**Sachbericht zum Verwendungsnachweis**

**Vorhabenbezeichnung:** CureMILS - Zelluläre Reprogrammierungs-basierte Strategie zur Neupositionierung von Arzneimitteln bei Patienten mit maternal vererbtem Leigh-Syndrom (MILS)
**Förderkennzeichen:** 01GM2002A (Teilprojekt: Induzierte pluripotente Stammzellen und Organoide, Prigione)
**Laufzeit des Vorhabens:** 01.06.2021 - 31.12.2024
**Zuwendungsempfänger:** Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
**Verantwortliche:** Prof. Dr. Alessandro Prigione (Koordinator)
**Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.**

**Teil II: Eingehende Darstellung**

## 1. Avisierte Ziele der ursprünglichen Vorhabenbeschreibung

Das mitochondriale DNA (mtDNA)-assoziierte Leigh-Syndrom (MILS) ist eine schwere, früh einsetzende Hirnerkrankung, von der 1/100.000 Neugeborene betroffen sind. MILS wird in der Regel durch mtDNA-Mutationen in der ATP-erzeugenden Untereinheit MT-ATP6 verursacht. Es gibt keine Behandlungsmöglichkeiten für MILS und die Entwicklung von Medikamenten für MILS stellt eine besondere Herausforderung dar. Der begrenzte Zugang zu Nervengewebe von Patienten und die Schwierigkeit, mtDNA zu manipulieren, erschweren die Entwicklung transgener Tiermodelle und zellulärer Modelle, die für die Entwicklung von Therapien erforderlich sind.
Unser Konsortium CureMILS hat sich zum Ziel gesetzt, neuronale Zellen, die durch Reprogrammierung von Zellen von MILS-Patienten erzeugt wurden, zu verwenden, um eine groß angelegte Screening-Kampagne mit einer qualitativ hochwertigen Bibliothek von wiederverwendbaren Substanzen durchzuführen. Für die Validierung von Hit-Substanzen planten wir eine Kombination aus mitochondrialer Profilerstellung und Multi-omics-Analyse unter Verwendung verschiedener durch Reprogrammierung erzeugter neuronaler Modelle von verschiedenen MILS-Patienten. Mit diesem Ansatz wollte CureMILS vermarktete Medikamente identifizieren, die als Interventionen für MILS neu positioniert werden könnten. Diese Ergebnisse könnten die Grundlage für eine multinationale klinische Studie und einen Weg zu wirksamen Behandlungen für MILS bilden. Gleichzeitig wird CureMILS eine patientenspezifische, auf Umprogrammierung ausgerichtete Wirkstoffforschungspipeline für die Neupositionierung von Medikamenten etablieren, die auch auf andere seltene unheilbare neurologische Erkrankungen angewendet werden kann.
Das CureMILS-Konsortium hat sich zum Ziel gesetzt, mit Hilfe von Reprogrammierungstechnologien für patienteneigene Zellen neue Modelle für die Arzneimittelforschung bei MILS zu entwickeln. In einer Proof-of-Concept-Studie haben wir in Vorarbeiten gezeigt, dass neurale Vorläuferzellen (NPCs), die von Patienten mit MILS gewonnen wurden, zur Durchführung von Wirkstoffscreens verwendet werden können, die zur Identifizierung potenzieller neuer Behandlungen führen können. Daher wollten wir diesen Ansatz erweitern und NPCs aus mehreren von Patienten stammenden induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) generieren und sie zur Durchführung groß angelegter Experimente zur Identifizierung von Hits verwenden.
Wir wollten uns dabei auf das Repurposing von Arzneimitteln konzentrieren, da dieser Ansatz bessere Chancen hat, schnell zu konkreten Behandlungsoptionen für die betroffenen Patienten zu führen. Insbesondere wollten wir eine große, qualitativ hochwertige Bibliothek mit 5.632 Wirkstoffen verwenden, die mit umfangreichen Sicherheits- und Wirksamkeitsdaten gut annotiert sind. Wir wollten Hit-Substanzen validieren, indem wir die mitochondriale Profilerstellung mit einer Multi-omics-Analyse unter Verwendung verschiedener reprogrammierter neuraler Modelle (neurale Vorläuferzellen, Neuronen, Hirnorganoide und Hirnkapillarendothelzellen) von verschiedenen MILS-Patienten kombinierten.

Ein Hauptaugenmerk von CureMILS lag auf MT-ATP6-Mutationen im Complex V, da diese die häufigste Ursache von MILS sind. Wir planten jedoch auch vergleichende Studien mit von Patienten stammenden Nervenzellen, die Mutationen in Complex-I-Genen wie MT-ND5 und NDUFS4 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4) aufweisen. Das letztgenannte Gen ist nukleär kodiert, ist aber für das Leigh-Syndrom von Bedeutung, da das am häufigsten verwendete Tiermodell für das Leigh-Syndrom die homozygote Ndufs4-Knockout-Maus ist, die im Alter von etwa 50 Tagen eine progressive Enzephalopathie, Wachstumsverzögerung, motorische Rückbildung, Kardiomyopathie und einen vorzeitigen Tod entwickelt. Indem wir uns auch auf Complex-I-Defekte konzentrierten, konnten wir i) potenzielle Unterschiede oder Ähnlichkeiten in der neuronalen Pathogenese und den Pathomechanismen des Leigh-Syndroms zwischen verschiedenen genetischen Formen bestimmen, ii) die Zielpopulation der Patienten für künftige klinische Studien definieren, die unserer *in vitro*-Identifizierungsstrategie für wiederverwendbare Arzneimittel folgen könnten. Das Vorhaben wurde in fünf Arbeitspakete gegliedert, welche in enger Zusammenarbeit der pan-europäischen Partner umgesetzt wurden. In diesem Schlussbericht werden nur die APs mit BMBF-finanzierten Inhalten zusammengefasst werden (APs1-4).

**Ablauf des Vorhabens, Ergebnisse, Verwertung**

**AP1: Bewertung von PDE5-Inhibitoren (PDE5i) als Referenzmedikamente für MILS** (Prigione, Pless, *Bottani*)

*AP1-Ziel1: Bestätigung der PDE5i-Effekte in MILS-NPCs*

Wir haben induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) von MILS-Patienten erzeugt und charakterisiert, die verschiedene Mutationen im *MT-ATP6*-Gen tragen (**Tabelle 1**). Alle aus MILS-Patienten gewonnenen iPSC-Linien sind inzwischen veröffentlicht, und die meisten der Linien sind als Laborressourcen in der Open-Access-Zeitschrift Stem Cell Research verfügbar (*Lorenz et al., Stem Cell Res., 2022*; *Steiner et al., Stem Cell Res., 2022*; *Henke et al., Stem Cell Res., 2023*). Alle von Patienten abgeleiteten MILS-iPSCs und Kontroll-iPSCs wurden in hPSCreg hinterlegt, einem EU-zertifizierten Portal für die Registrierung pluripotenter Stammzelllinien (https://hpscreg.eu/).

Der Heteroplasmiegrad der iPSC-Linien wurde von Markus Schuelke (Charité, Berlin, Deutschland) bestimmt, einem assoziierten Mitglied des CureMILS-Konsortiums und führender Kliniker in den laufenden „Compassionate Use“-Studien.

*Tabelle 1: ATP6-mutierte iPSCs und gesunde Kontroll-iPSCs*

| Name | hPSCreg name | Alternative name | Sex | Age (years) | Mutation | Heteroplasmy (Fibs) | Heteroplasmy (iPSCs) | Heteroplasmy (NPCs) | Publication of iPSC line (PMID) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **CTRLs** | | | | | | | | | |
| CTRL_1 | BIHi043-A | XM001 | f | 47 | - | - | - | - | 29396371 |
| CTRL_2 | HHUUKDi009-A | TFBJ | m | 0 | - | - | - | - | 28132834 |
| CTRL_3 | CRMi003-A | NCRM1 | m | 0 | - | - | - | - | 36459969 |
| CTRL_4 | BIHi269-B | - | f | 42 | m.9176T>G | 55.0% | 1.0% | 1.6% | 36669241 |
| CTRL_5 | HVRDi004-B | PGP1 | m | 55 | - | - | - | - | 36459969 |
| CTRL_6 | IUFi004-A | iPS12-10 | f | 30 | - | - | - | - | 38217996 |
| CTRL_7 | BIHi266-A | - | f | 31 | m.8993T>G | 0.0% | 0.0% | 0.0% | 36669241 |
| CTRL_8 | WISCi004-B | - | f | 0 | - | - | - | - | 18029452 |
| **ATP6** | | | | | | | | | |
| ATP6_1 | HHUi001-A | TDA2 | f | 47 | m.9185T>C | 99.0% | 100.0% | 100.0% | 28132834 |
| ATP6_2 | HHUi002-A | TDA3 | f | 20 | m.9185T>C | 100.0% | 100.0% | 100.0% | 28132834 |
| ATP6_3 | HHUi003-C | A4_W1 | m | 4 | m.9185T>C | 93.5% | 100.0% | 100.0% | 36137325 |
| ATP6_4 | MDCi008-A | 8993-B12 | m | 9 | m.8993T>C | 96.8% | 98.2% | 97.9% | 35279592 |
| ATP6_5 | MDCi009-A | 8993-C11 | f | 2 | m.8993T>G | 97.8% | 97.4% | 96.2% | 35279592 |
| ATP6_6 | MDCi010-A | 8993-D7 | m | 3 | m.8993T>G | 98.1% | 98.1% | 97.9% | 35279592 |
| ATP6_7 | BIHi267-B | - | m | 17 | m.9176T>G | 98.0% | 98.0% | 98.0% | 36669241 |

Aus allen ATP6-mutierten iPSCs und Kontroll-iPSCs haben wir NPCs generiert (**Abbildung 1**). Wir haben die gewonnenen NPCs aus dem Prigione-Labor erfolgreich an verschiedene CureMILS-Partner

und -Kollaborateure (Pless, Bottani, Koopman, Brunetti, Schuelke) übersendet und entsprechende Kultivierungsprotokolle standardisiert.

➔ AP1-Ziel1 wurde erfolgreich abgeschlossen.

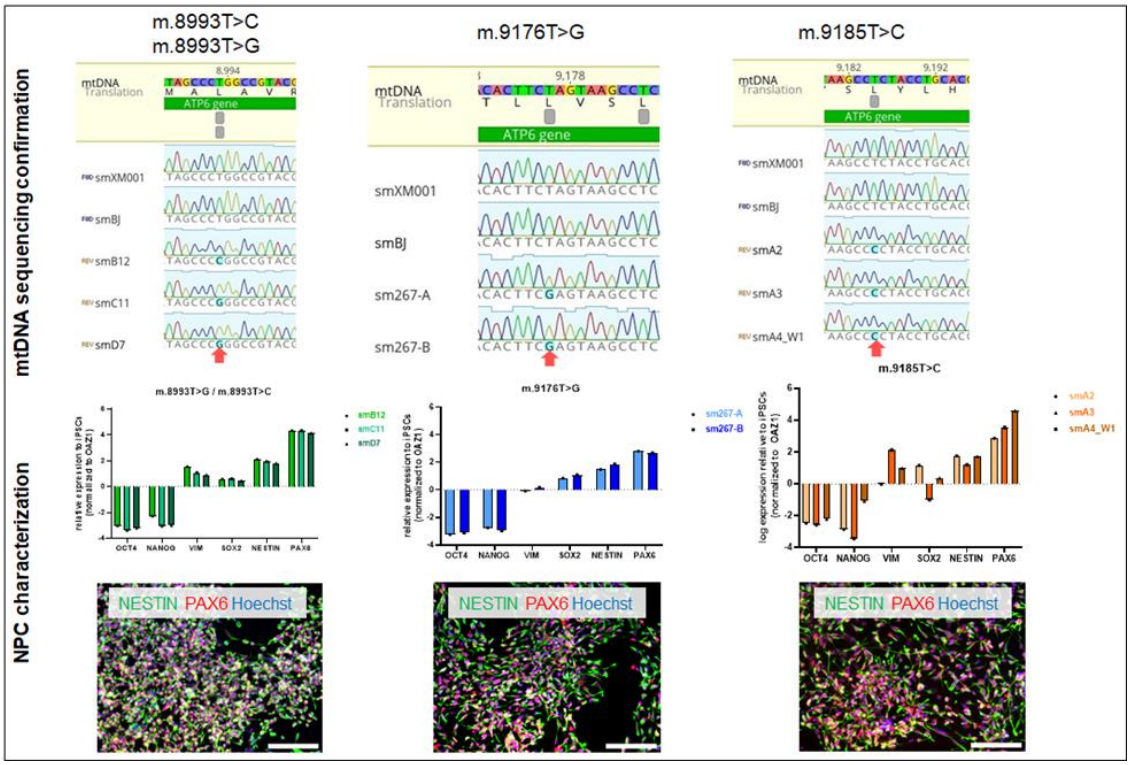


***Abbildung 1**: Bestätigung der mtDNA-Sequenzierung und Charakterisierung von MILS-NPCs, unterteilt nach dem Typ der MT-ATP6-Mutation. Links: MILS-NPCs mit m.8993T>C oder m.8993T>G Mutation. Mitte: MILS-NPCs mit der Mutation m.9176T>G. Rechts: MILS-NPCs mit der Mutation m.9185T>C. Immunfluoreszenzgefärbte Zellen am unteren Rand zeigen ein repräsentatives Bild für jeden dieser Mutationstypen.*

