**Programma di Attività del/della borsista**

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 del candidato 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 confering protein) dell’ATP sintasi, evidenze sperimentali pubblicate da Zanotti et al., 20041 e mai confermate successivamente in letteratura, il/la borsista 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 perchè 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 Ca2+ 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 Ca2+, 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) D5,6 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.

Il/la borsista 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 al/alla** **borsista 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 del/della borsista 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 deleto 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 sudiate a confronto per la respirazione mitocondriale e la capacità di crescita tumorale in *soft agar*. **La fase 2 permetterà al/alla borsista 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’affetto 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.

Il/la borsista 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 al/alla borsista 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.* Ca 2+ 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 F1F 0-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).