



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale in

**BIOLOGIA MOLECOLARE APPLICATA**

*Curriculum* Tecnologie Biologiche

**RUOLO DEL COENZIMA Q<sub>10</sub> NELLA DISFUNZIONE  
MITOCONDRIALE E LO STRESS OSSIDATIVO NELLA  
SINDROME DI RETT**

**ROLE OF COENZYME Q<sub>10</sub> IN MITOCHONDRIAL  
DYSFUNCTION AND OXIDATIVE DAMAGE IN RETT  
SYNDROME**

*Tesi di Laurea  
Magistrale di:*

**Francesco  
Mengarelli**

*Relatore Chiar.mo  
Prof.*

**Luca Tiano**

**Sessione estiva**

**Anno Accademico 2022/2023**

*Nel mezzo delle difficoltà  
nascono le opportunità.*

*(Albert Einstein)*

# Sommario

I. INTRODUZIONE.....	6
1. La sindrome di RETT .....	6
1.1 Caratteristiche cliniche della sindrome.....	6
1.2 Cause genetiche della sindrome di Rett.....	9
1.3 Criteri diagnostici della sindrome di Rett.....	10
2. MECP2 e MeCP2: il gene e la proteina, struttura e funzione .....	13
3. Ruolo dello Stress ossidativo e della disfunzione mitocondriale nella sindrome di Rett.....	17
3.1 Lo stress ossidativo e il mitocondrio .....	17
3.2 Lo stress ossidativo e la sindrome di Rett.....	22
4. Alterazione del metabolismo lipidico nella sindrome di Rett .....	25
5. Strategie terapeutiche nella sindrome di Rett .....	26
6. Coenzima Q <sub>10</sub> .....	28
6.1. Descrizione della molecola .....	28
6.2 La biosintesi del coenzima Q <sub>10</sub> .....	30
6.3 Ruolo bioenergetico del coenzima Q <sub>10</sub> .....	32
6.4 Ruolo antiossidante del coenzima Q <sub>10</sub> .....	36
6.5 Il deficit di Coenzima Q <sub>10</sub> .....	38
II. SCOPO DELLA TESI .....	40
III. MATERIALI E METODI .....	42
1. Colture cellulari.....	42

1.1. Specifiche delle linee cellulari utilizzate .....	42
1.2. Isolamento dei fibroblasti in coltura da biopsia cutanea.....	42
1.3 Mantenimento della coltura cellulare e tecnica di semina .....	43
2. Supplementazione con ubiquinolo (CoQ <sub>10</sub> ridotto).....	44
3. Quantificazione dei livelli di CoQ <sub>10</sub> .....	45
4. Quantificazione delle proteine totali .....	49
5. Saggi citofluorimetrici per l'analisi di markers di stress ossidativo .....	50
5.1 Saggio della Cloro metil-H <sub>2</sub> diclorofluoresceina diacetata (CM- H <sub>2</sub> DCFDA) .....	51
5.2. MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator .....	53
6. Western Blot.....	54
7. Analisi statistica.....	57
IV. RISULTATI .....	59
1. Livelli totali di Coenzima Q <sub>10</sub> intracellulare .....	59
2. Uptake cellulare di coenzima Q <sub>10</sub> esogeno .....	60
3. Stato ossidativo del coenzima Q <sub>10</sub> intracellulare .....	62
4. Saggi citofluorimetrici per la rilevazione delle specie reattive dell'O <sub>2</sub> .....	63
4.1 Livelli di anione superossido mitocondriale .....	64
4.2 Livelli citosolici delle specie reattive dell'ossigeno .....	66
5. Livelli di espressione della PON2 .....	68
V. DISCUSSIONE .....	71
VI. CONCLUSIONI.....	78

VII. BIBLIOGRAFIA ..... 80

# I. INTRODUZIONE

## 1. La sindrome di RETT

### 1.1 Caratteristiche cliniche della sindrome

La sindrome di RETT (RTT; OMIM identifier #312750) è stata descritta dal dottor Andreas Rett nel 1966 riconoscendo inizialmente in 2 giovani bambine e successivamente in ulteriori 22 pazienti gli stessi insoliti comportamenti, riportando per la prima volta un'entità clinica unica che poi prese il suo nome [1]. La sindrome di Rett è classificata come un disordine dello sviluppo neurologico progressivo che si manifesta principalmente nelle bambine con una frequenza di 1 su 10,000 nate vive. È caratterizzata da un apparente sviluppo normale seguito però da una precoce comparsa dei primi sintomi già dai primi 6-18 mesi di vita.

La sindrome evolve in 4 distinte fasi [2] :

- Stadio I, è la fase di stagnazione iniziale. Inizia tra i 6 e i 18 mesi di età. In questa fase si verifica un ritardo o una stagnazione dello sviluppo.
- Stadio II, è la fase della rapida regressione. Si verifica dal 1° anno fino al 4° ed è caratterizzata dalla perdita delle abilità acquisite relative alla comunicazione, socializzazione e le abilità motorie. In questa fase diventano evidenti anche i movimenti stereotipati delle mani e microencefalia. Possono

inoltre verificarsi irregolarità respiratorie, come apnee o iperventilazione.

- Stadio III, fase pseudostazionaria. In questa fase il fenotipo si stabilizza. Alcuni possono riacquisire una consapevolezza sociale e alcune delle abilità perse nello stadio II e mostrando un tipico sguardo intenso. Possono manifestare eventi di epilessia. La durata di questa è variabile da pochi anni a decenni.
- Stadio IV, nota come fase della deteriorazione motoria, anch'essa può durare da pochi anni a decenni. In questa fase si ha riduzione delle abilità motorie, rigidità, debolezza muscolare e spasticità con sviluppo di distonia e deformità di mani e piedi mentre le abilità di comunicazione e cognitive non declinano.

L'andamento ben definito appena descritto corrisponde però alla forma predominante, ma non unica, classificata come "TIPICA". Oltre a questa esistono infatti delle forme definite "ATIPICHE" che condividono molte delle manifestazioni cliniche della forma tipica ma che non necessariamente le manifestano tutte [3] e sono conosciute come:

1. *Variante a linguaggio conservato* o variante Zappella, caratterizzata da un decorso clinico più lieve.
2. *Variante ad insorgenza precoce dell'epilessia* o variante di Hanefeld con comparsa di eventi di epilessia durante la fase di regressione.

3. *Variante congenita* o variante di Rolando, che si manifesta attraverso un ritardo psicomotorio evidente sin dai primi mesi di vita con alterazioni encefalografiche senza evidenza di epilessia precoce.
4. *Variante a regressione tardiva* o variante Hagberg (rara) nella quale dopo un prolungato periodo protratto fino all'età scolare in cui è evidente un ritardo mentale può succedere che si manifesti la fase di regressione e la comparsa dei sintomi classici.
5. "*Forme fruste*" in cui i sintomi sono più lievi e sfumanti con esordio tardivo.
6. *Sindrome di Rett maschile* con sintomi molto più gravi e nella maggior parte dei casi letale.

Al di là delle features principali della patologia legate allo sviluppo del sistema nervoso centrale, i pazienti con sindrome di Rett possono soffrire di una ampia gamma di comorbidità tra le quali sono annoverate anomalie respiratorie, problemi gastrointestinali, deformità scheletriche come scoliosi e osteopenia associabili in parte alle difficoltà locomotorie e alla sedentarietà a cui questa patologia costringe molti pazienti soprattutto nelle fasi avanzate.

Possono essere frequenti anche complicazioni di tipo metabolico. Un certo numero di pazienti può presentare una condizione di dislipidemia con alti livelli di colesterolo plasmatici, elevati livelli di ammoniaca, di leptina e adiponectina, alterazioni nel metabolismo dei carboidrati nel cervello ed elevati livelli di lattato e piruvato nel sangue e nel liquido

cerebrospinale [4-5]. Sono state inoltre osservate alterazioni della funzionalità mitocondriale, in particolare della catena di trasporto degli elettroni, alterazioni della struttura mitocondriale, stress ossidativo ed uno stato di infiammazione cronica ad esso strettamente interconnesso [5,6].

## **1.2 Cause genetiche della sindrome di Rett**

Nel 90-95% dei pazienti con diagnosi di sindrome di Rett TIPICA la patologia è causata da mutazioni de novo nelle cellule germinali della linea paterna che causano la perdita di funzione nel gene X-linked MECP2, il quale codifica per la methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) [7]. Tra le centinaia di mutazioni che possono verificarsi nel gene, otto (mutazioni per sostituzioni aminoacidiche R106W, R133C, T158M, R168X, R255X, R270X, R294X e R306C) sono quelle che si verificano nel 60% dei casi documentati. In genere le mutazioni troncanti precoci come R168X, R255X, R270X sono responsabili di un fenotipo più severo mentre quelle missenso come R133C e R306C sono più lievi. Tuttavia esiste una certa variabilità nella severità del fenotipo a causa del mosaicismo dovuto al differente silenziamento del cromosoma X. Alcune cellule infatti potrebbero esprimere il cromosoma X con la mutazione, altre quello wild type determinando un fenotipo più lieve o più severo. Nelle varianti “ATIPICHE” solo un 50-70 % dei casi condividono le mutazioni nel gene MECP2 mentre sono state individuate mutazioni in altri geni come CDKL5 e FOXP1 associati alla *variante ad insorgenza precoce dell'epilessia* e alla *variante congenita* [8].

Recentemente grazie a tecniche di Next Generation Sequencing (NGS) sono stati individuati più di ottanta geni associabili al fenotipo rett-simile, sebbene alcuni di questi siano associati a sindrome meglio conosciute come la sindrome di Pitt-Hopkins, la sindrome Phelan-McDermid, sindrome di Angelman, e quella di Kleefstra e di Cornelia de Lange. Un sostanziale numero di geni è coinvolto nell'encefalopatia epilettica o associato a ritardo mentale ed epilessia. Molti di questi geni, inoltre, sono dei modulatori della cromatina o sono coinvolti nelle funzioni sinaptiche e questo potrebbe spiegare il motivo della sovrapposizione fenotipica con la forma tipica in cui è principalmente coinvolto il gene MECP2 [9].

Il gene MECP2, infatti, viene espresso in maniera ubiquitaria in tutti i tessuti umani ma in particolare è coinvolto nella maturazione e mantenimento del sistema nervoso come dimostrato da Noriyuki *et al.* e in altri lavori in modelli di topo [10,11,12,13] oltre ad essere anche un modulatore della cromatina [14].

### **1.3 Criteri diagnostici della sindrome di Rett**

La scoperta del gene MECP2 avvenuta nel 1999 da Amir *et al.* come causa principale (90-95% dei casi) della sindrome di Rett [15] e le recenti informazioni molecolari hanno generato un po' di confusione riguardo la diagnosi della patologia. esiste infatti una piccola percentuale di individui che pur non avendo la mutazione nel gene presentano tutti i tratti clinici tipici della malattia. La situazione diventa ancora più marcata nel caso delle forme atipiche in cui solo nel 50-70% dei casi è stata riscontrata la

mutazione in MECP2. A complicare ulteriormente il tutto è l'esistenza di individui che pur presentando la mutazione nel gene non ne mostrano il tipico profilo clinico. Da una parte c'è il caso delle femmine asintomatiche dovuta all'inattivazione del cromosoma X con il gene mutato, dall'altra maschi emizigoti che presentano una severa encefalopatia postnatale precoce con mancanza di alcuni tratti distintivi della sindrome di Rett e morte precoce [16]. Per cui la presenza della mutazione di per sé non è condizione necessaria né sufficiente per la diagnosi della sindrome che si basa su criteri clinici ben definiti.

Un primo tentativo di stilare dei criteri diagnostici fu fatto nel 2001 nella conferenza di Baden-Baden sulla base di osservazioni e risultati clinici raccolti tra il 1980 ed il 1990 [17]. Successivamente i criteri sono stati riadattati sulla base delle nuove conoscenze acquisite al fine di semplificare e chiarire la diagnosi [16,17]. L'attuale sistema si basa su quattro criteri principali e due criteri di esclusione per la forma tipica e sulla presenza di due dei quattro criteri principali e di cinque su undici criteri di supporto per le forme atipiche come mostrato in tabella 1.

**Criteri diagnostici RTT 2010**

Considerare la diagnosi quando viene osservata una decelerazione postnatale della crescita del cranio

### **Requisiti per RTT tipica o classica**

1. Periodo di regressione seguito da recupero o stabilizzazione
2. Tutti i criteri principali e i criteri di esclusione
3. Criteri di supporto non richiesti, sebbene spesso presenti nella RTT classica

### **Requisiti per RTT atipica**

1. Periodo di regressione seguito da recupero o stabilizzazione
2. Almeno 2 dei 4 criteri principali
3. 5 degli 11 criteri di supporto

### **Criteri di esclusione per RTT tipica**

1. Danno cerebrale secondario a trauma (peri- o postnatale), malattia neuro-metabolica o grave infezione che causa problemi neurologici
2. Sviluppo psicomotorio esageratamente anormale nei primi 6 mesi di vita

### **Criteri di supporto per RTT atipica**

1. Disturbi respiratori durante i periodi di veglia
2. Bruxismo durante i periodi di veglia
3. Alterazione del ciclo del sonno
4. Tono muscolare anormale
5. Disturbi vasomotori periferici
6. Scoliosi/cifosi
7. Ritardi della crescita
8. Mani e piedi piccoli e freddi

9. Intervalli di risate/urla inappropriati

10. Risposta al dolore diminuita

11. Intensa comunicazione visiva – “eye pointing”

Tabella 1. *Criteri diagnostici della sindrome di Rett rivisti nel 2010, Alan K. Percy dicembre 2010 Ann Neurol. [16]*

## 2. MECP2 e MeCP2: il gene e la proteina, struttura e funzione

Il gene MECP2 localizzato sul cromosoma X (Xq28), è costituito da 4 esoni e codifica per due isoforme proteiche a seguito di splicing alternativo [13]: Mecp2-e1 e Mecp2-e2.

L'isoforma più abbondante è la Mecp2-e1 che include l'esone 1 mentre l'isoforma e2 inizia dall'esone 2. Entrambe le isoforme sono ubiquitarie ed espresse prevalentemente a livello cerebrale.

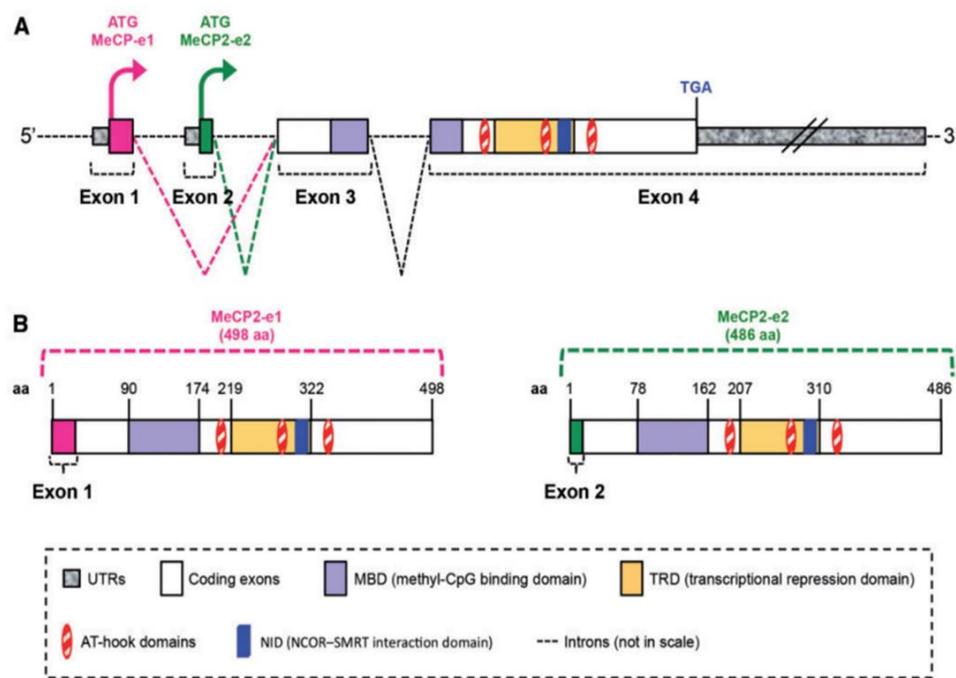


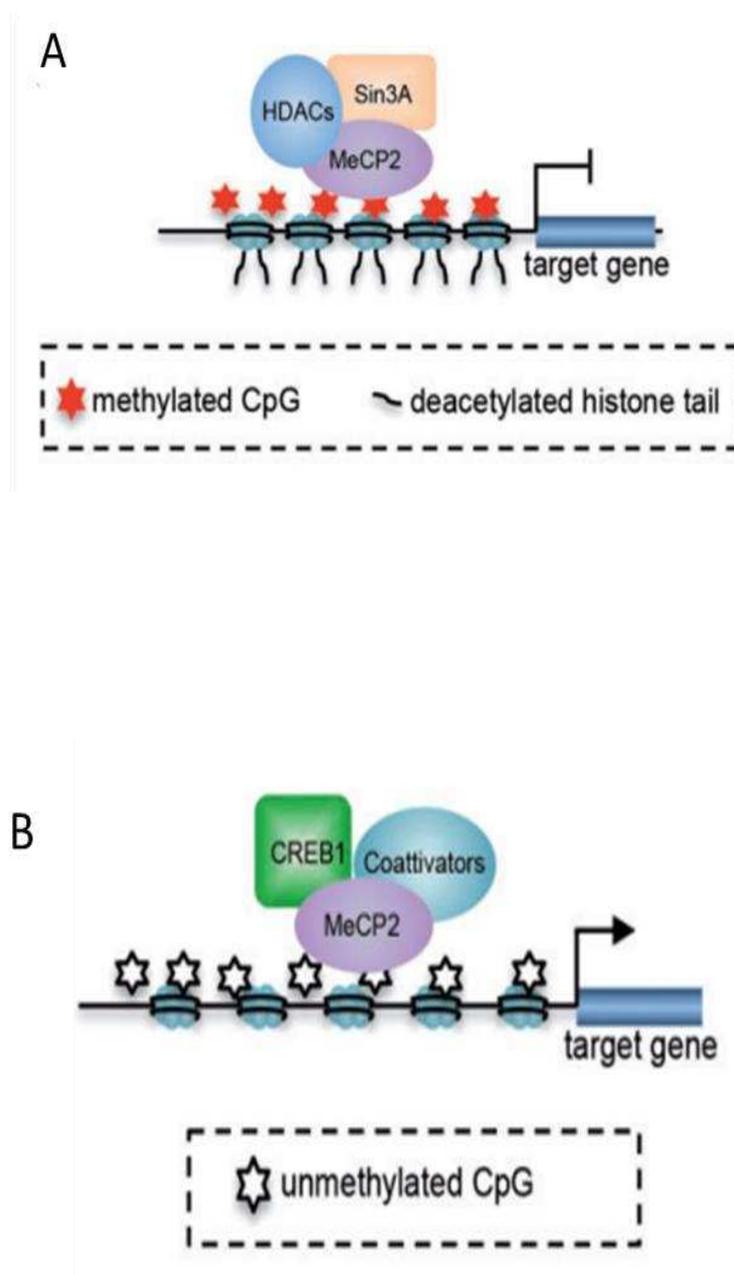
Figura 1. Rappresentazione schematica del gene MecP2 e delle sue principali isoforme: Mecp2-e1 (498 aa) e Mecp2-e2 (486 aa). Floriana Della Ragione et al. *Briefings in Functional Genomics*, 2016

La proteina Mecp2 è in grado di legare sequenze CpG metilate adiacenti a quattro o più sequenze A/T grazie ad un dominio MBD (metil binding domain). Oltre a questo la proteina presenta un dominio TRD (transcription repression domain) che media il legame tra gli istoni modificati ed i corepressori, un segnale di localizzazione nucleare (NLS) e una porzione C-terminale coinvolta nell'interazione con il DNA ed altre proteine.

In termini di funzione MeCP2 promuove o reprime la trascrizione genica attraverso la formazione di complessi molecolari. Uno dei meccanismi più studiati di silenziamento della trascrizione riguarda il reclutamento del complesso HDACs/Sin3A con conseguente deacetilazione delle code istoniche e compattazione della cromatina. Un altro meccanismo inibitorio conosciuto riguarda il reclutamento del complesso NCoR/SMRT via NID (NCoR/SMRT interaction domain) e successiva interazione con la istone deacetilasi che promuove anche in questo caso compattazione della cromatina e silenziamento genico. MeCP2 può d'altro canto promuovere la trascrizione reclutando CREB (cAMP response element-binding protein) a seguito dell'interazione con le citosine non metilate delle isole CpG oppure legandosi alla 5-idrossimetil citosina che è una modificazione comune nei geni attivi a livello del cervello. Infine sembrerebbe anche essere in grado di organizzare la cromatina in ordini superiori compattando i nucleosomi similmente all'istone H1 [3,4,13].

