



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato in Medicina Molecolare

XXXI CICLO

**MALATTIE DA MUTAZIONI DEI tRNA MITOCONDRIALI:  
IMPLEMENTAZIONE DI STRATEGIE TERAPEUTICHE E MODELLI  
CELLULARI INNOVATIVI**

Relatore

Prof.ssa Giulia d'Amati

Dottoranda

Dott.ssa Bruna Cerbelli

Coordinatore del Dottorato

Prof.ssa Isabella Screpanti

Anno Accademico 2017-2018

1.	Le patologie mitocondriali.....	1
1.1	I mitocondri .....	1
1.2	Il DNA mitocondriale .....	3
1.3	Genetica .....	7
1.3.1	<i>Mutazioni a carico del DNA mitocondriale</i> .....	8
1.3.2	<i>Mutazioni eteroplasmiche: l'effetto soglia</i> .....	8
1.3.3	<i>Mutazioni omoplasmiche: il problema della penetranza</i> .....	9
1.3.4	<i>Mutazioni a carico del DNA nucleare</i> .....	9
1.4	Clinica, epidemiologia e terapie .....	10
1.4.1	<i>Il modello delle cellule staminali pluripotenti indotte</i> .....	11
1.5	Il ruolo delle aminoacil-tRNA sintetasi nella penetranza nelle mutazioni mitocondriali.....	12
1.6	Delivery mitocondriale .....	14
1.6.1	<i>Nanoparticelle</i> .....	14
1.6.2	<i>Peptidi</i> .....	15
2.	Scopo dello studio .....	16
3.	Risultati.....	17
3.1	Sviluppo di strategie per veicolare le molecole in studio alla matrice mitocondriale .....	17
3.1.1	<i>Elaborazione di costrutti contenenti il frammento aminoacidico 632_33 derivato dal Cterm</i> .	17
3.1.2	<i>Molecole di ferritina umana come ipotetico carrier</i> .....	26
3.2	Analisi dell'effetto tessuto-specifico delle mutazioni dei mt-tRNA ed individuazione di eventuali meccanismi terapeutici dotati di specificità tessutale .....	31
3.2.1	<i>Produzione di iPSCs da fibroblasti umani portatori della mutazione m.3243A&gt;G</i> .....	31
3.2.2	<i>Caratterizzazione delle colonie di iPSCs</i> .....	32
3.2.3	<i>Produzione e caratterizzazione di cellule staminali neurali (NSCs)</i> .....	32
4.	Discussione .....	37
6.	Materiali e metodi.....	39
5.1	Cibridi transmitocondriali portatori di mutazioni nei tRNA mitocondriali.....	39
5.1.1	<i>Allestimento di cibridi</i> .....	39
5.1.2	<i>Condizioni di crescita</i> .....	40
5.1.3	<i>Analisi di localizzazione cellulare</i> .....	40

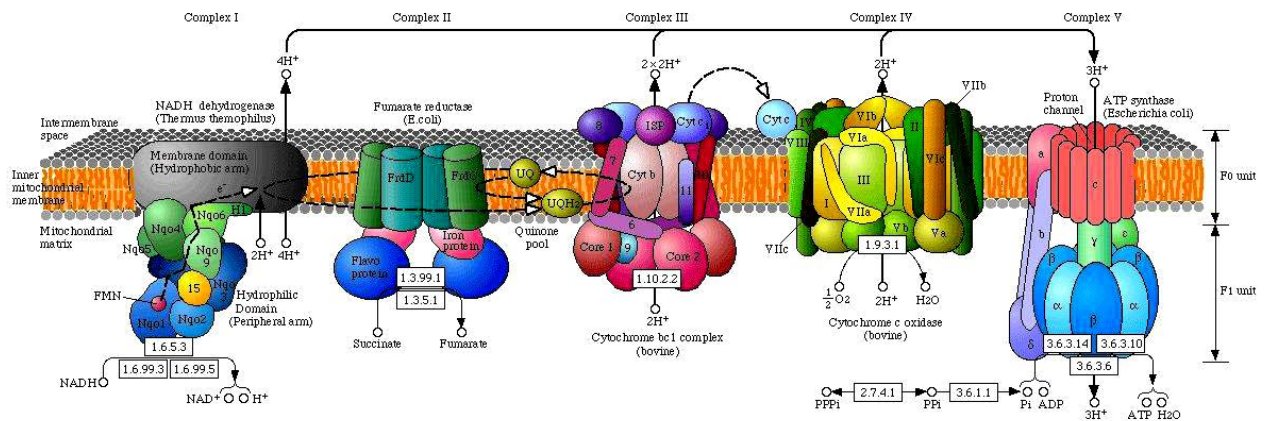
5.1.4	<i>Analisi di tossicità cellulare</i>	40
5.1.5	<i>Curve di crescita</i>	41
5.1.6	<i>Consumo di ossigeno</i>	41
5.2	Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) da fibroblasti umani	41
5.2.1	<i>Generazione di iPSCs</i>	41
5.2.2	<i>Caratterizzazione di iPSCs</i>	42
5.2.3	<i>Produzione e caratterizzazione di cellule staminali neurali (NSCs)</i>	44
5.3	Analisi statistica	44
7.	Bibliografia	45

# 1. Le patologie mitocondriali

## 1.1 I mitocondri

I mitocondri sono organelli citoplasmatici a doppia membrana, filamentosi o granulari, di circa 1  $\mu\text{m}$  presenti in tutte le cellule animali e vegetali e nei protozoi, nonché nelle alghe e nei funghi in quantità variabile, da varie centinaia a un migliaio. Si ritiene che i mitocondri attuali derivino da procarioti primordiali capaci di effettuare la respirazione, incorporati stabilmente come “endosimbionti” nelle cellule eucariotiche ancestrali incapaci di respirazione. La membrana esterna è permeabile a piccole molecole e ioni, la membrana interna formante le creste risulta impermeabile alla maggior parte delle piccole molecole e agli ioni, compresi i protoni, e contiene i complessi della catena respiratoria, l'ATP – ADP traslocasi e altri trasportatori di membrana. Lo spazio delimitato dalla membrana interna è detto matrice mitocondriale e contiene il complesso della piruvato-deidrogenasi, gli enzimi dell'acido citrico, gli enzimi della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, DNA, ribosomi, ATP, ADP, ioni ed enzimi. Poiché i mitocondri hanno il ruolo di centrali energetiche cellulari in genere i tessuti metabolicamente attivi sono quelli che ne contengono il maggior numero. In media i mitocondri occupano circa il 30% del volume citoplasmatico e possono trovarsi isolatamente come organelli discreti o come rete interconnessa. Proteine mitocondriali per la fissione e la fusione regolano gli stati differenti dell'organizzazione citoplasmatica. I mitocondri sono la sede del ciclo dell'acido citrico, dell'ossidazione degli acidi grassi e della fosforilazione ossidativa, processi che, in condizioni aerobiche, producono la maggior parte dell'energia utilizzata dalla cellula. Tra tutte queste funzioni è cruciale la generazione di ATP attraverso la catena di trasporto elettronico e il sistema della fosforilazione ossidativa, ovvero la respirazione cellulare (Figura 1). Oltre a produrre energia chimica, i mitocondri svolgono un ruolo rilevante nel metabolismo dei lipidi e dei fosfolipidi. Partecipano, insieme al reticolo endoplasmatico liscio, alla biosintesi degli ormoni steroidei ed è stato attribuito loro un ruolo essenziale nella gluconeogenesi e nel metabolismo degli amminoacidi. Inoltre, i mitocondri sono coinvolti nei meccanismi che presiedono alla morte cellulare programmata (apoptosi) e alla senescenza cellulare. Sono inoltre considerati come dei grossi serbatoi capaci di accumulare e concentrare varie sostanze. Il fenomeno più rilevante è rappresentato dall'accumulo di cationi ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e soprattutto

Ca<sup>++</sup>) all'interno della matrice. Gli ioni Ca<sup>++</sup> possono concentrarsi nei mitocondri fino a superare di centinaia di volte i valori normali, formando talora depositi cristallini di fosfato di calcio. La capacità dei mitocondri di concentrare ioni Ca<sup>++</sup> nella matrice mitocondriale contribuisce a mantenere molto bassa la concentrazione citoplasmatica di questo ione (inferiore a 10<sup>-7</sup> M) permettendo in questo modo di regolare vari aspetti della funzione cellulare.



**Figura 1. Catena della fosforilazione ossidativa.** La fosforilazione ossidativa (OXPHOS) è una fase della respirazione cellulare che avviene a livello delle creste mitocondriali, ossia dei ripiegamenti della membrana interna. Essa consiste nel trasferimento degli elettroni dell'idrogeno del NADH attraverso i quattro complessi della catena respiratoria fino all'ossigeno, che rappresenta l'accettore finale. Il passaggio degli elettroni comporta la liberazione d'energia che viene immagazzinata nei legami di 36 molecole di adenosindifosfato, ADP, tramite il legame di gruppi fosfato e la sintesi di molecole di ATP. La sintesi di tali molecole è operata dall'enzima ATP sintetasi, la quale attraverso un processo di chemiosmosi sfrutta l'energia liberata da un flusso di ioni idrogeno H<sup>+</sup> che si spostano attraverso la membrana del mitocondrio secondo il loro gradiente di concentrazione. **Complesso I** (NADH deidrogenasi): è una flavoproteina complessa contenente più di 25 catene polipeptidiche. L'intero complesso che è immerso nella membrana mitocondriale interna, è orientato con il sito che lega il NADH rivolto verso la matrice, in modo da poter interagire con il NAD prodotto dalle diverse deidrogenasi presenti in questo compartimento mitocondriale. **Complesso II** (succinato deidrogenasi): è il solo enzima del ciclo dell'acido citrico ad essere legato alla membrana mitocondriale interna. Anche se è più piccolo del complesso I contiene due tipi di gruppi prostetici e almeno quattro proteine diverse. **Complesso III** (ubichinone citocromo c ossidoreduttasi): contiene i citocromi b562 e 566, c1, una proteina ferro-zolfo ed almeno altre sei subunità proteiche. Queste proteine sono asimmetriche sulla membrana interna: mentre il citocromo b attraversa a tutto spessore la membrana, il citocromo c1 e la proteina ferro-zolfo giacciono sulla superficie esterna della membrana. Il complesso III funziona come una pompa protonica che crea un gradiente protonico rilasciando gli H<sup>+</sup> rilasciati dall'ubichinone ossidato nello spazio transmembrana. **Complesso IV** (citocromo ossidasi): è costituito dai citocromi a e a<sub>3</sub> legati a regioni diverse della stessa proteina; contiene inoltre due ioni rame Cu A e B che partecipano al trasferimento di elettroni all'ossigeno. Il complesso IV è anch'esso una pompa protonica che trasporta H<sup>+</sup> dalla matrice allo spazio intermembrana. **Complesso V o ATP sintetasi**: è il complesso enzimatico che sintetizza l'ATP nella membrana interna dei mitocondri. È composta di due subunità: F<sub>0</sub> e F<sub>1</sub>, entrambe proteine oligomeriche. F<sub>0</sub> è situata nella membrana interna e contiene un canale attraverso cui i protoni fluiscono verso F<sub>1</sub>. F<sub>0</sub> contiene tre subunità a, b e c: quest'ultima assume una forma a ciambella sul piano della membrana. Si ritiene che ciascuna subunità passi attraverso la membrana 8 volte.



A differenza del genoma nucleare, quello mitocondriale è privo di introni, le sequenze intergeniche sono scarse e brevi e talvolta le regioni codificanti si sovrappongono alle estremità.

Il DNA mitocondriale codifica per 13 componenti proteiche, tutte coinvolte nel processo di produzione di ATP attraverso la OXPHOS, 2 RNA ribosomali (rRNA 12S e 16S) e 22 RNA di trasporto (tRNA) necessari e sufficienti per la traduzione del messaggio informativo del mtDNA. I geni che codificano le subunità della OXPHOS sono ripartiti tra il DNA mitocondriale e il DNA nucleare. Le proteine codificate da quest'ultimo vengono riconosciute grazie alla presenza di una sequenza leader all'estremità N-terminale e trasportate nei mitocondri.

Il DNA mitocondriale costituisce un'eccezione all'universalità del codice genetico. Nei mammiferi molti cambiamenti riguardano codoni coinvolti nell'inizio o nella terminazione della sintesi proteica. I codoni AGA e AGG sono entrambi letti come segnali di terminazione invece che come codoni per l'arginina; il codone AUA è letto come codone per la metionina e non per l'isoleucina. L'unica modifica comune a tutti i DNA mitocondriali, è che il codone UGA ha lo stesso significato di UGG e quindi codifica per il triptofano invece che essere un codone di stop. La replicazione delle molecole di mtDNA avviene a partire da due diverse origini, che si trovano rispettivamente sul filamento pesante (OH) e sul filamento leggero (OL).

Secondo il modello tradizionale di Clayton la replicazione inizia con la sintesi della catena pesante a partire da vari punti precisi all'interno del D-loop. L'allungamento della catena nascente porta al distacco dei due filamenti, finché non viene scoperta l'origine di replicazione del filamento leggero; a questo punto può aver inizio anche la replicazione di quest'ultimo che avviene in direzione opposta ([Clayton, 1982](#)).

La replicazione ha inizio sul filamento pesante dall'origine OH utilizzando un innesco a RNA generato dalla trascrizione del filamento leggero. Quest'ultimo infatti viene tagliato da una RNAsi codificata nel nucleo in alcune posizioni specifiche ben conservate ed il risultante 3'-OH viene utilizzato dalla DNA polimerasi  $\gamma$  come primer per sintetizzare un DNA 7S che termina alla sequenza associata alla terminazione (TAS), situata all'estremità della regione di controllo.

La sequenza TAS si lega ad un fattore specifico in grado di regolare le pause nella replicazione. Questa regione neosintetizzata espone il filamento pesante parentale in modo da creare l'ansa D (displacement loop).

All'interno del D-loop esistono numerosi siti di origine per il filamento H, ma solo alcune di queste catene nascenti vengono effettivamente estese per dare una replicazione completa. La maggior parte va invece a costituire il DNA 7S. Fish e collaboratori hanno evidenziato l'esistenza di una nuova origine nella posizione 57, che sembrerebbe essere la "vera" origine di replicazione, poiché nessuno dei filamenti nascenti da questa posizione termina prematuramente (Fish et al, 2004).

