

PROGRAMMA DI RICERCA (Dott.ssa Valentina Giorgio)

“I mitocondri come nuovo bersaglio terapeutico nei disturbi legati all’X fragile”

Stato dell’arte

I disturbi legati all’X fragile (FXDs) sono condizioni genetiche che includono sindrome dell’X fragile (FXS), un disturbo dello sviluppo neurologico responsabile di disturbi intellettivi disabilità e autismo, e sindrome dell’X fragile con tremore/atassia (FXTAS), una sindrome neurodegenerativa caratterizzata da tremore intenzionale progressivo, parkinsonismo, declino cognitivo. FXS deriva dalla perdita della funzione del gene nucleare *FMRI*, mentre FXTAS da un aumento tossico dell’RNA di *FMRI* (1–4). Raramente sono stati descritti individui apparentemente senza disabilità intellettiva, ma con segni precoci di atassia e portatori di una *full mutation* (FM) completamente non metilata (UFM) o portatori di una forma premutata (PM), (1,5). I livelli di FMRP, la proteina codificata da *FMRI*, diminuiscono all’aumentare delle ripetizioni CGG. La proteina è una proteina che lega molti RNA cellulari tra cui quelli di molte proteine mitocondriali.

Fasi del Progetto di Ricerca

Lo scopo principale di questo progetto è svelare i meccanismi mitocondriali coinvolti nella fisiopatologia del fenotipo dei disordini FXDs per sviluppare nuovi trattamenti.

Il piano sperimentale del progetto è suddiviso nei seguenti obiettivi:

- 1) esplorare i meccanismi molecolari che causano la disfunzione mitocondriale nei fibroblasti FXD;
- 2) selezionare composti mirati in grado di migliorare il fenotipo mitocondriale nei fibroblasti FXD;
- 3) esplorare gli effetti di composti selezionati sui fibroblasti FXD a livello molecolare e proteomico e validare i fattori mitocondriali patologici determinanti utilizzando neuroni derivati da iPSC.

Fase 1- Identificazione dei meccanismi molecolari che causano la disfunzione mitocondriale nei fibroblasti FXD

In esperimenti preliminari, la sovra-regolazione di ciclofilina D (CypD) e altre proteine mitocondriali chiave è correlata nei fibroblasti al fenotipo di pazienti FXS e PM, causando disfunzione mitocondriale e morte apoptotica. In linea con fenotipi lievi nei pazienti, i fibroblasti derivati da genotipi UFM sono resistenti alla morte per apoptosi e difetto bioenergetico, con caratteristiche più simili a quelle osservate nei donatori sani.

Per valutare la presenza di un leak protonico nelle membrane mitocondriali di pazienti umani portatori di FM e PM, la respirazione mitocondriale sarà studiata in fibroblasti intatti in coltura e confrontata con quella dell’UFM e delle cellule di controllo (Agilent technology). La respirazione mitocondriale (consumo di ossigeno, dopo trattamento con inibitori dei complessi OXPHOS o disaccoppiamento della membrana interna mitocondriale con FCCP) consentirà di identificare e analizzare eventuali alterazioni della funzione mitocondriale che potrebbe essere dovuta alla mancanza (FM) o alla bassa espressione (PM) della proteina FMRP, rivelando la causa dello squilibrio energetico cellulare previsto negli FXDs. In questa fase del progetto di Ricerca, lo studio del potenziale di membrana contribuirà alla comprensione dei meccanismi mitocondriali coinvolti nella patologia dei FXDs.

L’utilizzo della sonda fluorescente TMRM nei diversi fenotipi cellulari rivelerà la presenza di difetti a livello dell’ATP sintasi o dei complessi OXPHOS. Questi esperimenti verranno condotti monitorando le variazioni del potenziale di membrana nel tempo in cellule aderenti *in situ* in seguito all’aggiunta di rotenone e/o antimicina A, o oligomicina.

