



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA.

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE AVANZATE IN MEDICINA

XXI CICLO

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FUNZIONALE DI
NUOVE MUTAZIONI NELLE ENCEFALOMIOPATIE
MITOCONDRIALI

TERESA RIZZA

A.A. 2008/2009

Tutor: Prof. GIUSEPPE NOVELLI

Coordinatore: Prof. LUIGI GIUSTO SPAGNOLI

Sommario

1	INTRODUZIONE	4
1.1	I MITOCONDRI.....	4
1.1.1	Forma, dimensioni, distribuzione, numero	5
1.1.2	Struttura submicroscopica	5
1.1.3	Le funzioni dei mitocondri	8
1.1.4	La respirazione cellulare	8
1.1.5	La glicolisi.....	9
1.1.6	Il ciclo dell'acido citrico o ciclo di Krebs	10
1.1.7	La fosforilazione ossidativa.....	11
1.1.8	Le altre funzioni dei mitocondri	17
1.1.9	Ruolo dei Mitocondri nell'apoptosi.....	18
1.2	LA GENETICA MITOCONDRIALE	21
1.2.1	Struttura, organizzazione e contenuto genico del mtDNA umano	21
1.2.2	Espressione genica	26
1.2.3	Principi di genetica mitocondriale.....	39
1.3	PATOLOGIE MITOCONDRIALI	42
1.3.1	Mutazioni del DNA mitocondriale.....	46
1.3.1.1	Riarrangiamenti del mtDNA	46
1.3.1.2	Mutazioni puntiformi	47
1.3.2	Mutazioni nel DNA nucleare.....	50
1.3.2.1	Mutazioni in geni strutturali ed assemblanti i complessi dell'OXPPOS.....	51
1.3.2.2	Difetti della comunicazione intergenomica	51
1.3.3	Deplezione Del Dna Mitocondriale.....	52
1.3.4	Diagnosi Prenatale e Prevenzione	53
1.4	SINDROME DI LEIGH	55
1.5	IL COMPLESSO V DELLA CATENA RESPIRATORIA: F ₁ F ₀ -ATP SINTETASI.....	58
1.5.1	Struttura.....	58
1.5.2	Meccanismo d'azione.....	59
1.5.3	Mutazioni nell' ATPasi 6 umana.....	63
2	SCOPO DEL LAVORO	65
3	MATERIALI E METODI	67
3.1	PAZIENTI	67
3.2	INDAGINE MOLECOLARE.....	71
3.3	COLTURE PRIMARIE	73
3.4	FUSIONE	73
3.5	CURVE DI CRESCITA	75
3.6	ISOLAMENTO DEI MITOCONDRI	76
3.7	DETERMINAZIONE BIOCHIMICA DELLA SINTESI DI ATP.....	76
3.8	DETERMINAZIONE BIOCHIMICA DELLA IDROLISI DI ATP	77
3.9	SONICAZIONE.....	78
3.10	STUDI DI APOPTOSI.....	78
3.10.1	Linee cellulari.....	78
3.10.2	CARATTERIZZAZIONE DI BASE.....	79
3.10.3	ANALISI DI APOPTOSI.....	81
4	RISULTATI.....	84
4.1	PERCENTUALE DI MUTAZIONE NEI PEDIGREE	84
4.2	PERCENTUALE DI MUTAZIONE NEI CLONI CIBRIDI.....	86
4.3	CURVE DI CRESCITA	88
4.4	SINTESI DI ATP NELLE LINEE PRIMARIE.....	90
4.5	SINTESI DI ATP NEI CLONI 100% MUTATI	91
4.6	SINTESI DI ATP NEI CLONI CON DIVERSA PERCENTUALE DI MUTAZIONE...92	
4.7	IDROLISI DELL' ATP	93

4.7.1	SONICAZIONE	94
4.8	INDAGINE APOPTOTICA	96
4.8.1	Caratterizzazione di base	96
4.8.2	Suscettibilità dei cloni all'apoptosi	99
4.8.3	Ruolo dei mitocondri nell' apoptosi	101
4.8.4	Ruolo del potenziale di membrana nella sensibilità apoptotica.....	104
5	DISCUSSIONE	108
6	BIBLIOGRAFIA	116

1 INTRODUZIONE

1.1 I MITOCONDRI

Il nome mitocondrio, derivante dal greco "mitos" (fili) e "chondrion" (granuli), fu introdotto nel 1898 da Benda, che osservò questi organuli durante i suoi studi sulla spermatogenesi dell'insetto (Benda,1898). I mitocondri sono organelli filamentosi o granulari presenti in tutte le cellule animali e vegetali e nei protozoi, nonché nelle alghe e nei funghi. In essi hanno luogo numerose ed importanti funzioni cellulari, quali il metabolismo dei lipidi, il ciclo dell'acido citrico ed il metabolismo energetico, che avviene mediante la respirazione cellulare e la fosforilazione ossidativa. Tali organuli sono assenti nei batteri nei quali le funzioni respiratorie sono svolte dalla membrana plasmatica e dalle sue brevi invaginazioni, dette mesosomi.

I mitocondri contengono un proprio genoma (Nass e Nass, 1963) e pertanto sono da considerarsi organuli semiautonmi, capaci cioè di replicare il loro DNA,

di codificare e di provvedere alla biosintesi di alcune delle proprie proteine costitutive.

1.1.1 Forma, dimensioni, distribuzione, numero

Le prime testimonianze di strutture intracellulari riconducibili ai mitocondri risalgono al 1840, solo pochi anni dopo la scoperta del nucleo. Nel 1890, Altmann fu il primo a riconoscere la presenza ubiquitaria di queste strutture, che egli definì “bioblasti” e rappresentò come organismi elementari della cellula in grado di portare avanti funzioni vitali (Altmann, 1890).

I mitocondri appaiono come filamenti o bastoncelli con un diametro medio di 0.3 μm circa e lunghezza variabile da 1 a 6 μm . Sono generalmente distribuiti in modo uniforme nel citoplasma ma, a livello degli interstizi compresi fra le miofibrille, nelle fibre muscolari striate, risultano disposti in file longitudinali e negli spermatozoi sono raggruppati a formare una spirale attorno al segmento intermedio del flagello. Il numero dei mitocondri e' variabile a seconda del tipo cellulare e dello stato funzionale della cellula stessa. Infatti, in una cellula normale ve ne sono da 1000 a 2000, ma gli ovociti maturi ne possono contenere fino a 100.000 unità (Jenuth *et al.*, 1996)

1.1.2 Struttura submicroscopica

Al microscopio ottico i mitocondri appaiono privi di organizzazione interna, ma quando esaminati al microscopio elettronico presentano un'organizzazione membranosa molto complessa ed altamente caratteristica (**Figura 1**).

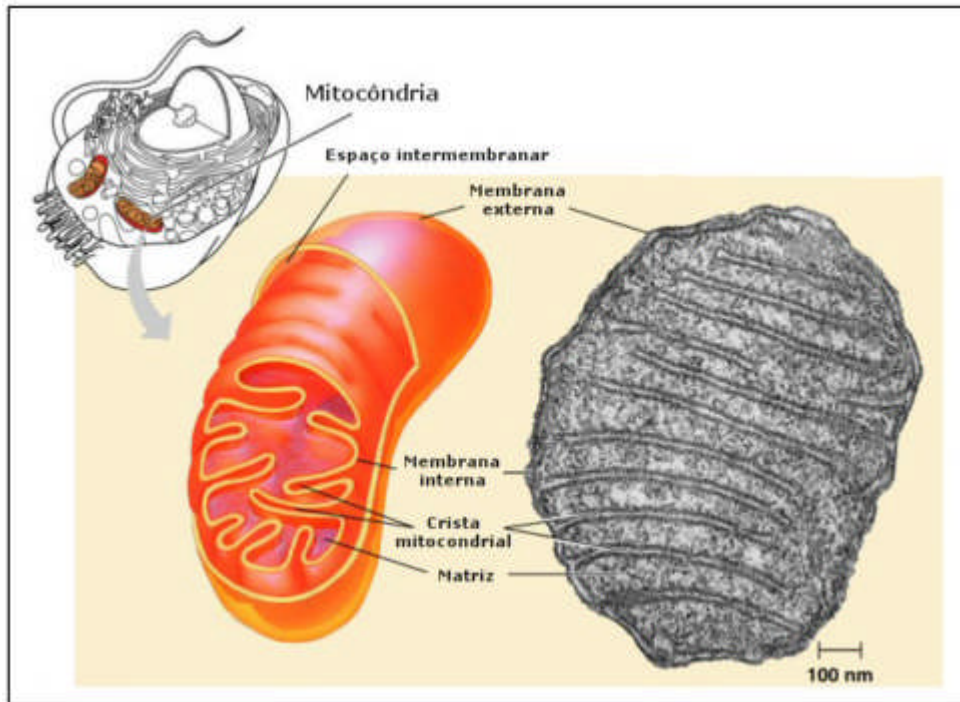


Figura 1 - Mitocondrio in microscopia elettronica

La parete risulta costituita da due membrane concentriche. La membrana esterna, di 5-6 nm di spessore, è continua e probabilmente è implicata nei processi di permeabilità. La membrana interna, pure di 6 nm di spessore, è separata dalla membrana esterna da uno spazio di circa 8-20 nm ed è sollevata in pieghe, le creste mitocondriali. I primi a parlare di creste mitocondriali furono Sjostrand (Sjostrand, et al.,1956) e Palade (Palade et al., 1952) attraverso lavori pionieristici con la microscopia elettronica.

Entrambi riconobbero che i mitocondri contengono più di un sistema di membrane, ma fu Palade ad osservare la presenza di compartimenti limitati dalla membrana interna che egli battezzò “cristae mitochondriales”. Il modello da lui proposto ed ancora universalmente accettato prevede che la membrana mitocondriale interna è una superficie unica, continua, con una morfologia complessa, in cui le creste sono il frutto di ripiegamenti assimilabili a quelli del

mantice di una fisarmonica. Successivamente si è visto che tali invaginazioni sono delle cisterne che presentano numerose interconnessioni tubulari con la membrana interna, definite da Perkins e collaboratori “crista junction” (Perkins, *et al.*, 1997). La morfologia delle creste è variabile seconda del tessuto di origine e dello stato conformazionale del mitocondrio, in modo da regolare il gradiente dei metaboliti interni e quindi la sintesi di ATP.

La cavità centrale del mitocondrio, delimitata dalla membrana interna e dalle sue creste, costituisce la *camera interna*, denominata *matrice mitocondriale*. Lo spazio compreso tra le due membrane, di 8-20 nm di spessore, costituisce la *camera esterna* o *spazio intermembrana*. La matrice mitocondriale è in generale omogenea o finemente granulare, ma in alcuni casi può presentare granuli densi di circa 30 nm. I *granuli della matrice* sono stati isolati e si ritiene che siano deputati a legare cationi bivalenti, quali Mg^{++} e Ca^{++} . Oltre ai granuli di 30-40 nm, la matrice può contenere granuli più piccoli di circa 12 nm che corrispondono ai ribosomi mitocondriali.

I mitocondri sono costituiti per circa il 65-70% da proteine e per il 30-35% circa da lipidi (fosfolipidi e piccole quantità di colesterolo). Le varie centinaia di proteine contenute nel mitocondrio sono sintetizzate nel citoplasma, ad eccezione di alcune codificate dal DNA mitocondriale e sintetizzate nell'organulo stesso. Le proteine mitocondriali comprendono proteine strutturali costitutive delle membrane, proteine con proprietà contrattili e numerosi enzimi (più di settanta) che provvedono all'attività di questi organuli. Sono presenti anche nucleotidi (essenzialmente ATP e ADP), coenzimi accettori di idrogeno (NAD, NADP e FAD) e ioni (soprattutto Na^+ , K^+ , Ca^{++} , e Mg^{++}).

1.1.3 Le funzioni dei mitocondri

I mitocondri sono la sede in cui si verifica il ciclo dell'acido citrico, l'ossidazione degli acidi grassi e la fosforilazione ossidativa, processi che, in condizioni aerobiche, producono la maggior parte dell'energia utilizzata dalla cellula. Essi sono inoltre i responsabili del metabolismo degli acidi grassi, degli amminoacidi e degli steroidi.

Tra tutte queste funzioni, sicuramente la più cruciale è la generazione di ATP attraverso la catena di trasporto elettronico e il sistema della fosforilazione ossidativa, ovvero la respirazione cellulare.

1.1.4 La respirazione cellulare

Il termine "respirazione" è usato per riferirsi ai processi nei quali l'energia cellulare è generata attraverso l'ossidazione di molecole di nutrienti, con l'O₂ in qualità di accettore finale di elettroni. Questo tipo di respirazione è anche chiamato "respirazione cellulare" per distinguerla da quella polmonare.

Le vie metaboliche di questo processo possono essere descritte attraverso tre fasi (**Figura 2**):

- Generazione di un frammento attivato a due carboni (acetil-CoenzimaA) prodotto partendo da glucosio, acidigrassi, o amminoacidi.
- Ossidazione dei carboni del gruppo acetilico a CO₂ attraverso il ciclo dell'acido citrico o ciclo di Krebs (mitocondri).
- Gli elettroni, liberati nella precedente fase di ossidazione, vengono conservati riducendo le molecole di NAD⁺ e FAD⁺ rispettivamente a

NADH e FADH₂. I cofattori così ridotti vengono a loro volta ossidati liberando protoni (H⁺) ed elettroni (e⁻). Gli elettroni sono trasferiti mediante una serie di molecole trasportatrici (la catena respiratoria) all'O₂ che si riduce formando H₂O. Al trasferimento di elettroni si associa un gradiente protonico che determina la produzione di ATP nel processo dalla “fosforilazione ossidativa”.

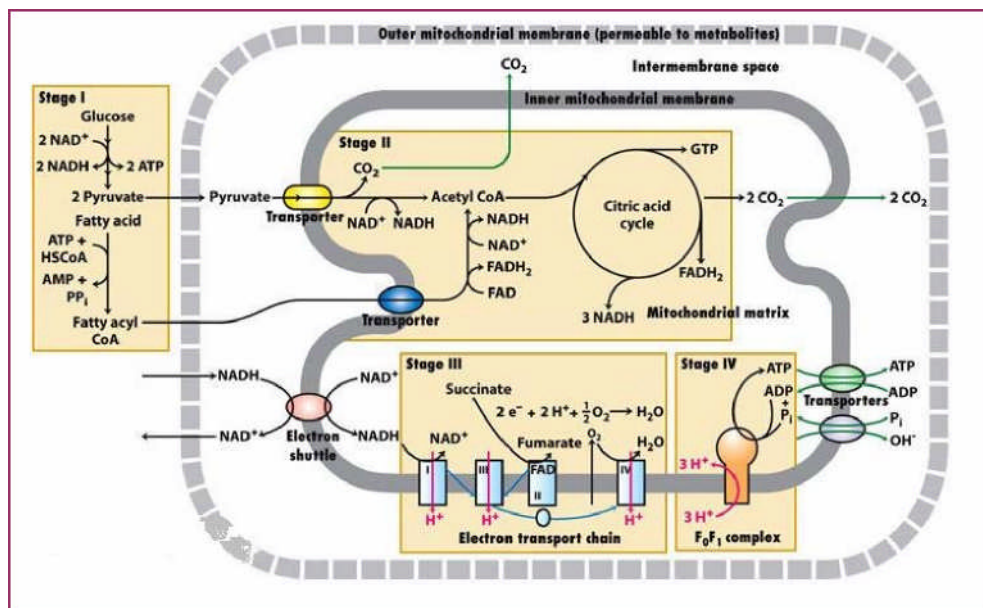


Figura 2 - Glicolisi e respirazione cellulare

1.1.5 La glicolisi

La respirazione cellulare è preceduta da un processo anaerobico di acquisizione di energia, pressochè universale nelle cellule viventi, che è rappresentato dalla *glicolisi*.

La glicolisi è una via a 10 reazioni che negli eucarioti si svolge nel **citiosol**. Essa consta di due fasi principali:

- una *fase di investimento energetico* (le prime cinque reazioni) in cui vengono sintetizzati gli zuccheri fosfati a spese di 2 moli di ATP e in cui il

substrato a sei atomi di carbonio viene scisso in 2 zuccheri fosfati a 3 atomi di carbonio (piruvato)

- Una *fase di produzione energetica* (le ultime cinque reazioni) nella quale i due trioso fosfati sono convertiti in composti ad alta energia. Questi composti trasferiscono 4 molecole di fosfato all'ADP, formando 4 molecole di ATP. Tale processo, chiamato *fosforilazione a livello di substrato*. Sottraendo le due moli di ATP investite nella prima fase per formare lo zucchero fosforilato a sei atomi di carbonio (fruttosio 1,6-bifosfato), si realizza un guadagno netto di due molecole di ATP per ogni mole di glucosio convertito a piruvato.

1.1.6 Il ciclo dell'acido citrico o ciclo di Krebs

Il piruvato è uno dei metaboliti critici nelle cellule e la maggior parte di esso origina dalla glicolisi. Il suo destino metabolico dipende da quattro enzimi differenti: la *lattico deidrogenasi* (formazione reversibile del lattato), l'*alanina amminotransferasi* (formazione reversibile dell'alanina), la *piruvico carbossilasi* (formazione di ossalacetato nella gluconeogenesi e innesco del ciclo di Krebs), ed il *complesso della Piruvico deidrogenasi* (formazione dell'acetil-coA ed entrata nel ciclo di Krebs).

In presenza di ossigeno, il piruvato penetra nella *matrice mitocondriale* dove va incontro ad una decarbossilazione ossidativa in cui il gruppo acilico risultante, viene unito al coenzimaA (CoASH) con formazione di Acetil-CoA e CO₂ ad opera della Piruvico deidrogenasi. La Piruvico deidrogenasi

è formata da tre distinti enzimi (Eley *et al.*, 1972)

- la *Piruvato decarbossilasi* (E1), formata da un eterotetramero di due subunità α e di due subunità β
- la *Didrolipoil transacetilasi* (E2)
- la *Didrolipoil deidrogenasi* (E3)

Il complesso richiede cinque differenti coenzimi per le sue reazioni: tiamina pirofosfato, acido lipoico e FAD, strettamente legati al complesso; Coenzima A e il NAD^+ sono utilizzati come carrier per i prodotti dell'attività enzimatica. L'attività della piruvico deidrogenasi è finemente regolata dal suo stato di fosforilazione, che dipende da una chinasi-PDH specifica che inattiva l'enzima; la riattivazione dipende dalla PDH-fosfatasi (Pithukpakorn *et al.*, 2005).

Gli *enzimi ossidativi* del ciclo di Krebs sono situati nella matrice mitocondriale. Questi enzimi attraverso otto tappe conducono all'ossidazione del gruppo acetilico. La prima reazione del ciclo è la condensazione dell'acetil-CoA con l'ossalacetato per formare citrato. Nelle successive sette reazioni si liberano due molecole di CO_2 e si riforma l'ossalacetato. Per ogni molecola di piruvato si formano ad ogni ciclo 2 molecole di NADH, una di NADPH ed una di FADH_2 , che verranno utilizzate dagli enzimi della catena respiratoria. Inoltre viene prodotto un legame fosforico ad alta energia sotto forma di ATP o di GTP per fosforilazione dell'ADP o del GDP.

1.1.7 La fosforilazione ossidativa

Nel corso del processo della glicolisi si libera soltanto una frazione

dell'energia chimica potenzialmente disponibile nella molecola del glucosio: la trasformazione di una molecola di glucosio in acido lattico o alcool etilico produce solo due moli di ATP. In condizioni aerobiche, invece, l'ossidazione controllata degli zuccheri libera una grande quantità di energia: vengono infatti prodotte fino a 38 moli di ATP per ogni mole di glucosio ossidata a CO₂ e H₂O e la maggior parte di esse sono generate attraverso il processo della fosforilazione ossidativa.

La fosforilazione ossidativa consta di due fenomeni strettamente accoppiati:

1. il NADH e il FADH₂ prodotti dalla glicolisi, dal ciclo di Krebs e dall'ossidazione degli acidi grassi vengono ossidati nella catena respiratoria di trasporto degli elettroni (ETC). La catena respiratoria è un sistema di complessi proteici, localizzati nella membrana mitocondriale interna, che comprendono anche ossidoreduttasi in grado di pompare protoni attraverso la membrana interna mitocondriale.
2. il gradiente di protoni è una fonte di energia libera, che viene dissipata quando i protoni attraversano di nuovo la membrana mitocondriale interna utilizzando l'ATP-sintasi. In questo processo, l'ADP viene fosforilato e si forma ATP (Mitchell, 1968).

Gli enzimi della catena respiratoria sono quattro complessi multi proteici ossidoreduttasici: la NADH-deidrogenasi (complesso I), la Succinico-deidrogenasi (complesso II), la Citocromo c-reduttasi (complesso III) e la Citocromo c-ossidasi (complesso IV) (**Figura 3**).

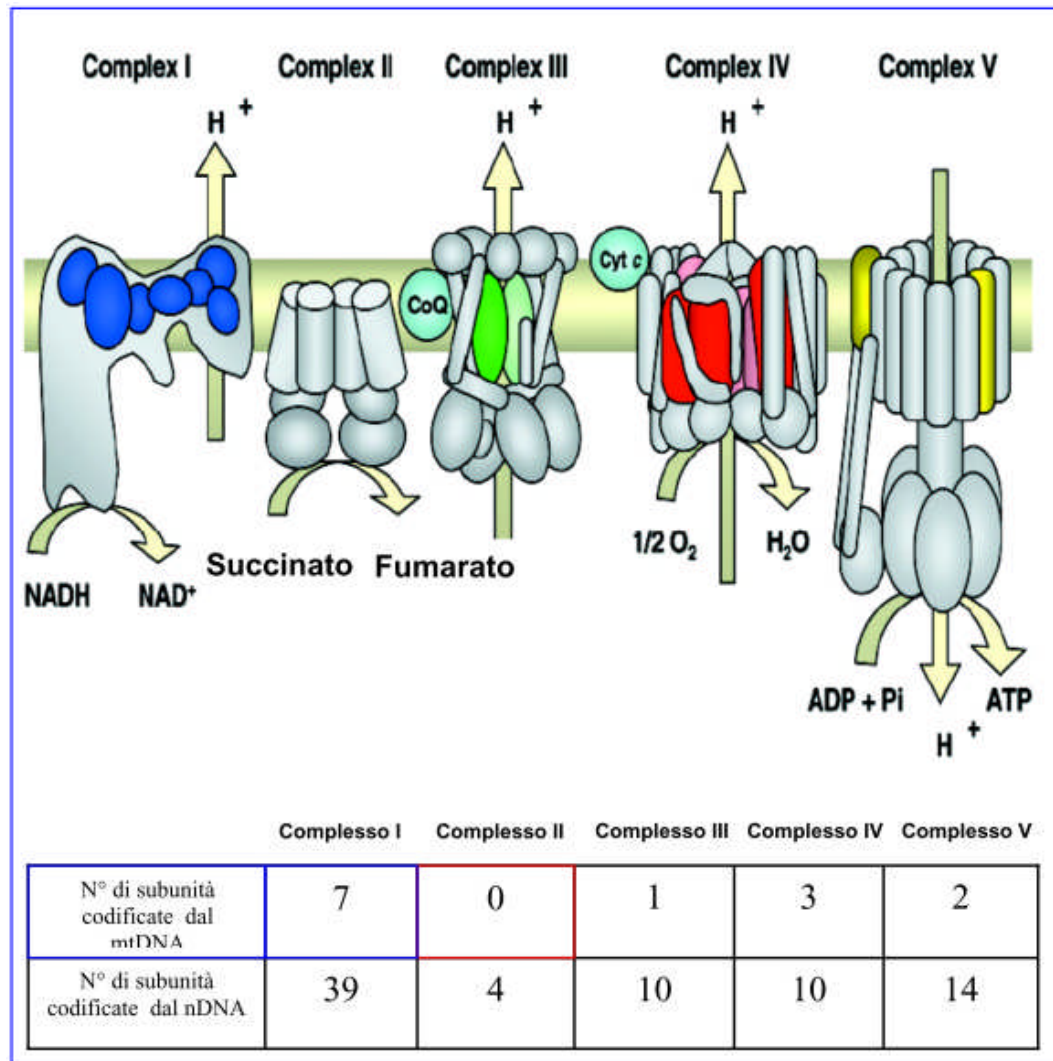


Figura 3 - La catena respiratoria mitocondriale. Le subunità blu (nel Complesso I), verdi (nel Complesso III), rosse (nel Complesso IV) e gialle (nel Complesso V) sono codificate dal DNA mitocondriale. (Zeviani e Di Donato, 2004)

Complesso I

La NADH-deidrogenasi catalizza il primo passaggio della fosforilazione ossidativa nei mitocondri. Il NADH proveniente dal catabolismo degli acidi grassi, dal piruvato e dagli amminoacidi viene ossidato nella matrice mitocondriale e i suoi elettroni vengono trasferiti all'ubichinone della membrana interna, passando attraverso una flavina mononucleotide ed una serie di centri ferro-zolfo. Il passaggio di due elettroni, uno alla volta, dal NADH all'ubichinone è accoppiato

alla traslocazione di quattro protoni dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana. Nell'uomo, il complesso I contiene 7 subunità codificate dal mtDNA (subunità ND1, ND2, ND3, ND4, ND5 e ND6 e ND4L) e 39 codificate dal genoma nucleare, ma soltanto 14 rappresentano l'effettivo cuore catalitico della NADH-deidrogenasi (Smeitink *et al.*, 2004).

L'analisi strutturale del complesso I è stata estesamente condotta sull'enzima di origine bovina; esso si presenta come un assemblaggio di 45 polipeptidi di massa complessiva pari a 1Mda, associati in maniera non covalente ad una flavina mononucleotide (FMN) e ad 8 centri ferro-zolfo. Il complesso I ha una forma ad "L" bipartita (Grigorieff,1999) con un braccio periferico che protrude nella matrice e responsabile del trasporto elettronico, ed uno immerso nella membrana costituito solo da subunità di origine mitocondriale e coinvolto nella riduzione dell'ubichinone e nel pompaggio dei protoni (Brandt *et al.*, 2006). Il complesso I è assemblato a formare dei supercomlessi di ordine superiore (respirasomi) con il complesso III e IV (Schägger e Pfeiffer, 2000; Schägger *et al.*, 2004). Poiche' il 50% dei pazienti con deficit del complesso I non presentano mutazioni nelle subunità costitutive (Janssen *et al.*, 2002; Thorburn *et al.*, 2004), si ipotizza che le mutazioni rimanenti ricadano nei geni necessari alla biogenesi del complesso I stesso. La biogenesi del complesso I è stata largamente studiata utilizzando il fungo *Neurospora crassa*, nel quale sono state identificati due proteine CIA84 (84kDa) e CIA30(30Kda) (Kuffner, 1998) in grado di comportarsi come chaperonine molecolari che assemblano il complesso I senza mai entrarne a far parte. Recentemente è stato identificato un gene, NDUFAF1, il cui prodotto di traduzione mostra un omologia del 28% con CIA30 di *N. crassa* (Janssen *et al.*, 2002).

Assieme ad esso altre due proteine sono state riconosciute nei mammiferi come fattori di assemblaggio del complesso I: B17.2L (Ogilvie *et al.*, 2005) e AIF (Vahsen *et al.*, 2004).

Complesso II

La Succinico-ubichinone-ossidoreduttasi (SQR) è un enzima formato da quattro subunità, che accoppia l'ossidazione del succinato a fumarato con la riduzione del chinone a chinolo (QH₂). Questa reazione lega funzionalmente il ciclo di Krebs con la catena respiratoria. L'ossidazione del succinato si attua a spese del

FAD, covalentemente legato al sito solubile dall'enzima. Gli elettroni vengono trasferiti, attraverso tre centri ferro-zolfo, all'ubichinone. Differentemente dagli altri complessi, la SQR si pensa che non contribuisca alla traslocazione dei protoni, a causa della piccola variazione di energia libera conseguente alla riduzione dell'ubichinone. Attraverso studi cristallografici condotti su SQR di *E.Coli*, risulta che la SQR è formata da un largo complesso solubile, comprendente due subunità (SdhA, Fp 70Kda e SdhB, Ip Kda), e un dominio di ancoraggio alla membrana anch'esso formato da due componenti (SdhC e SdhD) (Horsefield *et al.*, 2004).

Il complesso II è l'unico componente della catena respiratoria a non possedere subunità codificate dal mtDNA.

Complesso III

Il complesso bc1 o *Ubichinolo-citocromo c ossidoreduttasi*, è formato da 11 subunità di cui solo una, il citocromo b, è codificata dal genoma mitocondriale. La funzione di questo complesso è quella di ossidare l'ubichinone ridotto (ovvero l'ubichinolo) e di trasferire gli elettroni attraverso i quattro centri redox della proteina, sull'accettore finale del citocromo c. I centri redox della proteina,

rappresentati dalla proteina Fe-S Reiske (nella subunità V) da due citocromi di tipo b (b562 e b566 nella subunità III) e dal citocromo c1 (nella subunità IV), si trovano nelle subunità maggiori del complesso che risultano essere ben conservate nelle diverse specie (Rich, 1991). Il citocromo c, che costituisce il trasportatore intermedio di elettroni dal complesso III al complesso IV, è una piccola proteina (12.5 Kda) localizzata nello spazio intermembrana e debolmente associata alla faccia citosolica della membrana mitocondriale interna.

Complesso IV

La Citocromo c-ossidasi (COX) è l'enzima terminale della catena respiratoria e gioca un ruolo chiave nella produzione aerobica dell'energia cellulare. La COX è un enzima multimerico, il cui assemblaggio richiede l'intervento di un ampio numero di fattori nucleari, che agiscono su vari livelli lungo il processo di formazione. Il complesso IV è, infatti, formato da 11 subunità differenti dalla duplice origine genetica. Le tre subunità più grandi Cox1, Cox2 e Cox3 sono codificate dal mtDNA e formano il cuore catalitico dell'enzima. Questi polipeptidi sono proteine transmembrana della membrana mitocondriale interna e coordinano un gruppo eme A e vari cofattori contenenti rame, che sono poi responsabili dell'attività di trasporto elettronico. Cox1 possiede due centri redox, uno rappresentato da un eme A, e l'altro da un gruppo eme a_3 e da Cu_b . Un terzo centro redox dell'enzima è formato da due ioni rame presenti nel Cu_a di Cox2. Il percorso degli elettroni è il seguente: il Cu_a accetta nel suo sito attivo gli elettroni provenienti dal citocromo c e rapidamente riduce l'eme A. Dall'eme A, gli elettroni sono trasferiti intramolecolarmente al centro binucleare eme a_3 - Cu_b , dove l'ossigeno molecolare si lega per essere ridotto. Per ogni elettrone trasferito, due protoni sono pompato attraverso la membrana mitocondriale interna. Cox3 non

contiene gruppi prostetici e probabilmente è coinvolta nell'assemblaggio e/o nella stabilità della subunità 1 e 2.

Queste tre proteine codificate dal mtDNA rappresentano il “core” catalitico dell'enzima, ma è altrettanto importante la presenza di subunità di origine nucleare non coinvolte nel processo di riduzione dell'ossigeno. Circa 10 peptidi si occupano di formare l' “impalcatura” protettiva che circonda il cuore catalitico, proteggendolo dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e regolandone l'attività enzimatica. Più di 20 subunità nucleari si occupano invece dell'assemblaggio del complesso IV e quindi della sua biogenesi: Cox4, le due isoforme di Cox5, Cox6, Cox7 e Cox9 si occupano della biogenesi dell'oloenzima. Il primo step del processo di formazione del complesso IV prevede la formazione di Cox1; il secondo possibile intermedio è formato da Cox1-Cox4 e forse anche da Cox5, il terzo intermedio contiene tutte le subunità eccetto le subunità da Cox7 a Cox10, l'aggiunta delle quali porta alla formazione dell' enzima completo.