Alcune mutazioni che cadono all'interno di uno dei 4 domini possono fortemente influenzare l'attività di questa proteina come ad esempio

mutazioni missenso T158M, R133C nel MBD interferiscono con il legame al DNA oppure come le mutazioni che si verificano nel dominio TRD e NID come R255X, R270X, R294X e R306C che determinano la perdita dell'interazione con i corepressori Sin3a e NCoR/SMRT. Alcune di queste mutazioni possono contribuire al fenotipo della sindrome di Rett.



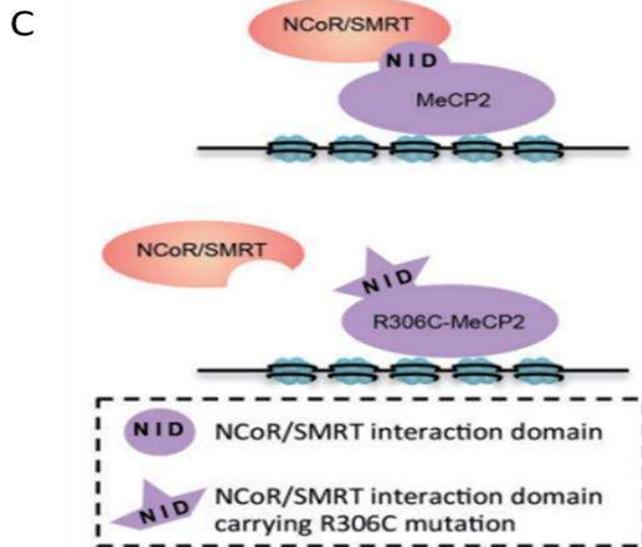


Figura 2. Rappresentazione di alcuni dei meccanismi d'azione della proteina MeCP2. Nella figura A e C sono mostrati due meccanismi di silenziamento dell'espressione genica da parte di MeCP2 e come la mutazione nel dominio NID interferisca con questa funzione C. Nella figura B è mostrato invece come MeCP2 possa attivare l'espressione genica attraverso CREB. Immagine tratta da Floriana Della Ragione et al. *Briefings in Functional Genomics*, 2016, 1–12

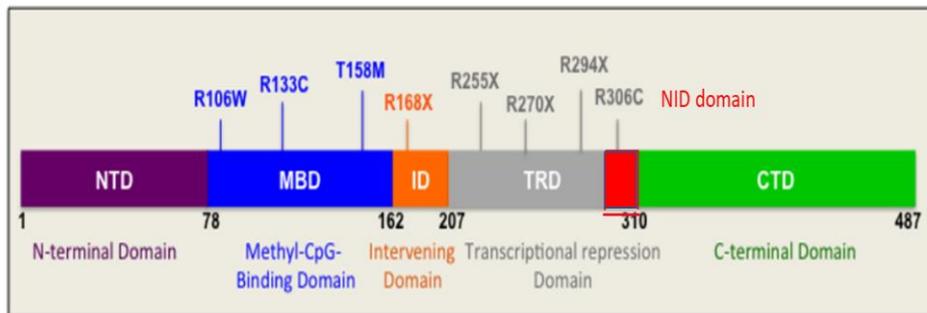


Figura 3. Rappresentazione schematica dei domini della proteina MeCP2 e delle mutazioni che possono verificarsi. Immagine modificata da Shervin Pejhan et al. *biomolecules* 2021

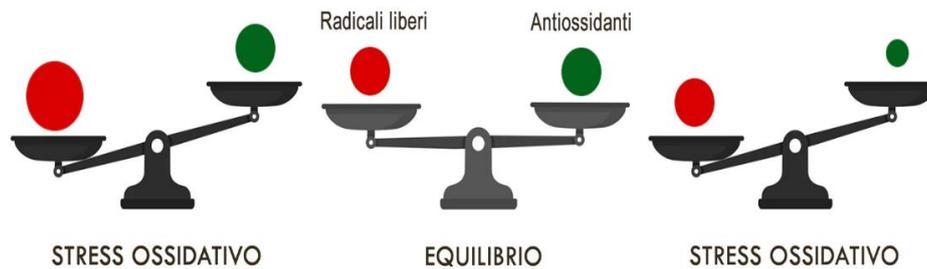
### **3. Ruolo dello Stress ossidativo e della disfunzione mitocondriale nella sindrome di Rett**

#### **3.1 Lo stress ossidativo e il mitocondrio**

Lo stress ossidativo è definito come “uno squilibrio tra specie pro-ossidanti e antiossidanti a favore delle prime con conseguente alterazione dell’equilibrio redox e/o danno molecolare” [18]. Lo stress ossidativo è una condizione coinvolta nella patogenesi e nella progressione di numerose patologie come malattie cardiovascolari, cancro, infertilità maschile e malattie neurodegenerative [19,20,21]. Tra le specie pro-ossidanti coinvolte ci sono le specie reattive dell’ossigeno (ROS) e dell’azoto (RNS). In condizioni fisiologiche una bassa o moderata produzione di ossidanti avviene normalmente nelle cellule durante il metabolismo aerobico con effetti positivi nel signaling intracellulare e nella difesa immunitaria.

Per mantenere un equilibrio redox ottimale le cellule si sono dotate di sistemi antiossidanti di vario genere tra cui sistemi enzimatici come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutatione perossidasi (GPx), la tioredoxina (TRX) e la perossiredoxina (PRDX) e altri sistemi non enzimatici rappresentati da composti a basso peso molecolare tra cui il glutatione, l’acido ascorbico, il tocoferolo e l’ubichinolo. Tuttavia a seguito di una non ottimale gestione dei meccanismi di detossificazione, a causa di una eccessiva produzione di ROS/RNS o una ridotta attività antiossidante, la continua esposizione delle cellule alle molecole ossidanti può generare effetti citotossici. Infatti alti livelli di specie reattive intaccano le strutture cellulari provocando perossidazione

lipidica, ossidazione delle proteine e danno al DNA.



*Figura 4. La bilancia al centro raffigura la condizione di equilibrio tra specie ossidanti e difese antiossidanti, aumentata produzione di specie reattive (bilancia a sinistra) o ridotte difese antiossidanti (destra) provocano la condizione di stress ossidativo. <https://magazine.x115.it/x115/stress-ossidativo-invecchiamento/>*

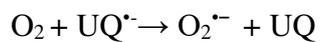
Uno dei potenziali e principali siti di produzione di specie reattive dell'ossigeno è il mitocondrio, un organello intracellulare dove hanno sede complesse reazioni ossido-riduttive che coinvolgono l'ossigeno al fine di generare l'energia necessaria per il funzionamento di tutti i processi cellulari.

I mitocondri in particolare sono costituiti da un doppio sistema di membrana: una esterna permeabile che delimita uno spazio intermembrana e una interna impermeabile molto più estesa organizzata in creste che circoscrive la matrice mitocondriale all'interno della quale è contenuto il DNA mitocondriale e le proteine che partecipano al ciclo degli acidi tricarbossilici. In corrispondenza delle creste è invece presente l'apparato della catena di trasporto degli elettroni e della fosforilazione ossidativa necessario alla generazione dell'ATP essenziale per tutti i processi biologici. L'apparato è costituito da 5 complessi:

1. Complesso I (NADH deidrogenasi), catalizza l'ossidazione nel NADH rigenerando il NAD ossidato per il ciclo degli acidi tricarbossilici e l'ossidazione degli acidi grassi e trasferisce gli elettroni al coenzima Q<sub>10</sub> (ubichinone) mediante il coenzima flavina mononucleotide (FMN) e centri Ferro-zolfo.
2. Complesso II (succinato deidrogenasi), trasferisce elettroni dal FADH<sub>2</sub> all'ubichinone.
3. Complesso III (coenzima Q<sub>10</sub> – citocromo c reduttasi), che catalizza il trasferimento mediante centri Fe-S dal coenzima Q<sub>10</sub> ridotto al citocromo c.
4. Complesso IV (citocromo c ossidasi) che catalizza il trasferimento finale degli elettroni all'ossigeno molecolare con produzione di H<sub>2</sub>O.
5. Complesso V (ATP sintasi) responsabile della conversione del potenziale elettrochimico generato durante la catena di trasporto degli elettroni (gli elettroni durante il trasferimento perdono parte della loro energia che viene utilizzata dai complessi I, III e IV per pompare protoni verso lo spazio intermembrana) in energia chimica sotto forma di ATP.

Sebbene la catena mitocondriale di trasporto degli elettroni sia un sistema molto efficiente la natura variabile delle reazioni di ossido-riduzione che avvengono nei complessi respiratori predispone ogni trasportatore di elettroni a partecipare alle reazioni collaterali che coinvolgono l'ossigeno molecolare. Infatti è stato visto che in condizioni fisiologiche circa il 2%

dell'ossigeno totale utilizzato dal mitocondrio viene convertito in anione superossido. In particolare nel complesso I può verificarsi che la FMN a seguito di un eccesso di potere riducente non riesca a cedere elettroni al coenzima Q e li trasferisca direttamente all'ossigeno oppure che a seguito di un eccesso della forma ridotta del coenzima Q si verifichi una condizione definita respirazione inversa con gli elettroni che rivengono ceduti al NAD e successivamente all'ossigeno. Altro sito di formazione delle specie reattive dell'ossigeno è il complesso 3 nel quale il coenzima Q si alterna tra gli stati di chinone (completamente ossidato), semichinone (il prodotto della riduzione monovalente) e chinolo (completamente ridotto da due elettroni); può succedere che a seguito di un accumulo di intermedi semichinonici reattivi gli elettroni vengano ceduti direttamente all'ossigeno tramite la seguente reazione:



Il radicale superossido che ne risulta può dare origine al perossido di idrogeno attraverso una reazione di dismutazione catalizzata dalla superossido dismutasi (MnSOD):



Il perossido di idrogeno, generato nella precedente reazione, oppure in un altro processo metabolico, può andare incontro alla ben nota reazione di Fenton in cui il ferro ferroso agisce come donatore di elettroni. La reazione produce il radicale idrossilico ( $^{\circ}\text{OH}$ ) altamente reattivo:



Altri enzimi mitocondriali finora conosciuti in grado di produrre ROS sono gli enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici come l'aconitasi (ACO) e l' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi (KGDH), le monoammino ossidasi, la glicerolo-3-fosfatodeidrogenasi e la diidroorotato deidrogenasi. Generalmente in condizioni fisiologiche la produzione di ROS è controbilanciata da un esteso sistema antiossidante mitocondriale che dipende esso stesso anche dallo stato redox ed energetico del mitocondrio [22]. Oltre alle già citate superossido dismutasi e catalasi il mitocondrio è dotato anche di altre difese enzimatiche come la glutatione perossidasi (GPX) che riduce il perossido ad acqua e ossigeno tramite l'ossidazione del glutatione il quale viene a sua volta rigenerato dalla glutatione reduttasi (GR). Ancora, sono presenti il sistema perossiredossina, tioredoxina e tioredoxina reduttasi che sfruttano allo stesso modo il potere riducente (NADPH) generato dal potenziale elettronico e dal ciclo di Krebs. A fronte di quanto appena descritto difetti della funzionalità mitocondriale e difese antiossidanti subottimali diventano il prerequisito per la produzione di ROS che se non intercettate possono ulteriormente danneggiare i mitocondri, provocare ulteriore riduzione della capacità innescando un circolo vizioso responsabile della condizione di stress ossidativo e del danno ossidativo.

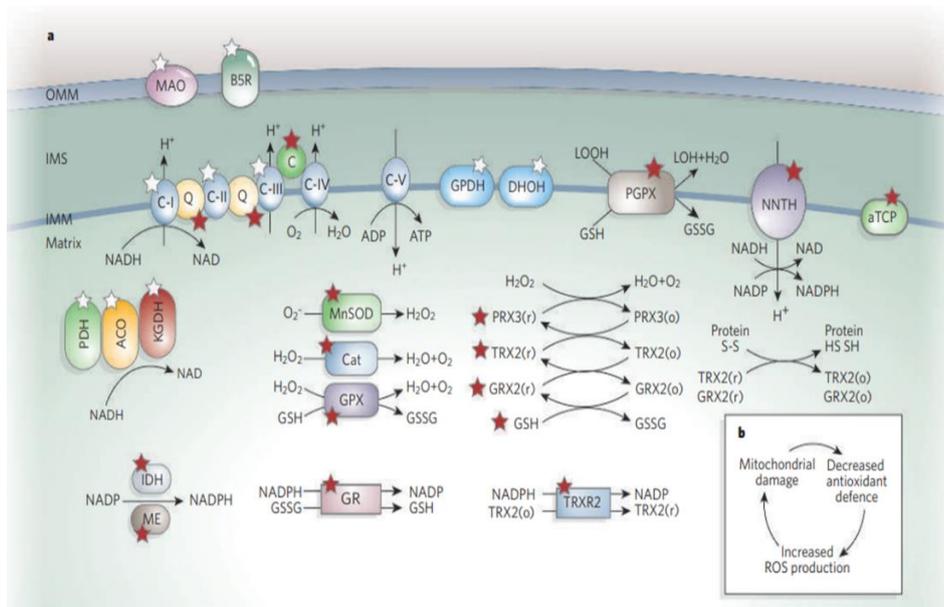


Figura 5. I processi e le componenti coinvolte nella generazione di ROS (stelle bianche) e nella difesa antiossidante (stelle rosse). Fonte: *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Michael T. Lin1 & M. Flint Beal1[22].

### 3.2 Lo stress ossidativo e la sindrome di Rett

Nel 1987 Sofic *et al.* [23] riportarono per la prima volta l'evidenza di una riduzione dei livelli di acido ascorbico e di glutazione (GSH) postmortem nel cervello di un paziente suggerendo una ridotta capacità antiossidante nella sindrome di Rett. Da allora si è cercato di approfondire la possibile connessione tra stress ossidativo e la sindrome sia nell'uomo che più recentemente in modelli animali. Ad oggi numerosi studi hanno messo in evidenza una riduzione delle difese antiossidanti ed un aumento dei biomarkers dello stress ossidativo suggerendo un potenziale danno alle componenti cellulari: Cristina Sierra *et al.* [24] in uno studio condotto nel 2001 su 43 pazienti con sindrome di Rett osservarono una riduzione dell'attività della superossido dismutasi e aumentati livelli di malondialdeide plasmatica mentre in altri studi condotti da Claudio de felice *et al.* su eritrociti e fibroblasti [25,26,27] sono stati riscontrati

aumentati livelli di molecole non proteiche leganti il ferro (NPBI), malondialdeide, addotti 4-idrossinonenale, isoprostani, e ridotti livelli di glutathione ridotto (GSH). Queste evidenze confermano l'esistenza di una condizione di danno ossidativo nella sindrome di RTT che potrebbe contribuire alla progressione della malattia non solo a livello del cervello, in quanto organo particolarmente sensibile ad una condizione di stress ossidativo dato l'elevato contenuto di acidi grassi insaturi, di ferro e relativamente basse difese antiossidanti, ma anche a livello sistemico. La possibile connessione esistente tra la sindrome di Rett e stress ossidativo è stata ulteriormente confermata grazie a studi condotti utilizzando modelli murini della malattia ed in particolare De Felice *et al.* [28] hanno dimostrato che lo stress ossidativo risulta essere evidente ancor prima della comparsa della sintomatologia oltre ad essere un fenomeno reversibile se si ripristina la normale funzione del gene MECP2.

Sebbene la forte correlazione tra sindrome di Rett e lo stress ossidativo sia stata ampiamente documentata ancora poco si sa sul meccanismo complessivo alla base dello squilibrio.

L'intuizione scientifica che le alterazioni mitocondriali potessero essere coinvolte nella patogenesi della sindrome di Rett risale già agli anni 1989/1990 [29,30] quando a seguito di analisi di microscopia elettronica su biopsie di tessuto muscolare di pazienti furono individuati mitocondri eccessivamente allungati, con vacuolizzazioni ed alterazioni delle creste mitocondriali. Ricerche più recenti mirate ad esplorare questo possibile coinvolgimento dei mitocondri hanno evidenziato un'aumentata produzione di anione superossido e una ridotta attività antiossidante della superossido dismutasi [31], una riduzione dell'attività dei complessi

respiratori II, III [32] e l'overproduzione di perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) associabile alla disfunzione del complesso II come dimostrato da Bianca de Filippis et al. in modelli murini di femmine eterozigoti MeCP2-308 [33]. Studi di proteomica su larga scala hanno inoltre mostrato un'up-regolazione di molte proteine coinvolte nel network mitocondriale. In particolare sembrano essere overespresso le proteine dei complessi respiratori (ATP sintasi subunità g, citocromo c ossidasi subunità 6B1) e di alcuni sistemi antiossidanti (NADH-citocromo b5 reduttasi 3, Peroxiredoxin-5) come meccanismi compensatori atti a ripristinare una corretta funzionalità mitocondriale [34]. Studi di dinamica mitocondriale hanno invece individuato nei pazienti affetti da sindrome mitocondri iperfusi e deficit nei processi di mitofagia con conseguente ritenzione di mitocondri invecchiati o danneggiati [35]. Nell'insieme tutte queste evidenze descrivono un complesso quadro di disfunzione mitocondriale e uno squilibrio ossidativo ad esso associato che potrebbe contribuire alla patogenesi della sindrome dato il ruolo fondamentale dei mitocondri nella neurogenesi, nel differenziamento e nella plasticità delle sinapsi [36] ed essere quindi responsabile anche delle problematiche neuromuscolari riscontrate nei pazienti. Questa ipotesi che trova riscontro anche in altre evidenze scientifiche che sottolineano una possibile correlazione tra le alterazioni mitocondriali, lo stress ossidativo e la patogenesi in altre malattie del neurosviluppo dato che disfunzioni mitocondriali e stress ossidativo possono portare all'alterazione del metabolismo energetico che è cruciale per la normale funzione del cervello essendo uno degli organi con la più alta richiesta energetica [37,38].

#### **4. Alterazione del metabolismo lipidico nella sindrome di Rett**

Altro aspetto non secondario nella sindrome di Rett è l'evidenza di una condizione di dislipidemia. Nel 2013 Sticozzi *et al.* [39] riportarono alti livelli plasmatici di colesterolo totale, delle lipoproteine ad alta densità (HDL) e a bassa densità (LDL) in pazienti affetti da sindrome di Rett. In aggiunta, gli stessi autori osservarono sia una diminuzione dei livelli del recettore Scavenger Receptor-B1 (SRB1) coinvolto principalmente nell'uptake del colesterolo HDL, che un aumento degli addotti SRB1-HNE nei fibroblasti degli stessi pazienti. Questa scoperta suggerì una possibile correlazione tra dislipidemia e stress ossidativo. Buchovecky *et al.* mostrarono inoltre che il metabolismo lipidico risultava alterato sia nel fegato che nel cervello di topolini maschi mutanti per MECP2 e che le statine erano in grado di migliorare lo squilibrio nel profilo lipidico [40]. A seguire Segatto *et al.* [41] indagarono il pathway proteico responsabile della via biosintetica del colesterolo anche nei fibroblasti in coltura osservando una ridotta attività della idrossimetilgluratil CoA reduttasi (HMGR), enzima limitante della via biosintetica del colesterolo, in accordo con quanto dimostrato nel cervello di topi MECP2 mutanti adulti. Insieme alla riduzione dell'attività della proteina però furono evidenziati anche aumentati livelli di espressione della stessa e dei recettori delle LDL (LDLr) entrambi modulati da SREBP-2 in risposta a ridotti livelli di steroli come meccanismi compensatori della ridotta attività della HMGR e degli elevati livelli plasmatici di colesterolo. Più recentemente Kyle *et al.* [42] hanno mostrato, nel fegato di topolini con delezione del gene MECP2 il diretto coinvolgimento della proteina MeCP2 nella regolazione del metabolismo lipidico illustrando

l'ancoraggio diretto al complesso contenente NCor1 e HDAC3 e la repressione della trascrizione dei geni del metabolismo lipidico. Contrariamente quanto precedentemente visto gli autori hanno ipotizzato che la delezione è responsabile dell'aumentata espressione degli enzimi lipogenici quali HMGCR e la squalene epossidasi (SQLE) e della sintesi dei trigliceridi senza che ci siano aumentati livelli di SREBP-2. Nel complesso questi lavori sottolineano uno squilibrio sia nella via biosintetica che nei meccanismi di redistribuzione del colesterolo permettendo di definire la sindrome di Rett come un disturbo neurologico dalle componenti metaboliche.

## **5. Strategie terapeutiche nella sindrome di Rett**

Attualmente non esiste ancora una cura nella sindrome di Rett [43]. Le correnti strategie terapeutiche si basano su un approccio multidisciplinare mirate al miglioramento della sintomatologia. I principali interventi sono di natura fisica e farmacologica. La terapia fisica consiste in differenti tipi di approcci come la musicoterapia, la fisioterapia, la idroterapia, l'ippoterapia e si prefigge l'obiettivo di preservare migliorare o ripristinare le capacità motorie, alleviare stati di sconforto o irritabilità e aumentare l'indipendenza dei pazienti. Ogni tipo di intervento deve essere ben pianificato e programmato a misura delle esigenze di ciascun paziente [44].