La trascrizione a partire dai promotori mitocondriali produce degli RNA policistronici, che contengono tutte le informazioni genetiche codificate da ciascun filamento. Questi trascritti primari vengono poi processati per produrre singole molecole di mRNA, rRNA e tRNA (Clayton et al, 1991). Esiste un solo sito iniziale di trascrizione per la catena leggera da cui origina un lungo trascritto destinato a produrre l'mRNA per la subunità ND6 e gli otto tRNA codificati da questa catena (Attardi, 1986). La trascrizione della catena pesante coinvolge, invece, due siti estremamente ravvicinati che danno luogo ad altrettanti tipi di trascritti, sintetizzati in proporzioni diverse. Il promotore situato più a monte (H1), il più attivo, è localizzato 16bp prima del tRNA<sup>Phe</sup> ed è deputato alla sintesi degli rRNA e di due tRNA (tRNA<sup>Phe</sup> e tRNA<sup>Val</sup>) in forma di un trascritto che termina al confine tra il 3' del gene per l'rRNA 16S ed il gene per il tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Il promotore situato più a valle (H2), funzionalmente meno attivo, si localizza al 5' del gene per l'rRNA 12S e controlla la sintesi di un enorme trascritto policistronico che comprende tutti gli altri tRNA e gli mRNA codificati dal filamento H. Ogni proteina e ogni rRNA è immediatamente fiancheggiata da almeno un gene per i tRNA. L'escissione delle molecole di tRNA è necessario per produrre molecole di rRNA e mRNA mature. Il folding dei tRNA probabilmente rappresenta un substrato idoneo al riconoscimento e al taglio ad opera dell'RNasi P mitocondriale e di altre RNasi non identificate. La trascrizione del genoma mitocondriale prevede la presenza di una RNA polimerasi mitocondriale (POLRMT) formata da una sola subunità, che viene sintetizzata nel citoplasma e poi successivamente importata nei mitocondri. POLRMT da sola non è in grado di riconoscere il promotore e richiede perciò l'assistenza del fattore di trascrizione mitocondriale A (TFAM) e di uno dei due fattori di trascrizione mitocondriale B (TFB1M e TFB2M) (Falkenberg et al, 2002; McCulloch et al, 2002). TFAM può legare, svolgere e piegare il DNA introducendo alterazioni strutturali specifiche nella molecola del mtDNA (Fisher et al, 1992). È ragionevole pensare che il riconoscimento del promotore e l'inizio della trascrizione avvenga secondo questa modalità: TFAM legherebbe e



piegherebbe l' mtDNA introducendo uno svolgimento parziale nella sequenza del promotore; questo permetterebbe a TFB2M di legarsi al ssDNA, reclutando sul promotore la POLMRT ed evitando la formazione di eterodimeri RNA/DNA che bloccherebbero la trascrizione sul promotore. L'interazione con TFB2M o con TFB1M da parte di TFAM contribuirebbe quindi a richiamare in sede il macchinario della trascrizione mitocondriale (McCulloch et al, 2003). Ci sono tre unità trascrizionali mitocondriali (quella che inizia su H1, quella su H2 e quella su LSP), ma solo l'unità che viene avviata a partire da H1 presenta un sito di terminazione ben stabilito, localizzato alla fine dell'rRNA 16S. La terminazione della trascrizione in questo sito richiede l'attività di uno specifico fattore di terminazione della trascrizione, chiamato mTERF (Fernandez-Silva et al, 1997). Per quanto riguarda il sito di terminazione per il trascritto H2, ne è stato identificato uno immediatamente a monte del gene per il tRNA<sup>Phe</sup>. Due proteine di 45 e 70 kDa sono state associate a questa regione ma la loro identità non è stata ancora chiarita (Camasamudram et al, 2003). La terminazione della trascrizione sul filamento L non è stata ancora studiata in dettaglio, è noto però che la sintesi di questo trascritto più breve, comprendente gli rRNA, abbia un tasso di trascrizione venticinque volte superiore rispetto all'altro trascritto policistronico, comprendente l'intera lunghezza del genoma. In questa maniera il pool di rRNA viene arricchito a spese degli mRNA. Questo tipo di trascrizione è coerente con il maggior fabbisogno di molecole di rRNA 12S e 16S durante la sintesi proteica (Fernandez-Silva et al, 2003).

L'apparato di traduzione mitocondriale umano comprende ribosomi specifici, 22 specie di tRNA, un gruppo di aminoacil-tRNA sintetasi specifiche e fattori di iniziazione e di allungamento. I ribosomi 55S sono costituiti da una subunità 39S e da una subunità 28S, che contengono rispettivamente rRNA 16S e 12S, codificati dal mtDNA, e vari tipi di proteine codificate dal nucleo. Gli rRNA mitocondriali si differenziano da quelli nucleari per alcune peculiarità: sono metilati, sono più piccoli di quelli citoplasmatici o batterici ed hanno una corta coda di poliA all'estremità 3'. Anche i tRNA mitocondriali hanno caratteristiche strutturali e funzionali che li distanziano da quelli nucleari: hanno dimensioni minori (59-75 nucleotidi), hanno il "loop DHC" estremamente variabile ed in alcuni casi assente (tRNA<sup>Ser(AGY)</sup>) (Arcari e Brownlee, 1980), sono soggetti ad un numero inferiore di modificazioni post-trascrizionali, alcune delle quali peculiari dei tRNA mitocondriali (es. la metilazione di residui di taurina in posizione U34 del tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> e del tRNA<sup>Lys</sup>). Inoltre, come descritto in precedenza, funzionano anche come segnali per lo

spezzettamento dei nastri policistronici ed alcuni di essi contengono sequenze di regolazione che legano fattori specifici (es. mtTERF).

È stato provato come l'espressione dei geni codificati dall' mtDNA sia costitutiva ([Attardi e Schatz, 1988](#)). Tuttavia, nei mammiferi sono stati riportati casi in cui si sono verificati cambiamenti nei livelli di espressione degli mRNA, relativamente all'invecchiamento ([Fernández-Silva et al, 1991](#)), alla richiesta energetica ([Martin et al, 1993](#)) o ai livelli ormonali ([Weber et al, 2002](#)). La variabilità della richiesta energetica tra i vari tipi cellulari e nelle diverse condizioni fisiologiche influisce sulla biogenesi mitocondriale, il cui sistema di controllo, che non è stato ancora completamente chiarito, richiede la partecipazione e la coordinazione dei genomi nucleare e mitocondriale. I geni nucleari codificano per due tipi di fattori: attivatori e co-attivatori. Gli attivatori sono fattori di trascrizione (es. NRF1, NRF2, Sp-1, CREB etc) mentre i co-attivatori sono fattori nucleari (es. PGC1, PRC) che interagiscono con i fattori di trascrizione legati al DNA ed intervengono nella regolazione dell'espressione genica in risposta a segnali fisiologici, termici e nella proliferazione cellulare ([Wu et al, 1999](#); [Andersson and Scarpulla, 2001](#); [Carmona et al, 2002](#)). I siti di riconoscimento per NRF1, NRF2 e Sp1 si trovano in corrispondenza di molti geni nucleari che codificano per subunità della catena respiratoria, fattori di trascrizione e replicazione mitocondriali, enzimi coinvolti nella via biosintetica dell'eme ed implicati nel processo di importazione delle proteine all'interno del mitocondrio ([Scarpulla, 1997; 2002](#)).

La distruzione del principale processo energetico cellulare, la fosforilazione ossidativa, dà origine ad un numeroso e variegato gruppo di patologie multi-sistemiche conosciute con il termine di mitocondriopatie. Sebbene le malattie mitocondriali possano colpire qualunque organo, più spesso interessano il muscolo ed il cervello data la maggiore richiesta energetica di questi tessuti, specialmente durante lo sviluppo. Per questo motivo, le malattie mitocondriali sono spesso definite come **encefalo-cardio-mio-patie mitocondriali** ([Chinnery, 2015](#)).

### 1.3 Genetica

La classificazione delle malattie mitocondriali riflette una caratteristica peculiare del sistema della fosforilazione ossidativa, ovvero quella di essere costituita da proteine codificate da due diversi sistemi genetici, il genoma mitocondriale e il genoma nucleare. Un primo gruppo di

malattie è caratterizzato dalla presenza di mutazioni del mtDNA, a trasmissione materna o a insorgenza sporadica. Un secondo gruppo è causato da mutazioni in geni nucleari che fanno parte o controllano la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) e la corretta funzionalità mitocondriale. Queste malattie sono a volte classificate sulla base delle sole alterazioni biochimiche rilevate dall'analisi dei tessuti affetti (soprattutto il muscolo scheletrico), perché i geni responsabili risultano ancora sconosciuti. L'enorme eterogeneità clinica, biochimica e molecolare di queste patologie spiega perché solo il 50% circa delle malattie mitocondriali definite sul piano clinico-biochimico, siano diagnosticate geneticamente. Negli ultimi anni numerosi progressi sono stati compiuti in questo campo grazie all'introduzione di nuove tecnologie (Next generation sequencing, NGS) che offrono la possibilità di analizzare rapidamente e a basso costo un gran numero di sequenze di DNA. Questo ha portato all'identificazione di numerosi geni nucleari associati a patologie mitocondriali, consentendo di ampliare e migliorare l'offerta diagnostica a pazienti e famiglie.

### 1.3.1 Mutazioni a carico del DNA mitocondriale

L'identificazione di mutazioni del mtDNA ha aperto un capitolo fondamentale nella comprensione della patologia mitocondriale. Nel 1988, Holt e collaboratori ([Holt et al, 1988](#)) descrissero la prima delezione del DNA mitocondriale e nello stesso anno fu identificata la prima mutazione puntiforme del mtDNA a carico del gene ND4 (Complesso I) in numerosi pazienti con "neuropatia ottica ereditaria di Leber" (LHON). Ad oggi sono conosciute un gran numero di mutazioni patogene a carico del mtDNA, la metà delle quali coinvolgono i geni non codificanti i tRNA. Alcune mutazioni sono state identificate in molte famiglie, mentre altre sono state osservate solo in rari casi e possono essere specifiche di famiglie occasionali. Normalmente il genotipo mitocondriale di un individuo è composto da una singola specie di mtDNA, condizione nota come *omoplasma*. Tuttavia, la tendenza intrinseca del mtDNA a mutare casualmente può determinare, in modo occasionale, una condizione transitoria nota come *eteroplasma*, nella quale coesistono genomi "wild-type" e mutati.

### 1.3.2 Mutazioni eteroplasmiche: l'effetto soglia

Le mutazioni e/o delezioni a carico del mtDNA sono, solitamente, eteroplasmiche e le conseguenze sulla funzione respiratoria cellulare sono gravi quando la percentuale di molecole di mtDNA mutato supera un valore soglia, che sarà tanto minore quanto maggiore è il

fabbisogno energetico del tessuto. La diversa percentuale di molecole di mtDNA mutato nei diversi tessuti può spiegare, in parte, la variabile penetranza delle mutazioni mitocondriali e l'estrema eterogeneità clinica di queste patologie. Resta comunque da chiarire la diversa sensibilità tissutale che si osserva nelle mutazioni eteroplasmiche che causano l'encefalomiopatia mitocondriale associata ad acidosi lattica e sindrome stroke-like (MELAS, [Sproule and Kaufmann, 2008](#)) o l'epilessia mioclonica con ragged red fiber (MERRF, [Wu et al, 2010](#)). La mutazione m.8993T>G sul gene codificante la subunità enzimatica ATP6 è un eccellente esempio del fenomeno dell'effetto soglia e dell'importanza del livello di eteroplasmia nel determinare il fenotipo patologico espresso dai pazienti. La NARP (neuropatia, atassia, retinite pigmentosa) e la MILS (Sindrome di Leigh ad ereditarietà materna, un'encefalopatia infantile) sono entrambe patologie dovute a questa mutazione. Quando il paziente presenta un'eteroplasmia del 70% circa, l'espressione clinica è rappresentata dalla NARP, mentre per valori superiori di eteroplasmia (circa 90%), insorgono complicazioni come la sindrome del "bambino flaccido" e la sindrome di Leigh ([Rojo et al, 2006](#)).

### 1.3.3 Mutazioni omoplasmiche: il problema della penetranza

Accanto alle mutazioni eteroplasmiche, sono state identificate mutazioni omoplasmiche associate a patologie prevalentemente ma non esclusivamente tessuto-specifiche quali la neuropatia ottica di Leber (LHON) ([Wallace et al, 1988](#)), la cardiomiopatia ipertrofica mitocondriale ([Taylor et al, 2003](#); [Perli et al, 2012](#)) e la sordità neurosensoriale ([Prezant et al, 1993](#)). Pur nella diversità della loro determinazione genetica, in tali patologie la penetranza della malattia è incompleta e l'espressività clinica, in termini di gravità dei sintomi, può essere molto variabile. Il difetto genetico, sebbene presente in tutte le cellule dell'organismo, si manifesta in modo selettivo, colpendo anche una singola categoria di cellule ma non solo; nell'ambito di intere famiglie portatrici della mutazione solo alcuni individui manifestano un fenotipo patologico.

### 1.3.4 Mutazioni a carico del DNA nucleare

Come già indicato in precedenza, oltre il 90% delle proteine mitocondriali sono espressione di geni nucleari. Infatti, una serie di funzioni all'interno del mitocondrio deriva direttamente o indirettamente da proteine nucleari, ad esempio l'assemblaggio della catena respiratoria e la replicazione. Tuttavia, le patologie causate da mutazioni in questi geni coinvolti nel

funzionamento e assemblaggio delle subunità enzimatiche della catena respiratoria sono attualmente ancora poco note. Le recenti ricerche riguardanti le malattie neurodegenerative ereditarie confermano che un gran numero di quest'ultime derivano dalla mutazione di proteine codificate nel nucleo.

Disfunzioni nei fattori nucleari necessari per l'assemblaggio della catena sono stati associati a varie malattie, tra cui la sindrome di Leigh. Alterazioni dell'apparato replicativo del DNA mitocondriale possono essere fonti di duplicazioni o delezioni e causare neuropatie ottiche.

#### 1.4 Clinica, epidemiologia e terapie

Le malattie mitocondriali possono manifestarsi a qualsiasi età, con una maggiore incidenza nell'età dello sviluppo puberale dovuta al maggior consumo energetico.

Nei neonati queste malattie possono manifestarsi sotto forma di grave anemia oppure con disfunzioni del pancreas, del cuore, dei reni o con alterazioni dei muscoli. Nell'infanzia possono esordire con rallentamento o arresto della crescita, danni renali, atrofia ottica, sordità e disfunzioni endocrine come il diabete. Nell'adulto i sintomi più ricorrenti sono rappresentati l'intolleranza allo sforzo e il facile affaticamento.

Da quanto sopradescritto, appare evidente come le malattie mitocondriali siano clinicamente variabili e perciò difficili da diagnosticare. Spesso richiedono il concorso di diversi specialisti: il neurologo, il pediatra, il cardiologo, il medico di laboratorio, il genetista. In genere, una patologia mitocondriale deve essere sospettata in tutti i pazienti che presentino un'associazione di segni di coinvolgimento del sistema nervoso centrale e periferico associato ad un interessamento multiorgano, con un decorso progressivo.

In alcuni individui, il quadro clinico è caratteristico di una specifica disfunzione mitocondriale e la diagnosi può essere confermata tramite il test del DNA.

In molti individui è necessario ricorrere ad un approccio più complesso, che comprende:

1. l'analisi dell'albero genealogico (con particolare attenzione ai soggetti di sesso femminile, visto che il DNA mitocondriale è di esclusiva eredità materna);
2. la misurazione della concentrazione di acido lattico (che si va gradualmente ad accumulare nei tessuti, che passano alla fermentazione in quanto risulta inefficiente la riduzione dell'ossigeno);

3. la biopsia muscolare per analisi istologiche;

4. l'analisi molecolare della sequenza del mtDNA, qualora sia sospettabile una mutazione a livello del genoma mitocondriale.

L'incidenza delle malattie mitocondriali è fortemente sottostimata sia a causa della difficoltà nel riconoscimento e nella diagnosi che a causa della gravità della maggior parte di esse, che spesso non consentono il raggiungimento della vita extra-uterina.

La prevalenza minima dei pazienti adulti affetti da una patologia mitocondriale è di 12,5 su 100000 individui (Gorman et al, 2015), considerando sia le mutazioni che insorgono a livello del DNA nucleare (nDNA) che quelle a carico del DNA mitocondriale. Studi sulla prevalenza hanno dimostrato che le mitocondriopatie dovute a mutazioni del mtDNA coinvolgono 9.2 adulti su 100000 di età inferiore a 65 anni (McFarland et al, 2010).

Le malattie mitocondriali rappresentano una sfida aperta per la ricerca, poiché ad oggi non è stata identificata alcuna terapia efficace. Tra le molecole potenzialmente benefiche, alcuni studi stanno testando la capacità antiossidante dell'idebenone e la sua efficacia sulle mutazioni del complesso I che causano la neuropatia ottica di Leber (Klopstock et al, 2011). Strategie alternative includono molecole attrivatrice della biogenesi mitocondriale oppure ad azione anti-apoptotica; tuttavia tutti gli approcci restano di tipo sperimentali (Cwerman-Thibault et al, 2011). La difficoltà nell'individuare una possibile terapia deriva anche dalla scarsità di modelli animali in grado di riprodurre la mutazione del mtDNA (Cwerman-Thibault et al, 2011).

#### 1.4.1 Il modello delle cellule staminali pluripotenti indotte

I meccanismi patogenetici alla base dei disturbi mitocondriali rimangono in gran parte ancora sconosciuti soprattutto per la mancanza di modelli cellulari e murini in grado di rappresentare la fisiopatologia determinata da mutazioni a carico del mtDNA. La tecnologia delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) ha aperto a nuove strategie rivoluzionando il campo dei modelli cellulari utilizzati nella ricerca biomedica (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al, 2007). Le iPSCs sono cellule somatiche con caratteristiche simili alle cellule staminali embrionali (ES), ovvero la capacità di auto-rinnovarsi e la possibilità di differenziare in tutti i tessuti dei tre foglietti germinali embrionali (Hanna et al, 2010). Inoltre, possono essere generate da campioni facilmente reperibili quali biopsie cutanee o campioni di sangue. Grazie a queste caratteristiche il loro utilizzo ha permesso di effettuare importanti passi avanti nell'ambito di malattie neurodegenerative e cardiache (Matsa et al, 2014; Peitz et al, 2013).

