochondria is Mediated by F-ATP Synthase e and g Subunits, Cell Physiol Biochem 50(5):1840-1855.				
6	Biosa A, Arduini I, Soriano ME, Giorgio V, Bernardi P, Bisaglia M, Bubacco L (2018) Dopamine Oxidation Products as Mitochondrial Endotoxins, a Potential Molecular Mechanism for Preferential Neurodegeneration in Parkinson's Disease, ACS Chem Neurosci 9(11): 2849–2858.	CHEMISTRY, MEDICINAL -- SCIE	4.486	Q1	
7	Antonieli M, Jones K, Antonucci S, Spolaore B, Fogolari F, Petronilli V, Giorgio V, Carraro M, Di Lisa F, Forte M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P (2017) The unique histidine in OSCP subunit of F-ATP synthase mediates inhibition of the permeability transition pore by acidic pH, EMBO REP 19(2): 257-268.	BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY -- SCIE	7.497	Q1	
8	Giorgio V*, Burchell V, Schiavone M, Bassot C, Minervini G, Petronilli V, Argenton F, Forte M, Tosatto S, Lippe G, Bernardi P (2017) Ca(2+) binding to F-ATP synthase β subunit triggers the mitochondrial permeability transition, EMBO REP 18: 1065-1076 (* corresponding).	BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY -- SCIE	7.497	Q1	
9	Zanon A, Kalvakuri S, Rakovic A, Foco L, Guida M, Schwienbacher C, Serafin A, Rudolph F, Trilck M, Grünwald A, Stanslowsky N, Wegner F, Giorgio V, Lavdas AA, Bodmer R, Pramstaller PP, Klein C, Hicks AA, Pichler I, Seibler P (2017) SLP-2 interacts with Parkin in mitochondria and prevents mitochondrial dysfunction in Parkin-deficient human iPSC-derived neurons and Drosophila, HUM MOL GENET 26 (13): 2412-2425.	BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY -- SCIE	5.101	Q1	
10	Zulian A, Schiavone M, Giorgio V, Bernardi P (2016) Forty years later: Mitochondria as therapeutic targets in muscle diseases, PHARMACOL RES 113: 563-573.	PHARMACOLOGY & PHARMACY -- SCIE	5.893	Q1	
11	Granatiero V, Giorgio V, Cali T, Patron M, Brini M, Bernardi M, Tiranti V, Zeviani M, Pallafacchina G, De Stefani D and Rizzuto R (2015) Reduced mitochondrial Ca ²⁺ transients	BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY -- SCIE	10.717	Q1	

	stimulate autophagy in human fibroblasts carrying the 13514A>G mutation of the ND5 subunit of NADH dehydrogenase, Cell Death and Differentiation 23: 231-41.				
12	Kaludercic N, Giorgio V* (2016) The Dual Function of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Bioenergetics and Cell Death: The Role of ATP Synthase, OXID MED CELL LONGEV 2016: 3869610 (* corresponding).	CELL BIOLOGY -- SCIE	5.076	Q2	

ALLEGATI

- Programma di ricerca
- Programma di formazione dell'Assegnista

COSTO ASSEGNI RICERCA 2021

	LORDO 1 MESE	LORDO 6 MESI	LORDO 12 MESI
Importo minimo L.240/2010	1.982,23	11.894	23.787
Importo massimo	2.678,87	16.073	32.147

PROGRAMMA DI RICERCA (Dott.ssa Valentina Giorgio)

“La proteina inibitrice IF1 di ATP sintasi lega un nuovo sito dell’enzima e promuove la tumorigenesi: rimozione dell’interazione proteica come strategia anti-cancro”

Stato dell’arte

La parziale soppressione della fosforilazione ossidativa ed un incrementato utilizzo della glicolisi in condizioni di disponibilità di ossigeno sono caratteristiche tipiche di cellule tumorali ad alta capacità proliferativa, che promuovono il cosiddetto metabolismo *Warburg*.

