

Le basi genetiche delle malattie mitocondriali

Valeria Tiranti

U.O. Genetica Medica e Neurogenetica

Corso di aggiornamento Malattie Mitocondriali
Congresso AINPeNC e AIRIC
Bologna 23 maggio 2019



Fondazione I.R.C.C.S.
Istituto Neurologico Carlo Besta

Sistema Socio Sanitario

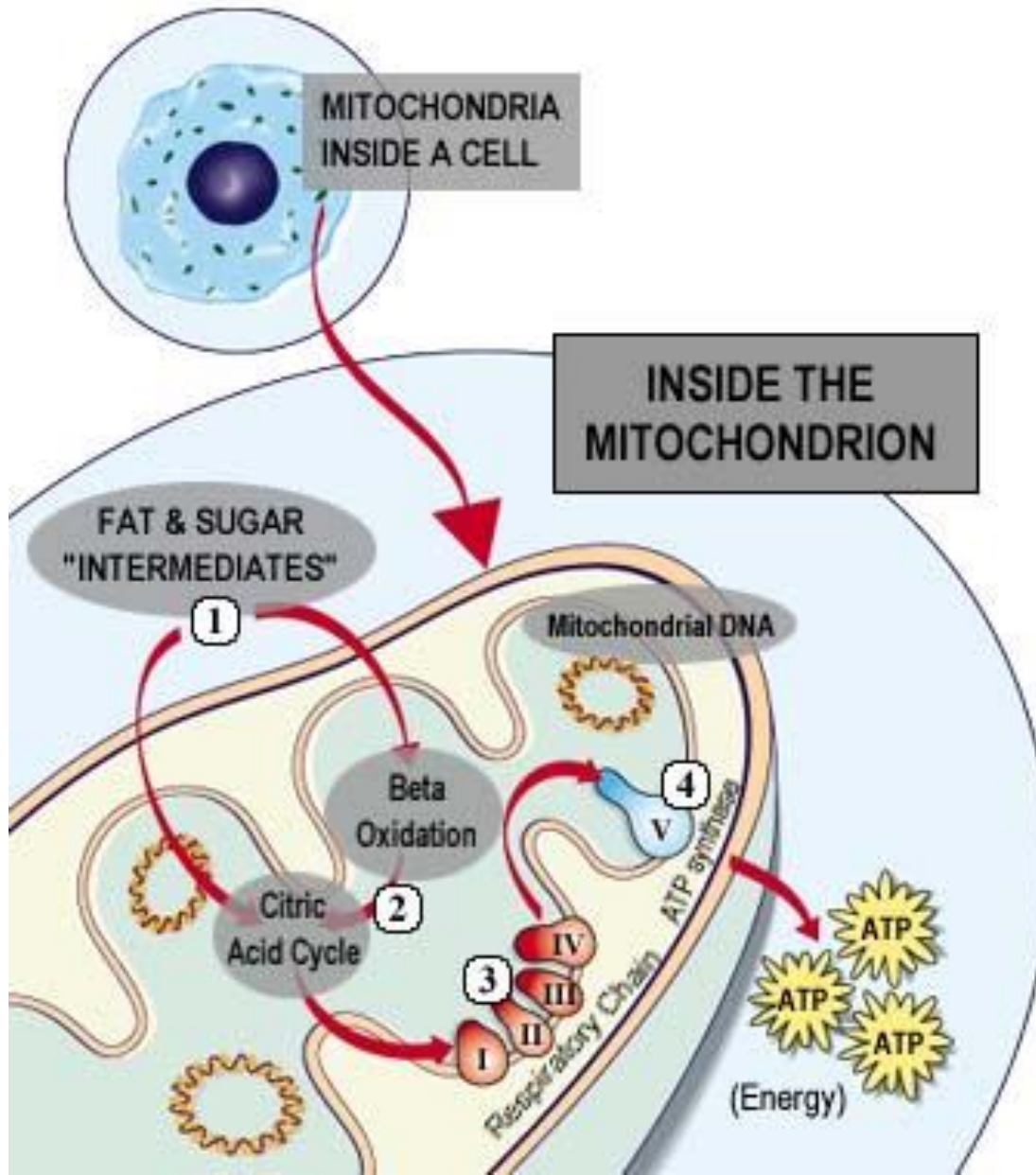


Regione
Lombardia

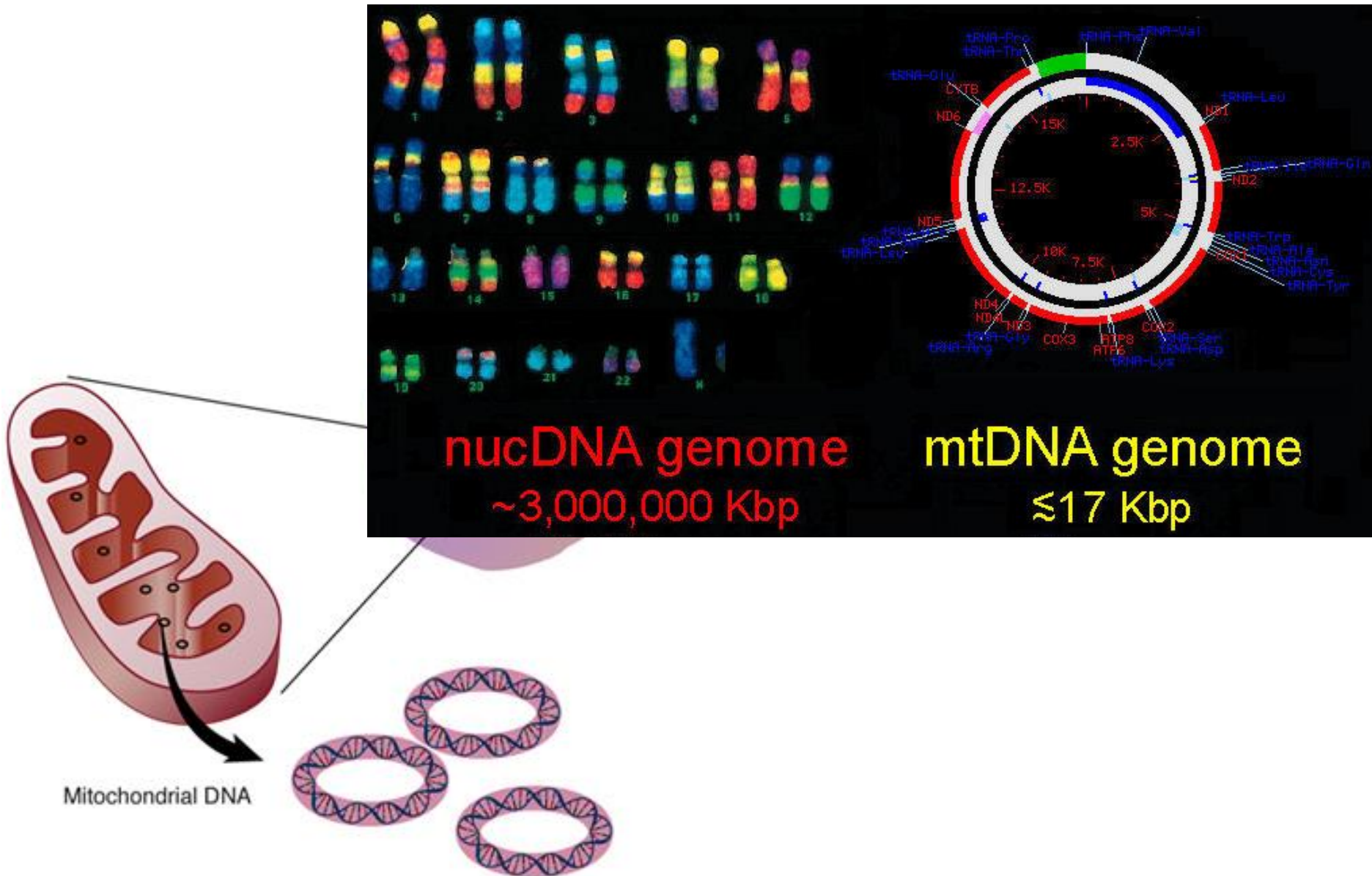
Mitocondri: la centrale energetica della cellula