Negli ultimi anni la tecnologia delle cellule staminali ha assunto un ruolo rilevante anche nell'ambito delle patologie mitocondriali. Differenti gruppi di ricerca, infatti, hanno generato iPSCs partendo da pazienti affetti da differenti patologie mitocondriali, inclusi pazienti affetti da sindrome MELAS e sindrome MERRF (Cherry et al, 2013; Hämäläinen et al, 2013; Chou et al, 2016). Questi studi hanno dimostrato come le iPSCs oltre ad essere in grado di differenziare in cellule adulte quali i neuroni, mostrano una segregazione bimodale del mtDNA mutato dopo la riprogrammazione generando cellule con alti livelli di mutazione e cellule di controllo isogeniche (Hämäläinen et al, 2013). Queste cellule si stanno dimostrando un valido strumento per lo studio dei meccanismi alla base delle malattie mitocondriali e per testare potenziali agenti terapeutici.

### 1.5 Il ruolo delle aminoacil-tRNA sintetasi nella penetranza nelle mutazioni mitocondriali

Per facilitare la scoperta di una possibile terapia per i pazienti con mutazioni nei tRNA mitocondriali è necessario chiarire i meccanismi che ne regolano la penetranza. Mentre nel caso delle mutazioni eteroplasmiche il fenotipo è più facilmente associabile ai livelli di mutazione, nel caso delle mutazioni omoplasmiche, l'estrema variabilità del fenotipo clinico e la tessuto-specificità suggerisce la presenza di fattori nucleari che agiscono da modulatori (Carelli et al, 2003).

I fattori nucleari associati alla biogenesi dei tRNA mitocondriali e alla traduzione sono molteplici e di alcuni non è ancora chiara la funzione. Tra questi, un ruolo fondamentale è svolto dalle aminoacil-tRNA sintetasi (aARSs) (Suzuki et al, 2011), enzimi deputati al legame di ciascuno dei 20 amminoacidi con l'anticodone veicolato dal tRNA cognato. La reazione di aminoacilazione si articola in due fasi: inizialmente si ha attivazione degli amminoacidi tramite ATP con formazione di aminoacil-adenilato, un prodotto intermedio che viene legato all'estremità 3' del tRNA per ottenere il complesso aminoacil-tRNA vero e proprio. Nelle cellule umane esistono sintetasi specifiche per il citoplasma, per i mitocondri o per entrambi in base al compartimento nel quale sviluppano la loro attività catalitica.

L'accuratezza della reazione di aminoacilazione consente una corretta sintesi proteica. In base alla loro struttura e al meccanismo di legame le aARSs sono differenziabili in due classi (I e II) che a loro volta vengono suddivise in sottoclassi che condividono caratteristiche strutturali e

funzionali (Francklyn et al, 1997). Tutte le sintetasi, infatti, presentano un dominio catalitico e un dominio di riconoscimento dell'anticodone entrambi necessari per la reazione di aminoacilazione e l'identificazione delle molecole di tRNA specifiche per ogni amminoacido. Inoltre, per garantire una corretta traduzione, le aaRSs sono dotate di un dominio aggiuntivo in grado di deacilare gli amminoacidi errati e prevenire, dunque, errori durante la sintesi proteica. Negli ultimi anni sono state descritte mutazioni a carico dei vari domini delle aaRSs mitocondriali alcune delle quali, sebbene gli enzimi siano espressi ubiquitariamente, causano malattie tessuto-specifiche (Gotz et al, 2011, Scheper et al, 2007, Riley et al, 2010, Messmer et al, 2011, Sommerville et al, 2017, Moosa et al, 2017).

Parallelamente, numerosi studi condotti sul lievito hanno dimostrato che i livelli delle aminoacil-tRNA sintetasi sono coinvolti nella modulazione dei livelli dei rispettivi tRNA (Fuermann et al, 2003; De Luca et al, 2006; De Luca et al, 2009). In particolare, è stato osservato che, quando sovra-esprese, le sintetasi sono in grado di “curare” gli effetti dovuti alle mutazioni nei tRNA mitocondriali. Per questo motivo questi enzimi vengono identificati con il termine “soppressori”.

Negli stessi anni sono stati condotti studi analoghi per valutare il loro effetto anche su cellule umane: i ibridi *trans*mitocondriali portatori di mutazioni sui tRNA. Questi lavori hanno dimostrato che tre sintetasi mitocondriali umane, mt-LeuRS, mt-ValRS, e mt-IleRS, oltre a migliorare il fenotipo clinico in linee cellulari portatrici di mutazioni nel mt-tRNA<sup>Ile</sup> (MTTI), sono in grado di recuperare il fenotipo patologico anche in linee cellulari portatrici della mutazione m.3243A>G del mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> che causa una patologia molto più grave e complessa, la MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes syndrome) (Perli et al, 2012). In particolare, il nostro gruppo ha dimostrato, in lievito e nei ibridi, che la porzione carbossi-terminale dell'aminoacil-tRNA sintetasi LeuRS (Cterm) e due piccoli frammenti aminoacidici da essa derivati sono sufficienti a correggere le disfunzioni mitocondriali prendendo contatto *in vivo* con il mt-tRNA mutato, stabilizzandone la struttura (Francisci et al, 2011; Perli et al, 2014; Perli et al, 2016).

Studi condotti in anni recenti nel nostro laboratorio hanno dimostrato come la sovra-espressione delle mt-aaRS sia in grado di migliorare il fenotipo causato dalle mutazioni m.3243A>G del mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> e m.8344A>G del mt-tRNA<sup>Lys</sup> in modelli cellulari. Un dato estremamente interessante che è emerso dai nostri esperimenti è che il miglioramento del



fenotipo patologico dipende dalla porzione carbossi-terminale della leucil-tRNA sintetasi (Cterm) e da due piccoli frammenti aminoacidici ( $\beta_{30\_31}$  e  $\beta_{32\_33}$ ) da essa derivati (Perli et al, 2014; 2016). Queste molecole rappresentano quindi dei potenziali strumenti terapeutici per le malattie mitocondriali da mutazioni del mtDNA. Tuttavia, è necessario disporre di strategie adeguate a veicolarle all'interno delle cellule e nel compartimento mitocondriale.

## 1.6 Delivery mitocondriale

Un aspetto importante nello sviluppo di approcci terapeutici efficaci nei disordini mitocondriali è la capacità da parte di molecole "candidate" di giungere nel compartimento mitocondriale. A questo scopo le molecole devono avere la capacità di penetrare facilmente nella cellula ed essere efficacemente accumulate a livello mitocondriale. Una volta pervenute nello spazio extracellulare, infatti, il primo ostacolo da superare è rappresentato dalla membrana cellulare. Molecole relativamente piccole e lipofile riescono a oltrepassare la membrana cellulare passivamente. Una volta nel citoplasma devono però essere in grado di attraversare le membrane mitocondriali, esterna ed interna, per giungere nella matrice. La membrana mitocondriale esterna non presenta un potenziale di membrana ed è relativamente più debole rispetto a quella interna, quindi più facilmente penetrabile. Ben diversa è la situazione della membrana interna, quest'ultima infatti è altamente densa, satura, con carattere idrofobico e con un elevato potenziale di membrana negativo, rappresentando così una formidabile barriera per l'ingresso delle molecole. Per questo le molecole devono presentare proprietà farmacocinetiche particolari; la mancanza di queste proprietà è un rilevante limite nell'applicazione clinica. Negli ultimi anni l'attenzione è stata focalizzata all'identificazione di strategie di delivery in grado di garantire l'ingresso selettivo di molecole nei mitocondri. In particolare, sono stati investigati differenti vettori in grado di penetrare le membrane ed accumularsi a livello mitocondriale, che includono nanoparticelle (Durazo et al, 2012), piccole molecole (Smith et al, 2011) e peptidi (Horton et al, 2008).

### 1.6.1 Nanoparticelle

In ambito medico e farmaceutico le nanoparticelle si stanno sempre più affermando come sistemi capaci di intrappolare farmaci e altri agenti per poi rilasciarli in circolo. Grazie alla loro dimensione e al carattere idrofilico possono essere trasportate col flusso sanguigno, penetrare

negli organi attraverso i capillari e raggiungere i tessuti dove poi vengono assorbite dalle cellule. Grazie a queste caratteristiche, negli ultimi anni l'attenzione si è concentrata sullo sviluppo di nanoparticelle multifunzionali per applicazioni terapeutiche in nanomedicina (Poon et al, 2011; Kateb et al, 2011; Armstead et al 2011).

Nonostante il gran numero di tecniche di bioconiugazione disponibili, il conseguimento di nanosonde multifunzionali dotate di bioattività, specificità di targeting e di stabilità rimane ancora una sfida aperta. I nuovi approcci si avvalgono dell'utilizzo di strutture a forma di gabbie proteiche, come le proteine appartenenti alla famiglia della ferritina (Bode et al, 2011). La ferritina è una molecola composta da 24 subunità auto-assemblanti che formano una proteina globulare simile a un guscio, carica negativamente all'esterno, che racchiude una cavità vuota in cui, fisiologicamente, incapsula il ferro e lo trasporta alle cellule. Ciascun monomero risulta costituito da un residuo N terminale, sulla faccia esterna, ed un residuo COOH terminale all'interno, che possono essere coniugati sia chimicamente che geneticamente conferendogli differenti funzionalità, rappresentando caratteristiche ideali per applicazioni *in vivo* quali il target delivery (Uchida et al, 2010; Valero et al, 2011; Geninatti et al, 2006; Lin et al, 2011).

### 1.6.2 Peptidi

I metodi convenzionali per introdurre agenti terapeutici all'interno delle cellule, quali microiniezione e vettori virali o liposomiali, presentano vari inconvenienti, tra cui bassa efficienza, alta tossicità e scarsa biocompatibilità. Strategie alternative sono state sviluppate a partire dalla capacità di alcune proteine di attraversare le membrane cellulari. Si è giunti così allo sviluppo di particolari vettori in grado di veicolare differenti molecole all'interno delle cellule: i Cell-Penetrating Peptides (CPPs). È stato dimostrato come questi peptidi siano in grado di trasportare differenti molecole come acidi nucleici, polimeri e farmaci a basso peso molecolare (Langel et al, 2011), risultino privi di tossicità e siano in grado di penetrare in differenti tipi cellulari (Heitz et al, 2009). Studi più recenti, si sono concentrati sulla progettazione di molecole con le medesime caratteristiche dei CPPs ma in grado di attraversare anche la matrice mitocondriale interna. Partendo dalle caratteristiche peculiari dei CPPs, ovvero le proprietà cationiche e idrofiliche, e grazie all'incorporazione di residui idrofobici, è stata sviluppata una classe di peptidi sintetici con un efficace assorbimento cellulare e una specifica localizzazione a livello dei mitocondri: Mitochondria-Penetrating Peptides (MPPs) (Jean et al, 2016). Tali peptidi presentano caratteristiche peculiari, quali sintesi diretta e biocompatibilità,

che li rende una classe di trasportatori mitocondriali efficienti in grado di oltrepassare le membrane organiche difficili da penetrare (Horton et al, 2008).

## 2. Scopo dello studio

Lo scopo di questo studio è di avvicinare le molecole peptidiche da noi identificate all'applicazione terapeutica. Per approcciare questo risultato ho dato priorità ai seguenti obiettivi:

- i.) Sviluppo di strategie per veicolare le molecole in studio alla matrice mitocondriale.
- ii.) Analisi dell'effetto tessuto-specifico delle mutazioni dei mt-tRNA ed individuazione di eventuali meccanismi terapeutici dotati di specificità tissutale.

## 3. Risultati

### 3.1 Sviluppo di strategie per veicolare le molecole in studio alla matrice mitocondriale

#### 3.1.1 Elaborazione di costrutti contenenti il frammento aminoacidico $\beta$ 32\_33 derivato dal Cterm

Tra i due frammenti aminoacidici derivati dal Cterm, la sequenza  $\beta$ 32\_33 è risultata essere la più efficace e per tale motivo è stata scelta per gli studi successivi. Abbiamo così fuso il frammento  $\beta$ 32\_33 con fluorescina isotiocianato (FITC) alla lisina C-terminale in modo da visualizzare il frammento all'interno delle cellule. Inoltre, per facilitare il passaggio delle membrane plasmatiche e mitocondriali, la molecola  $\beta$ 32\_33-FITC è stata coniugata all'estremo N-terminale con due piccoli oligomeri sintetici: i) FRFK, una sequenza di lisina (K), arginina (R) e fenilalanina (F) e ii) HisTag, una sequenza ricca di istidine; entrambe note per la capacità di penetrare nelle cellule e giungere nel compartimento mitocondriale (Horton et al, 2008; Seo et al, 2011). Il razionale alla base di questa scelta risiede in alcune importanti prerogative delle due presequenze: i) carica positiva e lipofilia, due proprietà necessarie per il passaggio attraverso le membrane citoplasmatiche e mitocondriali; ii) piccole dimensioni; iii) relativa facilità di sintesi; iv) biocompatibilità.

Ad entrambe le sequenze aminoacidiche è stata aggiunta una ulteriore lisina (K) all'estremo C-terminale per il legame con il FITC, per gli esperimenti di visualizzazione.

Abbiamo così ottenuto i due seguenti costrutti:

1.  **$\beta$ 32\_33-HisTag**: HHHHHHKKSFSPRTALINFLV-K(FITC);
2.  **$\beta$ 32\_33-FRFK**: FRFKKSFSPRTALINFLV-K(FITC).

##### *3.1.1.1 Il peptide $\beta$ 32\_33, preceduto da piccoli oligomeri sintetici, è in grado di penetrare nelle cellule umane*

Per prima cosa abbiamo incubato i cibridi WT con concentrazioni crescenti di entrambi i costrutti e abbiamo monitorato l'ingresso nelle cellule a tempi diversi (1, 2, 6, 12, 24 e 36 ore). I risultati ottenuti ci hanno mostrato che entrambi i costrutti erano in grado di oltrepassare la membrana citoplasmatica dopo circa 6 ore e che il segnale all'interno delle cellule risultava stabile fino a 24 ore. Inoltre, le cellule non risultavano danneggiate dal processo di uptake. Abbiamo anche testato diverse concentrazioni identificando 0.5 $\mu$ M come quella ottimale per la visualizzazione. Quantità superiori producevano infatti un segnale troppo intenso per riuscire a

localizzare il peptide all'interno delle cellule. A questo punto abbiamo verificato la loro localizzazione all'interno delle cellule. Dopo 12 ore dall'incubazione con i costrutti, abbiamo trattato le cellule con sonde vitali specifiche o per i lisosomi (Lisotracker) o per i mitocondri (Mitotracker). In Figura 1 è possibile osservare come entrambi i costrutti penetrino nelle cellule e che il segnale si sovrappone parzialmente al Mitotracker, suggerendo una loro localizzazione mitocondriale. In particolare, il peptide con la presequenza FRFK sembra avere una maggiore affinità per i mitocondri rispetto a quello con la presequenza HisTag. Nessuno dei costrutti localizza con i lisosomi.

#### *3.1.1.2 I costrutti $\beta$ 32\_33 co-localizzano con i mitocondri*

Dal momento che la presequenza FRFK è risultata essere migliore per veicolare il peptide verso il compartimento mitocondriale, è stato scelto questo oligomero per gli esperimenti successivi. Abbiamo così progettato diversi costrutti e valutato la loro capacità di localizzare con i mitocondri e migliorare il fenotipo patologico. I costrutti testati sono stati i seguenti:

1. **FRFK- $\beta$ 32\_33-FITC (F $\beta$ ):** composto dalla presequenza FRFK e dalla sequenza aminoacidica  $\beta$ 32\_33;
2. **FRFK-scramble-FITC (FS):** composto dalla presequenza FRFK e dalla sequenza aminoacidica  $\beta$ 32\_33 alterata per verificare se è la sequenza specifica, e non la composizione aminoacidica, ad essere importante per il recupero del fenotipo patologico;
3. **FRFK- $\beta$ 32\_33 (noKKR)-FITC (FA):** un composto in cui i tre residui carichi positivamente (K-K-R) della sequenza  $\beta$ 32\_33 vengono sostituiti da residui di alanina (A) che mostra una carica neutra per valutare se il numero di cariche positive possa influire sul rescue;
4.  **$\beta$ 32\_33-FITC ( $\beta$ ):** composto dalla sola sequenza aminoacidica  $\beta$ 32\_33 per verificare se la sequenza è in grado di oltrepassare le membrane citoplasmatica e mitocondriale in assenza di una presequenza specifica;
5. **FRFK-FITC (F):** composto dalla sola presequenza FRFK da utilizzare come controllo negativo.