*<u>AP1-Ziel2: Wirkung von PDE5i auf die mitochondriale Polarisierung in MILS-NPCs</u>*

Wir bestätigten, dass mehrere ATP6-Mutanten-NPCs einen pathologischen Anstieg des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) im Vergleich zu Kontroll-NPCs entwickeln (**Abbildung 2A**). Anschließend stellten wir fest, dass das PDE5i Sildenafil zu einer Normalisierung des pathologisch erhöhten MMP in MILS-NPCs in einer dosisabhängigen Weise führt (**Abbildung 2B**). Wichtig ist, dass die Behandlung mit Sildenafil bei MILS-NPCs keine Toxizität verursachte. Dies wurde mit zwei Methoden geprüft: Zelllebensfähigkeit (**Abbildung 2C**) und Kernzählung nach Hoechst-Gegenfärbung (**Abbildung 2D-E**). Anschließend berechneten wir die IC50 auf der Grundlage der Fähigkeit von Sildenafil, die MMP-Defekte in MILS-NPCs zu normalisieren (**Abbildung 2F**). Schließlich bestätigten wir, dass die MMP-Normalisierung nach der Sildenafil-Behandlung in mehreren MILS-NPCs auftrat, die verschiedene MT-ATP6-Mutationen trugen (**Abbildung 2G**). Diese Experimente wurden im Pless-Labor in Zusammenarbeit mit dem Prigione-Labor durchgeführt.

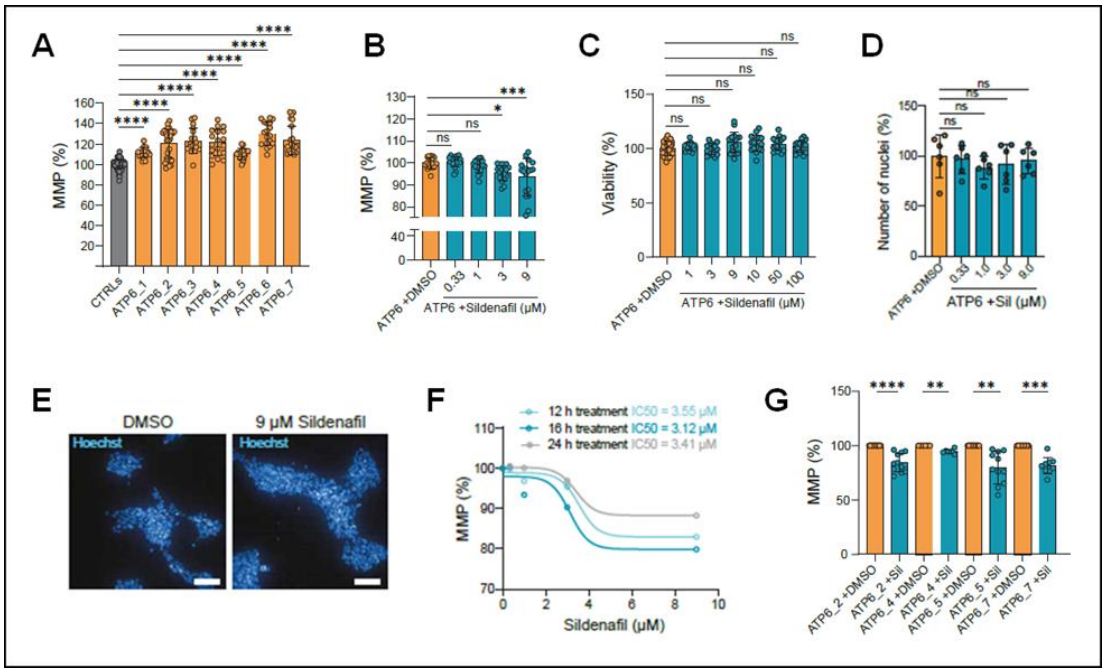


***Abbildung 2***: (***A***) *Quantifizierung des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) in ATP6-mutierten NPCs im Vergleich zu Kontroll-NPCs, die den Hyperpolarisations-Phänotyp in Patienten zeigen.* (***B***) *Dosis-Wirkungs-Verhältnis der Sildenafil-Behandlung in Bezug auf den MMP-Wert in ATP6-mutierten NPCs. Die Daten sind gegenüber der DMSO-Behandlung normalisiert.* (***C-E***) *Keine Toxizität von Sildenafil in ATP6-mutierten NPCs, basierend auf der Anzahl der Zellkerne oder der Lumineszenz als Ausdruck der zellulären Viabilität, die mit dem CellTiter-Glo-Assay bestimmt wurde.* (***F***) *Wirkung von Sildenafil in ATP6-mutierten NPCs zur Berechnung der IC50.* (***G***) *Sildenafil normalisierte die MMP mehrerer MILS-NPCs mit verschiedenen MT-ATP6-Mutationen.*

➔ AP1-Ziel2 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*<u>AP1-Ziel3: Mitochondriale Wirkmechanismen von PDE5i in MILS-NPCs</u>*

Experimente, die im Bottani-Labor in Zusammenarbeit mit dem Brunetti-Labor und dem Schuelke-Labor durchgeführt wurden, dienten der Bewertung der bioenergetischen Wirkungen von Sildenafil in MILS-NPCs, die eine defekte ATP6-Expression aufweisen (**Abbildung 3A-B**). Durch die Behandlung mit Sildenafil in MILS-NPCs wurde die Aktivität des Complex V derjenigen von Kontroll-NPCs ähnlicher (**Abbildung 3C**). Die Auswirkungen von Sildenafil wurden deutlicher, wenn NPCs in glukosefreiem Galaktosemedium gezüchtet wurden, was zu einer erhöhten intrazellulären ATP-Konzentration in behandelten MILS NPCs führte (**Abbildung 3D**). Da MT-ATP6-Defekte die Morphologie der mitochondrialen Cristae stören können, haben wir in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Stefan Jakobs (Fraunhofer ITMP, Göttingen) die Verteilung der mitochondrialen Cristae Junctions anhand der Expressionsverteilung des Cristae Junction Regulatormarkers MIC60 mit Hilfe der Stimulated Emission Depletion (STED) Mikroskopie analysiert (**Abbildung 3E-F**). Wir konnten Veränderungen in der Lokalisierung der MIC60-Fluoreszenzsignale in MILS-NPCs feststellen, die durch die Behandlung mit Sildenafil teilweise rückgängig gemacht wurden. Diese Analysen wurden mit Hilfe von Algorithmen des maschinellen Lernens durchgeführt (**Abbildung 3G**) und auch mit einer unabhängigen manuellen Bewertung durch einen menschlichen Anwender bestätigt (**Abbildung 3H**).

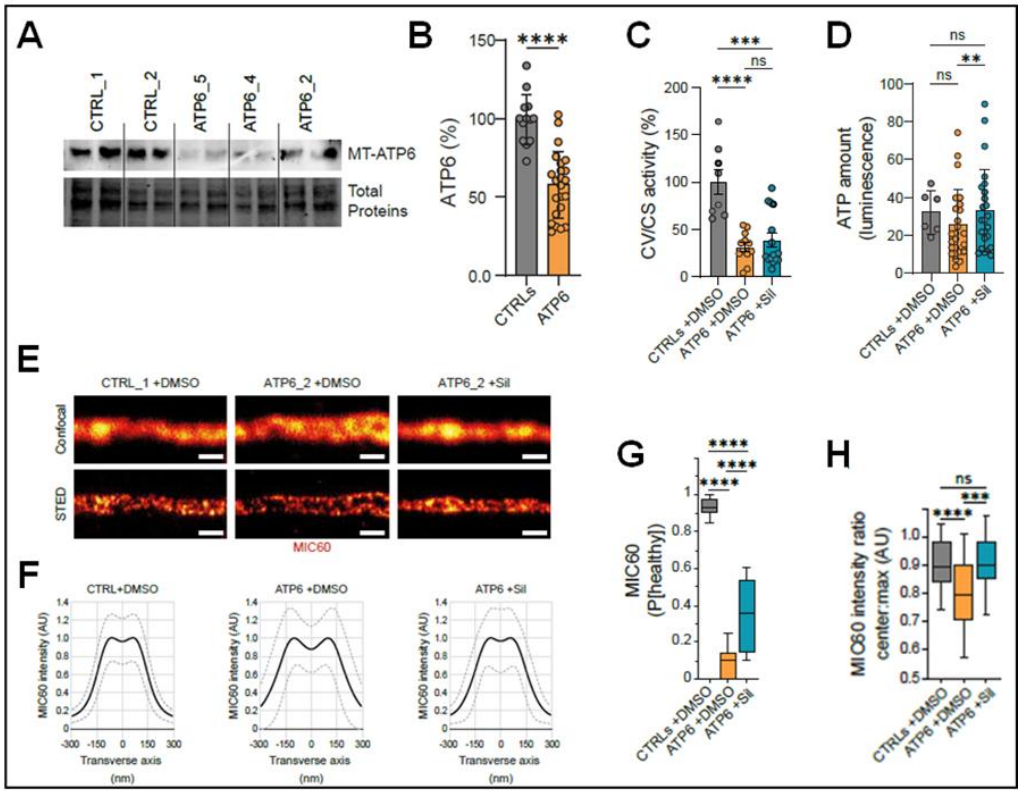


***Abbildung 3**: (**A-B**) Quantifizierung der ATP6-Proteinexpression und relative Quantifizierung, die eine signifikante Verringerung des ATP6-Proteins in MILS-NPCs zeigt. (**C-D**) Komplexaktivität und ATP-Produktion in mit Sildenafil behandelten MILS-NPCs und Kontroll-NPCs. Die Versuche zur ATP-Produktion wurden in einem glukosefreien Galaktose-Medium durchgeführt. (**E-F**) STED-Analyse des MIC60-Färbemusters als Indikator für die Morphologie der mitochondrialen Cristae. (**G-H**) Quantifizierung des MIC60-Musters durch STED, berechnet entweder durch maschinelles Lernen oder durch manuelle Auswertung.*

➔ AP1-Ziel3 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*WP1-Ziel4: Zusammenarbeit mit Regulierungs- und Patentexperten*

Wir haben vier Patentanmeldungen eingereicht.

- Zwei Patentanmeldungen mit den Mitanmeldern Prigione und Schuelke bezogen sich auf die Verwendung von Sildenafil und PDE5i bei mitochondrialen Complex V-Defekten (EP22197344.9 / EP21198827.4) und bei mitochondrialen Complex IV-Defekten (EP23164629.0).
- Eine Patentanmeldung mit den Mitanmeldern Prigione und Del Sol bezog sich auf die Verwendung des Medikaments Talarozol bei Patienten mit Leigh-Syndrom (EP24163953.3).
- Eine Patentanmeldung mit den Mitanmeldern Prigione und der PAO Cure Mito (die zur PAO IMP gehört, die wiederum Mitglied von CureMILS ist) bezog sich auf den Einsatz des Medikaments Sertaconazole bei Patienten mit Leigh-Syndrom (vorläufige US-Patentanmeldung Nr. 63/491.017).