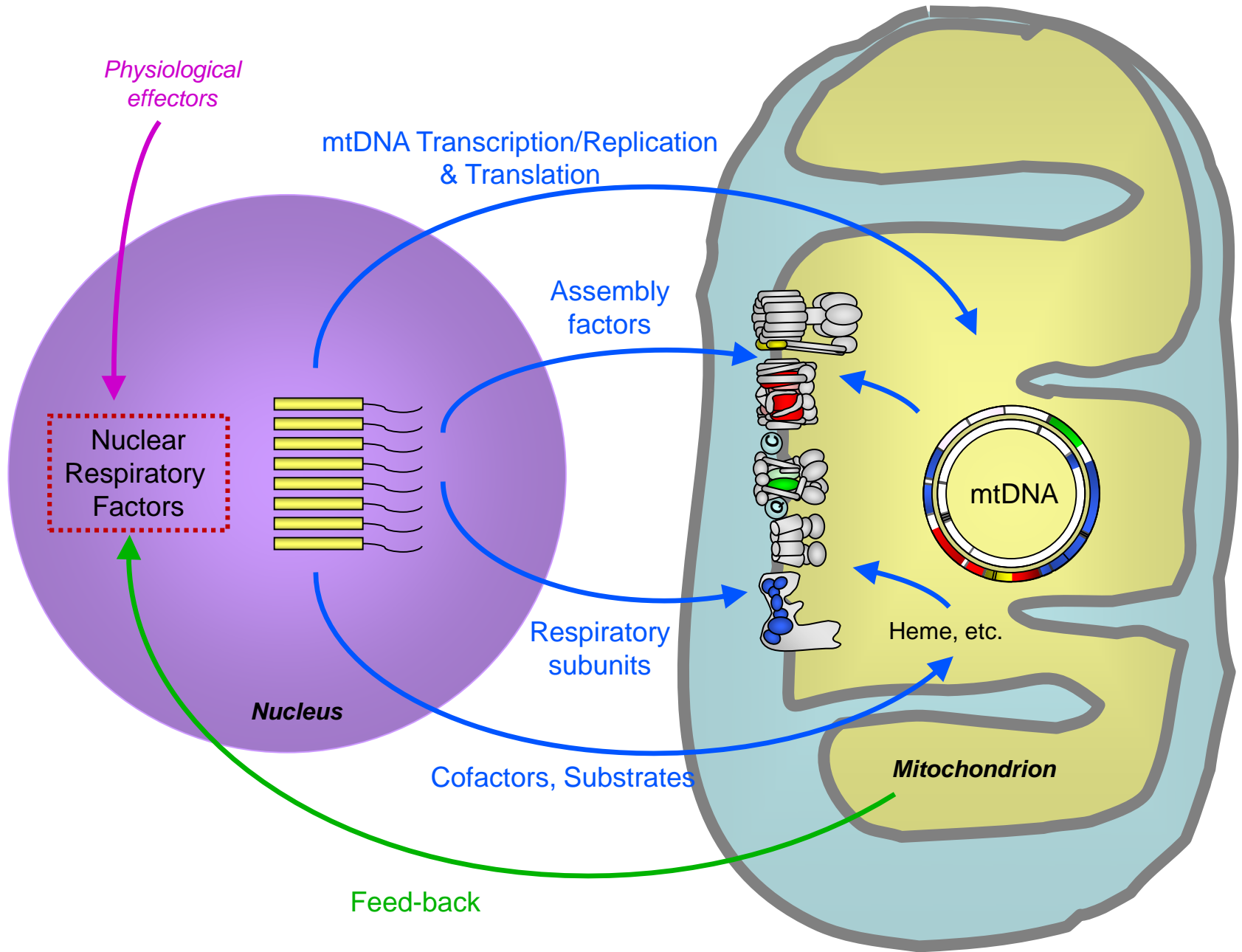
MITOCHONDRIA
THE CELL'S POWER HOUSE
theAukwardYeti.com