La maturazione definitiva dell' oloenzima prevede la formazione di un dimero intermembrana cataliticamente attivo, processo anche questo guidato attraverso l'interezione tra prodotti proteici del nucleo e polipeptidi mitocondriali (Fontanesi *et al.*, 2006)

1.1.8 Le altre funzioni dei mitocondri

Oltre a produrre energia chimica, i mitocondri svolgono un ruolo importante nel metabolismo dei lipidi e dei fosfolipidi. Partecipano, insieme al reticolo endoplasmatico liscio, alla biosintesi degli ormoni steroidei ed è stato attribuito loro un ruolo essenziale nella gluconeogenesi e nel metabolismo degli

amminoacidi. Inoltre i mitocondri sono coinvolti nei meccanismi che presiedono alla morte cellulare programmata (apoptosi) e alla senescenza cellulare. Sono inoltre considerati come dei grossi serbatoi capaci di accumulare e concentrare varie sostanze. Il fenomeno più importante è rappresentato dall'accumulo di cationi (Na^+ , K^+ , Mg^{++} e soprattutto Ca^{++}) all'interno della matrice. Gli ioni Ca^{++} possono concentrarsi nei mitocondri fino a superare di centinaia di volte i valori normali, formando talora depositi cristallini di fosfato di calcio. La capacità dei mitocondri di concentrare ioni Ca^{++} nella matrice mitocondriale contribuisce a mantenere molto bassa la concentrazione citoplasmatica di questo ione (inferiore a 10^{-7} M) permettendo in questo modo di regolare vari aspetti della funzione cellulare.

1.1.9 Ruolo dei Mitocondri nell'apoptosi

L'apoptosi è un processo in cui una serie di proteasi a cisteina vengono attivate attraverso una complessa cascata di segnali in modo tale che il DNA nucleare delle cellule venga degradato, portando a morte cellulare. Molti componenti mitocondriali giocano un ruolo fondamentale nella cascata di segnali. L'evento chiave iniziale è il rilascio del citocromo *c* dal sito di legame sulla faccia esterna della membrana mitocondriale interna e la sua liberazione nel citosol (Liu *et al.*, 1996; Zamzami *et al.*, 1998).

Osservazioni su mitocondri isolati hanno suggerito che, in condizioni di carenza di ATP, di alte concentrazioni citosoliche di calcio, o di un incremento nella produzione di radicali liberi (ROS), il traslocatore di nucleotidi adeninici (ANT) della membrana mitocondriale interna va incontro a cambiamenti

conformazionali che provocano una variazione del potenziale di membrana ($\Delta\psi$) e del gradiente di pH (ΔpH) (Shimizu *et al.*, 1999; Hengartner, 2000). Ciò porta probabilmente ad una modificazione della permeabilità della membrana mitocondriale o all'apertura di pori mitocondriali transitori (mitochondrial permeability transition pore, MPTP), che consentono il rilascio del citocromo *c* (Zamzami *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1999; Hengartner, 2000), di AIF (*apoptosis initiating factor*), e della proteina DIABLO nell'ambiente citosolico. DIABLO impedisce ad un gruppo di proteine inibitrici dell'apoptosi (IAP) di inibire l'attivazione della caspasi 3.

Il rilascio del citocromo *c* può essere indotto, inoltre, dal legame del gruppo di proteine Bax (Bid, Bax, Bad) alla membrana mitocondriale esterna (Shimizu *et al.*, 1999; Hengartner, 2000).

Il citocromo *c* successivamente si combina con un fattore citosolico, Apaf-1, per attivare la caspasi 9 (Mignotte and Vayssiere, 1998; Hengartner, 2000). Quest'ultima agisce a livello della pro-caspasi 3 promovendo un taglio che permette il rilascio della caspasi 3 attiva e questa, a sua volta, attiva CAD (caspase activated DNAase). Tutte queste specie attivate, insieme ad AIF, concorrono alla condensazione nucleare e alla frammentazione del DNA (Li *et al.*, 1995; Mignotte e Vayssiere, 1998; Vander Heiden *et al.*, 1999; Hengartner, 2000).

L'attivazione della caspasi 3 può avvenire anche indipendentemente da quanto su illustrato, qualora siano coinvolti il fattore TNF (tumor necrosis factor) e altri fattori sierici (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997). Questi, infatti, attivano la caspasi 8 che, operando un taglio a livello di Bid p22, permette il rilascio di Bid

p15, coinvolta direttamente nel rilascio del citocromo *c*.

Le proteine anti-apoptotiche, Bcl-2 e Bcl-XL, possono legare le proteine pro-apoptotiche Bax e Bad, quando quest'ultime sono in eccesso, e prevenire così il rilascio del citocromo *c*. La quantità di Bax relativa a Bcl-2 è controllata da un numero di fattori, tra i quali la fosforilazione di Bcl-2, ma soprattutto la trascrizione indotta da p53 di nuovi monomeri di Bax (Hengartner, 2000) (**Figura 4**).

La figura riassume i passaggi intramitocondriali e citoplasmatici che conducono alla morte cellulare programmata. (da Hengartner, 2000).

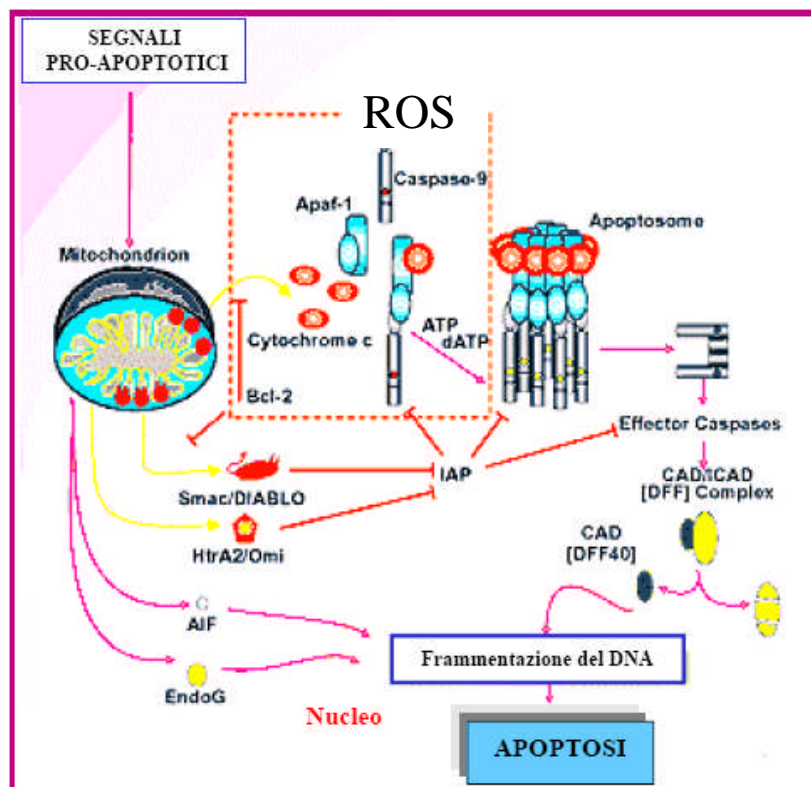


Figura 4 - Il ruolo dei mitocondri nell'apoptosi.

1.2 LA GENETICA MITOCONDRIALE

L'esistenza di un DNA genomico mitocondriale (mtDNA) è spiegata attraverso l'ormai largamente accettata teoria endosimbiotica. Durante il corso del tempo, alcuni geni del batterio ancestrale sono stati trasferiti dal mitocondrio al genoma nucleare, e questo spiegherebbe perché tutte le proteine necessarie per la replicazione del mtDNA, così come quelli necessari per la sua trascrizione e traduzione sono codificati dal nucleo.

La prima ed importante indicazione della presenza di piccole quantità di DNA nei mitocondri è stata ottenuta nel 1956 da Chèvremont con metodi citochimici, ma soltanto dopo il 1963 ne è stata provata definitivamente la presenza mediante metodi biochimici ed ultrastrutturali. Negli anni successivi il DNA mitocondriale umano è stato oggetto di intensi studi che hanno completamente delucidato la sua sequenza genica (Anderson *et al.*, 1981), chiarendo anche le caratteristiche generali della sua modalità di espressione (Attardi *et al.*, 1989).

1.2.1 Struttura, organizzazione e contenuto genico del mtDNA umano

Il DNA mitocondriale presenta caratteristiche diverse da quelle del DNA nucleare e simili a quello batterico. Infatti, all'interno dell'organello, l'mtDNA è organizzato in aggregati chiamati "nucleoidi", che ricordano da vicino l'organizzazione del nucleoide batterico, necessario alla cellula procariote per una corretta ripartizione del patrimonio genico durante la

divisione cellulare. Ognuno di essi risulta formato da 1-10 copie di mtDNA (Sato e Kuroiwa, 1991; Iborra *et al.*, 2004) associati con proteine di natura differente, che includono TFAM (che agisce sia da fattore di trascrizione che da proteina di impacchettamento del mtDNA), l'aconitasi (nel lievito), la polimerasi D₂, le proteine che legano l'mtDNA a singolo filamento, l' α -chetoadido deidrogenasi (nel lievito) e l'elicasi mitocondriale Twinkle (Chen e Butow, 2005; Wang e Bogenhagen, 2006). La loro distribuzione è uniforme attraverso la rete della matrice mitocondriale (Capaldi *et al.*, 2002).

Due modelli sono stati proposti per spiegare le modalità di trasmissione dell'mtDNA attraverso i nucleoidi: il primo modello, proposto da Jacobs *et al.* (2000), è a favore di nucleoidi statici, che replicano solo ed esclusivamente il proprio contenuto genico, senza mai scambiarlo reciprocamente (modello del "nucleoide statico").

D'Aurelio *et al.*, (2004) sostengono invece che i nucleoidi sono soggetti ad un continuo rimodellamento, dovuto ad un'organizzazione dinamica che permette loro di scambiarsi liberamente l'mtDNA (modello "dinamico del nucleoide").

Gilkerson *et al.*, (2008) hanno recentemente portato prove a favore di quest'ultimo modello, attraverso studi di fusione e complementazione tra nucleoidi provenienti da backgrounds genetici differenti. Le due popolazioni eterologhe di nucleoidi riescono a ripristinare una corretta sintesi proteica mitocondriale, mantenendo però la loro autonomia genetica.

Questi risultati dimostrano che, sebbene i nucleoidi siano in grado di migrare liberamente all'interno della matrice mitocondriale (Okamoto *et al.*,

1998; Iborra *et al.*, 2004; Legros *et al.*, 2004) non scambiano mai il loro genoma, assumendo un comportamento in linea con il modello “statico” di Jacobs. I nucleoidi vengono ereditati fedelmente come entità genetiche separate, permettendo quindi di ipotizzare anche possibili strategie future terapie per l’eliminazione terapeutica di mutazioni deleterie del mtDNA.

Il mtDNA umano è costituito da una molecola circolare a doppia elica (filamento H e filamento L) di 16569 paia di basi (bp); non è organizzato in una struttura cromosomica e non è associato ad istoni o ad altre proteine. Ogni cellula umana contiene un numero compreso fra poche dozzine fino a diverse migliaia di molecole di mtDNA, in relazione al fabbisogno energetico dei vari tipi di cellule. La caratteristica principale del mtDNA umano è la sua organizzazione estremamente compatta, in cui, tranne un breve segmento intorno all’origine di replicazione, privo di geni, tutte le sequenze codificanti sono contigue tra loro e prive di introni. Alcuni geni mostrano sequenze codificanti parzialmente sovrapposte: ATPasi-ATPasi8 e ND4-ND4L hanno in comune rispettivamente una regione di 16 e 7 bp. Quasi tutti i geni non contengono porzioni laterali non tradotte e la maggior parte di essi manca di una tripletta di terminazione completa, che viene poi generata solo durante la poliadenilazione post-trascrizionale dell’mRNA.

Entrambi i filamenti del DNA mitocondriale sono codificanti. Vengono denominati “catena pesante” (filamento H) e “catena leggera” (filamento L) in base alla diversa composizione in basi puriniche (di cui è più ricco il filamento H) ed in basi pirimidiniche (di cui è più ricco il filamento L). Il DNA mitocondriale umano contiene **37** geni: i geni per i due RNA ribosomiali (12S e 16S rRNAs), i

geni per 22 RNA transfer (tRNAs), e i geni per 13 polipeptidi (mRNAs) che costituiscono alcune delle subunità di quattro dei cinque complessi della catena respiratoria mitocondriale. Sette polipeptidi fanno parte del Complesso I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6); uno fa parte del Complesso III (cyt b); tre del Complesso IV (COXI, COXII e COXIII) e due del Complesso V (ATPasi 6 e ATPasi 8). Le restanti subunità della catena respiratoria sono codificate dal DNA nucleare (nDNA) ed importate ed assemblate nei mitocondri tramite sequenze segnale ammino-terminali riconosciute dai recettori della membrana mitocondriale esterna. I geni sono distribuiti asimmetricamente nel mtDNA; la maggior parte di essi sono trascritti dal filamento pesante (H), includendo i geni dei due rRNA, i geni di 14 tRNA e i geni codificanti 12 proteine. I geni per i restanti otto tRNA e per la tredicesima proteina (ND6) sono trascritti dal filamento leggero (L).

La regione priva di geni vicino all'origine della replicazione (pari al 5-7% dell'intero mtDNA) viene generalmente chiamata "D-loop" ("displacement loop" o "ansa di spiazzamento"). E' la principale regione di regolazione del genoma mitocondriale umano; è lunga circa 1kb ed è compresa tra due geni per i tRNA (tRNAPhe e tRNAPro).

Essa contiene l'origine di replicazione del filamento pesante (OH) ed i promotori della trascrizione sia del filamento pesante (PH) che di quello leggero (PL) (**Figura 5**).

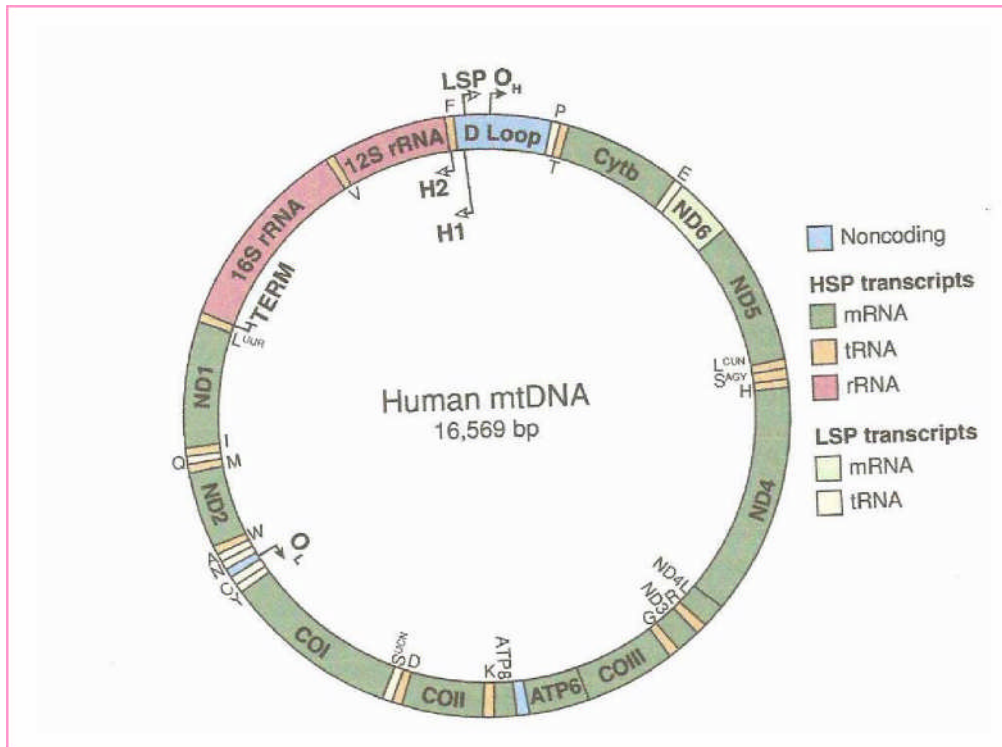


Figura 5- Mappa del mtDNA umano (da Falkenberg et al., 2007)

I promotori PH e PL danno inizio alla trascrizione delle rispettive catene e producono dei lunghi trascritti policistronici. L'origine di replicazione del filamento leggero (OL) coincide invece con una regione di circa 30 nucleotidi all'interno di un gruppo di quattro geni per i tRNA ($tRNA^{Ala}$, $tRNA^{Asn}$, $tRNA^{Cys}$, $tRNA^{Tyr}$), distante da OH per circa due terzi della lunghezza dell'intero mtDNA. Un'altra peculiarità del DNA mitocondriale umano è la distribuzione in maniera sparsa dei geni dei tRNA, che separano in maniera regolare i geni per gli rRNA e i geni per le proteine. I tRNA così distribuiti hanno una funzione di segnale per gli enzimi che processano i lunghi mRNA policistronici, dando origine agli mRNA maturi.

1.2.2 Espressione genica

Replicazione

Le cellule dei mammiferi contengono migliaia di molecole di mtDNA e la loro replicazione è indipendente da quella del DNA nucleare.

La replicazione del mtDNA ha luogo nella matrice mitocondriale, indipendentemente dalla fase del ciclo cellulare e dalla replicazione del DNA nucleare (Bogenhagen and Clayton, 1977). Questo processo avviene con maggiore frequenza nelle molecole localizzate in prossimità del nucleo rispetto a quelle della periferia citoplasmatica. L'allungamento e la maturazione dei filamenti figli avviene ad opera della polimerasi D γ (POL γ), l'unica DNA polimerasi presente nei mitocondri (Bolden et al., 1977). L'enzima è costituito in tutti i vertebrati da due subunità, "A" e "B", entrambe essenziali per il mantenimento del mtDNA (Spelbrink et al., 2000). La subunità catalitica più grande, "A", ha sia attività di sintesi (in direzione 5'→3') che attività esonucleasica (in direzione 3'→5') (Longley et al., 2001). La subunità catalitica più piccola, "B", (30-54 kDa) è invece coinvolta nel riconoscimento e nel processamento dell'innesco di RNA (Carrodeguas et al, 1999; Fan et al, 1999; Lim et al, 1999); tale subunità accessoria avrebbe però anche altri ruoli importanti: aumentare l'affinità di legame dell'oloenzima ai nucleotidi, e incrementare la processività dello stesso (Kaguni et al., 2004). POL γ nei mammiferi si organizza a formare un eterotrimerico del tipo POL γ AB2 (Fan et al., 2006).

Sono stati caratterizzati inoltre, diversi fattori transagenti, coinvolti nel

processo di replicazione del mtDNA. Tra questi, le topoisomerasi mitocondriali (I e II) hanno la funzione di rilassare i superavvolgimenti del mtDNA (Castora et al., 1985; Kosovsky e Soslau, 1993). L'elicasi mitocondriale ATP - dipendente (twinkle), si lega al DNA sottoforma di esamero e rompe i legami idrogeno tra i due filamenti di DNA. Essa determina lo svolgimento della doppia elica e garantisce alla polimerasi DŽ un template a filamento singolo (Spelbrink et al., 2001). La necessità di lavorare sul DNA a filamento singolo richiede la presenza di proteine che lo mantengano in questa forma. Nei mitocondri tutto ciò è svolto da un pool specializzato di “ single-strand binding protein”: le mtSSB. Esse si legano in maniera cooperativa al DNA, formando dei tetrameri che coprono ciascuno 50-70 nucleotidi (Kaguni et al., 2004). Possiamo quindi affermare che il macchinario di replicazione mitocondriale, nella sua forma minimalista è formato da: POL γ , dall'elicasi e dalle mtSSB.

L'elicasi svolge il duplex di DNA muovendosi in direzione 5'→3'. Le proteine mtSSB stabilizzano la conformazione non avvolta e stimolano la sintesi del DNA agendo sull'enzima POL γ . (Da Falkenberg et al., 2007) POL γ e l'elicasi insieme costituiscono la componente processiva; in assenza delle mtSSB esse arrivano a sintetizzare frammenti non più lunghi di 2Kb; la presenza delle mtSSB invece stimola l'attività di sintesi permettendo la formazione di frammenti di 16Kbp, che corrispondono all'intera lunghezza del mtDNA umano.

La replicazione del mtDNA avviene in maniera piuttosto insolita. Coinvolge due origini di replicazione, unidirezionali ed indipendenti, una per

la catena pesante (OH) ed una per la catena leggera (OL), situate in posizioni specifiche sulla molecola di DNA e distanziate da due terzi del genoma. La sintesi del DNA a partire da OH procede spostando il filamento pesante parentale. Il filamento H nascente frequentemente termina 700 bp a valle di OH, generando il cosiddetto 7S DNA. Questa terminazione precoce, produce una caratteristica struttura a triplo filamento chiamata D-loop (Clayton et al., 1991). L'inizio della replicazione del filamento H richiede primers di RNA, originati dalla trascrizione del filamento L e che funzionano da innesco per la DNA polimerasi γ . Il processo di replicazione coinvolge sia elementi cis-agenti che fattori trans-agenti implicati nella trascrizione dell'RNA (Clayton, 1992). Le sequenze CSBs (conserved sequence blocks) e le sequenze TASs (termination-associated sequences) sono elementi cis-agenti, localizzati all'interno del "D-loop" ed estremamente conservati in tutti i vertebrati, che partecipano al processo di replicazione. Le CSBs si localizzano a valle dell'LSP e nei vertebrati sono tre: CSBI, CSBII e CSBIII (Walberg *et al.*, 1983); in particolare il ruolo di CSBII sarebbe quello di aumentare la stabilità dell'eterodimero RNA/DNA al momento dell'inizio della replicazione (Xu et al., 1995). Le sequenze CSBs vengono riconosciute da uno specifico fattore di trascrizione mitocondriale (mtTFA) e partecipano alla formazione dei primer di RNA. Le sequenze TASs sono regioni di circa 15 bp localizzate al 3' del D-loop nascente; al loro livello si arresta la sintesi del filamento di DNA che ha dato origine al "D-loop". Proteine di 48kDa d'identità sconosciuta si riconoscono e legano le sequenze TAS, promuovendo la formazione del D-loop (Madsen et al., 1993).

L'RNA polimerasi mitocondriale, responsabile dell'inizio della replicazione del filamento H, sintetizza l'innesco di RNA che viene in un secondo momento rimosso dalla RNasi MRP (Shadel e Clayton, 1997). La DNA primasi mitocondriale è coinvolta nel processo di inizio di replicazione del filamento L e sembra contenere una componente di RNA fondamentale per la sua attività (Wong e Clayton, 1986). Inoltre, la presenza di proteine che si legano al mtDNA a singolo filamento (mtSSB) mantiene l'integrità di queste regioni, impedendone la rinaturazione e l'interazione con nucleasi, incrementando l'attività e l'accuratezza della polimerasi DŽ (Hoke *et al.*, 1990; Farr *et al.*, 1999).

La replicazione completa del mtDNA può essere riassunta in quattro fasi fondamentali (**Figura 6**)

1) A livello dell'origine di replicazione per la catena pesante (OH), all'interno dell'ansa D, la DNA polimerasi DŽ inizia la sintesi di un filamento di DNA utilizzando come stampo il filamento L allungando l'innesco di RNA generato dalla mtRNA polimerasi.

2) Il neofilamento di DNA, sintetizzato in senso orario, "spiazza" sempre di più il filamento H fino a raggiungere l'origine di replicazione OL, necessaria per la sintesi della catena leggera.

3) Dall'origine di replicazione OL, in senso antiorario, inizia la sintesi del filamento L attorno al filamento H. La sintesi del filamento pesante viene completata quando la sintesi del filamento leggero è solo ad un terzo del suo cammino. Si genera in questo modo un cerchio duplex completo ed un cerchio in cui un tratto di uno dei due filamenti è incompleto.

4) Dopo che è stata completata la sintesi di entrambi i filamenti si formano

due circoli concatenati che vengono poi tagliati e richiusi così da formare due molecole figlie di mtDNA.

Secondo questo modello la replicazione del DNA mitocondriale è bidirezionale, asincrona ed entrambi i filamenti sono replicati in modo continuo.

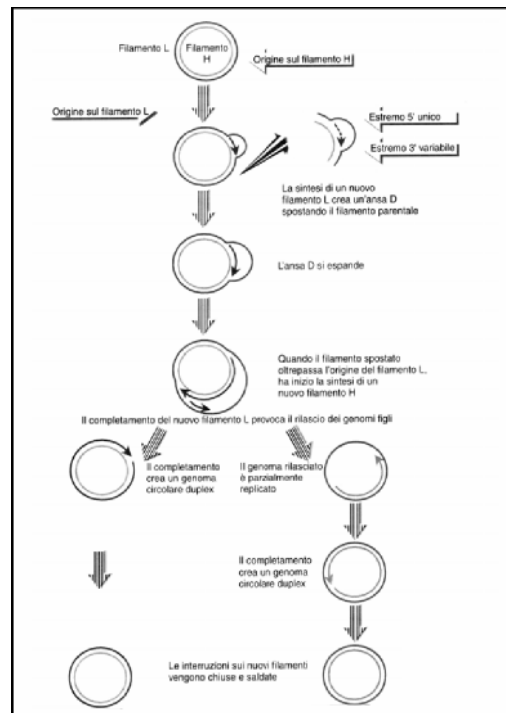


Figura 6 - Meccanismo di replicazione dell' mtDNA. (Russel 1998)

Recentemente sono stati proposti due nuovi modelli di replicazione del mtDNA. Secondo la prima teoria la replicazione ha inizio in siti multipli a valle di OH e procede con la formazione di una forza replicativa che si arresta in prossimità di OH. Nella forza replicativa il filamento H (filamento “guida”) viene replicato in modo continuo, mentre la replicazione del filamento L (filamento “ritardato”) coinvolge la sintesi discontinua di piccoli frammenti di Okazaki con l’incorporazione di molti nucleotidi (Yang *et al.*, 2002; Bowmaker *et al.*, 2003).

Il secondo modello di replicazione si basa sulla scoperta di una nuova origine di replicazione in posizione 57 all'interno del "D-loop". Sembra che questa nuova origine sia responsabile del mantenimento del mtDNA in condizioni di stato stazionario. Contrariamente alle altre origini di replicazione, infatti, caratterizzate da una terminazione prematura della sintesi all'estremità 3' del "D-loop", che portano alla sintesi del DNA 7S, le catene di mtDNA nascenti dall'origine in posizione oltrepassano questo punto di controllo portando alla sintesi di una catena di mtDNA completa (Fish *et al.*, 2004).

Trascrizione

Il compatto genoma mitocondriale umano manca di introni e l'unica regione non codificante contiene gli elementi di controllo della trascrizione e della replicazione del mtDNA (Shadel *et al.*, 1997). Nelle cellule umane ogni filamento contiene una singola regione del promotore per dare inizio alla trascrizione: il promotore della catena leggera (**Light-Strand Promoter = LSP**) e il promotore della catena pesante (**Heavy-Strand Promoter = HSP**).

La trascrizione a partire dai promotori mitocondriali produce degli RNA policistronici, che abbracciano tutte le informazioni genetiche codificate da ciascun filamento. Questi trascritti primari vengono poi processati per produrre singoli molecole di mRNA, rRNA e tRNA (Clayton *et al.*, 1991). Esiste un solo sito iniziale di trascrizione per la catena leggera da cui origina un enorme trascritto destinato a produrre il mRNA per la subunità ND6 della NADH-deidrogenasi e gli otto tRNA codificati da questa catena (Attardi, 1986). La trascrizione della catena pesante coinvolge, invece, due siti estremamente

ravvicinati che danno luogo ad altrettanti tipi di trascritti, sintetizzati in proporzioni diverse. Il promotore situato più a monte (H1), il più attivo, è localizzato 16bp prima del tRNA^{Phe} ed è deputato alla sintesi degli rRNA e di due tRNA (tRNA^{Phe} e tRNA^{Val}) in forma di un trascritto che termina al confine tra il 3' del gene per l' rRNA 16S ed il gene per il tRNA^{Leu}(UUR). Il promotore situato più a valle (H2), funzionalmente meno attivo, si localizza al 5' del gene per l'rRNA 12s e controlla la sintesi di un enorme trascritto policistronico che comprende tutti gli altri tRNA e gli mRNA codificati dal filamento H (Montoya *et al.*, 1983). Ogni proteina e ogni rRNA è immediatamente fiancheggiato da almeno un gene per i tRNA. L'escissione delle molecole di tRNA è necessario per produrre molecole di rRNA e mRNA mature. Il folding dei tRNA probabilmente rappresenta un substrato idoneo al riconoscimento e al taglio ad opera dell'RNasi P mitocondriale e di altre RNasi non identificate. Questo modello di processamento dell'RNA è conosciuto con il nome di "tRNA punctuation" (Ojala *et al.*, 1981).

La trascrizione del genoma mitocondriale prevede la presenza di una RNA-polimerasi mitocondriale (POLRMT) formata da una sola subunità, grande 1230 amminoacidi, che viene sintetizzata nel citoplasma e poi successivamente importata nei mitocondri (Masters *et al.*, 1987). POLRMT da sola non è in grado di riconoscere il promotore e richiede perciò l'assistenza del fattore di trascrizione mitocondriale A (TFAM) e di uno dei due fattori di trascrizione mitocondriale B (TFB1M e TFB2M) (Falkenberg *et al.*, 2002; McCulloch *et al.*, 2002). Sia TFB1M che TFB2M sono in grado di formare un eterodimero con POLRMT: TFB1M/POLMRT o TFB2M/POLMRT (Falkenberg *et al.*, 2002); TFAM invece

può legare, svolgere e piegare il DNA introducendo alterazioni strutturali specifiche nella molecola dell' mtDNA (Fisher et al., 1992). E' ragionevole pensare che il riconoscimento del promotore e l'inizio della trascrizione avvenga secondo questa modalità: TFAM legherebbe e piegherebbe l' mtDNA introducendo uno svolgimento parziale nella sequenza del promotore; questo permetterebbe a TFB2M di legarsi al ssDNA, reclutando sul promotore la POLMRT ed evitando la formazione di eterodimeri RNA/DNA che bloccherebbero la trascrizione sul promotore. L'interazione con TFB2M o con TFB1M da parte di TFAM contribuirebbe quindi a richiamare in sede il macchinario della trascrizione mitocondriale (McCulloch *et l.*, 2003).

Ci sono tre unità trascrizionali mitocondriali (quella che inizia su H1, quella su H2 e quella su LSP), ma solo l'unità che viene avviata a partire da H1 presenta un sito di terminazione ben stabilito, localizzato alla fine dell'rRNA 16S.

La terminazione della trascrizione in questo sito richiede l'attività di uno specifico fattore di terminazione della trascrizione, chiamato mTEFR. Esso è una proteina di 39kDa che si lega specificamente ad una sequenza di 28-bp al 3' del gene per il tRNA^{Leu}(UUR) (Fernandez-Silva et al., 1997). Una mutazione nel sito di legame di mTERF sono associate nell'uomo con una malattia conosciuta come MELAS. La mutazione provoca una riduzione dell'affinità di legame con mTERF, senza però cambiare il rapporto tra i trascritti H1/H28 (Chomyn et al., 1992).

Per quanto riguarda il sito di terminazione per il trascritto H2, ne è stato identificato uno immediatamente a monte del gene per il tRNA^{Phe}. Due proteine di 45 e 70 kDa sono state associate con questa regione ma la loro identità non è stata ancora chiarita (Camasamudram et al., 2003) La terminazione della trascrizione sul

filamento L non è stata ancora studiata in dettaglio, si sa però che la sintesi di questo trascritto più breve, comprendente gli rRNA, ha un tasso di trascrizione venticinque volte superiore rispetto all'altro trascritto policistronico, comprendente l'intera lunghezza del genoma. In questa maniera il pool di rRNA viene arricchito a spese degli mRNA. Questo tipo di trascrizione è coerente con il maggior fabbisogno di molecole di rRNA 12S e 16S durante la sintesi proteica.

Processamento dell'RNA

Il processamento del RNA è un processo che implica almeno quattro attività enzimatiche. Le prime due consistono nel taglio endonucleotidico, all'interno dei trascritti primari, delle estremità 5' e 3' dei tRNA che, localizzati strategicamente in modo da separare tra loro tutti gli altri geni, funzionano come segnali per lo spezzettamento dei nastri policistronici.