In carcinomi umani sono stati osservati due meccanismi che promuovono il suddetto adattamento metabolico attraverso la modulazione dell’enzima ATP sintasi: (i) la riduzione dell’espressione della subunità catalitica β e (ii) l’aumento di espressione della proteina inibitrice IF1, che è coinvolta nell’inibizione dell’attività catalitica dell’enzima.

L’ATP sintasi mitocondriale è un complesso multi-subunità di 600 kDa, organizzato in un dominio catalitico (F1) ed una porzione di membrana (Fo), connessi da un rotore ed uno statore. L’enzima è localizzato sulla membrana mitocondriale interna dove catalizza la sintesi di ATP, sfruttando il potenziale di membrana generato dalla catena respiratoria. L’enzima in alcune condizioni specifiche come l’anossia o l’assenza di potenziale di membrana può idrolizzare ATP (catalisi inversa), anziché sintetizzarlo. Nelle condizioni in cui avviene idrolisi di ATP, l’ATP sintasi sostiene il potenziale di membrana utilizzando ATP glicolitico¹. IF1 è l’inibitore endogeno di ATP sintasi che lega l’enzima durante l’idrolisi di ATP, limitando la dissipazione di ATP cellulare^{2,3}. In alcuni tumori in cui avviene la fosforilazione ossidativa è stato proposto un possibile ruolo di IF1 nell’inibire la sintesi di ATP, ma questa ipotesi è oggetto di un acceso dibattito in letteratura^{2,4,5}.

La subunità OSCP (oligomycin sensitive conferring protein) dell’ATP sintasi è cruciale nella connessione del dominio catalitico F1 con lo statore, assicurando l’accoppiamento funzionale dell’enzima, ed è soggetta a numerose modificazioni post-traduzionali ed interazioni con modulatori proteici. Ad esempio sono riportate evidenze sull’acetilazione del residuo Lys 139 (de-acetilato dal legame della sirtuina SIRT3 con OSCP) e sulla protonazione del residuo His 135 (sensore del pH di matrice)⁶. Inoltre è riportato in letteratura il legame della subunità OSCP con p53⁷, noto oncosoppressore, mettendo in luce un possibile coinvolgimento della subunità OSCP nella tumorigenesi.

L’inibitore IF1 lega il dominio catalitico F1 di ATP sintasi durante l’idrolisi di ATP, in un meccanismo che è largamente caratterizzato ed è massimizzato a basso pH², condizione che può caratterizzare sia tessuti ischemici che tumorali. La proteina inibitrice matura è formata da 84 amminoacidi, e la sua porzione N-terminale è indispensabile per le proprietà inibitorie (contatta le subunità α , β e γ di F1). La sua porzione C-terminale è invece coinvolta nella formazione del dimero dell’inibitore. Il resveratrolo, che è un composto polifenolico naturale di origine vegetale, inibisce ATP sintasi interagendo con le stesse subunità di F1 coinvolte nell’interazione con IF1⁸. Diversi interattori di IF1 ne regolano la sua attività. IEX-1 (immediate early response gene X-1), lega e degrada IF1 in cellule di mammifero⁹. HIF-1 α può regolare i livelli di IF1 aumentandone l’espressione¹⁰. E’ stato inoltre proposto un meccanismo di fosforilazione del residuo di Ser 39 sulla proteina IF1 umana ad opera della PKA¹¹. IF1 è sovraespresso in tumori umani come il glioma, il tumore al colon, al polmone ed al seno¹².