La sensibilità all’apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (PTP) sarà inoltre analizzata nei suddetti fenotipi, aggiungendo una concentrazione crescente dello ione Ca^{2+} , il principale

attivatore del canale mitocondriale *in situ*. La sensibilità Ca^{2+} -dipendente all'apertura del PTP sarà valutata nei mitocondri isolati attraverso l'analisi di swelling per stabilire se la sovraregolazione della CypD nei pazienti sensibilizza strutturalmente il PTP. Inoltre, l'apoptosi dipendente dal PTP sarà valutata in tutti i modelli FXDs dopo trattamento in coltura con gli attivatori noti del PTP: acido arachidonico (ArA), benzodiazepina (Bz) 423, o l'inibitore ciclosporina (Cs) A, monitorando le cellule positive all'annessina-V attraverso un'analisi di fluorescenza al FACS.

Il confronto degli effetti dei due composti consentirà di definire il meccanismo molecolare che promuove l'apoptosi negli FXDs e aiuterà a progettare molecole per una potenziale terapia mirata. Al fine di verificare se la sovraregolazione di CypD è una causa primaria nel meccanismo che porta ad un aumento dell'apoptosi PTP-dipendente nei fibroblasti FXS e PM, miriamo a generare CypD KO da FXS, PM e modelli cellulari UFM.

La fase 1 è finalizzata ad (i) identificare i meccanismi mitocondriali alla base della disfunzione neuronale negli FXDs, (ii) disegnare molecole farmacologiche o peptidi in grado di revertire tali meccanismi patologici, quindi potenzialmente interessanti per una terapia nei fenotipi FXDs.

Fase 2 – Selezione di composti mirati in grado di migliorare fenotipo mitocondriale nei fibroblasti FXD

I fibroblasti derivati da individui controllo, PM, FXS e UFM verranno utilizzati per studiare l'effetto di composti che saranno identificati da collaboratori dell'Università di Padova, coinvolti in questa fase del progetto di Ricerca. I composti verranno identificati attraverso la metodologia Fragment-Based Drug Discovery (FBDD). I composti che verranno indicati come promettenti per l'attività sulla CypD saranno valutati per i loro effetti mitocondriali e la loro eventuale tossicità cellulare. Altri composti ottenuti per analogia strutturale con altre molecole e per il miglioramento della funzione mitocondriale, verranno testati. La respirazione mitocondriale *in situ* sarà studiata in fibroblasti con o senza concentrazioni crescenti dei composti selezionati in modo da definire la loro soglia di tossicità sulle cellule dei pazienti (Agilent technology).

La fase 2 è finalizzata ad identificare molecole farmacologiche (i) che abbiano effetti migliorativi sulla funzione mitocondriale dei pazienti FXD e (ii) ne inibiscano la morte cellulare PTP dipendente.

Fase 3- Studio degli effetti di composti selezionati su fibroblasti e neuroni FXD a livello molecolare e proteomico

Le molecole/peptidi identificate nella fase 2 per la loro efficacia nel competere per il sito di legame della CyPD, verranno analizzate per i loro effetti a lungo termine. Solo i composti che non mostrano alcun effetto tossico sui fibroblasti verranno utilizzati in questa terza fase del progetto.

Verranno valutati gli effetti dei composti selezionati su respirazione mitocondriale, cambiamenti nel potenziale della membrana mitocondriale nel corso del tempo. La sensibilità all'apertura del PTP sarà inoltre analizzata nei fibroblasti *in situ* in seguito al trattamento. La sensibilità Ca^{2+} -dipendente all'apoptosi (dipendente dal PTP) sarà valutata per stabilire l'effetto dei trattamenti. In questa serie di esperimenti cellule o mitocondri saranno trattati con o senza i composti selezionati (il loro solvente verrà utilizzato come controllo) per periodi brevi (10-30 minuti) o lunghi (7-10 giorni). I campioni trattati saranno utilizzati per analisi dei trascritti e le proteine i cui livelli di espressione sono variati verranno messe in luce.