Per quanto riguarda la terapia farmacologica negli ultimi anni la mole di studi clinici e pre-clinici è notevolmente aumentata nel tentativo di individuare trattamenti sicuri ed efficaci e in tal senso i modelli murini

sono una fondamentale risorsa nello sviluppo di nuovi farmaci. Essendo la sindrome di Rett principalmente una patologia del sistema nervoso molti dei farmaci testati sono rivolti a ripristinare o comunque a stimolare la funzionalità neuronale. Una delle prime molecole ad essersi rivelate efficaci è stata la desipramina [45] capace di ridurre le irregolarità respiratorie ed aumentare l'aspettativa di vita nel topo. Altre molecole testate sono il fattore di crescita insulino simile-1 (IGF1), i mimetici del brain-derived neurotrophic factor (BDNF) che è anche un target del gene MeCP2, farmaci dopaminergici, GABAergici, adrenergici, glutaminergici e colinergici. Quando somministrati in topi mutanti per MECP2 sembrano migliorarne la funzionalità motoria, le irregolarità respiratorie, la morfologia neuronale e lo sviluppo dendritico [43].

Anche contrastare la condizione di stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale si è rivelato un possibile approccio terapeutico atto al migliorare le condizioni di vita delle bambine affette da sindrome di Rett. Ad esempio la somministrazione di acidi grassi polinsaturi ( $\omega$ -3 PUFAs) in pazienti affetti dalla sindrome sembrerebbe alleviare alcuni dei sintomi clinici in particolare relativamente alle anomalie respiratorie, i deficit nella comunicazione non verbale ai deficit motori ma anche a ridurre i markers di danno ossidativo in particolare nelle prime fasi della malattia [46]. Altri studi preclinici condotti su topi sembrerebbero confermare l'effetto positivo di un trattamento antiossidante con vitamina E, seppur tenendo conto sia delle dosi che delle modalità di somministrazione in quanto dosi troppo elevate potrebbero avere come conseguenza l'aumento dello stress ossidativo [47,48]. Ancora, la somministrazione di quercetina idrata sembra avrebbe un effetto protettivo sulla funzionalità

mitocondriale in termini di attività dei complessi respiratori con effetto dose dipendente [35] e trattamenti in vivo in topolini con CNF1 (fattore citotossico necrotizzante 1) che è una molecola batterica che promuove nelle cellule eucariotiche la trascrizione di geni, la sopravvivenza e la proliferazione cellulare e che migliorerebbe il funzionamento mitocondriale riducendone la produzione di perossido di idrogeno e aumentandone i livelli dei marker bioenergetici [36].

In ultimo anche trattamenti con statine finalizzati a normalizzare l'alterato metabolismo lipidico potrebbero migliorare l'aspettativa di vita e le abilità motorie come dimostrato sempre in modelli di topo [42].

Infine recentissime prospettive di cura per la sindrome di Rett potrebbe derivare dalla terapia genica che mira a ripristinare la corretta funzionalità del gene MECP2 attraverso tecnologia miRNA-Responsive Auto-Regulatory Element (miRARE) [49] già in fase di trial clinico, oppure tramite sistema CRISPr-cas9 [50].

## **6. Coenzima Q<sub>10</sub>**

### **6.1. Descrizione della molecola**

Il Coenzima Q (CoQ) è una molecola lipofila presente in tutte le membrane delle cellule eucariotiche in particolare nei lisosomi, nel reticolo endoplasmatico, nei perossisomi e soprattutto nei mitocondri.

È stato isolato per la prima volta nel 1957 da Frederick Crane e dal suo team dell'Enzyme Institute [51] all'interno dei mitocondri cardiaci dei bovini mentre la sua struttura chimica è stata caratterizzata successivamente da Wolf e collaboratori nei laboratori della Merck & Co.

Il CoQ è un 2,3-dimetossi-5-metilbenzoquinone con una catena laterale isoprenoide di lunghezza variabile in maniera specie-specifica. Il più comune nei mitocondri umani è il CoQ<sub>10</sub> nel quale la coda idrofobica è costituita da 10 unità isoprenoidi (presenti tutte in configurazione trans) come raffigurato in **figura 6**.

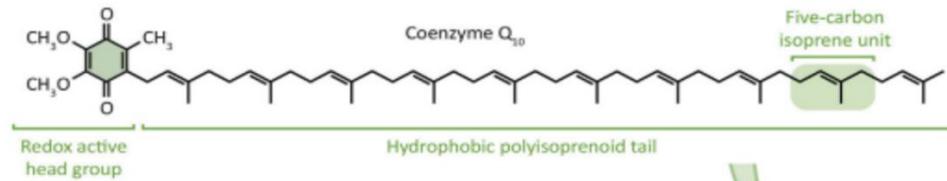


Figura 6. *struttura chimica del CoQ10* Fonte: J. A. Stephely et al. 2017.

All'interno dei sistemi biologici il coenzima Q<sub>10</sub> può esistere in tre diversi stati di ossidazione: nella forma ridotta detta ubiquinol, in un intermedio semichinonico e in una forma ossidata chiamata ubiquinone. La presenza della forma instabile semichinonica è scongiurata dalla catena di trasporto degli elettroni o da reductasi specifiche (diaforasi) in grado di trasferire due elettroni simultaneamente.

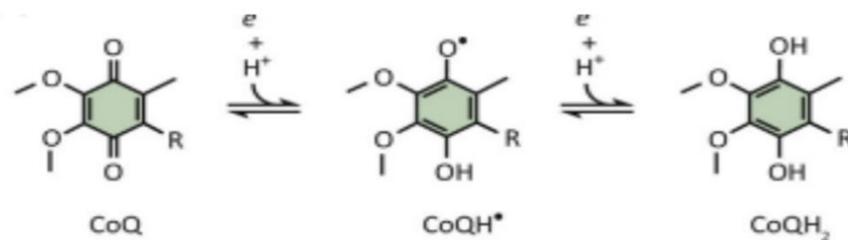


Figura 7. *Reazioni di ossidoriduzione che coinvolgono il coenzima Q<sub>10</sub>* Fonte: J. A. Stephely et al. 2017.

Ad oggi numerose funzioni sono state associate al coenzima Q. La prima ad essere stata individuata è quella come componente essenziale della

catena di trasporto degli elettroni dove svolge la funzione di trasportatore di elettroni tra i complessi I e III, e II e III e dove in più sembrerebbe proteggere i mitocondri dai fenomeni di apoptosi innescati dalla depolarizzazione della membrana interna, dalla diminuzione dei livelli di ATP, dall'attivazione della caspasi 9 o dalla frammentazione del DNA. A livello mitocondriale il coenzima Q sembrerebbe favorire il trasferimento degli elettroni da lipidi a proteine disaccoppianti favorendo la termogenesi ad esempio nel tessuto adiposo bruno. Il coenzima Q inoltre è l'unica molecola antiossidante sintetizzata endogenamente capace di proteggere lipidi, proteine e DNA dall'ossidazione. Proteggendo le LDL dall'ossidazione e i lipidi presenti nelle lesioni aterosclerotiche svolge anche una proprietà anti-aterosclerotica. Migliora inoltre la disfunzione endoteliale stimolando il rilascio di ossido nitrico. Infine il coenzima Q sembra possedere un'attività anti-infiammatoria influenzando l'espressione di geni dipendenti da NF $\kappa$ B1 regolando l'attivazione, la sopravvivenza e il differenziamento delle cellule del sistema immunitario innato e dei linfociti T.

## **6.2 La biosintesi del coenzima Q<sub>10</sub>**

Il coenzima Q è sintetizzato principalmente nei mitocondri e la biogenesi necessita della sintesi dell'anello benzoico, di quella della catena laterale e dell'unione delle due unità funzionali e modificazioni successive a livello della testa [52]. Nei mammiferi l'anello benzoico deriva dall'amminoacido essenziale fenilalanina, che viene convertito nel citosol in tirosina e poi in 4-idrossibenzoato.

La sintesi della catena laterale avviene invece attraverso la via del mevalonato che a partire dall'Acetil-CoA porta alla formazione di Farnesil pirofosfato (FPP). Nella parte iniziale della via biosintetica che avviene nel citoplasma tre molecole di acetil-CoA vengono condensate in 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A da parte dell'HMG-CoA reduttasi, il principale enzima regolatore nella biosintesi del colesterolo. Il mevalonato viene poi fosforilato in due step dalla mevalonato e dalla fosfomevalonato chinasi. La successiva decarbossilazione produce isopentenil pirofosfato (IPP). Un'altra molecola di IPP viene isomerizzata in dimetilallil pirofosfato e la FPP-sintasi catalizza la formazione di farnesil pirofosfato (FPP) dalle due attraverso la formazione dell'intermedio geranil pirofosfato (GPP). L' FPP rappresenta il precursore del colesterolo, del dolicolo e del coenzima Q<sub>10</sub>. Il farnesil pirofosfato viene poi trasportato a livello della membrana mitocondriale interna attraverso meccanismi non ancora noti. La trans-preniltransferasi (CoQ1p) catalizza la reazione di condensazione di diverse unità di FPP in poliprenil-pirofosfato. A seguire la poliprenil 4 idrossil benzoato transferasi catalizza l'unione dell'anello benzoico alla catena isoprenoide. Nella fase finale l'anello benzoico subisce una serie di modificazioni quali decarbossilazione, idrossilazione e metilazione.

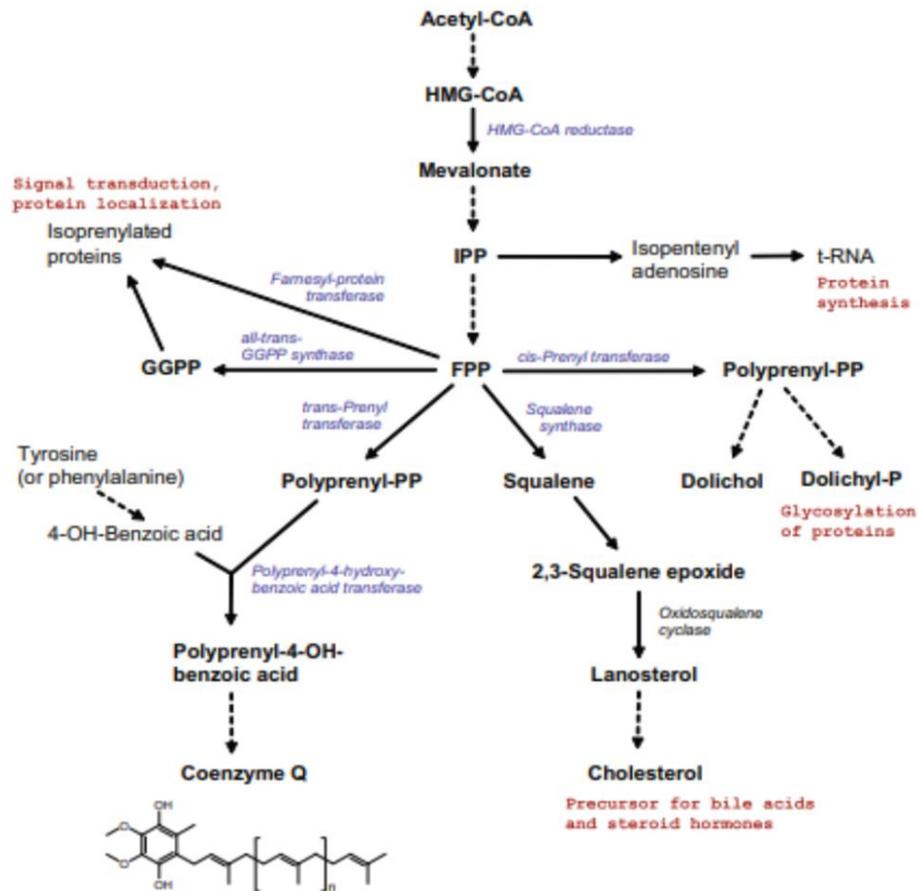
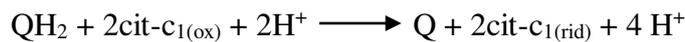


Figura 8. Via biosintetica condivisa del coenzima  $Q_{10}$  e del colesterolo. M. Bentinger; M. Tekle; G. Dallner 2010

### 6.3 Ruolo bioenergetico del coenzima $Q_{10}$

Storicamente uno dei primi aspetti ad essere indagati relativamente alle funzioni del  $CoQ_{10}$  riguarda il suo ruolo nella bioenergetica mitocondriale: le cellule richiedono un continuo apporto di energia per lo svolgimento delle specifiche funzioni cellulari (trasmissione degli impulsi nervosi, contrazione muscolare, trasporti attivi attraverso le membrane plasmatiche, sintesi delle proteine, divisione cellulare, etc.) e più del 95% dell'ATP viene prodotto nei mitocondri mediante la respirazione cellulare. L'ubichinone è il solo trasportatore di elettroni della catena respiratoria che non sia legato ad una proteina e quindi,

grazie alle caratteristiche apolari che gli conferisce la catena terpenica, può diffondere rapidamente all'interno del doppio strato fosfolipidico della membrana interna dei mitocondri. Raccoglie elettroni dai centri ferro-zolfo dei complessi 1 o 2 (**Figura 9**) e quindi migra fino ad entrare in contatto con il complesso 3 dove cede i propri due elettroni ad un gruppo ferro-zolfo e al citocromo c.



Questo si realizza attraverso un processo chiamato *ciclo del coenzima Q* che consiste in un doppio flusso di elettroni e coinvolge due molecole di coenzima Q con un meccanismo in due fasi (**Figura 10**).

Nella prima fase una molecola di  $\text{QH}_2$  cede due elettroni, di cui uno va al centro ferro-zolfo e da questo prosegue fino al citocromo  $c_1$ , mentre l'altro viene ceduto dal  $\text{QH}_2$  al citocromo b nel quale si muove attraverso i due gruppi eme fino ad un'altra molecola di Q che viene ridotta alla forma semichinonica  $\text{QH}\cdot$ . A questo punto solo uno dei 2 elettroni di  $\text{QH}_2$  è stato trasferito al citocromo c. L'altro elettrone è in attesa sotto forma di  $\text{Q}^{\cdot-}$ .

Nella seconda fase una seconda molecola di  $\text{QH}_2$  immette altri due elettroni che seguono la stessa strada dei primi due e giungono, da un lato al citocromo c e dall'altro al semichinone  $\text{QH}\cdot$  che viene ridotto a  $\text{QH}_2$ .

### Mitochondrial Electron Transport Chain

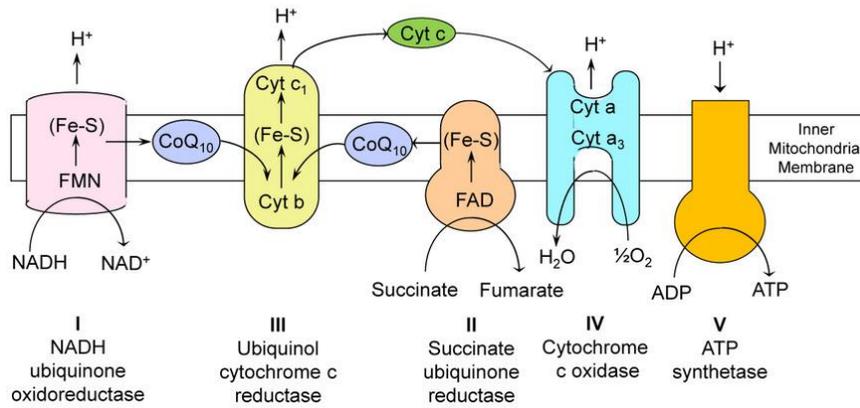


Figura 9. Il coenzima Q<sub>10</sub> fa da spola tra i complessi I e III, II e III ricevendo gli elettroni dai centri Ferro-Zolfo. Parkinson *et al. Journal of neurochemistry* 2013

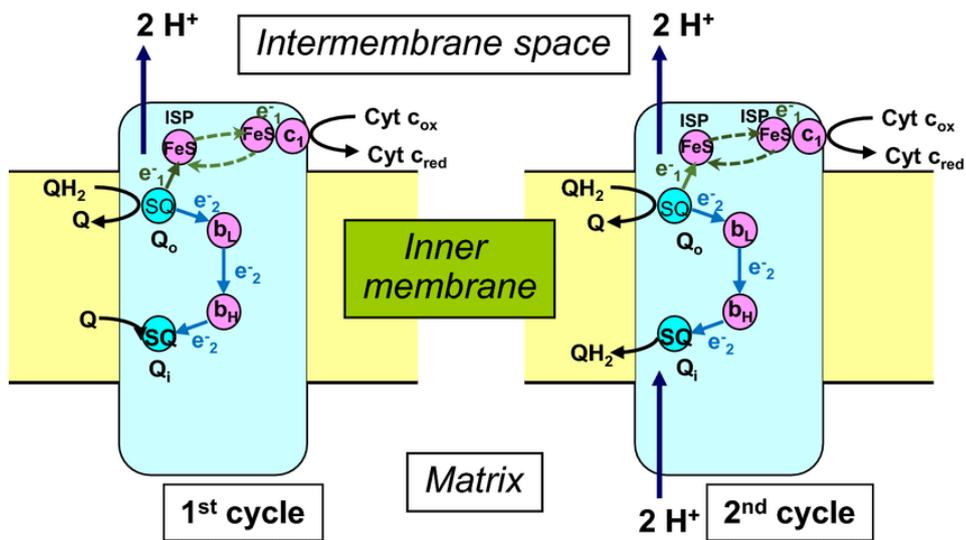


Figura 10. Ciclo del coenzima Q. Fonte Mazat *et al Cellular and Molecular Life Sciences* (2020)

Le reazioni di trasferimento di elettroni da parte dei chinoni si accompagnano con il legame e il rilascio di protoni e questa è una proprietà fondamentale per il trasporto transmembrana di H<sup>+</sup>. La caratteristica del CoQ<sub>10</sub> di avere tre stadi di ossidazione diventa

indispensabile quando il Q deve accettare un solo elettrone per volta dai gruppi ferro-zolfo del complesso 1 o del complesso 2.

Oltre che dai complessi il coenzima Q sembra accettare elettroni anche da altre deidrogenasi presenti in basse quantità e che sembrano essere fattori limitanti nella catena di trasporto degli elettroni (**Figura 11**).

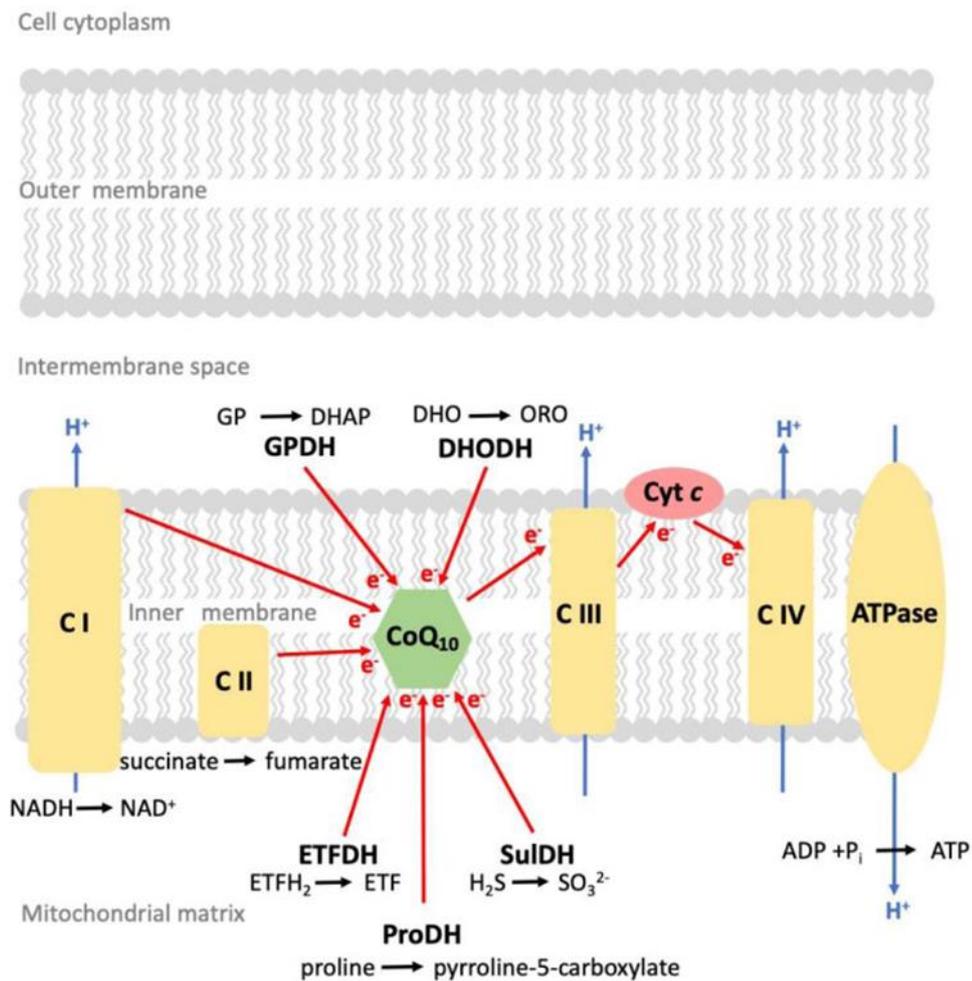


Figura 9. Gli elettroni sono ceduti al coenzima Q dai complessi I e II che li veicola al complesso III. La glicerolo-3-fosfato deidrogenasi (GPDH) mitocondriale, la diidroorotato deidrogenasi (DHODH), la flavoproteina deidrogenasi a trasporto di elettroni (ETFDH), la prolina deidrogenasi (ProDH) e la solfuro deidrogenasi (SulDH) cedono elettroni al CoQ<sub>10</sub> per essere trasferiti al complesso III e infine al complesso IV. Fonte Hana Rauchova *Physiol Res.*2021

#### **6.4 Ruolo antiossidante del coenzima Q<sub>10</sub>**

IL coenzima Q<sub>10</sub> nella forma ridotta (ubichinolo) si comporta come antiossidante fenolico capace di preservare l'integrità delle membrane cellulari, degli organelli, delle vescicole, esercitando un effetto protettivo nei confronti dei lipidi e delle proteine dagli insulti di natura ossidativa. La sua eccezionale efficienza antiossidante è da imputare alla sua natura lipofilica, alla sua localizzazione intramembrana, alla sua abbondanza e dai sistemi capaci di rigenerare la sua forma ridotta. L'azione del coenzima Q come inibitore della perossidazione lipidica si verifica attraverso una complessa interazione durante il processo perossidativo. L'azione principale è quella di prevenire la formazione di radicali perossilici LOO<sup>•</sup> nella reazione di iniziazione tramite la riduzione del radicale perferrilico iniziatore con la formazione dell'intermedio parzialmente ridotto e perossido di idrogeno. Inoltre il coenzima può intervenire direttamente sul radicale perossile o indirettamente rigenerando la vitamina E dalla sua forma reattiva  $\alpha$ -tocoferossile arrestando la reazione di propagazione [53]. Anche il coenzima Q, che viene ossidato nel processo, deve essere rigenerato. Nei mitocondri la sua forma ridotta è generata direttamente dalla catena di trasporto degli elettroni, nelle membrane plasmatiche invece sono coinvolti sistemi che rigenerano l'ubichinolo trasferendo due elettroni in 2 step a singolo elettrone (citocromo B5 reduttasi) oppure in un unico step (NADPH chinone ossidoreduttasi).