Wir suchten die Unterstützung von EATRIS und schlossen einen Unterauftrag mit einem Zulassungsexperten ab, der uns bei der Erstellung des Dossiers für die Ausweisung als Arzneimittel für seltene Leiden (Orphan Drug Designation, ODD) half. Das ODD-Dossier wurde am 28. März 2023 von Prigione und Schuelke bei der Europäische Arzneimittel-Agentur (European Medicines Agency, EMA) eingereicht. Im Oktober 2023 erteilte der Ausschuss für Arzneimittel für seltene Leiden (Committee for Orphan Medicinal Products, COMP) der EMA den ODD-Status für Sildenafil zur Behandlung von Patienten mit Leigh-Syndrom (EU/3/23/2831).

Im Jahr 2023 erhielten die Gruppen von Prigione und Schuelke außerdem den Champion-Status der EMA für das „Repurposing-Pilotprojekt für zugelassene Arzneimittel für seltene Krankheiten“. Dank dieses Champion-Status konnten wir uns kostenlos an die EMA wenden. Wir hatten insgesamt drei

Treffen mit der EMA und erörterten, wie wir eine klinische Studie für MILS unter Verwendung des PDE5-Hemmers Sildenafil durchführen können. Dieser Prozess ist abgeschlossen und wir haben die Rückmeldung der EMA für unseren Antrag erhalten.

➔ AP1-Ziel4 wurde erfolgreich abgeschlossen.

**Meilenstein 1**: Wir haben den ersten Meilenstein erreicht, der 12 Monate nach Projektbeginn abgeschlossen werden sollte. Wir haben ein Patent für die Neupositionierung von PDE5i für die Behandlung von MILS eingereicht und das ODD-Dossier bei der EMA eingereicht.

**AP2: Hochdurchsatz-Screening von vermarkteten Substanzen in MILS-NPCs** (Pless, Prigione)

*AP2-Ziel1: Primärscreen und Hit-Identifizierung*

Wir haben die Entwicklung der Hochdurchsatz-Pipeline für die Bewertung des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) in iPSC-abgeleiteten NPCs abgeschlossen (**Abbildung 4**). Dieses Protokoll wurde im Pless-Labor in enger Zusammenarbeit mit dem Prigione-Labor entwickelt. Der mit dem Hochdurchsatz-Screening kompatible Assay wurde insbesondere im Hinblick auf die 384-Well-Format-Kompatibilität, die Konzentration der Referenzsubstanz, die Dauer des Assays und die automatische Verarbeitung der Reagenzien optimiert. Wir haben einen automatisierungskompatiblen phänotypischen Hochdurchsatz-Screening-Assay entwickelt und eine robuste analytische Pipeline für die Bewertung von MMP in iPSC-abgeleiteten NPCs implementiert (**Abbildung 4A-B**). Zu diesem Thema wurde ein gemeinsames Methodenpapier veröffentlicht (*Zink*, Haferkamp* et al., STAR Protoc., 2022*). Diese Screening-Pipeline wurde dann vom Pless-Labor in MILS-NPCs optimiert. Wir verwendeten FCCP und Antimycin A (AA) als Positivkontrolle, um die MMP zu depolarisieren und das Assay-Fenster zu bestimmen (das mindestens 4-fach zwischen hohen und niedrigen Kontrollen liegen sollte). Wir erzielten einen durchschnittlichen Z'-Faktor von 0,62, was auf einen robusten und screeningkompatiblen Assay hindeutet. Wir arbeiteten mit der Gruppe von Jakob Metzger (MDC, Berlin) zusammen, um maschinelles Lernen für die Verarbeitung der Bilder anzuwenden. Durch ein auf einem neuronalen Netzwerk basierendes Verfahren wurde das Assay-Fenster weiter verbessert und erreichte einen Z'-Faktor = 0,924 (**Abbildung 4C**). Mit diesem optimierten Assay führten wir im Pless-Labor ein Screening ausgewählter Platten mit niedermolekularen Substanzbibliotheken durch, um die idealen Screening-Konzentrationen zu ermitteln. Hier zeigten alle Referenzsubstanzen die erwartete Wirkung, und Substanzen mit MMP-veränderndem Potenzial konnten zuverlässig als Hits eingestuft werden (**Abbildung 4D**).

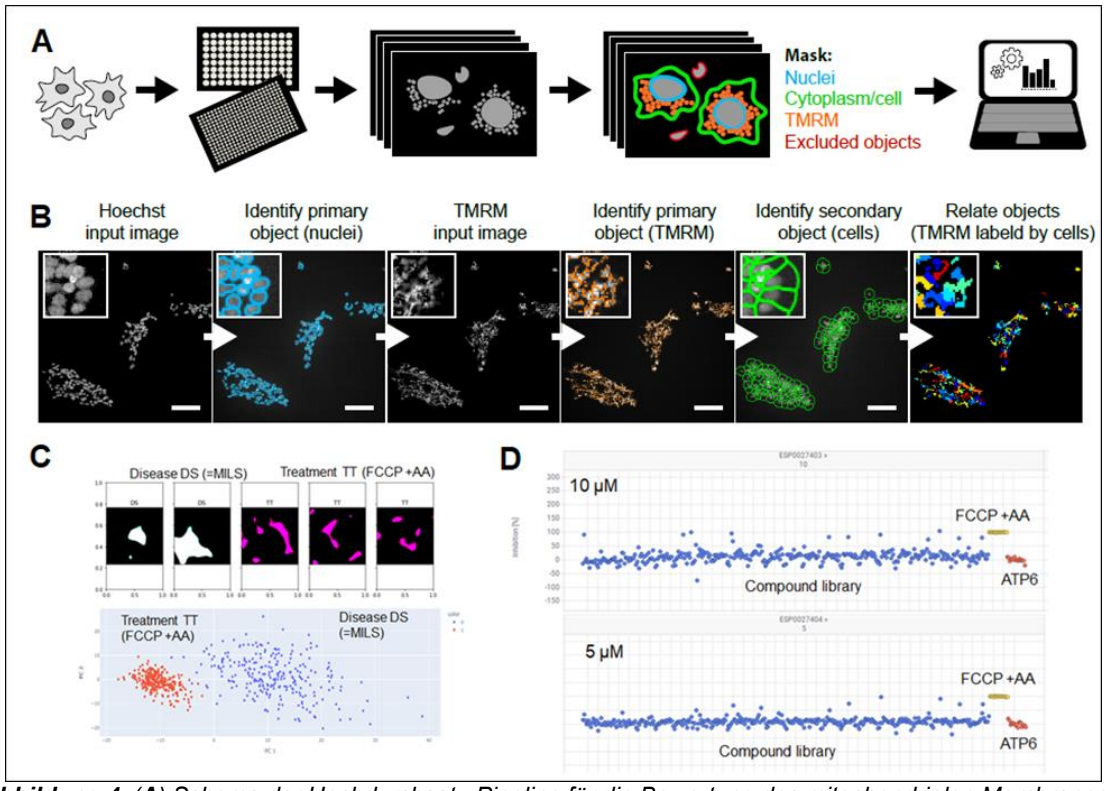


***Abbildung 4**: (**A**) Schema der Hochdurchsatz-Pipeline für die Bewertung des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) in iPSC-abgeleiteten NPCs. (**B**) Arbeitsablauf der Bildanalyse (aus Zink*, Haferkamp* et al., STAR Protocols, 2022). (**C**) Pipeline für maschinelles Lernen in Zusammenarbeit mit Jakob Metzger (MDC). (**D**) Proof-of-Concept-Screens von Substanzen.*

Mit dieser Assay- und Analyse-Pipeline führte das Pless-Labor das automatisierungsgestützte Hochdurchsatz-Screening durch. Unter Verwendung unseres validierten Screening-Protokolls (**Abbildung 5A**) bestätigten wir, dass FCCP+AA in einer Konzentration von jeweils 5 µM eine wirksame Depolarisierung der MMP ohne Verlust der Zelllebensfähigkeit bewirkte, was zu einem ausgezeichneten Z'-Faktor von 0,68 - 0,85 über alle Screening-Platten hinweg führte (**Abbildung 5B**). Als Nächstes führten wir MMP-Assays mit einer repräsentativen Substanzplatte in verschiedenen Konzentrationen durch (**Abbildung 4D**). Wir bestätigten, dass 5 µM die optimale Screening-Konzentration ist, die eine Hitquote von ~5 % bei insgesamt geringer Toxizität aufweist. Das Screening von Duplikaten bestätigte die hohe Reproduzierbarkeit der Daten zwischen den Platten an verschiedenen Tagen (**Abbildung 5C**). Wir untersuchten die Repurposing-Bibliothek des Fraunhofer ITMP, die aus 5.632 niedermolekularen Substanzen besteht, die entweder ausgereifte präklinische Kandidaten, in der klinischen Prüfung befindliche Substanzen oder bereits vermarktete bzw. vom Markt genommene Arzneimittel sind. Alle Referenzsubstanzen zeigten die erwartete Pharmakologie, und 187 Substanzen mit signifikantem MMP-veränderndem Potenzial konnten als Hits eingestuft werden.

Zur Identifizierung von Hit-Substanzen haben wir folgende Auswahlkriterien verwendet:

- **% Viability** > 100% (average (%Viability DMSO) – 3 x 23.38 (standard deviation (%Viability DMSO)) = **29.86%**
- **% Inhibition** > 0% (average (%Inhibition DMSO) + 5 x 6.51 (standard deviation (%Inhibition DMSO)) = **32.53%**

Als Nächstes klassifizierten wir die 5.632 Verbindungen auf der Grundlage ihrer depolarisierenden Wirkung auf die hyperpolarisierte MMP von LS NPCs (MMP-Hemmung) im Verhältnis zur Standardabweichung (SD) von DMSO-behandelten Zellen (SD=6,51 %). Wir identifizierten 767 milde Entkoppler-Moleküle, die die MMP um mehr als das Zweifache der SD depolarisierten (13,0 - 19,5 % Hemmung), 520 mittlere Entkoppler-Moleküle, die die MMP um mehr als das Dreifache der SD

depolarisierten (19,5 - 32,5 % Hemmung), und 187 starke Entkoppler-Moleküle, die die MMP um mehr als das Fünffache der SD depolarisierten (**Abbildung 5D**). Wir stuften die Verbindungen anhand der Zellzahl der mit DMSO behandelten Zellen als nicht toxisch ein (Cut-off: 29,86 %).

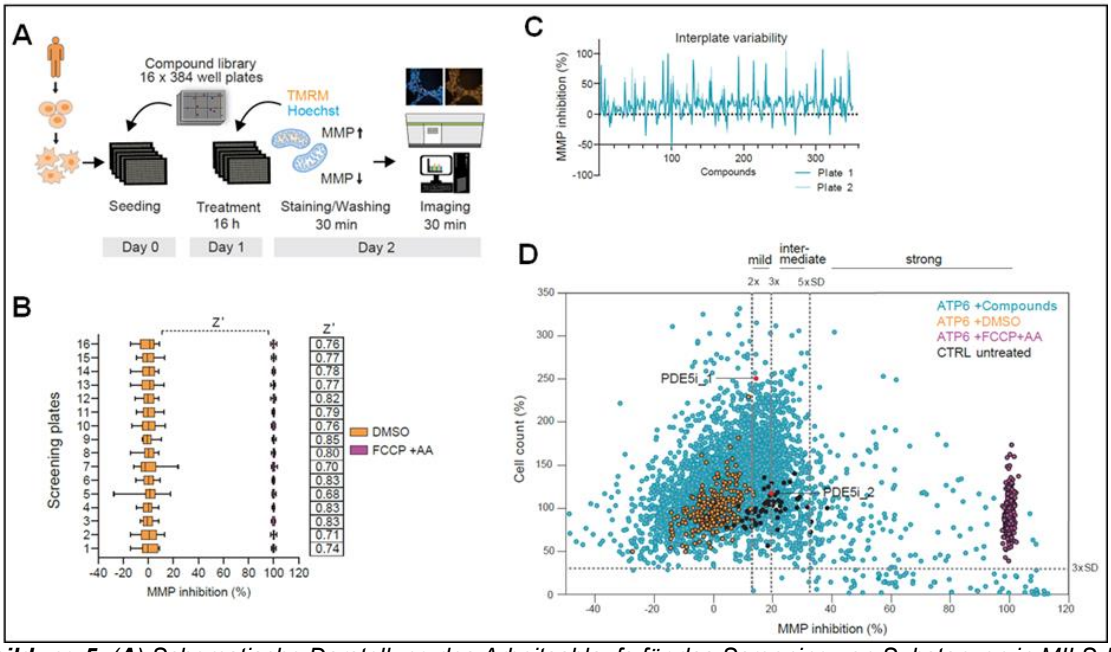


***Abbildung 5**: (**A**) Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs für das Screening von Substanzen in MILS-NPCs unter Verwendung des Revvity Operetta CLS High-Content Analysis (HCA)-Systems. (**B**) Assay-Fenster für das HCA-basierte MMP-Screening in MILS-NPCs in unabhängigen Screening-Platten. Der Z'-Faktor lag in allen Screening-Platten zwischen 0,68 und 0,85, was auf ein ausgezeichnetes Assay-Fenster hinweist. (**C**) HCA-basierte MMP-Quantifizierung mit TMRM und Hoechst in MILS-NPCs mit 352 Verbindungen (5 µM nach 16 h), die eine gute Reproduzierbarkeit der unabhängigen Screening-Platten zeigt. (**D**) MMP-Screening von 5.632 wiederverwendbaren Verbindungen in MILS-NPCs. Streupunktdiagramm, das den prozentualen Anteil der MMP-Depolarisierung (TMRM-Signal) gegen den prozentualen Anteil der Zellzahl (Hoechst-Signal) nach 16-stündiger Behandlung mit 5 µM jeder Verbindung in MILS-NPCs (blaue Punkte) zeigt, normalisiert auf MILS-NPCs, die 16 Stunden lang entweder mit 5 µM FCCP+AA (lila Punkte) oder nur mit DMSO (orange Punkte) behandelt wurden. Unbehandelte Kontroll-NPCs sind in schwarz dargestellt; MILS-NPCs, die mit den PDE5-Inhibitoren (PDE5i) 1 (T-0156) und PDE5i 2 (Vardenafilhydrochlorid) behandelt wurden, sind in rot dargestellt. Die Punkte stellen Einzelwerte dar.*