Se identificate, le molecole promettenti verranno inoltre usate per il trattamento di neuroni, derivati da iPSCs, per stabilirne gli effetti sulla distribuzione e la morfologia mitocondriale *in situ* (microscopia TEM).

La fase 3 è finalizzata ad identificare quelle molecole che, essendo in grado di competere con la CyPD per il suo sito di legame, abbiano efficacia anti-apoptotica in fibroblasti e neuroni FXD, senza risultare tossiche.

Bibliografia

1. Bagni, C., Tassone, F., Neri, G. & Hagerman, R. J. Clin. Invest. 122, 4314–4322 (2012).
2. Pieretti, M. et al. Cell 66, 817–822 (1991).
3. Pietrobono, R. et al. Hum. Mol. Genet. 14, 267–277 (2005).
4. Tassanakijpanich, N., Hagerman, R. J. & Worachotekamjorn, J. Clin. Genet. 99, 751–760 (2021).
5. Tabolacci, E., Palumbo, F., Nobile, V. & Neri, G. Genes (Basel). 7, 1–16 (2016).

Programma di Attività dell'assegnista

Programma di Ricerca (Dott.ssa Valentina Giorgio)

“I mitocondri come nuovo bersaglio terapeutico nei disturbi legati all’X fragile”

L’attività dell’assegno sarà articolata all’interno delle tre fasi del Progetto come descritto:

Fase 1- Identificazione dei meccanismi molecolari che causano la disfunzione mitocondriale nei fibroblasti FXD

In esperimenti preliminari, la sovra-regolazione di ciclofilina D (CypD) e altre proteine mitocondriali chiave è correlata nei fibroblasti al fenotipo di pazienti FXS e PM, causando disfunzione mitocondriale e morte apoptotica. In linea con fenotipi lievi nei pazienti, i fibroblasti derivati da genotipi UFM sono resistenti alla morte per apoptosi e difetto bioenergetico, con caratteristiche più simili a quelle osservate nei donatori sani.

Per valutare la presenza di un leak protonico nelle membrane mitocondriali di pazienti umani portatori di FM e PM, la respirazione mitocondriale sarà studiata in fibroblasti intatti in coltura e confrontata con quella dell'UFM e delle cellule di controllo (Agilent technology). La respirazione mitocondriale (consumo di ossigeno, dopo trattamento con inibitori dei complessi OXPHOS o disaccoppiamento della membrana interna mitocondriale con FCCP) consentirà di identificare e analizzare eventuali alterazioni della funzione mitocondriale che potrebbe essere dovuta alla mancanza (FM) o alla bassa espressione (PM) della proteina FMRP, rivelando la causa dello squilibrio energetico cellulare previsto negli FXDs. In questa fase del progetto di Ricerca, lo studio del potenziale di membrana contribuirà alla comprensione dei meccanismi mitocondriali coinvolti nella patologia dei FXDs.

L’utilizzo della sonda fluorescente TMRM nei diversi fenotipi cellulari rivelerà la presenza di difetti a livello dell'ATP sintasi o dei complessi OXPHOS. Questi esperimenti verranno condotti monitorando le variazioni del potenziale di membrana nel tempo in cellule aderenti *in situ* in seguito all’aggiunta di rotenone e/o antimicina A, o oligomicina.

La sensibilità all'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (PTP) sarà inoltre analizzata nei suddetti fenotipi, aggiungendo una concentrazione crescente dello ione Ca^{2+} , il principale attivatore del canale mitocondriale *in situ*. La sensibilità Ca^{2+} -dipendente all’apertura del PTP sarà valutata nei mitocondri isolati attraverso l’analisi di swelling per stabilire se la sovraregolazione della CypD nei pazienti sensibilizza strutturalmente il PTP. Inoltre, l’apoptosi dipendente dal PTP sarà valutata in tutti i modelli FXDs dopo trattamento in coltura con gli attivatori noti del PTP: acido arachidonico (ArA), benzodiazepina (Bz) 423, o l’inibitore ciclosporina (Cs) A, monitorando le cellule positive all'annexina-V attraverso un’analisi di fluorescenza al FACS.