## 6.5 Il deficit di Coenzima Q<sub>10</sub>

Nell'uomo è stata identificata una condizione di deficit di coenzima Q<sub>10</sub> che può essere primario o secondario. Il deficit primario è raro e dipende dalle mutazioni a carico dei geni coinvolti nella via biosintetica mentre quello secondario dipende dalla presenza di difetti a carico di processi mitocondriali e non mitocondriali, associati a una riduzione della disponibilità di CoQ<sub>10</sub> nelle cellule o nei tessuti. I deficit di CoQ<sub>10</sub> sono infatti molto comuni nelle malattie mitocondriali associate a cardiomiopatie o miopatie, all'epilessia e all'infertilità. La deplezione di CoQ è anche presente in differenti patologie età dipendenti come diabete di tipo 2 con o senza insulino resistenza, patologie cardiovascolari e aterosclerosi, patologie neurodegenerative, patologie del fegato e nella sarcopenia [54] che sono generalmente associate ad aumentati livelli di stress ossidativo. La somministrazione di coenzima Q potrebbe quindi rappresentare una valida strategia terapeutica per migliorare i sintomi legati alla presenza delle suddette patologie. Ad esempio Mikhin *et al.*, nel 2011 hanno dimostrato che la somministrazione di una combinazione di CoQ<sub>10</sub> e angiotensina a pazienti con ipertensione promuoveva la normalizzazione delle funzioni vascolari endoteliali. Lee *et al.*, nel 2012 hanno invece osservato che la somministrazione di 60/150 mg di ubiquinone al giorno a pazienti con CAD (Coronary Artery Disease) era in grado di ridurre i markers di stress ossidativo come la perossidazione lipidica, considerato un fattore di rischio della stessa patologia. Mortensen *et al.*, nel 2014 hanno invece riscontrato che in pazienti affetti da un moderato o severo arresto cardiaco, la supplementazione con 100 mg per tre volte al giorno di ubiquinolo, per 12 settimane, migliorava la

sintomatologia e riduceva il rischio di eventi cardiovascolari. Anche nei soggetti sani l'integrazione con ubiquinolo può ridurre la mortalità per malattie cardiovascolari, tramite il miglioramento dei livelli di perossidazione lipidica nelle LDL e dello stato redox generale [55]. Infine, anche nelle patologie a carico del sistema nervoso come nel Parkinson, la supplementazione con Coenzima Q<sub>10</sub> sembra essere in grado di migliorare la sintomatologia come dimostrato da Muller *et al.* nel 2003 [56], mentre la somministrazione di alte dosi di CoQ<sub>10</sub> a bambini affetti dalla sindrome dello spettro autistico migliora la condizione di stress ossidativo con concomitanti miglioramenti anche dei problemi gastro intestinali e dei disturbi del sonno [57]. La supplementazione in bambini caratterizzati dalla trisomia 21 sembra essere in grado di normalizzare lo squilibrio ossidativo plasmatico [58]. Nel complesso l'efficacia di questa molecola come nutraceutico risiede proprio nella sua attività antiossidante e nella capacità di migliorare la funzionalità mitocondriale che spesso risulta essere alterata in queste patologie.

## II. SCOPO DELLA TESI

Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato come la sindrome di Rett sia caratterizzata dalla presenza di una condizione di stress e di danno ossidativo molto elevati e come questa potrebbe essere a sua volta coinvolta nella progressione della malattia, sebbene i meccanismi alla base di questo fenomeno non siano ancora del tutto conosciuti. Recentemente, la disfunzione mitocondriale è stata proposta come una delle principali faattrici della patogenesi della sindrome in quanto supportata da diverse evidenze scientifiche che hanno sottolineato la presenza sia di alterazioni della morfologia mitocondriale che dell'attività dei complessi respiratori, in modelli murini e in quelli *in vitro*. Anche l'omeostasi lipidica, in particolare quella del colesterolo, risulta essere profondamente alterata in entrambi i modelli, assumendo un ruolo di rilievo nell'insorgenza e nell'evoluzione delle malattie legate al neurosviluppo. Tra le possibili strategie terapeutiche, l'utilizzo di molecole antiossidanti ed in particolare di nutrienti mitocondriali, potrebbe fornire un valido contributo nel contenimento e nel miglioramento dei sintomi che caratterizzano le numerose varianti fenotipiche di questa sindrome.

In questo contesto, il presente lavoro di tesi ha avuto l'obiettivo di investigare il ruolo del Coenzima Q<sub>10</sub> all'interno della sindrome di Rett, in termini di livelli cellulari e stato ossidativo *in vitro*, mediante l'impiego di una coltura primaria di fibroblasti di derma umano, isolati da biopsie cutanee di tre pazienti e un controllo sano. In particolare, nota

l'alterazione del network proteico alla base del corretto funzionamento del metabolismo lipidico, il presente studio ha mirato a comprendere il ruolo del CoQ<sub>10</sub> in quanto sintetizzato nella stessa via di sintesi del colesterolo, valutando quindi la possibile presenza di un deficit di tipo secondario.

Alla luce della sua attività antiossidante in qualità di antiossidante lipofilico endogeno, sullo stesso modello, sono stati studiati gli effetti legati alla supplementazione esogena per 24 h con 5 µg/mL di ubiquinolo, la forma ridotta del coenzima Q<sub>10</sub>, in termini di riduzione di markers di stress ossidativo quali la produzione di anione superossido mitocondriale e i livelli citosolici di specie reattive dell'ossigeno.

Infine, in termini di meccanismi molecolari coinvolti nell'attività antiossidante del coenzima Q<sub>10</sub>, è stato investigato il possibile ruolo sinergico con la paraoxonasi 2 (PON2), una proteina situata principalmente a livello del complesso III della catena respiratoria mitocondriale e che sembra avere un'elevata affinità di legame con il CoQ<sub>10</sub>, oltre ad altre numerose funzioni legate alla sua attività catalitica quali l'inibizione della formazione di biofilm, la protezione da agenti patogeni e l'attività antiossidante a livello mitocondriale.

### III. MATERIALI E METODI

#### 1. Colture cellulari

##### 1.1. Specifiche delle linee cellulari utilizzate

Lo studio è stato condotto su un modello in vitro mediante l'impiego di una coltura primaria di fibroblasti di derma umano proveniente da biopsia cutanea di un totale di tre pazienti con sindrome di RETT tipica e un controllo sano. Nella **tabella 2** sono indicate le informazioni relative al tipo di sindrome, al gene coinvolto, alla mutazione presente e provenienza della biopsia utilizzata per isolare i fibroblasti impiegati nello studio.

PAZIENTE	TIPO DI SINDROME	GENE COINVOLTO	TIPO DI MUTAZIONE	FENOTIPO	PROVENIENZA DELLA BIOPSIA
CONTROLLO	/	/	/	/	SKIN
RETT 1	TIPICA	MECP2	R133C	MILD	SKIN
RETT 2	TIPICA	MECP2	T158M	SEVERE	SKIN
RETT 3	TIPICA	MECP2	C-TERMINAL DELETION	MILD	SKIN

Tabella 2. Informazioni relative alle linee cellulari utilizzate nello studio

##### 1.2. Isolamento dei fibroblasti in coltura da biopsia cutanea

La biopsia cutanea, una volta prelevata, è stata lavata in PBS sterile 2 o 3 volte e poi trasferita all'interno di una fiasca sterile da 25 cm<sup>3</sup> in modo che il derma fosse a contatto con la superficie pretrattata della fiasca. Sono stati poi aggiunti 2 mL di mezzo di coltura (descritto nel paragrafo

successivo) delicatamente, per non staccare la biopsia e successivamente la fiasca è stata riposta in incubatore a 37°C e in atmosfera controllata (5% CO<sub>2</sub>). Durante la fase iniziale se la biopsia non fosse risultata particolarmente sporca o contaminata è sufficiente stato fare aggiunte di 1mL di mezzo completo ogni tre giorni fino alla comparsa dei primi fibroblasti (7-10 giorni). Successivamente è stato sostituito il mezzo di coltura ogni due giorni aumentando il volume fino a 5 ml man mano che i fibroblasti aumentano di numero. I fibroblasti ottenuti sono stati infine criopreservati in azoto liquido in una soluzione contenente 90% di siero fetale bovino e il 10% di DMSO fino al momento delle analisi.

### **1.3 Mantenimento della coltura cellulare e tecnica di semina**

Le cellule sono state coltivate in DMEM Low Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplementato con il 20% (ad eccezione del controllo sano coltivato al 10%) di siero fetale bovino (FBS) scomplementato (30 minuti a 56° in bagnetto termostato), l'1% penicillina e streptomina (100 U/mL), e l'1% di glutamina (100 U/mL), in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> con una densità di semina compresa tra 6\*10<sup>5</sup> e 9\*10<sup>5</sup>. Le cellule sono state poste in incubatore a 37°C in atmosfera controllata con il 5% CO<sub>2</sub> fino al raggiungimento dell'80-90% di confluenza (5-7 giorni) e trasferite in nuove fiasche attraverso un lavaggio in PBS, seguito dall'aggiunta di tripsina-EDTA fino al distacco completo delle cellule (3-5 minuti a 37°C) e successiva neutralizzazione con mezzo completo in rapporto 1:3. Ai fini dell'esecuzione delle analisi le cellule sono state seminate in 24-well (DCF, MitoSOX, e western blot)

e 6-well (livelli cellulari e stato ossidativo del CoQ10) nel mezzo di coltura al 10% di FBS con una densità di semina rispettivamente di  $4 \cdot 10^4$  e  $1,5 \cdot 10^5$ . Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno in triplicato sperimentale.

## 2. Supplementazione con ubiquinolo (CoQ<sub>10</sub> ridotto)

Al raggiungimento nelle multiwell del 90% di confluenza i fibroblasti sono stati trattati per 24 ore a 37°C con 5 µg/mL di ubiquinolo conservato in aliquote da 50 µL (8,7 mg/mL in cremophor e glicerolo) a -80°C fino al momento dell'utilizzo e disciolto in mezzo di coltura DMEM low glucose. La soluzione di CoQ<sub>10</sub> è stata ottenuta attraverso una prediluizione a 100 µg/mL e una successiva diluizione alla concentrazione finale di 5 µg/mL a partire da un madre concentrata 8,7 mg/mL. Partendo dalla soluzione madre, quella finale di CoQ<sub>10</sub> è stata ottenuta attraverso una prediluizione a 100 µg/mL e una successiva diluizione alla concentrazione finale di 5 µg/mL. Nelle figure seguenti sono riportati gli schemi dei trattamenti per i singoli esperimenti.

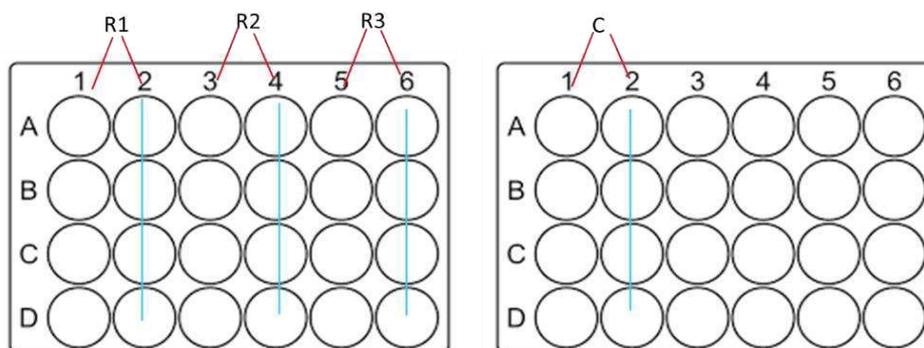


Figura 11. Schema di supplementazione con 5 µg/mL di CoQ<sub>10</sub> per l'analisi dei livelli di anione superossido mitocondriali (MitoSOX), i livelli citosolici di specie reattive dell'ossigeno (DCF) e i

livelli di espressione della PON2 (Western blot), 4 pozzetti evidenziati con la linea azzurra rappresentano quelli trattati per ciascuno paziente per tutte le analisi.

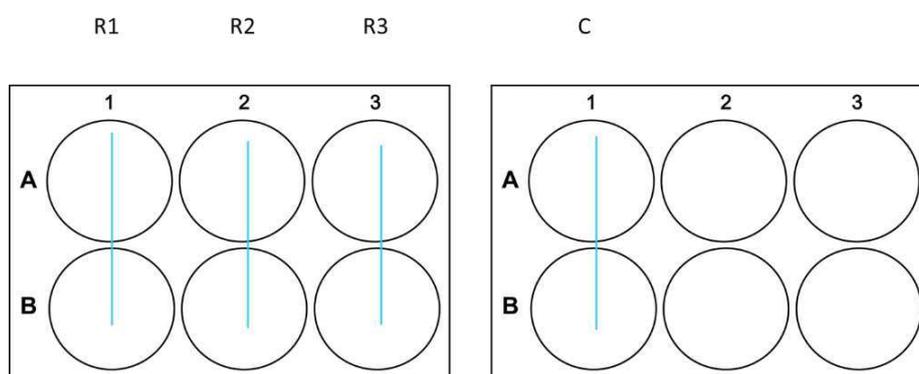


Figura 12. Schema di supplementazione con 5 µg/mL di CoQ10 per la quantificazione dei livelli cellulari di coenzima Q10 ed il suo stato ossidativo (HPLC-ECD). I 2 pozzetti evidenziati con la linea azzurra rappresentano quelli trattati per ciascun paziente per le analisi.

La madre del coenzima Q<sub>10</sub> ridotto è stata ottenuta sciogliendo 10 mg di coenzima Q<sub>10</sub> in polvere (Kaneka, Giappone) in 12 mL di etanolo assoluto in una falcon a bagnomaria, alla temperatura di circa 60°C. Successivamente sono stati aggiunti 30 mg di cremophor (emulsionante costituito da PEG-hydrogenate castor oil) e 18 mg di glicerolo sulla base della proporzione di 10 (Cremophor): 4 (CoQ): 6 (glicerolo). Infine è stato aliquotato in vials e conservato a -80°C fino al momento dell'uso.

### 3. Quantificazione dei livelli di CoQ<sub>10</sub>

Dopo le 24h ore di trattamento con il CoQ<sub>10</sub> le cellule nelle 6 well sono state recuperate e trasferite in eppendorf mediante l'utilizzo di tripsina-EDTA precedentemente scaldata a 37°C e lasciata agire per 3-5 minuti e successivamente neutralizzata con mezzo di coltura in rapporto di 1:3. Al momento del trasferimento due pozzetti per ciascun paziente sono stati

riuniti in una singola eppendorf. Le eppendorf sono state trasferite subito in ghiaccio e centrifugate a 500g per 5 min a 4°C. Il pellet è stato risospeso in 100 µl di tampone fosfato salino (PBS) e diviso in due aliquote: 50 µl di sospensione cellulare sono stati destinati all'analisi in *High performance liquid chromatography* (HPLC) e 50 µl di pellet cellulare, ottenuto con una seconda centrifuga a 500g per 5 minuti, alla quantificazione delle proteine totali mediante la metodica del *Bicinchoninc acid assay* (BCA assay). Le aliquote sono state conservate a -80°C fino al momento delle analisi.

La quantificazione del coenzima Q<sub>10</sub> è stata eseguita mediante l'impiego di un *High performance liquid Chromatography* (HPLC) con rivelatore elettrochimico (ECD).

La sospensione cellulare (50 µl), è stata velocemente scongelata in ghiaccio e addizionata di propanolo (250 µl) per estrarre le molecole lipofile dalle cellule e indurre la precipitazione delle proteine. Dopo aver vortexato vigorosamente il campione per circa un minuto, questo è stato centrifugato a 20.900 g per 2 minuti a 4°C. Infine 40 µl di surnatante sono stati iniettati all'HPLC-ECD ed è stata avviata l'analisi cromatografica.

Il sistema cromatografico utilizzato è dotato di un detector elettrochimico Shiseido Co. Ltd 3005, di due pompe Shiseido-M 3201, di un campionatore automatico refrigerato Shiseido-M 3023 e di una valvola switch Shiseido-M 3012. La peculiarità risiede nell'utilizzo di 3 colonne cromatografiche: una colonna concentrante Capcel I Pack C18 MG che permette di concentrare l'analita rendendolo più facilmente

rilevabile, una colonna analitica Capcel I Pack C18 AQ (150 mm x 2 mm I.D.) che separa le molecole di interesse in virtù delle loro caratteristiche chimico fisiche, e una colonna riducente (OSAKA SODA CQ-R; 2.0 mm x 20 mm) che ha la funzione di ridurre le forme ossidate del coenzima Q<sub>10</sub> presenti nel campione. In questo modo il detector con un potenziale elettrochimico di 650 mV è in grado di rilevare solo le forme ridotte delle molecole, discriminando i due stati ossidativi del coenzima Q separati attraverso la colonna analitica in funzione dei tempi di ritenzione (**Figure 15 e 16**).