Dopo 12 ore di incubazione con i costrutti alla concentrazione di 0.5 $\mu$ M, le cellule sono state trattate con la sonda specifica per i mitocondri e successivamente visualizzate con un microscopio a fluorescenza. Come evidente dalla Figura 2 tutti i peptidi localizzano

parzialmente con i mitocondri. È interessante notare come che anche il peptide  $\beta$ 32\_33, privo della presequenza, sia in grado di raggiungere il compartimento mitocondriale.

*3.1.1.3 I costrutti  $\beta$ 32\_33 migliorano la vitalità cellulare e riducono l'apoptosi in ibridi portatori della mutazione 3243A>G*

Abbiamo testato diverse concentrazioni di ogni costrutto e valutato la loro tossicità cellulare e/o mitocondriale. Ibridi WT e patologici (MELAS) sono stati piastrati in multiwell da 96 e dopo 4 ore dal piastramento sono stati incubati con tutti e 5 i costrutti a 3 diverse concentrazioni (5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M). Dopo 12 ore, è stato effettuato il saggio Mitochondrial ToxGlo™ Assay e valutata la tossicità cellulare. Come evidente dalla Figura 3A nessuna concentrazione è risultata particolarmente cito-tossica e mito-tossica, nonostante la concentrazione di 5 $\mu$ M, sia nei ibridi di controllo che in quelli patologici, sia risultata quella ottimale e pertanto utilizzata per gli esperimenti successivi.

A questo punto abbiamo valutato l'effetto dei peptidi sulla vitalità cellulare in ibridi di controllo (WT) e ibridi MELAS (m.3243). Dopo 3 ore dal piastramento, le cellule sono state incubate con tutti e 5 i costrutti alla concentrazione di 5 $\mu$ M.

Dal giorno successivo le cellule sono state mantenute per 24 ore in due condizioni di crescita diversa: una condizione normale (in presenza di glucosio) e una condizione di stress (in presenza di galattosio che costringe le cellule ad utilizzare la fosforilazione ossidativa come fonte di ATP). Dopo 24 ore in galattosio i ibridi mutati mostrano una marcata riduzione del numero di cellule vive rispetto ai ibridi di controllo (Figura 3B). È interessante notare come i costrutti F $\beta$  e  $\beta$  siano in grado di migliorare la vitalità delle cellule MELAS, nonostante solo F $\beta$  ne comporti un aumento significativo (Figura 3B).

*3.1.1.4 Il peptide FRFK- $\beta$ 32\_33 migliora le competenze energetiche delle cellule MELAS*

I ibridi patologici, oltre ad una riduzione della vitalità cellulare mostrano anche un deficit dello stato bioenergetico. Abbiamo così investigato se l'aumento della vitalità cellulare fosse correlato con un miglioramento del deficit bioenergetico. Abbiamo incubato i ibridi WT e patologici con i peptidi alla concentrazione di 5 $\mu$ M e misurato il consumo di ossigeno dopo 24 ore. Come è possibile osservare in Figura 4 il solo costrutto F $\beta$  induce un aumento statisticamente significativo del consumo di ossigeno in condizioni normali (glucosio).

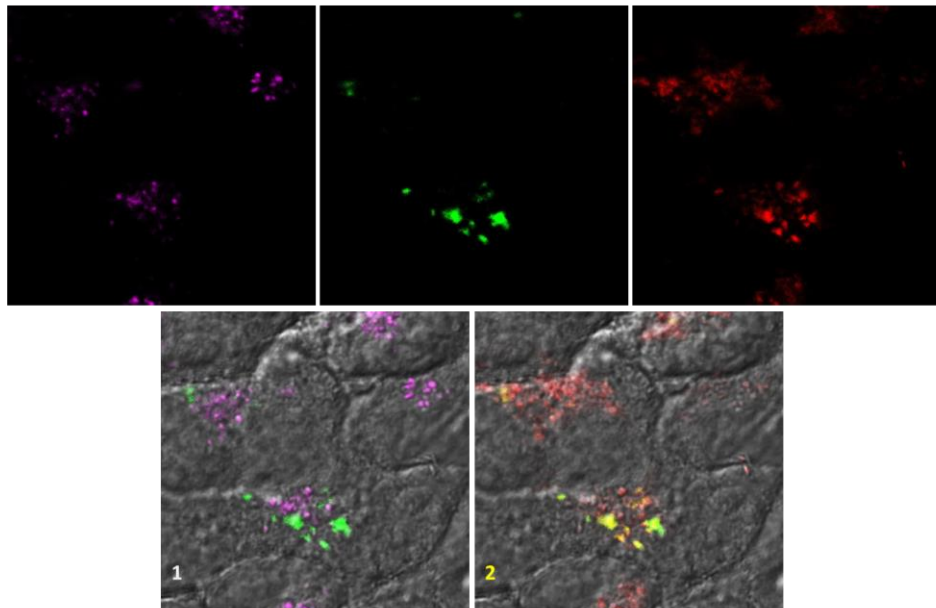
*3.1.1.5 L'effetto "curativo" della sequenza aminoacidica  $\beta_{32\_33}$  è osservabile anche in cellule MERRF*

Poiché avevamo già dimostrato in precedenza come il Cterm e i frammenti  $\beta_{30\_31}$  e  $\beta_{32\_33}$  migliorino il fenotipo sia di cibridi mutati derivati da pazienti MELAS che da pazienti MERRF, abbiamo iniziato ad investigare l'effetto dei nostri costrutti anche su cibridi portatori della mutazione m.8344A>G (cibridi MERRF).

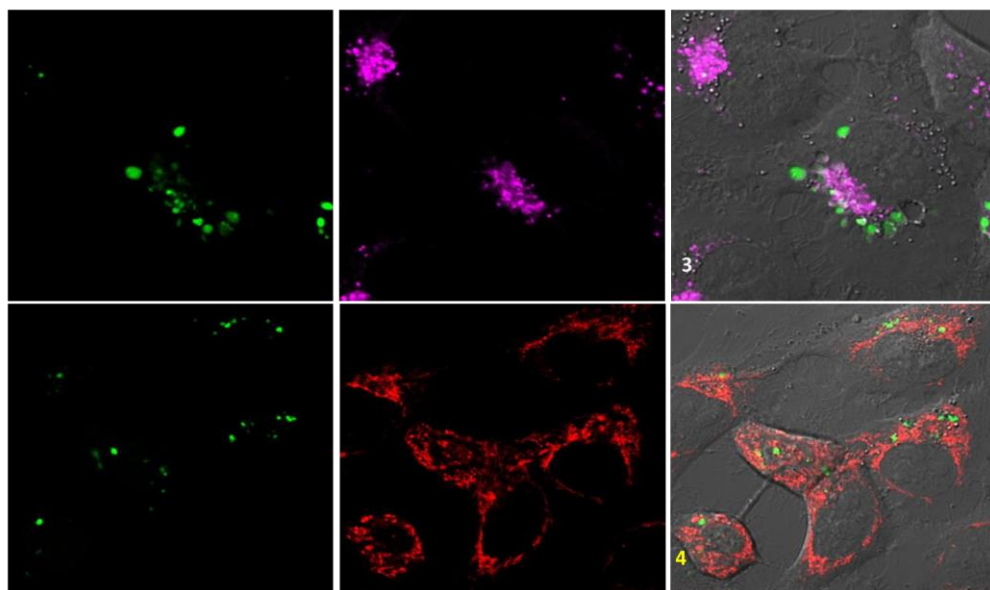
Dopo aver accertato la localizzazione mitocondriale dei peptidi e stabilito la concentrazione ottimale, risultata essere anche in questo caso di 5 $\mu$ M, abbiamo proceduto inizialmente a valutare l'effetto dei costrutti sulla vitalità cellulare. Come evidente nella Figura 5 i cibridi MERRF mostrano una significativa riduzione della vitalità cellulare dopo 24 ore di incubazione in terreno contenente galattosio. L'incubazione con i costrutti F $\beta$  e  $\beta$  comporta un aumento statisticamente significativo del numero di cellule vive (Figura 5).

**Figura 1**

**A**



**B**



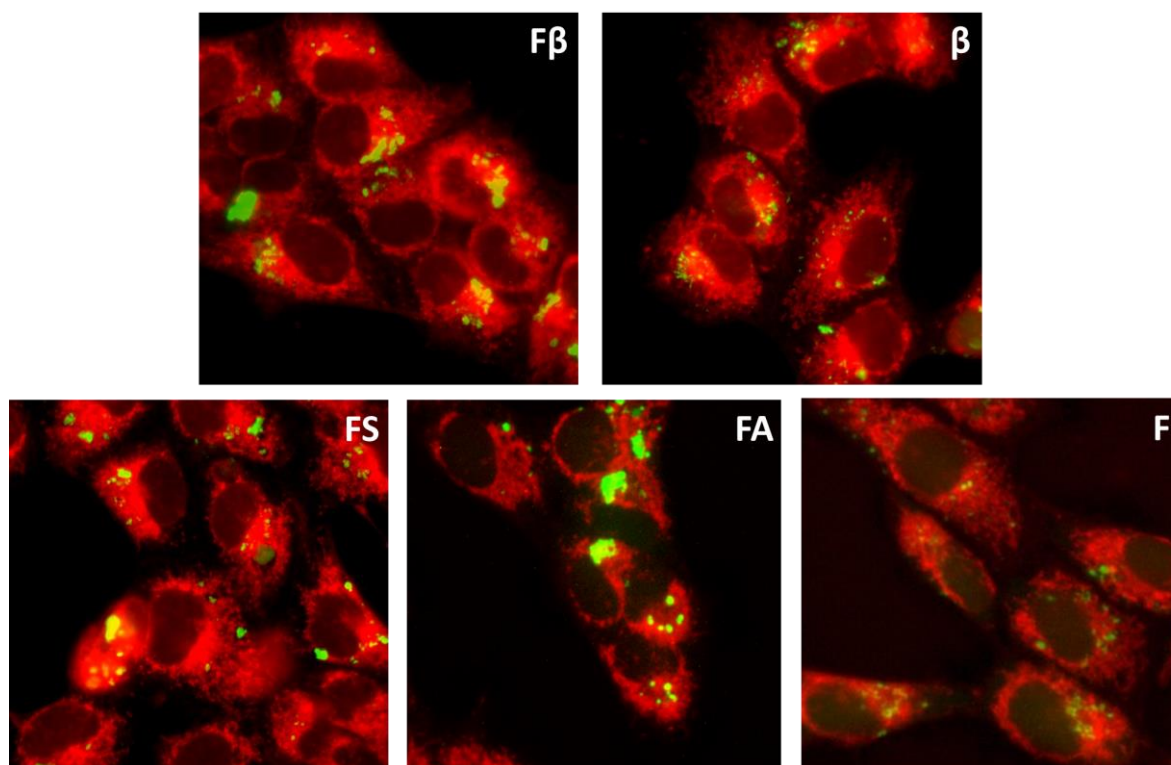
**Il peptide  $\beta$ 32\_33, preceduto da piccoli oligomeri sintetici, è in grado di penetrare nelle cellule umane**

**A.** Il peptide  $\beta$ 32\_33-FRFK (0.5 $\mu$ M, verde) mostra una buona co-localizzazione con i mitocondri (marcati con Mitotracker 200nM, rosso) mentre sembra non essere presente nei lisosomi (marcati con Lisotracker 100nM, viola) come è possibile osservare nei pannelli 1 e 2 che mostrano la doppia colorazione rispettivamente con Lisotracker e Mitotracker.

**B.** Il peptide  $\beta$ 32\_33-HisTag (0.5 $\mu$ M, verde) mostra una debolissima localizzazione mitocondriale (Mitotracker 200nM, rosso) e non sembra localizzare con i lisosomi (Lisotracker 100nM, viola) come è possibile osservare nei pannelli 3 e 4 che mostrano la doppia colorazione rispettivamente con Lisotracker e Mitotracker.



**Figura 2**

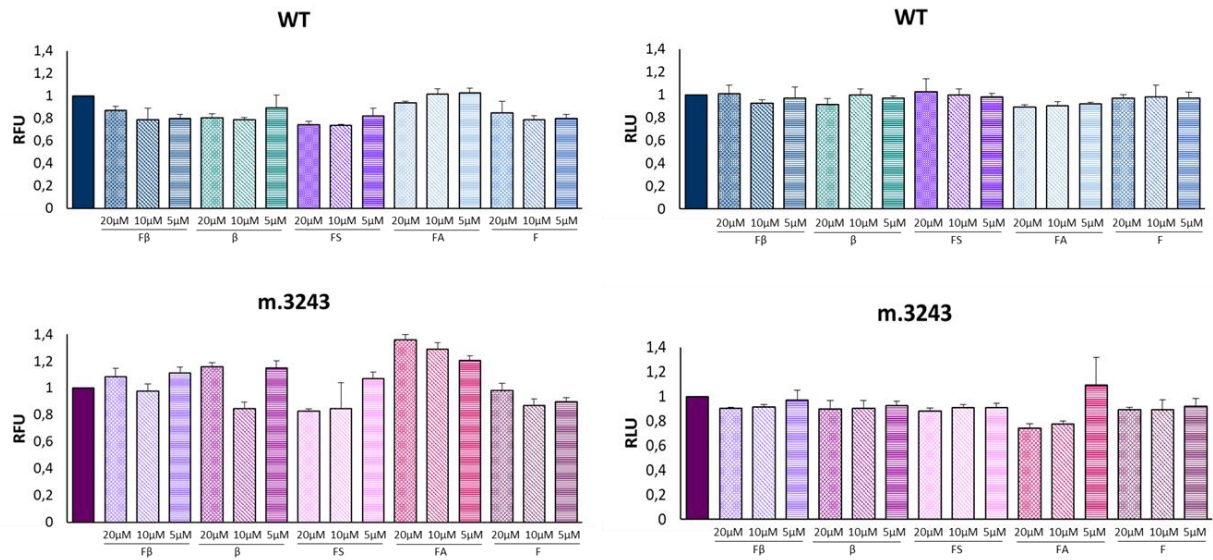


**I peptidi  $\beta$ 32\_33 localizzano con i mitocondri**

Tutti i peptidi (verde) testati mostrano una buona co-localizzazione con i mitocondri (marcati con Mitotracker 200nM, rosso).

**Fβ**: FRFK- $\beta$ 32\_33-FITC; **β**:  $\beta$ 32\_33-FITC; **FS**: FRFK-scramble-FITC; **FA**: FRFK- $\beta$ 32\_33(no K-K-R)-FITC; **F**: FRFK-FITC.

**Figura 3**

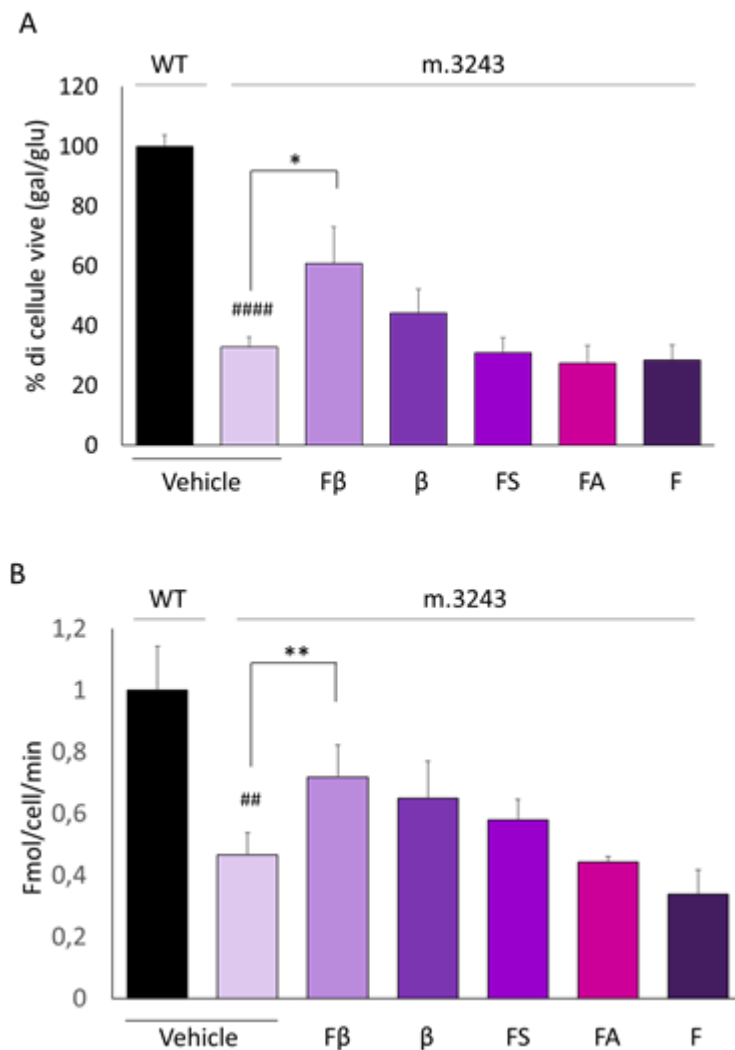


**I peptidi non risultano tossici per le cellule**

Cibridi di controllo (WT) e cibridi patologici (m.3243) sono stati incubati con i peptidi a 3 concentrazioni diverse e dopo 12h ne è stata valutata la cito-tossicità (misurando la fluorescenza, RFU) e la mito-tossicità (misurando la luminescenza, RLU).

