



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

PhD Program
in **Drug Discovery and Development**

XXXIV Cycle — Academic Year 2021/2022

PhD Thesis in

***Development and application of omics technologies
for the monitoring of personalized therapeutic
protocols***

Candidate

Fabrizio Merciai

Supervisor

Prof. *Pietro Campiglia*

PhD Program Coordinator: Prof. Dr. *Gianluca Sbardella*

Abstract

During the 1st year the scientific activity was focused on the development of an experimental protocol aimed to evaluate the possible involvement of Sortilin (Sort), a membrane glycoprotein, in the modulation of sphingolipids pathway in the field of hypertension. Lipid profiling was carried out through targeted and untargeted approaches. In detail, a targeted lipidomic study was performed to investigate a potential correlation between the plasma levels of Sort and of Sphingosine-1-phosphate (S1P), Ceramide C16, Ceramide C18, Ceramide C24:1. The extraction protocol and the analytical method were optimized on human umbilical vein endothelial cells lines and, subsequently, applied to a small cohort of normotensive and hypertensive patients. The results showed a possible relationship between the plasma levels of Sort and S1P, identifying the latter one as co-responsible for the high levels of blood pressure observed. Then, in order to take a fast snapshot to the lipidome of hypertensive patients, a rapid DI-FT-ICR method was optimized. A preliminary statistical analysis highlighted different sphingolipids, such as sphingamines and deoxy-ceramides, dysregulated in hypertensive subjects. Subsequently, during the 2nd year, to corroborate the role of sphingolipids and Sort in hypertension, a large-scale study was conducted on 270 patients, enrolling normotensives, controlled hypertensives and uncontrolled hypertensives. The results confirmed the indications obtained from the pilot study. Indeed, a statistically significant increase and a linear correlation were observed in the S1P and Sort plasma levels of hypertensive patients' group.

Furthermore, hypertension represents one of the risk factors for the onset of inflammatory pathologies of the vessel wall, such as atherosclerosis. For this purpose, the untargeted analytical method previously developed (nano-DI-FT-ICR) was applied to evaluate the effect of a novel antihypertensive Spirulina peptide, namely SP6, in the modulation of atherosclerosis progression in HFD ApoE^{-/-} mice model. Statistical analysis put in evidence several dysregulated pathways, such as: sphingolipids and glycerophospholipids metabolism, fatty acid biosynthesis, tricarboxylic acid cycle (TCA) and glutamate/glutamine metabolism. In the 3rd year, trapped ion mobility mass spectrometry (TIMS) was employed to investigate both a genetic syndrome, like adaptor protein 4 (AP-4) associated hereditary spastic paraplegia (HSP), and a viral disease, such as SARS-CoV-2. AP-4-deficient neurons are characterized by axonal growth defects. During my period as visiting scientist at Max Planck Institute (MPI), the application of a spatial proteomics platform proposed the diacylglycerol lipase-beta (DAGLB), a key enzyme for generation of 2-arachidonoylglycerol (2-AG), as a novel AP-4's cargo protein. We found that levels of 2-AG were significantly reduced in the brains of AP-4 deficient mice, confirming DAGLB as a novel AP-4 cargo protein responsible with 2-AG of the abnormal axonal growth. The identification of possible prognostic biomarkers, which

may predict the course of the disease, it's one of the main lipidomics tasks. Thus, we hypothesize that metabolic changes in COVID-19 plasma patients are earlier than clinical changes and, therefore, potentially exploitable for early prognostic assessment. So, we evidenced a significant and progressive decrease of Lysophosphatidylcholines and ether-linked Lysophosphatidylcholines already at the time of admission, unveiling their capability to predict COVID-19 patients' outcome. During the 3rd year at MPI, we adapted the EvosepOne LC system to lipidomics challenges and evaluated its performance in combination with TIMS-qTOF. This platform allowed to maintain benefits from both nano-ionizations sensitivity and high flow rates throughput (1 μ L/min). The EvosepOne elutes sample from disposable trap columns to reduce carry-over issue, and embeds the analytes in a pre-formed gradient, which is then pushed through the separation column with a single high-pressure pump. Our results show new perspectives for high-throughput and in-depth lipidomics in biomedical research using a novel nanoflow LC system and a TIMS-qTOF.