In primo luogo si verifica il taglio endonucleotidico all'estremità 5' del tRNA, ad opera di una RNasi P mitocondriale, molto simile a quella batterica (Doersen et al., 1985; Puraman e Attardi, 2001). Successivamente viene tagliata anche l'estremità 3' del tRNA, ad opera di una RNasi Z, un enzima della famiglia ELAC (Shiffer et al., 2002). Gli rRNA ed i vari mRNA prodotti dal taglio dei trascritti primari vengono poi modificati mediante l'addizione alla loro estremità 3' di una sequenza breve (da 1 a 10 nucleotidi), nel caso degli rRNA, o lunga (fino a 55 nucleotidi), nel caso degli mRNA, di residui di A (Dublin et al., 1982). La poliadenilazione degli RNA implica l'esistenza di un'attività poli(A)polimerasica mitocondriale, che gioca un ruolo importante nel rendere più stabili le molecole di RNA ed in molti casi contribuisce alla formazione dei codoni di stop di alcuni mRNA

(Ojala et al., 1981). Invece, una nucleotidiltransferasi mitocondriale, catalizza l'aggiunta della sequenza – CCA all'estremità 3' delle molecole di tRNA (Deutscher e McGann, 1982), completandone quindi la maturazione e rendendole pronte a svolgere la propria funzione durante la sintesi proteica. I tRNA maturi, infatti, vengono riconosciuti da specifiche amminoacil-tRNA sintetasi mitocondriali che esterificano l'estremità 3' del tRNA con l'amminoacido corrispondente.

Le amminoacil-tRNA sintetasi sono codificate dal genoma nucleare ed importate successivamente nei mitocondri. La maggior parte di esse, pur presentando un elevato grado di omologia con i corrispondenti enzimi citoplasmatici, è codificata da geni diversi da quelli che specificano le amminoacil-tRNA sintetasi citoplasmatiche.

Regolazione dell'espressione genica

E' stato provato che l'espressione dei geni codificati dall'mtDNA è costitutiva (Attardi e Schatz, 1988). Tuttavia nei mammiferi sono stati riportati casi in cui si sono verificati cambiamenti nei livelli di espressione degli mRNA, relativamente ai diversi stadi dello sviluppo (LoguercioPolosa e Attardi, 1991), all'invecchiamento (Fernández-Silva *et al.*, 1991), alla richiesta energetica (Martin *et al.*, 1993) o ai livelli ormonali (Weber *et al.*, 2002)

La variabilità della richiesta energetica tra i vari tipi cellulari e nelle diverse condizioni fisiologiche influisce sulla biogenesi mitocondriale, il cui sistema di controllo, che non è stato ancora completamente chiarito, richiede la partecipazione e la coordinazione dei genomi nucleare e mitocondriale.

I geni nucleari codificano due tipi di fattori: attivatori e coattivatori. Gli attivatori sono fattori di

trascrizione (es. NRF-1, NRF-2, Sp-1, CREB etc). I coattivatori sono fattori nucleari (es. PGC-1, PRC) che interagiscono con i fattori di trascrizione legati al DNA ed intervengono nella regolazione dell'espressione genica in risposta a segnali fisiologici, termici e nella proliferazione cellulare (Wu *et al.*, 1999; Andersson and Scarpulla, 2001; Carmona *et al.*, 2002). I siti di riconoscimento per NRF-1, NRF-2 e Sp-1 si trovano in corrispondenza di molti geni nucleari che codificano subunità della catena respiratoria, fattori di trascrizione e replicazione mitocondriali, enzimi coinvolti nella via biosintetica dell'eme ed implicati nel processo di importazione delle proteine all'interno del mitocondrio (Scarpulla, 1997; 2002). considerato che le 13 proteine codificate dal genoma mitocondriale sono altamente idrofobiche (sono costituite per il 60% da amminoacidi aromatici o alifatici), alcune amminoacil-tRNA (es. Ser-tRNA^{Ser}, Thr-tRNA^{Thr} e Leu-tRNA^{Leu}) sono richieste ad un livello maggiore di stato stazionario rispetto ad altre (es. Cys-tRNA^{Cys}) coerentemente con la relativa importanza funzionale di ciascun tRNA. Il fattore di traduzione EF-Tu (Elongation Factor), infine, trasferisce l'amminoacil-tRNA neoformato sul ribosoma dove ha luogo la traduzione del mRNA.

Traduzione

L'apparato di traduzione mitocondriale umano comprende ribosomi specifici 55S, 22 specie di tRNA, un gruppo di amminoacil tRNA sintetasi specifiche e fattori di iniziazione e di allungamento. I ribosomi 55S sono costituiti da una subunità 39S e da una subunità 28S, che contengono rispettivamente rRNA 16S e 12S, codificati dal mtDNA, e vari tipi di proteine codificate dal nucleo. Gli rRNA mitocondriali si differenziano da quelli nucleari per alcune peculiarità: sono metilati, sono più piccoli di quelli citoplasmatici o batterici ed hanno una corta coda di poliA all'estremità 3'. Anche i tRNA mitocondriali hanno caratteristiche strutturali e funzionali che li distanziano da quelli nucleari: hanno dimensioni minori (59-75 nucleotidi), hanno il "loop DHC" estremamente variabile ed in alcuni casi assente (tRNA^{Ser}(AGY)) (Arcari e Brownlee, 1980; Bruijn *et al.*,

1980), sono soggetti ad un numero inferiore di modificazioni post-trascrizionali, alcune delle quali peculiari dei tRNA mitocondriali (es. la metilazione di residui di taurina in posizione U34 del tRNA^{Leu}(UUR) e del tRNA^{Lys}). Inoltre, come descritto in precedenza, funzionano anche come segnali per lo spezzettamento dei nastri policistronici ed alcuni di essi contengono sequenze di regolazione che legano fattori specifici (es. mtTERF).

Il codice genetico e lo schema di riconoscimento delle triplette utilizzato dai mitocondri sono atipici (Attardi, 1986). Nella Tabella I sono riassunte le differenze tra il codice genetico universale e quello mitocondriale.

CODONE	CODICE MITOCONDRIALE	CODICE UNIVERSALE
UGA	TRIPTOFANO	STOP
AUA	METIONINA	ISOLEUCINA
AGA	STOP	ARGININA
AGG	STOP	ARGININA
AUG	METIONINA	METIONINA

Tabella I

Risulta evidente l'esistenza di due codoni specifici per la Metionina (nel codice universale codificata solo dalla tripletta AUG) e due codoni specifici per il Triptofano (nel codice universale codificato solo da UGG), uno dei quali in sostituzione di un codone di STOP. Infine, i codoni di terminazione nel codice mitocondriale sono specificati da quattro triplette diverse (in luogo delle tre triplette del codice universale) in seguito alla diversa lettura di due codoni per l'Arginina in codoni di STOP.

Un'altra caratteristica peculiare del genoma mitocondriale umano è l'atipicità nello schema di riconoscimento da parte delle varie triplette che costituiscono i codoni nel mRNA e gli anticodoni nei tRNA. Secondo il fenomeno del "vacillamento" infatti, alcuni tRNA possono leggere fino a tre codoni diversi e nel citoplasma sono presenti 32 tRNA per 61 codoni senso. Quindi, se un amminoacido è specificato dalle prime due basi del codone, indipendentemente dalla terza base, i quattro codoni possibili possono venir letti da due tRNA diversi (uno per le basi puriniche ed uno per quelle pirimidiniche). In alcuni tRNA mitocondriali, invece, l'interazione tra codoni e anticodoni coinvolge solamente due basi su tre, così che ciascuno degli otto gruppi di quattro codoni per amminoacido avrà un solo tRNA mitocondriale specifico, invece di due come avviene per il codice genetico universale. Il risultato di questo vacillamento esteso, insieme alla presenza di un solo tRNAMet (che specifica sia la Metionina che la N-formilmetionina) e di due codoni per l'Arginina letti come codoni di terminazione, riduce a 22 il numero totale dei tRNA mitocondriali.

Regolazione dell'espressione genica

E' stato provato che l'espressione dei geni codificati dall'mtDNA è costitutiva (Attardi e Schatz, 1988). Tuttavia nei mammiferi sono stati riportati casi in cui si sono verificati cambiamenti nei livelli di espressione degli mRNA, relativamente ai diversi stadi dello sviluppo (Loguercio-Polosa e Attardi, 1991), all'invecchiamento (Fernández-Silva *et al.*, 1991), alla richiesta energetica (Martin *et al.*, 1993) o ai livelli ormonali (Weber *et al.*, 2002)

La variabilità della richiesta energetica tra i vari tipi cellulari e nelle

diverse condizioni fisiologiche influisce sulla biogenesi mitocondriale, il cui sistema di controllo, che non è stato ancora completamente chiarito, richiede la partecipazione e la coordinazione dei genomi nucleare e mitocondriale.

I geni nucleari codificano due tipi di fattori: attivatori e coattivatori. Gli attivatori sono fattori di trascrizione (es. NRF-1, NRF-2, Sp-1, CREB etc). I coattivatori sono fattori nucleari (es. PGC-1, PRC) che interagiscono con i fattori di trascrizione legati al DNA ed intervengono nella regolazione dell'espressione genica in risposta a segnali fisiologici, termici e nella proliferazione cellulare (Wu et al., 1999; Andersson and Scarpulla, 2001; Carmona et al., 2002). I siti di riconoscimento per NRF-1, NRF-2 e Sp-1 si trovano in corrispondenza di molti geni nucleari che codificano subunità della catena respiratoria, fattori di trascrizione e replicazione mitocondriali, enzimi coinvolti nella via biosintetica dell'eme ed implicati nel processo di importazione delle proteine all'interno del mitocondrio (Scarpulla, 1997; 2002).

1.2.3 Principi di genetica mitocondriale

Come è stato descritto precedentemente, il DNA mitocondriale possiede una genetica specifica che si riflette anche nella diversa modalità di trasmissione, oltre che in altre differenze con il genoma nucleare riassunte di seguito.

POLIPLASMIA. In ciascuna cellula vi sono numerosi mitocondri, ognuno dei quali contiene molte copie di mtDNA (da 2 a 10); così, mentre i geni nucleari sono rappresentati ciascuno da due alleli (uno di origine paterna ed uno di origine

materna), ciascuna cellula contiene centinaia o migliaia di geni mitocondriali.

OMOPLASMIA/ETEROPLASMIA. Nei tessuti normali tutte le molecole di mtDNA sono identiche, una situazione nota come *omoplasma*. Tuttavia, l'insorgenza di una mutazione nel mtDNA può determinare una condizione nota come eteroplasma, caratterizzata dalla coesistenza nella stessa cellula di due popolazioni di mtDNA cioè una contenente DNA normale (wild-type) e una contenente DNA mutato. Solitamente i polimorfismi o le mutazioni silenti sono omoplasmiche, mentre le mutazioni patogenetiche sono eteroplasmiche.

SEGREGAZIONE MITOTICA. Ogni volta che una cellula eteroplasmica si divide, copie di mtDNA mutato e wild-type si distribuiscono in maniera casuale alle cellule figlie (Wallace *et al.*, 1988). Pertanto, dopo molte divisioni mitotiche o meiotiche la percentuale del mtDNA mutato può cambiare e ne possono risultare cellule che contengono solo genomi normali o solo genomi mutati (omoplasma). Le variazioni nelle percentuali delle due popolazioni di mtDNA possono risultare in uno spettro continuo di difetti dell'OXPHOS la cui funzionalità è strettamente collegata alla percentuale di mtDNA mutato.

EREDITÀ MATERNA. La trasmissione dell'informazione genetica mitocondriale non segue le leggi di Mendel, valide per il patrimonio genetico nucleare, organizzato in geni allelici. Infatti i mitocondri dello zigote, e quindi il suo DNA mitocondriale, derivano dall'oocita. I pochi mitocondri provenienti dallo spermatozoo che riescono a penetrare nell'oocita durante la fecondazione vengono attivamente eliminati attraverso un meccanismo ubiquitinadipendente (Sutovsky *et al.*, 1999; 2000). La madre trasmette il proprio mtDNA alla discendenza e solo le

figlie trasmettono il loro mtDNA alla generazione successiva. Durante l'oogenesi, inoltre, le molecole di mtDNA subiscono un fenomeno "a collo di bottiglia" mediante il quale solo una piccola parte delle molecole di mtDNA totali viene amplificata e trasmessa alla discendenza (Marchington *et al.*, 1998). A questo fenomeno si deve il rapido "shift" delle popolazioni di mtDNA che da eteroplasmiche possono diventare omoplasmiche nel giro di poche generazioni (Zeviani e Antozzi, 1997). Recentemente è stata dimostrata la trasmissione patrilineare del mtDNA nel muscolo scheletrico (ma non in altri tessuti) di un paziente con una miopatia mitocondriale (Schwartz *et al.*, 2002); segno che la trasmissione matrilineare del mtDNA, pur avendo un ruolo primario nelle malattie mitocondriali, non è una regola assoluta.

EFFETTO SOGLIA. L'espressione fenotipica di una mutazione patogena, in un determinato tessuto, insorge solo quando la proporzione relativa di mtDNA mutato e *wild-type* supera una determinata soglia. Un minimo numero critico di molecole di mtDNA mutato può causare un difetto energetico sufficientemente grave da non poter essere più complementato dalla popolazione di mtDNA normale e riflettersi in un danno funzionale di quel particolare organo o tessuto.

Solitamente la proporzione di molecole di mtDNA mutate in grado di manifestare effetti patologici si aggira intorno al **60-80%** (Zeviani and Antozzi, 1997). Inoltre, l'espressione fenotipica di una mutazione patogena del mtDNA dipende non solo dal grado di eteroplasmia della mutazione, ma anche dalla natura della mutazione stessa (patogenicità "intrinseca"), dalla coesistenza di altre mutazioni in geni nucleari o mitocondriali, dall'età dell'individuo

portatore (a causa dell'elevato tasso di mutazione del mtDNA e dell'effetto mutageno dei radicali liberi d'ossigeno che si formano come prodotti di scarto della catena respiratoria), dal sesso e dalla dipendenza di ciascun tessuto dal metabolismo ossidativo.

Gli organi più sensibili a difetti della fosforilazione ossidativa sono: il sistema visivo e uditivo, il sistema nervoso centrale e periferico, il cuore, i muscoli scheletrici, il pancreas endocrino ed i parenchimi renale ed epatico.

1.3 PATOLOGIE MITOCONDRIALI

Con il termine di “malattie mitocondriali” si definisce quell'ampia gamma di sindromi cliniche associate ad un'insufficienza della fosforilazione ossidativa.

Poiché il muscolo scheletrico e il cervello sono particolarmente sensibili a difetti del metabolismo ossidativo mitocondriale, nel 1977 Shapira ha introdotto il termine di *encefalomiopatie mitocondriali* (MEM), per definirle. In realtà, le malattie mitocondriali sono multisistemiche in quanto i mitocondri sono responsabili del rifornimento di ATP attraverso il metabolismo aerobico, quindi alterazioni genetiche della respirazione cellulare sono poco tollerate dai tessuti metabolicamente attivi che sono rappresentati da cervello, muscolo scheletrico e cardiaco, rene e fegato (**Figura 7**).

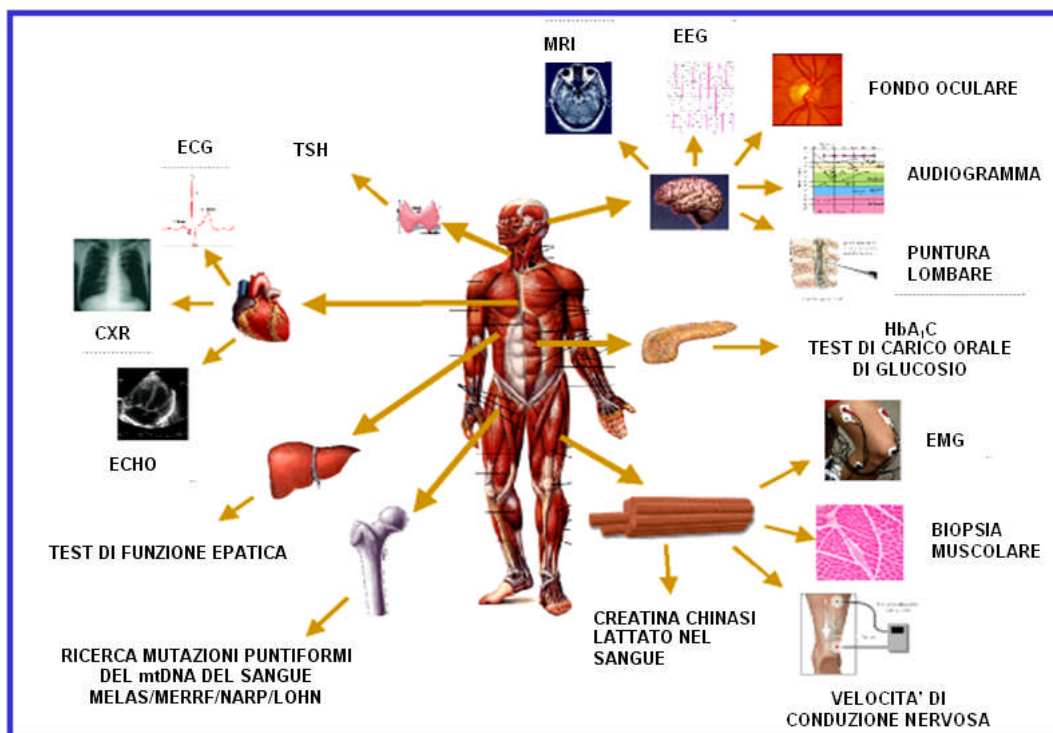


Figura 7 - Patologie mitocondriali: Sindromi cliniche, multisistemiche, associate ad insufficienza della fosforilazione ossidativa.

Numerose caratteristiche morfologiche e biochimiche caratterizzano la maggior parte di queste sindromi. Le alterazioni morfologiche più note riguardano il muscolo scheletrico, che denuncia la sofferenza mitocondriale attraverso una proliferazione di mitocondri anormali, soprattutto sotto il sarcolemma, che causa l'insorgenza delle così dette fibre *ragged-red* (fibre "rosse stracciate", RRF). La proliferazione mitocondriale è chiaramente evidenziata dall'intensa reazione istochimica delle RRF all'enzima succinato-deidrogenasi, che fa parte del complesso respiratorio II. Le RRF rappresentano il marker patologico di molti disordini mitocondriali, soprattutto nelle patologie caratterizzate da alterazioni qualitative del mtDNA (delezioni). Un'altra alterazione frequente è la presenza di fibre muscolari che risultano negative alla reazione istochimica per la citocromo *c* ossidasi (COX), il complesso respiratorio IV. Nei casi infantili si riscontrano spesso elevati livelli di acido lattico nel sangue,

il cui accumulo è causato dall'insufficienza della respirazione mitocondriale e dalla conseguente riduzione dell'acido piruvico, accumulatosi come prodotto terminale della glicolisi, in acido lattico da parte della lattico-deidrogenasi citoplasmatica.

L'identificazione di mutazioni del mtDNA ha aperto un capitolo fondamentale nella comprensione della patologia mitocondriale. Nel 1988, Holt e collaboratori (Holt *et al.*, 1988) descrissero la prima delezione del DNA mitocondriale e nello stesso anno fu identificata la prima mutazione puntiforme del mtDNA a carico del gene ND4 (Complesso I) in numerosi pazienti con “neuropatia ottica ereditaria di Leber” (LHON). Successivamente sono state individuate altre mutazioni puntiformi del mtDNA in associazione a numerose altre sindromi cliniche mitocondriali, come la Sindrome di Kearns-Sayre (KSS), la “epilessia mioclonica con fibre rosse stracciate” (MERRF), la “encefalomiopatia mitocondriale, con acidosi lattica ed episodi tipo ictus” (MELAS).

Le peculiari caratteristiche della genetica mitocondriale, con i suoi concetti di eteroplasmia, segregazione mitotica e soglia energetica tissutale, spiegano l'estrema variabilità fenotipica delle malattie mitocondriali causate da mutazioni del mtDNA. Infatti, differenti difetti genici del mtDNA possono causare la stessa sindrome clinica, e differenti sindromi cliniche possono essere associate ad uno stesso difetto genico.

L'esistenza di complessi multienzimatici della catena respiratoria, costituiti da subunità codificate dal genoma nucleare e dal genoma mitocondriale ha fornito le basi per l'attuale classificazione genetico-molecolare dei disordini

mitocondriali.

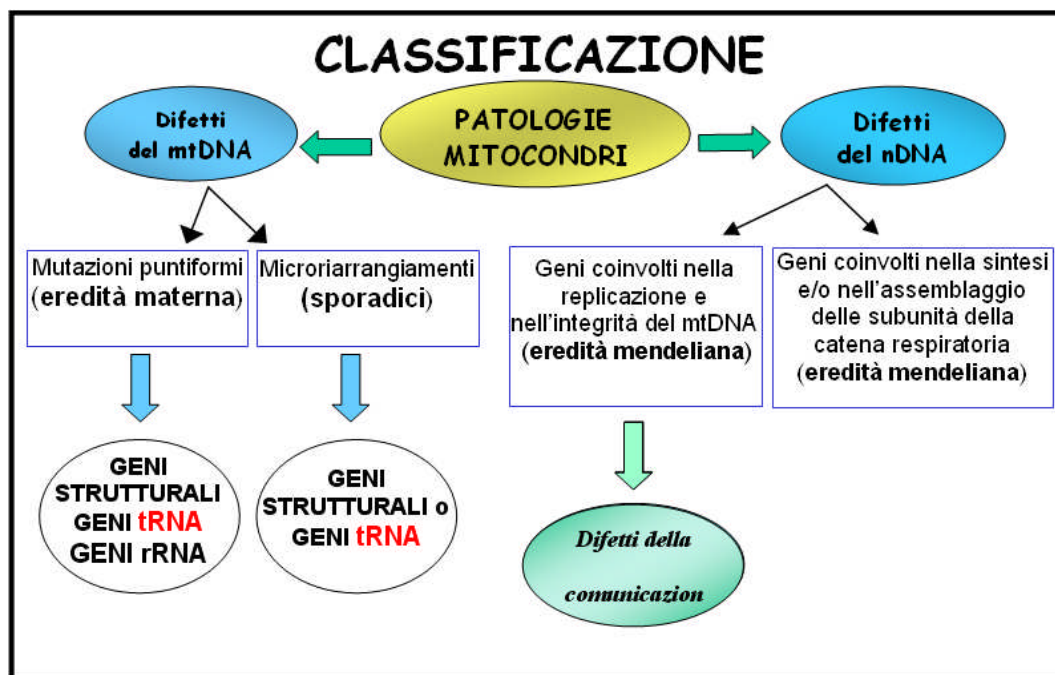


Figura 4 - Classificazione delle malattie mitocondriali associate a deficit della fosforilazione ossidativa.

Un primo gruppo di malattie è caratterizzato dalla presenza di mutazioni del mtDNA che sono ereditate per via materna secondo la genetica mitocondriale, o ad insorgenza sporadica. Un secondo gruppo è costituito da Alterazioni del mtDNA (delezioni multiple, duplicazioni, deplezione) dovute amutazioni in geni nucleari che controllano l'integrità strutturale e la propagazione del mtDNA. Questo gruppo di malattie, definite anche disordini della comunicazione in tergenomica, vengono ereditate per via mendeliana. Infine vi è un gruppo numeroso di malattie che non sono associate a mutazioni note del mtDNA, e che si ritiene siano causate da mutazioni in geni nucleari che fanno parte e controllano il processo di fosforilazione ossidativa. Queste malattie, ereditate per via mendeliana, sono classificate sulla base delle sole alterazioni biochimiche rilevate dall'analisi dei tessuti affetti.

1.3.1 Mutazioni del DNA mitocondriale

1.3.1.1 Riarrangiamenti del mtDNA

Consistono in delezioni parziali del mtDNA o, più raramente, in duplicazioni parziali. Entrambi i tipi di mutazione si riscontrano solitamente in eteroplasmia; inoltre, in contrasto alle mutazioni puntiformi, che vengono ereditate per via matrilineare, le delezioni e le duplicazioni singole del mtDNA non si ereditano né si trasmettono e le malattie ad esse associate appaiono perciò sporadiche. Probabilmente, infatti, l'origine di questi riarrangiamenti può essere favorita dall'attiva divisione cellulare e dall'altrettanto attiva replicazione del mtDNA all'interno dell'oocita o nei primi stadi dell'embriogenesi. Dal momento che molecole di genoma mitocondriale delecto sono state riscontrate anche in ovociti umani, un meccanismo ancora sconosciuto interviene nel prevenire la trasmissione verticale o l'espansione della popolazione di molecole mutate. Queste alterazioni grossolane del mtDNA sono quasi invariabilmente associate con tre principali presentazioni cliniche: la sindrome di Kearns-Sayre, l'oftalmoplegia esterna progressiva (PEO) e la sindrome di Pearson. La sintomatologia clinica di questi disordini comprende spesso una degenerazione progressiva della muscolatura scheletrica o del sistema nervoso centrale, generalmente accompagnata da intolleranza all'esercizio, debolezza muscolare, acidosi lattica e spesso associata a problemi oculari, tremore involontario o atassia.

Le delezioni del mtDNA sono le più comuni anomalie genetiche mitocondriali associate a malattie umane, essendo state riscontrate in circa il 40% dei pazienti con encefalomiopatia mitocondriale.

La maggior parte delle delezioni sono localizzate nell'arco più grande del mtDNA tra le due origini di replicazione, ma in alcuni pazienti la delezione coinvolge il promotore del filamento pesante e il sito di legame del fattore di trascrizione. La più comune delezione osservata è di 4.9 kb in lunghezza ed è fiancheggiata da una regione di 13 nucleotidi. Nei pazienti con MEM e delezioni del mtDNA è stata identificata una varietà di difetti della catena respiratoria e della fosforilazione ossidativa, più spesso coinvolgenti i complessi I, III e IV in combinazione; infatti, la maggior parte delle delezioni coinvolge subunità di più d'uno di questi complessi e almeno un tRNA. Lo stesso dicasi per le duplicazioni del mtDNA, anch'esse coinvolgenti un certo numero di tRNA. Sarebbe quindi il mancato equilibrio all'interno della popolazione dei tRNA ad indurre errori nell'incorporazione degli amminoacidi durante la sintesi proteica, tanto da far risultare dannoso sia un difetto quanto un eccesso nel numero di copie di tRNA. L'intervento della segregazione mitotica e l'effetto soglia successivamente influenzerebbero la distribuzione nei vari tessuti e quindi il fenotipo clinico.

1.3.1.2 Mutazioni puntiformi

Le mutazioni puntiformi sono singole sostituzioni nucleotidiche, o microinserzioni/microdelezioni. Queste mutazioni possono interessare sequenze codificanti tRNA, mRNA o rRNA. A differenza dei macroriarrangiamenti, che sono per lo più sporadici, tutte le mutazioni puntiformi vengono trasmesse per via matrilineare. Poiché i polimorfismi del mtDNA sono molto numerosi nella specie umana, le mutazioni patogene possono essere distinte dai polimorfismi non patogeni sulla base dei seguenti criteri:

- (1) La mutazione dovrebbe alterare un residuo (nucleotidico e/o aminoacidico) fortemente conservato durante l'evoluzione della specie; in generale, più il nucleotide o l'amminoacido sono conservati, maggiore è la loro importanza funzionale, ed è quindi presumibile che un loro cambiamento porterà a conseguenze dannose;
- (2) la segregazione del fenotipo patologico con la mutazione deve essere molto stretta e, possibilmente, assoluta; in pratica, la mutazione non deve essere individuata in un vasto numero di campioni di controllo;
- (3) la mutazione dovrebbe essere eteroplasmica e mostrare una correlazione quantitativa tra fenotipo e grado di eteroplasmia;
- (4) Infine, la mutazione dovrebbe essere riscontrata in famiglie clinicamente simili ma etnicamente diverse.

Eteroplasmia e multietnicità suggeriscono che la mutazione è avvenuta di recente, e che è in atto una selezione negativa che si oppone alla fissazione della mutazione stessa.

La patogenesi delle malattie mitocondriali associate a mutazioni puntiformi del mtDNA non è ancora del tutto chiarita; in particolare non è noto il meccanismo in base al quale le alterazioni genetiche osservate siano in grado di determinare quadri clinici così diversi tra loro e spesso accomunati da un analogo deficit biochimico della catena respiratoria mitocondriale. Tuttavia è possibile delineare una qualche correlazione (es. mutazioni nel tRNA^{Ile} sono generalmente associate a cardiomiopatie, mutazioni nei geni ND determinano varie forme di neuropatia ottica di Leber, mutazioni nel rRNA 12S e nel tRNA^{Ser} inducono

sordità etc.). Studi sperimentali *in vitro* sostengono l'ipotesi che le mutazioni nei geni tRNA, così come le delezioni parziali del mtDNA, siano responsabili di un'alterazione della traduzione e della sintesi proteica di componenti della catena respiratoria mitocondriale. Le mutazioni puntiformi che colpiscono geni strutturali causerebbero invece un'insufficienza dell'attività enzimatica dei complessi a cui appartengono le subunità proteiche.

La maggior parte delle patologie mitocondriali coinvolge mutazioni eteroplasmiche del mtDNA, proporzionali solitamente alla severità clinica della patologia; tuttavia esistono alcune eccezioni. Sono spesso omoplasmiche le mutazioni nelle subunità di tre complessi della catena respiratoria (Complessi I, III, IV) che risultano nel fenotipo della neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON), una sindrome ad esordio infantile che provoca perdita della visione centrale (Wallace *et al.*, 1999). La LHON è causata da mutazioni missenso del mtDNA, principalmente 11778G-)A(ND4), 3460G-)A(ND1) e 14484T-)C (ND6) (25). Questa malattia è un esempio di come diverse mutazioni possano determinare lo stesso quadro clinico.

L'espressione fenotipica può, in alcuni casi, essere influenzata da fattori genetici, rappresentati da mutazioni addizionali nel mtDNA o nel DNA nucleare, e da fattori ambientali. Un esempio può essere fornito dalla sordità neurosensoriale non sindromica ereditaria che può essere causata, in alcune popolazioni, fino ad un 25% dei casi dalla mutazione 1555A-)G. Tale mutazione avviene in una regione altamente conservata del gene mitocondriale per l'rRNA ribosomale 12S e determina la malattia dopo l'assunzione di aminoglicosidi. Si pensa che questa sostituzione nucleotidica possa determinare un aumento dell'affinità di legame dell'antibiotico per il rRNA 12S,

nella regione dove il tRNA si lega al ribosoma e inibire così la traduzione degli mRNA mitocondriali.

1.3.2 Mutazioni nel DNA nucleare

Negli anni recenti l'interesse si è spostato verso la genetica mendeliana delle patologie mitocondriali. Più del 90% delle proteine mitocondriali sono espressione di geni nucleari e inoltre, per il corretto funzionamento dei complessi dell'O_XPHOS, sono necessari numerosi fattori addizionali codificati dal nDNA, che provvedono a:

- (1) corretto assemblaggio delle subunità della catena respiratoria;
- (2) replicazione ed integrità del mtDNA;
- (3) trasporto delle proteine a codifica nucleare all'interno del mitocondrio;
- (4) sintesi della cardiolipina e degli altri fosfolipidi che costituiscono le membrane mitocondriali;
- (5) movimenti dei mitocondri all'interno delle cellule (es. neuroni);
- (6) divisione degli organelli durante la proliferazione cellulare.

La possibilità di una deficienza della catena respiratoria conseguente a mutazione di un gene nucleare emerge dall'osservazione di casi familiari a trasmissione mendeliana, in cui non vi sono mutazioni del mtDNA ma vi è un chiaro deficit biochimico. Analogamente ai quadri associati a mutazioni del mtDNA, i difetti della catena respiratoria definiti biochimicamente e, presumibilmente dovuti a mutazioni nucleari, presentano una notevole eterogeneità clinica.

1.3.2.1 Mutazioni in geni strutturali ed assemblanti i complessi dell'OXPPOS

Mutazioni nei componenti strutturali della catena respiratoria sono stati trovati soltanto nel complesso I e II, e sono associate a gravi disordini neurologici dell'infanzia (sindrome di Leigh e leucodistrofia). Invece, nessuna mutazione patogenetica è stata identificata nelle subunità a codifica nucleare dei complessi III, IV e V. Tuttavia, difetti dei complessi III e IV sono stati associati a mutazioni in proteine "accessorie" necessarie per l'assemblaggio o l'inserzione di cofattori.