Il confronto degli effetti dei due composti consentirà di definire il meccanismo molecolare che promuove l'apoptosi negli FXDs e aiuterà a progettare molecole per una potenziale terapia mirata. Al fine di verificare se la sovraregolazione di CypD è una causa primaria nel meccanismo che porta ad un aumento dell'apoptosi PTP-dipendente nei fibroblasti FXS e PM, miriamo a generare CypD KO da FXS, PM e modelli cellulari UFM.

La fase 1 permetterà all'assegnista di utilizzare metodologie biochimiche e di biologia molecolare e cellulare come saggi funzionali sui mitocondri, analisi della morte cellulare per attivazione del PTP, Western blotting, preparazione di campioni destinati ad analisi di Risonanza Magnetica Nucleare, preparazione di mitocondri da linee cellulari e mettersi alla prova con la biologia cellulare per generare linee CypD KO derivate da pazienti FXDs.

Fase 2 – Selezione di composti mirati in grado di migliorare fenotipo mitocondriale nei fibroblasti FXD

I fibroblasti derivati da individui controllo, PM, FXS e UFM verranno utilizzati per studiare l'effetto di composti che saranno identificati da collaboratori dell'Università di Padova, coinvolti in questa fase del progetto di Ricerca. I composti verranno identificati attraverso la metodologia *Fragment-Based Drug Discovery (FBDD)*. I composti che verranno indicati come promettenti per l'attività sulla CypD saranno valutati per i loro effetti mitocondriali e la loro eventuale tossicità cellulare. Altri composti ottenuti per analogia strutturale con altre molecole e per il miglioramento della funzione mitocondriale, verranno testati. La respirazione mitocondriale *in situ* sarà studiata in fibroblasti con o senza concentrazioni crescenti dei composti selezionati in modo da definire la loro soglia di tossicità sulle cellule dei pazienti (Agilent technology).

La fase 2 permetterà all'assegnista di utilizzare metodologie di biologia cellulare e tecniche di fluorescenza finalizzate allo studio della respirazione cellulare e della morte apoptotica *in vitro*, in risposta ai trattamenti farmacologici.

Fase 3- Studio degli effetti di composti selezionati su fibroblasti e neuroni FXD a livello molecolare e proteomico

Le molecole/peptidi identificate nella fase 2 per la loro efficacia nel competere per il sito di legame della CypD, verranno analizzate per i loro effetti a lungo termine. Solo i composti che non mostrano alcun effetto tossico sui fibroblasti verranno utilizzati in questa terza fase del progetto.

Verranno valutati gli effetti dei composti selezionati su respirazione mitocondriale, cambiamenti nel potenziale della membrana mitocondriale nel corso del tempo. La sensibilità all'apertura del PTP sarà inoltre analizzata nei fibroblasti *in situ* in seguito al trattamento. La sensibilità Ca²⁺-dipendente all'apoptosi (dipendente dal PTP) sarà valutata per stabilire l'effetto dei trattamenti. In questa serie di esperimenti cellule o mitocondri saranno trattati con o senza i composti selezionati (il loro solvente verrà utilizzato come controllo) per periodi brevi (10-30 minuti) o lunghi (7-10 giorni). I campioni trattati saranno utilizzati per analisi dei trascritti e le proteine i cui livelli di espressione sono variati verranno messe in luce.

Se identificate, le molecole promettenti verranno inoltre usate per il trattamento di neuroni, derivati da iPSCs, per stabilirne gli effetti sulla distribuzione e la morfologia mitocondriale *in situ* (microscopia TEM).

La fase 3 permetterà all'assegnista di unire i risultati ottenuti nelle due fasi precedenti per identificare molecole con potenziale azione terapeutica in fibroblasti e neuroni (derivati da iPSCs) FXD, e di validarne il meccanismo molecolare.