Il campione raggiunge la colonna analitica tramite l'impiego di due fasi mobili con le seguenti caratteristiche:

- Fase mobile 1 [50 mM Sodio Perclorato in Metanolo/Acqua deionizzata (95/5, v/v) con flusso di 200 µl/min]
- Fase mobile 2 [50 mM Sodio Perclorato in Metanolo/2-Propanolo (95/5, v/v) con flusso di 240 µl/min]

I tempi di ritenzione sono i seguenti:

- Q<sub>10</sub> ridotto –15 minuti
- Q<sub>10</sub> ossidato –21 minuti

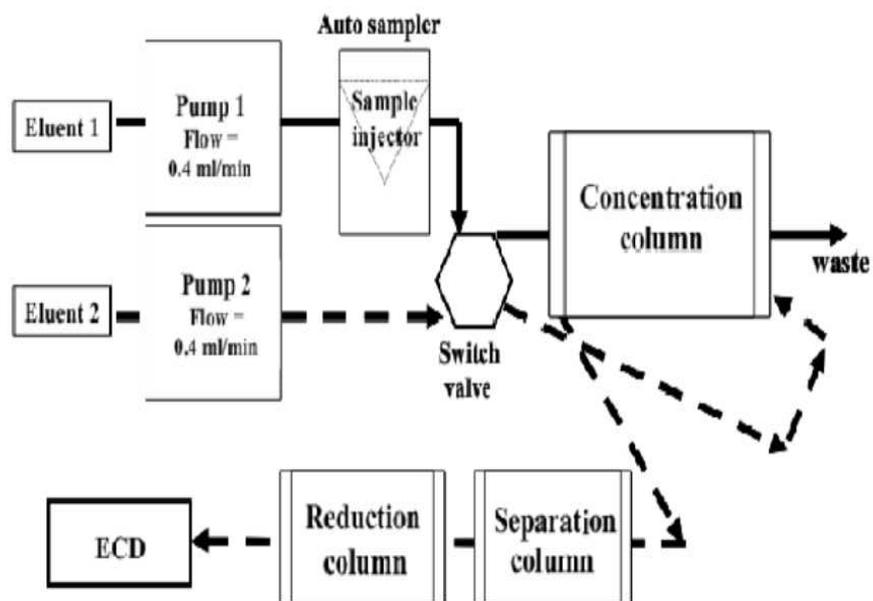


Figura 13. Schema del funzionamento del sistema HPLC-ECD

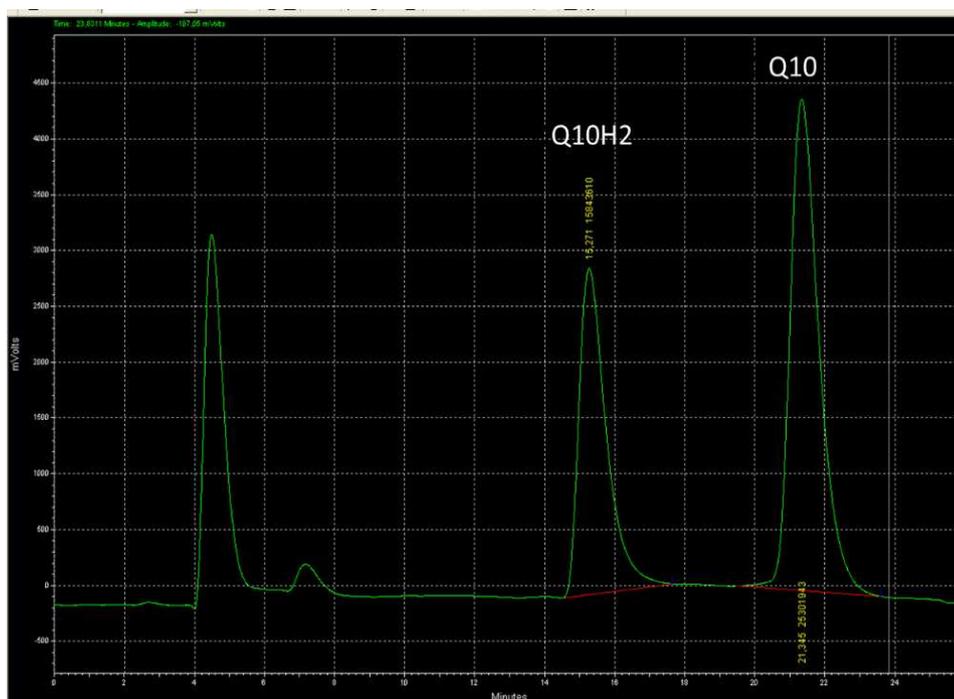


Figura 14. Esempio di un cromatogramma ottenuto in seguito all'analisi HPLC-ECD di un campione di sospensione cellulare di fibroblasti di RETT trattate con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di ubiquinolo. Il primo picco corrisponde alla forma ridotta del coenzima Q10 mentre il secondo alla forma ossidata.

#### 4. Quantificazione delle proteine totali

Il metodo dell'acido bicinconinico (BCA assay) è uno dei metodi colorimetrici utilizzati per la determinazione della concentrazione delle proteine in campioni biologici. Nel nostro studio è stato utilizzato per due motivi:

- Normalizzare i livelli di Q<sub>10</sub> in funzione del contenuto cellulare, espresso in termini di proteine. Il contenuto finale è stato riportato come µg di CoQ<sub>10</sub> / mg di proteine.
- Quantificare le proteine per analisi di Western Blot.

Il saggio combina la riduzione dello ione Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> da parte delle proteine in ambiente alcalino con il rilevamento colorimetrico sensibile e selettivo del catione rameoso, impiegando un unico reagente contenente acido bicinconinico. A seguito della chelazione di due molecole di acido bicinconinico con uno ione rameoso si ha una reazione colorimetrica con formazione di una soluzione di colore viola che assorbe a 562 nm. Le concentrazioni delle proteine dei campioni sono determinate sulla base di una curva standard allestita al momento delle analisi utilizzando albumina sierica bovina (BSA) a concentrazioni note.

Per normalizzare i livelli di Q<sub>10</sub> i pellet cellulari, conservati a -80°C, sono stati scongelati a temperatura ambiente e risospesi in 15 µl di RIPA buffer, vortexati vigorosamente per 30 secondi e sottoposti a centrifugazione a 13.000 g per 5 minuti a 4°C. Il ripa buffer è un buffer per estrarre e preservare le proteine dalle cellule di mammifero grazie alla sua composizione con tre detergenti ionici e non ionici.

Il surnatante contenente le proteine è stato poi diluito 10 volte in acqua deionizzata e trasferito in una microplate well con un volume di 25  $\mu$ l. In ciascun pozzetto sono stati ulteriormente aggiunti 200  $\mu$ l del Working reagent (Thermo Scientific), ottenuto mescolando 50 parti del BCA Reagent A con 1 parte del BCA Reagent B (50:1, Reagent A: B). Dopo incubazione di 30 minuti a 37°C e altri 10 min a temperatura ambiente è stata eseguita la lettura in assorbanza a 563 nm al lettore di piastre (Biotek).

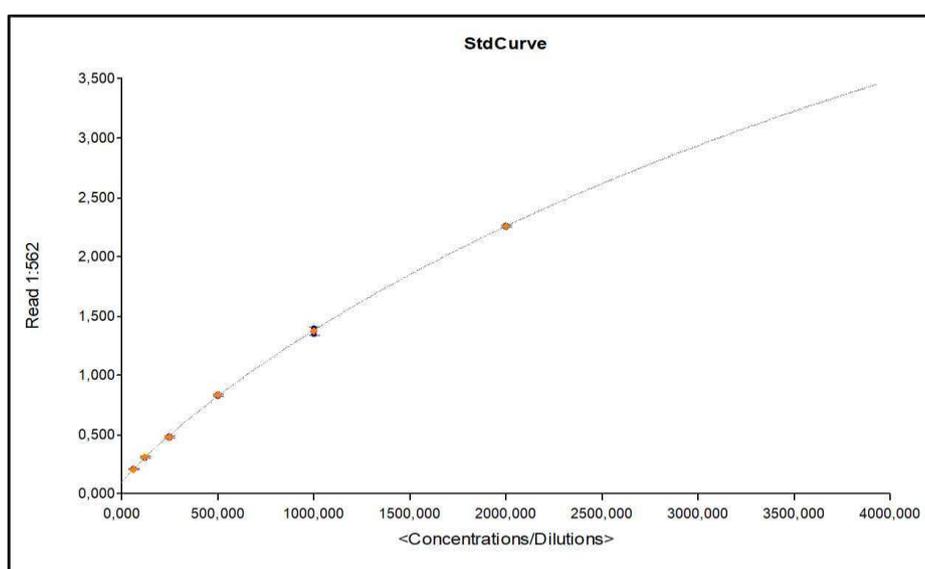


Figura 15. Esempio di curva standard ottenuta usando 6 concentrazioni note di BSA (2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5  $\mu$ g/ml).

## 5. Saggi citofluorimetrici per l'analisi di markers di stress ossidativo

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono state analizzate attraverso saggi di citofluorimetria a flusso utilizzando il Guava Flow-Cytometer (Millipore) e di due sonde specifiche per la rilevazione delle specie reattive dell'ossigeno.

La citofluorimetria è una tecnica che permette di caratterizzare una

sospensione cellulare sia quantitativamente sia qualitativamente, valutando sia parametri fisici come dimensione e complessità sia parametri biochimici.

Le cellule vengono fatte passare mediante la camera di flusso perpendicolarmente ad una sorgente luminosa (laser). Attraverso un detector è possibile registrare sia il fascio deviato (Side Scatter) sia il fascio che attraversa le singole cellule (Forward scatter). In particolare il forward scatter (FSC) permette di discriminare le cellule per la dimensione. L'intensità del FSC è proporzionale al diametro delle cellule ed è principalmente dovuta alla diffrazione della luce che attraversa le cellule.

Il side scatter (SSC) permette di ottenere informazioni relativamente la complessità interna della cellula ed è ottenuto da fenomeni di riflessione e rifrazione della luce che colpisce le strutture intracellulari. Nel side scatter inoltre vengono rilevate anche le fluorescenze degli eventuali fluorocromi impiegati.

### **5.1 Saggio della Cloro metil-H<sub>2</sub>diclorofluoresceina diacetata (CM-H<sub>2</sub>DCFDA)**

Il saggio mediante l'utilizzo della metil-H<sub>2</sub>diclorofluoresceina diacetata è stato utilizzato per valutare la presenza di specie reattive dell'ossigeno citosoliche.

In particolare, questa sonda polare è in grado di diffondere passivamente all'interno delle cellule, dove il gruppo acetato della molecola viene tagliato dalle esterasi intracellulari e il suo gruppo clorometile reagendo

con il glutatione e altri tioli intracellulari fa sì che la sonda rimanga intrappolata all'interno delle cellule. Successivamente in presenza di ROS la molecola viene ossidata divenendo in grado di emettere una fluorescenza direttamente proporzionale alla quantità di ROS citosolici (eccitazione con laser blu 492-495 nm e emissione nel verde a 517-527 nm) (**Figura 18**).

Le cellule seminate nella 24 well, trattate secondo il modello sperimentale descritto, prima di essere raccolte sono state incubate per 15 minuti a 37°C con 150 µl di una soluzione 1µM di CM-H<sub>2</sub>DCFDA preparata in DMEM LG al 1% di FBS a partire da una stock concentrata 1mM in dimetilsolfossido (DMSO). Al termine dell'incubazione è stato eseguito un lavaggio in PBS per rimuovere l'eccesso di sonda ed è stata utilizzata la tripsina-EDTA per il distacco delle cellule. A questo punto è stato aggiunto mezzo di coltura completo (10% FBS) per neutralizzare la tripsina. Quindi, la sospensione cellulare di ogni campione è stata poi trasferita in eppendorf (una per ogni pozzetto), messa in ghiaccio e infine centrifugata a 500 g per 5 minuti a 4°C. Il pellet è stato successivamente risospeso in 150 µl di PBS. Prima di eseguire l'analisi al citofluorimetro, a ciascun campione sono stati aggiunti 11,25 µl di ViaCount (Luminex), un reagente costituito da due differenti sonde in grado di discriminare le cellule vitali da quelle apoptotiche e morte grazie alla capacità di legare il DNA in funzione della permeabilità differenziale.

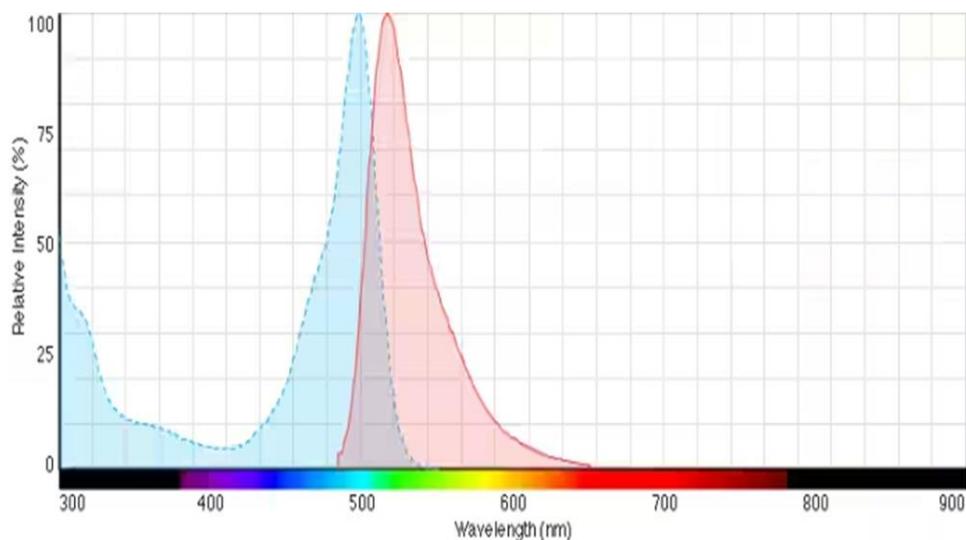


Figura 16. Spettro di emissione (517-527 nm) e eccitazione (492-495) della sonda CM-H2DCFDA (ThermoFisher).

## 5.2. MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator

Il saggio mediante l'utilizzo della sonda MitoSOX Red Superoxide Indicator è una sonda che è in grado di targhetare e accumularsi selettivamente all'interno dei mitocondri grazie alla carica positiva del sostituito cationico trifenilfosfonio. In presenza di superossido mitocondriale il MitoSOX viene ossidato producendo una fluorescenza rossa a 610 nm rilevabile dal citofluorimetro a seguito di eccitazione con laser a 396 nm.

Similmente a quanto descritto precedentemente le cellule sono state incubate 15 minuti a 37°C con 100 µl di una soluzione 5µM di MitoSOX red preparata in DMEM Low Glucose al 1% FBS ottenuta a partire da una stock concentrata 5mM in DMSO. Al termine dell'incubazione le cellule sono state raccolte, centrifugate, risospese in 150 µl di PBS ed analizzate al citofluorimetro.

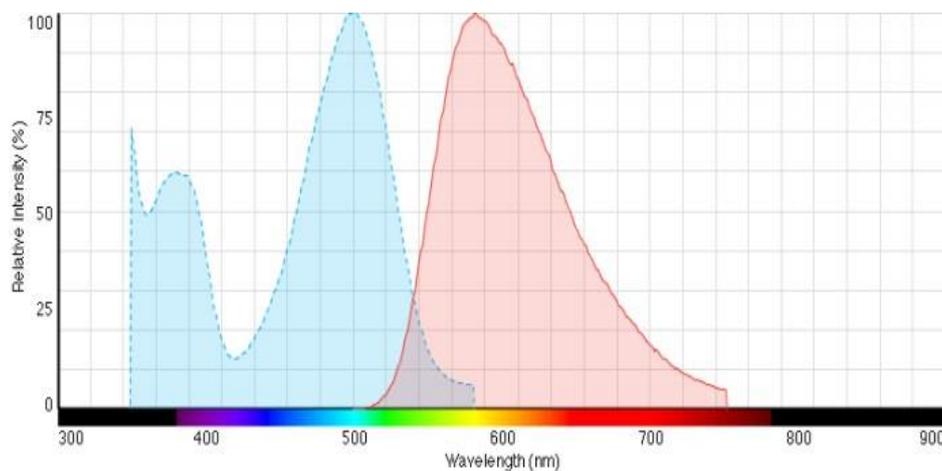


Figura 17. Spettro di emissione (610nm) e eccitazione (396nm) della sonda MitoSOX Red (ThermoFisher).

## 6. Western Blot

Il western è una tecnica analitica che permette di identificare una determinata proteina all'interno di una miscela complessa di proteine. Le proteine vengono separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide e poi visualizzate con una combinazione di anticorpi primari, specifici per la proteina di interesse e secondari, mirati verso l'anticorpo primario marcati con enzimi come la perossidasi di rafano. Quest'ultima in presenza di perossido di idrogeno catalizza la reazione di ossidazione del substrato (luminol) con sviluppo di luminescenza. Nel presente studio la metodica del western blot è stata impiegata per valutare i livelli di espressione della Human paraoxonase 2 (PON2).

Le multiwell contenenti le cellule per l'esperimento sono state messe in ghiaccio. Dopo un lavaggio in PBS freddo è stato utilizzato RIPA buffer (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate) contenente fosfatasi e inibitore delle proteasi

(Roche, Switzerland) e uno scraper per recuperare le cellule presenti nei pozzetti. I pozzetti con le stesse condizioni sono stati riuniti in un'unica eppendorf. Le eppendorf sono state vortexate vigorosamente e centrifugate a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C. A questo punto il sovrantante è stato recuperato per la quantifica con BCA assay similmente a quanto già descritto. Il campione è stato diluito 10 volte prelevando 6 µl di sospensione proteica e aggiungendo 56 µl di H<sub>2</sub>O e poi prelevati 25 µl di sospensione e trasferiti nella microwell plate con 200 µl di reagente (Reagente A +B, 50:1) per la quantificazione. Dopo la quantificazione delle proteine la sospensione di proteine iniziale è stata risospesa in Sample loading buffer (LDS) al fine di avere una concentrazione di proteine di 1µg/µl. Il Sample buffer è un buffer contenente sonda coomassie che permette la visualizzazione della progressione della corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide. Infine i campioni sono stati denaturati a 90° per 5 minuti e poi conservati a -80°C fino al momento delle analisi.

Il western blot inizia con la preparazione di un gel al 12% di sodio dodecil solfato (SDS). All'interno di uno stampo vengono aggiunti 8,6 ml di acqua distillata, 6 ml di acrilamide al 40% e 5 ml di tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (TRIS) 1,5 M a pH 8.8. Per innescare la polimerizzazione sono stati aggiunti 200 µl di SDS al 10%, 200 µl di ammonio persolfato (APS) al 10% e 8 µl di tetrametiletildiammide (TAMED). Al di sopra della sospensione è stato messo un solvente a diverso peso specifico come il metanolo e lasciato poi polimerizzare per circa 1h e 15 min. Al gel solidificato è stato poi aspirato il metanolo ed è stata aggiunta una soluzione per lo

stack gel al 5% costituita da 7,3 ml di acqua distillata, 1,25 ml di acrilamide al 40%, 1,25 ml di Tris 1 M a pH 6,8, 100 µl di SDS e APS al 10% e 10 µl di TAMED. All'interno della soluzione sono stati poi inseriti dei pettini per creare i pozzetti e il tutto è stato lasciato ulteriormente polarizzare per 1h e 30 min. Il gel polimerizzato è stato poi messo all'interno di una cameretta elettroforetica riempita con Electrode buffer (SDS, tris, glicina) e i campioni sono stati caricati nei pozzetti e fatte correre a 70 Volts a temperatura ambiente per circa 2 ore. Terminata la corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite dal gel ad una membrana in polivinilidenefluoruro (PVDF) mediante l'attivazione in metanolo su agitatore oscillante e trasferimento in transfer buffer. A questo punto è stato composto un vero e proprio "sandwich" costituito da:

1. Spugna
2. Foglio di carta assorbente
3. Gel
4. Membrana in PVDF attivata
5. Foglio di carta assorbente
6. Spugna

Il tutto rigorosamente tenuto ben umido.

Il sandwich è stato collocato nella cameretta per il trasferimento ed immerso nel transfer buffer. Il trasferimento è stato fatto a 4°C a 30 Volts overnight.

La membrana è stata poi bloccata con blocking solution, lavata con PBS

tween e incubata per 1h e 45 min con due anticorpi primari rispettivamente per la proteina PON2 (rabbit polyclonal PON2 Sab1303623 Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e la vinculina (rabbit monoclonal Vinculin A2752 Abclonal, Woburn, MA, USA) come gene di riferimento. Al termine dell'incubazione sono stati effettuati 5 lavaggi da 5 minuti ognuno per rimuovere l'anticorpo primario in eccesso e la membrana è stata incubata con anticorpo secondario (goat anti-rabbit IgG-HRP 12-348 Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) per 1h e 30 min. Al termine dell'incubazione sono stati eseguiti 5 lavaggi da 5 minuti ognuno in PBS Twin e successivamente è stato aggiunto il rivelatore di fluorescenza (Clarity Max Western ECL Substrate) costituito dalla soluzione luminol/enhancer e dalla peroxide reagent. Il segnale chemiluminescente è stato acquisito usando il ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad) e la quantità di proteine è stata analizzata usando il software Image J (Version 1.50i, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

## **7. Analisi statistica**

Gli esperimenti sono stati condotti effettuando almeno il triplicato sperimentale con all'interno almeno il duplicato tecnico. I dati sono stati analizzati mediante il test statistico One-way ANOVA utilizzando il software Graphpad (Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA) e sono stati rappresentati sia come istogrammi che descrivono la media  $\pm$  la deviazione standard (DS) che come box plot, i quali illustrano la distribuzione dei dati in termini di valore minimo, massimo, mediana

(linea centrale che identifica il 50° percentile), 25° e 75° percentile. Le significatività delle variazioni tra i campioni sono state riportate come segue: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  rispetto al controllo e  $p^\# < 0,05$ ,  $p^{\#\#} < 0,01$ ,  $p^{\#\#\#} < 0,001$  rispetto al proprio basale.

## IV. RISULTATI

### 1. Livelli totali di Coenzima Q<sub>10</sub> intracellulare

I livelli intracellulari di coenzima Q<sub>10</sub> sono stati riportati come  $\mu\text{g}$  di CoQ<sub>10</sub> su mg di proteine intracellulari (**grafico1**). I dati illustrati mostrano come i livelli di CoQ<sub>10</sub> dei pazienti R1 ed R3 con sindrome di Rett tipica, non risultano significativamente differenti dal controllo. Diversamente il paziente R2 (mutazione T158M, fenotipo severo) mostra dei livelli significativamente più bassi rispetto sia al controllo sano ( $***p < 0,001$ , -42%) che agli altri due pazienti ( $**p < 0,01$  vs R1, -36,8% e  $*p < 0,05$  vs R3, -50%).