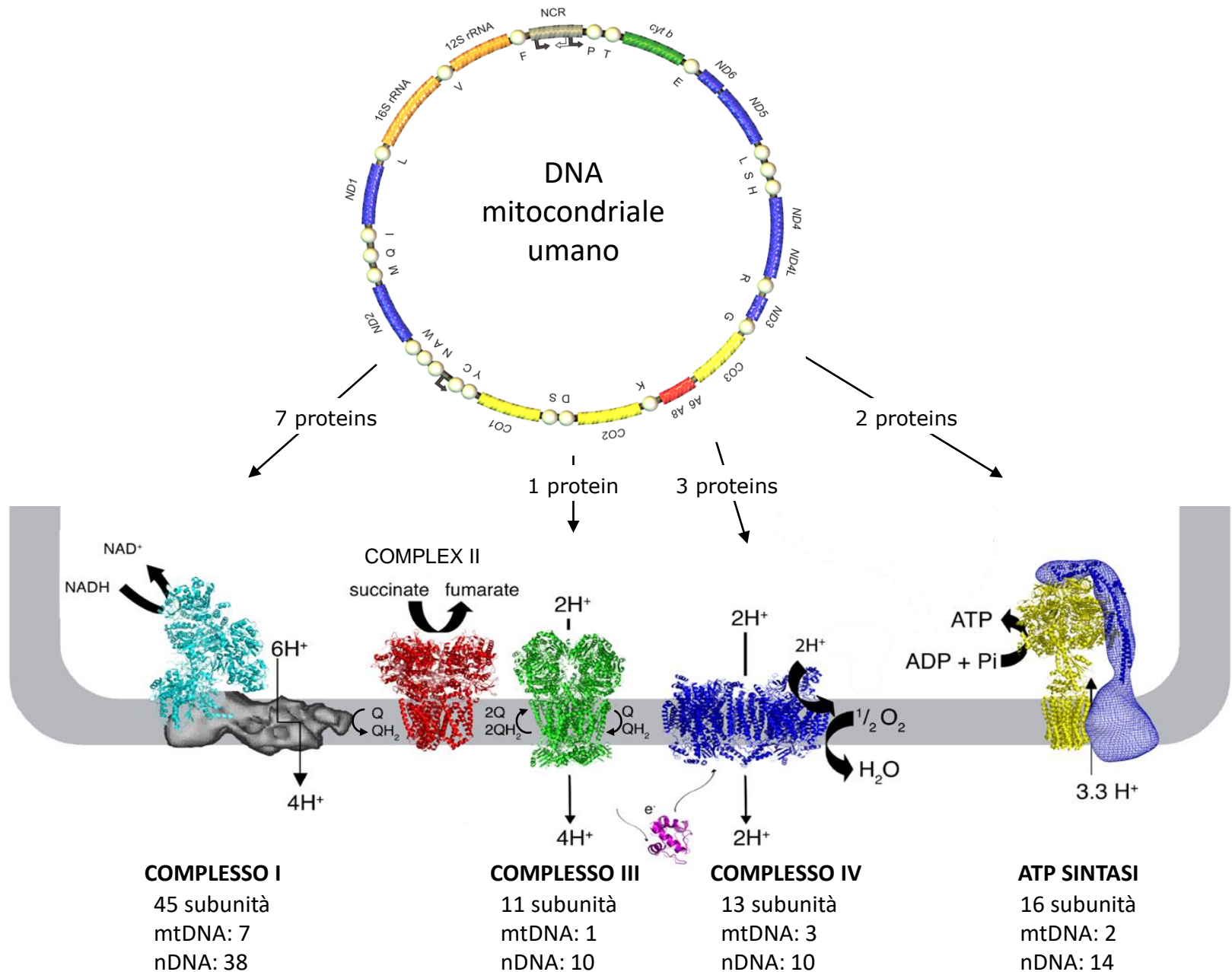
DNA mitocondriale (mtDNA)