1.3.2.2 Difetti della comunicazione intergenomica

Un terzo gruppo di disordini, associato ad alterazioni nel DNA nucleare, è noto come difetti di comunicazione intergenomica nucleo-mitocondriale. Come è noto, nel corso dell'evoluzione i mitocondri hanno perso la loro indipendenza e l'integrità e la replicazione del mtDNA dipendono attualmente da numerosi fattori codificati dal nucleo. Mutazioni in questi fattori vengono ovviamente ereditate per via mendeliana ed hanno come conseguenza diretta l'alterazione del mtDNA, che può essere di tipo quantitativo e qualitativo.

L'integrità del mtDNA può essere compromessa in maniera diretta, attraverso il danno a proteine necessarie alla replicazione o al mantenimento del mtDNA (POL γ , TWINKLE); oppure in maniera *indiretta*, alterando le proteine necessarie al mantenimento del pool di nucleotidi interno ai mitocondri (TK2, dGK, TP).

1.3.3 Deplezione Del Dna Mitocondriale

Dal punto di vista molecolare, la caratteristica peculiare delle sindromi da deplezione del mtDNA (MDS) è una profonda riduzione del numero di copie del mtDNA. Le MDS rappresentano un gruppo eterogeneo di malattie che si palesano subito dopo la nascita onel corso dell'infanzia.

Esse possono presentarsi attraverso tre principali manifestazioni cliniche, che dipendono dal tipo di tessuti compromessi (Moras *et al.*, 1991; Tritschle *et al.*, 1992; Vu *et al.*, 1998; Ducluzeau *et al.*, 1999.):

- (1) forma miopatica
- (2) forma epatocerebrale
- (3) forma encefalomiopatica

Nonostante i numerosi fattori coinvolti nel mantenimento del mtDNA (componenti del replisoma, proteine dell'assemblaggio dei nucleotidi, fattori coinvolti nel mantenimento del pool di nucleotidi), solo pochi geni risultano fino ad ora implicati nelle MDS: la forma mitocondriale della timidin chinasi (TK2) (Saada *et al.*, 2001) e la subunità R2 ciclo-dipendente della ribonuclotide reductasi (p53R2) (Bourbon *et al.*, 2007), associate con la forma di MDS miopatica; la deossiguanosin chinasi (DGUOK) (Mandel *et al.*, 2001), la subunità catalitica del mtDNA polimerasi (Po!- γ A) (Naviaux e Nguyen, 2005) e MPV17, una proteina dalla funzione ancora ignota (Spinazzola *et al.*, 2006), implicate nello sviluppo della forma di MDS epatocerbrale. Un difetto nel ciclo dell'acido citrico è invece responsabile della forma di MDS encefalomiopatia; il gene responsabile di questa patologia è *SUCLA2*, codificante la subunità ADP-dipendente della

Succinil-CoA sintetasi (Elpeleg *et al.*, 2005).

1.3.4 Diagnosi Prenatale e Prevenzione

L'espressione fenotipica di una mutazione nel mtDNA è regolata da un effetto soglia, vale a dire che il fenotipo patologico è espresso nelle cellule eteroplasmiche solo quando la proporzione di mtDNA mutante raggiunge un certo valore. Tale soglia è variabile da tessuto a tessuto e dipende dalle richieste energetiche intrinseche ad ogni tessuto nonché dall'entità del metabolismo aerobico richiesto. Ad esempio i neuroni e i miociti hanno una richiesta energetica più alta e una minore capacità di tollerare alte percentuali di mutazione, per cui in tali tessuti la soglia per lo sviluppo della malattia è più bassa rispetto a tessuti che hanno una minore richiesta di energia come ad esempio il tessuto connettivo.

In termini di consulenza genetica possiamo dire che la diagnosi prenatale per le malattie mitocondriali è sicura solo per una piccola parte di esse, quelle cioè che sono dovute a mutazioni del DNA nucleare che segregano con modalità mendeliana. La consulenza genetica delle malattie mitocondriali dovute a mutazioni nei geni mitocondriali invece è particolarmente difficile. A tal proposito bisogna distinguere tra riarrangiamenti su larga scala (macroriarrangiamenti es. delezioni/ duplicazioni) che sono per lo più sporadici, e mutazioni puntiformi del mtDNA che vengono trasmesse secondo un'eredità matrilineare. Queste mutazioni possono interessare sequenze codificanti RNA transfer (tRNA), RNA ribosomali (rRNA), o RNA messaggeri di proteine mitocondriali (mRNA). Per tali mutazioni del mtDNA la prognosi non è facilmente formulabile in quanto la percentuale di DNA mutato presente negli amniociti o nei villi coriali può non

corrispondere a quella presente in altri tessuti fetali. Inoltre, tale percentuale può cambiare sia durante lo sviluppo intrauterino che dopo la nascita. Analogamente, la previsione sul decorso della malattia nei portatori di basse percentuali della mutazione all'interno della stessa famiglia è difficilmente formulabile. Anche se con qualche difficoltà, la diagnosi prenatale per alcune mutazioni puntiformi del mtDNA, quando siano già state identificate nei familiari è possibile. Recentemente una revisione di alcune famiglie con la mutazione T8993G nel gene ATP6, fornisce una forte evidenza che non c'è una significativa variazione nella percentuale di mutazione tra i tessuti fetali e adulti. Inoltre i dati presentati suggeriscono che la percentuale di mutazione non mostra una sostanziale variazione con l'età. Per cui la percentuale di mutazione al nucleotide 8993 misurata nei villi coriali può essere considerata rappresentativa della percentuale di mutazione presente nei tessuti fetali. Tuttavia, tale osservazione non può essere estesa ad altre mutazioni dell'mtDNA (White *et al.*, 1999).

1.4 SINDROME DI LEIGH

La sindrome di Leigh (LS) o encefalomiopatia necrotizzante subacuta è un raro disordine neurodegenerativo ereditario e progressivo con prognosi infausta. La maggior parte dei pazienti muore pochi anni dopo la nascita. Tale condizione è stata descritta per la prima volta nel 1951 dal dottor Leigh in un paziente che presentava foci di necrosi e proliferazione di capillari nel cervello. L'incidenza della malattia viene stimata all'incirca in 1/40000. L'esordio in più di metà dei casi è nel primo anno di vita, soprattutto entro il sesto mese, ma si conoscono anche varietà ad esordio tardivo. Come in altre malattie mitocondriali, l'esordio dei sintomi neurologici è di solito subacuto o improvviso, qualche volta precipitato da un episodio febbrile o un intervento chirurgico (Scriver *et al.*, 2001. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed., pp.2384). Sebbene la LS sia un disordine multisistemico, il quadro clinico è determinato dal coinvolgimento del sistema nervoso centrale, con ritardo dello sviluppo, regressione psicomotoria, atassia, epilessia, neuropatia periferica, atrofia ottica, oftalmoparesi, nistagmo e vomito ricorrente. La malattia ha un peculiare quadro neuropatologico caratterizzato da lesioni focali e bilaterali in una o più aree del sistema nervoso centrale, in particolare a livello del talamo, i gangli della base, il cervelletto e il cordone spinale. Le lesioni sono caratterizzate da aree di demielinizzazione, gliosi, necrosi, spongiosi e proliferazione capillare. La presentazione clinica è estremamente variabile ed i sintomi dipendono da quale aree del sistema nervoso centrale sono coinvolte.

Le caratteristiche cliniche più comuni includono: ipotonia generalizzata,

debolezza tremore, anomalie dei movimenti oculari (oftalmoplegia esterna, nistagmo, disturbi dello sguardo fisso), disturbi respiratori (apnea e iperpnea), paralisi della deglutizione, movimenti anomali degli arti (distonia, movimenti coreiformi, atassia). La prognosi è infausta: la morte è inevitabile e di solito avviene per insufficienza respiratoria o complicanze come una sepsi. La risonanza magnetica rivela la presenza di lesioni simmetriche nei gangli della base e nel cervello. Le indagini biochimiche rivelano che i livelli ematici e, più ancora, liquorali di lattato e piruvato sono elevati. Ammoniemia e glicemia sono di solito normali, come pure i valori degli acidi organici urinari. Altri test utili includono la determinazione della biotinidasi sierica, il campionamento ematico per gli acidi grassi a catena molto lunga e la catalasi eritrocitaria, e la determinazione dell'acido pipicolico per escludere malattie dei perossisomi.

L'indagine al microscopio elettronico della biopsia muscolare mette in evidenza un'alterazione dei mitocondri, in numero e forma; d'altra parte l'indagine istoenzimatica dello stesso rivela deficit variabili di uno dei complessi della catena respiratoria. Infatti, l'eziologia della LS è stata correlata a deficit dei complessi della catena respiratoria, I, II, e IV, della subunità E1 α del complesso della piruvato deidrogenasi, e della subunità 6 dell'ATPasi mitocondriale. Di conseguenza l'ereditarietà può essere autosomica recessiva, X-linked o materna.

Da un punto di vista molecolare sono state identificate numerose mutazioni sia in geni nucleari che mitocondriali coinvolti nel metabolismo energetico e nella produzione di ATP. I geni mitocondriali includono quelli che codificano la subunità 6 dell'ATP sintasi (complesso V) (Holt *et al.*, 1990; de Vries *et al.*, 1993; Thyagarajan *et al.*, 1995; Carrozzo *et al.*, 2001; Olgivie &

Capaldi, 1999); le subunità MTND2, MTND3, MTDN5 e MTDN6 (Taylor *et al.* 2002, Sudo 2004 *et al.*, Ugalde *et al.* 2003, Hinttala *et al.* 2006) del complesso I; la subunità 3 del complesso IV (Tiranti *et al.* 2000), e numerosi tRNA. I geni nucleari includono quelli che codificano le subunità NDUFV1 (Schuelke *et al.* 1999), NDUFS1 (Martin, M.A. 2005), NDUFS3 (Benit *et al.* 2004), NDUFS4 (Petruzzella *et al.* 2001), NDUFS7 (Smeitinik and van den Heuvel 1999) NDUFS8 (Loeffen *et al.* 1998) NDUFA2 (Hoefs, *et al.*, 2008) C8ORF38 (Pagliarini, D. J *et al.*, 2008) del complesso I; il gene SDHA che codifica per la subunità flavoproteica del complesso II (Bourgeron *et al.* 1995) e il gene BCS1L che codifica per un fattore di assemblaggio del complesso III (Lonlay *et al.* 2001). Altri geni nucleari codificano per fattori di assemblaggio del complesso IV [SURF1 (Tiranti *et al.* 1998), COX 10 (Valnot I *et al.* 2000), COX 15 (Antonicka *et al.*, 2003), SCO2 (Jaksch *et al.*, 2001), SCO1 (Valnot I *et al.*, 2000)] e del complesso V [ATP11 e ATP12 (Ackermann *et al.*, 1990)]. Infine, una forma X-linked di sindrome di Leigh è causata da una mutazione nella subunità E1 α della piruvato deidrogenasi (PDH).

1.5 IL COMPLESSO V DELLA CATENA RESPIRATORIA: F₁F₀-ATP SINTETASI

1.5.1 Struttura

F₁F₀-ATP sintetasi è un enzima ubiquitario, presente nelle membrane dei batteri, dei cloroplasti e nella membrana interna dei mitocondri dove sintetizza la maggior parte di ATP (**Figura 9**) (Garcia *et al.*, 2002). La struttura quaternaria dell'ATP sintetasi dei mammiferi è stata dedotta dal modello batterico e da quello bovino. L'enzima è costituito, indipendentemente dall'organismo considerato, da due subcomplessi F₀ e F₁. L'attività catalitica dell'enzima è localizzata nella porzione F₁, che è estrinseca alla membrana ed utilizza il gradiente protonico per convertire ADP in ATP e viceversa; la subunità F₀ si trova nella membrana mitocondriale interna e permette il flusso di protoni dallo spazio intermembrana alla matrice (Souid *et al.* 1994; Garcia & Capaldi,1998; Souid & Penefsky, 1995). Come di seguito riportato, in *E. coli* la porzione F₀ è composta da tre subunità (a, b₂, c₁₂); nei mitocondri bovini oltre a quelle suddette ve ne sono altre sette (d, e, f, g, F6, A6L(A8), Sub6). La porzione F₁ in *E. coli* è composta da cinque subunità ($\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$), nell'enzima bovino oltre a queste ve ne sono altre due, OSCP e IF1. Le subunità bovine OSCP (oligomicina sensitivity conferring protein) e δ sono rispettivamente omologhe alle subunità batteriche δ , e ϵ .

Tra i vari fattori noti necessari per l'assemblaggio del complesso nel lievito, soltanto due (ATP 11 e ATP 12) sono stati identificati nell'uomo. Nel *S. cerevisiae*, ATP11 e ATP 12, promuovono l'assemblaggio di F₁, legando α a β . La particella F₁ guida l'assemblaggio di F₀. Nelle cellule di mammifero, non è

stato ancora identificato nessun fattore di assemblaggio di F₀. F₁ interagisce direttamente con le subunità c; questo step è seguito dall' incorporazione di altre subunità, b, OSCP ed F₆, formando un complesso intermedio detto V*. L'inserimento delle subunità a codifica mitocondriale a ed A6L completano il processo di assemblaggio.

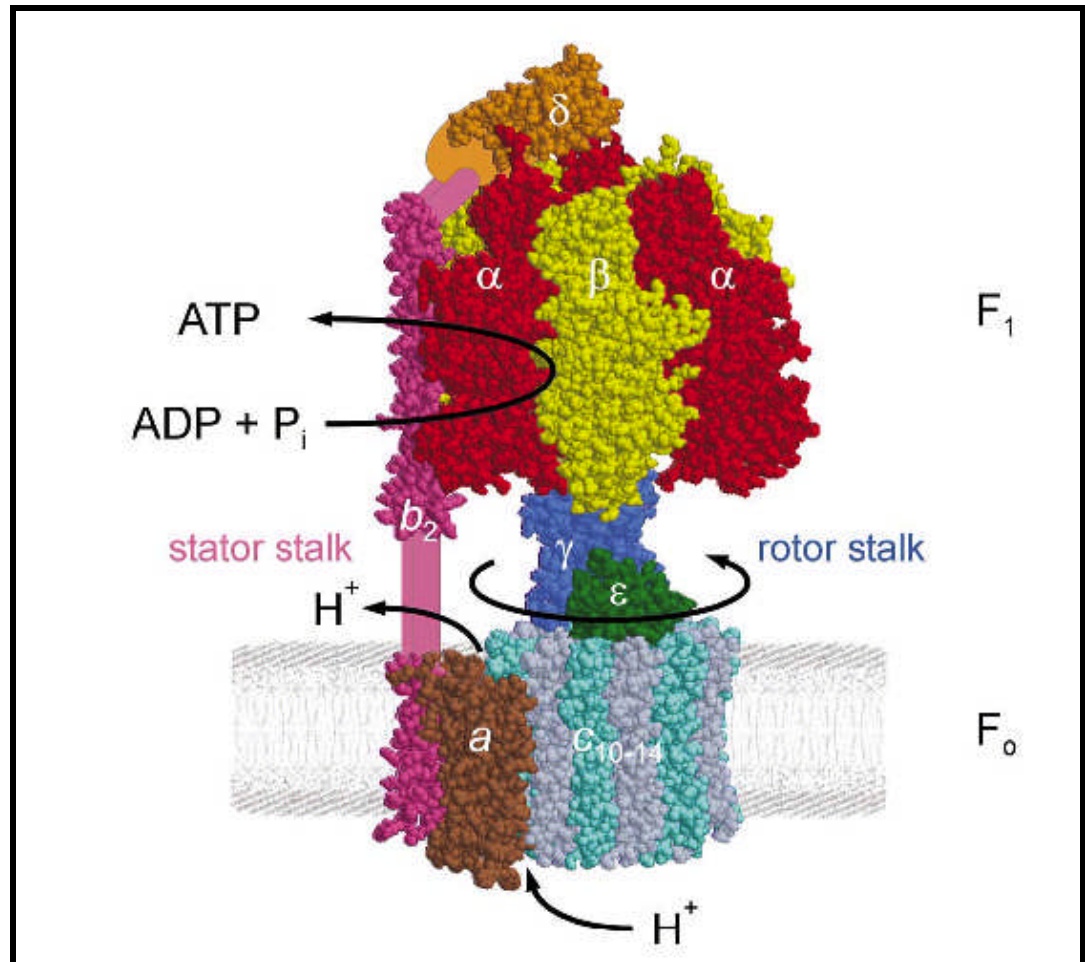


Figura 5 - Struttura dell'ATP sintetasi in E.coli.

1.5.2 Meccanismo d'azione

L'enzima è funzionalmente suddiviso in due porzioni: lo STATORE, costituito dalle subunità a, b, δ, α₃ e β₃; e il ROTORE, costituito dalle subunità γ, ε, c (composta da 9-12 subunità). I siti catalitici sono tre e sono situati

all'interfaccia delle subunità α e β . La reazione ADP—ATP è reversibile. Il complesso V, infatti, agisce in entrambe le direzioni, come SINTETASI e come IDROLASI. Questa modulazione dell'attività enzimatica è sotto il controllo della subunità ϵ . In *E. coli*, è stato dimostrato che quando il dominio c-terminale di ϵ si trova vicino ad F_0 viene stimolata l'idrolisi, quando si trova vicino ad F_1 l'idrolisi è inibita, ma la sintesi di ATP rimane inalterata (Rodgers *et al.*, 2000; Tsunoda *et al.*, 2001). Quindi, l'ATP idrolisi viene bloccata a seconda che la subunità ϵ sia o meno in contatto con il dimero α - β . La subunità ϵ bovina è diversa dall'omonima batterica: essa forma un'interfaccia con il dominio globulare delle subunità γ e δ , ed insieme ad esse interagisce con l'anello c di F_0 , stabilizzandone il rotore. La subunità δ bovina ha una struttura omologa alla ϵ di *E.coli*; tuttavia avendo la δ bovina una diversa conformazione ed un diverso orientamento, perde l'attività regolatoria dell'omologa batterica sul complesso enzimatico. Dati recenti (Gibbons *et al.*,2000), indicano che la subunità IF1, assente nell'enzima dei batteri, interferisce con i movimenti rotazionali delle subunità γ , δ , e ϵ inibendo l'attività d'idrolisi, soprattutto in condizioni di basso potenziale mitocondriale.

Da un punto di vista genetico, nell'ATP sintetasi dei mammiferi tutte le subunità sono codificate dal nucleo ad eccezione della subunità 6 (corrispondente ad *a* in *E. coli*) e della subunità A8, codificate dall'mtDNA. La subunità 6 è una parte fondamentale di F_0 , che interagisce con la subunità *c* durante la traslocazione dei protoni. L'elevata omologia tra la subunità *a* di *E. coli* e la subunità 6 dei mitocondri, ha permesso di utilizzare il modello ATPasi di *E.coli* per uno studio più approfondito sia sulla struttura che sul meccanismo che sottende alla sintesi di ATP. Studi molecolari, e biochimici hanno messo in evidenza una proteina a 5

eliche transmembrana (Hatch *et al.*, 1995). Inoltre, studi di mutagenesi (Cain, 2000) e studi che utilizzano modificazioni chimiche utilizzando DCCD e LDAO (Fillingame & Dimitriev, 2002; Fillingame *et al.*, 2002; Von Ballmoos *et al.*, 2002; Kaim & Dimroth, 1998; Wehele *et al.*, 2002; Vik *et al.*, 2000) hanno evidenziato due amminoacidi fondamentali nel passaggio del flusso protonico (**Figura 10**): Asp61 nella subunità *c* (corrispondente a Glu58 nei mammiferi) e l'Arg210 nella subunità *a* (corrispondente a Arg159 nei mammiferi). Questi due amminoacidi si trovano al centro della membrana a livello dell'interfaccia tra la subunità *a* e la subunità *c*. La loro azione concertata è necessaria per il movimento dei protoni. Esistono dei "canali" d'accesso per l'entrata e l'uscita dei protoni. La subunità *a* contiene, infatti, due "canali parziali", ognuno a contatto con una diversa parte della membrana. Il protone per attraversare la membrana si muove inizialmente attraverso il "primo canale parziale" portandosi verso il centro della membrana dove lega una delle subunità *c*, in particolare lega l'Asp61, quindi viene trasportato verso il "secondo canale parziale" attraverso la rotazione della subunità *c*. Quindi è la protonazione dell'Asp61, che determina lo spostamento di *c* verso *a*. E' generalmente accettato che ogni subunità nell'anello *c*, porta una carica negativa nella fase di rotazione e che subunità *c* deprotonate si trovino soltanto all'interfaccia *a/c*. Essendo la subunità *c* ancorata alla subunità γ , mentre la subunità *a* è ancorata attraverso le subunità *b* e δ alla periferia dell'esamero $\alpha_3\beta_3$, la rotazione di *c* rispetto ad *a* dirige la rotazione di γ rispetto ad $\alpha_3\beta_3$, questo determina il cambiamento conformazionale delle subunità catalitiche ed infine la sintesi di ATP.

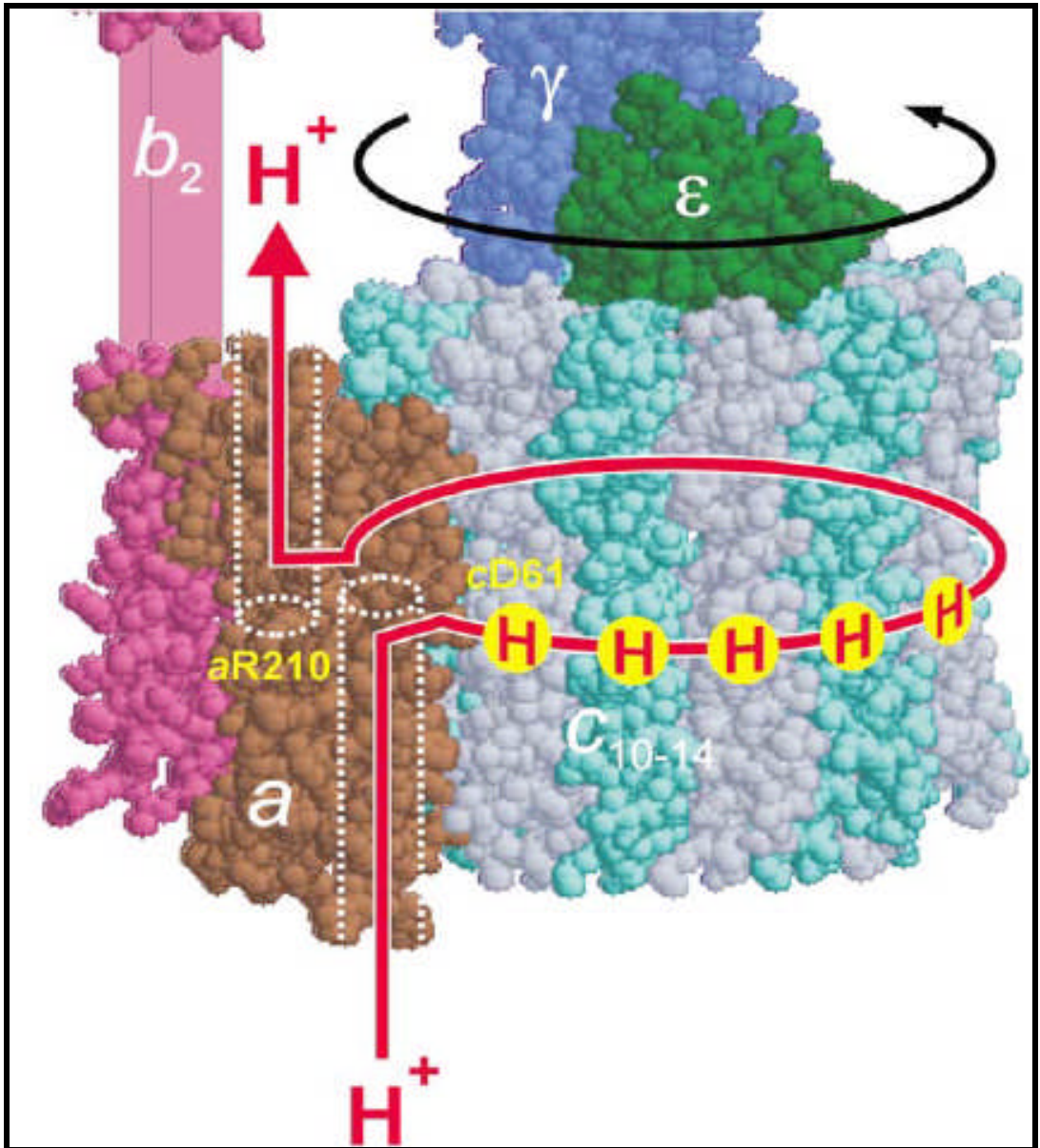


Figura 6 - Meccanismo di trasporto dei protoni nell'ATP sintetasi.

1.5.3 Mutazioni nell' ATPasi 6 umana

Alla luce del ruolo chiave dell'ATP sintetasi nel metabolismo energetico, non è troppo sorprendente attenderci che alterazioni di questa proteina determinino gravi patologie nell'uomo. L'enzima è costituito da due subcomplessi F_0 e F_1 . L'attività catalitica dell'enzima è localizzata nella porzione F_1 , che è estrinseca alla membrana ed utilizza il gradiente protonico per convertire ADP in ATP e viceversa; la subunità F_0 si trova nella membrana mitocondriale interna e permette il flusso di protoni dallo spazio intermembrana alla matrice (Souid, 1994; Garcia & Caapaldi, 1998; Souid & Penefsky, 1995). Soltanto due subunità di F_0 , la subunità a (ATP6) e la subunità A6L (ATP8), sono codificate dal DNA mitocondriale. Entrambe sono essenziali per la biogenesi e l'assemblaggio del complesso. Ad oggi, le mutazioni patogenetiche a carico del complesso risiedono nelle subunità codificate dai geni mitocondriali ATP6 (Holt, 1990; de Vries, 1993; Thyagarajan, 1995; Carozzo, 2001; Olgivie & Capaldi, 1999) e ATP8 (Jonckheere, 2007). Nessuna mutazione è stata individuata nelle subunità a codifica nucleare. Tali mutazioni sono ereditate per via materna e sono responsabili di un sottogruppo di disordini molto severi, spesso fatali, caratterizzati principalmente da lesioni cerebrali, soprattutto nello *striatum*. Questi includono la sindrome NARP (Neuropathy Ataxia Retinitis Pigmentosa), associata alla trasversione T8993G (Holt *et al.*, 1990), la neuropatia ottica di Leber (Leber's hereditary optic neuropathy o LHON), associata ad una mutazione in posizione T9101C (Majander *et al.*, 1997), la FBSN (familial bilateral striatal necrosis) associata ad una mutazione omoplasmica in posizione T8851C (De

Meirleir *et al.*, 1995), e la sindrome di Leigh. Quest'ultima è stata descritta sopra più dettagliatamente e risulta associata oltre che alla mutazione T8993G/C anche alla mutazione T9176G/C.

2 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di capire il meccanismo patogenetico che è responsabile di una severità clinica così diversa in quattro pazienti affetti da sindrome di Leigh dovuta a mutazioni alleliche nel gene dell'ATPasi 6. I pazienti studiati presentavano una delle seguenti mutazioni: T8993G (Leu156Arg), T8993C (Leu156Pro), T9176G (Leu217Arg), T9176C (Leu217Pro). In particolare si è cercato di capire perché mutazioni uguali in siti amminoacidici diversi determinino un effetto fenotipico clinico sovrapponibile, ed invece mutazioni diverse nello stesso sito determinino un quadro clinico differente.

Si è così valutato l'effetto delle quattro mutazioni attraverso saggi cellulari in "vitro" utilizzando fibroblasti e ibridi:

- attività biochimica di sintesi ed idrolisi di ATP
- crescita cellulare
- risposta all'uso di stressanti metabolici quali galattosio e oligomicina
- studi di apoptosi

3 MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI

Sono state studiate quattro famiglie con sindrome di Leigh associata a mutazioni differenti nel gene ATPase 6 del DNA mitocondriale. Gli studi sono stati eseguiti sia sui fibroblasti dei pazienti che sui cloni ottenuti dalla fusione delle linee primarie con cellule tumorali rese sperimentalmente prive di mtDNA (cellule dette p0).

Nella prima famiglia (**Figura 11a**), il probando (IV-1) era nato a 38 settimane con parto cesareo; il peso alla nascita era di 3200g, l'indice APGAR era 9 e 10 rispettivamente al 1° ed al 5° minuto. Nei primi 3 mesi di vita si era notato che la bambina mangiava poco e lentamente ed il suo peso è calato dal 70° al 25° percentile, sviluppando inoltre ipotonia e ritardo psicomotorio. Il lattato nel sangue era elevato (3-5 mM). La risonanza magnetica mostrava anormalità

simmetrica bilaterale ai gangli basali compatibile con la Sindrome di Leigh. La vista, l'udito e l'encefalogramma erano comunque normali. A 6 mesi la bambina fu ricoverata a causa di una letargia in aumento, un episodio di apnea. Dopo alcune settimane in seguito ad altri episodi di apnea, la paziente è deceduta per crisi respiratoria. L'autopsia ha rivelato lesioni cistiche bilaterali dei gangli basali, del talamo, della regione periventricolare, della sostanza nigra, del ceppo cerebrale tectale e tegumentale con proliferazione di astrociti e vasi sanguigni nelle aree cistiche, compatibili con la sindrome di Leigh. L'indagine istochimica del muscolo scheletrico è risultata normale, così come l'indagine ultrastrutturale dei mitocondri.

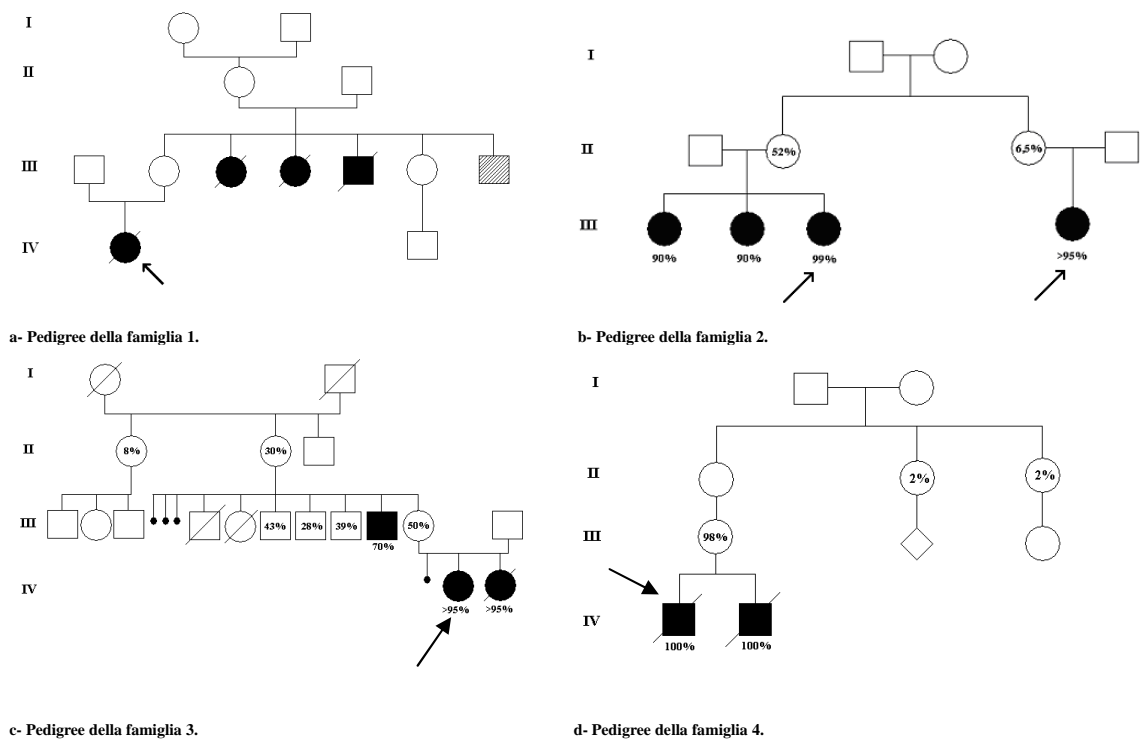


Fig.11 - La freccia indica il probando; i simboli colorati in nero rappresentano individui clinicamente affetti.