Modelli *in vivo* e *in vitro*, in cui l’espressione di IF1 è inibita o stimolata, mostrano che questo inibitore ha una marcata influenza sugli eventi di tumorigenesi. Un meccanismo proposto, ancorchè molto dibattuto nella comunità scientifica, suggerisce un ruolo di IF1 nell’inibizione della fosforilazione ossidativa¹³, tuttavia il legame di IF1 al sito catalitico di ATP sintasi è stato

dimostrato solo in condizioni di mitocondri de-energizzati (potenziale di membrana assente e attività ATP idrolitica dell'ATP sintasi). Su questa base e considerando studi pubblicati dal gruppo di ricerca della Prof. Baracca che indicano che IF1 modula positivamente la fosforilazione ossidativa, suggeriamo la presenza di un nuovo sito alternativo (non ancora identificato) sull'enzima ATP sintasi che possa ospitare l'interazione con IF1 in mitocondri in cui sia attiva la sintesi di ATP. Coerentemente con questa ipotesi e molto interessante per gli studi sui tumori, esistono evidenze *in vitro* di una possibile interazione di IF1 con la subunità OSCP¹⁴.

Il poro di transizione mitocondriale (PTP) è un canale della membrana interna del mitocondrio di cui il complesso ATP sintasi è stato proposto il principale costituente molecolare¹⁵. Questo mega-canale, la cui apertura è indotta da aumento della concentrazione di Ca²⁺ mitocondriale e da stress ossidativo, induce la morte cellulare. Esso è regolato dalla ciclofilina (CyP) D che ne facilita l'apertura, mentre risulta inibito dalla ciclosporina (Cs) A¹⁶. È stato dimostrato che la subunità OSCP sia il sito di legame regolatorio della CyPD, che riduce la soglia di Ca²⁺ in grado di attivare il PTP. OSCP inoltre è anche il sito di legame per la benzodiazepina (Bz) 423, una molecola farmacologica che induce l'apoptosi e compete con la CyPD per il sito di legame su OSCP¹⁵. Da queste evidenze si evince che OSCP è una subunità cruciale per ospitare il legame di diversi effettori i cui segnali possono agire sull'ATP sintasi e sull'apertura del PTP.

In tale contesto l'ipotesi di lavoro proposta in questo progetto è quella che un nuovo sito di legame per l'inibitore IF1 sulla subunità OSCP possa inibire l'apertura del PTP e conferire resistenza all'apoptosi in cellule tumorali.

Fasi del Progetto di Ricerca

Il progetto sarà suddiviso nelle seguenti **fasi**: (1) identificazione del nuovo sito di legame di IF1 sull'enzima ATP sintasi, (2) studio degli effetti di IF1 sulla modulazione del PTP e la crescita delle cellule tumorali, (3) caratterizzazione di molecole o peptidi disegnati in modo specifico che siano in grado di spiazzare IF1 dal sito di legame sull'ATP sintasi e promuovere la morte cellulare in modelli tumorali.

Fase 1- Identificazione del nuovo sito di legame di IF1 sull'enzima ATP sintasi in cellule tumorali

Questa fase del progetto si basa sulle evidenze sperimentali pubblicate da Zanotti et al., 2004¹⁴, secondo cui IF1 interagisce con la subunità OSCP attraverso un meccanismo pH-indipendente, e quindi diverso dal noto meccanismo di legame di IF1 con il dominio catalitico F1 dell'ATP sintasi, durante l'idrolisi di ATP².

Al fine di studiare la possibilità che IF1 possa interagire con la subunità OSCP in cellule tumorali, che esprimono alti livelli di IF1, valuteremo questa interazione in mitocondri isolati dal modello cellulare derivato da cancro alla cervice HeLa. Tale preparazione di mitocondri verrà incubata in una soluzione contenente i substrati necessari alla sintesi mitocondriale di ATP, a pH 7.4, con l'aggiunta di una molecola che stabilizzi le interazioni, il 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). I mitocondri saranno soggetti successivamente ad immunoprecipitazione dell'enzima ATP sintasi o della subunità OSCP solamente. Gli interattori dell'enzima e della subunità OSCP verranno identificati attraverso esperimenti di Western blotting degli immunoprecipitati. I complessi contenenti l'inibitore IF1 e le subunità coinvolte nell'interazione con l'inibitore verranno così identificati. Le bande identificate attraverso Western blotting, perché contenenti IF1 e le subunità coinvolte nell'interazione, verranno inoltre processate per analisi di spettrometria di massa per confermare le regioni coinvolte nell'interazione.