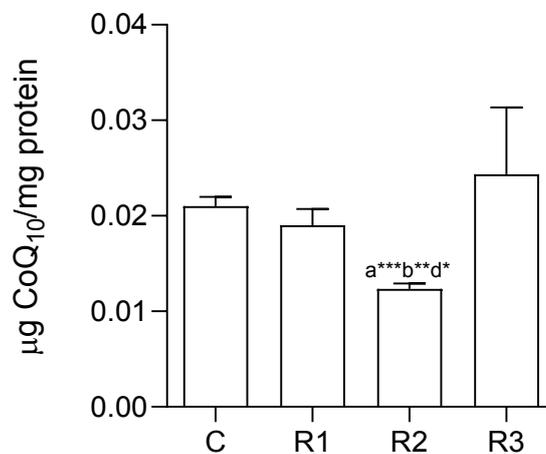


Grafico 1. Livelli intracellulari totali di coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) espressi come  $\mu\text{g}$  di CoQ<sub>10</sub> normalizzati su milligrammi (mg) di proteine totali cellulari (media  $\pm$ DS). C (Controllo sano), R1 (mutazione R133C), R2 (mutazione T158M) e R3 (Delezione C-terminale).  $P < 0,0001$  vs Controllo ( $a***$ ),  $p = 0,003$  vs R1 ( $b**$ );  $P = 0,04$  vs R3 ( $d*$ ).

## 2. Uptake cellulare di coenzima Q<sub>10</sub> esogeno

L'uptake cellulare di CoQ<sub>10</sub> è stato valutato dopo 24 ore di supplementazione con 5 µg/ml per 24 ore con ubiquinolo (la forma ridotta del coenzima Q<sub>10</sub>). I dati illustrati nel **grafico 2** mostrano come i livelli intracellulari di CoQ<sub>10</sub> (µg CoQ<sub>10</sub>/mg proteine) sono risultati significativamente aumentati nei fibroblasti di tutti i pazienti arruolati nello studio. In particolare sono stati registrati aumenti dalle 23 (R1, #p<0,05, +2.300%) alle 68 (R2, ###p<0,001, +6.566%) volte superiori rispetto ai livelli basali corrispondenti.

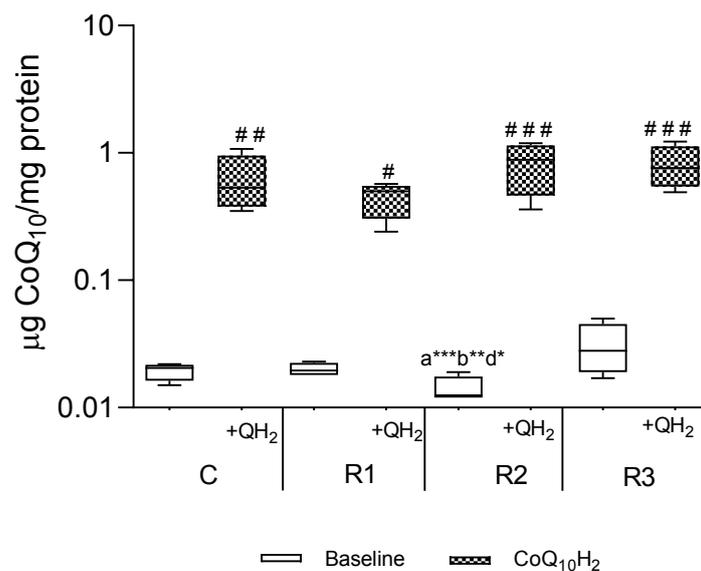


Grafico 2. Livelli totali di Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) intracellulari dopo 24 ore di supplementazione con 5 µg/ml di ubiquinolo (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) espresso come µg di CoQ<sub>10</sub> normalizzati su milligrammi (mg) di proteine totali intracellulari. (media±DS). C (Controllo sano), R1 (mutazione R133C), R2 (mutazione T158M) e R3 (Delezione C-terminale). p=0,005 vs Controllo basale (##); p=0,05 vs R1 basale (#); p=0,0001 vs R2 basale (###); p=0,0003 vs R3 basale (###).

Nello specifico, i fibroblasti del paziente R2 affetto dalla mutazione T158M (fenotipo severo), caratterizzati da livelli basali di coenzima Q<sub>10</sub>

significativamente più bassi rispetto sia al controllo sano e che agli altri due pazienti, in seguito a 24 h di supplementazione con 5 µg/mL di ubiquinolo esogeno, hanno fatto registrare l'incremento significativamente più alto (\* $p < 0,05$ ) dei livelli cellulari di CoQ<sub>10</sub> in termini di n fold (**grafico 3**)

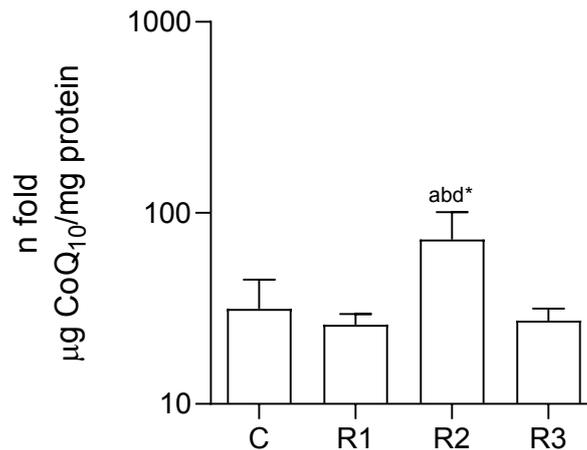


Grafico 3. Incremento dei livelli di Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) intracellulari dopo 24 ore di supplementazione con 5 µg/ml di ubiquinolo (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) espresso come N fold rispetto ai livelli basali (media±DS). C (Controllo sano), R1 (mutazione R133C), R2 (mutazione T158M) e R3 (Delezione C-terminale).  $p=0,02$  vs Controllo (a\*);  $p=0,01$  vs R1 (b\*);  $p=0,01$  vs R3 (d\*).

L'analisi degli stessi dati in termini di correlazione tra il contenuto cellulare basale di coenzima Q<sub>10</sub> e l'incremento raggiunto dopo 24 h di supplementazione non ha messo in evidenza alcuna significatività ( $p=0,15$ ,  $R^2=0,72$ ), probabilmente a causa del numero esiguo di dati dovuto all'arruolamento nello studio di soli 4 soggetti (3 pazienti affetti dalla sindrome di Rett e un controllo sano) (**grafico 4**).

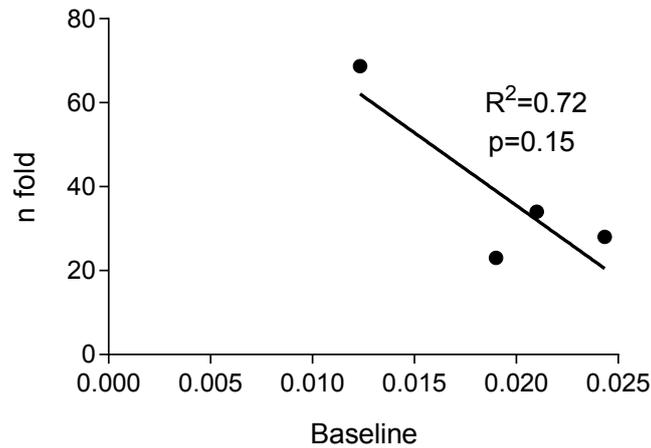


Grafico 4. Correlazione tra i livelli basali di Coenzima  $Q_{10}$  ( $CoQ_{10}$ ) e gli n fold di incremento dello stesso parametro dopo 24 ore di trattamento con  $5 \mu\text{g/mL}$  di Ubiquinolo ( $CoQ_{10}H_2$ ). Ogni punto nero riportato nel grafico rappresenta un soggetto arruolato nello studio ossia, 3 pazienti affetti da sindrome di Rett e 1 controllo sano.

### 3. Stato ossidativo del coenzima $Q_{10}$ intracellulare

Uno tra i primi parametri di stress ossidativo analizzati nello studio è stato lo stato ossidativo del coenzima  $Q_{10}$  descritto come la percentuale di  $CoQ_{10}$  ossidato sul  $CoQ_{10}$  totale, dato dalla somma delle forme ossidata e ridotta. Lo stato ossidativo basale dei pazienti affetti da sindrome di Rett è risultato essere paragonabile al controllo sano. In seguito a supplementazione con  $5 \mu\text{g/ml}$  per 24 ore con ubiquinolo lo stato ossidativo di ciascun paziente è risultato essere migliorato in termini diminuzione della percentuale di coenzima  $Q_{10}$  ossidato, raggiungendo livelli significativamente più bassi sia rispetto al controllo sano che al proprio basale (**grafico5**). La percentuale di coenzima  $Q_{10}$  ossidato dei fibroblasti del paziente R1 sono inoltre risultati significativamente più bassi anche rispetto al controllo sano trattato (\*\* $p < 0,01$  (b)).

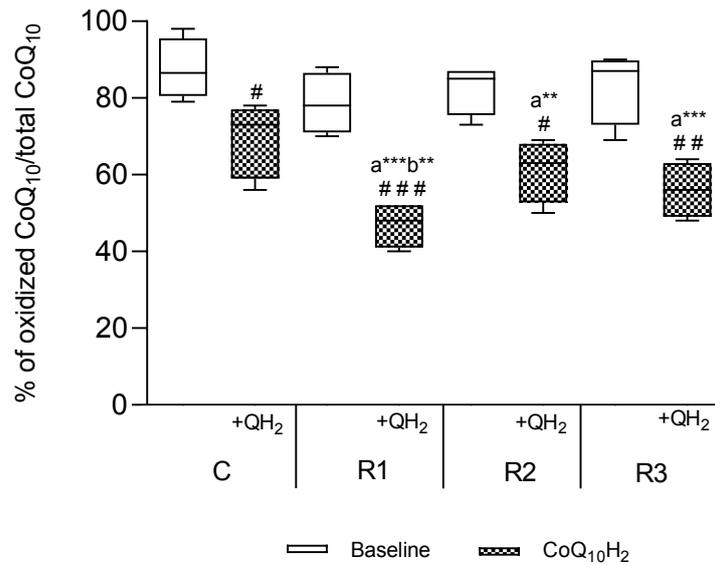


Grafico 5. Percentuale di Coenzima  $Q_{10}$  ( $CoQ_{10}$ ) ossidato sul coenzima  $Q_{10}$  totale, basale (box bianchi) e dopo trattamento con  $5 \mu\text{g/mL}$  di ubichinolo ( $CoQ_{10}H_2$ ) (box quadrettati). C (Controllo sano), R1 (mutazione R133C), R2 (mutazione T158M) e R3 (Delezione C-terminale). ( $p=0,03$  vs Controllo basale (#);  $p=0,0002$  vs basale di R1 (###);  $p=0,02$  vs R2 basale (#);  $p=0,001$  vs R3 basale (##);  $p<0,0001$  (a\*\*\*);  $p=0,002$  (a\*\*);  $p=0,0002$  (a\*\*\*)) ed il controllo + $CoQ_{10}H_2$  (b) ( $p=0,007$  b\*\*).

#### 4. Saggi citofluorimetrici per la rilevazione delle specie reattive dell' $O_2$

Le analisi citofluorimetriche sono state condotte per analizzare i livelli citosolici delle specie reattive dell'ossigeno e la produzione di anione superossido mitocondriale, sia in condizioni basali che in seguito a 24 ore di trattamento con  $5 \mu\text{g/mL}$  di ubichinolo. Data la distribuzione della popolazione cellulare del campione di controllo, definita dai parametri "count" (numero di eventi) e "fluorescence" (verde per la CM-H<sub>2</sub>-DCFDA e gialla per il MitoSOX red), arbitrariamente, per entrambi i parametri, sono stati stabiliti due gate corrispondenti alla percentuale di cellule contenente un bassissimo contenuto di ROS (Low) e a quella

contenente un altissimo contenuto di ROS (high), che per il campione di controllo sono stati settati entrambi al 10% **Figura 20**.

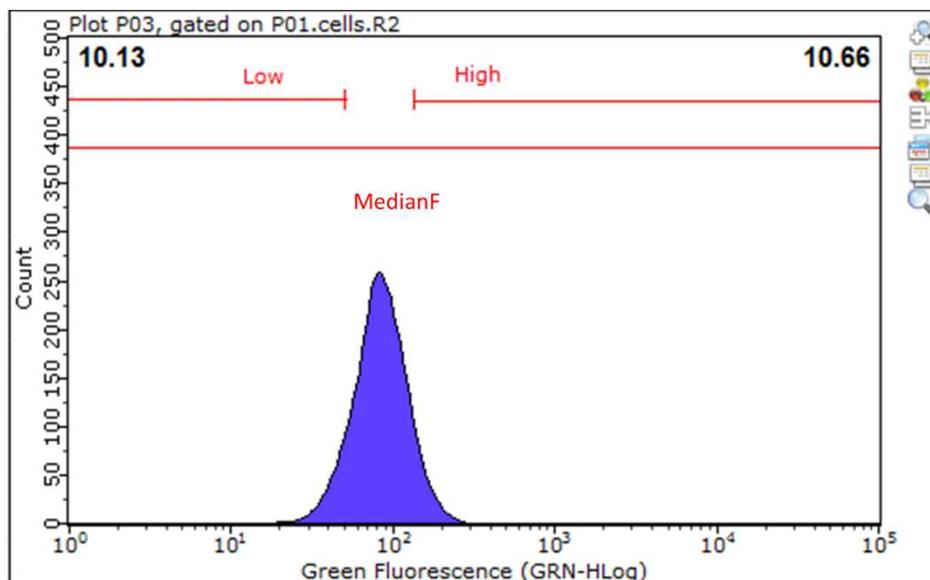


Figura 18. Istogramma della distribuzione della popolazione cellulare del campione di controllo, descritta in termini di conta cellulare e fluorescenza della sonda (Green per la CM-H<sub>2</sub>DCFDA e Gialla per il MitoSOX red). LOW: gate relativo alla percentuale di cellule con un bassissimo contenuto di ROS. HIGH: gate relativo alla percentuale di cellule con un altissimo contenuto di ROS. Median F: mediana della fluorescenza

#### 4.1 Livelli di anione superossido mitocondriale

I livelli di anione superossido sono stati valutati sia in termini di median fluorescence intensity (MFI) del MitoSOX superoxide indicators, espresso come unità di fluorescenza relativa (RFU) (**grafico6**) e come rapporto tra la percentuale di cellule con un alto contenuto di anione superossido e quella con un basso contenuto (Ratio high/low O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (**grafico7**). Nel primo caso, l'analisi della fluorescenza ha messo in evidenza un trend in aumento della produzione di anione superossido, anche se solamente nel paziente R3 è risultata essere statisticamente più alta rispetto al campione di controllo (\*\*p<0,01, +1.611%). In seguito a

trattamento con 5 µg/ml per 24 ore con ubiquinolo non sono state osservate differenze statisticamente significative rispetto sia al controllo che ai rispettivi livelli basali. Inoltre, la supplementazione con ubiquinolo non ha fatto registrare un miglioramento significativo dello stesso parametro nel paziente R3, in cui livelli di anione superossido sono rimasti invariati.

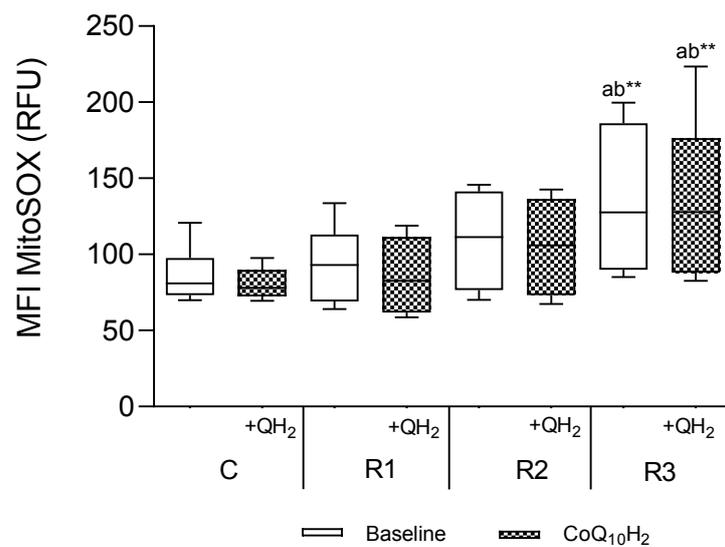


Grafico 6. Median fluorescence intensity (MFI) del MitoSOX<sup>TM</sup> mitochondrial superoxide indicators espressa come Relative Fluorescence Units (RFU) in condizioni basali (white boxes) e dopo 24 ore di supplementazione con 5 µg/mL di Ubichinolo (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) (squared boxes). C (Controllo sano), R1 (mutazione R133C), R2 (mutazione T158M) e R3 (Delezione C-terminale). \*\*p<0,01 vs controllo (a) e controllo trattato con ubiquinolo (b)

Diversamente, analizzando lo stesso dato in termini di rapporto tra le percentuali High/Low, sia R2 (p=0,02) che R3 (p=0,004), in condizioni basali (box bianchi), sono risultati caratterizzati da un contenuto di anione superossido significativamente più alto rispetto al controllo sano mentre in R1 i livelli si sono confermati paragonabili. La supplementazione con ubiquinolo è stata in grado di abbassare il rapporto, aumentando la percentuale di cellule con bassi livelli di anione

superossido sia in R1 (# $p < 0,05$  vs basale) che in R2 il quale dopo il trattamento non è risultato più significativamente differente dal controllo ( $p = 0,19$ ). Infine, per quanto riguarda il paziente R3, anche quest'analisi ha messo di nuovo in evidenza l'elevato contenuto di anione superossido e l'incapacità dell'ubichinolo di invertire la produzione osservata in condizioni basali.

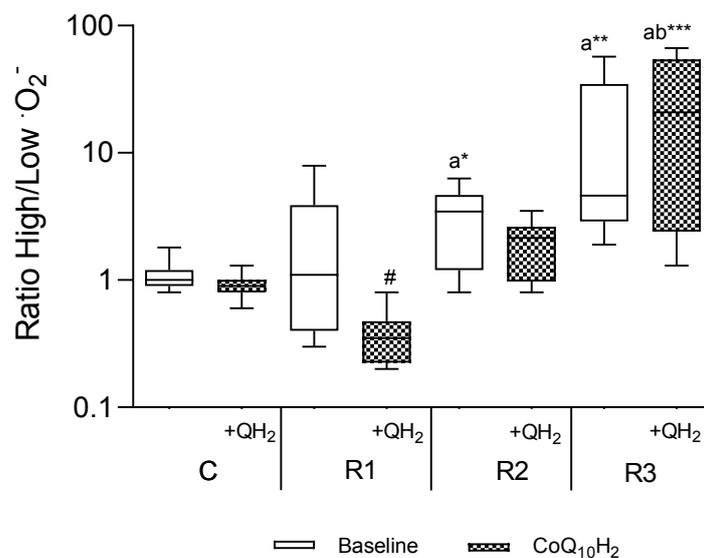


Grafico 7. Livelli di anione superossido mitocondriale espressi come rapporto tra la percentuale di cellule con un alto (high) e un basso (low) contenuto di anione superossido in condizioni basali (white boxes) e dopo 24 ore di supplementazione con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di ubichinolo (squared boxes). C (Controllo sano), R1 (mutazione R133C), R2 (mutazione T158M) e R3 (Delezione C-terminale). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs controllo (a), controllo trattato (b) e proprio basale (#).

#### 4.2 Livelli citosolici delle specie reattive dell'ossigeno

Oltre ai livelli mitocondriali di anione superossido, è stato analizzato citofluorimetricamente anche il contenuto di ROS citoplasmatici, anch'essi sia in termini di median fluorescence intensity che in termini di rapporto tra la percentuale di popolazione cellulare con un alto e quella con un basso contenuto e di specie reattive dell'ossigeno (high/low). Anche l'analisi della MFI della CM-H<sub>2</sub>DCFDA ha messo in evidenza

l'elevato e significativo stress ossidativo che caratterizza il paziente R3 (\*\*p<0,001, +57%), diversamente gli altri due, che a livello citosolico non sembrano essere significativamente compromessi rispetto al controllo sano. Il trattamento con ubiquinolo non ha infine avuto effetti significativamente rilevanti (**grafico8**).