**FB:** FRFK-β32\_33-FITC; **β:** β32\_33-FITC; **FS:** FRFK-scramble-FITC; **FA:** FRFK-β32\_33(no K-K-R)-FITC; **F:** FRFK-FITC

**Figura 4**



**I peptidi recuperano il fenotipo patologico nei ibridi MELAS**

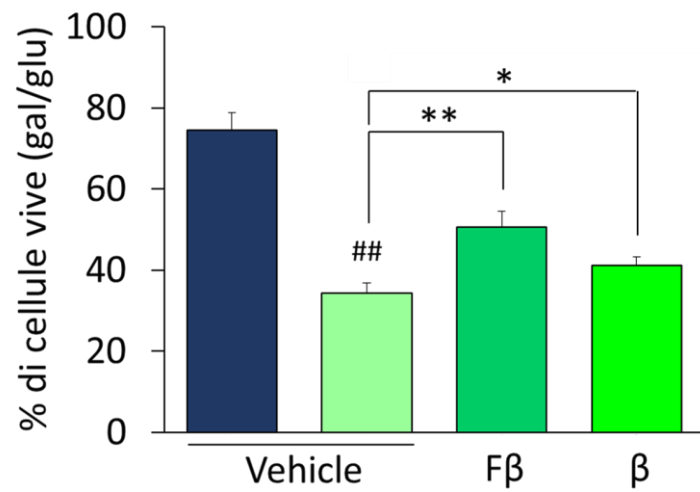
**A.** Percentuale di cellule vive nei ibridi trattati con i peptidi e incubati in glucosio o galattosio per 24 ore. Il numero di cellule vive in galattosio è normalizzato per il numero di cellule vive in glucosio allo stesso tempo.

**B.** Valutazione dello stato bioenergetico delle cellule. I ibridi di controllo e patologici sono stati incubati con i peptidi in glucosio e dopo 24 ore è stato valutato il consumo di ossigeno nelle cellule intatte. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti.

##  $p < 0.01$  per ibridi m.3243 non trattati vs WT non trattati. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  per ibridi m.3243 trattate vs ibridi m.3243 non trattate (T-test).

**Fβ:** FRFK-β32\_33-FITC; **β:** β32\_33-FITC; **FS:** FRFK-scramble-FITC; **FA:** FRFK-β32\_33(no K-K-R)-FITC; **F:** FRFK-FITC

**Figura 5**



**I peptidi migliorano la vitalità cellulare dei cibridi MERRF**

I cibridi sono stati trattati con i peptidi e incubati in glucosio o galattosio per 24 ore. Il numero di cellule vive in galattosio è normalizzato per il numero di cellule vive in glucosio allo stesso tempo.

I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di tre esperimenti.

##  $p < 0.01$  per cibridi m.8343 non trattati vs WT non trattati. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  per cibridi m.8343 trattate vs cibridi m.8343 non trattate (T-test).

**Fβ**: FRFK-β32\_33-FITC; **β**: β32\_33-FITC.

### 3.1.2 Molecole di ferritina umana come ipotetico carrier

In ambito medico e farmaceutico numerosi sforzi sono stati rivolti all'individuazione di sistemi in grado di veicolare agenti terapeutici all'interno delle cellule, in modo selettivo e con un elevato grado di biocompatibilità.

Stante la prospettiva futura di veicolare nelle cellule le molecole terapeutiche oggetto del nostro studio, abbiamo parallelamente iniziato la ricerca di un ipotetico carrier, focalizzando la nostra attenzione sulla ferritina umana per le sue peculiarità particolarmente favorevoli, ovvero: la sua fisiologica presenza nel sangue e all'interno delle cellule umane, la ubiquitarietà del suo recettore (TfR1) su tali cellule, la sua stabilità in vitro e nel plasma. La ferritina è una proteina multimerica, formata da 24 subunità che interagiscono formando una sfera cava. Di conseguenza essa espone, sia sulla superficie esterna che interna, numerose catene laterali di amminoacidi quali cisteine, lisine, acido glutammico ed acido aspartico, che possono essere utilizzate per legare ad essa, per via chimica, diverse molecole dotate di funzioni diverse, tra le quali: i) peptidi dotati di attività "rescuing", ii) agenti per il targeting mitocondriale, iii) composti necessari per rilevare la localizzazione intracellulare. Inoltre, la superficie esterna espone anche le estremità ammino (N)-terminali dei 24 monomeri, che possono essere legate a molecole di natura peptidica per via genetica.

#### *3.1.2.1 Progettazione e localizzazione di molecole di HFt senza presequenze mitocondriali*

In collaborazione con il Dott. Ceci e la Dott.ssa Morea dell'Istituto di Biologia e Patologia Molecolari del CNR, abbiamo valutato la capacità di ingresso della ferritina nel nostro modello cellulare, ovvero i cibridi *trans*mitocondriali. Tutti i costrutti progettati, prodotti mediante ingegneria genetica e sintesi chimica, ed espressi nel ceppo di *Escherichia coli* BL21(DE3) sono elencati nella Tabella 1.

Il primo costrutto prodotto, HFt-FITC, contiene la molecola di ferritina (HFt) i cui residui di cisteina sulla superficie esterna sono stati coniugati, mediante sintesi chimica, alla fluoresceina isotiocianato (FITC), per permetterne la visualizzazione all'interno delle cellule. Dopo aver individuato la concentrazione opportuna (0,1 mg/mL) abbiamo trattato le cellule di controllo e patologiche con la molecola sopradescritta constatando, dopo 2 ore, attraverso l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza, la presenza della molecola stessa all'interno delle cellule in esame (Figura 6A). A tal punto, abbiamo valutato la precisa localizzazione della molecola all'interno delle nostre cellule, considerando la possibilità che molecole "esterne", una volta internalizzate,

possano essere sequestrate nel comparto lisosomiale e successivamente degradate. Abbiamo così trattato le cellule con la molecola HfT-FITC effettuando, dopo 2 ore, una colorazione vitale per i lisosomi e per i mitocondri, con sonde specifiche (rispettivamente LysoTracker e MitoTracker). Come evidente nella Figura 6B-C, la molecola HfT-FITC, una volta internalizzata nella cellula, non localizzava nel comparto mitocondriale bensì in quello lisosomiale, andando presumibilmente incontro ad una rapida degradazione della parte proteica.

Come noto in letteratura, esistono molecole in grado di prevenire la compartimentalizzazione lisosomiale. Abbiamo pertanto somministrato alle cellule il composto HfT-RLA-FITC, nel quale i residui di lisina esposti sulla superficie esterna di HfT sono coniugati chimicamente con una molecola di escape lisosomiale (RLA), osservandone così una localizzazione non lisosomiale (Figura 6D).

Parallelamente, la molecola HfT-FITC è stata coniugata anche con la sequenza amminoacidica  $\beta$ 32\_33 di nostro interesse, in assenza o in presenza della sequenza di *escape* lisosomiale RLA. I ibridi *trans*mitocondriali sono stati così incubati per 2h con le molecole HfT-RLA-FITC, HfT- $\beta$ 32\_33-FITC e HfT- $\beta$ 32\_33-RLA-FITC, tutte alla concentrazione di 0.1 mg/mL, e successivamente trattate con la sonda MitoTracker. Come evidente nella Figura 6E nessuna delle tre molecole così composte sembrava localizzare nel comparto mitocondriale.

#### 3.1.2.2 Progettazione di molecole di HfT fuse con presequenze mitocondriali

Dal momento che le molecole di Ferritina progettate non mostravano una localizzazione mitocondriale, abbiamo iniziato a progettare molecole di HfT legate con specifiche sequenze di *targeting* mitocondriale (MTS). È stata quindi effettuata una revisione della letteratura per individuare le sequenze MTS migliori da unire alla ferritina per consentirne l'entrata nei mitocondri. In particolare, sono state prese in esame le sequenze di proteine umane codificate dal nucleo e a localizzazione mitocondriale, nelle quali, le sequenze MTS, sono state individuate in seguito ad allineamento con sequenze omologhe mediante metodi Bioinformatici. Al contrario delle regioni globulari, che sono evolutivamente conservate, le presequenze sono altamente variabili sia in lunghezza che in sequenza. La maggior parte delle MTS individuate sono molto lunghe (> 50 residui) e, di conseguenza, difficili da coniugare con la ferritina sia per via chimica che genetica. Da un lato, la sintesi dei peptidi più lunghi di circa 30 amminoacidi diventa poco affidabile, ed è quindi difficile ottenere peptidi di 50 amminoacidi da coniugare chimicamente alla ferritina; dall'altro, l'unione per via genetica di tali sequenze all'estremità N-

terminale della ferritina può causare dei problemi per il corretto ripiegamento (*folding*) di ciascuna subunità e/o per l'assemblaggio delle 24 subunità nella struttura quaternaria. Abbiamo quindi selezionato la MTS più corta tra quelle investigate, ovvero quella di Cox8A, contenente 25 residui, e l'abbiamo unita all'estremità N-terminale della ferritina mediante ingegneria genetica (MTS-Cox8A-HFt). Nonostante questo costrutto si esprimesse in grandi quantità, come gli altri costrutti basati su ferritina, la proteina non era solubile, ma era localizzata quasi esclusivamente nei corpi inclusi. Questi risultati suggeriscono un problema di assemblaggio del 24-mero, presumibilmente dovuto all'interferenza della MTS di Cox8A, in quanto in seguito a problemi di folding le proteine vanno generalmente incontro a degradazione più che a precipitazione.

D'altra parte, anche la coniugazione dell'estremità N-terminale della ferritina a sequenze ricche in cariche positive, come RLA o lo stesso peptide  $\beta_{32\_33}$ , ostacola l'ottenimento di un costrutto solubile, presumibilmente in quanto l'elevata concentrazione di cariche positive dovuta alla sovra-espressione della proteina danneggia le membrane cellulari di E. Coli.

Per questo motivo, le sequenze RLA sono state legate chimicamente ai gruppi amminici di residui di lisina nei costrutti riportati in Tabella 1.

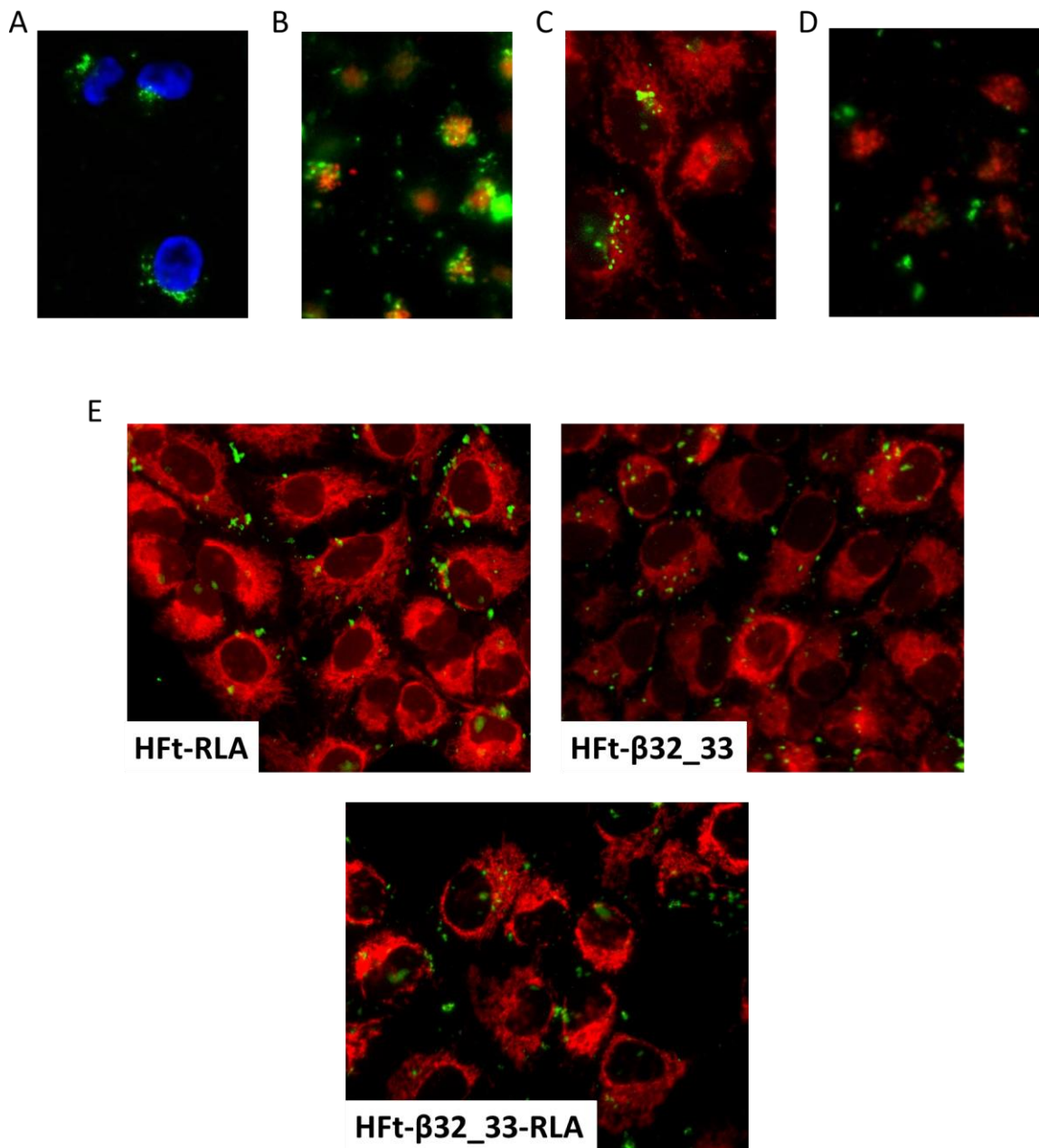
## Tabella 1

### Costrutti di ferritina prodotti

	Frammento $\beta$ 32_33	Molecola di escape lisosomiale	Sequenza MTS	Molecola di FITC	Espressione	Localizzazione cellulare
<b>Hft</b>	No	No	No	Si	Si	Citoplasma/lisosomi
<b>Hft-RLA</b>	No	Si	No	Si	Si	Citoplasma
<b>Hft-<math>\beta</math>32_33</b>	Si	No	No	Si	Si	Citoplasma
<b>Hft-<math>\beta</math>32_33-RLA</b>	Si	Si	No	Si	Si	Citoplasma
<b>MTS-Cox8A-Hft</b>	No	No	Si	Si	No	na



**Figura 6**



**Localizzazione delle molecole di Hft all'interno delle cellule**

**A-C.** La molecola di ferritina, somministrata alle cellule, è in grado di oltrepassare la membrana citoplasmatica (**A**, Hft in verde, nuclei in blu, 40x) ma viene internalizzata dai lisosomi (**B**, Hft in verde, lisosomi in rosso, 40X) e non localizza con i mitocondri (**C**, Hft in verde, mitocondri in rosso, 40X).