Il sistema di connessione nucleo-mitocondrio



Le subunità della catena respiratoria codificate dal mtDNA



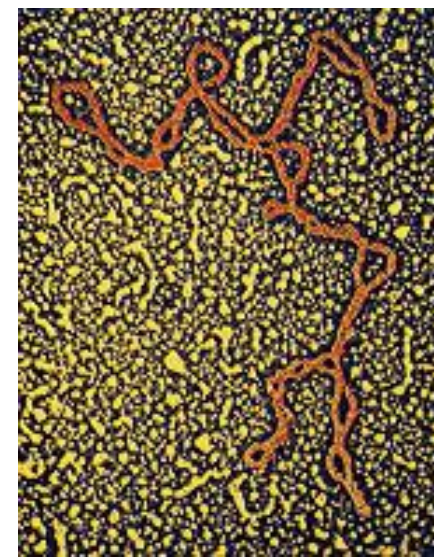
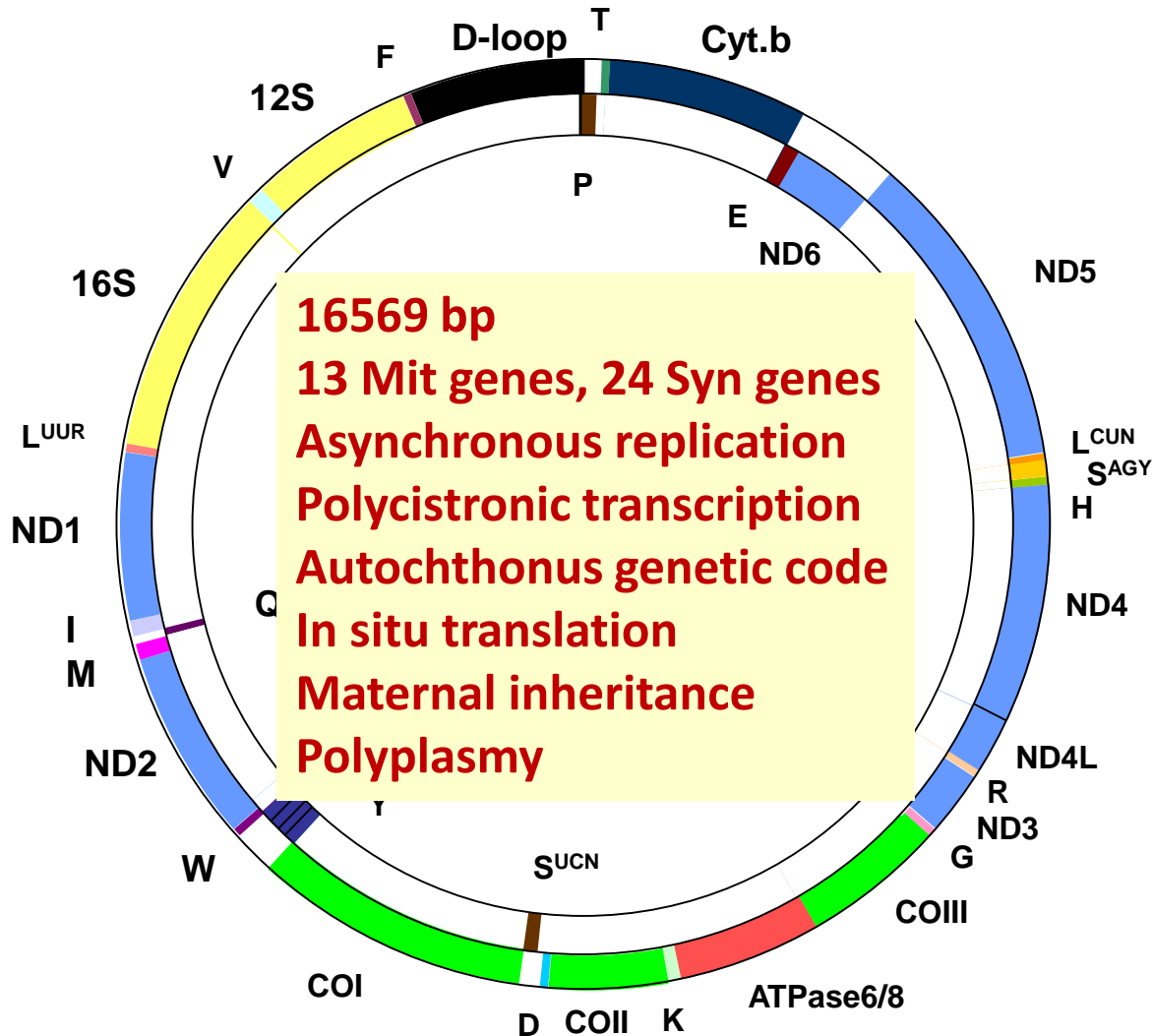
DNA nucleare versus DNA mitocondriale

- Il DNA mitocondriale viene replicato in modo asincrono durante tutto il ciclo cellulare in modo non coordinato con la sintesi del DNA nucleare
- Il DNA mitocondriale è privo delle proteine istoniche ma è compattato in complessi nucleoproteici definiti NUCLEOIDI
- Il DNA mitocondriale umano non ha introni
- Il contenuto in GC del mtDNA è spesso diverso da quello del DNA nucleare (separabili per densità)
- L' mtDNA viene duplicato dalla DNA polimerasi gamma
- Trascrizione: due grandi molecole di RNA sono tagliate successivamente per dare i singoli mRNA, tRNA e rRNA
- La presenza di ribosomi permette al mitocondrio di svolgere una propria sintesi proteica
- I meccanismi di riparazione del DNA sono meno efficienti nei mitocondri