➔ AP2-Ziel1 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*<u>AP2-Ziel2: Hit-Bestätigung und Priorisierung</u>*

Nach dem Screening von 5632 niedermolekularen Substanzen aus der Repurposing-Bibliothek begannen die Labore von Pless und Prigione mit der Bestätigung und Priorisierung der Hit-Verbindungen. Wir testeten diese 187 Substanzen in dreifacher Ausführung mit denselben Testparametern. Bei 83 Treffern konnten wir die Wirkung bestätigen (44 % Hitrate). Wir bewerteten die Toxizität dabei mit zwei Techniken: i) Zählung der Zellzahl, ii) ATP-basierter Lumineszenz-Lebensfähigkeitstest (CellTiter-Glo, Promega). Die Bewertung der Toxizität ergab, dass 64 dieser 83 Verbindungen zu einer verbleibenden Lebensfähigkeit von mindestens 76 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen führten. Darüber hinaus haben wir diese in Dosis-Wirkungs-Titrationsexperimenten getestet und 23 Verbindungen identifiziert, die eine dosisabhängige Wirkung ohne offenkundige toxische Effekte zeigten. Zu diesem Zweck wurden für jede Verbindung 10 verschiedene Konzentrationen getestet, wobei 50 µM die höchste und 0,1 µM die niedrigste Konzentration nach serieller Verdünnung darstellten. Wir waren in der Lage, die getesteten Verbindungen auf der Grundlage ihrer Dosis-Wirkungs-Kurvenprofile zu gruppieren und schlossen Verbindungen aus, bei denen die beobachtete Hemmung auf eine zytotoxische Wirkung zurückzuführen war. Wir entschieden uns, uns auf milde Entkoppler zu konzentrieren (**Abbildung 5D**), da diese

ausreichten, um die MMP von LS-NPCs auf ähnliche Werte wie die von Kontroll-NPCs zu depolarisieren. Unter ihnen identifizierten wir zwei Phosphodiesterase-Typ-5-Hemmer (PDE5i): T-0156 und Vardenafil-Hydrochlorid. Dies war für uns von besonderem Interesse, da unser im Vorfeld durchgeführter Proof-of-Concept-Screen von 140 wiederverwendbaren Medikamenten in LS-NPCs die positive Wirkung des PDE5i Avanafil aufgezeigt hatte (*Lorenz et al., Cell Stem Cell, 2017*).

➔ AP1-Ziel4 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*AP2-Ziel3: Hit-Validierungen in verschiedenen MILS-NPCs*

Im Anschluss an die Hit-Priorisierung bestätigten die Labore von Prigione und Pless, dass sowohl T-0156 als auch Vardenafil-Hydrochlorid zu einer dosisabhängigen leichten Depolarisierung der MMP in LS-NPCs ohne Verlust der Lebensfähigkeit führten (**Abbildung 6**).

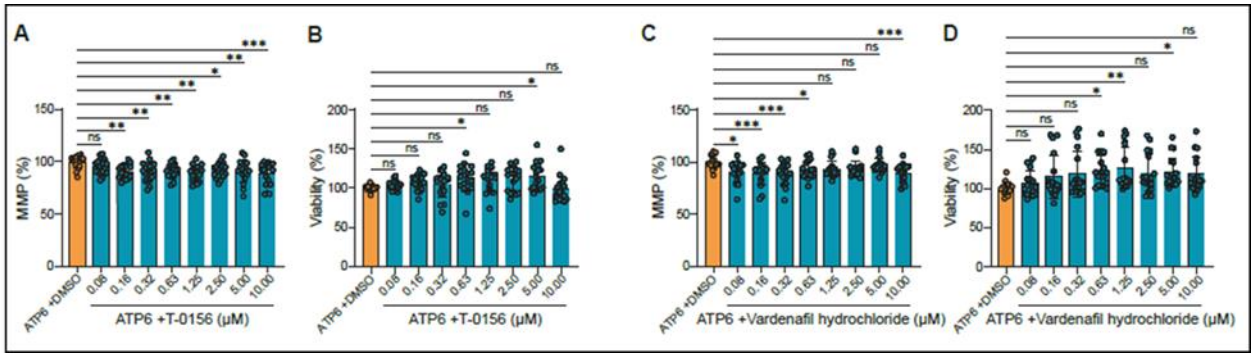


***Abbildung 6**: (**A-D**) HCA-basierte MMP-Quantifizierung mit TMRM und Zellviabilität mit Cell Titer-Glo Assay in MILS-NPCs, die mit steigenden Konzentrationen von PDE5i T-0156 oder Vardenafil-Hydrochlorid behandelt wurden, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Punkte stellen Mittelwerte pro Vertiefung aus n=3 unabhängigen Experimenten dar. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ns (nicht signifikant); normale einseitige ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleich.*

➔ AP1-Ziel4 wurde erfolgreich abgeschlossen.

**Meilenstein 2**: Wir haben den zweiten Meilenstein erreicht, der 18 Monate nach Projektbeginn abgeschlossen werden sollte. Wir haben ein Hochdurchsatz-Screening mit 5.632 wiederverwendbaren Arzneimitteln durchgeführt, die signifikantesten Hits identifiziert und sie in orthogonalen und sekundären Assays validiert.

**WP3: Validierungen von wiederverwendbaren Wirkstoffen in neuronalen MILS-Zellen** (*Koopman*, *Suomalainen*, Pless, *Edenhofer*)

*AP3-Ziel1: Auswirkungen der Wirkstoffe auf das mitochondriale Profil von MILS-NPCs*

Wir haben erfolgreich iPSCs und NPCs von MILS-Patienten, die repräsentative MT-ATP6-Mutationen tragen, sowie iPSCs und NPCs von angepassten Kontrollen aus dem Prigione-Labor in das Koopman-Labor transferiert. Im Koopman-Labor wurde die Lebendzell-Kalziumbildgebung (Zeitraffer) unter Verwendung von Fura-2-Acetoxymethyl (AM) etabliert und optimiert, um den *store-operated calcium entry* (SOCE) und die Calciumhomöostase in MILS-NPCs zu untersuchen. Für eine effiziente Datenanalyse dieser Experimente wurde ein Excel-Makro entwickelt. MMP wurde in MILS-NPCs mit Hilfe von Tetramethylrhodamin-Methylester-Perchlorat (TMRM)-Färbung und Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie untersucht, um den Modus (vorwärts/rückwärts) von Complex V mit Hilfe von Zeitrafferaufnahmen in Kombination mit dem Complex-V-Inhibitor Oligomycin zu untersuchen. Die Wirksamkeit von Oligomycin in von MILS-Patienten stammenden NPCs wurde durch hochauflösende Respirometriemessungen (Oroboros) bestätigt. Patch-Clamp-Experimente in MILS-NPCs bestätigten die Hyperpolarisierung der Plasmamembran. Die Quantifizierung des intrazellulären Calciums zeigte,

dass es bei MILS-NPCs im Vergleich zu Kontroll-NPCs im Basalbereich keine Unterschiede gibt. Dennoch erhöhte Sildenafil den Spitzenwert des intrazellulären Calciums signifikant, und zwar speziell bei MILS-NPCs und nicht bei Kontroll-NPCs (**Abbildung 7**). Dies deutet darauf hin, dass Sildenafil in Zellen, die MT-ATP6-Mutationen tragen, in Bezug auf die Calciumhomöostase eine spezifische Wirkung haben kann.

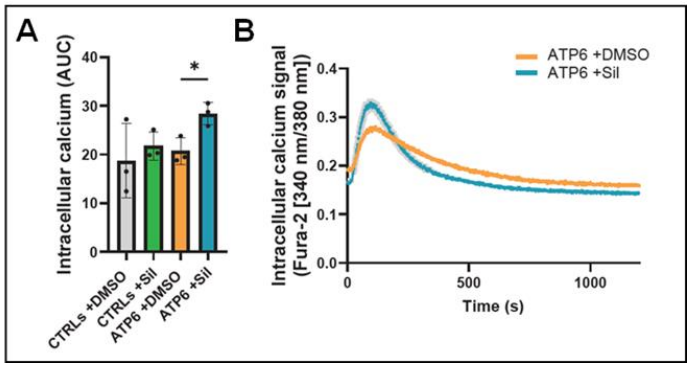


***Abbildung 7**: (**A**) Live-Cell-Calcium-Imaging unter Verwendung von Fura-2-Acetoxymethyl (AM) zur Untersuchung des store-operated calcium entry (SOCE) und der Calcium-Homöostase in Kontroll-NPCs und MILS-NPCs. (**B**) Beispielhafte Kurvenverläufe des intrazellulären Calciumspiegels, die die zeitliche Reaktion aller Experimente in MILS-NPCs auf dem Grundniveau und nach Behandlung mit Sildenafil zeigen.*

➔ AP3-Ziel1 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*AP3-Ziel2: Auswirkungen der Wirkstoffe auf NAD-Metaboliten in MILS-NPCs*

Um einen Einblick in die Wirkungsmechanismen von Sildenafil bei MILS zu erhalten, wählten wir vier MILS-NPC-Linien (eine für jede der MT-ATP6-Mutationen: m.9185T>C, m.8993T>C, m.8993T>G und m.9176T>G) und vier gesunde Kontroll-NPC-Linien aus, um eine Multi-omics-Analyse durchzuführen. Die Behandlung mit 10 µM Sildenafil über 16 Stunden reichte aus, um Veränderungen in der mitochondrialen Funktion hervorzurufen (siehe AP1-Ziele2-3). Wir verglichen Proben, die mit in 0,1% DMSO gelöstem Sildenafil behandelt wurden, mit Proben, die nur mit 0,1% DMSO behandelt wurden. Das Omics-Design würde es uns ermöglichen, i) die Krankheitssignatur zu identifizieren, indem wir DMSO-behandelte LS-NPCs mit DMSO-behandelten Kontroll-NPCs vergleichen, ii) die Sildenafil-Signatur, indem wir Sildenafil-behandelte LS-NPCs mit DMSO-behandelten LS-NPCs vergleichen (**Abbildung 8A**). Die gleichen Proben wurden an das Suomalainen-Labor geschickt, wo die Methodik für NAD-Metaboliten und Metabolomics-Messungen entwickelt wurde. Die Assays wurden auf MILS-NPCs angewendet (jede Probe in vierfacher biologischer Wiederholung). Mit dem NADmed-Assay konnten wir feststellen, dass das NAD+/NADH-Verhältnis in MILS-NPCs im Vergleich zu Kontroll-NPCs signifikant verändert war und sich nach der Behandlung mit Sildenafil normalisierte (**Abbildung 8B**).