**D.** La molecola Hft-RLA non mostra una localizzazione lisosomiale (Hft-RLA in verde, lisosomi in rosso, 40X).

**E.** Le molecole Hft-RLA, Hft-β32\_33, Hft β32\_33-RLA non mostra una localizzazione mitocondriale (molecole di Hft in verde, mitocondri in rosso, 40X).

### 3.2 Analisi dell'effetto tessuto-specifico delle mutazioni dei mt-tRNA ed individuazione di eventuali meccanismi terapeutici dotati di specificità tessutale

#### 3.2.1 Produzione di iPSCs da fibroblasti umani portatori della mutazione m.3243A>G

I ibridi *transmitocondriali* rappresentano il modello cellulare più utilizzato nell'ambito delle patologie mitocondriali per il basso costo e la facilità di manipolazione ma, poiché derivano da cellule neoplastiche, non sono in grado di riprodurre il fenotipo biochimico dei tessuti più comunemente colpiti dalle malattie mitocondriali quali il tessuto muscolare e cerebrale. È chiaro quindi come sia nata l'esigenza di un modello cellulare in grado di rappresentare gli effetti tessuto-specifici delle mutazioni del mtDNA. Negli ultimi anni la differenziazione in diversi tipi cellulari a partire da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) ottenute da pazienti affetti da patologie mitocondriali (Cherry et al, 2013; Hämäläinen et al, 2013; Chou et al, 2016) ha aperto una nuova strada per lo studio della tessuto-specificità delle malattie mitocondriali. Le iPSCs derivate dai pazienti rappresentano un'enorme risorsa sia per lo studio dei meccanismi patogenetici di queste patologie sia per lo sviluppo di nuove molecole terapeutiche.

Nel nostro laboratorio abbiamo collezionato, negli ultimi anni, fibroblasti provenienti da pazienti affetti dalla sindrome MELAS, caratterizzati da percentuali diverse di eteroplasmia (dal 45% al 65%). Per la produzione di iPSCs inizialmente abbiamo selezionato fibroblasti con un'elevata percentuale di eteroplasmia (65%). Nonostante i ripetuti tentativi, non siamo riusciti ad ottenere colonie mature a partire da tali fibroblasti. Abbiamo deciso quindi di utilizzare fibroblasti con una percentuale minore di eteroplasmia (intorno al 50%) ottenendo, questa volta, colonie mature. Infatti, dopo circa 30 giorni di riprogrammazione e mantenimento, siamo riusciti ad identificare in modo chiaro la formazione di colonie mature che apparivano tondeggianti e compatte, come si può osservare in Figura 7A. Per confermare la natura delle colonie osservate abbiamo effettuato l'analisi dei marcatori di pluripotenza mediante immunofluorescenza. Tutte le colonie che apparivano tondeggianti e compatte sono risultate positive alla colorazione per il marcatore della superficie cellulare specifico per le cellule staminali pluripotenti, TRA 1-60 (Figura 7B). Siamo così riusciti ad isolare 12 colonie e, dopo averle espanse, abbiamo effettuato un'ulteriore analisi per la verifica dei marcatori di pluripotenza (Oct4, Sox2, Lin28, L-Myc, Klf4) mediante PCR. Delle 12 colonie ottenute solo 7 sono risultate positive alla PCR (Figura 7C).

### 3.2.2 Caratterizzazione delle colonie di iPSCs

A questo punto abbiamo verificato il livello di eteroplasmia delle colonie (iMS-1/7) osservando valori compresi tra il 7% e il 77% (Figura 8). Per gli studi successivi di differenziamento abbiamo deciso di utilizzare la colonia con la percentuale maggiore (77%, iMS-4) e quella con la percentuale minore (7%, iMS-1) da utilizzare come controllo isogenico.

Per escludere la presenza di eventuali alterazioni del DNA mitocondriale secondarie al processo di riprogrammazione abbiamo sequenziato il mtDNA delle due colonie cellulari, che ci ha permesso di escludere la presenza di nuove mutazioni. Abbiamo inoltre verificato anche l'eventuale presenza di delezioni nella molecola di mtDNA, escludendo anche in questo caso alterazioni dovute alla riprogrammazione.

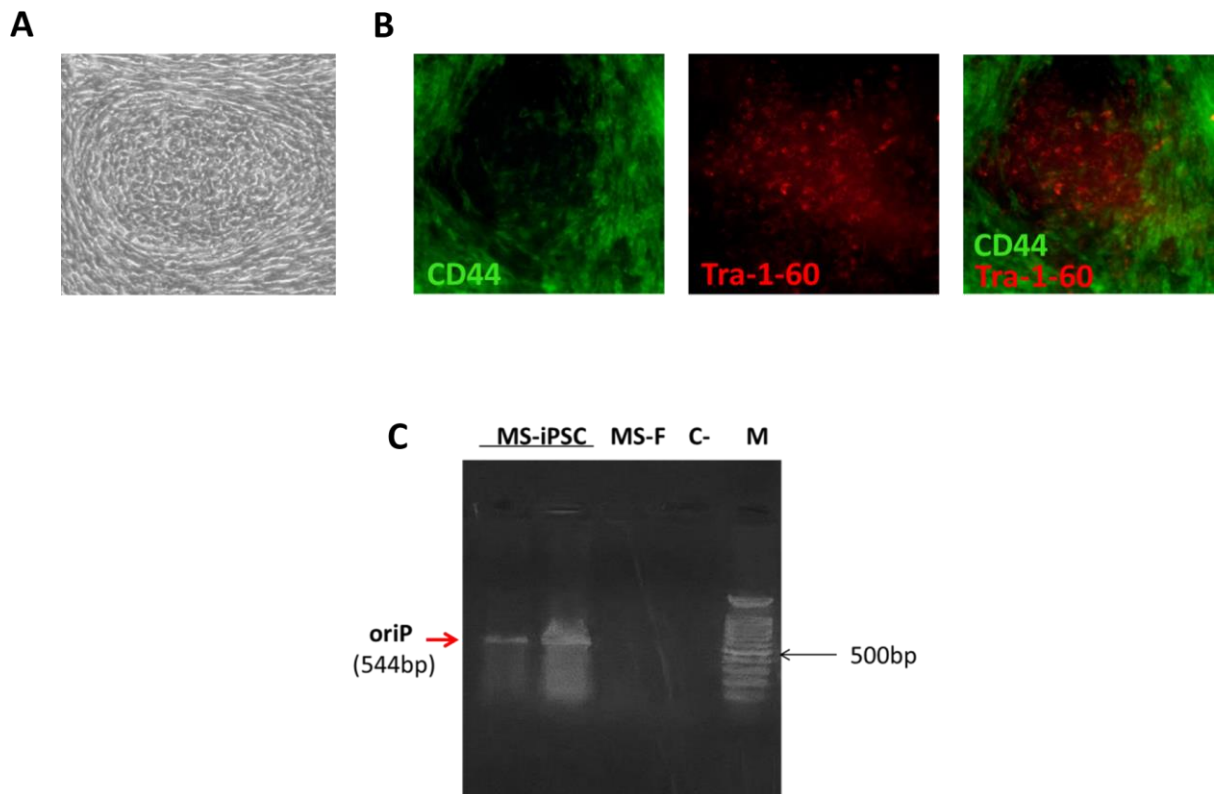
Per verificare le proprietà di pluripotenza dei cloni abbiamo effettuato il saggio di formazione del teratoma. A questo scopo, cloni di cellule iPSCs sono stati iniettati in topi immunodepressi. In ogni animale si sono sviluppati teratomi, contenenti tessuti di derivazione ectodermica, mesodermica ed endodermica (Figura 9).

### 3.2.3 Produzione e caratterizzazione di cellule staminali neurali (NSCs)

Lo scopo della produzione di cellule staminali da pazienti affetti da patologie mitocondriali è la possibilità di differenziarle in tipi cellulari diversi, quali neuroni, cardiomiociti e cellule muscolari, per poter così investigare la tessuto-specificità di queste patologie.

Una volta identificate e caratterizzate le colonie ideali per il nostro studio, abbiamo iniziato il differenziamento di questi cloni in neuroni. Il primo passo nel differenziamento neurale è la formazione di precursori neurali: le cellule staminali neurali (NSCs). Abbiamo così indotto le nostre colonie verso un fenotipo neurale, ottenendo la produzione di NSCs. Infatti, le nostre cellule sono risultate positive per differenti markers neurali quali Nestina, Pax6, SOX1 e SOX2 (Figura 10). Ad oggi stiamo continuando il differenziamento di queste cellule in neuroni.

Figura 7



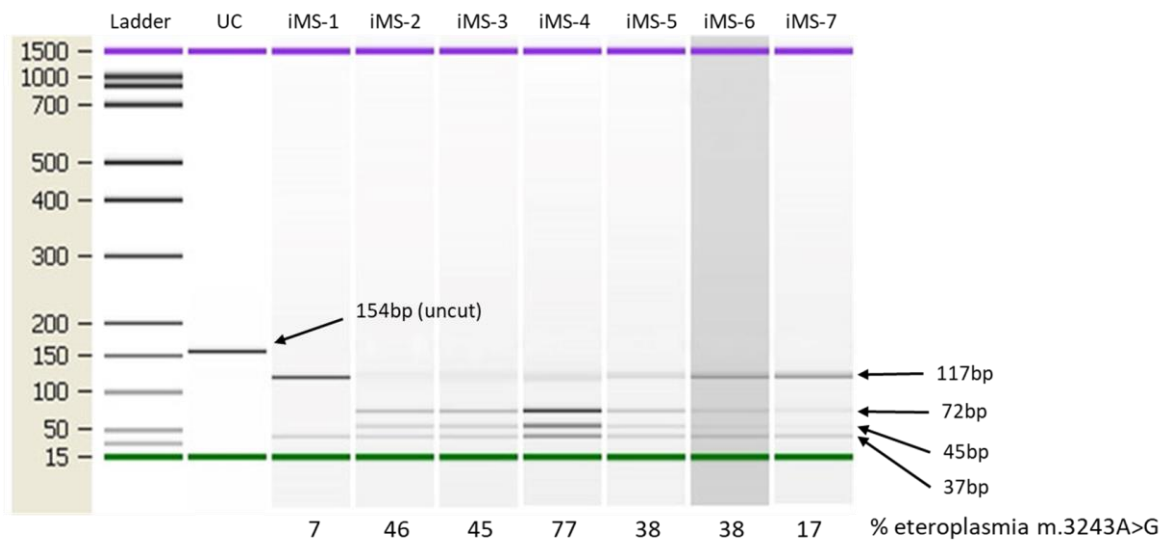
#### Caratterizzazione delle colonie di iPSC

**A.** Immagine rappresentativa di una colonia matura di iPSC ottenuta da fibroblasti portatori della mutazione m.3243A>G (Contrasto di fase, 10X)

**B.** Verifica della presenza dei marcatori di pluripotenza mediante immunofluorescenza. L'immagine mostra una colonia matura di iPSC marcata con anticorpi specifici per fibroblasti (CD44, verde) e per cellule staminali (Tra1-60, rosso) (Ingrandimento 10X)

**C.** Verifica della presenza dei marcatori di pluripotenza mediante PCR. Detenzione del vettore episomale (oriP) contenete i fattori trascrizionali specifici per le cellule staminali embrionali (Oct4, Sox2, Lin28, L-Myc, Klf4). Immagine rappresentativa di gel d'agarosio. MS-iPSC: cloni di cellule staminali pluripotenti indotte derivati da fibroblasti MELAS; MS-F: fibroblasti MELAS; C-: controllo negativo; M: Marker (100bp).

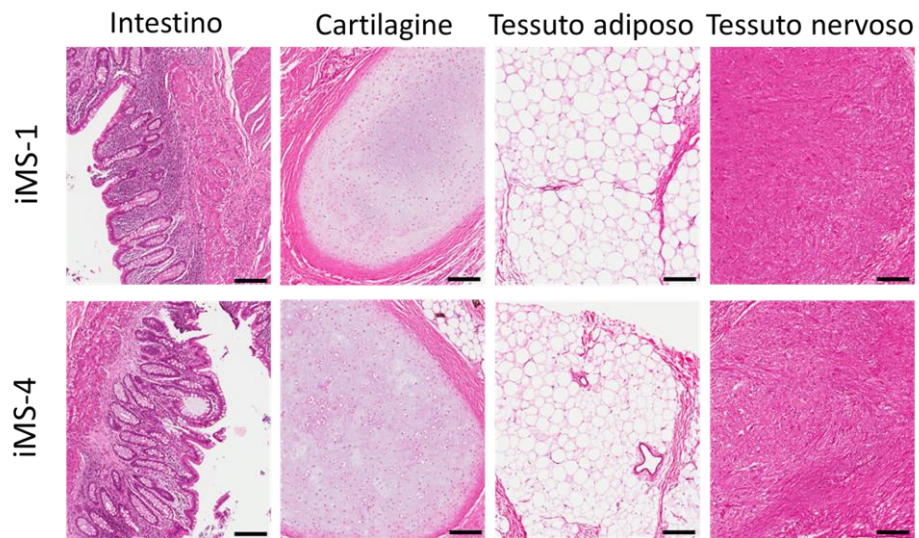
**Figura 8**



**Verifica dei livelli di eteroplasma nelle colonie di iPSCs ottenute da fibroblasti MELAS.**

Immagine gel prodotta tramite Agilent 2100 bioanalyzer instrument utilizzando la tecnologia 1000 LabChip kit che mostra i livelli di eteroplasma ottenuti tramite analisi RFLP. UC: CTR+; iMS-1/7: colonie di cellule staminali pluripotenti indotte da fibroblasti portatori della mutazione m.3243A>G. La quantizzazione è stata effettuata tramite il programma ImageJ.

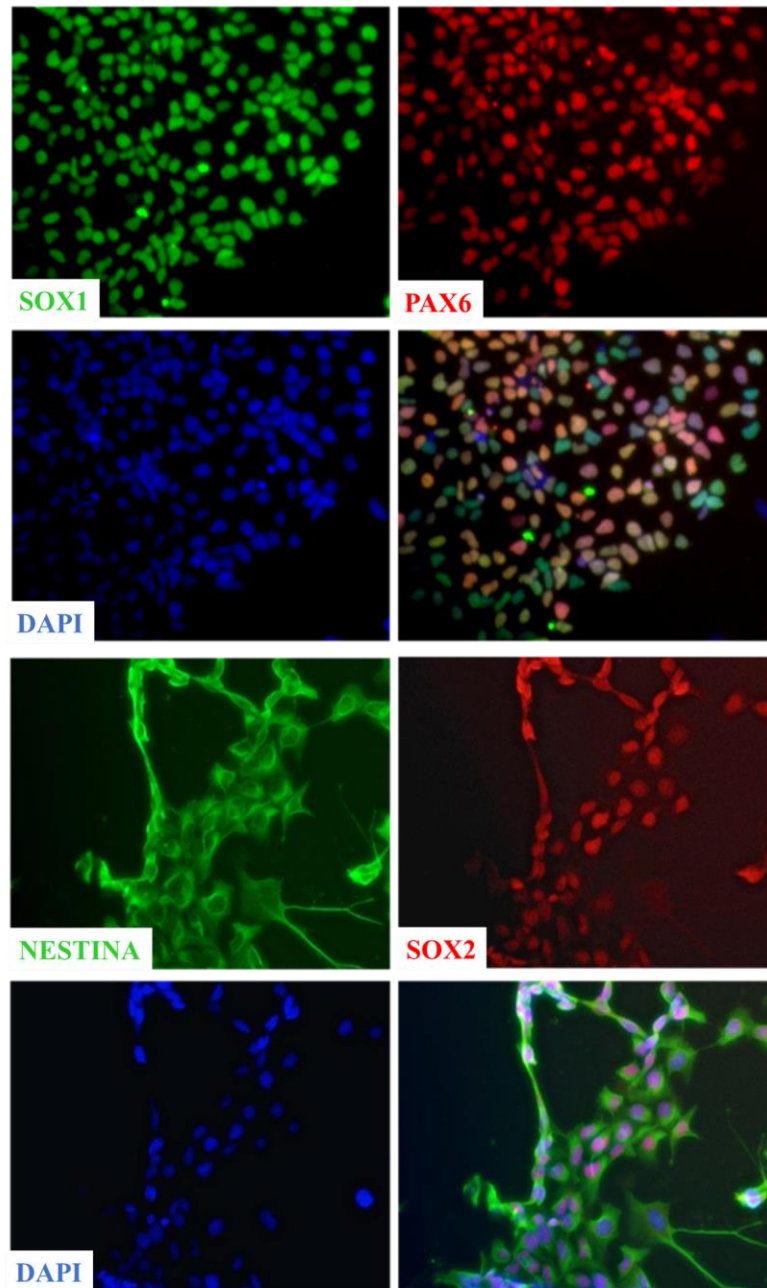
**Figura 9**



**Verifica della pluripotenza dei cloni**

Immagini relative a teratomi generati da cloni di iPSCs derivati da fibroblasti portatori della mutazione m.3243A>G, con alta (iMS-4) e bassa (iMS-1) percentuale di eteroplasmia che mostrano componenti di intestino (endoderma), di cartilagine e tessuto adiposo (mesoderma) e tessuto nervoso (ectoderma) (Scale bar 100  $\mu$ m).