L'indagine familiare aveva evidenziato nel ramo materno un individuo morto alla nascita (III-3) ed altri due casi di LS (III-4 e III-5). L'individuo III-4 aveva mostrato un'acidosi metabolica cronica ed episodi di apnea. Il decesso è

avvenuto all'età di 1 anno. L'autopsia aveva rivelato degenerazione spongiforme, proliferazione di capillari, gliosi nel talamo, nel midollo, nei gangli basali, e nel ceppo cerebrale. L'individuo III-5 è deceduto a 5 mesi per crisi respiratoria, ed ancora una volta l'autopsia ha rivelato lesioni compatibili con la sindrome di Leigh. L'individuo III-7 ha mostrato debolezza muscolare e atassia. Successivamente ha sviluppato una degenerazione della retina ed una perdita di QI. L'analisi mutazionale ha individuato la presenza di una mutazione T>G a livello del nucleotide 8993(L156R) nel gene dell' ATPasi 6 del DNA mitocondriale.

Nella seconda famiglia (**Figura 11b**), la paziente III-3, a colloquio all'età di 21 anni, riferisce un primo episodio di letargia ed ipotonia a 5 mesi successivamente ad una febbre. Episodi simili sono ricomparsi nell'arco dei primi 10 anni di vita. All'età di 11 anni, l'esame neurologico ha messo in evidenza un deficit mentale, una severa disartria e paralisi verticale dello sguardo. I livelli ematici di lattato erano elevati (4.2mmol/L). La risonanza magnetica mostrava iperintensità nel putamen e nella testa del nucleo caudato. Due sorelle più grandi mostravano una neuropatia periferica con una risonanza magnetica normale e livelli di lattato normali. Una cugina materna, 16 anni all'età del colloquio, riferisce un episodio di debolezza alle gambe, atassia, disartria all'età di 3 anni. Episodi simili si sono ripetuti, sempre con recupero lento. Con il tempo è migliorata ma presenta una permanente disabilità motoria. All'età di 9 anni, presentava elevati livelli di lattato nel sangue (3 mmol/L) e nel CSF (2.8mmol/L). La risonanza magnetica era compatibile con la sindrome di Leigh.

L'analisi mutazionale ha individuato la presenza di una mutazione T>C a livello del nucleotide 8993 (L156R) nel gene dell' ATPasi 6 del DNA mitocondriale. La percentuale di mutazione nel sangue delle due probande era superiore al 95%. Per le sorelle più grandi della probanda III-3, è stata riferita una percentuale di mutazione intorno al 90%.

Nella terza famiglia (**Figura 11c**), la probanda (IV-1) è giunta alla nostra osservazione all'età di 10 anni. Fino a quel momento aveva sviluppato un severo disordine neurodegenerativo simile alla sindrome di Leigh.

La sorella più giovane era anch'essa affetta da sindrome di Leigh; diagnosi confermata dagli esami neuropatologici. Entrambe le sorelle erano portatrici di un'alta percentuale di una nuova mutazione nel gene dell'ATPasi 6 (T9176G; L217R). La probanda ha presentato un normale sviluppo motorio ed intellettuale durante il primo anno di vita.

Essa ha camminato intorno al 22° mese e intorno a quel periodo è stata colpita da attacchi di epilessia. La risonanza magnetica rivelò iperintensità nei gangli della base. All'età di 6 anni ella ha perso irreversibilmente tutte le sue capacità intellettive dopo due episodi di coma durante un attacco di febbre. Le indagini metaboliche hanno mostrato elevati livelli ematici di lattato (3.1 mmol/L, normal <2) ed ipocitrullinemia (4mmol/L, normal 10-30mmol/L). Uno zio materno (III-9) all'età di 41 anni presentava un disordine spinocerebellare, iperintensità nel putamen ed atrofia cerebellare evidenziata mediante risonanza magnetica. Caratteristica di questo ramo materno dell'albero genealogico è risultata l'elevata frequenza di aborti spontanei.

Nella quarta famiglia (**Figura 11d**), il paziente 1 (IV-1) è nato a termine di una gravidanza decorsa regolarmente da genitori sani e non consanguinei. La storia familiare è negativa. Il suo sviluppo è stato normale fino a 9 mesi di età quando improvvisamente comparvero in seguito ad una febbre ipotonia e coma. Il bambino è morto improvvisamente dopo poche ore la comparsa di questi sintomi.

Il paziente 2 è nato al termine di una gravidanza decorsa regolarmente. Lo sviluppo è decorso regolarmente nel primo anno di vita. Similmente a suo fratello ha manifestato in seguito ad un attacco febbrile una sindrome neurologica caratterizzata da coma, periodic breathing, seizures, e segni piramidali. Al momento del ricovero è stata evidenziata una severa acidosi metabolica. I livelli di lattato ematico e nel liquido cerebro- spinale erano elevati (7 mmol/L ,normal <2). La CT del cervello mostrava una ipodensità simmetrica nei gangli della base e nel cervello. L'EEG era diffusamente depresso. L'esame del fondo oculare e l'ultrasonografia in due dimensioni del cuore erano entrambe normali. Il decesso è sopraggiunto 3 settimane dopo il ricovero per un arresto cardiorespiratorio. L'analisi mutazionale ha evidenziato una sostituzione T>C in posizione 9176 (L217P) del gene ATPasi 6 mitocondriale.

3.2 INDAGINE MOLECOLARE

Il DNA estratto secondo procedure standard, è stato utilizzato in reazione di amplificazione genica (Polymerase Chain Reaction, PCR) utilizzando una concentrazione pari a 100-200 ng/µl. Le condizioni della PCR sono: 94 °C 30 sec.,

60 °C 30 sec., 72 °C 30 sec., per 30 cicli. Nella tabella II sono riportati gli oligonucleotidi utilizzati.

Primers	Sequenze dei Primers (5'-3')
MTF 8648	GACTAATCACCACCCAACAATGAC
MTR 9550	AGCGGGGTGATGCCTGTTGGGGGCCAG
MTF 9176	GGCCACTACTCATCCACCTAATTCCG
MTR 9203	GTGTTGTCGTGCAGGTAGAGGCTTCC

Tabella II

Per quantificare la relativa percentuale di mtDNA mutato rispetto al wild-type è stato aggiunto α -(³²P) dATP(0.5 μ l) nell'ultimo ciclo della PCR dei campioni di DNA studiati.

I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a digestione RFLP con due enzimi specifici per le due mutazioni T8993G/C e T9176G/C, rispettivamente Hpa II e Taq I. L'enzima Hpa II taglia l'mtDNA mutato in tre frammenti (345, 299 e 258 bp), mentre il wild-type viene tagliato in due frammenti (644 e 258 bp). L'enzima Taq I taglia l'mtDNA mutato in tre frammenti (128, 27 e 23 bp), ed il wild-type viene tagliato solo in due frammenti (155 e 23 bp). Le digestioni sono state preparate utilizzando 6 μ l di prodotto di PCR, 10U di enzima, 2 μ l di opportuno buffer e portate ad un volume finale di 20 μ l con acqua sterile. Il prodotto di PCR è stato digerito a 65 °C per l'enzima Taq I, ed a 37 °C per l'enzima Hpa II. I prodotti delle digestioni radiomarcati sono stati fatti correre su gel d'acrilamide al 12% e il gel ottenuto è stato esposto per circa tre ore a temperatura ambiente in un XAR Kodak film. Infine, per misurare la

quantità percentuale di molecole di mtDNA mutate, i gel sono stati analizzati da un elaboratore automatico Phosphor Imager (Biorad).

3.3 COLTURE PRIMARIE

Fibroblasti umani sono stati ottenuti da biopsie cutanee di pazienti affetti da sindrome di Leigh, e caratterizzati da una delle seguenti quattro mutazioni: T8993G (L156R), T8993C (L156P), T9176G (L217R), T9176C (L217P). I fibroblasti sono stati fatti crescere in Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] contenente 4.5 mg/ml di glucosio, al quale sono stati aggiunti 10% di siero fetale bovino, e 50µg/ml di uridina.

3.4 FUSIONE

Cloni cellulari (cibridi) sono stati ottenuti dalla fusione di fibroblasti (donatori di mtDNA) aventi una delle quattro mutazioni, e cellule di osteosarcoma umano (143B/TK-) prive del proprio mtDNA (Rho⁰) (donatrici di nucleo) (**Fig. 12**) (King & Attardi, 1989). I fibroblasti dei quattro pazienti sono stati fatti crescere in dischi da coltura da 35 mm e sottoposti ad enucleazione. Il terreno è stato rimosso dai dischi, che sono stati capovolti e messi in tubi da centrifuga contenenti 30ml di DMEM, 2ml di siero bovino, e 0.32 ml di citocalasina B (1mg/ml). I tubi sono stati centrifugati a 37⁰ C per 40 minuti a 5800xg. I dischi con i fibroblasti enucleati (citoplasti) sono stati lavati con DMEM per rimuovere i residui di citocalasina B. Ai fibroblasti enucleati sono state aggiunte le cellule Rho⁰, in numero da 1 a 2x 10⁶ e lasciate aderire per circa 3 ore. In seguito i dischi sono stati lavati per tre volte con DMEM e ad essi è stata aggiunta una soluzione

al 50% di polietilenglicole (PEG) per 60 secondi. Questa sostanza essendo altamente tossica viene rimossa rapidamente e le cellule dopo essere state lavate per 2-3 volte vengono nutrite con terreno permissivo alla crescita di tutte le cellule presenti. Dopo 24 ore le cellule vengono tripsinizzate e piastrate a bassa densità (da un disco da 35 in 15-20 dischi da 100mm), e nutrite con un terreno selettivo contenente DMEM, 8% di siero dializzato, 100µg/ml di bromodeossiuridina e puromicina. Le cellule donatrici dei mitocondri (i fibroblasti dei pazienti) sono timidina chinasi positive (TK⁺) e sintetizzano uridina (UR⁺), le cellule riceventi (Rho^o) sono TK⁻ e UR⁻; i ibridi ottenuti dalla fusione vengono selezionati per la loro capacità di crescere in assenza di uridina (che seleziona le cellule Rho^o non fuse) e in presenza di bromodeossiuridina (che seleziona i fibroblasti non enucleati). Le cellule vengono nutrite a giorni alterni, e dopo circa 10-14 giorni in terreno selettivo i cloni ibridi raggiungono una grandezza sufficiente da essere visibili ad occhio nudo, ed essere isolati utilizzando degli anellini di diametro pari a 5mm. Dai cloni così isolati viene estratto il DNA che viene sottoposto ad amplificazione (PCR) e digestione con enzimi specifici (RFLP) per valutarne la % di mutazione.

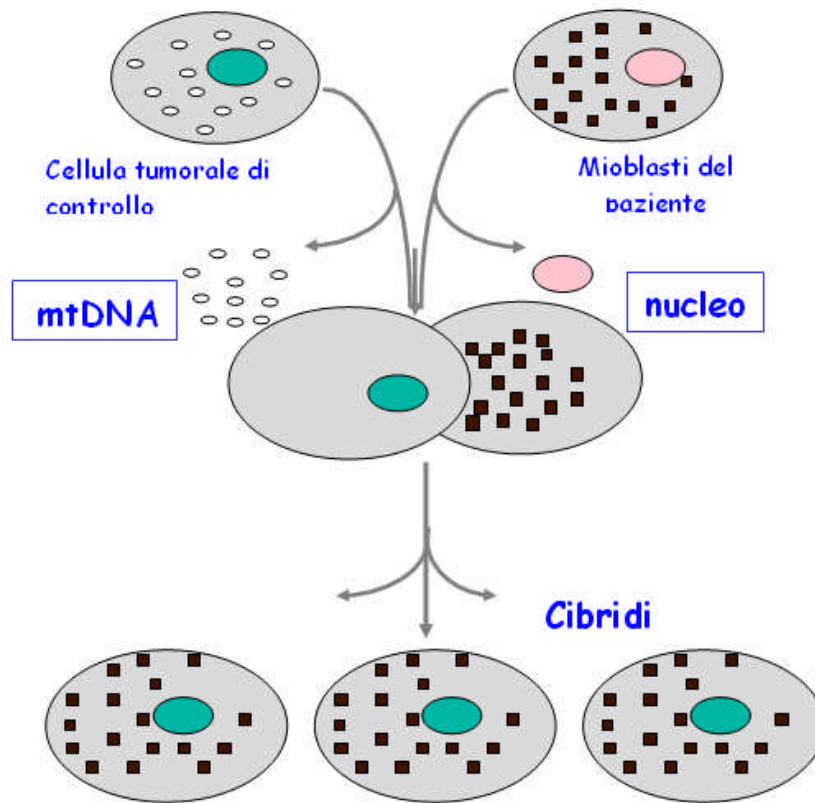


Figura 12 - Gli ibridi citoplasmatici

3.5 CURVE DI CRESCITA

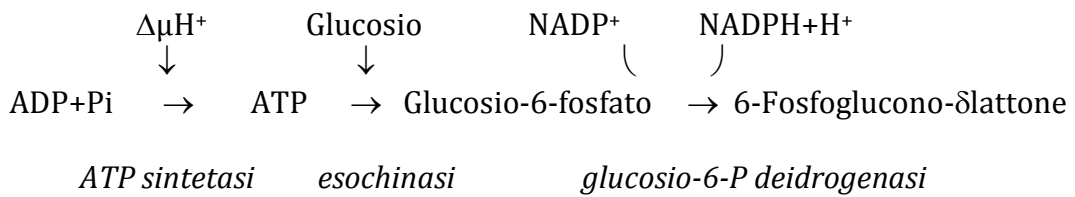
Per valutare la capacità di crescita delle quattro linee primarie, i fibroblasti sono stati piastrati in dischi da 30mm ed il numero di cellule è stato contato, mediante la camera di burker, dopo 5, 10 e 20 giorni dalla semina. Inoltre, abbiamo valutato la capacità delle stesse cellule di duplicare in presenza di “stress” metabolici, quali galattosio (5mM), oligomicina (0.1ng/ml), e galattosio+oligomicina (5mM e 0.1ng/ml rispettivamente); anche in questo caso le cellule sono state tripsinizzate e contate dopo 5, 10 e 20 giorni dall’inizio del trattamento.

3.6 ISOLAMENTO DEI MITOCONDRI

Per isolare i mitocondri vengono raccolte circa 5×10^7 cellule. Il pellet ottenuto viene risospeso in 5ml di buffer di omogeneizzazione [Saccarosio 250 mM, EGTA 1mM, Hepes 10mM, 0.5% (BSA) albumina serica bovina, pH 7.4] e tenuto in ghiaccio. Successivamente, vengono aggiunti 25 μ l di Proteasi (stock 100 μ g/ml) per permettere la rottura delle membrane cellulari. Dopo 7 minuti l'azione della proteasi viene bloccata aggiungendo 5ml del buffer di omogeneizzazione e gli inibitori dell'enzima: 10 μ l di PMSF (stock 1M), 5 μ l di Leupeptina (stock 1 mg/ml), 5 μ l di Pepstatina (stock 1 mg/ml). La sospensione viene omogeneizzata in un omogenizzatore di vetro con pestello in teflon per 12 volte alla velocità di 2000 colpi al minuto. L'omogenato viene quindi centrifugato a 1500g per 8 minuti a 4⁰C (centrifuga refrigerata della Beckam J-25). Il sovrinatante (in cui sono presenti i mitocondri) viene trasferito in un altro tubo da centrifuga e mantenuto in ghiaccio. Il pellet viene risospeso, omogeneizzato e centrifugato come in precedenza; il sovrinatante ottenuto da questa seconda centrifuga viene unito all'altro ed entrambi vengono centrifugati a 14600xg per 12 minuti, a 4⁰C. Il pellet così ottenuto è costituito dai mitocondri, che vengono risospesi in 140-200 μ l di Wash-Buffer (Saccarosio 250 mM, Tris – HCL 10mM, EDTA 1mM). Sul pellet di mitocondri si effettua il dosaggio delle proteine (metodo BCA). Una quantità di proteine mitocondriali pari a 200-250 μ g sono state utilizzate per gli studi biochimici.

3.7 DETERMINAZIONE BIOCHIMICA DELLA SINTESI DI ATP

Il metodo segue la seguente reazione:



I mitocondri vengono incubati in 20 mM Tris-HCl, 1mM ADP, 20 mM Pi (KH₂PO₄), 5 mM MgCl₂, 100µM diadenosina pentaosfato, 10 mM di glucosio, 30 unità di esochinasi e 20 mM di succinato. L'incubazione è condotta a 37⁰C in vials con forte agitazione per ottenere il massimo di ossigenazione. La reazione viene bloccata con EDTA 25 mM e 2 µM di CCP. I campioni vengono trasferiti in tubi eppendorf, bolliti per 10 minuti e centrifugati (10000xg, 10 min) per rimuovere le proteine denaturate. Il supernatante viene trasferito in cuvette di plastica, diluito con acqua in rapporto 1:1 e vengono aggiunti 1 mM di NADP e 30 unità di glucosio 6 fosfato deidrogenasi. Il glucosio 6 fosfato che è stabile al calore viene ossidato dall'NADP in presenza della glucosio 6 fosfato deidrogenasi. La formazione di NADPH viene monitorata a 340 nm. C'è un rapporto 1:1 tra ATP sintetizzata ed NADPH formato.

3.8 DETERMINAZIONE BIOCHIMICA DELLA IDROLISI DI ATP

L'attività di idrolisi dell'ATPasi è stata determinata in presenza di fosfoenolpiruvato (PEP), e degli enzimi piruvato chinasi (PK) e lattico-

deidrogenasi (LDH), seguendo l'ossidazione di NADH spettrofotometricamente a 340 nm a 30°C.

La reazione prevede l'incubazione in cuvetta di 100 microgrammi di mitocondri con una soluzione di reazione contenente: medium per ATP idrolisi (saccarosio 50mM, tris acetato 50mM, acetato di potassio 30mM, acetato di magnesio 3mM, pH 8.2), ATP 300 mM, PEP 300mM, NADH 30mM, PK 10U, LDH 2.5U, rotenone 5mM, in un volume finale di reazione di 1 ml. La reazione ha inizio con l'aggiunta delle proteine mitocondriali, e viene monitorata per almeno 180 sec. Ogni attività enzimatica viene valutata contemporaneamente anche in presenza di oligomicina, inibitore specifico del complesso, ed il valore viene espresso come attività di idrolisi sensibile all'oligomicina.

3.9 SONICAZIONE

I mitocondri isolati dalle 4 linee cellulari dei pazienti che presentano le mutazioni L156R, L217R, L156P, L217P, e da fibroblasti di controllo, sono stati sottoposti a sonicazione. L'attività enzimatica, in assenza ed in presenza di oligomicina, è stata misurata in aliquote prese a diversi tempi di sonicazione (20", 30", 50", 120", 150", 210"), utilizzando un sonicatore "Vibra Cell" (Sonics & Materials) alla potenza di 400 wa.

3.10 STUDI DI APOPTOSI

3.10.1 Linee cellulari

Tutto il lavoro sperimentale è stato effettuato su tre linee cellulari: Rho+

(cellule parentali di controllo), clone A [100% mutato per la mutazione T9176G, (L217R)] e clone B [100% mutato per la mutazione T8993G, (L156R)]. E' stata eseguita una caratterizzazione di base delle quattro linee cellulari, e successivamente indagata la loro risposta a diversi stimoli apoptotici.

3.10.2 CARATTERIZZAZIONE DI BASE

a) Microscopia Elettronica (TEM)

Per l'analisi delle sezioni ultrasottili, le cellule sono state fissate con 2,5% di gluteraldeide in un buffer di cacodilato 0.2M (pH 7.4) per 2 ore a temperatura ambiente, e successivamente fissate con l'1% di OsO₄ nello stesso buffer per 1 ora a temperatura ambiente. Quindi le cellule sono state lavate, disidratate in un gradiente alcolico e imbevute in resina epossinica (Agar 100, resina, Agar Scientific Ltd., Stansted, UK). Le sezioni ultrasottili, ottenute con un ultramicrotomo della LKB Ultratome Nova, sono state colorate con acetato di uranio e citrato di piombo ed esaminate con un microscopio elettronico a trasmissione (Philips EM 208 S) a 60Kvoltage.

b) Potenziale Di Membrana: Analisi Qualitativa (JC-1)

Il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi$) è stato studiato utilizzando la sonda JC-1 (5-5',6-6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilenbenzimidazol-carbocianina iodato) alla concentrazione di 10 μ M. JC-1 è una sonda metacromatica capace di entrare selettivamente nei mitocondri e risente del potenziale di membrana. Esiste in una forma monomerica (verde) in cellule ipopolarizzate, ed in J-aggregati (arancione) in cellule iperpolarizzate. JC-1 può essere utilizzato sia per saggi di

tipo qualitativo (considerando lo shift dal verde all'arancione) che di tipo quantitativo (considerando l'intensità della fluorescenza).

c) Analisi Della Massa Mitocondriale (NAO)

Per l'analisi della massa mitocondriale le cellule sono state incubate a 37° per 30 minuti con 5µM di nonylacridina arancione (NAO, Molecular Probes). I campioni sono stati immediatamente analizzati con un "citometer flow" della Becton Dickinson.

d) Analisi di Western- Blotting

L'analisi di Western-blotting relativo alle proteine Hsp70, Hsp60, Bcl-2, Mn-SOD e Cu-Zn-SOD è stata condotta sui cloni e sulla linea parentale.

I pellet di campioni congelati sono stati risospesi in un buffer contenente Tris-HCL 50mM, NaCl 150mM e NP-40 1%-pH 8.0 e sonicati tre volte per 2' ogni 5". Il contenuto proteico è stato misurato con BCA (Pierce, USA) e letto a 562nm. 10µg di proteina vengono bolliti per 5' in un buffer 2X (Tris-HCl 140mM pH 6.8, SDS 4%, Glicerolo 20%, blu di Bromofenolo 0.015%) più 1:1 di β-mercaptoetanololo, e separati su un gel di SDS-poliacrilammide al 12%. Le proteine vengono trasferite elettroforeticamente su una membrana di "polyvinilidene difluoride" in Tris 25 mM, Glicina 192 mM. L'anticorpo monoclonale Porina (Calbiochem, la Jolla, California, USA) è usato 1:20.000 diluito in T-TBS. Gli anticorpi policlonali Mn-SOD ed Cu/Zn SOD (Stressgen,

Victoria, BC, Canada) sono stati utilizzati ad 1:1500 e ad 1:7000 rispettivamente diluiti in T-TBS. L'anticorpo monoclonale Bcl-2 (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) è stato usato ad una diluizione pari a 1:100, infine Hsp-60 e HSP-70 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) alla diluizione di 1:2500 ed 1:20000 rispettivamente. Le bande "reattive" sono state rivelate usando il kit-ECL plusTM (Amersham, Buckinghamshire, UK), e la fluorescenza è stata quantificata usando il programma "Quantity one Software"-Bio Rad, utilizzando la Porina come standard interno.

3.10.3 ANALISI DI APOPTOSI

a) Induzione di apoptosi

Le cellule 143Brho+ e i cloni A e B sono stati fatti crescere fino ad una confluenza pari a 5×10^4 cell/ml. Dopo 24h di incubazione a 37°C in 5% di CO₂ le cellule sono state trattate nel seguente modo: a) 2h con cycloheximide (CHX) e quindi 4 h con Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α); b) 6 h con staurosporina (STS); c) 48 h con l'anticorpo anti-Fas (α -Fas); d) 2 h con cycloheximide e infine 48 h con TRAIL (induttore di apoptosi - correlato a TNF- α). Sono stati eseguiti controlli specifici utilizzando solamente CHX. Inoltre sono stati utilizzati DMSO (dimethyl solfossido) come veicolo di STS e IGM murino come un controllo dell'innescamento di Fas.

b) Caratterizzazione della cascata apoptotica

Due ore prima dell'aggiunta degli stimoli apoptotici descritti sopra sono stati aggiunti direttamente al mezzo di coltura specifici inibitori delle caspasi (permeabili attraverso le cellule): DEVD-CHO (inibitore della caspasi 3), LEHD-CHO (inibitore della caspasi 9), IETD-CHO (inibitore della caspasi 8). Come controlli sono stati considerati cellule trattate solamente con uno degli inibitori delle caspasi per lo stesso periodo di tempo

c) Valutazione della cascata apoptotica

La valutazione quantitativa di apoptosi è stata eseguita utilizzando una metodica citometrica statica e di flusso: i) con il Kit di determinazione dell'apoptosi che si basa sulla doppia colorazione con annexina V-FITC che è in grado di differenziare cellule che hanno perso l'integrità della membrana (cellule necrotiche) dalle cellule viventi attraverso l'intensità del colore rosso dei loro nuclei in seguito al trattamento con ioduro di propidio (PI); ii) valutazione della frammentazione nucleare in cellule fissate in etanolo usando il PI; iii) valutazione della condensazione della cromatina mediante colorazione dei nuclei con l'Hoechst.

d) Rilascio di citocromo c

Il rilascio del citocromo c è stato valutato mediante ELISA

e) Studi mitocondriali:

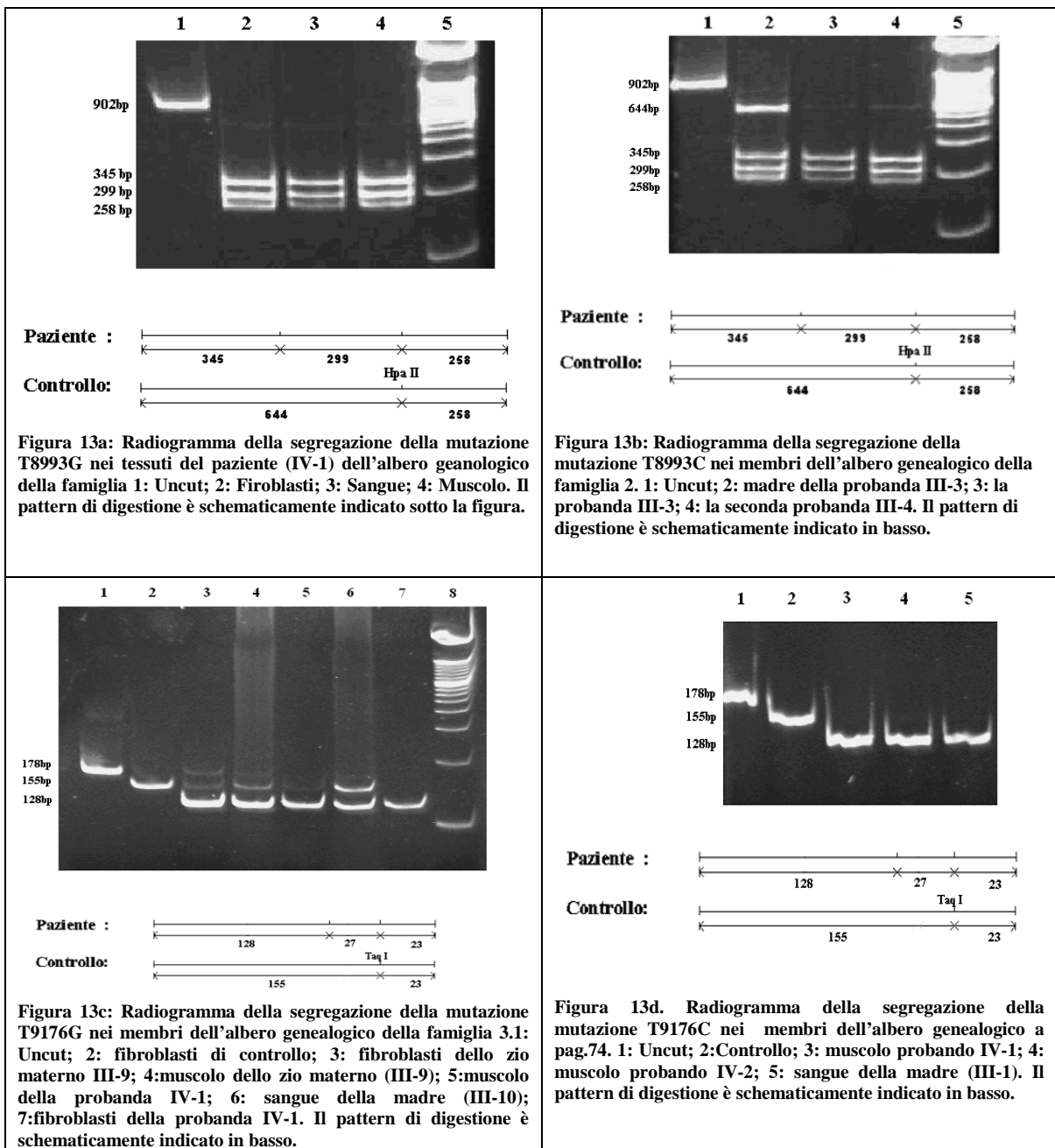
Le cellule sono state pretrattate per 1 h con acido bongkreik (BA: un diretto antagonista del trasportatore dell'adenin-nucleotide, che inibisce il passaggio attraverso i pori mitocondriali), con FCCP (carbonil cianide p-trifluoro-metossi fenilidrazone: (un disaccoppiante della catena respiratoria) oppure con OLM (oligomicina: un inibitore dell'ATP sintetasi che incrementa il potenziale della membrana mitocondriale), e successivamente sono state esposte agli stimoli apoptotici. Come controlli sono state usate cellule trattate con uno solo di questi agenti isolati.

4 RISULTATI

4.1 PERCENTUALE DI MUTAZIONE NEI PEDIGREE

Nella probanda abbiamo individuato la mutazione T->G al nucleotide 8993 nel gene dell'ATP asi 6 mediante sequenziamento dell'mtDNA.

Famiglia 1.L'analisi RFLP nella probanda ha evidenziato che la mutazione è omoplasmica nei fibroblasti, nel muscolo scheletrico e nei leucociti. L'indagine dei tessuti autoptici degli individui affetti III3, III4, III5 ha riscontrato la presenza della mutazione in omoplasma. L'analisi RFLP dei membri non affetti del ramo materno ha individuato la presenza della mutazione in grado variabile tra 2%-30% nei linfociti. L'individuo III-7 che presenta segni di neuropatia ottica porta la mutazione in eteroplasma in percentuale intorno al 70%.



Famiglia 2. Nelle probande III-3 e III-4, abbiamo individuato una transizione T->C al nucleotide 8993 del gene dell' ATPasi 6 mediante sequenziamento del mtDNA isolato dal muscolo. L'analisi dell'RFLP nelle probande indica che le mutazioni sono essenzialmente omoplasmiche nei fibroblasti, nel muscolo scheletrico e nei leucociti. L'analisi dell'RFLP è stata eseguita su altri membri

della famiglia rivelando che le due sorelle maggiori della probanda III-3 (III-1 e III-2) hanno nel sangue una percentuale di mutazione di circa il 90%. I leucociti della madre sana della probanda III-3 contengono una percentuale di mutazione pari al 52%. La mutazione è risultata eteroplasmica con una percentuale pari a 54% anche nei leucociti della madre della probanda III-4 anch'essa sana.

Famiglia 3. La mutazione è stata trovata in percentuale superiore al 95% nel muscolo, nel sangue, e nei fibroblasti della probanda IV-1 e in tutti i tessuti autoptici del individuo IV-2. La quantità di DNA mitocondriale mutato nel sangue degli individui appartenenti al ramo materno varia tra 8% e 70% ed è correlata con la severità dei sintomi clinici: la più alta percentuale è stata individuata nel soggetto III-9 che ha una sindrome spinocerebellare.

Famiglia 4. Gli studi molecolari sono stati eseguiti sul muscolo e sui fibroblasti. In entrambi i tessuti è stata trovata la mutazione T9176C in percentuale superiore a 95%. Nei linfociti della madre, dello zio materno e della nonna è stata trovata la mutazione in percentuale pari a 50%, 70% e 10% rispettivamente.

4.2 PERCENTUALE DI MUTAZIONE NEI CLONI CIBRIDI

In seguito alla fusione tra le cellule primarie (fibroblasti) dei quattro pazienti e le cellule Rho^o sono stati isolati, dopo opportuna selezione, un totale di 200 cloni. Un pellet cellulare di ogni clone è stato utilizzato per estrarre il DNA e testarne la percentuale di mutazione.