Per confermare l'interazione tra IF1 e la subunità OSCP e meglio definire i residui amminoacidici coinvolti nell'interazione verranno inoltre utilizzate diverse molecole o peptidi specifici per trattare i mitocondri da cellule HeLa. Tali trattamenti saranno seguiti da immunoprecipitazione e analisi Western blotting come descritto precedentemente. Sarà usato per tale trattamento il resveratrolo, noto inibitore polifenolico che inibisce ATP sintasi interagendo nel sito catalitico F1 dell'enzima, come dimostrato da studi cristallografici⁸. L'eventuale presenza di IF1 nel sito catalitico durante il trattamento, potrebbe competere con il legame di questo composto. L'utilizzo del resveratrolo risulta di particolare interesse perché potrà chiarire il dibattito esistente in letteratura sul fatto che IF1 possa essere legato al sito catalitico F1 esclusivamente durante idrolisi di ATP e non, come recentemente proposto, durante la sua sintesi. Inoltre il resveratrolo potrebbe essere interessante per un altro possibile effetto nel promuovere l'apertura del PTP. Questa ipotesi si basa sull'evidenza sperimentale che il legame dello ione Ca^{2+} al sito catalitico di ATP sintasi si ripercuota sull'apertura del poro con effetti sulla morte cellulare¹⁷. Non si può escludere a priori che il resveratrolo, analogamente allo ione Ca^{2+} , possa modulare il PTP attraverso il suo legame al sito F1 dell'enzima. Data la presenza dei siti di legame di Bz423¹⁸ e CyPD^{15,19} a livello della subunità OSCP, verranno usati per le incubazioni dei mitocondri da HeLa anche Bz423 e CsA, per studiarne una possibile competizione con l'inibitore IF1, nel caso la subunità OSCP sia coinvolta nel nuovo sito di legame con IF1.

Da studi bioinformatici abbiamo identificato due regioni sulla subunità OSCP, esposte in matrice, che potrebbero rappresentare potenzialmente il sito di legame per IF1. Sono state disegnate sequenze amminoacidiche specifiche per queste regioni di OSCP e le rispettive sull'inibitore IF1, e tali peptidi sono disponibili per ulteriori studi di competizione sull'interazione di IF1 con OSCP. Anche in questi esperimenti i mitocondri verranno sottoposti ad incubazione in una soluzione che favorisca la sintesi di ATP e verranno processati per studi di immunoprecipitazione, Western blotting e spettrometria di massa. Gli studi di questa fase sperimentale sono finalizzati a definire le regioni coinvolte nel sito di legame per la proteina inibitrice IF1 ed a definire molecole/peptidi in grado di competere per il nuovo sito di legame in cellule tumorali. **La fase 1 è finalizzata ad (i) identificare il nuovo sito di legame a cui si lega IF1 in modelli tumorali, (ii) caratterizzare molecole farmacologiche o peptidi in grado di competere con IF1 per il suo sito di legame, che siano quindi potenzialmente interessanti per una terapia anti-cancro.**

Fase 2 – Studio dell'effetto di IF1 sulla modulazione del PTP e sulla capacità di crescita tumorale