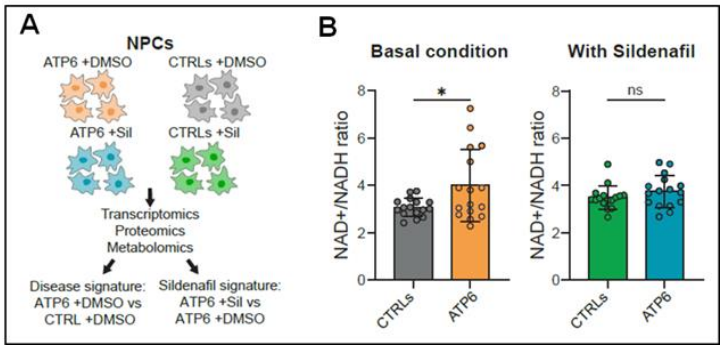


***Abbildung 8**: (**A**) Schematische Darstellung der Proben für Omics- und NAD-Profiling in Kontroll-NPCs (CTRL_1, CTRL_2, CTRL_3, CTRL_4) und MILS-NPCs (ATP6_2, ATP_4, ATP6_5, ATP6_7), um die Krankheitsmerkmale und die Sildenafil-Signatur (10 µM für 16 h) im Vergleich zu DMSO nur zu untersuchen. (**B**) Quantifizierung des NAD+/NADH-Verhältnisses in NPCs unter basalen Bedingungen und nach Sildenafil-Behandlung. *p<0,05, ns; ungepaarter zweiseitiger t-Test.*

➔ AP3-Ziel2 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*AP3-Ziel3: Effekt der Wirkstoffe in MILS-Neuronen*

Dopaminerge Neurone wurden aus ATP6-mutierten NPCs erzeugt, basierend auf unserem zuvor etablierten Protokoll. Mit diesem Ansatz testeten wir die Auswirkungen einer langfristigen Sildenafil-

Behandlung und maßen deren neuronale Auswuchs-Kapazität mithilfe von Hochdurchsatz-Bildgebung (**Abbildung 9A**). Wir stellten fest, dass sowohl ATP6-mutierte Neuronen als auch SURF1-mutierte Neuronen im Vergleich zu Kontrollneuronen eine reduzierte Neuritenlänge aufwiesen (**Abbildung 9B-D**). Die Sildenafil-Behandlung förderte das effektive Neuritenwachstum in Neuronen mit Leigh-Syndrom. Diese Verbesserung war spezifisch für Patientenneuronen (**Abbildung 9E**) und wurde nicht in Kontrollneuronen beobachtet, die mit Sildenafil behandelt wurden (**Abbildung 9F**).

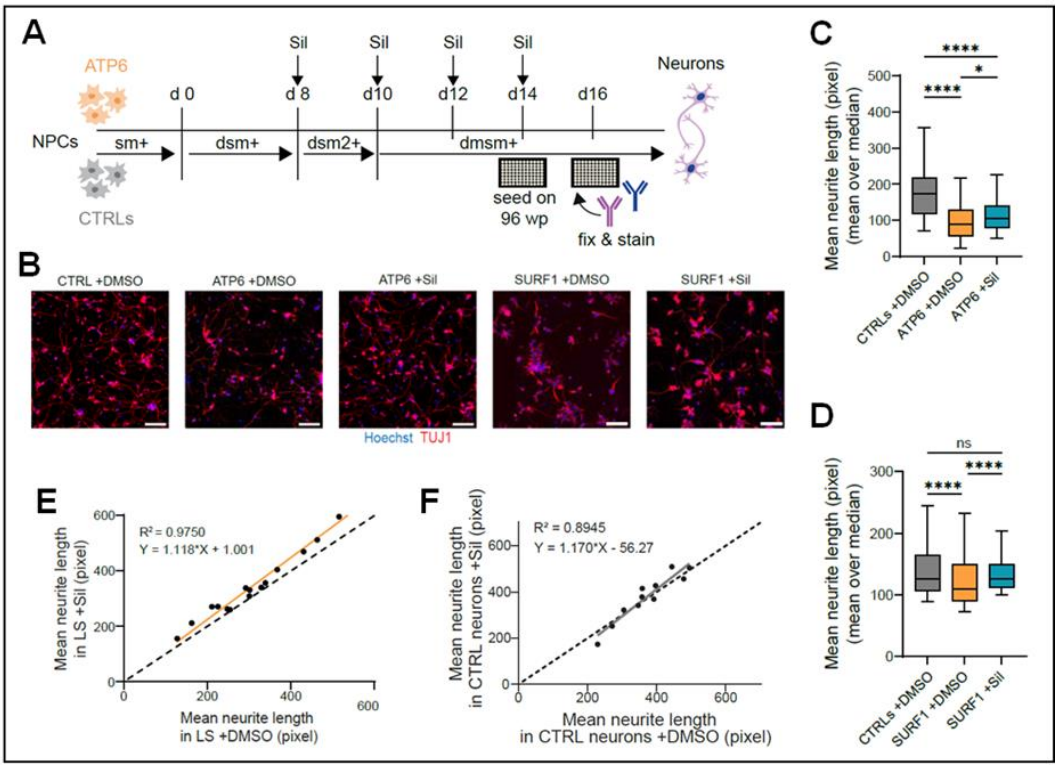


***Abbildung 9**: (**A**) Schematische Darstellung der Differenzierung in dopaminerg-angereicherten neuronalen Kulturen zur Bewertung der Auswirkungen der Sildenafil-Behandlung. (**B**) Repräsentative Bilder von dopaminerg-angereicherten Neuronen an Tag 16 aus Kontrollen, MT-ATP6-Mutanten und SURF1-Mutanten, die mit 10 µM Sildenafil oder DMSO für 8 Tage behandelt wurden. Maßstab: 100 µm. (**C-D**) Quantifizierung des neuronalen Auswuchses von dopaminerg-angereicherten Neuronen an Tag 16 aus MT-ATP6-Mutanten und Kontrollen sowie von SURF1-Mutanten und isogenen Kontrollen, die 8 Tage mit 10 µM Sildenafil oder DMSO behandelt wurden. Punkte repräsentieren die durchschnittliche Neuritenlänge pro Bild, berechnet als der Mittelwert über den Median pro Experiment. *p<0,05, ****p<0,0001, ns; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Multiple Comparison-Test. (**E**) Lineare Regression (Sildenafil über DMSO) der durchschnittlichen Neuritenlänge in allen Neuronen mit Leigh-Syndrom. Die schwarze gestrichelte Linie zeigt die hypothetische lineare Regression an, bei der kein Effekt der Behandlung zu sehen wäre (y=x oder Steigung=1). Punkte repräsentieren einzelne Experimente. (**F**) Lineare Regression der durchschnittlichen Neuritenlänge (Mittelwert über Median) in Kontrollneuronen, die 8 Tage mit Sildenafil behandelt wurden, im Vergleich zu Kontrollneuronen, die nur mit DMSO behandelt wurden (graue Linie). Die schwarze gestrichelte Linie zeigt die hypothetische lineare Regression an, bei der aufgrund der Sildenafil-Behandlung kein Effekt zu sehen ist (y=x). Punkte repräsentieren individuelle Werte pro Experiment aus n=10 unabhängigen Experimenten.*

Zusammen mit dem Del Sol-Labor haben wir auch die Auswirkungen zusätzlicher Medikamente durch Screening von kleinen Molekülen identifiziert. Wir haben Neuronen mithilfe einer schnellen und zuverlässigen Methode erzeugt, die auf der Induktion des pan-neuronalen Transkriptionsfaktors Neurogenin 2 (NGN2) in Patienten-NPCs basiert (**Abbildung 10A**). Wir bestätigten, dass diese Neuronen ebenfalls einen Defekt im Neuritenwachstum aufwiesen. Wir entdeckten zwei umwidmungsfähige Medikamente, Talarozole und Sertaconazole, die effektiv waren, um den Defekt im neuronalen Auswuchs bei Neuronen mit Leigh-Syndrom zu korrigieren (**Abbildung 10B**). Ein Manuskript zu diesen Ergebnissen mit mehreren Mitgliedern des CureMILS-Konsortiums befindet sich aktuell in Revision (Preprint: Menacho et al BioRxiv 2024; doi: https://doi.org/10.1101/2024.07.08.602501).

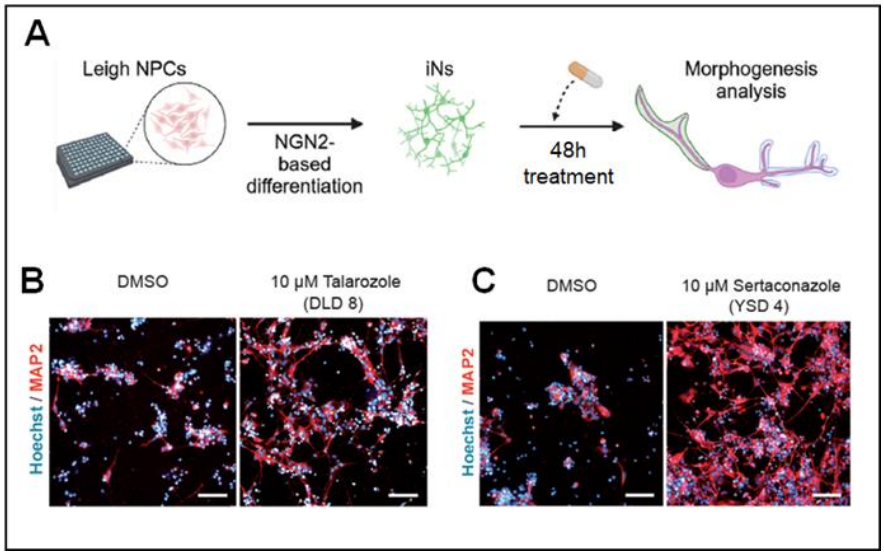


***Abbildung 10**:*
*(**A**) Schematische Darstellung der Bewertung der neuronalen Morphogenese in Leigh-NGN2-induzierten Neuronen (iNs).*
*(**B**) Einfluss der entdeckten umwidmungsfähigen Arzneikandidaten Talarozole und Sertaconazole auf das Neuritenwachstum in aus Leigh-Syndrom abgeleiteten iNs. Maßstab: 100 µm.*

➔ AP3-Ziel3 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*AP3-Ziel4: Effekt der Wirkstoffe in MILS-Hirnorganoiden*

Da MILS die Funktion von beeinträchtigt, untersuchten wir diesen Prozess mithilfe von kortikalen Gehirn-Organoiden. Diese erzeugten wir aus Kontroll-iPSCs und MILS-iPSCs nach unserem veröffentlichten Protokoll (*Le et al., JoVE, 2021*). Wir fanden heraus, dass MT-ATP6-Mutationen die Bildung neurogener Zonen beeinträchtigten (**Abbildung 11A**) und das Verhältnis von frühen Neuronen zu neuralen Vorläufern veränderten. Kortikale Gehirn-Organoide zeigten nach 50 Tagen in Kultur bei Vorhandensein von MT-ATP6-Mutationen defekte Wachstumsraten (**Abbildung 11B**). Anschließend untersuchten wir die funktionalen Konsequenzen der Sildenafil-Behandlung in Gehirn-Organoiden. Ein entscheidender Aspekt der MILS-Pathogenese ist die plötzliche Verschlechterung der Patienten nach Episoden metabolischer Dekompensation. Daher wollten wir akuten metabolischen Stress in MILS-Gehirn-Organoiden induzieren und den resultierenden intrazellulären Calciumanstieg bestimmen. Tatsächlich deuteten unsere Studien an MILS-NPCs darauf hin, dass die Wirkung von Sildenafil auf Calcium möglicherweise speziell im Zusammenhang mit MT-ATP6-Mutationen von Bedeutung ist (**AP3-Ziel1**). Zur Bearbeitung dieser Frage arbeiteten wir mit Christine Rose (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zusammen. An den Tagen 70-74 der Differenzierung stellten wir kortikale Gehirn-Organoid-Schnitte (*cortical brain organoid slices*, cBOS) nach unserem veröffentlichten Protokoll (*Petersilie et al., iScience, 2023*) her. Wir züchteten cBOS bis Tag 129 und behandelten sie dann 24 Stunden lang mit Sildenafil, bevor wir akuten metabolischen Stress anwendeten (2 Minuten Glukoseentzug und Hemmung der Glykolyse und OXPHOS) (**Abbildung 11C**). Die Calciumreaktion auf metabolischen Stress war in LS cBOS ausgeprägter und vorzeitiger im Vergleich zu Kontroll-cBOS, was auf eine erhöhte Anfälligkeit für metabolische Ungleichgewichte in Gegenwart von MT-ATP6-Mutationen hindeutet (**Abbildung 11D-E**). Eine Vorbehandlung mit Sildenafil in LS cBOS war ausreichend, um ihre Calciumlast nach metabolischem Stress und ihre Spitzen-Calcium-Amplitude zu reduzieren (**Abbildung 11D-E**). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sildenafil übermäßige Dekompensation in MILS-neuronalen Zellen unter akutem metabolischem Stress verhindern könnte.