Per le mutazioni L156R ed L156P sono stati ottenuti cloni che spaziano in

un range dallo 0% al 100% di mutazione. In particolare per la mutazione L156R abbiamo ottenuto i cloni: (AT153,) 0% (wild-type); (AT 106), 2%; (AT128), 20%; (AT 144), 50%; (AT 103), 80%; (AT 116), 93%; (AT 101), 100%. Per la mutazione L217R: (LR 40), 0%, (LR 30), 84%; (LR 9), 85%; (LR 60), 95%; (LR4), 99%; (LR 31), 100%. Per la mutazione L156P: (DK257), 0% (wild- type); (DK145), 35%; (DK135), 50%; (DK169), 70%; (DK163), 88%; (DK151), 100%. Per la mutazione L217P : (EL 43), 100%.

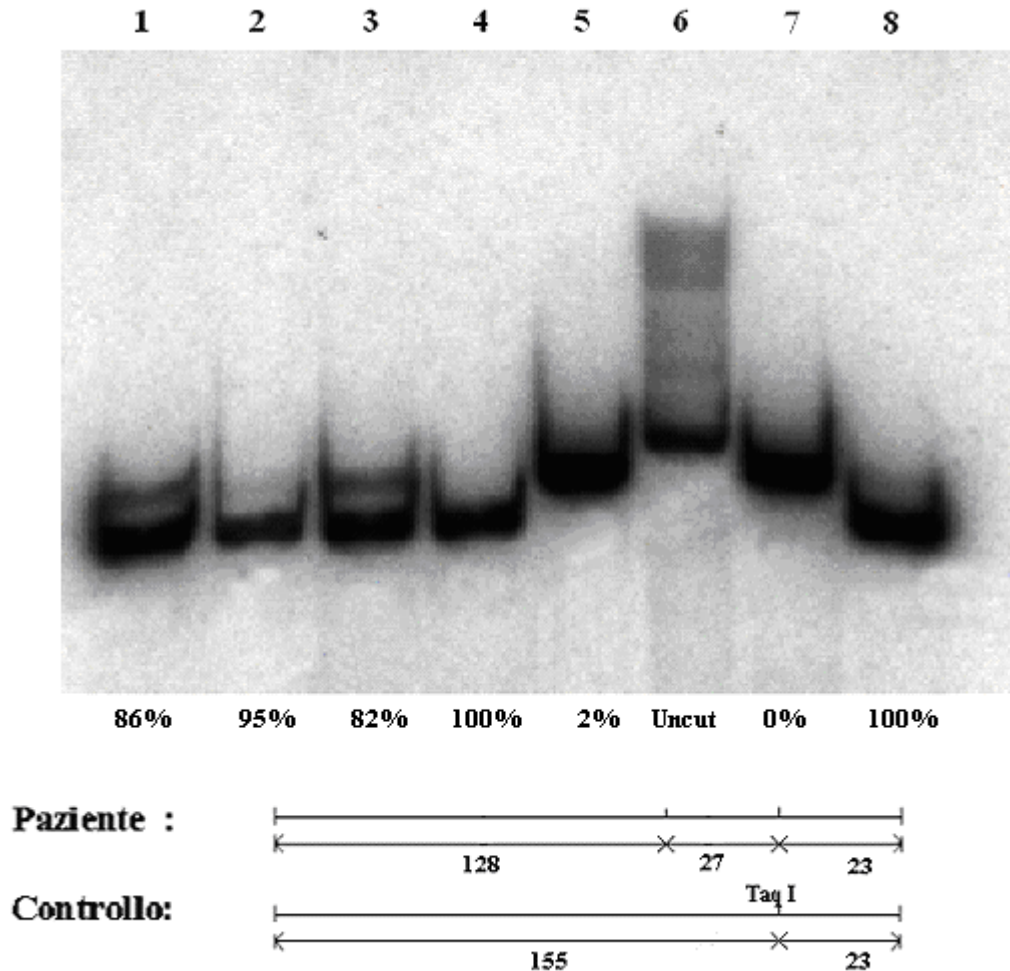


Figura 14: Radiogramma della segregazione della mutazione T9176G. 1: clone86%; 2:clone 95%; 3:clone 82%; 4: clone 100%; 5: clone 2%; 6:Uncut; 7:clone 0%; 8:clone 100%

4.3 CURVE DI CRESCITA

La capacità di crescita dei fibroblasti mutati in un normale terreno di coltura (contenente 4,5 mg/mL di glucosio) è ridotta rispetto ai fibroblasti di controllo. In particolare, le mutazioni L156R ed L217R agiscono in maniera simile, manifestando una riduzione della crescita dell'80% rispetto al controllo. Le corrispondenti mutazioni alleliche, L156P e L217P, mostrano un fenotipo meno grave (dati non mostrati). Quando il galattosio viene usato al posto del glucosio nel terreno di coltura, noi abbiamo osservato un drastico effetto sulla crescita delle cellule L156R (**Figura 15b**). Infatti, il galattosio induce una riduzione sulla crescita per la L156R che è del 49% a soli 5 giorni di trattamento ed arriva a 79% di riduzione dopo 20 giorni rispetto alle stesse cellule cresciute nel terreno contenente glucosio. La riduzione nella linea cellulare con la mutazione L217R è stata del 65% a 5 giorni e del 75% a 20 giorni (**Figura 15c**). Le due mutazioni L156P e L217P mostrano un comportamento simile al controllo (**Figura 15 d ed e**). L'aggiunta dell'oligomicina (0.1ng/ml) non induce un effetto significativo su tutte le linee testate. Pertanto l'effetto del doppio trattamento, galattosio+oligomicina, riproduce l'effetto del trattamento con il solo galattosio.

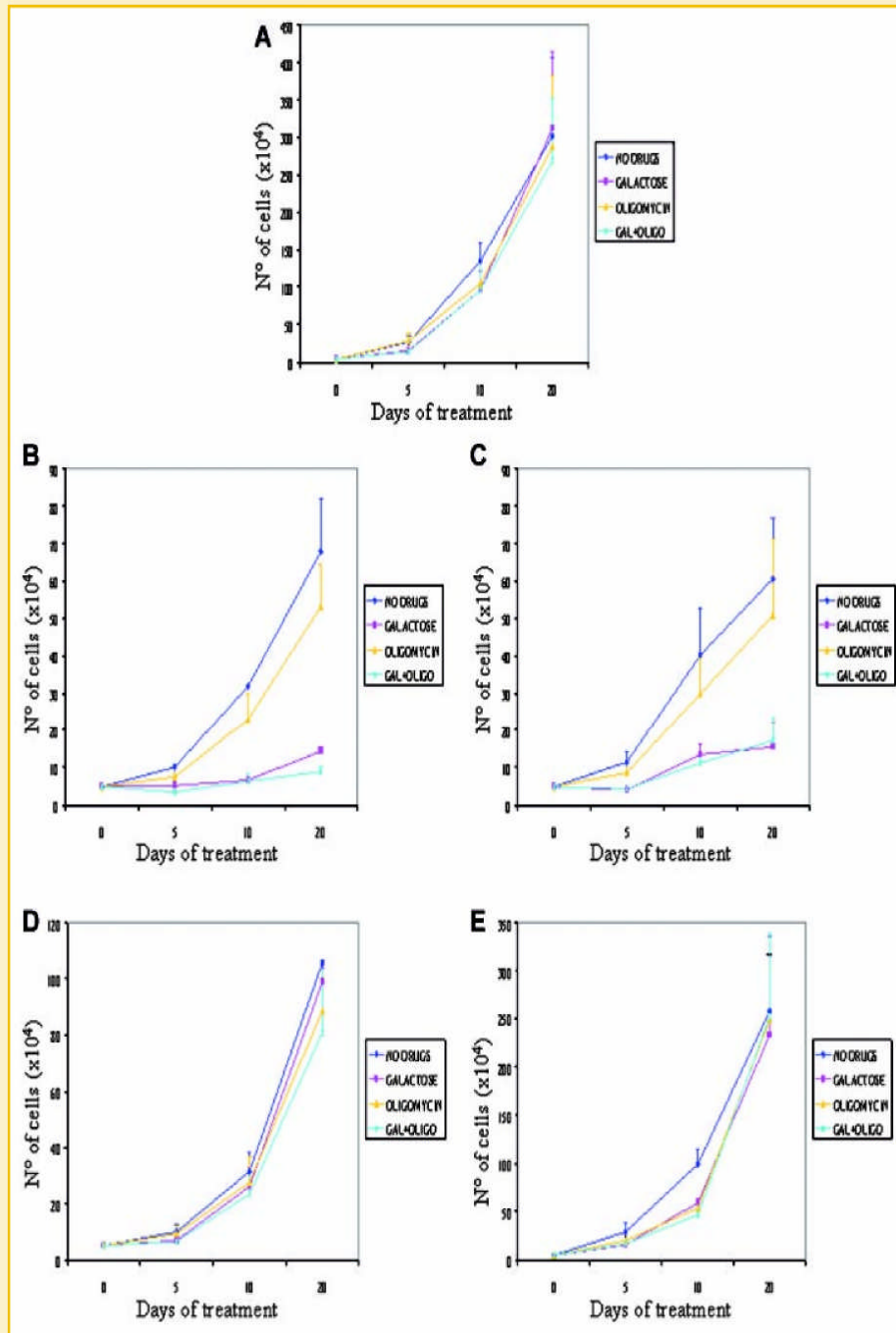


Figura 15 - Effetti del galattosio e della oligomicina sulla curva di crescita(a)controllo (b)L156R ;(c)L156P;(d) L156P. I risultati sono espressi come media di almeno tre esperimenti

4.4 SINTESI DI ATP NELLE LINEE PRIMARIE

L'attività enzimatica dell'ATP sintetasi nelle linee primarie è risultata gravemente deficitaria nelle linee cellulari con la mutazione L156R e L217R. I risultati delle attività sono riportati in tabella e graficati di seguito.

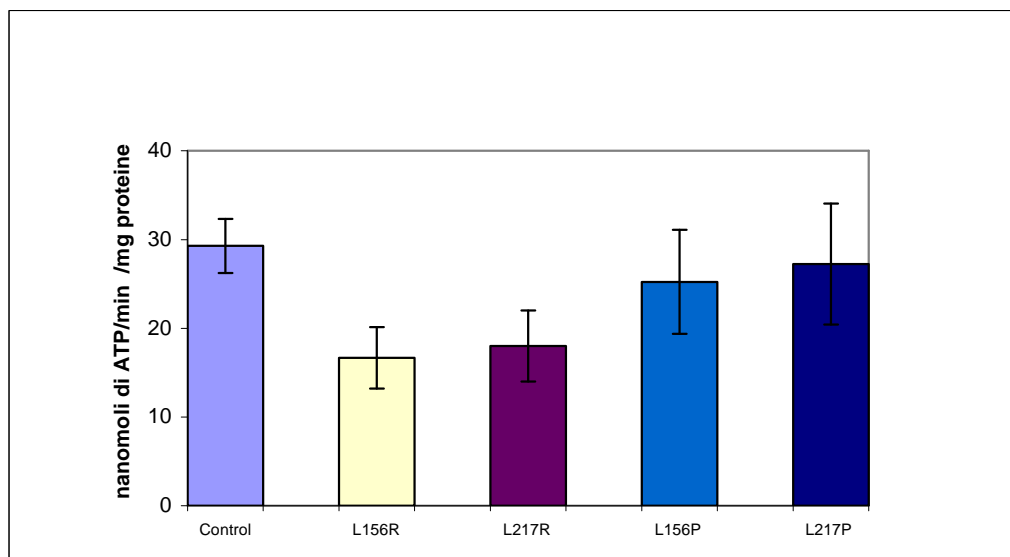


Figura 16: Sintesi di ATP nei controlli e nelle linee primarie mutate. I risultati sono espressi come media di almeno tre esperimenti

4.5 SINTESI DI ATP NEI CLONI 100% MUTATI

L'attività enzimatica dell'ATP sintetasi, quando valutata nei cloni 100% mutati, è risultata gravemente alterata nei due cloni L>R rispetto ai due cloni L>P (**Figura 17**). Infatti, le attività sono risultate pari a 22; 24; 37 e 32 nanomoli ATP/min/mg proteine, rispettivamente per i cloni L156R, L217R, L156P e L217P. L'attività della linea cellulare di controllo (Rho⁺) è risultata 57 nanomoli ATP/min/mg proteine; mentre la linea Rho^o mostrava un'attività pari a 5 nanomoli ATP/min/mg proteine. I risultati indicano che i due ibridi L156R e L217R hanno una simile attività enzimatica con una riduzione pari al 60% ($P<0.005$) quando confrontata alla linea cellulare di controllo. Nei cloni L156P e L217P, invece, è stata osservata una riduzione più lieve, pari a circa il 40% ($P<0.005$) rispetto al controllo. L'attività di sintesi di ATP è stata misurata, in tutti gli esperimenti eseguiti, anche in presenza di oligomicina, un'inibitore specifico del complesso V. Come ci si aspettava, la sintesi di ATP si riduceva oltre il 95% (.dati non mostrati).

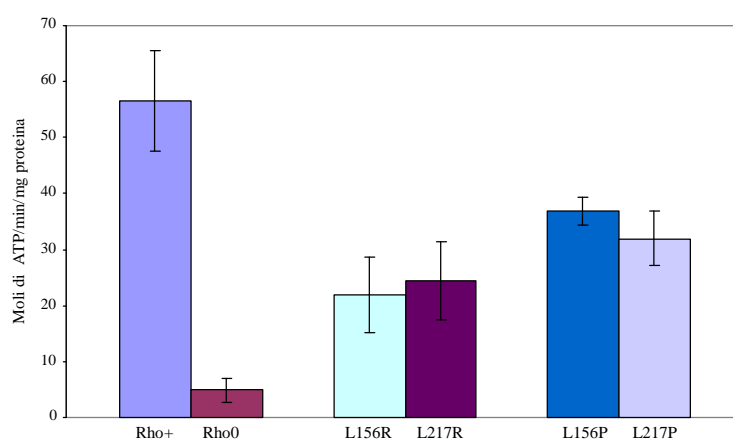


Figura 17. Sintesi di ATP nei cloni 100% mutati. I risultati sono espressi come media di almeno quattro esperimenti

4.6 SINTESI DI ATP NEI CLONI CON DIVERSA PERCENTUALE DI MUTAZIONE

Allo scopo di capire l'effetto delle mutazioni del complesso V, e di stimare l'effetto soglia delle differenti mutazioni, è stata analizzata la capacità di sintetizzare ATP dei cloni contenenti differenti percentuali delle quattro mutazioni qui studiate. Nei cloni ottenuti dai fibroblasti con mutazione L156R è stato osservato che l'attività dell'enzima ATP-sintetasi diminuisce all'aumentare della percentuale di mutazione (**Figura 18a**). I mitocondri contenenti 100% di DNA mutato mostravano il 25% della capacità di sintesi di ATP rispetto al wild-type. Comunque, l'attività del complesso V è significativamente alterata ($p < 0.01$) a partire dal clone con 50% di mutazione. I cloni con la mutazione L217R, similmente alla mutazione L156R, mostrano un decremento della sintesi di ATP con l'aumentare della percentuale di mutazione (**Figura 18b**). Viceversa, Per la mutazione L156P, noi mostriamo in questo studio, che i livelli di produzione di ATP sono simili in tutti i cloni. Infatti i cloni 100% mutati presentano il 76% dei livelli di sintesi di ATP rispetto ai mitocondri wild-type, indicando che la diversa percentuale di questa mutazione non influenza l'attività dell'enzima (**Figura 18c**). Sfortunatamente per la mutazione allelica L217P è stato disponibile solamente il clone 100% mutato.

SINTESI DI ATP NEI CLONI CON DIFFERENTE % DI MUTAZIONE

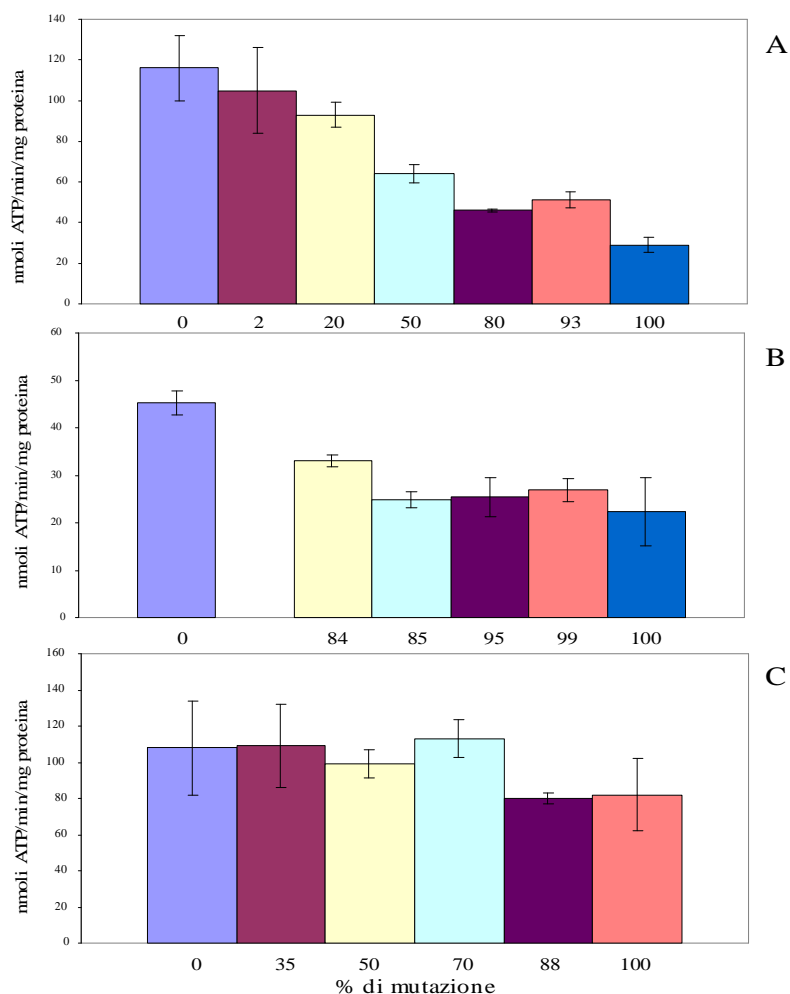


Figura 18 - Sintesi di ATP nei cloni con differente percentuale di mutazione (A), L156R; (B), L217R; (C) L156P.

4.7 IDROLISI DELL'ATP

L'idrolisi dell'ATP è stata valutata considerando l'attività della porzione dell'ATP sintetasi sensibile all'oligomicina (OS-ATPase). Mentre le linee contenenti le mutazioni L217R, L156P, e L217P mostrano una OS-ATPase simile al controllo, le cellule con la mutazione L156R mostrano una riduzione pari al 62% (**Figura 19a**) I risultati ottenuti nelle linee primarie (**Figura 19b**) si replicano nei cloni 100% mutati eccetto che per il clone L156R 100% mutato che non mostra una significativa riduzione dell'attività ATP idrolasica.

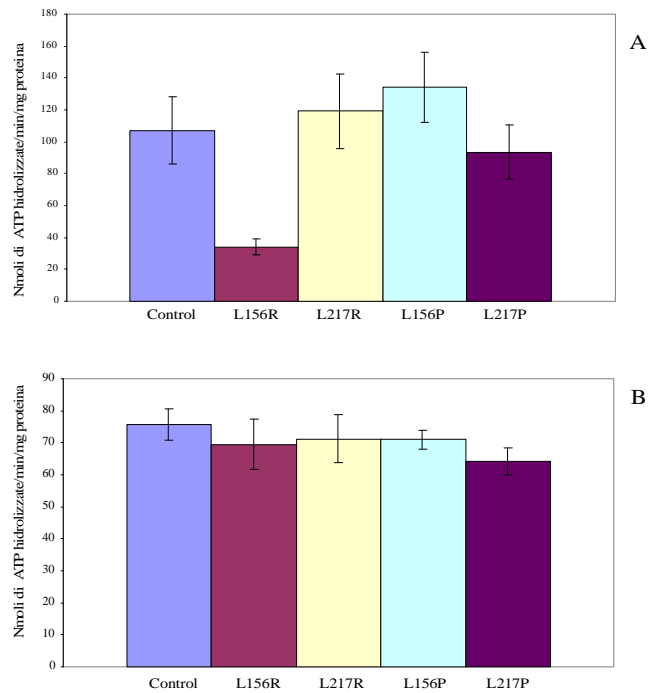


Figura 19. Effetto dell'oligomicina sulla attività dell'ATPasi nei fibroblasti(a) e nei cloni(b): L'attività idrolasica del complesso è stata valutata su mitocondri isolati dai fibroblasti mutati in presenza di 50 µg di oligomicina per mg di proteina. La media e la deviazione standard sono state eseguite su cinque esperimenti.

4.7.1 SONICAZIONE

In questa parte del lavoro è stata verificata la stabilità dell'associazione delle due porzioni F_0 e F_1 in mitocondri normali e mutati sottoposti allo stimolo meccanico della sonicazione. E' noto che la trasmissione di energia da F_0 a F_1 è indiretta ed è mediata da cambiamenti conformazionali indotti dal trasporto di protoni attraverso lo stelo (*stator stalk*) dell'enzima. Nel caso in cui lo stelo venga danneggiato da trattamenti chimici o fisici come la sonicazione, la porzione F_1 viene rilasciata, mantenendo però la sua attività idrolitica, che può essere influenzata in vario modo dall'aggiunta di oligomicina. I mitocondri ottenuti dalle linee cellulari di controllo mostrano un lieve aumento di sensibilità alla

oligomicina nei primi tempi di sonicazione (20", 30"). A 60 secondi di sonicazione la sensibilità alla oligomicina diminuisce, raggiungendo una riduzione di circa il 40% a 210 secondi di sonicazione (**figura 20a**). Le linee cellulari che presentano le mutazioni L217R, L217P e L156P, mostrano un andamento simile ai fibroblasti di controllo (**figura 20 c-d-e**). Viceversa, i fibroblasti che presentano la mutazione L156R mostrano una diminuzione della sensibilità alla oligomicina dai primi secondi di sonicazione (**figura 20 b**); infatti, a 20 secondi di sonicazione la sensibilità è ridotta di circa il 40% e si mantiene tale fino al termine della sonicazione.

Inoltre, i fibroblasti dei pazienti che presentano le mutazioni L217R, L156P e L217P mostrano un'inibizione dell'attività di idrolisi da oligomicina sovrapponibile alle linee cellulari di controllo; mentre nei fibroblasti con la mutazione L156R (T8993G) si riscontra una minore sensibilità all'oligomicina (**Figura 20b**). Questo risultato potrebbe essere la conseguenza di un danno nell'assemblaggio dell'enzima, in particolare nell'interazione tra F_0 e F_1 , essendo il legame dell'oligomicina influenzato dallo stato funzionale dell'ATPasi. Quindi i nostri risultati suggeriscono che la sostituzione nell'ATPasi 6 dell'aminoacido normale (Leu) con uno mutato (in particolare arginina) produce cambiamenti conformazionali della porzione F_0 dell'enzima, i quali a loro volta influenzano l'interazione con la porzione F_1 .

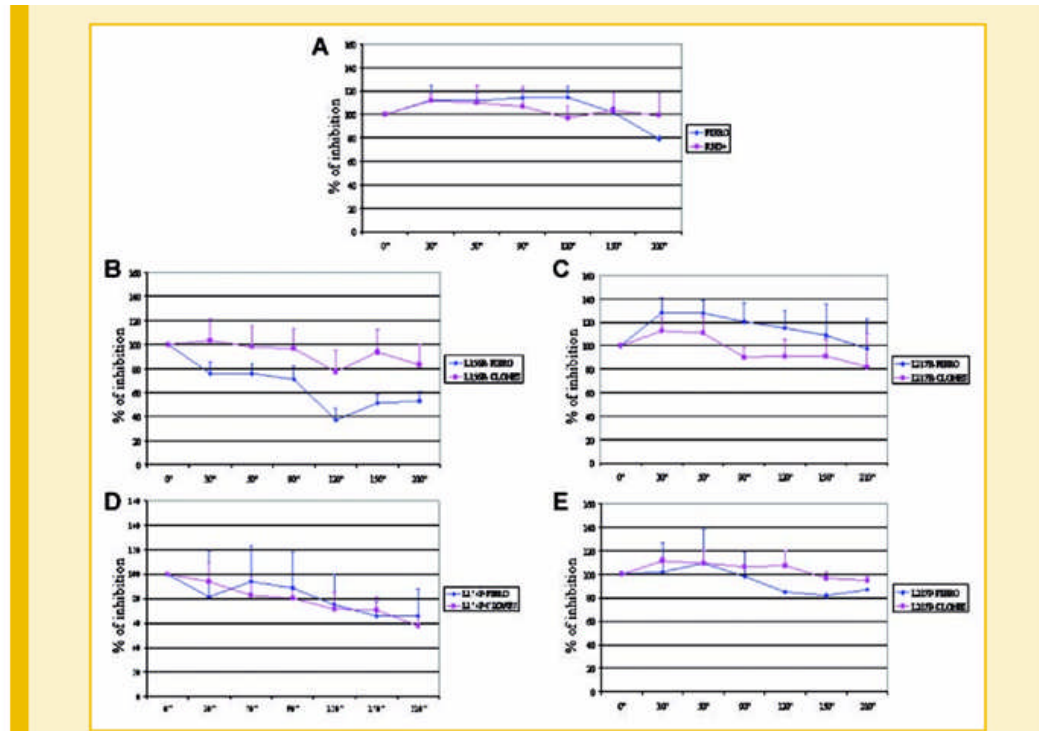


Figura 20. Effetto della sonicazione sulla sensibilità dell' ATPase all' oligomicina nelle linee primarie: (A), controllo; (B), L156R; (C),L217R; (D), L156P; (E), L217P. Le medie si riferiscono a quattro esperimenti.

4.8 INDAGINE APOPTOTICA

4.8.1 Caratterizzazione di base

La microscopia a contrasto di fase (**Fig. 21a**) ha messo in evidenza che la morfologia dei due cloni era sovrapponibile a quella del controllo. Per quanto riguarda l'ultrastruttura dei mitocondri (**Fig. 21b**) è stato osservato che le RhO+ avevano un'organizzazione mitocondriale regolare con creste parallele ed una matrice uniforme e densa, mentre i cloni mostravano delle importanti modificazioni. In particolare, nel clone A è stato visto che la maggior parte dei mitocondri erano caratterizzati da una matrice condensata e da creste dilatate, inoltre alcuni di loro presentavano una elettrodensità non uniforme con zone centrali più rarefatte ed una disposizione circolare delle creste. In aggiunta il

clone A presentava numerosi granuli elettrodensi nel citoplasma simili a depositi di "lipofuscina". I mitocondri del clone B mostravano una riduzione delle creste che erano dislocate per lo più alla periferia ma non presentavano accumuli di granuli citoplasmatici di " lipofuscina".

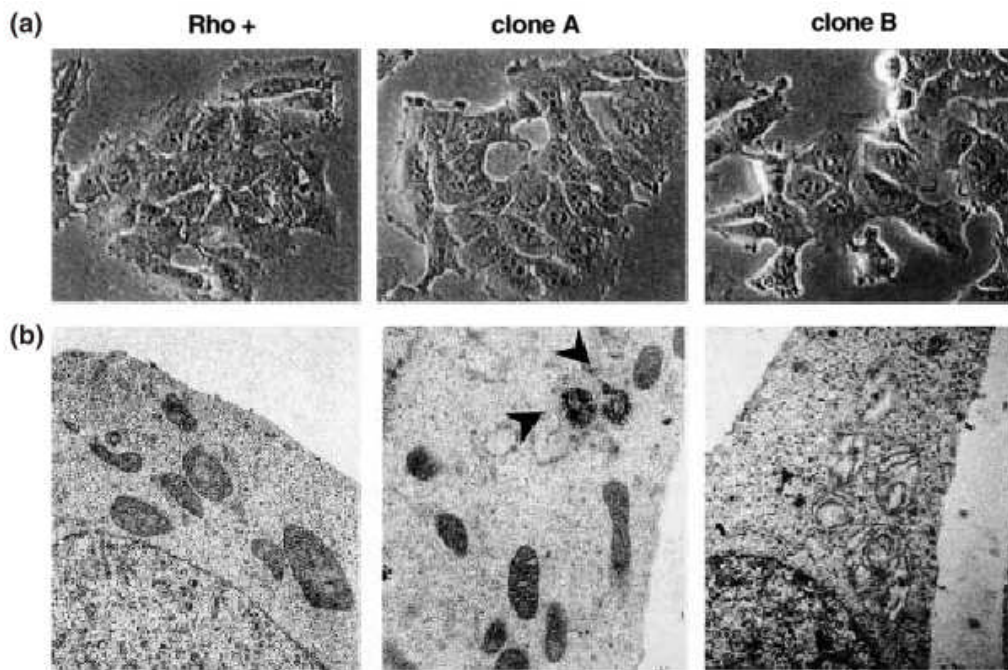


Figura 21a-b - Caratterizzazione di base della linea parentale e dei ibridi: a)microscopia a contrasto di fase (800x) b) Microscopia elettronica dei mtocondri (10,000x) delle Rho+ (pannello di sinistra), clone A (pannello centrale), clone B (pannello di destra).

Le drammatiche modificazioni osservate nella ultrastruttura dei mitocondri erano associate alle alterazioni della polarizzazione osservata con il colorante JC-1. L'analisi dello stato di polarizzazione mitocondriale (**Fig. 21c**), mostra un peculiare stato di iperpolarizzazione in entrambi i ibridi. E' noto che lo stato di iperpolarizzazione mitocondriale è correlato all'anormale attività dell'ATPasi, dovuta alla mutazione nella subunità 6 di questo complesso enzimatico che è incapace di utilizzare il gradiente protonico prodotto dalla catena respiratoria. Lo stato di iperpolarizzazione è stato confermato attraverso

l'analisi quantitativa del TMRM (**Fig. 21d**), una sonda del gradiente protonico alternativa al JC-1. E' stato visto che lo stato di polarizzazione aumenta di circa il 63% nel clone A e del 26% nel clone B rispetto alla linea parentale. Abbiamo inoltre verificato che tale incremento è causato da uno stato di reale iperpolarizzazione dei mitocondri e non da un incremento dell'incorporamento del colorante come conseguenza dell'incremento del numero dei mitocondri. Infatti l'analisi citofluorimetrica utilizzando la sonda NAO (**Fig. 21e**) ha chiaramente indicato che la massa mitocondriale era sostanzialmente simile in tutti i campioni analizzati.