Il ruolo dell'inibitore IF1 di ATP sintasi nella modulazione del PTP come meccanismo di controllo sulla crescita tumorale non è mai stato caratterizzato. Per approfondire questo aspetto in questa fase del Progetto di Ricerca verranno usate diverse strategie. Una di esse prevede l'utilizzo di costrutti per silenziare (RNA interference) o annullare (delezione genica attraverso CRISPR/CAS9) l'espressione dell'inibitore IF1 nel modello cellulare HeLa. Altri modelli cellulari provenienti da tessuti tumorali umani e murini quali colon, fegato e seno saranno testati per il loro contenuto della proteina inibitrice. I suddetti modelli cellulari verranno studiati, unitamente ai loro controlli, per identificarne la soglia di resistenza all'apertura del PTP in diverse condizioni fisiologiche come la sintesi o l'idrolisi di ATP, attraverso saggi di Ca^{2+} retention capacity e swelling. Nel caso in cui anche nei modelli tumorali di colon, fegato e seno siano identificati alti livelli di IF1, anche in queste linee cellulari verrà deletato il gene codificante IF1, per validare gli effetti dell'inibitore sulla modulazione del PTP in modelli tumorali di origine diversa dalle HeLa. Le cellule HeLa esprimenti o meno la proteina IF1 saranno inoltre studiate a confronto per la respirazione mitocondriale e la capacità di crescita tumorale in *soft*

agar. La fase 2 è finalizzata ad (i) identificare il meccanismo attraverso cui IF1 promuove lo sviluppo del tumore, (ii) valutare se il silenziamento o l'assenza di IF1 abbiano effetti sulla modulazione del PTP e/o la crescita tumorale *in vitro*.

Fase 3- Identificazione di molecole/peptidi in grado di spiazzare IF1 e promuovere l'apoptosi

Le molecole/peptidi identificate nella fase 1 per la loro efficacia nel competere per il sito di legame per IF1 e nel prevenire il legame della proteina inibitrice al nuovo sito di legame pH-indipendente sull'ATP sintasi, verranno studiate per valutarne l'effetto pro-apoptotico in cellule tumorali. Per identificare le dosi non tossiche di queste molecole, verranno come prima cosa testate diverse concentrazioni delle stesse in cellule non tumorali, fibroblasti cutanei umani provenienti da donatori sani e fibroblasti murini MEF. Saggi di vitalità cellulare e di respirazione mitocondriale su cellule *in situ* (seahorse, Agilent), in assenza o presenza di dosi crescenti del trattamento, permetteranno di identificare le soglie di tossicità delle molecole oggetto di questa fase di studio.

Le molecole selezionate saranno poi studiate alle concentrazioni non tossiche per il loro effetto pro-apoptotico nei modelli cellulari derivati da tumori alla cervice, al colon, al fegato ed al seno, attraverso studi di mortalità cellulare al citofluorimetro (colorazione con *annexin-V*). Verranno inoltre utilizzate le suddette molecole alle concentrazioni non tossiche in studi di crescita tumorale *in vitro* su *soft agar*, per validare l'efficacia dei trattamenti. Infine verranno valutati gli effetti sulla modulazione del PTP, possibile meccanismo primario responsabile dell'apoptosi. **La fase 3 è finalizzata ad identificare quelle molecole che, essendo in grado di competere con IF1 per il nuovo sito di legame, abbiano efficacia pro-apoptotica in cellule tumorali senza risultare tossiche per le cellule non-tumorali.**

Bibliografia

1. Walker, J. E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1–16 (2013).
2. Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. How the regulatory protein, IF1, inhibits F1-ATPase from bovine mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 15671–15676 (2007).
3. Sgarbi, G., Barbato, S., Costanzini, A., Solaini, G., Baracca, A. The role of the ATPase inhibitor factor 1 (IF1) in cancer cells adaptation to hypoxia and anoxia. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1859**, 99–109 (2018).
4. Solaini, G., Sgarbi, G., Baracca, A. The F1Fo-ATPase inhibitor, IF1, is a critical regulator of energy metabolism in cancer cells. *Biochemical Society Transactions* **49**, 815–827 (2021).
5. Formentini, L. *et al.* In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *EMBO J.* **33**, 762–778 (2014).
6. Yang, W. *et al.* Mitochondrial Sirtuin Network Reveals Dynamic SIRT3-Dependent Deacetylation in Response to Membrane Depolarization. *Cell* **167**, 985–1000.e21 (2016).
7. Bergeaud, M. *et al.* Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F1Fo-ATP synthase. *Cell Cycle* **12**, 2781–2793 (2013).
8. Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 13632–13637 (2007).
9. Shen, L., Zhi, L., Hu, W. & Wu, M. X. IEX-1 targets mitochondrial F1Fo-ATPase