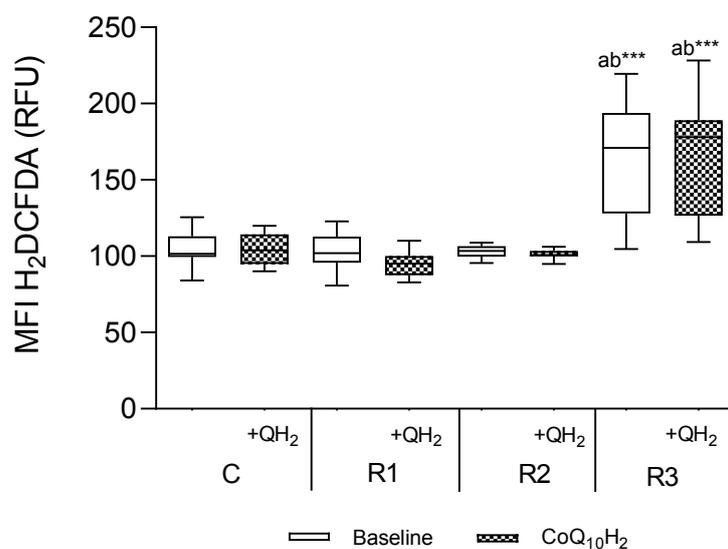


Grafico 8. Median fluorescence intensity (MFI) di CM-H<sub>2</sub>DCFDA espressa come Relative Fluorescence Units (RFU) in condizioni basali (white boxes) e dopo 24 h di supplementazione con 5 µg/mL di ubiquinolo (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) (squared boxes). C (Controllo sano), R1 (mutazione R133C), R2 (mutazione T158M) e R3 (Delezione C-terminale). \*\*\*p<0,001 vs controllo (a) e controllo trattato (b)

Diversamente da quanto osservato per il MitoSOX, l'analisi dei livelli citosolici delle specie reattive dell'ossigeno come rapporto high/low ha confermato quanto già osservato in termini di mediana dell'intensità di fluorescenza (MFI), sia in condizioni basali che in seguito a supplementazione con ubiquinolo. (**grafico9**).

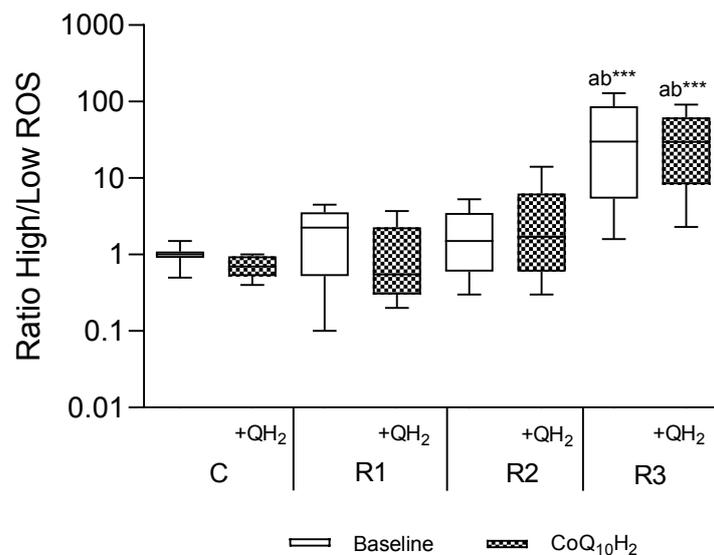


Grafico 9. Livelli citosolici di specie reattive dell'ossigeno (ROS) espressi come rapporto tra la percentuale di cellule con un alto (high) e un basso (low) contenuto di ROS in condizioni basali (white boxes) e dopo 24 ore di trattamento con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ubiquinolo ( $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ ) (squared boxes). C (Controllo sano), R1 (mutazione R133C), R2 (mutazione T158M) e R3 (Delezione C-terminale). \*\*\* $p < 0,001$  vs controllo (a) e controllo trattato (b).

## 5. Livelli di espressione della PON2

I livelli di espressione della proteina Paraoxonasi-2 sono stati valutati tramite la metodica del western blot e normalizzati per il contenuto di vinculina, una proteina utilizzata come riferimento. La **figura 21** mostra le bande relative all'espressione della proteina PON-2 e della vinculina (partendo da sinistra) relative al controllo, a R1, R2 ed R3 prima e dopo il trattamento per 24h con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di ubiquinolo.

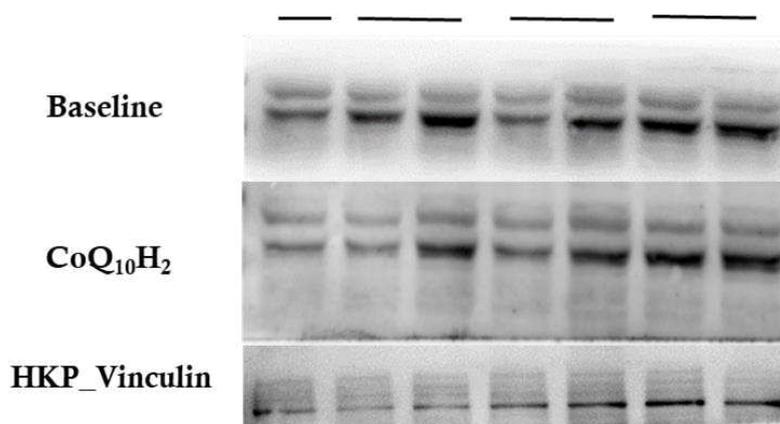


Figura 19. Membrana del western blot contenente le bande relative all'espressione delle proteine PON-2 e vinculina (proteina di riferimento/housekeeping), prima e dopo trattamento con ubiquinolo (5 µg/ml), del controllo e dei pazienti affetti da sindrome di Rett.

I dati sono stati riportati come n fold rispetto al controllo (n=1) prima e dopo 24 ore di trattamento con ubiquinolo. I livelli di espressione della PON-2 in condizioni basali nei pazienti R1 ed R2 sono risultati significativamente più bassi rispetto al controllo sano ( $p=0,04$  (a\*), -31,51%;  $p<0,001$ , -66,75% (a\*\*\*)) mentre per R3 non sono state osservate differenze significative. In seguito a supplementazione per 24 h con ubiquinolo, negli stessi pazienti R1 ed R2 è stato osservato un incremento significativo dei livelli di espressione della PON-2 rispetto sia al controllo sano (\* $p<0,05$  (a)) che ai propri livelli basali ( $p=0,04$ , +235% (#),  $p=0,008$ , +236% (##)).

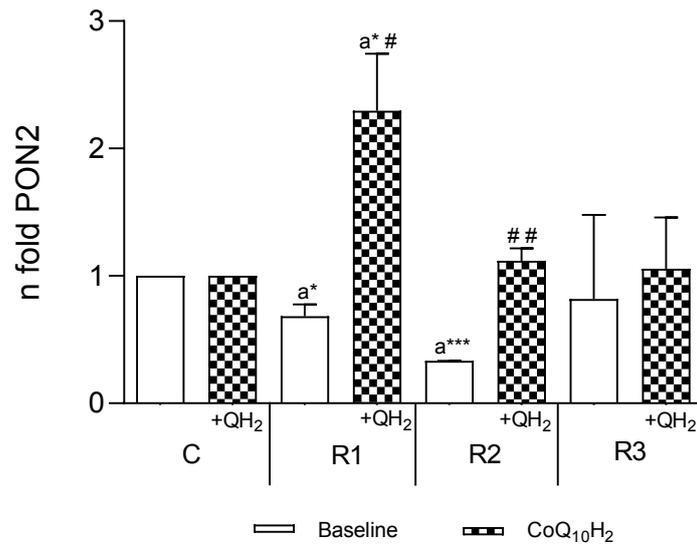


Grafico 10. Livelli di espressione della PON2 descritti come n fold rispetto al controllo in condizioni basali (box bianchi) e dopo 24 ore di trattamento con 5µg/ml di ubiquinolo (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) (box quadrati). C (Controllo sano), R1 (mutazione R133C), R2 (mutazione T158M) e R3 (Delezione C-terminale). \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 vs controllo (a) e proprio basale (#).

## V. DISCUSSIONE

La sindrome di Rett è una sindrome neurologica progressiva che si manifesta principalmente nelle bambine con una frequenza di 1 su 10.000 nate vive. La causa principale della sindrome è riconducibile al gene X-linked MECP2 sebbene esistano forme definite atipiche nelle quali possono essere coinvolti anche altri geni. Al di là delle manifestazioni neurologiche/cliniche caratteristiche della malattia, diversi studi scientifici hanno messo in evidenza la presenza di una forte condizione di stress ossidativo associata sia ad un'alterata funzionalità mitocondriale che ad una dislipidemia sistemica legata alla compromissione del network proteico.

In questo contesto, al fine di valutare il possibile ruolo del coenzima Q<sub>10</sub> nella sindrome di Rett e indagare se possa rappresentare un valida terapia per contrastare la condizione di stress ossidativo che caratterizza i pazienti affetti dalla sindrome migliorandone la qualità di vita, il presente studio ha avuto l'obiettivo di indagare quali fossero i livelli intracellulari di coenzima Q<sub>10</sub> e il suo stato ossidativo (percentuale di coenzima Q<sub>10</sub> ossidato/totale) mediante l'impiego di un modello *in vitro* di fibroblasti di derma umano ottenuti da biopsia cutanea di tre pazienti affetti dalla sindrome tipica e di un controllo sano. In particolare, i tre pazienti presentavano tre diverse mutazioni a carico del gene MECP2 ossia, R133C (fenotipo mild, R1), T158M (fenotipo severo, R2) e delezione C-terminale (fenotipo mild, R3). Inoltre dopo aver valutato l'uptake di coenzima Q da parte delle stesse cellule in seguito alla somministrazione

di 5µg/ml di ubiquinolo (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) per 24 ore è stato verificato il suo possibile effetto protettivo analizzando citofluorimetricamente i livelli intracellulari di specie reattive mitocondriali (anione superossido) e citosoliche (ROS). Infine, in termini di meccanismi molecolari, sono stati analizzati anche i livelli di espressione della paraoxonasi umana 2 (PON2), una proteina situata a livello mitocondriale la cui attività antiossidante indiretta sembra essere strettamente associata alla regolazione di quella di composti chinonici come il coenzima Q<sub>10</sub> [59].

Recentemente, studi condotti sia su modelli murini MECP2 ko che su fibroblasti di pazienti con sindrome di Rett hanno messo in evidenza come il metabolismo dei lipidi e in particolare quello del colesterolo risulti essere profondamente alterato. Segatto *et al.* [41] in fibroblasti di 15 pazienti osservarono una ridotta attività della idrossimetilglutaril-coenzima A reduttasi (HMGR), un enzima limitante della via del mevalonato, ipotizzando che anche i livelli di coenzima Q<sub>10</sub> il quale condivide lo stesso pathway di biosintesi potessero essere alterati. Diversamente, un lavoro pubblicato nel 2014 da Gold *et al.* non mostrava differenze significative tra i livelli di CoQ<sub>10</sub> nel muscolo di topolini wild type e topolini MECP2<sup>y/-</sup> presintomatici e sintomatici [60]. Nel presente lavoro di tesi, dalla quantificazione del CoQ<sub>10</sub> intracellulare totale di tre pazienti affetti dalla sindrome e un controllo sano, è emerso che solo uno dei tre pazienti (R2) affetto da mutazione T158M con fenotipo severo, presentava livelli significativamente ridotti rispetto sia gli altri due pazienti che al controllo sano.

Indagando la produzione di specie reattive dell'ossigeno sia citosoliche (ROS) che mitocondriali (anione superossido) nello stesso modello *in*

*vitro*, è stata inoltre confermata la presenza di una condizione di stress ossidativo già nota in letteratura [23-28]. In particolare, il paziente R3 affetto da una delezione C-terminale (fenotipo mild) è risultato possedere sia alti livelli di ROS che di anione superossido mitocondriale mentre il paziente R2 presentava solo livelli significativamente elevati di anione superossido, facendo presupporre che l'origine dello squilibrio ossidativo potesse essere imputato direttamente ad alterazioni mitocondriali che nei casi più severi (come R3), inducono uno squilibrio ossidativo anche a livello citoplasmatico alimentando un circolo vizioso di produzione dei ROS. Diversamente il paziente R1 (mutazione R133C, fenotipo mild) non ha mostrato un equilibrio ossidativo significativamente alterato né in termini di anione superossido né di ROS citosolici, sottolineando la grande variabilità fenotipica esistente nella sindrome di Rett. La disfunzione mitocondriale è stata associata da molti studi scientifici ad aumentati livelli di ROS tuttavia, se questo sia dovuto ad un meccanismo di overproduzione da parte dei complessi respiratori o a deficit delle difese antiossidanti ancora non è del tutto chiaro. Gold *et al.* hanno ipotizzato che l'alterazione della funzionalità mitocondriale potrebbe essere secondaria ad una diminuzione dei livelli di GSH e questo determinerebbe un accumulo di specie reattive che poi andrebbero a danneggiare il mitocondrio inducendo una ridotta funzionalità dei complessi respiratori [60]. Valenti *et al.* [61] e altri studi [33] hanno dimostrato invece che la stabilizzazione dei complessi respiratori potrebbe avere un effetto significativo nel prevenire l'overproduzione di ROS. Questa osservazione alimenterebbe l'ipotesi che la disfunzione dei complessi respiratori possa essere una delle cause principali degli

aumentati livelli di specie reattive piuttosto che una conseguenza dello stesso meccanismo.

Gli stessi aspetti appena descritti sono stati valutati anche in seguito a supplementazione per 24 ore dei fibroblasti in coltura con coenzima Q<sub>10</sub> esogeno. La scelta di supplementare con una sola concentrazione di ubiquinolo, la forma ridotta del coenzima Q<sub>10</sub> pari a 5 µg/ml è stata basata su precedenti studi di biodisponibilità condotti *in vitro* su fibroblasti umani e su altri modelli in coltura nel laboratorio di invecchiamento e stress ossidativo (DISVA, Univpm) giustificando uno degli aspetti dello studio, ovvero utilizzare una concentrazione abbastanza alta corrispondente ai valori di assorbimento più alti da parte delle cellule in coltura (dati in fase di pubblicazione) [62]. A rafforzare ulteriormente l'interesse nella possibilità di individuare nel coenzima Q<sub>10</sub> un valido supplemento utile al miglioramento dei sintomi della sindrome è la scarsa presenza in letteratura scientifica di studi di supplementazione *in vivo* ed *in vitro* in pazienti con sindrome di Rett. Eccezionalmente uno studio condotto da Di Pierro *et al* [63] la somministrazione di ubiquinolo (300 mg una volta al giorno per 12 mesi) sembra essere stata in grado di ridurre il danno indotto da stress ossidativo negli eritrociti dei pazienti, migliorando lo stato energetico e preservando la funzionalità delle membrane biologiche meglio di altre molecole antiossidanti come la vitamina E. L'efficacia della somministrazione di CoQ<sub>10</sub> è stata ampiamente documentata in numerosi studi che ne evidenziano gli effetti benefici nel trattamento di molte patologie [55] in particolare anche nelle disabilità intellettuali, nelle patologie neurodegenerative e del neurosviluppo [56,57,58]. Nel presente studio, in seguito alla

supplementazione per 24 ore con 5µg/mL di ubiquinolo, i livelli intracellulari totali di CoQ<sub>10</sub> sono aumentati in tutti e tre i pazienti (da 23 a 68 volte superiori rispetto al contenuto basale), in particolar modo nel paziente R2 che aveva fatto registrare livelli basali significativamente più bassi. La supplementazione è stata contemporaneamente in grado di ridurre significativamente la percentuale di CoQ<sub>10</sub> ossidato intracellulare probabilmente andando ad arricchire la porzione ridotta a livello delle membrane plasmatiche. Inoltre è stato in grado di ridurre la produzione di anione superossido mitocondriale nei pazienti R1 ed R2 i quali presentavano livelli di produzione lievemente o moderatamente aumentati rispetto al controllo sano ma non nel paziente R3, caratterizzato da uno stato ossidativo significativamente compromesso suggerendo la possibilità di intervenire con la supplementazione di ubiquinolo, la forma maggiormente biodisponibile [64,65], in casi di sindrome di Rett con lieve o moderato stress ossidativo.

La paraoxonasi umana 2 (PON2) fa parte della famiglia degli enzimi idrolizzanti i lattoni principalmente conosciuta come enzima capace di idrolizzare le molecole segnale batteriche densità dipendenti (quorum sensing), in grado quindi di prevenire la formazione di biofilm batterici. È un enzima ubiquitario presente nell'ambiente intracellulare ed è distribuito prevalentemente a livello delle membrane cellulari, del reticolo endoplasmatico e della membrana mitocondriale interna. Oltre all'attività lattonasica, la PON2 è stata dimostrata espletare anche una funzione antiossidante prevenendo la formazione di anione superossido mitocondriale e esercitando quindi un ruolo protettivo dell'integrità e della funzionalità mitocondriale. In particolare, è stato dimostrato che la

PON2 interagisce strettamente con i chinoni e nello specifico impedisce che gli intermedi semichinonici del coenzima Q cedano elettroni direttamente all'ossigeno [66] prevenendo il rilascio delle specie reattive.

Al fine di valutare un possibile effetto sinergico a livello mitocondriale tra la PON2 e il coenzima Q<sub>10</sub> nel presente lavoro di tesi, sono stati valutati anche i livelli di espressione di questa proteina, sia in condizioni basali che in seguito a supplementazione con ubiquinolo. I risultati hanno messo in evidenza livelli di espressione basali significativamente più bassi nei pazienti R1 e R2 mentre nel paziente R3 non è stata registrata alcuna differenza significativa rispetto al controllo. Ridotti livelli della PON2 sono stati già associati ad aumentati livelli di produzione di anione superossido da parte del mitocondrio [67], nonostante nel presente studio sia il paziente R2 che R3 presentavano entrambi aumentati livelli di radicali mitocondriali. Questo comportamento potrebbe essere giustificato dal fatto che il paziente R2 oltre ad avere livelli di espressione più bassi di PON2 è anche quello che presentava un contenuto intracellulare di CoQ<sub>10</sub> significativamente minore traducendosi in una ridotta funzionalità mitocondriale e quindi in un'aumentata produzione di anione superossido. Diversamente, nel paziente R3, dove il contenuto di coenzima Q<sub>10</sub> era paragonabile al controllo sano ma i markers di stress ossidativo erano significativamente aumentati, l'adozione di meccanismi compensatori come un'induzione dell'espressione della PON2 potrebbe essere alla base dell'assenza di differenze significative di espressione in condizioni basali. Infine, nel paziente R1 che invece mostrava anch'esso livelli di CoQ<sub>10</sub> paragonabili la significativa diminuzione dei livelli di espressione della paraoxonasi-2

non sembrava tale da determinare un aumento significativo dei livelli di  $\cdot\text{O}_2^-$  e di ROS citosolici. In seguito a supplementazione con ubiquinolo i livelli di PON2 sono aumentati in maniera significativa nei pazienti R1 ed R2 supportando l'ipotesi di una sua attività sinergica con il coenzima  $\text{Q}_{10}$  e in un effetto protettivo in termini di riduzione della produzione di specie reattive in presenza di una lieve o moderata overproduzione. Nel paziente R3 non sono stati invece individuati cambiamenti significativi nei livelli di espressione della PON2 probabilmente in seguito all'attivazione, già in condizioni basali di meccanismi compensatori indotti dall'elevata produzione di anione superossido mitocondriale e ROS. A causa dell'elevata variabilità fenotipica che caratterizza la sindrome di Rett gli esperimenti mirati a valutare i livelli di espressione della PON2 necessitano di un'ulteriore conferma al fine di chiarire il ruolo di un possibile effetto sinergico tra il coenzima  $\text{Q}_{10}$  e questa proteina nel migliorare la funzionalità mitocondriale e ridurre la produzione di anione superossido alla luce anche di un suo possibile ruolo neuroprotettivo. È stato dimostrato infatti che la PON2 è l'unica della famiglia delle paraoxonasi ad essere espressa nel cervello, in particolare nelle regioni dopaminergiche e negli astrociti dove svolge un ruolo protettivo nei confronti dello stress ossidativo [68], protezione che viene meno quando alterata, ipotizzando un suo coinvolgimento nella patogenesi della sindrome di Rett.