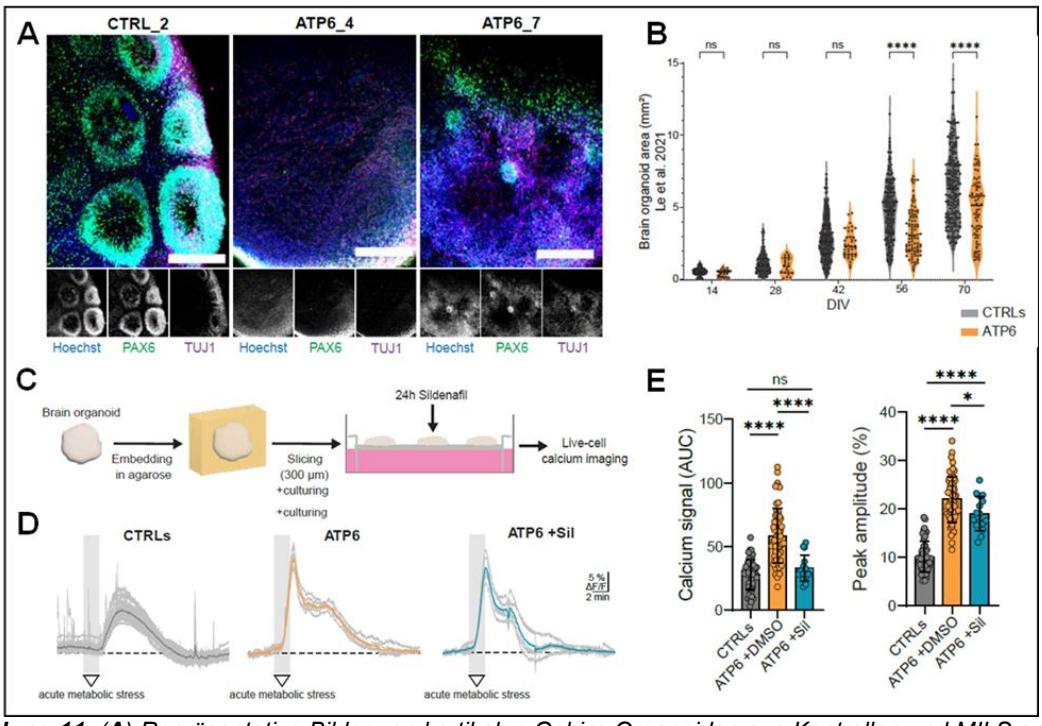


***Abbildung 11***: (***A***) *Repräsentative Bilder von kortikalen Gehirn-Organoiden aus Kontrollen und MILS am Tag 35, gefärbt mit dem neuralen Vorläufermarker PAX6 und dem neuronalen Marker TUJ1. Maßstab: 200 µm.* (***B***) *Quantifizierung der Größe einzelner Gehirn-Organoide, die gemäß unserem Protokoll von Le et al. bis Tag 70 gezüchtet wurden. ****p<0,0001, ns (nicht signifikant); zweiseitiger Mann-Whitney U-Test.* (***C***) *Schematische Darstellung der kortikalen Gehirn-Organoid-Schnitte (cBOS) für die Calcium-Bildgebung in lebenden Zellen.* (***D***) *Beispielhafte Signale des intrazellulären Calciums in Kontroll-cBOS und MILS cBOS als Reaktion auf akuten metabolischen Stress (2 Minuten glucosefreies Medium + 2 mM 2-Desoxyglucose und 5 mM Natriumazid). Einzelne Zellen, die in einem einzelnen Experiment aufgezeichnet wurden (graue Linien), plus die entsprechenden Durchschnittssignale (farbig).* (***E***) *Fläche unter der Kurve (AUC) und Spitze der durch metabolischen Stress in Kontroll-cBOS und MILS cBOS hervorgerufenen Calciumsignale. Punkte repräsentieren einzelne Zellen innerhalb der cBOS. *p<0,05, ****p<0,0001, ns (nicht signifikant); zweiseitiger Mann-Whitney U-Test.*

Wir haben auch die Auswirkungen der zusätzlich identifizierten Medikamente Talarozole und Sertaconazole untersucht. Zu diesem Zweck verwendeten wir Mittelhirn-Organoide (MOs), da die Mittelhirnregionen bei Leigh-Syndrom besonders betroffen sind (**Abbildung 12A**). Wir stellten fest, dass diese Medikamente den pathologischen Anstieg von Lactat, der durch Leigh-Syndrom-MOs erzeugt wird, reduzierten (**Abbildung 12B**) und die Anzahl der Tyrosinhydroxylase (TH)-positiven dopaminergen Neuronen in Patienten-MOs erhöhten (**Abbildung 12C**). Schließlich bestätigten wir, in Übereinstimmung mit den Daten von induzierten Neuronen (iNs), dass diese beiden Medikamente auch die defekte neuronale Morphogenese in MOs umkehrten (**Abbildung 12D**). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Talarozole und Sertaconazole signifikante positive Effekte auf dopaminerge Neurone von Leigh-Syndrom Patienten zeigten.

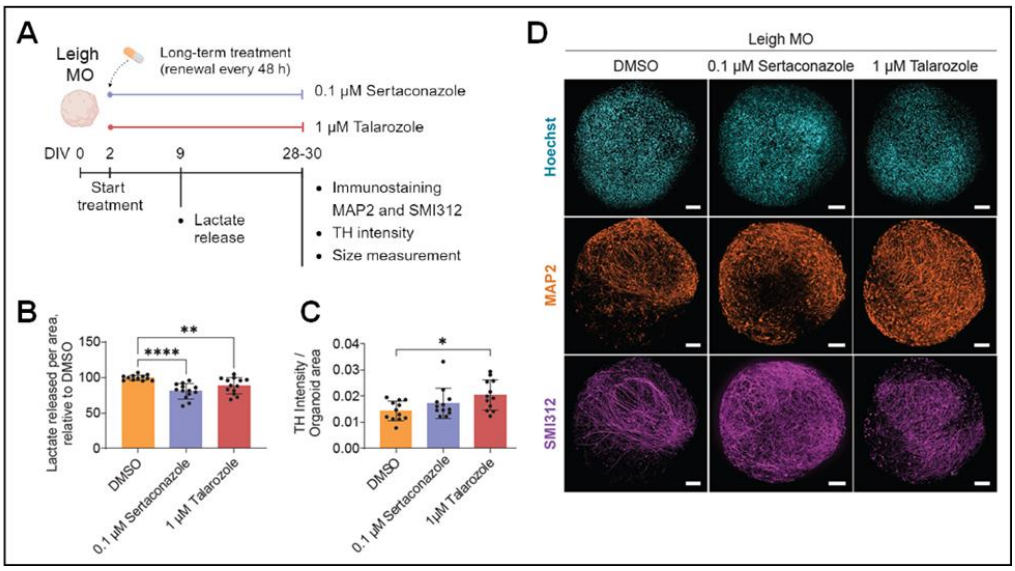


***Abbildung 12**: (**A**) Schematische Darstellung der Behandlung in Leigh-Mittelhirn-Organoiden (MO). (**B**) Lactatfreisetzung in behandelten Leigh MOs im Vergleich zu DMSO-behandelten Leigh MOs. Punkte repräsentieren einzelne MOs über 3 unabhängige Experimente. **p<0,01, ****p<0,001, Mann-Whitney U-Test, mit Verbindungen behandelte Leigh MOs vs. DMSO-behandelte Leigh MOs. (**C**) Neuritorganisation und Quantifizierung von Tyrosinhydroxylase (TH)-positiven Neuronen in behandelten Leigh MOs. Punkte repräsentieren einzelne MOs über 3 unabhängige Experimente; *p<0,05, ungepaarter zweiseitiger t-Test, mit Substanzen behandelte Leigh MOs vs. DMSO-behandelte Leigh MOs. (**D**) Neuritenorganisation in Leigh MOs, die mit Talarozole oder Sertaconazole behandelt wurden. Maßstab: 100 µm.*

➔ AP3-Ziel4 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*AP3-Ziel5: Durchgängigkeit von patientenspezifischen Blut-Hirn-Schranken-Modellen für wiederverwendbare Wirkstoffe*

Damit systemisch verabreichtes Sildenafil potenziell vorteilhafte Effekte bei MILS-Patienten ausüben kann, muss das Medikament die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überwinden. Um die Permeabilität für Sildenafil in MILS zu untersuchen, verwendeten wir ein auf menschlichen iPSCs basierendes BHS-Modell, das auf unserem zuvor veröffentlichten Protokoll basiert (*Krasemann et al., Stem Cell Reports, 2022*) (**Abbildung 13A**). Die Gehirnkapillaren-Endothelzellen (BCECs) von MILS zeigten eine korrekte Morphologie und Markerexpression, ähnlich wie die Kontroll-BCECs (**Abbildung 13B**), sowie eine akzeptable Monolayer-Integrität und transendothelialen elektrischen Widerstand (*transendothelial electrical resistance*, TEER). Die Permeabilität von Sildenafil und Sildenafil-Citrat (der aktiv verwendeten pharmazeutischen Substanz, die oral in der klinischen Anwendung verabreicht wird) in MILS-BCECs war ähnlich wie die in Kontroll-BCECs und war höher als die des negativen Referenzsubstanz Atenolol (Beta-Blocker, der nicht ins Gehirn eindringt), aber niedriger als die des positiven Referenzsubstanz Diazepam (ein anxiolytisches Benzodiazepin) (**Abbildung 13C**). Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Permeabilitätswerten von Sildenafil, die in anderen klinischen Kontexten berichtet wurden. Somit könnte Sildenafil in der Lage sein, die BHS von Patienten mit Leigh-Syndrom effektiv zu überwinden. Die vielversprechenden präklinischen Ergebnisse von Sildenafil in zellulären Modellen des Leigh-Syndroms veranlassten uns zu fragen, ob dieses Medikament umgewidmet werden könnte, um Patienten mit MILS zu behandeln. Sildenafil wurde sicher bei mehreren pädiatrischen Erkrankungen eingesetzt, einschließlich pulmonaler Hypertonie und lymphatischer Malformationen. Unser klinischer Mitarbeiter und Mitglied des CureMILS-Konsortiums, Markus Schuelke (Charité Berlin), initiierte die chronische orale Anwendung (*off-label compassionate use*) von Sildenafil-Citrat (Revatio®) bei sechs MILS-Patienten mit verschiedenen MT-ATP6-Mutationen. Er überwachte den Verlauf der MILS-Krankheit mithilfe der *Newcastle mitochondrial disease adult scale* (NMDAS) oder der *Newcastle pediatric mitochondrial disease scale* (NPMDS). Diese Bewertungsskalen

spiegeln alle Aspekte der mitochondrialen Erkrankung wider, einschließlich klinischer Bewertungen und Lebensqualität. Der Gesamtscore beschreibt die allgemeine Schwere der Krankheitslast und kann bei Patienten mit MILS schnell ansteigen. Dieser Anstieg ist in der Kohorte von MILS-Patienten mit MT-ATP6-Mutationen zu beobachten, die zuvor in Newcastle beschrieben wurde (*Lim et al., Annal Neurol., 2022*), wo der Score um 8,8 ± 11,4 SD-Prozentpunkte pro Jahr anstieg (**Abbildung 13D**, braune Linien), und in unserer Kohorte an der Charité in Berlin (*Carli et al., Neurology, 2025*), wo der Score um 3,4 ± 2,2 SD-Prozentpunkte anstieg (**Abbildung 13D**, orange Linien). Bemerkenswerterweise sanken die NPMDS/NMDAS-Scores der sechs Sildenafil-behandelten MILS-Patienten oder zeigten über die Zeit reduzierte Anstiegsraten (**Abbildung 13E**). Die Ergebnisse der individualisierten *compassionate use* Studien deuten darauf hin, dass eine chronische Behandlung mit Sildenafil zu klinischen Verbesserungen bei Patienten mit LS, die MT-ATP6-Mutationen tragen, führen könnte. Eine formelle randomisierte kontrollierte klinische Studie ist nun erforderlich, um die Sicherheit und mögliche Wirksamkeit von Sildenafil bei Patienten mit Leigh-Syndrom zu evaluieren.