- inhibitor for degradation. *Cell Death Differ.* **16**, 603–612 (2009).
10. Huang, L.J., Chuang, I.C., Dong, H.P. & Yang, R.C. Hypoxia-inducible factor 1 α regulates the expression of the mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in rat liver. *Shock* **36**, 90–6 (2011).
 11. García-Bermúdez, J. *et al.* PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H⁺-ATP Synthase. *Cell Rep.* **12**, 2143–2155 (2015).
 12. Sánchez-Aragó, M. *et al.* Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis* **2**, e46 (2013).
 13. Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L. & Cuezva, J. M. C. The Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response. *Mol. Cell* **45**, 731–742 (2012).
 14. Zanotti, F., Raho, G., Gaballo, A. & Papa, S. Inhibitory and Anchoring Domains in the ATPase Inhibitor Protein IF 1 of Bovine Heart Mitochondrial ATP Synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**, 447–457 (2004).
 15. Giorgio, V. *et al.* Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 5887–92 (2013).
 16. Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M. & Lippe, G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **95**, 1111–1155 (2015).
 17. Giorgio, V., Burchell, V., Schiavone, M., Bassot, C., Minervini, G., *et al.* Ca²⁺ binding to F-ATP synthase β subunit triggers the mitochondrial permeability transition. *EMBO Rep.* **18**, 1065-1076 (2017).
 18. Johnson, K. M. *et al.* Identification and validation of the mitochondrial F1F₀-ATPase as the molecular target of the immunomodulatory benzodiazepine Bz-423. *Chem. Biol.* **12**, 485–496 (2005).
 19. Antoniel, M. *et al.* The Oligomycin-Sensitivity Conferring Protein of Mitochondrial ATP Synthase: Emerging New Roles in Mitochondrial Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 7513–75

Programma di Attività dell'Assegnista

Programma di Ricerca (Dott.ssa Valentina Giorgio)

“La proteina inibitrice IF1 di ATP sintasi lega un nuovo sito dell'enzima e promuove la tumorigenesi: rimozione dell'interazione proteica come strategia anti-cancro”

L'attività dell'Assegnista sarà articolata all'interno delle tre fasi del Progetto come descritto:

Fase 1- Identificazione del nuovo sito di legame di IF1 sull'enzima ATP sintasi in cellule tumorali

Al fine di studiare la possibilità che IF1 possa interagire con la subunità OSCP (oligomycin sensitive conferring protein) dell'ATP sintasi, evidenze sperimentali pubblicate da Zanotti et al., 2004¹ e mai confermate successivamente in letteratura, l'Assegnista di Ricerca analizzerà l'esistenza e caratterizzerà il legame proteina-proteina dell'inibitore IF1 dell'ATP sintasi con OSCP durante la sintesi mitocondriale di ATP in cellule tumorali che esprimono alti livelli di IF1. Questa interazione sarà valutata in mitocondri isolati dal modello cellulare derivato da cancro alla cervice uterina, HeLa. Tale preparazione di mitocondri verrà incubata in una soluzione contenente i substrati necessari alla sintesi mitocondriale di ATP, a pH 7.4, con l'aggiunta di una molecola che stabilizzi le interazioni, il 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). I mitocondri saranno soggetti successivamente ad immunoprecipitazione dell'enzima ATP sintasi o della subunità OSCP solamente. Gli interattori dell'enzima e della subunità OSCP verranno identificati attraverso esperimenti di Western blotting su immunoprecipitati. I complessi contenenti l'inibitore IF1 e le subunità coinvolte nell'interazione con l'inibitore verranno così identificati. Le bande identificate attraverso Western blotting, perché contenenti IF1 e le subunità coinvolte nell'interazione, verranno inoltre processate per analisi di spettrometria di massa per confermare le regioni proteiche interessate.