## VI. CONCLUSIONI

L'obiettivo del presente lavoro di tesi mirava ad approfondire il ruolo del coenzima Q<sub>10</sub> nella sindrome di Rett, alla luce di un alterato metabolismo lipidico e quindi di una possibile modulazione della sua via biosintetica, condivisa con il colesterolo. Lo studio si poneva inoltre l'obiettivo di investigare e comprendere se la somministrazione esogena di ubiquinolo possa rappresentare una valida strategia terapeutica, da affiancare a quelle già messe in atto, per migliorare i sintomi della sindrome e quindi la qualità di vita dei pazienti. I dati preliminari del presente lavoro testimoniano l'elevata variabilità fenotipica che caratterizza questa rara sindrome (tre pazienti con tre differenti mutazioni) e suggeriscono la possibilità di integrare le terapie classiche attualmente impiegate, con la somministrazione di coenzima Q<sub>10</sub>, nella fattispecie ubiquinolo, sfruttando la sua capacità di contenere lo stress ossidativo, soprattutto in presenza di una lieve o moderata alterazione dell'equilibrio ossidativo, già dalle fasi più precoci di diagnosi (6-18 mesi di vita), promuovendo un normale neurosviluppo. A livello molecolare, il ruolo antiossidante del CoQ<sub>10</sub> osservato nello studio, potrebbe esplicarsi attraverso l'aumento dei livelli di espressione della PON2, con l'obiettivo di ridurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno (anione superossido) a livello mitocondriale e migliorare le difese antiossidanti endogene. In particolare, questo possibile effetto sinergico è stato osservato nel paziente R2 (mutazione T158M, fenotipo severo) caratterizzato sia da un contenuto basale di coenzima Q<sub>10</sub> significativamente più basso che da

livelli di espressione di PON2 significativamente inferiori e che in seguito a supplementazione con ubiquinolo ha registrato aumentati livelli di entrambi i parametri, associati ad una ridotta produzione di anione superossido. Tuttavia, per poter chiarire quale sia il ruolo del coenzima Q<sub>10</sub> all'interno della sindrome di Rett e confermare i dati preliminari di questo studio, ulteriori indagini sono necessarie, partendo da un campione più ampio di pazienti e approfondendo il suo ruolo sia nelle dinamiche mitocondriali che nella modulazione dei sistemi enzimatici delle difese antiossidanti endogene.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- [1] Chahrour M, Zoghbi HY. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron*. 2007 Nov 8;56(3):422-37. doi: 10.1016/j.neuron.2007.10.001. PMID: 17988628.
- [2] Gold WA, Krishnaraj R, Ellaway C, Christodoulou J. Rett Syndrome: A Genetic Update and Clinical Review Focusing on Comorbidities. *ACS Chem Neurosci*. 2018 Feb 21;9(2):167-176. doi: 10.1021/acscemneuro.7b00346. Epub 2017 Dec 15. PMID: 29185709.
- [3] <http://www.unirett.org/le-varianti/>
- [4] Pejhan S, Rastegar M. Role of DNA Methyl-CpG-Binding Protein MeCP2 in Rett Syndrome Pathobiology and Mechanism of Disease. *Biomolecules*. 2021 Jan 8;11(1):75. doi: 10.3390/biom11010075. PMID: 33429932; PMCID: PMC7827577.
- [5] Kyle SM, Vashi N, Justice MJ. Rett syndrome: a neurological disorder with metabolic components. *Open Biol*. 2018 Feb;8(2):170216. doi: 10.1098/rsob.170216. PMID: 29445033; PMCID: PMC5830535.
- [6] Pecorelli A, Cervellati C, Hayek J, Valacchi G. OxInflammation in Rett syndrome. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Dec;81(Pt B):246-253. doi: 10.1016/j.biocel.2016.07.015. Epub 2016 Jul 15. PMID: 27425398.
- [7] Ip JPK, Mellios N, Sur M. Rett syndrome: insights into genetic, molecular and circuit mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2018

Jun;19(6):368-382. doi: 10.1038/s41583-018-0006-3. PMID: 29740174;  
PMCID: PMC6402579.

[8]<https://www.airett.it/forme-atipiche-nella-sindrome-di-rett-ruolo-di-cdk15-e-foxg1/>

[9] Vidal S, Xiol C, Pascual-Alonso A, O'Callaghan M, Pineda M, Armstrong J. Genetic Landscape of Rett Syndrome Spectrum: Improvements and Challenges. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 12;20(16):3925. doi: 10.3390/ijms20163925. PMID: 31409060; PMCID: PMC6719047.

[10] Kishi N, Macklis JD. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci.* 2004 Nov;27(3):306-21. doi: 10.1016/j.mcn.2004.07.006. PMID: 15519245.

[11] Asaka Y, Jugloff DG, Zhang L, Eubanks JH, Fitzsimonds RM. Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the *Mecp2*-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis.* 2006 Jan;21(1):217-27. doi: 10.1016/j.nbd.2005.07.005. Epub 2005 Aug 8. PMID: 16087343.

[12] Belichenko PV, Wright EE, Belichenko NP, Masliah E, Li HH, Mobley WC, Francke U. Widespread changes in dendritic and axonal morphology in *Mecp2*-mutant mouse models of Rett syndrome: evidence for disruption of neuronal networks. *J Comp Neurol.* 2009 May 20;514(3):240-58. doi: 10.1002/cne.22009. PMID: 19296534.

[13] Na ES, Monteggia LM. The role of MeCP2 in CNS development and function. *Horm Behav.* 2011 Mar;59(3):364-8. doi:

10.1016/j.yhbeh.2010.05.014. Epub 2010 May 31. PMID: 20515694;  
PMCID: PMC3077534.

[14] Della Ragione F, Vacca M, Fioriniello S, Pepe G, D'Esposito M. MECP2, a multi-talented modulator of chromatin architecture. *Brief Funct Genomics*. 2016 Nov;15(6):420-431. doi: 10.1093/bfgp/elw023. Epub 2016 Jun 12. PMID: 27296483.

[15] Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*. 1999 Oct;23(2):185-8. doi: 10.1038/13810. PMID: 10508514.

[16] Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, Leonard H, Bailey ME, Schanen NC, Zappella M, Renieri A, Huppke P, Percy AK; RettSearch Consortium. Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol*. 2010 Dec;68(6):944-50. doi: 10.1002/ana.22124. PMID: 21154482; PMCID: PMC3058521.

[17] Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O. An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. *Comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting, Baden Baden, Germany, 11 September 2001*. *Eur J Paediatr Neurol*. 2002;6(5):293-7. doi: 10.1053/ejpn.2002.0612. PMID: 12378695.

- [18] Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002. Epub 2015 Jan 3. PMID: 25588755; PMCID: PMC4309861.
- [19] Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients.* 2019 Sep 4;11(9):2090. doi: 10.3390/nu11092090. PMID: 31487802; PMCID: PMC6769522.
- [20] Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Dec;12(12):931-47. doi: 10.1038/nrd4002. PMID: 24287781.
- [21] Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol.* 2017 Aug;14(8):470-485. doi: 10.1038/nrurol.2017.69. Epub 2017 May 16. PMID: 28508879.
- [22] Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006 Oct 19;443(7113):787-95. doi: 10.1038/nature05292. PMID: 17051205.
- [23] Sofić E, Riederer P, Killian W, Rett A. Reduced concentrations of ascorbic acid and glutathione in a single case of Rett syndrome: a postmortem brain study. *Brain Dev.* 1987;9(5):529-31. doi: 10.1016/s0387-7604(87)80079-7. PMID: 3434732.
- [24] Sierra C, Vilaseca MA, Brandi N, Artuch R, Mira A, Nieto M, Pineda M. Oxidative stress in Rett syndrome. *Brain Dev.* 2001 Dec;23 Suppl 1:S236-9. doi: 10.1016/s0387-7604(01)00369-2. PMID: 11738881.

[25] De Felice C, Ciccoli L, Leoncini S, Signorini C, Rossi M, Vannuccini L, Guazzi G, Latini G, Comporti M, Valacchi G, Hayek J. Systemic oxidative stress in classic Rett syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2009 Aug 15;47(4):440-8. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.016. Epub 2009 May 21. PMID: 19464363.

[26] Ciccoli L, De Felice C, Paccagnini E, Leoncini S, Pecorelli A, Signorini C, Belmonte G, Valacchi G, Rossi M, Hayek J. Morphological changes and oxidative damage in Rett Syndrome erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Apr;1820(4):511-20. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.002. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22183031.

[27] Signorini C, Leoncini S, De Felice C, Pecorelli A, Meloni I, Ariani F, Mari F, Amabile S, Paccagnini E, Gentile M, Belmonte G, Zollo G, Valacchi G, Durand T, Galano JM, Ciccoli L, Renieri A, Hayek J. Redox imbalance and morphological changes in skin fibroblasts in typical Rett syndrome. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:195935. doi: 10.1155/2014/195935. Epub 2014 May 29. PMID: 24987493; PMCID: PMC4060159.

[28] De Felice C, Della Ragione F, Signorini C, Leoncini S, Pecorelli A, Ciccoli L, Scalabrì F, Marracino F, Madonna M, Belmonte G, Ricceri L, De Filippis B, Laviola G, Valacchi G, Durand T, Galano JM, Oger C, Guy A, Bultel-Poncé V, Guy J, Filosa S, Hayek J, D'Esposito M. Oxidative brain damage in Mecp2-mutant murine models of Rett syndrome. *Neurobiol Dis*. 2014 Aug;68(100):66-77. doi: 10.1016/j.nbd.2014.04.006. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24769161; PMCID: PMC4076513.

[29] Eeg-Olofsson O, al-Zuhair AG, Teebi AS, Daoud AS, Zaki M, Besisso MS, Al-Essa MM. Rett syndrome: a mitochondrial disease? *J Child Neurol.* 1990 Jul;5(3):210-4. doi: 10.1177/088307389000500311. PMID: 2168910.

[30] Ruch A, Kurczynski TW, Velasco ME. Mitochondrial alterations in Rett syndrome. *Pediatr Neurol.* 1989 Sep-Oct;5(5):320-3. doi: 10.1016/0887-8994(89)90027-1. PMID: 2803392.

[31] Cervellati C, Sticozzi C, Romani A, Belmonte G, De Rasmio D, Signorile A, Cervellati F, Milanese C, Mastroberardino PG, Pecorelli A, Savelli V, Forman HJ, Hayek J, Valacchi G. Impaired enzymatic defensive activity, mitochondrial dysfunction and proteasome activation are involved in RTT cell oxidative damage. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Oct;1852(10 Pt A):2066-74. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.07.014. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26189585.

[32] Dave A, Shukla F, Wala H, Pillai P. Mitochondrial Electron Transport Chain Complex Dysfunction in MeCP2 Knock-Down Astrocytes: Protective Effects of Quercetin Hydrate. *J Mol Neurosci.* 2019 Jan;67(1):16-27. doi: 10.1007/s12031-018-1197-9. Epub 2018 Dec 6. PMID: 30519865.

[33] De Filippis B, Valenti D, de Bari L, De Rasmio D, Musto M, Fabbri A, Ricceri L, Fiorentini C, Laviola G, Vacca RA. Mitochondrial free radical overproduction due to respiratory chain impairment in the brain of a mouse model of Rett syndrome: protective effect of CNF1. *Free Radic Biol Med.* 2015 Jun;83:167-77. doi:

10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.014. Epub 2015 Feb 20. PMID: 25708779.

[34] Cicaloni V, Pecorelli A, Tinti L, Rossi M, Benedusi M, Cervellati C, Spiga O, Santucci A, Hayek J, Salvini L, Tinti C, Valacchi G. Proteomic profiling reveals mitochondrial alterations in Rett syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2020 Aug 1;155:37-48. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.05.014. Epub 2020 May 20. PMID: 32445864.

[35] Crivellari I, Pecorelli A, Cordone V, Marchi S, Pinton P, Hayek J, Cervellati C, Valacchi G. Impaired mitochondrial quality control in Rett Syndrome. *Arch Biochem Biophys.* 2021 Mar 30;700:108790. doi: 10.1016/j.abb.2021.108790. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33549528.

[36] Valenti D, de Bari L, De Filippis B, Henrion-Caude A, Vacca RA. Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: an overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 Oct;46 Pt 2:202-17. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.01.012. Epub 2014 Feb 15. PMID: 24548784.

[37] Ortiz-González XR. Mitochondrial Dysfunction: A Common Denominator in Neurodevelopmental Disorders? *Dev Neurosci.* 2021;43(3-4):222-229. doi: 10.1159/000517870. Epub 2021 Aug 3. PMID: 34350863; PMCID: PMC8440386.

[38] Anitha A, Thanseem I, Iype M, Thomas SV. Mitochondrial dysfunction in cognitive neurodevelopmental disorders: Cause or effect?

- Mitochondrion. 2023 Mar;69:18-32. doi: 10.1016/j.mito.2023.01.002. Epub 2023 Jan 6. PMID: 36621534.
- [39] Sticozzi C, Belmonte G, Pecorelli A, Cervellati F, Leoncini S, Signorini C, Ciccoli L, De Felice C, Hayek J, Valacchi G. Scavenger receptor B1 post-translational modifications in Rett syndrome. FEBS Lett. 2013 Jul 11;587(14):2199-204. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.042. Epub 2013 May 24. PMID: 23711372.
- [40] Buchovecky CM, Turley SD, Brown HM, Kyle SM, McDonald JG, Liu B, Pieper AA, Huang W, Katz DM, Russell DW, Shendure J, Justice MJ. A suppressor screen in Mecp2 mutant mice implicates cholesterol metabolism in Rett syndrome. Nat Genet. 2013 Sep;45(9):1013-20. doi: 10.1038/ng.2714. Epub 2013 Jul 28. PMID: 23892605; PMCID: PMC3837522.
- [41] Segatto M, Trapani L, Di Tunno I, Sticozzi C, Valacchi G, Hayek J, Pallottini V. Cholesterol metabolism is altered in Rett syndrome: a study on plasma and primary cultured fibroblasts derived from patients. PLoS One. 2014 Aug 12;9(8):e104834. doi: 10.1371/journal.pone.0104834. Erratum in: PLoS One. 2014;9(11):e114654. PMID: 25118178; PMCID: PMC4130597.
- [42] Kyle SM, Saha PK, Brown HM, Chan LC, Justice MJ. MeCP2 coordinates liver lipid metabolism with the NCoR1/HDAC3 corepressor complex. Hum Mol Genet. 2016 Jul 15;25(14):3029-3041. doi: 10.1093/hmg/ddw156. Epub 2016 Jun 10. PMID: 27288453; PMCID: PMC5181597.

[43] Gomathi M, Padmapriya S, Balachandar V. Drug Studies on Rett Syndrome: From Bench to Bedside. *J Autism Dev Disord*. 2020 Aug;50(8):2740-2764. doi: 10.1007/s10803-020-04381-y. PMID: 32016693.

[44] <https://www.airett.it/intervento-di-terapia-fisica-nei-casi-di-sindrome-di-rett/>

[45] <https://www.airett.it/trattamento-farmacologico-della-sindrome-di-rett-in-modelli-animali/>

[46] De Felice C, Signorini C, Durand T, Ciccoli L, Leoncini S, D'Esposito M, Filosa S, Oger C, Guy A, Bultel-Poncé V, Galano JM, Pecorelli A, De Felice L, Valacchi G, Hayek J. Partial rescue of Rett syndrome by  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) oil. *Genes Nutr*. 2012 Jul;7(3):447-58. doi: 10.1007/s12263-012-0285-7. Epub 2012 Mar 8. PMID: 22399313; PMCID: PMC3380188.

[47] Janc OA, Hüser MA, Dietrich K, Kempkes B, Menzfeld C, Hülsmann S, Müller M. Systemic Radical Scavenger Treatment of a Mouse Model of Rett Syndrome: Merits and Limitations of the Vitamin E Derivative Trolox. *Front Cell Neurosci*. 2016 Nov 15;10:266. doi: 10.3389/fncel.2016.00266. PMID: 27895554; PMCID: PMC5109403.

[48] Baroncelli L, Auel S, Rinne L, Schuster AK, Brand V, Kempkes B, Dietrich K, Müller M. Oral Feeding of an Antioxidant Cocktail as a Therapeutic Strategy in a Mouse Model of Rett Syndrome: Merits and Limitations of Long-Term Treatment. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jul

20;11(7):1406. doi: 10.3390/antiox11071406. PMID: 35883897; PMCID: PMC9311910.

[49] <https://ir.tayshagtx.com/news-releases/news-release-details/taysha-gene-the-rabies-announces-first-patient-dosed-tsha-102>

[50] <https://reverserett.org/research/cures/gene-editing/>

[51] Crane fl, Hatefi y, Lester rl, Widmer c. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1957 Jul;25(1):220-1. doi: 10.1016/0006-3002(57)90457-2. PMID: 13445756.

[52] Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 21;396(1):74-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.147. PMID: 20494114.

[53] Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*. 2007Jun; 7Suppl:S41-50. doi: 10.1016/j.mito.2007.02.006. Epub 2007 Mar 16. PMID: 17482888.

[54] Pallotti F, Bergamini C, Lamperti C, Fato R. The Roles of Coenzyme Q in Disease: Direct and Indirect Involvement in Cellular Functions. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 23;23(1):128. doi: 10.3390/ijms23010128. PMID: 35008564; PMCID: PMC8745647.

[55] Cirilli I, Damiani E, Dłudla PV, Hargreaves I, Marcheggiani F, Millichap LE, Orlando P, Silvestri S, Tiano L. Role of Coenzyme Q<sub>10</sub> in Health and Disease: An Update on the Last 10 Years (2010-2020). *Antioxidants (Basel)*. 2021 Aug 23;10(8):1325. doi: 10.3390/antiox10081325. PMID: 34439573; PMCID: PMC8389239.

[56] Müller T, Büttner T, Gholipour AF, Kuhn W. Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2003 May 8;341(3):201-4. doi: 10.1016/s0304-3940(03)00185-x. PMID: 12697283.

[57] Mousavinejad E, Ghaffari MA, Riahi F, Hajmohammadi M, Tiznobeyk Z, Mousavinejad M. Coenzyme Q<sub>10</sub> supplementation reduces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activity in children with autism spectrum disorders. *Psychiatry Res*. 2018 Jul;265:62-69. doi: 10.1016/j.psychres.2018.03.061. Epub 2018 Apr 4. PMID: 29684771.

[58] Miles MV, Patterson BJ, Chalfonte-Evans ML, Horn PS, Hickey FJ, Schapiro MB, Steele PE, Tang PH, Hotze SL. Coenzyme Q10 (ubiquinol-10) supplementation improves oxidative imbalance in children with trisomy 21. *Pediatr Neurol*. 2007 Dec;37(6):398-403. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2007.08.003. PMID: 18021919.

[59] Manco G, Porzio E, Carusone TM. Human Paraoxonase-2 (PON2): Protein Functions and Modulation. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Feb 7;10(2):256. doi: 10.3390/antiox10020256. PMID: 33562328; PMCID: PMC7915308.

[60] Gold WA, Williamson SL, Kaur S, Hargreaves IP, Land JM, Pelka GJ, Tam PP, Christodoulou J. Mitochondrial dysfunction in the skeletal muscle of a mouse model of Rett syndrome (RTT): implications for the disease phenotype. *Mitochondrion*. 2014 Mar;15:10-7. doi: 10.1016/j.mito.2014.02.012. Epub 2014 Mar 6. PMID: 24613463.

[61] Valenti D, de Bari L, Vigli D, Lacivita E, Leopoldo M, Laviola G, Vacca RA, De Filippis B. Stimulation of the brain serotonin receptor 7 rescues mitochondrial dysfunction in female mice from two models of Rett syndrome. *Neuropharmacology*. 2017 Jul 15;121:79-88. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.04.024. Epub 2017 Apr 15. PMID: 28419872.

[62] Orlando P, Silvestri S, Marcheggiani F, Cirilli I, Venturini G, Tiano L. Compared bioavailability of different CoQ isoforms in different in vitro cellular models.

[63] Di Pierro D, Ciaccio C, Sbardella D, Tundo GR, Bernardini R, Curatolo P, Galasso C, Pironi V, Coletta M, Marini S. Effects of oral administration of common antioxidant supplements on the energy metabolism of red blood cells. Attenuation of oxidative stress-induced changes in Rett syndrome erythrocytes by CoQ10. *Mol Cell Biochem*. 2020 Jan;463(1-2):101-113. doi: 10.1007/s11010-019-03633-5. Epub 2019 Oct 8. PMID: 31595423.

[64] Marcheggiani F, Kordes S, Cirilli I, Orlando P, Silvestri S, Vogelsang A, Möller N, Blatt T, Weise JM, Damiani E, Tiano L. Anti-ageing effects of ubiquinone and ubiquinol in a senescence model of human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2021 Mar;165:282-288. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.032. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33482334.

[65] Langsjoen PH, Langsjoen AM. Comparison study of plasma coenzyme Q10 levels in healthy subjects supplemented with ubiquinol

versus ubiquinone. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2014 Jan;3(1):13-7. doi: 10.1002/cpdd.73. Epub 2013 Oct 8. PMID: 27128225.

[66] Altenhöfer S, Witte I, Teiber JF, Wilgenbus P, Pautz A, Li H, Daiber A, Witan H, Clement AM, Förstermann U, Horke S. One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *J Biol Chem.* 2010 Aug 6;285(32):24398-403. doi: 10.1074/jbc.M110.118604. Epub 2010 Jun 8. PMID: 20530481; PMCID: PMC2915675.

[67] Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva VR, Morvardi S, Clarke CF, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, Reddy ST. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Feb 1;14(3):341-51. doi: 10.1089/ars.2010.3430. Epub 2010 Sep 6. PMID: 20578959; PMCID: PMC3011913.

[68] Costa LG, de Laat R, Dao K, Pellacani C, Cole TB, Furlong CE. Paraoxonase-2 (PON2) in brain and its potential role in neuroprotection. *Neurotoxicology.* 2014 Jul;43:3-9. doi: 10.1016/j.neuro.2013.08.011. Epub 2013 Sep 4. PMID: 24012887; PMCID: PMC3942372.