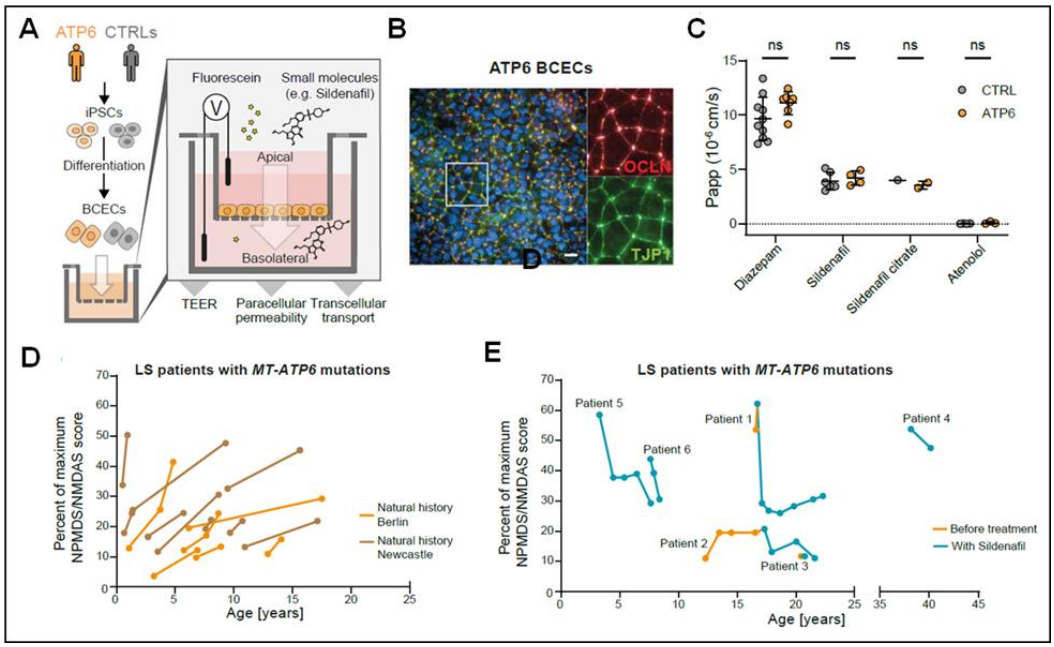


***Abbildung 13**: (**A**) Schematische Darstellung des aus iPSCs abgeleiteten Blut-Hirn-Schranken (BHS)-Modells zur Erzeugung von Gehirnkapillaren-Endothelzellen (BCECs). (**B**) Repräsentative Immunfärbung von MILS-BCECs, die die Expression und Ko-Lokalisierung von Occludin (OCLN) und dem tight junction Protein TJP1 zeigen, die erforderlich sind, um eine Barriere mit hohem transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) zu bilden. Maßstab: 100 µm. (**C**) Permeabilitätskoeffizient (Papp), gemessen durch LC-MS/MS in den apikalen und basolateralen Medien von Kontroll-BCECs und MILS-BCECs, die 10 µM Sildenafil oder Sildenafil-Citrat für 1 Stunde ausgesetzt waren, in n=1-5 unabhängigen Experimenten. Diazepam und Atenolol (jeweils 10 µM) dienten als interne positive und negative Kontrollen. ns; zweifaktorielle ANOVA. (**D**) Klinische Entwicklung von Patienten mit MILS, die MT-ATP6-Mutationen tragen, bewertet mit der Newcastle mitochondrial disease adult scale (NMDAS) oder der Newcastle pediatric mitochondrial disease scale (NPMDS), dargestellt als Prozentsatz des maximal erreichbaren Scores für die jeweilige Altersgruppe. Braune Linien zeigen Individuen, die zuvor in einer Kohorte aus Newcastle beschrieben wurden. Orange Linien zeigen Individuen in unserer Kohorte von der Charité Berlin. (**E**) Langfristige klinische Bewertung von off label compassionate use Behandlungen mit Sildenafil bei sechs Patienten mit MILS, die verschiedene MT-ATP6-Mutationen tragen, basierend auf dem NMDAS/NPMDS-Score.*

➔ AP3-Ziel5 wurde erfolgreich abgeschlossen.

**Meilenstein 3**: Wir konnten unseren dritten Meilenstein erreichen, den wir 24 Monate nach Projektbeginn prognostiziert hatten. Wir haben umfassende Experimente mit Sildenafil durchgeführt und die relevanten regulatorischen und IP-Informationen gesammelt. Wir haben die klinischen Bewertungen aller laufenden *compassionate use* Behandlungen (derzeit sechs) aktualisiert. Wir haben die ODD für die Verwendung von Sildenafil bei Leigh-Syndrom und Unterstützung von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) erhalten, um eine klinische Studie zur Prüfung der Wirksamkeit der

Sildenafil-Behandlung bei MILS-Patienten mit MT-ATP6-Mutationen zu organisieren. Außerdem haben wir zusätzliche Verbindungen (Talarozole und Sertaconazole) identifiziert, die für die Behandlung des Leigh-Syndroms umgewidmet werden sollen, und die entsprechenden Patentanmeldungen eingereicht.

**AP4: Validierungen in neuronalen LS-Zellen mit Complex I-Mutation** (*Edenhofer*, *Koopman*, Prigione)

*AP4-Ziel1: Direkte Reprogrammierung von MILS-iNPC*

Wir wählten Fibroblasten von MILS-Patienten mit MT-ATP6-Mutationen und Mutationen in Komplex-I-Genen (ND1, ND3, ND5) aus, um sie ins Edenhofer-Labor zu senden. Gleichzeitig reprogrammierten wir diese Fibroblasten zu iPSCs, um iPSC-abgeleitete MILS-NPCs mit direkt reprogrammierten MILS-iNPCs vergleichen zu können.

➔ AP4-Ziel1 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*AP4-Ziel2: Validierung von PDE5i in MILS-iNPCs*

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Lukas Cyganek (Georg-August-Universität Göttingen und Fraunhofer ITMP) haben wir iPSCs mit Komplex-I-Mutationen im Gen MT-ND5 erzeugt. Wir haben iPSC-Linien mit unterschiedlichen Heteroplasmieleveln für die m.13513G>A MT-ND5-Mutation im gleichen genetischen Hintergrund generiert. Anschließend differenzierten wir diese zu NPCs. Die Heteroplasmie-Quantifizierung wurde in Zusammenarbeit mit Andrea Rossi (IUF, Düsseldorf) durchgeführt. Wir konzentrierten uns auf zwei NPC-Linien mit 0% Heteroplasmie (isogene Kontroll-NPCs) und mit 50% Heteroplasmie, welches ausreicht, um MILS zu verursachen. Es wurden jedoch keine Unterschiede in Bezug auf das MMP beobachtet und die Behandlung mit Sildenafil erwies sich ebenfalls als ineffektiv.

Wir konzentrierten uns dann auf die Komplex-I-Mutation NDUFS4. Wir erzeugten NPCs aus iPSCs, die diese Mutation und die entsprechenden isogenen Kontrollen trugen. Wir stellten fest, dass die MMP im Vergleich zu den isogenen Kontroll-NPCs leicht verringert war. Allerdings war auch hier die Behandlung mit Sildenafil bei diesem Krankheitsphänotyp nicht wirksam.

➔ AP4-Ziel2 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*AP4-Ziel3: Direkte Reprogrammierung in Complex I-mutante iNPCs*

Die Edenhofer-Gruppe reprogrammierte Fibroblasten von MILS-Patienten mit Mutationen im Gen MT-ATP6 oder MT-ND5 entweder zu iPSCs oder erzeugten direkt iNPCs. Die Messung der Heteroplasmie wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Andrea Rossi (IUF, Düsseldorf) durchgeführt. Wir stellten fest, dass die Heteroplasmie in iNPCs im Allgemeinen relativ ähnlich war wie die in iPSCs. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verwendung von iNPCs eine vielversprechende Strategie für zukünftige Arbeiten darstellen könnte, die darauf abzielen, Wirkstoff-Screenings in patientenabgeleiteten NPCs durchzuführen. Tatsächlich wird durch die direkte Erzeugung von iNPCs eine erhebliche Zeitersparnis erreicht, was eine schnellere Generierung von Daten ermöglicht.

➔ AP4-Ziel3 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*AP4-Ziel4: Vergleich von MILS-iNPCs und Complex I-mutanten iNPCs*

Wir verglichen MILS-iNPCs und Complex I mutante iNPCs und fanden keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Markerexpression und des globalen transkriptionalen Profils.

➔ AP4-Ziel4 wurde erfolgreich abgeschlossen.

*AP4-Ziel5: Mitochondriale Profilbildung in behandelten iNPCs*

Wir führten eine MMP-Quantifizierung und ein mitochondriales bioenergetisches Profiling in iNPCs mithilfe von Seahorse Bioanalyzern und Oroboros-Instrumenten durch. Wir beobachteten keine

signifikanten Veränderungen in Complex I mutanten iNPCs auf basalem Niveau oder nach Sildenafil-Behandlung, was mit den Ergebnissen übereinstimmt, die in iPSC-abgeleiteten Complex I NPCs (AP4-Ziel2) erhalten wurden.

➔ AP4-Ziel5 wurde erfolgreich abgeschlossen.

**AP5: Computergestützte Analyse von MILS (behandelt/unbehandelt)** (*del Sol*, *Suomalainen*, *Lisowski*)

Für die Arbeitspakete AP5-Ziel1 (Proteomweite und metabolomische Studien von neuronalen MILS-Zellen) und AP5-Ziel2 (Transkriptomische und epigenetische Studien von neuronalen MILS-Zellen) wurden vom Prigione-Labor folgende Proben hergestellt, an die Partnerlabore des CureMILS-Konsortiums verschickt und vollumfänglich analysiert und die Daten integriert.

Vier biologische Replikate von:

i) Vier MILS-NPC Linien
ii) Vier Kontroll-NPC Linien
iii) Vier MILS-NPC Linien, Sildenafil-behandelt (10 µM for 16 h)
iv) Vier Kontroll-NPC Linien, Sildenafil-behandelt (10 µM for 16 h)

Zudem wurden für bulk RNA-Sequenzierung (RNAseq) Experimente jeweils drei biologische Replikate hergestellt von:

i) Hirnorganoide von zwei Kontroll-iPSCs
ii) Hirnorganoide von zwei MILS-iPSCs
iii) Hirnorganoide von zwei Kontroll-iPSCs, Sildenafil-behandelt (10 µM for 24 h)
iv) Hirnorganoide von zwei MILS-iPSCs, Sildenafil-behandelt (10 µM for 24 h).

Darüber hinaus wurden Hirnorganoide für single nucleus RNA-Sequenzierungsexperimente (snRNAseq) jeweils drei biologische Replikate hergestellt von:

i) Hirnorganoide von einer Kontroll-iPSC Linie
ii) Hirnorganoide von einer MILS-iPSC Linie
iii) Hirnorganoide von einer Kontroll-iPSC Linie, Sildenafil-behandelt (10 µM ür 45 Tage)
iv) Hirnorganoide von einer MILS-iPSC Linie, Sildenafil-behandelt (10 µM für 45 Tage).

➔ AP5 wurde erfolgreich abgeschlossen.

**Meilenstein 4**: Wir haben den vierten Meilenstein erreicht, der 36 Monate nach Projektbeginn abgeschlossen werden sollte. Wir haben die Netzwerkintegration der Multi-omics Studien durchgeführt, und haben Schlüsselmoleküle und -signalwege identifiziert, die beim Leigh-Syndrom gestört sind und die durch Sildenafil positiv moduliert werden.

**2. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen**

Prof. Dr. Stefan Jakobs (Georg-August-Universität Göttingen und Fraunhofer ITMP Standortleiter Göttingen)
Dr. Lukas Cyganek (Georg-August-Universität Göttingen und Fraunhofer ITMP Göttingen)
Dr. Jakob Metzger (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin)
Prof. Dr. Christine Rose (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
Dr. Andrea Rossi (Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf)
Dr. Spyros Petrakis (Institute of Applied Biosciences (INAB), Centre for Research and Technology Hellas (CERTH), Thessaloniki, Griechenland)

Das Hauptmanuskript zu CureMILS befindet sich aktuell in Begutachtung (Preprint bei MedRxiv: https://doi.org/10.1101/2025.05.15.25325571).