Per confermare l'interazione tra IF1 e la subunità OSCP e meglio definire i residui amminoacidici coinvolti nell'interazione verranno inoltre utilizzate diverse molecole o peptidi specifici per trattare i mitocondri da cellule HeLa. Tali trattamenti di mitocondri che sintetizzano ATP saranno seguiti da immunoprecipitazione e analisi Western blotting come descritto precedentemente. Sarà usato per tale trattamento il resveratrolo, noto inibitore polifenolico che inibisce ATP sintasi interagendo nel sito catalitico F1 dell'enzima, come dimostrato da studi cristallografici². L'eventuale presenza di IF1 nel sito catalitico durante il trattamento, potrebbe competere con il legame di questo composto. L'utilizzo del resveratrolo risulta di particolare interesse perché potrà chiarire il dibattito esistente in letteratura sul fatto che IF1 possa essere legato al sito catalitico F1 esclusivamente durante idrolisi di ATP e non, come recentemente proposto, durante la sua sintesi. Inoltre il resveratrolo potrebbe essere interessante per un altro possibile effetto nel promuovere l'apertura del poro di transizione mitocondriale (PTP). Questa ipotesi si basa sull'evidenza sperimentale che il legame dello ione Ca^{2+} al sito catalitico di ATP sintasi si ripercuota sull'apertura del poro con effetti sulla morte cellulare³. Non si può escludere a priori che il resveratrolo, analogamente allo ione Ca^{2+} , possa modulare il PTP attraverso il suo legame al sito F1 dell'enzima. Data la presenza dei siti di legame di benzodiazepina (Bz) 423⁴ e ciclofilina (CyP) D^{5,6} a livello della subunità OSCP, verranno usati per le incubazioni dei mitocondri preparati da HeLa anche Bz423 e ciclosporina (Cs) A, per studiarne una possibile competizione con l'inibitore IF1, nel caso la subunità OSCP sia coinvolta nel nuovo sito di legame con IF1.

L'Assegnista avrà inoltre a disposizione dei peptidi disegnati grazie al supporto di studi bioinformatici che hanno identificato due regioni sulla subunità OSCP, esposte in matrice, che potrebbero rappresentare potenzialmente il sito di legame per IF1. Tali peptidi sono disponibili per studi di competizione sull'interazione di IF1 con OSCP. Anche in questi esperimenti i mitocondri verranno sottoposti ad incubazione in una soluzione che favorisca la sintesi di ATP e verranno processati per studi di immunoprecipitazione, Western blotting e spettrometria di massa. Gli studi di questa fase sperimentale sono finalizzati a definire le regioni coinvolte nel sito di legame per la proteina inibitrice IF1 ed a definire molecole/peptidi in grado di competere per il nuovo sito di legame in cellule tumorali. **La fase 1 permetterà all'Assegnista di Ricerca di utilizzare metodologie biochimiche come immunoprecipitazione, Western blotting e spettrometria di massa, preparare mitocondri da linee cellulari e mettersi alla prova con la farmacologia e la biologia cellulare.**

Fase 2 – Studio dell'effetto di IF1 sulla modulazione del PTP e sulla capacità di crescita tumorale