Abstract

Durante il primo anno di dottorato l'attività scientifica è stata finalizzata a sviluppare un protocollo sperimentale teso a valutare il possibile coinvolgimento della Sortilina (Sort), una glicoproteina di membrana, nella modulazione del *pathway* degli sfingolipidi nell'ambito dell'ipertensione. L'analisi lipidomica è stata condotta mediante un approccio mirato (*targeted*) ed uno *hypothesis-free* (*untargeted*). Nel dettaglio, lo studio di lipidomica *targeted* ha valutato la possibile correlazione tra i livelli plasmatici di Sort e degli sfingolipidi: Sfingosina-1-fosfato (S1P), Ceramide C16, Ceramide C18, Ceramide C24:1. Il protocollo analitico-estrattivo è stato ottimizzato a partire da cellule endoteliali di vena ombelicale umana e, successivamente, applicato ad una piccola coorte di pazienti normotesi ed ipertesi. I risultati hanno evidenziato una possibile correlazione tra i livelli plasmatici di Sort e S1P, identificando quest'ultima come co-responsabile degli alti livelli di pressione arteriosa. Successivamente, al fine di ottenere informazioni circa le possibili alterazioni lipidiche nel plasma di pazienti ipertesi, è stato ottimizzato un metodo di infusione diretta con l'impiego del sistema FT-ICR. L'analisi statistica preliminare ha evidenziato, in soggetti ipertesi, alterazioni nei livelli plasmatici di alcuni sfingolipidi, come sfinganine e deossi-ceramidi.

Nel corso del secondo anno di dottorato, per rafforzare l'ipotesi circa il coinvolgimento degli sfingolipidi e della sortilina nell'ipertensione, è stato condotto uno studio su una coorte più numerosa di soggetti. Quest'ultima ha arruolato 270 pazienti equamente divisi in: normotesi ed ipertesi responsivi o meno al trattamento farmacologico. I risultati hanno confermato le indicazioni ottenute dallo studio pilota. Infatti, è stato osservato un aumento statisticamente significativo delle concentrazioni plasmatiche di Sort e S1P nel plasma di soggetti ipertesi.

L'ipertensione rappresenta inoltre uno dei principali fattori di rischio per l'insorgenza di patologia infiammatorie, come l'aterosclerosi. Per tal motivo, il metodo per l'analisi *untargeted* (nano-FT-ICR) precedentemente sviluppato, è stato applicato per monitorare gli effetti di un nuovo peptide ad attività antiipertensiva, rinominato SP6, nella modulazione dell'aterosclerosi in modelli di topi ApoE^{-/-}. L'analisi statistica ha messo in luce alcuni *pathways* su cui sembra agire SP6, ossia: il metabolismo di sfingolipidi e glicerofosfolipidi, la biosintesi degli acidi grassi, il ciclo degli acidi tricarbossilici ed il metabolismo di glutammato e glutammina.

Nel corso del terzo anno di dottorato, la *trapped ion mobility mass spectrometry* (TIMS) è stata impiegata per valutare alterazioni lipidiche connesse sia ad una grave forma di paraplegia spastica ereditaria quale la sindrome da carenza del complesso AP-4, sia ad una patologia virale come l'infezione da SARS-CoV-2. I neuroni di pazienti affetti dalla sindrome di carenza del complesso AP-4 presentano delle alterazioni strutturali dovute a difetti nella crescita degli assoni. Recenti studi

hanno candidato la diacilglicerolo-lipasi-beta (DAGLB), l'enzima chiave per la generazione del 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), come una nuova possibile proteina cargo di AP-4. L'attività di ricerca ha permesso di osservare livelli cerebrali di 2-AG significativamente più bassi in topi carenti del complesso AP-4, confermando così l'ipotesi che la DAGLB sia una nuova proteina cargo di AP-4, responsabile insieme a 2-AG del danno neuronale.

L'identificazione di possibili markers prognostici, in grado di predire il decorso di una patologia, rappresenta uno dei principali obiettivi della lipidomica. Dunque, abbiamo ipotizzato che i cambiamenti metabolici nel plasma di pazienti positivi al Covid-19 possano essere precedenti ai cambiamenti clinici e, perciò, potenzialmente impiegabili per scopi prognostici. Infatti, abbiamo identificato una significativa e progressiva riduzione dei livelli plasmatici di Lisofosfatidilcoline ed Alchil-lisofosfatidilcoline già al momento dell'ospedalizzazione dei pazienti, che sembra quindi poter essere in grado di prevedere *l'outcome* dei pazienti.

Infine, durante l'ultimo di dottorato, abbiamo lavorato per adattare il sistema EvosepOne LC alle sfide della lipidomica e ne abbiamo valutato la performance in combinazione con uno spettrometro di massa TIMS-qTOF. Tale piattaforma cromatografica permette di unire i vantaggi della nano-ionizzazione con quelli derivanti dall'impiego di un alto flusso delle fasi mobili (1 μ L/min). Il sistema EvosepOne LC incorpora gli analiti in un gradiente preformato che è poi spinto attraverso la colonna cromatografica da una singola pompa ad alta pressione. I nostri risultati offrono nuove opportunità per un'analisi lipidomica ad elevate prestazioni nell'ambito della ricerca biomedica.