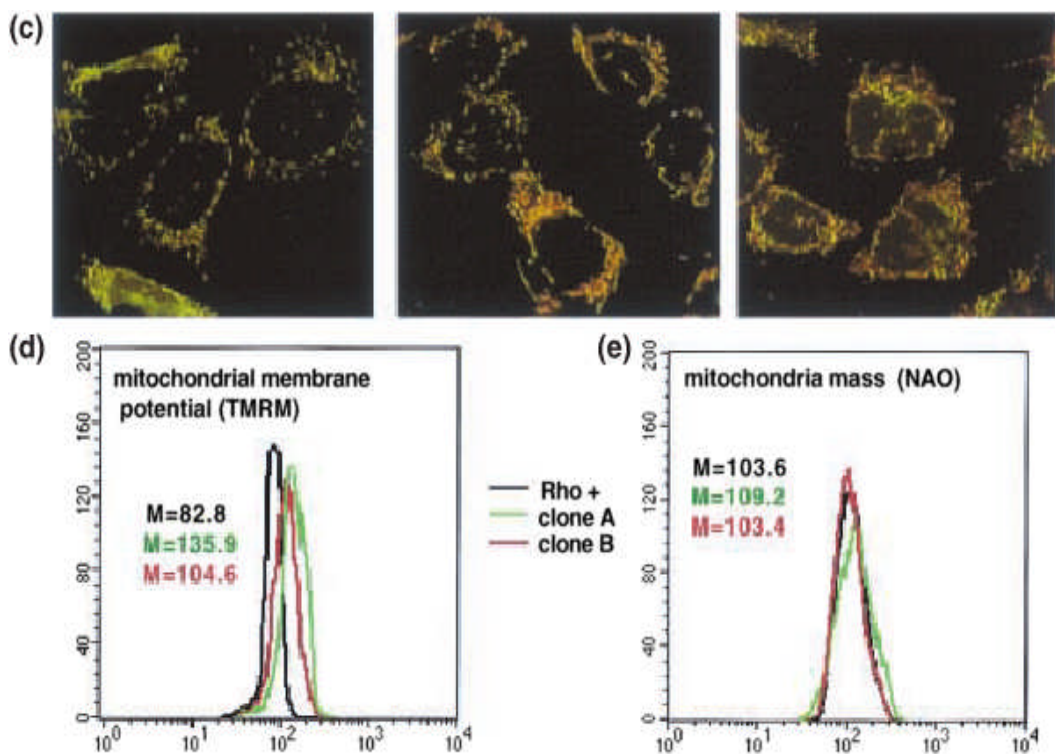


Figura 21c-d-e:Caratterizzazione di base della linea parentali e dei ibridi:c)analisi qualitativa del potenziale di membrana eseguita con un microscopio a fluorescenza dopo colorazione con JC-1(1,500X). d)analisi quantitativa del potenziale di membrana eseguita con un citofluorimetro dopo colorazione con TMRM.e)analisi quantitativa della massa mitocondriale eseguita mediante citofluorimetro dopo colorazione con NAO

L'analisi di Western-blotting (**Figura 22**) per Hsp70, Hsp60, Bcl-2, Mn-SOD e Cu,Zn-SOD è stata eseguita su entrambi i cloni e sulla linea parentale 143B Rho+.

Le singole proteine sono state normalizzate usando la porina come controllo. Nessuna differenza è stata osservata per la proteina Hsp70 (**Figura 22a**) e per le proteine SOD (**Figura 22d**). Al contrario una leggera riduzione è stata osservata nel clone B per la proteina per l'HSP60 (32%, **Figura 22b**) e per la proteina BCL2 (28%, **Figura 22c**).

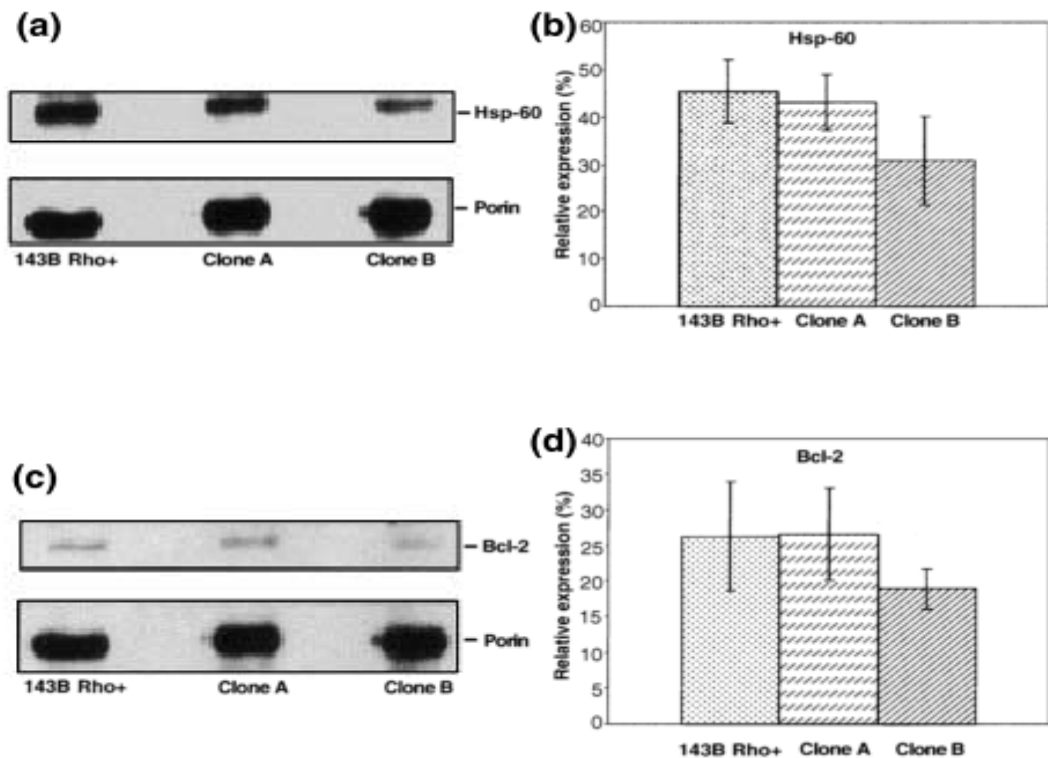


Fig.22:Valutazione delle proteine coinvolte nell'apoptosi mediante western blotting.a e c)Western Blot ; b e d)analisi densitometrica

4.8.2 Suscettibilità dei cloni all'apoptosi

Per valutare il fenomeno apoptotico nei cloni A e B mutati nel gene dell'ATPasi 6 sono stati usati diversi stimoli apoptotici: Fas, TRAIL, TNF- α e STS. Come mostrato in **figura 23a** tutte le linee cellulari mostrano un basso livello di apoptosi in seguito al trattamento con Fas e TRAIL. Al contrario sia TNF- α che

STS si sono rivelati degli effettivi induttori di apoptosi, sebbene in grado differente. TNF- α è un induttore d'elezione per il clone A (+96% rispetto alle 143BRho+) mentre la STS è un induttore egualmente efficace sia per il clone A (+68%) che per il clone B (+52%). A differenza della differente suscettibilità all'apoptosi mostrata dalle varie linee cellulari, il pathway coinvolto nell'attivazione sembra essere lo stesso in quanto è caspasi dipendente. Infatti ZVAD, un inibitore di tutte le caspasi è in grado di ridurre significativamente gli effetti dei due induttori di apoptosi TNF- α e STS (**figura 23b**). Inoltre LEHD-CHO (uno specifico inibitore della caspasi9) e DEVD-CHO (uno specifico inibitore della caspasi 3)- ma non IETD-CHO (uno specifico inibitore della caspasi 8)- riducevano significativamente la morte cellulare, suggerendo che la caspasi 9 è un iniziatore e la caspasi 3 un esecutore dell'apoptosi indotta da TNF- α . Simili risultati sono stati ottenuti sulle cellule trattate con STS. (**figura 23c**).

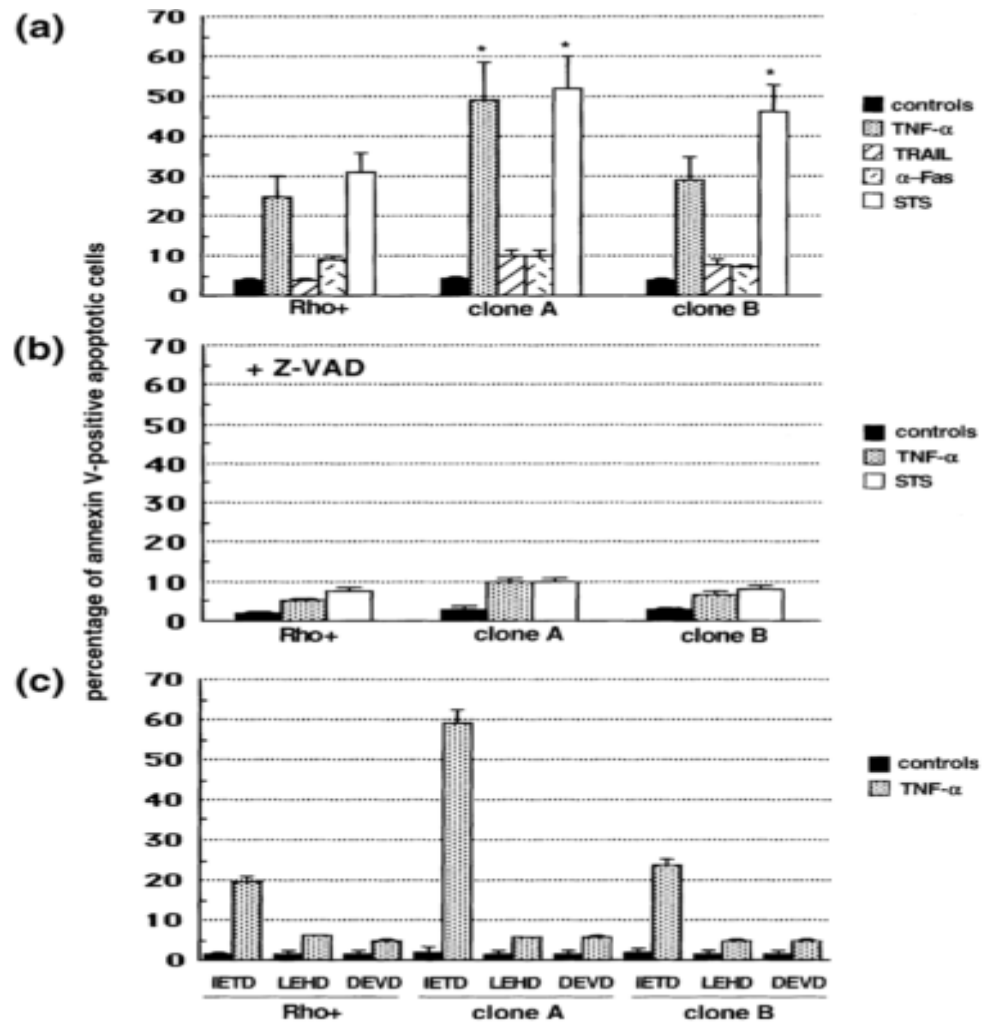


Fig.23 Analisi del fenomeno apoptotico: analisi quantitativa delle cellule apoptotiche mediante citofluorimetro dopo doppia colorazione con AnnessinaV-FITC/ioduro di propidio nel controllo e nei cloni.a) dopo differenti stimoli apoptotici;b) dopo pretrattamento con un inibitore delle caspasi ZVAD prima del trattamento con TNF- α e STS. c) dopo pretrattamento con IETD-CHO (inibitore della caspasi 8), LEHD-CHO (un inibitore della caspasi 9), DEVD-CHO (un inibitore della caspasi 3) seguito da trattamento con TNF- α . La percentuale di cellule positive per annessina-V è stata calcolata e data da un amedia di sei esperimenti indipendenti *p<0.01 rispetto alle linee di controllo.

4.8.3 Ruolo dei mitocondri nell' apoptosi

Un calo nel potenziale di membrana mitocondriale, la formazione di un megaporo mitocondriale, e il conseguente rilascio di citocromo C sono generalmente considerati importanti eventi nell'apoptosi mediata dai mitocondri. La relazione tra l' apoptosi indotta da TNF- α e STS e il calo di potenziale della membrana mitocondriale è illustrato in figura 2A. Nelle cellule trattate con TNF-

α , il clone A mostra un più profondo calo rispetto al clone B (vedere i numeri nei quadranti III, nel pannello centrale). Dopo induzione con STS, il potenziale di membrana mitocondriale scende ad un livello simile in entrambi i cloni (vedere i numeri nel III quadrante, pannello di destra). Questo ben si accorda con i dati in **figura 24**: cioè l'aumento di cellule depolarizzate si associa ad un aumento dell'apoptosi. Inoltre, il decremento del potenziale di membrana ben si correla anche con il rilascio di citocromo C nel citosol (**figura 25**). In particolare, il clone A presenta un incremento della concentrazione citosolica di citocromo C sia dopo trattamento con TNF- α (+77%) che dopo trattamento con STS (+83%). Invece, il clone B mostra un significativo rilascio di citocromo C solo in seguito al trattamento con STS (+62%); il trattamento con TNF- α è meno efficace (+21%).

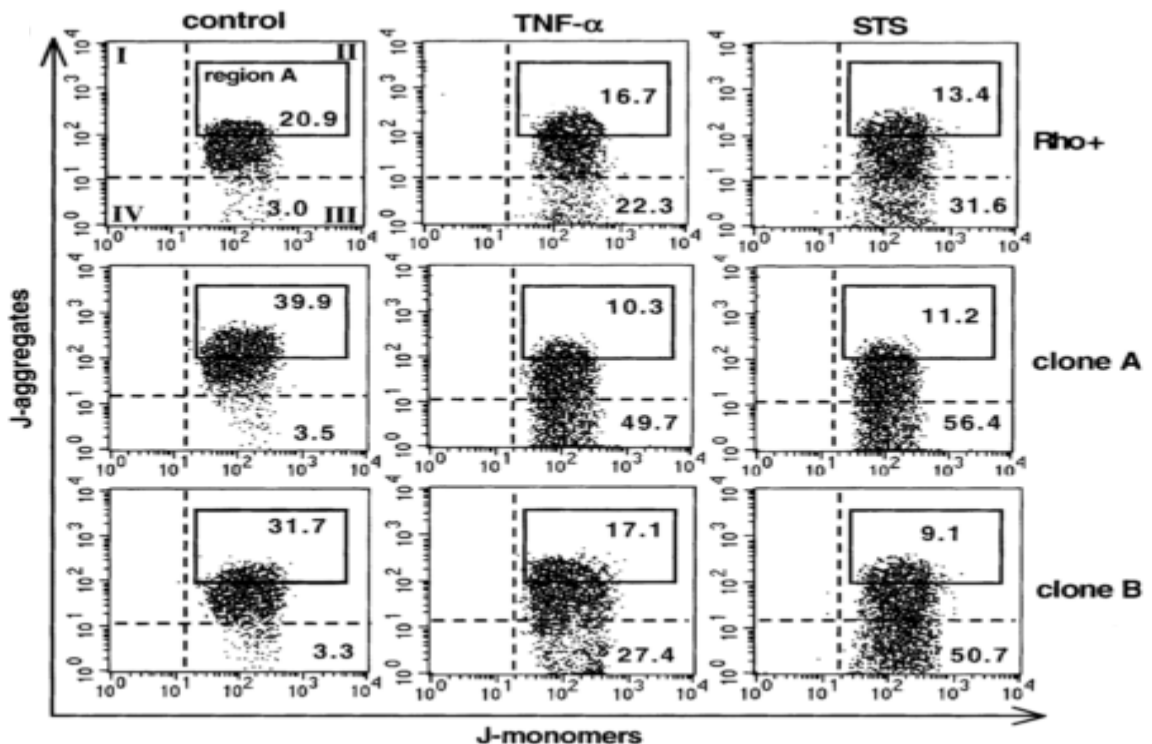


Fig.24 Analisi degli eventi mitocondriali durante l'apoptosi: misura del potenziale di membrana ottenuta mediante analisi citofluorimetrica in seguito colorazione con JC-1. pannello di sinistra, cellule di controllo non trattate; pannello centrale, cellule trattate con TNF- α ; pannello di destra, cellule trattate con STS. La regione A indica la percentuale di cellule che esprimono fluorescenza rossa (che corrisponde agli aggregati -J) che solitamente aumenta quando la membrana mitocondriale diventa iperpolarizzata. I numeri nel quadrante III si riferisce alla percentuale di cellule con mitocondri depolarizzati

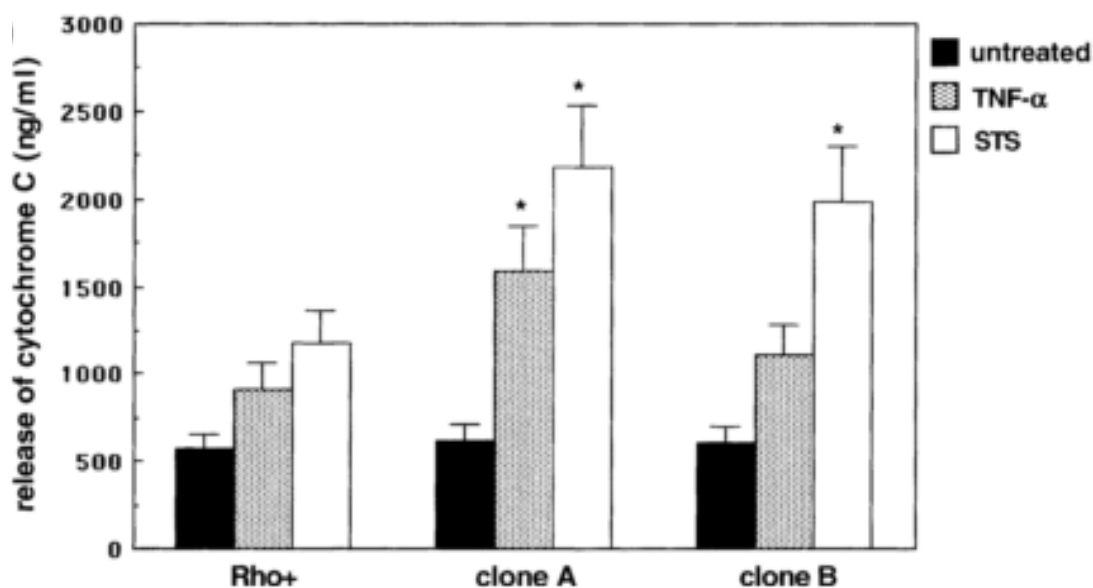


Figura 25 - Rilascio di citocromo c eseguito mediante ELISA ed espressi come ng/ml . I risultati sono espressi come media di quattro esperimenti.* $p < 0.01$

Usando il BA, un inibitore del passaggio attraverso i pori mitocondriali, tutte le cellule (controllo e cloni) mostrano una minore depolarizzazione mitocondriale nonostante i vari stimoli apoptotici (paragonare **figura 26a** con la **figura 24**, quadrante III). Inoltre il trattamento con BA mostra un significativo ($p < 0.01$) effetto antiapoptotico su tutte le linee cellulari (paragonare la **figura 26b** con la **figura 23a**).

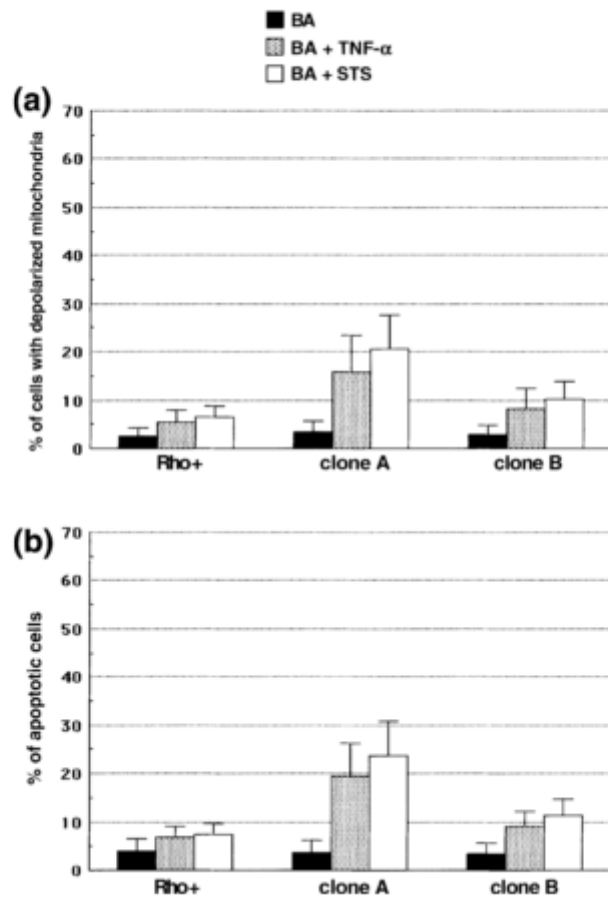


Figura 26 - Analisi del fenomeno apoptotico dopo trattamento con BA: a) percentuale di cellule con mitocondri depolarizzati (come rivelato dall'indagine citofluorimetrica mediante JC-1) e b) percentuale di cellule apoptotiche positive all'annessina-V (come rivelato dall'analisi citofluorimetrica) nelle di controllo, nel clone A, e nel clone B, trattati con TNF- α oppure STS in presenza di BA. I risultati sono espressi come media di quattro esperimenti indipendenti.

4.8.4 Ruolo del potenziale di membrana nella sensibilità apoptotica

Allo scopo di valutare se lo stato di iperpolarizzazione trovato nei mitocondri dei ibridi potrebbe essere responsabile della loro incrementata suscettibilità apoptotica, noi abbiamo pretrattato le cellule con due differenti agenti mitocondriotropici capaci di modulare il potenziale di membrana mitocondriale. Usando FCCP, che è capace di ridurre il gradiente protonico mitocondriale, è stata osservata una significativa riduzione del numero di cellule

con un alto potenziale di membrana nelle cellule 143Brho+, nel clone A, e nel clone B. In particolare il potenziale di membrana cala da 20.9% a 9.9 % nelle 143Brho+. Nei cloni A e B, il calo del potenziale di membrana era persino più elevato (da 39.9% a 12.4% nel clone A, e da 31.7% a 12.9% nel clone B). Questi risultati possono essere meglio compresi paragonando la regione A nel pannello di sinistra della **figura 27a** (pannello di sinistra) con la stessa regione in **figura 25a**. Dopo il trattamento pro-apoptotico, le cellule pretrattate con FCCP mostravano una significativa riduzione del numero di cellule con mitocondri depolarizzanti, come può essere visto paragonando i quadranti III nei pannelli centrali e di destra della **figura 27a** con la stessa regione della **figura 25a**. Di conseguenza FCCP era in grado di ridurre significativamente l'effetto pro-apoptotico indotto da TNF- α e da STS (paragonare **figura 27b**, con **figura 23a**). Utilizzando OLM, uno specifico inibitore della componente F₀ della ATPasi, è stato osservato un significativo incremento dei mitocondri iperpolarizzati. Il potenziale di membrana mitocondriale incrementa da 20.9% a 42.2% nelle 143Brho+, da 39.9% a 44.3% nel clone A, da 31.7% a 40.7% nel clone B (paragonare la regione A del pannello di sinistra della **figura 28a** con la con la stessa regione nella **figura 25a**). Dopo il trattamento pro-apoptotico, le cellule pretrattate con OLM mostravano una più alta percentuale di mitocondri depolarizzanti (paragonare il quadrante III nei pannelli centrali e di destra della **figura 28a** con le equivalenti regioni in **figura 25a** ed un parallelo significativo incremento nel numero di cellule apoptotiche.

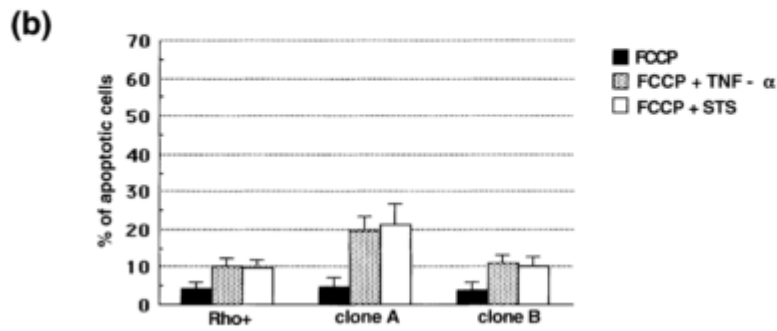
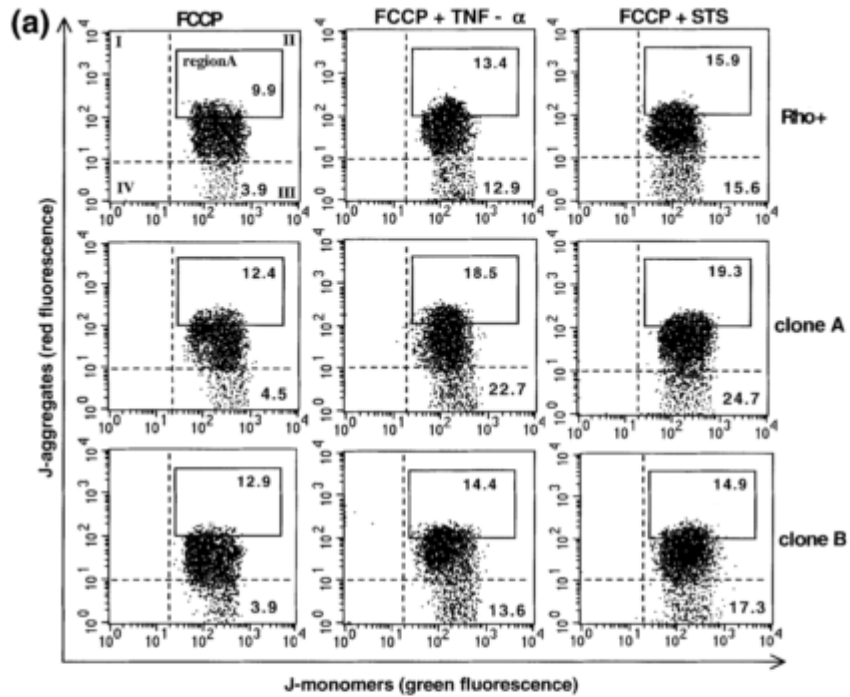


Fig.27 Modulazione dell'apoptosi mediante FCCP.(a)misura del potenziale di membrana, ottenuto mediante indagine citofluorimetrica con JC-1 sulle cellule di controllo (prima riga), clone A(seconda riga) e il clone B (terza riga) dopo trattamento con FCCP (pannello di sinistra); FCCP e quindi con TNF- α (pannello centrale). I valori nella regione A indicano la percentuale di cellule che esprimono un intensa fluorescenza rossa (corrispondente agli aggregati-J), che solitamente incrementa quando la membrana mitocondriale diventa iperpolarizzata. I numeri nel quadrante III si riferiscono alla percentuale di cellule con mitocondri depolarizzati. (b) La percentuale di cellule apoptotiche positive all' annessina -V è stata ottenuta mediante citofluorimetria. I valori sono espressi come media \pm SD di quattro esperimenti indipendenti.

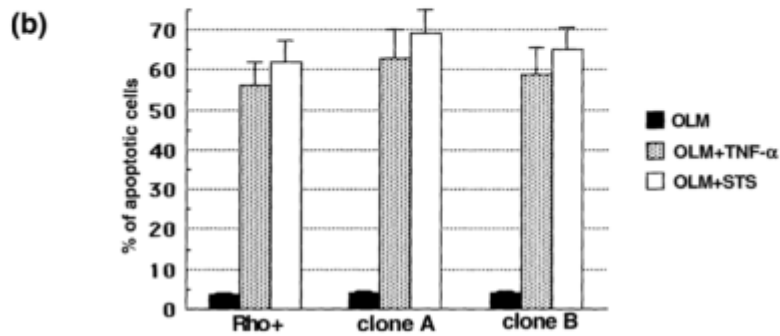
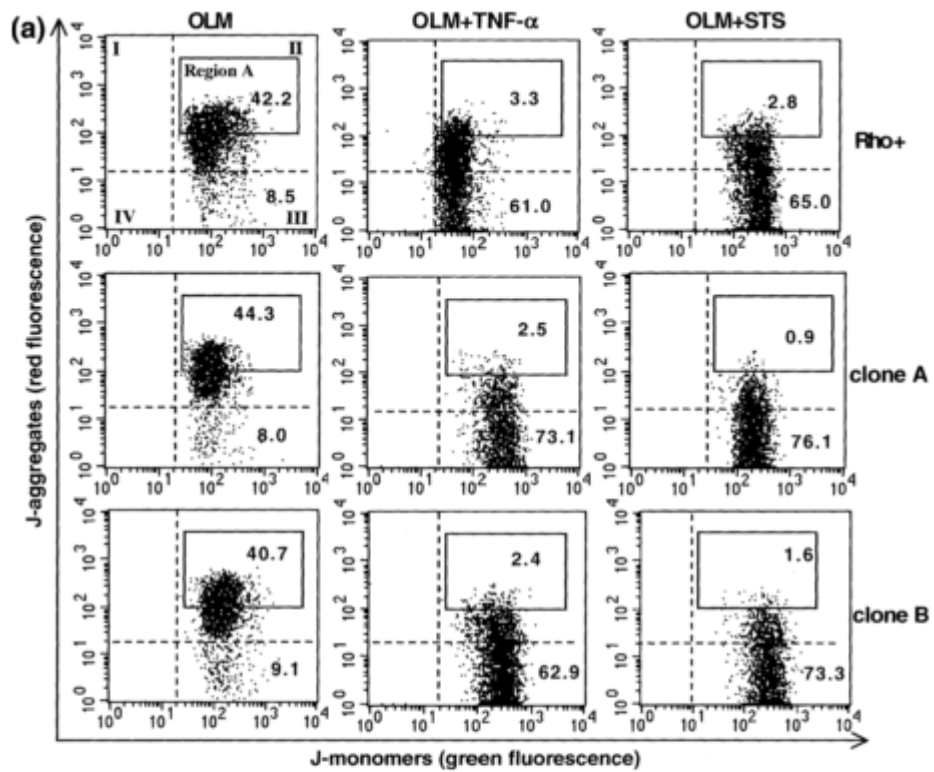


Figura 28 - Modulazione dell'apoptosi mediante OLM. (a) misura del potenziale di membrana, ottenuto mediante indagine citofluorimetrica con JC-1 sulle cellule di controllo (prima riga), clone A (seconda riga) e il clone B (terza riga) dopo trattamento con OLM (pannello di sinistra); OLM e quindi con TNF- α (pannello centrale). I valori nella regione A indicano la percentuale di cellule che esprimono un'intensa fluorescenza rossa (corrispondente agli aggregati-J), che solitamente incrementa quando la membrana mitocondriale diventa iperpolarizzata. I numeri nel quadrante III si riferiscono alla percentuale di cellule con mitocondri depolarizzati. (b) La percentuale di cellule apoptotiche positive all'annexina-V è stata ottenuta mediante citofluorimetria. I valori sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

5 DISCUSSIONE

Le encefalomiopatie mitocondriali rappresentano un gruppo di malattie estremamente eterogeneo ed in continua crescita sia per il sempre maggiore numero di fenotipi clinici descritti che per le conoscenze delle basi molecolari che le sottendono. Esse sono, collettivamente, il risultato di una diminuita capacità da parte dei mitocondri di soddisfare le richieste energetiche della cellula, a causa per lo più della ridotta attività enzimatica della catena respiratoria e la conseguente compromessa produzione di ATP intracellulare.

In questo studio sono state indagate le conseguenze patogenetiche delle quattro mutazioni più frequentemente associate alla NARP/MILS - T8993G (L156R), T9176G (L217R), T8993C (L156P) e T9176C (L217P) - nel gene mitocondriale ATPasi 6, che codifica per una subunità del complesso V. La F₁F₀-ATP sintetasi (complesso V) è un enzima ubiquitario, presente nelle membrane dei batteri, dei cloroplasti e nella membrana interna dei mitocondri dove sintetizza

ATP, l'ultimo step della fosforilazione ossidativa (Garcia, 2002). L'enzima è costituito da due subcomplessi F_0 e F_1 . L'attività catalitica dell'enzima è localizzata nella porzione F_1 , che è estrinseca alla membrana ed utilizza il gradiente protonico per convertire ADP in ATP e viceversa; la subunità F_0 si trova nella membrana mitocondriale interna e permette il flusso di protoni dallo spazio intermembrana alla matrice (Souid, 1994; Garcia & Capaldi, 1998; Souid & Penefsky, 1995). Valutando la capacità duplicativa delle cellule in terreno standard, abbiamo potuto osservare che i fibroblasti di pazienti con la mutazione T->G, crescono con maggiore difficoltà rispetto a quelli con la mutazione T->C ed ai fibroblasti di controllo. Questa condizione si aggrava ulteriormente quando le cellule vengono sottoposte a stress, come la sostituzione del glucosio con il galattosio, un metabolita che entrando nella glicolisi più a valle, fornisce un numero minore di molecole di ATP e mette in evidenza i danni a carico della catena respiratoria. L'attività del complesso V, in termini di sintesi ed idrolisi, della catena respiratoria è stata valutata sui mitocondri ottenuti sia dai fibroblasti omoplasmici per le quattro mutazioni, che da cloni a diversa percentuale di mutazione. Tali indagini, effettuate mediante metodiche di tipo spettrofotometrico, hanno confermato la gravità delle mutazioni T->G rispetto alle varianti alleliche in entrambi i tipi cellulari. L'utilizzo inoltre di cloni a diversa percentuale di mutazione, ha consentito di determinare la "soglia" del fenotipo patologico per le mutazioni T->G.