Figura 10



**L'immunofluorescenza conferma il fenotipo neuronale delle cellule staminali**

Le cellule neurali derivate dalle iPSCs sono state colorate con markers specifici per i precursori neurali SOX1 (verde) e Pax6 (rosso) in **A** e Nestina (verde) e Sox2 (rosso) in **B**. I nuclei sono stati marcati con il DAPI (blu) (Ingrandimento 20X).



## 4. Discussione

Le mutazioni in geni che codificano per i tRNA mitocondriali sono responsabili di un ampio spettro di malattie, spesso sindromiche, per le quali allo stato attuale non è disponibile alcuna terapia. Il nostro laboratorio ha dimostrato in anni recenti che la porzione carbossi-terminale (Cterm) della leucil-tRNA sintetasi (LeuRS) è in grado di stabilizzare non solo la struttura del mt-tRNA<sup>Leu</sup> ma anche quella del mt-tRNA<sup>Lys</sup>, che viene aminoacilato da una sintetasi appartenente ad una classe diversa. Il Cterm è quindi dotato di una funzione “chaperonica” indipendente dall’attività catalitica dell’intero enzima, che rappresenta con ogni verosimiglianza la base per il recupero del fenotipo patologico in ibridi *trans*mitocondriali mutati nei quali questo peptide viene espresso. Il passo successivo verso l’applicazione terapeutica di queste osservazioni è stato l’identificazione di piccole subunità del Cterm in grado di mantenerne gli stessi effetti. In seguito ad analisi strutturali sono stati selezionati due frammenti del Cterm,  $\beta_{30\_31}$  e  $\beta_{32\_33}$ , che in ulteriori esperimenti hanno dimostrato la capacità di interagire *in vitro* con i tRNA preservando l’effetto terapeutico del dominio Cterm. L’espressione di questi peptidi nei ibridi con le mutazioni m.3243A>G nel mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> e m.8344A>G nel mt-tRNA<sup>Lys</sup> ha indotto un significativo miglioramento della vitalità cellulare e del profilo bioenergetico delle cellule mutate. I risultati presentati in questa tesi rappresentano un passo importante verso la futura applicazione terapeutica di questi peptidi. Infatti, un presupposto fondamentale perché una molecola eserciti il suo effetto è che sia in grado di raggiungere il suo bersaglio. I risultati ottenuti dal nostro laboratorio circa l’effetto dei peptidi sul fenotipo patologico dei ibridi mutati erano basati su esperimenti di trasfezione, ma è importante verificare se queste molecole siano in grado di per sé di penetrare nelle cellule e raggiungere la matrice mitocondriale. Uno degli scopi del mio progetto è stato quello di disegnare dei costrutti in grado di veicolare i peptidi derivati dal Cterm attraverso la membrana citoplasmatica e mitocondriale, di verificarne la localizzazione e di valutarne l’effetto. Questo obiettivo è stato raggiunto, dopo esperimenti di confronto con altre sequenze, con la selezione della presequenza FRFK, che è in grado di raggiungere la matrice mitocondriale grazie alle sue piccole dimensioni, alla lipofilia e all’elevato numero di cariche positive. I risultati che abbiamo ottenuto dimostrano che i costrutti F $\beta$  e  $\beta$  inducono un aumento di vitalità, statisticamente significativo solo nel composto preceduto dalla presequenza. Un dato interessante è che né FS



né FA comportino aumenti di vitalità. Questo dato fornisce un importante spunto di riflessione in quanto permette di ipotizzare come la funzione del peptide  $\beta_{32\_33}$  dipenda sia dall'ordine dei residui amminoacidici che dalle cariche. Infatti, una delle ipotesi sul funzionamento di tale frammento, è che la sua funzione chaperonica di stabilizzazione del tRNA mutato sia legata proprio alla presenza delle cariche positive. Quest'ultimo dato è confermato dall'effetto di rescue del peptide anche in mutazione su tRNA non cognati. Per ciò che riguarda il consumo di ossigeno, solo il costrutto F $\beta$  induce un incremento statisticamente significativo. Un altro dato di rilievo è che i costrutti alle dosi ottimali per esercitare l'effetto "terapeutico" non subiscono una degradazione citoplasmatica e non sono tossici per le cellule. Questi importanti risultati aprono ulteriori prospettive per future applicazioni terapeutiche.

Il secondo obiettivo di questo studio è stato lo sviluppo di modelli cellulari adeguati allo studio dell'effetto tessuto-specifico delle mutazioni dei mt-tRNA. Infatti, in assenza di modelli murini di malattie da mutazioni dei mt-tRNA, i ibridi *transmitocondriali* rappresentano da anni il modello cellulare più usato per lo studio di queste malattie. Tuttavia, queste cellule, che derivano da cloni neoplastici indifferenziati, non hanno caratteristiche morfo-funzionali riconducibili agli organi e tessuti che sono preferenzialmente affetti dal deficit del metabolismo energetico mitocondriale, e cioè il muscolo striato e l'encefalo. Avere a disposizione cellule mutate con differenziazione muscolare e neuronale rappresenta una formidabile opportunità per dettagliare i meccanismi alla base della tessuto-specificità di queste mutazioni e, possibilmente, di indagare se gli effetti delle nostre molecole possano variare a seconda del fenotipo delle cellule mutate a cui vengono somministrate. Nell'arco del mio Corso di Dottorato ho sviluppato iPSCs a partire da fibroblasti di pazienti portatori della mutazione m.3243A>G con percentuali variabili di eteroplasmia e di soggetti di controllo (WT) differenziando le colonie ottenute in cellule neuronali staminali, che mantengono i diversi livelli di eteroplasmia.

I miei prossimi obiettivi sono rappresentati dalla differenziazione delle cellule neuronali staminali in neuroni, dall'analisi dettagliata del fenotipo di questi nuovi modelli cellulari e dallo studio dell'effetto tessuto specifico dei nostri costrutti.

## 6. Materiali e metodi

Tutti gli studi eseguiti sono in accordo con il protocollo della Commissione Etica dell'Università di Roma "Sapienza".

### 5.1 Cibridi transmitocondriali portatori di mutazioni nei tRNA mitocondriali

#### 5.1.1 Allestimento di cibridi

Uno dei modelli cellulari classici per l'analisi delle mutazioni del mtDNA è quello dei cibridi *transmitocondriali*. Queste cellule immortali, quindi facilmente manipolabili sono ottenute dalla fusione di citoplasmi (fibroblasti enucleati donatori di mtDNA mutato o wild-type) con cellule di osteosarcoma (143B/TK-) private dei propri mtDNA (Rho<sup>o</sup>) (King e Attardi, 1989). I fibroblasti dei pazienti sono stati fatti crescere in dischi da coltura da 35 mm e sottoposti ad enucleazione. Il terreno è stato rimosso dai dischi, che sono stati capovolti e messi in tubi da centrifuga contenenti 30ml di DMEM, 2ml di FBS, e 0.32 ml di citocalasina B (1mg/ml). I tubi sono stati centrifugati a 370 C per 40 minuti a 5800xg. I dischi con i fibroblasti enucleati (citoplasti) sono stati lavati con DMEM per rimuovere i residui di citocalasina B. Ai fibroblasti enucleati sono state aggiunte le cellule Rho<sup>o</sup> ( $1-2 \times 10^6$ ) e lasciate aderire per circa 3 ore. In seguito, i dischi sono stati lavati per tre volte con DMEM e ad essi è stata aggiunta una soluzione al 50% di polietilenglicole (PEG) per 60 secondi. Questa sostanza essendo altamente tossica viene rimossa rapidamente e le cellule dopo essere state lavate per 2-3 volte vengono nutrite con terreno permissivo alla crescita di tutte le cellule presenti. Dopo 24 ore, le cellule vengono tripsinizzate e piastrate a bassa densità (da un disco da 35 in 15-20 dischi da 100mm), e nutrite con un terreno selettivo contenente DMEM, 8% di FBS dializzato, 100µg/ml di bromodeossipuridina e puromicina. Le cellule donatrici dei mitocondri (i fibroblasti dei pazienti e dei controlli) sono timidina chinasi positive (TK+) e sintetizzano uridina (UR+), le cellule riceventi (Rho<sup>o</sup>) sono TK- e UR-; i cibridi ottenuti dalla fusione vengono selezionati per la loro capacità di crescere in assenza di uridina (che seleziona le cellule Rho<sup>o</sup> non fuse) e in presenza di bromodeossipuridina (che seleziona i fibroblasti non enucleati). Le cellule vengono nutrite a giorni alterni e, dopo circa 10-14 giorni in terreno selettivo, i cloni cibridi raggiungono una grandezza sufficiente da essere visibili ad occhio nudo, ed essere isolati utilizzando anellini di diametro pari a 5mm. Per ogni paziente sono stati ottenuti 16-25 cloni stabili, di cui 2-4 sono stati scelti per lo studio e caratterizzati.

### 5.1.2 Condizioni di crescita

Le cellule sono state coltivate in DMEM-glutamax con l'aggiunta di 10% FBS, 110 mg/mL sodio piruvato e aminoacidi, 100 U/ml penicillina e 100 mg/ml streptomicina (chiamato per semplicità DMEM-glucosio), in atmosfera umidificata (5% CO<sub>2</sub>) a 37°C. Gli esperimenti sono stati eseguiti nel medesimo mezzo di coltura oppure in DMEM-glucose free, con l'aggiunta di 5 mM di galattosio, 10% FBS, 110 mg/mL sodio piruvato e aminoacidi, 100 U/ml penicillina and 100 mg/ml streptomicina (chiamato DMEM-galattosio) nelle stesse condizioni ambientali. In entrambe le condizioni di crescita i ibridi sono stati coltivati con l'aggiunta di 5mM di uridina, indispensabili per la crescita di cellule con un deficit biochimico molto grave.

### 5.1.3 Analisi di localizzazione cellulare

Le cellule sono state coltivate su piastre specifiche contenenti un vetrino copri-oggetto (Ibidi) e dopo 4h dal piastramento sono state incubate con i peptidi. Il giorno successivo, il terreno è stato sostituito con un terreno contenete una sonda vitale specifica o per i lisosomi (LysoTracker™, ThermoFisher Scientific) o per i mitocondri (MitoTracker Red FM, ThermoFisher Scientific), ed incubate per 45 minuti a 37°C. Il terreno contenete la sonda è stato rimosso e le cellule sono state lavate e mantenute con un terreno specifico per gli studi di fluorescenza (FluoroBrite DMEM Media, ThermoFisher Scientific) e sono state poi visualizzate attraverso un microscopio a fluorescenza o un microscopio confocale.

### 5.1.4 Analisi di tossicità cellulare

Per identificare la concentrazione ottimale dei peptidi ne abbiamo valutato l'effetto tossico sulle cellule utilizzando il kit Mitochondrial ToxGlo™ Assay (Promega). 3500 cellule sono state piastrate in multiwell da 96 pozzetti; a distanza di 4h dal piastramento sono state incubate con tutti e 4 i peptidi a 3 diverse concentrazioni (5μM, 10μM, 20μM). Dopo 24h le cellule sono state trattate con un reagente citotossico (20μl di 5X Cytotoxicity Reagent per pozzetto) e incubate per 30 minuti a 37°C. A questo punto è stata effettuata una prima misurazione attraverso un lettore di piastra (GloMax® Multi, Promega) per calcolare la fluorescenza. Successivamente le cellule sono state incubate con un reagente per valutare la produzione di ATP (100μl di 2X ATP Detection Reagent per pozzetto) ed in seguito è stata letta la luminescenza con lo stesso lettore di piastra. Analizzando le due letture è possibile stabilire se un trattamento risulti non tossico, cito-tossico e/o mito-tossico.

### 5.1.5 Curve di crescita

Per valutare la capacità di crescita dei ibridi abbiamo piastrato  $30 \times 10^4$  cellule in dischi da 60mm. Dopo circa 3h ore dal piastramento le cellule sono state incubate con i peptidi e il giorno dopo abbiamo sostituito il terreno con DMEM-glucosio e DMEM-galattosio. Il numero di cellule vitali (selezionate tramite il marcatore Trypan blue) nelle due condizioni di crescita (glucosio e galattosio) è stato contato dopo 24h ed il numero di cellule vive in galattosio è stato normalizzato per il numero di cellule vive in glucosio.

### 5.1.6 Consumo di ossigeno

Il consumo di ossigeno è stato misurato su  $5 \times 10^6$  cellule integre, dopo averle incubate in glucosio. Per l'analisi è stato utilizzato l'elettrodo di Clark (Hansatech) mantenendo le cellule in DMEM glucose free + 10% NaP a 38°C (Carelli et al, 2002).

## 5.2 Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) da fibroblasti umani

### 5.2.1 Generazione di iPSCs

I meccanismi patogenetici alla base dei disturbi mitocondriali rimangono in gran parte sconosciuti a causa della mancanza di sistemi modello adatti. La tecnologia delle cellule staminali ha aperto nuovi orizzonti grazie alla produzione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) da pazienti affetti e la loro differenziazione in differenti tipi di cellule, inclusi, neuroni e cardiomiociti.

Per lo studio abbiamo utilizzato fibroblasti umani derivati da pazienti portatori della mutazione m.3243A>G (che causa la sindrome MELAS) o m.8344A>G (che causa il fenotipo MERRF) e da soggetti di controllo (WT). I fibroblasti sono stati mantenuti in terreno classico di crescita fino al momento della trasfezione.

Giorno -1:  $1 \times 10^5$  fibroblasti sono stati piastrati in dischi da 35mm precedentemente trattati con una matrice specifica (Geltrex, Invitrogen) per favorirne l'adesione. Per ogni linea cellulare sono stati preparati da 10 a 20 dischi.

Giorno 0: le cellule sono state transfettate con un kit specifico, Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit (Invitrogen), contenente 5 differenti vettori di riprogrammazione (Oct4, Sox2, Klf4, L-Myc, and Lin28).

Giorno 1-15: le cellule sono state mantenute in un terreno specifico (N2B27 addizionato con bFGF, Invitrogen) per favorire la formazione di cellule staminali indotte.

Giorno 16-35: dal 16° giorno il terreno N2B27 è stato sostituito con terreno specifico per la crescita ed espansione delle cellule staminali pluripotenti (Essential 8 Medium, Invitrogen). Le cellule sono state osservate tutti i giorni fino alla formazione delle prime colonie (intorno al giorno 29) che in questo stadio appaiono larghe e compatte. Una volta identificate le colonie, queste sono state mantenute in Essential 8 Medium e, una volta raggiunta la confluenza desiderata, sono state congelate e/o utilizzate per esperimenti successivi

### 5.2.2 Caratterizzazione di iPSCs

#### *5.2.2.1 Analisi marcatori di pluripotenza mediante immunofluorescenza*

Per l'identificazione delle colonie mature abbiamo effettuato l'analisi dei marcatori di pluripotenza mediante immunofluorescenza attraverso l'utilizzo dei markers TRA 1-60 (marcatore di superficie cellulare positivo per l'identificazione di cellule staminali pluripotenti, Invitrogen) e CD44 (marcatore specifico per i fibroblasti, Invitrogen). Una volta identificate, le colonie sono state prelevate attraverso l'aiuto di un ago e trasferite in singoli pozzetti di piastre multiwell (24-well) precedentemente trattate con la matrice di Geltrex.