## 3. Budget

Der initiale Budgetplan des Projektes wurde eingehalten. Es kam zu individuellen Abweichungen (z. B. zeitliche Verschiebungen in der Verausgabung und Umwidmungen) bei den einzelnen Budgets der Partner, die den jeweiligen Finanzberichten zu entnehmen sind.

## 4. Veröffentlichungen

*Corresponding author
#Co-first author

1. Heiduschka S, **Prigione A***. *iPSC models of mitochondrial diseases*. Neurobiology of Disease, 31 January 2025, 106822. doi: 10.1016/j.nbd.2025.106822. (Special issue "Role of Mitochondria in pathophysiology of neurodevelopmental disorders"). [Impact Factor: 5.1] Open Access

2. Henke MT, **Prigione A***, Schuelke M*. *Disease models of Leigh syndrome: from yeast to organoids*. Journal of Inherited Metabolic Disease. 2024 Nov;47(6):1292-1321. doi: 10.1002/jimd.12804. [Impact Factor: 4.2] Open Access
   ***Selected for the Podcast series of the Journal of Inherited Metabolic Disease:*** https://open.spotify.com/episode/2wrvNvWdrbldBfy4Mrzq5s?si=W7Cqp2LsQ82w6QRMNUSrHg

3. Dobner J, Diecke S, Krutmann J, **Prigione A**, Rossi A. *Reassessment of Marker Genes in Human Induced Pluripotent Stem Cells for Enhanced Quality Control*. Nature Communications. 2024 Oct 2;15(1):8547. doi: 10.1038/s41467-024-52922-1. [Impact Factor: 14.7] Open Access
   ***Featured among Nature Communications Editors Highlights in "Stem Cell Research":*** https://www.nature.com/collections/pkgztbmgly

4. Adelizzi, Giri, Boito, Di Donfrancesco, **Prigione A**, Tiranti V, Bottani E, Persico, Brunetti D. *Fetal and obstetrics manifestation of mitochondrial disease.* Journal of Translational Medicine. 2024. [Impact Factor: 8.4] Open Access

5. Lisowski P, Lickfett S, Rybak-Wolf A, Menacho C, Le S, Pentimalli TM, Notopoulou S, Dykstra W, Oehler D, Lopez-Calcerrada S, Mlody B, Otto M, Wu H, Richter Y, Roth P, Anand R, Kulka LAM, Meierhofer D, Glazar P, Legnini I, Telugu NS, Hahn T, Neuendorf N, Miller DC, Böddrich A, Polzin A, Mayatepek E, Diecke S, Olzscha H, Kirstein J, Ugalde C, Petrakis S, Cambridge S, Rajewsky N, Kühn R, Wanker EE, Priller J, Metzger JJ*, and **Prigione A***. *Mutant Huntingtin impairs neurodevelopment in human brain organoids through CHCHD2-mediated neurometabolic failure*. Nature Communications. 22 August 2024. doi.org/10.1038/s41467-024-51216-w. [Impact Factor: 14.7] Open Access
   ***Awarded as the Paper of the Quarter 3R-Kompetenznetzwerk NRW***

6. Petersilie L, Kafitz KW, Neu L, Heiduschka S, Le S, **Prigione A***, Rose CR*. *Protocol for the generation of cultured cortical brain organoid slices (cBOS)*. STAR Protocols. 2024 Aug 9;5(3):103212. doi: 10.1016/j.xpro.2024.103212. [Impact Factor: 1.3] Open Access

7. Le S, Menacho C, **Prigione A***. *Balancing neuronal activity to fight neurodevelopmental disorders* Trends Neurosci. 2024 Mar 22:S0166-2236(24)00039-0. doi: 10.1016/j.tins.2024.03.002. [Impact Factor: 14.6] Open Access

8. Dobner JTN, Nguyen T, Pavez-Giani MG, Cyganek L, Distelmaier F, Krutmann J, **Prigione A**, Rossi A. *mtDNA Analysis using Mitopore.* Mol Ther Methods Clin Dev. 2024 Mar 12;32(2):101231. doi: 10.1016/j.omtm.2024.101231. [Impact Factor: 4.6] Open Access

9. Petersilie L, Heiduschka S, Nelson JSE, Neu LA, Le S, Anand R, Kafitz KW, **Prigione A***, Rose CR*. *Cortical brain organoid slices (cBOS) as a functional model system to study human neural cells in intact minimal networks*. iScience. 2024 Mar 4;27(4):109415. doi: 10.1016/j.isci.2024.109415. [Impact Factor: 4.6] Open Access

10. Dobner JTN, Dunkel A, **Prigione A**, Krutmann J, Rossi A. *Mitochondrial DNA integrity and metabolome profile are preserved in the human induced pluripotent stem cell reference line KOLF2.1J*. Stem Cell Reports. 2024 Mar 12;19(3):343-350. doi: 10.1016/j.stemcr.2024.01.009. [Impact Factor: 5.9] Open Access

11. Miller DC, Lisowski P, Genehr C, Wanker EE, Priller J, **Prigione A***, Diecke S*. *Generation of an induced pluripotent stem cell line from a Huntington's disease patient with a long HTT-PolyQ sequence*. Stem Cell Res. 2023 Apr;68:103056. doi: 10.1016/j.scr.2023.103056. [Impact Factor: 1.1] Open Access

12. Tolle I, Tiranti V, **Prigione A***. *Modeling mitochondrial DNA diseases: from base editing to pluripotent stem-cell-derived organoids*. EMBO Rep. 2023 Mar 6:e55678. doi: 10.15252/embr.202255678. [Impact Factor: 8.8] Open Access

13. Daneshgar N, Leidinger MR, Le S, Hefti M, **Prigione A**, Dai DF. *Activated microglia and neuroinflammation as a pathogenic mechanism in Leigh syndrome.* Front Neurosci. 2023 Jan 18;16:1068498. doi: 10.3389/fnins.2022.1068498. eCollection 2022. [Impact Factor: 4.3] Open Access

14. Henke MT, Zink A, Diecke S, **Prigione A**, Schuelke M. *Generation of two mother–child pairs of iPSCs from maternally inherited Leigh syndrome patients with m.8993 T > G and m.9176 T > G MT-ATP6 mutations.* Stem Cell Res. 2023 https://doi.org/10.1016/j.scr.2023.103030 [Impact Factor: 1.1] Open Access

15. Miller DC, Lisowski P, Lickfett S, Mlody B, Bünning M, Genehr C, Ulrich C, Wanker EE, Diecke S, Priller J, **Prigione A***. *Generation of induced pluripotent stem cells from three individuals with Huntington's disease*. Stem Cell Res. 2022 Nov 17;65:102976. [Impact Factor: 1.1] Open Access

16. Raskó T, Pande A, Radscheit K, Zink A, Singh M, Sommer C, Wachtl G, Kolacsek O, Inak G, Szvetnik A, Petrakis S, Bunse M, Bansal V, Selbach M, Orbán TI, **Prigione A**, Hurst LD, Izsvák Z. *A Novel Gene Controls a New Structure: PiggyBac Transposable Element-Derived 1, Unique to Mammals, Controls Mammal-Specific Neuronal Paraspeckles*. Mol Biol Evol. 2022 Oct 7;39(10):msac175. [Impact Factor: 10.7] Open Access

17. Steiner T, Zink A, Henke MT, Cecchetto G, Buenning M, Rossi A, Schuelke M, **Prigione A***. *RNA-based generation of iPSCs from a boy carrying the mutation m.9185 T>C in the mitochondrial gene MT-ATP6 and from his healthy mother*. Stem Cell Res. 2022 Sep 15;64:102920. doi: 10.1016/j.scr.2022.102920. [Impact Factor: 1.1] Open Access

18. Zink A, Haferkamp H, Wittich A, Beller M, Pless O*, **Prigione A***. *High-content screening of mitochondrial polarization in neural cells derived from human pluripotent stem cells*. STAR Protocols 2022 Aug 5;3(3):101602. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101602. [Impact Factor: 1.3] Open Access

19. Lickfett S, Menacho C, Zink A, Telugu NS, Beller M, Diecke S, Cambridge SB, **Prigione A***. *High-content analysis of neuronal morphology in human iPSC-derived neurons*. STAR Protocols, 2022 Aug 6;3(3):101567. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101567. [Impact Factor: 1.3] Open Access

20. Lorenz C, Zink A, Henke MT, Staege S, Mlody B, Bünning M, Wanker E, Diecke S, Schuelke M, **Prigione A***. *Generation of four iPSC lines from four patients with Leigh syndrome carrying homoplasmic mutations m.8993T>G or m.8993T>C in the mitochondrial gene MT-ATP6.* Stem Cell Res 2022 May;61:102742. doi: 10.1016/j.scr.2022.102742. [Impact Factor: 1.1] Open Access

21. Rossi A, Lickfett S, Martins S, **Prigione A***. *A call for consensus guidelines on monitoring the integrity of nuclear and mitochondrial genome in human pluripotent stem cells*. Stem Cell Reports. March 03, 2022, doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.01.019. [Impact Factor: 5.9] Open Access

22. Goettle, Schichel K, Reiche L, Werner L, Zink A, **Prigione A**, Küry P. *TLR4 associated signaling disrupters as a new means to overcome HERV-W ENV mediated myelination deficits*. Front Cell Neurosci. 2021 Nov 23;15:777542. [Impact Factor: 4.2] Open Access

23. Palombo F, Peron C, Caporali L, Iannielli A, Maresca A, Di Meo I, Fiorini C, Segnali A, Sciacca F, Rizzo A, Levi S, Suomalainen A, **Prigione A**, Broccoli V, Carelli V, Tiranti V. *The relevance of mitochondrial DNA variants fluctuation during reprogramming and neuronal differentiation of human iPSCs.* Stem Cell Reports, July 29, 2021. [Impact Factor: 5.9] Open Access

**Preprints**

1. Menacho C[#], Okawa S[#], Álvarez-Merz I, Wittich A, Muñoz-Oreja M, Lisowski P, Pentimalli TM, Rybak-Wolf A, Inak G, Zakin S, Thevandavakkam M, Petersilie L, Zaliani A, Mlody B, Seibt A, Donnelly J, Woleben K, Fernandez-Checa J, Herebian D, Mayatepek E, Rajewsky N, Spinazzola A, Schuelke M, Perlstein E, Rossi A, Distelmaier F, Holt IJ, Pless O, Rose CR, Del Sol A*, and **Prigione A***. *Deep learning-driven neuromorphogenesis screenings identify repurposable drugs for mitochondrial disease.* BioRxiv 2024. doi: https://doi.org/10.1101/2024.07.08.602501

2. Zink A[#], Dao-Fu D[#*], Wittich A[#], Henke MH[#], Pedrotti G[#], Heiduschka S[#], Aguilar GS, Pentimalli TM, Brueser C, Notopoulou S, Zhaivoron A, Umar AR, Petersilie L, Jerred C, Bergmans J, Schumacher F, Keller-Findeisen J, Rybak-Wolf A, Stach D, Reinshagen J, Zaliani A, Haferkamp U, Euro L, Di Donfrancesco A, Santanatoglia C, Cappellozza E, Suarez Cubero M, Pavez-Giani M, Bakumenko O, Meierhofer D, Foley A, Morales-Gonzalez S, Tolle I, Herebian D, Bonesso D, Szabo I, Cecchetto G, Wong S, Moresco M, Maresca A, Decimo I, Adjobo-Hermans MJW, Kleuser B, Cyganek L, Mühlhausen C, Schlotawa L, Tiranti, Rossi A, Mayatepek E, La Morgia C, Carelli V, Klopstock T, Distelmaier F, Ullah G, Jakobs S, Rajewsky N, Rose CR, Petrakis S, Edenhofer F, Koopmann W, Brunetti D, Lisowski P, Suomalainen A, Del Sol A*, Bottani E*, Pless O*, Schuelke M*, **Prigione A***. *Pluripotent stem cell-based drug discovery uncovers sildenafil as a treatment for mitochondrial disease*. MedRxiv 2025. doi: https://doi.org/10.1101/2025.05.15.25325571