L'utilizzo inoltre di un sistema cellulare detto di ibridi transmitocondriali, ottenuti dalla fusione dei fibroblasti contenenti le quattro mutazioni con cellule Rho⁰, cellule di osteosarcoma umano prive di mtDNA ha consentito di

determinare la “soglia” del fenotipo patologico. Tale sistema ha inoltre il vantaggio di immortalizzare il genoma mitocondriale dei pazienti ed analizzare l’attività respiratoria in un “background” nucleare neutrale. Inoltre consente di ottenere elevate quantità di materiale geneticamente omogeneo, cloni a diversa percentuale di mutazione.

E’ stato riportato che l’oligomicina inibisce l’attività dell’ATPasi causando un cambiamento conformazionale nel settore F₀ del complesso che è trasmessa ad F₁, il che porta ad un alterato legame del substrato al sito catalitico (Penefsky, 1985). Noi abbiamo studiato l’effetto dell’oligomicina e della sonicazione sull’attività dell’ATPasi nelle cellule primarie e nei cloni. I nostri risultati suggeriscono che le linee primarie con la mutazione L156R esibiscono una porzione F₁ debolmente legata alla membrana poiché l’attività idrolitica non è pienamente sensibile alla oligomicina e poiché a 20” di sonicazione l’ATPasi diventa insensibile all’inibitore, probabilmente per il dovuto rilascio della porzione F₁ dalla membrana. Questo non è il caso delle altre mutazioni che mostrano un comportamento simile al controllo. Questi dati sono in accordo, con precedenti osservazioni in cui particelle submitocondriali con mutazione L156R mostrano un’inibizione da oligomicina in termini di attività idrolasica di soli 20% rispetto ai controlli [Vazquez-Memije et al., 1998; Cortes-Hernandez et al., 2007], ed un enzima più labile [Sgarbi et al., 2006]. Pertanto il cambio amminoacidico in posizione 156 risulta essere più severo rispetto al residuo 217. Si può tentare di spiegare queste scoperte analizzando le caratteristiche del modello strutturale proposto a-c coupling F₁F₀-ATP synthase [Rastogi and Girvin, 1999]. Secondo questo modello, l’interazione tra i residui R159 (nella subunità a) e E58 (nella

subunità c), sembra essere cruciale per il flusso protonico, per il movimento dell'anello costituito dalle subunità c, ed il cambiamento conformazionale delle subunità α e β , e alla fine per la sintesi di ATP. Le nostre scoperte suggeriscono che alcune differenze, sito correlate, potrebbero essere considerate fondamentali tra le due mutazioni "G". L'amminoacido L156R crea un contatto diretto a-c interelica con A 50 e si trova vicinissimo al residuo R159, con cui forma anche un importante contatto interelica con Q10. Invece, il residuo L217 è vicino al residuo Q210 e interagisce solo indirettamente con R159. La sostituzione di un amminoacido di tipo neutro (leucina) altamente conservato con un amminoacido basico (arginina) ad entrambi i siti, diminuisce l'efficienza dell' ATP sintesi a causa di un danneggiamento del flusso protonico attraverso la porzione F0 dell'enzima. Comunque, la stretta vicinanza dell'amminoacido mutato R156 all'amminoacido R159 probabilmente indebolisce la connessione di E58 e Q210 a R159 e produce un fenotipo più severo dovuto ad un inappropriata interazione, seguita da una ridotta rotazione tra a e c. Le due mutazioni "P" sebbene meno severe, sono anch'esse in grado di compromettere la produzione di ATP e la capacità di crescita. In questo caso è meno semplice spiegare come la sostituzione della leucina con la prolina possa portare al danno osservato nelle linee cellulari che presentano questo tipo di mutazione. Si può tentare di immaginare che l'enzima mutato risulti in un canale protonico distorto, ma parzialmente funzionante, e che ritarda in qualche modo sia il flusso protonico attraverso la porzione F0 oppure il contatto A6-c, oppure entrambi. Sotto questa ipotesi, la sostituzione dell' amminoacido 156 produce un danno maggiore rispetto all'amminoacido 217, come mostrato adottando il modello dell' ATP asi in figura.

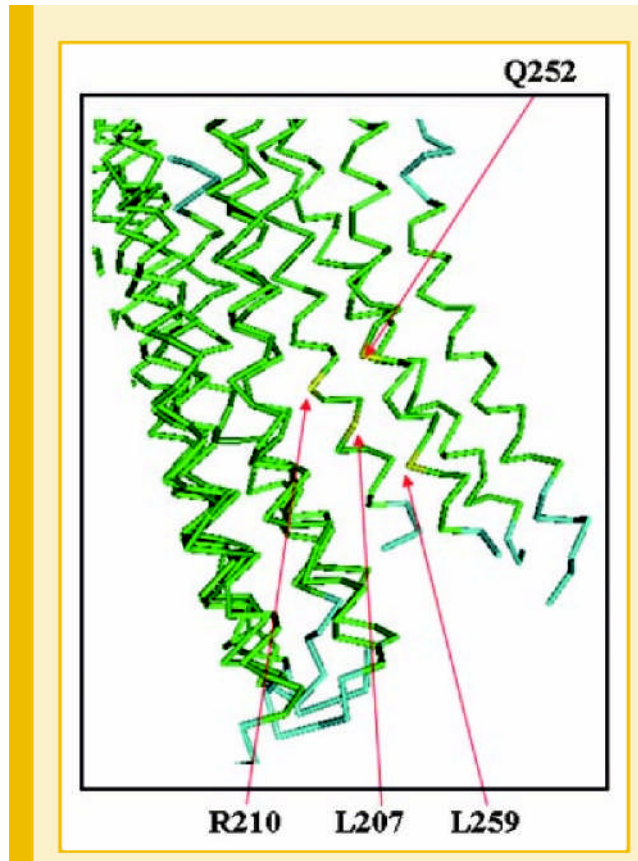


Figura 29 - modello strutturale proposto a-c coupling F1F0-ATP synthase [Rastogi and Girvin, 1999].

(<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui>; <http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED>;
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>).

Inoltre noi abbiamo i Noi abbiamo indagato se le due mutazioni patogenetiche del mtDNA, L217R e L156R, associate con la MILS e con un difetto simile di sintesi di ATP, potessero rendere le cellule più sensibili all'apoptosi. I risultati ottenuti suggeriscono che entrambe le mutazioni rendono le cellule più suscettibili all'apoptosi se opportunamente stimolate. Sia TNF- α sia STS sono in grado di indurre, anche se in grado differente, il rilascio di citocromo C nel citosol e il coinvolgimento delle caspasi 9 e 3, con conseguente aumento

dell'apoptosi. Il fenomeno è mediato dal potenziale di membrana mitocondriale, come dimostrato dalle sue modificazioni dopo pre-trattamento con FCCP o Oligomicina.

Il clone A, che porta la mutazione L127R, mostra un fenotipo morfologico "senescente", uno stato di iperpolarizzazione della membrana mitocondriale più evidente ed è preferenzialmente indotto all'apoptosi da TNF- α , con una risposta più alta rispetto al clone B che porta la mutazione L156R.

La diversa risposta dei due cloni agli stimoli apoptotici potrebbe essere riferita al differente meccanismo con cui operano le due mutazioni. Infatti precedenti risultati su *Escherichia coli* e i dati presentati in questo lavoro suggeriscono un differente meccanismo d'azione delle due mutazioni; un blocco della rotazione della subunità c per la mutazione L207R, mentre un difettoso assemblaggio del complesso enzimatico per la mutazione L156R.

Ci sono due pathways principali attraverso cui l'apoptosi può essere indotta: una è esemplificata dall'attivazione della caspasi 8 mediata da Fas; la seconda prevede il coinvolgimento del pathway della caspasi 9 la cui cascata è mediata dai mitocondri. Entrambi i pathways convergono sull'attivazione della caspasi 3, che porta alla degradazione nucleare e a cambiamenti della morfologia cellulare. Alcune linee di evidenze indicano che nei nostri modelli sperimentali, l'apoptosi indotta da TNF- α , coinvolge specificatamente il pathway mitocondriale. Questo è caratterizzato da un decremento del potenziale di membrana mitocondriale e conseguente rilascio di citocromo c. Una volta rilasciato nel citosol, il citocromo c si lega ad Apaf-1 che promuove l'oligomerizzazione e l'attivazione della caspasi

9. Il coinvolgimento del pathway mitocondriale, può indurre la traslocazione delle proteine quali bcl-2 e Hsp 60 dal citosol ai mitocondri, dove esse possono agire come effettori antiapoptotici (Reed 1997; Adams and Cory 1998; Adrain and Martin 2001). E' ben documentato che il decremento dell' espressione delle proteine Bcl-2 ed Hsp-60 porti ad un incremento della suscettibilità all'apoptosi. E' stato dimostrato che l'overespressione di Bcl-2 può incrementare il metabolismo energetico nei mitocondri con deficit della catena respiratoria, proponendo per Bcl-2 un effetto protettivo più in generale che non limitatamente alle sole proprietà antiapoptotiche (Manfredi 2003). I nostri risultati, che indicano una espressione più bassa, nonostante, un fenotipo apoptotico relativamente più lieve, nel clone B, supportano la nozione che Bcl-2 non è un effettore puramente antiapoptotico e potrebbe anche avere un effetto protettivo più in generale sui mitocondri modulando un loro adattamento agli stress metabolici. E' stato proposto che lo stato di iperpolarizzazione mitocondriale è sia un evento iniziale del processo apoptotico (Gross 2000, Kroemer and Reed 2000) oppure una condizione che porta la cellula alla morte (Gross 2000, Matarrese 2003). In questo studio noi abbiamo dimostrato per la prima volta che il costitutivo stato di iperpolarizzazione dei mitocondri nelle cellule mutate innesca l'apoptosi. Il ruolo cruciale giocato dall' iperpolarizzazione della membrana mitocondriale nell' innescare l' apoptosi viene anche confermato nei nostri sistemi, dagli effetti di FCCP e OLM. Entrambi i composti inibiscono la produzione di ATP attraverso l' ATP sintetasi ma con meccanismi differenti. FCCP dissipa il gradiente protonico attraverso la membrana mitocondriale interna disaccoppiando la respirazione cellulare. Al contrario OLM previene il riflusso degli ioni H^+ dallo spazio

intermembrana nella matrice mitocondriale. Questi effetti biochimici producono alterazioni differenti nello stato di polarizzazione mitocondriale.

Basse dosi di questi disaccoppianti sono in grado di danneggiare completamente lo stato di iperpolarizzazione osservata nei cloni A e B, e di conseguenza proteggere queste cellule sia da TNF- α che da STS, induttori da apoptosi.

In conclusione questa parte del lavoro conferma un coinvolgimento dell'iperpolarizzazione mitocondriale nella suscettibilità all'apoptosi suggerendo che questo meccanismo può giocare un ruolo fondamentale nella patogenicità delle mutazioni indagate.

Dai risultati ottenuti sembra che lo stato di iperpolarizzazione dei mitocondri dei due cloni analizzati rappresenti un fattore di rischio per le cellule che portano una profonda disfunzione dell'ATPasi 6 come nel caso di pazienti con sindrome di Leigh, e vanno incontro a morte attraverso un meccanismo di "morte cellulare programmata o apoptosi"

CONCLUSIONI

In conclusione, gli approcci utilizzati in questo studio, biochimico, cellulare e apoptico, hanno evidenziato un differente meccanismo patogenetico che sottende alle quattro mutazioni nel gene dell'ATP 6 associate alla sindrome di Leigh.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] Altmann R. "Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen". 1890
- [2] Anderson S, Bankier AT, Barrel BG., *et al.* "Sequence and organization of the human mitochondrial genome". *Nature* 1981;290:457-65.
- [3] Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, Kennaway NG, Shoubridge EA, "Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic

- cardiomyopathy". *Am J Hum Genet.* 2003 Jan;72(1):101-14.
Epub 2002 Dec 9.
- [4] Attardi G, Chomyn A, King MP, Kruse B, Polosa PL, Murdter NN. "Regulation of mitochondrial gene expression in mammalian cells". *Biochem Soc Trans* 1989; 18:509-13.
- [5] Benda C. "Über die Spermatogenese der Vertebraten und höherer evertibraten. II.Theil:Die Histiogenese der Spermien". *Arch.Anal Physiol (Physiol Abt)* 1898; 393-8.
- [6] Benit P, Slama A, Cartault F, Giurgea I, Chretien D, Lebon S, Marsac C, Munnich A, Rotig A, Rustin P. "Mutant NDUFS3 subunit of mitochondrial complex I causes Leigh syndrome". *J Med Genet.* 2004 Jan;41(1):14-7
- [7] Bogenhagen DF, Clayton AD. "The mitochondrial DNA replication bubble has not burst". *Trends in Bioch. Sci.* 2003; 28:357-360.
- [8] Bolden A, Noy GP, Weissbach A. "DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase". *J Biol Chem.* 1977; 252: 3351-6.
- [9] Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois

- M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rotig A. "Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency." *Nat Genet.* 1995 Oct;11(2):144-9.
- [10] Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ. "Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone". *J.Biol.Chem.* 2003; 278:50961-50969.
- [11] Brandt U. "Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu Rev Biochem.* 2006; 75:69-92. Review.
- [12] Brown MD, Sun F, Wallace DC. "Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage". *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 381-7.
- [13] Capaldi RA, Aggeler R, Gilkerson R, Hanson G, Knowles M, Marcus A, Margineantu D, Marusich M, Murray J, Oglesbee D, Remington SJ, Rossignol R. "A replicating module as the unit of mitochondrial structure and functioning". *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1555: 192-5.
- [14] Carrozzo R, Tessa A, Vasquez-Memije ME, Piemonte F, Patrono

- C, Malandrini A, Dionisi-Vici C, Vilarinho L, Villanova M, Schagger H, Federico A, Bertini E, Santorelli FM. “The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome”. *Neurology* 2001; 56:687-690.
- [15] Chen XJ, Butow RA. “The organization and inheritance of the mitochondrial genome”. 2005; *Nat Rev Genet.* 6: 815-25. Review.
- [16] Chomyn A, Cleeter MWJ, Ragan CI, Riley M, Doolittle RF, Attardi G. “URF6, the last unidentified reading frame of human mitochondrial DNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit”. *Science* 1986, 234:614-8.
- [17] Clayton DA. “Transcription of mammalian mitochondrial genome”. *Annu Rev Biochem* 1984; 53:573-594.
- [18] D'Aurelio M, Gajewski CD, Lin MT, Mauck WM, Shao LZ, Lenaz G, Moraes CT, Manfredi G. “Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells”. *Hum Mol Genet.* 2004; 13: 3171-9.
- [19] De Meirleir L, Seneca S, Lissens W, Schoentjes E, “Desprechins B. Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the

- mitochondrial ATPase 6 gene.” *Pediatr Neurol.* 1995 Oct;13(3):242-6.
- [20] de Vries DD, van Engelen BGM, Gabreels FJM, et al. “A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh’s syndrome“. *Ann Neurol* 1993; 34:410-412.
- [21] DiMauro, S, and. Schon EA. “Mitochondrial Respiratory Chain Diseases”. *New Engl. J. Med.* 2003; 348:2656-2668.
- [22] Eley MH, Namihira G, Hamilton L, Munk P, Reed LJ. “Keto acid dehydrogenase complexes. 18. Subunit composition of the Escherichia coli pyruvate dehydrogenase complex” *Arch Biochem Biophys.* 1972; 152: 655-69.
- [23] Fernandez-Silva P, Martinez-Azorin F, Micol V, Attardi G. “The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions”. *EMBO J.* 1997; 16: 1066-79.
- [24] Fillingame RH, Angevine CM, Dmitriev OY. “Coupling proton movements to c-ring rotation in F(1)F(o) ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface”.

Biochim.Biophys.Acta 2002; 1555:29-36.

- [25] Fontanesi F, Soto IC, Horn D, Barrientos A. “Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process”. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 291: C1129-47. Review.
- [26] Garcia JJ, Bravo C, Minauro-Sanmiguel F. “Mitochondrial F₁F₀-ATP synthase: structure, function, assembly, and a topography model for a human subunit 6. In “Recent reasearch developments in human mitochondrial myopathies”. 2002 Eds. Garcia JJ , Tuena Gomez-Puyou M, Gomez-Puyou A. Research Singnpost, Trivandum, India.
- [27] Garcia JJ, Capaldi RA. “Unisite catalysis without rotation of the gamma-epsilon domain in Escherichia coli F₁-ATPase”. *J.Biol.Chem.* 1998; 273:15940-15945.
- [28] Gibbons C, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE. “The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 A resolution”. *Nat.Struct.Biol.* 2000; 7:1055-61.
- [29] Gilkerson RW, Schon EA, Hernandez E, Davidson MM. “Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow

for functional complementation”. *J Cell Biol.* 2008; 181:1117-28.

- [30] Grigorieff N. “Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)”. *Curr Opin Struct Biol.* 1999, 9: 476-83. Review.
- [31] Hatch LP, Cox GB, Howitt SM. “The essential arginine residue at position 210 in the alpha subunit of the Escherichia coli ATP synthase can be transferred to position 252 with partial retention of activity”. *J.Biol.Chem.* 1995; 270:29407-12.
- Hinttala, R.; Smeets, R.; Moilanen, J. S.; Ugalde, C.; Uusimaa, J.; Smeitink, J. A. M.; Majamaa, K. :
- [32] Analysis of mitochondrial DNA sequences in patients with isolated or combined oxidative phosphorylation system deficiency. (Letter) *J. Med. Genet.* 43: 881-886, 2006.
- [33] Hoefs SJ, Dieteren CE, Distelmaier F, Janssen RJ, Epplen A, Swarts HG, Forkink M, Rodenburg RJ, Nijtmans LG, Willems PH, Smeitink JA, van den Heuvel LP “NDUFA2 complex I mutation leads to Leigh disease”. *Am J Hum Genet.* 2008 Jun;82(6):1306-15.
- [34] Holt IJ, Harding AE, Petty RKH, Morgan-hughes, J.A. “A new

- mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy". *Am J Hum Genet* 1990; 46: 428-433.
- [35] Horsefield R, Iwata S, Byrne B. "Complex II from a structural perspective". *Curr Protein Pept Sci.* 2004; 5: 107-18.
- [36] Iborra FJ, Kimura H, Cook PR. "The functional organization of mitochondrial genomes in human cells". *BMC Biol.* 2004; 24: 2-9.
- [37] Janssen R, Smeitink J, Smeets R, van Den Heuvel L. "CIA30 complex I assembly factor: a candidate for human complex I deficiency?" *Hum Genet.* 2002; 110: 264-70.
- [38] Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA. "Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA". *Nat Genet.* 1996; 14: 146-51.
- [39] Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M. "Organization and dynamics of human mitochondrial DNA". *J Cell Sci.* 2004; 117: 2653-62.
- [40] Loguercio-Polosa P e Attardi G. "Distinctive pattern and transcriptional control of mitochondrial protein synthesis in rat brain synaptic endings". *Journal Biol Chem.* 1991; 266:

10011-10017.

- [41] Margulis L. "Origin of eukaryotic cells" Yale University Press, New Haven, 1970.
- [42] Montpetit VJ, Andermann F, Carpenter S, Fawcett JS, Zborowska-SluisD, Giberson HR. "Subacute necrotizing encephalomyelopathy. A review and a study of two families". *Brain*. 1971; 94:1-30.
- [43] Mitchell P. "Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge". *J Bioenerg*. 1972; 3: 5-24. Review.
- [44] Nass S. & Nass MMK. "Ultramitochondrial fibers with DNA characteristics". *J.Cell.Biol* 1963; 19:593-629.
- [45] Neupert W, Hartl F-U, Craig E, Pfanner N. "How do polypeptides cross the mitochondrial membranes?". *Cell* 1990; 63:447-50.
- [46] Ojala D, Attardi G. "Identification of discrete polydenylate-containing RNA components transcribed from HeLa cell mitochondrial DNA". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1974; 71:563-7.
- [47] Ojala D, Montoya J, Attardi G. "tRNA punctuation model of

- RNA processing in human mitochondria". *Nature* 1981; 290:470-4.
- [48] Olgivie I, Capaldi RA."Mutation of the mitochondrially encoded ATPase 6 gene modeled in the ATP synthase of *Escherichia coli*". *FEBS Lett.* 1999; 453:179-82.
- [49] Ogilvie I, Kennaway NG, Shoubridge EA. "A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy". *J Clin Invest.* 2005;115:2784-92.
- [50] Okamoto K, Perlman PS, Butow RA. "The sorting of mitochondrial DNA and mitochondrial proteins in zygotes: preferential transmission of mitochondrial DNA to the medial bud". *J Cell Biol.* 1998; 142: 613-23.
- [51] Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha VK. "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology." *Cell.* 2008 Jul 11;134(1):112-23.
- [52] Palade G. "The fine structure of mitochondria". *Anat Rec.* 1952; 114:427-51.

- [53] Penefsky HS. "Energy-dependent dissociation of ATP from high affinity catalytic sites of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase." *J Biol Chem*. 1985 Nov 5;260(25):13735-41.
- [54] Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. "Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts" *J Struct Biol*. 1997; 119: 260-72.
- [55] Petruzzella V, Vergari R, Puzziferri I, Boffoli D, Lamantea E, Zeviani M, Papa S. "A nonsense mutation in the NDUFS4 gene encoding the 18 kDa (AQDQ) subunit of complex I abolishes assembly and activity of the complex in a patient with Leigh-like syndrome." *Hum Mol Genet*. 2001 Mar 1;10(5):529-35.
- [56] Pincus JH. "Subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh's disease): a consideration of clinical features and etiology". *Dev.Med.Child.Neurol*. 1972; 14:87-101.
- [57] Pithukpakorn M. "Disorders of pyruvate metabolism and the tricarboxylic acid cycle". *Mol Genet Metab*. 2005; 85: 243-6. Review.
- [58] Prezant TR, Agapian JV, Fischel-Ghodsian N. Corrections to the

- human mitochondrial ribosomal RNA sequences. *Hum Genet* 1994; **93**: 87-8.
- [59] Rastogi VK, Girvin ME. “¹H, ¹³C, and ¹⁵N assignments and secondary structure of the high pH form of subunit c of the F1F0 ATP synthase”. *Nature* 1999; 402:263-268.
- [60] Robinson BH, Glerum DM, Chow W, Petrova-Benedict R, Lightowers R, Capaldi R. The use of skin fibroblast cultures in the detection of respiratory chain defect in patients with lacticacidemia.” *Pediatr Res* 1990;28:549-555.
- [61] Robinson BH. “Cell culture studies on patients with mitochondrial diseases: molecular defects in pyruvate dehydrogenase”. *J. Bioenerg.Biomembr.* 1988;20:313-23. Rodgers AJ, Wilce MC. “Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase”. *Nat.Struct.Biol.* 2000; 7:1051-4.
- [62] Rotig A, Bessis JL, Romero N, et al. “Maternally inherited duplication of the mitochondrial genome in a syndrome of proximal tubulopathy, diabetes mellitus, and cerebellar ataxia” *Am.J.Hum.Genet* 1992; 50:364-70.
- [63] Sambongi Y, Iko Y, Tanabe M, Omote H, Iwamoto-Kihara A,

- Ueda I, Yanagida T, Wada Y, Futai M. “Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation”. *Science* 1999; 286:1722-4.
- [64] Santorelli FM, Shanske S, Jain KD, et al. “A T→C mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA in a child with Leigh’s syndrome”. *Neurology* 1994; 44:972-974.
- [65] Satoh M, Kuroiwa T. “Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell”. *Exp Cell Res.* 1991; 196: 137-40.
- [66] Schägger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, Brandt U. “Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I”. *J Biol Chem.* 2004; 279: 36349-53.
- [67] Schägger H, Pfeiffer K. “Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria”. *EMBO J.* 2000; 19: 1777-83.
- [68] Schon EA, Santra S, Pallotti F, Girvin ME. “Pathogenesis of primari defects in the mitochondrial ATP synthesis”. *Cell and Devel. Biol.* 2001; 12:441-448.

- [69] Shoubridge EA. Nuclear gene defects in respiratory chain disorders. *Semin Neurol* 2001; **21**:261-7.
- [70] Servidei S. “Mitochondrial encephalomyopathies :gene mutation”. *Neuromuscul Disord* 2002; 12:101-110.
- [71] Sharon H. Ackerman and Aleander Tzagoloff, “Identification of two nuclear genes (ATP11, ATP12) required for assembly of the yeast F₁-ATPase”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 87, pp.4986-4990, July 1990 *Biochemistry*
- [72] Shoubridge EA. “Nuclear gene defects in respiratory chain disorders”. *Semin Neurol* 2001; 21:261-7.
- [73] Sjostrand F.S. “The ultrastructure of cells as revealed by the electron microscope”. *Int. rev. Cytol.* 1995; 5: 455-533
- [74] Smeitink JA, van den Heuvel LW, Koopman WJ, Nijtmans LG, Ugalde C, Willems PH. “Cell biological consequences of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase Deficiency”. *Curr Neurovasc Res.* 2004; 1: 29-40. Review.
- [75] Souid AK, Penefsky HS. “Energetics of ATP dissociation from the mitochondrial ATPase during oxidative phosphorylation”. *J.Biol.Chem.* 1995; 270:9074-82.

- [76] Souid AK, Penefsky HS. "Mechanism of ATP synthesis by mitochondrial ATP synthase from beef heart". *J.Bioenerg.Biomembr.* 1994; 26:627-30.
- [77] Spelbrink JN, Toivonen JM, Hakkaart GA, Kurkela JM, Cooper HM, Lehtinen SK, Lecrenier N, Back JW, Speijer D, Foury F, Jacobs HT. "In vivo functional analysis of the human mitochondrial DNA polymerase POLG expressed in cultured human cells". *J Biol Chem.* 2000; 275: 24818-28.
- [78] Sudo A, Honzawa S, Nonaka I, Goto Y. "Leigh syndrome caused by mitochondrial DNA G13513A mutation: frequency and clinical features in Japan." *J Hum Genet.* 2004;49(2):92-6. Epub 2004 Jan 17.
- [79] Schwartz M, Vissing J. "Paternal inheritance of mitochondrial DNA". *N Engl Journal Med* 2002; 347: 576-80.
- [80] Wallace DC. "Mitochondrial diseases in man and mouse". *Science.* 1999; 283: 1482-1488.
- [81] Wang, Z.-G.; White, P. S.; Ackerman, S. H.: "Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F(1)-ATPase in human mitochondria". *J. Biol. Chem.* 276: 30773-30778, 2001.

- [82] Weber K, Bruck P, Mikes Z et al. "Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle". *Endocrinology*. 2002; 143: 177 –184.
- [83] Tanaka M, Ino H, Ohno K, et al. Mitochondrial DNA mutations in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **174**: 861-8.
- [84] Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A et al. "Heteroplasmic mtDNA mutation (T→G) can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high". *Am.J.Hum.Genet.* 1992; 50:852-858.
- [85] Tatuch Y, Pagon RA, Vlcek B, Roberts R, Korson M, Robinson BH. « The 8993 mtDNA mutation: heteroplasmy and clinical presentation in three families." *Eur J Hum Genet.* 1994;2(1):35-43.
- [86] Taylor R. W., Morris A. A. M., Hutchinson M., Turnbull D.M., "Leigh disease associated with a novel mitochondrial DNA ND5 mutation." *Europ. J. Hum. Genet.* 10: 141-144, 2002.
- [87] Thyagarajan D, Shanske S, Vazquez-Memije M, De Vivo D,

- DiMauro S. "A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis". *Ann. Neurol.* 1995; 38:468-72.
- [88] Thorburn DR, Sugiana C, Salemi R, Kirby DM, Worgan L, Ohtake A, Ryan MT. "Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders". *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1659: 121-8. Review.
- [89] Tiranti V, Corona P, Greco M, Taanman JW, Carrara F, Lamantea E, Nijtmans L, Uziel G, Zeviani M. "A novel frameshift mutation of the mtDNA COIII gene leads to impaired assembly of cytochrome c oxidase in a patient affected by Leigh-like syndrome." *Hum Mol Genet.* 2000 Nov 1;9(18):2733-42.
- [90] Tiranti V, Hoernagel K, Carozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P, Marzella R, Rocchi M, Bayona-Bafaluy MP, Enriquez JA, Uziel G, Bertini E, Dionisi-Vici C, Franco B, Meitinger T, Zeviani M. "Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency." *Am J Hum Genet.* 1998 Dec;63(6):1609-21.
- [91] Tsunoda SP, Rodgers AJ, Aggeler R, Wilce MC, Yoshida M, Capaldi RA." Large conformational changes of the epsilon subunit in the bacterial F1F0 ATP synthase provide a ratchet

action to regulate this rotary motor enzyme”.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 2001; 98:6560-4.

- [92] Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* 1996; 272:1136-1144.
- [93] Tuena de Gómez-Puyou M, Ayala G, Darszon A , Gómez-Puyou A. “Oxidative phosphorylation and the Pi-ATP exchange reaction of submitochondrial particles under influence of organic solvents”. *J.Biol.Chem.* 1984; 259:9472-9478.
- [94] Ugalde C, Triepels RH, Coenen MJ, van den Heuvel LP, Smeets R, Uusimaa J, Briones P, Campistol J, Majamaa K, Smeitink JA, Nijtmans LG. “Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene.” *Ann Neurol.* 2003 Nov;54(5):665-9.
- [95] Valnot I, von Kleist-Retzow JC, Barrientos A, Gorbatyuk M, Taanman JW, Mehaye B, Rustin P, Tzagoloff A, Munnich A, Rotig A. “A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome *c* oxidase deficiency”. *Hum Mol Genet.* 2000 May 1;9(8):1245-9.

- [96] Vahsen N, Candé C, Brière JJ, Bénit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schägger H, Rustin P, Kroemer G. "AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation". *EMBO J.* 2004; 23: 4679-89.
- [97] Vázquez-Memije ME, and Garcia JJ. "Human ATPase 6 mutations: molecular mechanisms of pathology". In "Recent reasearch developments in human mitochondrial myopathies". 2002 Eds. Garcia JJ , Tuena Gomez-Puyou M, Gomez-Puyou A. Research Singnpost, Trivandum, India.
- [98] Vik SB, Long JC, Wada T, Zhang D. "A model for the structure of subunit a of the Escherichia coli ATP synthase and its role in proton translocation". *Biochim.Biophys.Acta.* 2000;1458:457-466.
- [99] von Ballmoos C, Appoldt Y, Brunner J, Granier T, Vasella A, Dimroth P. "Membrane topography of the coupling ion binding site in Na⁺-translocating F1F0 ATP synthase". *J.Biol.Chem.* 2002; 277:3504-3510.
- [100] Wang Y, Bogenhagen DF. "Human mitochondrial DNA

nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane". 2006; *J Biol Chem.* 281: 25791-802.

[101] Weber J., Senior A.E."ATP synthesis driven by proton transport in F₁F₀-ATP synthase".*FEBS Letters*2003; 545:61-70.

[102] Wehrle F, Kaim G, Dimroth P. "Molecular mechanism of the ATP synthase's F(o) motor probed by mutational analyses of subunit a". *J Mol Biol* 2002; 322:369-381.

[103] White SL, Collins VR, Wolfe R, Cleary MA, Shanske S, DiMauro S, Dahl HH, Thorburn DR. "Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993." *Am J Hum Genet.* 1999 Aug;65(2):474-82.

[104] Zeviani M, Di Donato S. "Mitochondrial disorders" *Brain.* 2004 Dec;127(Pt 12):2783 Review

[105] Zeviani M., Antozzi. "Mitochondrial disorders".*Hum.Reprod.*. 1997; 3: 133-148.

R I N G R A Z I A M E N T I

Ringrazio innanzitutto il personale del Laboratorio di Biologia Molecolare del Bambin Gesù ed in particolar modo la Dott.ssa Rosalba Carrozzo, il Dott. Filippo Santorelli ed il Dott. Enrico Bertini, per la loro preziosissima collaborazione.

Ringrazio inoltre la Prof.ssa Sangiuolo ed il prof. Giuseppe Novelli dell'Università di Roma di "Tor Vergata" per la pazienza, la disponibilità ed il tempo che mi hanno dedicato.

Un ringraziamento speciale a mio marito Roberto per il suo supporto morale.