#### *5.2.2.2 Analisi marcatori di pluripotenza mediante PCR*

Raggiunta la confluenza, per ogni colonia è stata eseguita un'analisi dei marcatori di pluripotenza mediante PCR. Le colonie sono state trattate con EDTA 0.5mM (Invitrogen) per 5 minuti a 37°C per essere staccate dalla matrice. Sono state poi risospese in Essential 8 (Gibco) e centrifugate. Il pellet è stato risospeso in 20µl di una soluzione di lisi (Resuspension Buffer e Lysis solution, Invitrogen) e denaturato per 10 minuti a 75°C. 3µl di soluzione sono stati utilizzati per effettuare la PCR al fine di rivelare la presenza dei vettori di riprogrammazione nelle nostre colonie isolate. I primers utilizzati sono elencati in Tabella 2, le condizioni della PCR sono riportate in Tabella 3.

<b>Tabella 2</b>		
Primers	Sequenza	Banda attesa
pEP4-SF1-oriP	5'-TTC CAC GAG GGT AGT GAA CC-3'	544bp
pEP4-SR1-oriP	5'-TCG GGG GTG TTA GAG ACA AC-3'	

<b>Tabella 3</b>			
Step	Temperatura	Tempo	Cicli
Initial denaturation	94°C	2 minuti	--
Denaturation	94°C	30 secondi	40
Anneling	55°C	30 secondi	
Elogantion	72°C	1 minuto	
Final elongation	72°C	7 minuti	--

#### 5.2.2.3 Analisi PCR/RFLP

Abbiamo verificato i livelli di mutazione delle iPSCs derivate da fibroblasti portatori delle mutazioni m.3243A>G e m.8344A>G attraverso l'analisi di RFLP (restriction fragment length polymorphism). Per valutare i livelli di mutazione delle colonie di iPSCs ottenute da fibroblasti portatori della mutazione m.3243A>G abbiamo usato il test precedentemente descritto (Perli et al., 2014) utilizzando la seguente coppia di primers: 5'-TATACCCACACCCACCCAA-3' e 5'-GCGATTAGAATGGGTACAAT-3'. Dopo la digestione le molecole wild-type vengono tagliate una sola volta generando due frammenti di 117 e 37 bp. Il sito mutato 3243 introduce un secondo sito di taglio generando tre frammenti di 117, 72 e 45 bp. I frammenti sono stati analizzati tramite Agilent 2100 bioanalyzer instrument utilizzando la tecnologia 1000 LabChip kit (Agilent Technology). La quantizzazione è stata effettuata tramite il programma ImageJ.

#### 5.2.2.4 Analisi del DNA mitocondriale

La presenza di delezioni a carico del mtDNA è stata valutata tramite reazioni PCR con il metodo precedentemente descritto (Nishigaki et al., 2004). Il mtDNA è stato amplificato in una serie di frammenti parzialmente sovrapposti descritti precedentemente (Tuppen et al., 2010). Il sequenziamento con la chimica dei BigDye terminator è stato effettuato tramite il sequenziatore automatico AB 3100 XL (Applied Biosystems). Tutte le sequenze sono state confrontate con quella di riferimento del mtDNA umano (GenBank accession no. NC012920).

#### 5.2.2.5 Formazione di teratomi

Per la formazione dei teratomi  $2 \times 10^5$  cellule sono state risospese in 100  $\mu$ l di PBS e caricate in una siringa per iniezione. Ciascun topo nudo ha ricevuto una iniezione sottocutanea su ciascun fianco. Dopo circa 6 settimane i tumori cresciuti nel sito di iniezione sono stati raccolti. I noduli

sono stati separati dagli altri tessuti, lavati in PBS, fissati con PFA al 4%, inclusi in paraffina e colorati con Ematossilina-Eosina.

### 5.2.3 Produzione e caratterizzazione di cellule staminali neurali (NSCs)

Il primo passo nella produzione dei neuroni a partire dalle iPSCs è la produzione di precursori neurali. Caratterizzate le colonie di iPSCs adeguate al nostro studio, siamo quindi passati alla produzione di cellule staminali neurali (NSCs, neural stem cells).

Giorno -1: le colonie sono state mantenute in Essential 8 Medium fino all'induzione neurale. Il giorno prima dell'induzione le cellule staminali pluripotenti indotte sono state piastrate in dischi da 35mm in modo da raggiungere una confluenza pari al 25%, il giorno successivo.

Giorno 0: per favorire l'induzione neurale abbiamo sostituito il terreno specifico per la crescita delle iPSCs (Essential 8 Medium) con un terreno specifico per l'induzione (PSC Neural Induction Medium, Invitrogen).

Giorno 1-6: in questi giorni il terreno è stato sostituito quotidianamente e le cellule sono state osservate per verificare la morfologia. Non tutte le colonie differenziano in NSCs e, per garantire l'uniformità delle colonie, le cellule non neurali sono state eliminate manualmente attraverso l'utilizzo di un ago.

Giorno 7: le cellule hanno raggiunto la confluenza adeguata e vengono suddivise in differenti dischi per permettere l'ampliamento.

Raggiunta la confluenza desiderata le cellule sono state congelate e/o utilizzate per esperimenti successivi di caratterizzazione.

Per caratterizzare le cellule staminali neurali abbiamo effettuato un'analisi immunocitochimica utilizzando un kit specifico (Human Neural Stem Cell Immunocytochemistry Kit, Invitrogen). Il kit contiene quattro marcatori neurali: Nestina, PAX6, SOX1, and SOX2. Gli anticorpi sono divisi in due combinazioni specifiche; la prima combinazione è composta dagli anticorpi anti-Nestina e anti-SOX2, mentre la seconda combinazione è formata dagli anticorpi anti-PAX6 e anti-SOX1.

## 5.3 Analisi statistica

I dati rilevati sono espressi come medie  $\pm$  SEM (errore standard). Per l'analisi statistica è stata utilizzata la metodica del T-test. I risultati sono stati considerati significativi per valori  $p < 0.05$ .

## 7. Bibliografia

- Anderson S, Bankler AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, et al. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-464.
- Andersson U, Scarpulla RC. (2001) Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 21: 3738-3749.
- Arcari P, Brownlee GG. (1980) The nucleotide sequence of a small (3S) seryl-tRNA (anticodon GCU) from beef heart mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 8: 5207-5212.
- Armstead AL, Li B. (2011) Nanomedicine as an emerging approach against intracellular pathogens. *Int J Nanomedicine* 6: 3281–3293
- Attardi G, Schatz G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol.* 4: 289-333.
- Bode SA, Minten IJ, Nolte RJ, Cornelissen JJ. (2011) Reactions inside nanoscale protein cages. *Nanoscale* 3. 2376–2389.
- Camasamudram V, Fang JK, Avadhani NG. (2003) Transcription termination at the mouse mitochondrial H-strand promoter distal site requires an A/T rich sequence motif and sequence specific DNA binding proteins. *Eur J Biochem.* 270: 1128-1140.
- Carelli V, Giordano C, d'Amati G. (2003) Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Genet.* 19: 257-262.
- Carelli V, Vergani L, Bernazzi B, Zampieron C, Bucchi L, et al. (2002) Respiratory function in cybrid cell lines carrying European mtDNA haplogroups: implications for Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1588: 7-14.
- Carmona MC, Iglesias R, Obregón MJ, Darlington GJ, Villarroya F, et al. (2002) Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem.* 277: 21489-21498.
- Cherry AB, Gagne KE, McLoughlin EM, Baccei A, Gorman B, et al. (2013) Induced pluripotent stem cells with a pathological mitochondrial DNA deletion. *Stem Cells* 31: 1287-1297.
- Chinnery PF. (2015) Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? *EMBO Mol Med.* 7: 1503-1512.
- Chou SJ, Tseng WL, Chen CT, Lai YF, Chien CS, et al. (2016) Impaired ROS Scavenging System in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with MERRF Syndrome. *Sci Rep.* 6: 23661.
- Clayton DA. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell.* 28: 693-705.



Clayton DA. (1991) Nuclear gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription. *Trends Biochem Sci.* 16: 107-111.

Cwerman-Thibault H, Sahel JA, Corral-Debrinski M. (2011) Mitochondrial medicine: to a new era of gene therapy for mitochondrial DNA mutations. *J Inherit Metab Dis.* 34: 327-344.

De Luca C, Besagni C, Frontali L, Bolotin-Fukuhara M, Francisci S. (2006) Mutations in yeast mt tRNAs: Specific and general suppression by nuclear encoded tRNA interactors. *Gene* 377: 169-176.

De Luca C, Zhou Y, Montanari A, Morea V, Oliva R, et al. (2009) Can yeast be used to study mitochondrial diseases? Biolistic tRNA mutants for the analysis of mechanisms and suppressors. *Mitochondrion* 9: 408-417.

Durazo SA, Kompella UB. (2012) Functionalized nanosystems for targeted mitochondrial delivery. *Mitochondrion* 12: 190-201.

Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, et al. (2002) Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet.* 31: 289-294.

Fernandez-Silva P, Petruzzella V, Fracasso F, Gadaleta MN, Cantatore P. (1991) Reduced synthesis of mtRNA in isolated mitochondria of senescent rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 176: 645-653.

Feuermann M, Francisci S, Rinaldi T, De Luca C, Rohou H, et al. (2003). The yeast counterparts of human 'MELAS' mutations cause mitochondrial dysfunction that can be rescued by overexpression of the mitochondrial translation factor EF-Tu. *EMBO Reports* 4: 53-58.

Fish J, Raule N e Attardi G. (2004) Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis. *Science* 306: 2098-2101.

Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA. (1992) DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J Biol Chem.* 267: 3358-3367.

Francisci S, Montanari A, De Luca C, Frontali L. (2011). Peptides from aminoacyl-tRNA synthetases can cure the defects due to mutations in mt tRNA genes. *Mitochondrion* 11: 919-923.

Francklyn C, Musier-Forsyth K, Martinis SA. (1997) Aminoacyl-tRNA synthetases in biology and disease: new evidence for structural and functional diversity in an ancient family of enzymes. *RNA* 3: 954-960.

Geninatti Crich S, Bussolati B, Tei L, Grange C, Esposito G, et al. (2006) Magnetic resonance visualization of tumor angiogenesis by targeting neural cell adhesion molecules with the highly sensitive gadolinium-loaded apoferritin probe. *Cancer Res.* 66: 9196-9201.

Gorman G, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, et al. (2015) Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann. Neurol.* 77: 753-759.

Gotz A, Tynnismaa H, Euro L, Ellonen P, Hyotylainen T, et al. (2011) Exome sequencing identifies mitochondrial alanyl-tRNA synthetase mutations in infantile mitochondrial cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 88: 635–642.

Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143: 508-525.

Hämäläinen RH, Manninen T, Koivumäki H, Kislin M, Otonkoski T, et al. (2013) Tissue and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: E3622- 3630.

Heitz F, Morris MC, Divita G. (2009) Twenty Years of Cell Penetrating Peptides: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* 157: 195–206

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA, (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717-719.

Horton KL, Stewart KM, Fonseca SB, Guo Q, Kelley SO. (2008) Mitochondria-penetrating peptides. *Chem. Biol.* 15: 375–382.

Jean SR, Ahmed M, Lei EK, Wisnovsky SP, Kelley SO. (2016) Peptide-Mediated Delivery of Chemical Probes and Therapeutics to Mitochondria. *Acc Chem Res.* 49: 1893-18902.

Kateb B, Chiu K, Black KL, Yamamoto V, Khalsa B, et al. (2011) Nanoplatfoms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: what should be the policy? *Neuroimage.* 1: S106–S124.

Klopstock T, Yu-Wai-Man P, Dimitriadis K, Rouleau J, Heck S, et al. (2011) A randomized placebo controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain.* 134: 2677-86.

Langel Ü. (2011) Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols; Springer-Verlag GmbH: New York.

Lin X, Xie J, Niu G, Zhang F, Gao H, et al. (2011) Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging. *Nano Lett.* 11: 814–819.

Martin I, Viñas O, Mampel T, Iglesias R, Villarrojo F. (1993) Effects of cold environment on mitochondrial genome expression in the rat: evidence for a tissue-specific increase in the liver, independent of changes in mitochondrial gene abundance. *Biochem J.* 296: 231-234.

Matsa E, Burrige PW, Wu JC. (2014) Human stem cells for modeling heart disease and for drug discovery. *Sci Transl Med* 6:239ps6.

McCulloch V, Seidel-Rogol BL, Shadel GS. (2002) A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol.* 22: 1116-25.

McCulloch V, Shadel GS. (2003) Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Mol Cell Biol.* 23: 5816-5824.

- McFarland R., Taylor R.W., Turnbull M. (2010) A neurological prospective on mitochondrial disease. *Lancet Neurol.*, 9, 829-840.
- Messmer M, Florentz C, Schwenzer H, Scheper GC, van der Knaap MS, et al. (2011) A human pathology-related mutation prevents import of an aminoacyl-tRNA synthetase into mitochondria. *Biochem. J.* 433: 441-446.
- Nishigaki Y, Marti R and Hirano M. (2004) ND5 is a hot-spot for multiple atypical mitochondrial DNA deletions in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* 13: 91-101.
- Peitz M, Jungverdorben J, Brüstle O. (2013) Disease-specific iPS cell models in neuroscience. *Curr Mol Med.* 13: 832-841.
- Perli E, Giordano C, Tuppen HA, Montopoli M, Montanari A, et al. (2012) Isoleucyl-tRNA synthetase levels modulate the penetrance of a homoplasmic m.4277T>C mitochondrial tRNA(Ile) mutation causing hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* 21: 85-100.
- Perli E, Giordano C, Pisano A, Montanari A, Campese AF, et al. (2014). The isolated carboxy-terminal domain of human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase rescues the pathological phenotype of mitochondrial tRNA mutations in human cells. *EMBO Mol Med.* 6: 169-182.
- Perli E, Fiorillo A, Giordano C, Pisano A, Montanari A, et al, (2016) Short peptides from leucyl-tRNA synthetase rescue disease-causing mitochondrial tRNA point mutations. *Hum Mol Genet.* 25: 903-915.
- Poon Z, Chang D, Zhao X, Hammond PT. (2011) Layer-by-layer nanoparticles with a pH-sheddable layer for in vivo targeting of tumor hypoxia. *ACS Nano.* 5: 4284–4292.
- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, et al. (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat. Genet.* 4:289-294.
- Riley LG, Cooper S, Hickey P, Rudinger-Thirion J, McKenzie M, et al. (2010) Mutation of the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase gene, YARS2, causes myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia-MLASA syndrome. *Am J Hum Genet.* 87: 52-59.
- Rojo A, Campos Y, Sanchez JM, Bonaventura I, Aguilar M, et al. (2006) NARP-MILS syndrome caused by 8993 T>G mitochondrial DNA mutation: a clinical, genetic and neuropathological study. *Acta Neuropathol.* 111: 610-616.
- Scarpulla RC. (1997) Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr.* 29: 109-119.
- Scarpulla RC. (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene.* 286: 81-89.

- Scheper GC, van der Klok T, van Andel RJ, van Berkel CG, Sissler M, et al. (2007). Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nature Genet.* 39: 534-539.
- Seo YA, Lopez V, Kelleher SL. (2011) A histidine-rich motif mediates mitochondrial localization of ZnT2 to modulate mitochondrial function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300: C1479-1489.
- Smith RA, Hartley RC, Murphy MP. (2011) Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes. *Antioxid Redox Signaling.* 15: 3021–3038.
- Sproule DM and Kaufmann P. (2008) Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 1142: 133-158.
- Suzuki T, Nagao A, Suzuki T. (2011) Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annu Rev Genet.* 45: 299-329.
- Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126: 663-676.
- Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.* 2: 3081-3089.
- Taylor RW, Giordano C, Davidson MM, d'Amati G and Bain H. (2003) A homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll of Cardiol.* 41: 1786-1796.
- Uchida M, Kang S, Reichhardt C, Harlen K, Douglas T. (2010) The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1800: 834-845.
- Valero E, Tambalo S, Marzola P, Ortega-Muñoz M, López-Jaramillo FJ, et al. (2011) Magnetic nanoparticle-templated assembly of protein subunits: a new platform for carbohydrate-based MRI nanoprobe. *J Am Chem Soc.* 133: 4889–4895.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, et al. (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science.* 242: 1427-1430.
- Weber K, Brück P, Mikes Z, Küpper JH, Klingenspor M, et al. (2002) Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology.* 143: 177-184.
- Wu SB, Ma YS, Wu YT, Chen YC, Wei YH. (2010) Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. *Mol Neurobiol.* 41: 256-266.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, et al. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 98: 115-124.