In questa seconda fase il lavoro dell'Assegnista sarà focalizzato sulla caratterizzazione del ruolo dell'inibitore IF1 di ATP sintasi nella modulazione del PTP, come meccanismo di controllo sulla crescita tumorale. Per approfondire tale aspetto questa fase del Progetto di Ricerca prevede l'utilizzo di costrutti per silenziare (RNA interference) o annullare (delezione genica attraverso CRISPR/CAS9) l'espressione dell'inibitore IF1 nel modello cellulare HeLa. Altri modelli cellulari provenienti da tessuti tumorali umani e murini quali colon, fegato e seno saranno testati per il loro contenuto della proteina inibitrice. I suddetti modelli cellulari verranno studiati, unitamente ai loro controlli, per identificarne la soglia di resistenza all'apertura del PTP in diverse condizioni fisiologiche come la sintesi o l'idrolisi di ATP, attraverso saggi di *Ca²⁺ retention capacity* e *swelling*. Nel caso in cui anche nei modelli tumorali di colon, fegato e seno siano identificati alti livelli di IF1, anche in queste linee cellulari verrà deletato il gene codificante IF1, per validare gli effetti dell'inibitore sulla modulazione del PTP in modelli tumorali di origine diversa dalle HeLa. Le cellule HeLa esprimenti o meno la proteina IF1 saranno inoltre studiate a confronto per la respirazione mitocondriale e la capacità di crescita tumorale in *soft agar*. **La fase 2 permetterà all'Assegnista di Ricerca di utilizzare metodologie di biologia molecolare e biologia cellulare per generare HeLa KO o KD per la proteina IF1. Potrà inoltre utilizzare tecniche finalizzate allo studio della transizione di permeabilità e della respirazione mitocondriale, e studiare la tumorigenesi *in vitro*.**

Fase 3- Identificazione di molecole/peptidi in grado di spiazzare IF1 e promuovere l'apoptosi

Le molecole/peptidi identificate nella fase 1 per la loro efficacia nel competere per il sito di legame per IF1 e nel prevenire il legame della proteina inibitrice al nuovo sito di legame pH-indipendente sull'ATP sintasi, verranno studiate per valutarne l'effetto pro-apoptotico in cellule tumorali. Per identificare le dosi non tossiche delle molecole identificate, verranno come prima cosa testate diverse concentrazioni delle stesse in cellule non tumorali, fibroblasti cutanei umani provenienti da donatori sani e fibroblasti murini MEF. Saggi di vitalità cellulare e di respirazione mitocondriale su cellule *in situ* (seahorse, Agilent), in assenza o presenza di dosi crescenti del trattamento, permetteranno di identificare le soglie di tossicità delle molecole oggetto di questa fase di studio.

L'Assegnista potrà studiare le molecole selezionate caratterizzandone l'effetto pro-apoptotico nei modelli cellulari derivati da tumori alla cervice, al colon, al fegato ed al seno, attraverso studi di mortalità cellulare al citofluorimetro (colorazione con *annexin-V*). Verranno inoltre utilizzate le suddette molecole alle concentrazioni non tossiche in studi di crescita tumorale *in vitro* su *soft agar*, per validare l'efficacia dei trattamenti sulla crescita tumorale. Infine verranno

valutati gli effetti sulla modulazione del PTP, possibile meccanismo primario responsabile dell'apoptosi. **La fase 3 permetterà all'Assegnista di Ricerca di unire i risultati ottenuti nelle due fasi precedenti per identificare molecole con potenziale azione anti-tumorale, e di identificarne il meccanismo molecolare di azione.**

Bibliografia

1. Zanotti, F., Raho, G., Gaballo, A. & Papa, S. Inhibitory and Anchoring Domains in the ATPase Inhibitor Protein IF1 of Bovine Heart Mitochondrial ATP Synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**, 447–457 (2004).
2. Gledhill, J. R., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W. & Walker, J. E. Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 13632–13637 (2007).
3. Giorgio, V., Burchell, V., Schiavone, M., Bassot, C., Minervini, G., *et al.* Ca²⁺ binding to F-ATP synthase β subunit triggers the mitochondrial permeability transition. *EMBO Rep.* **18**, 1065-1076 (2017).
4. Johnson, K. M. *et al.* Identification and validation of the mitochondrial F1F0-ATPase as the molecular target of the immunomodulatory benzodiazepine Bz-423. *Chem. Biol.* **12**, 485–496 (2005).
5. Giorgio, V., Von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., *et al.* Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 5887–92 (2013).
6. Antoniel, M., Giorgio, V., Fogolari F., Glick, G., Bernardi, P., *et al.* The Oligomycin-Sensitivity Conferring Protein of Mitochondrial ATP Synthase: Emerging New Roles in Mitochondrial Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 7513–7536 (2014).