Il mtDNA può essere sottoposto a livelli elevati di radicali dell'ossigeno che agiscono come mutageni

Il tasso di mutazione del mtDNA è circa 10 volte maggiore di quello nucleare

mtDNA umano

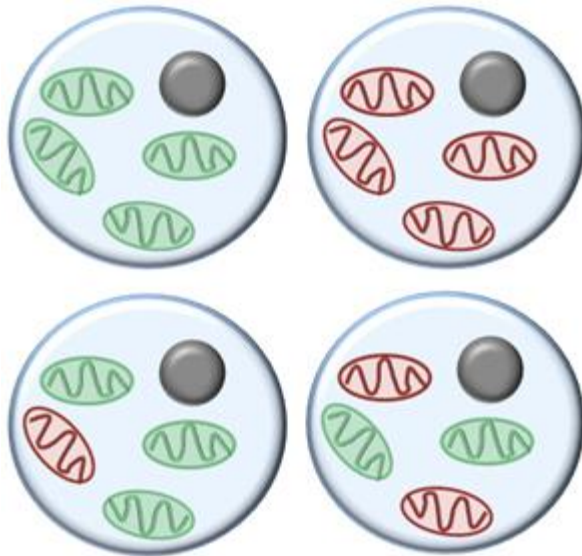


“Le Regole Mitochondriali”

- Eredità materna
- Eteroplasmia
- Segregazione mitotica casuale
- Effetto soglia

Omoplasma ed eteroplasma

Ogni cellula contiene migliaia di mitocondri e ogni mitocondrio contiene copie multiple di mtDNA (2 -10). Di solito queste copie sono identiche, una condizione che viene definita di omoplasma.



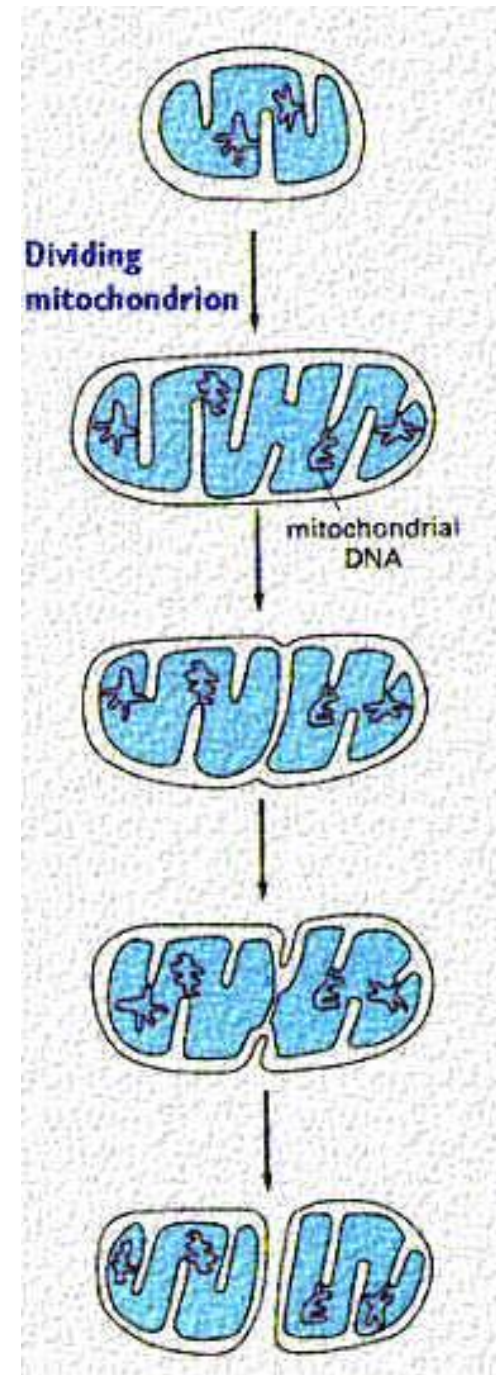
omoplasma

eteroplasma

Tuttavia molecole di DNA mutate possono coesistere con molecole wild-type, una condizione che viene definita eteroplasma.

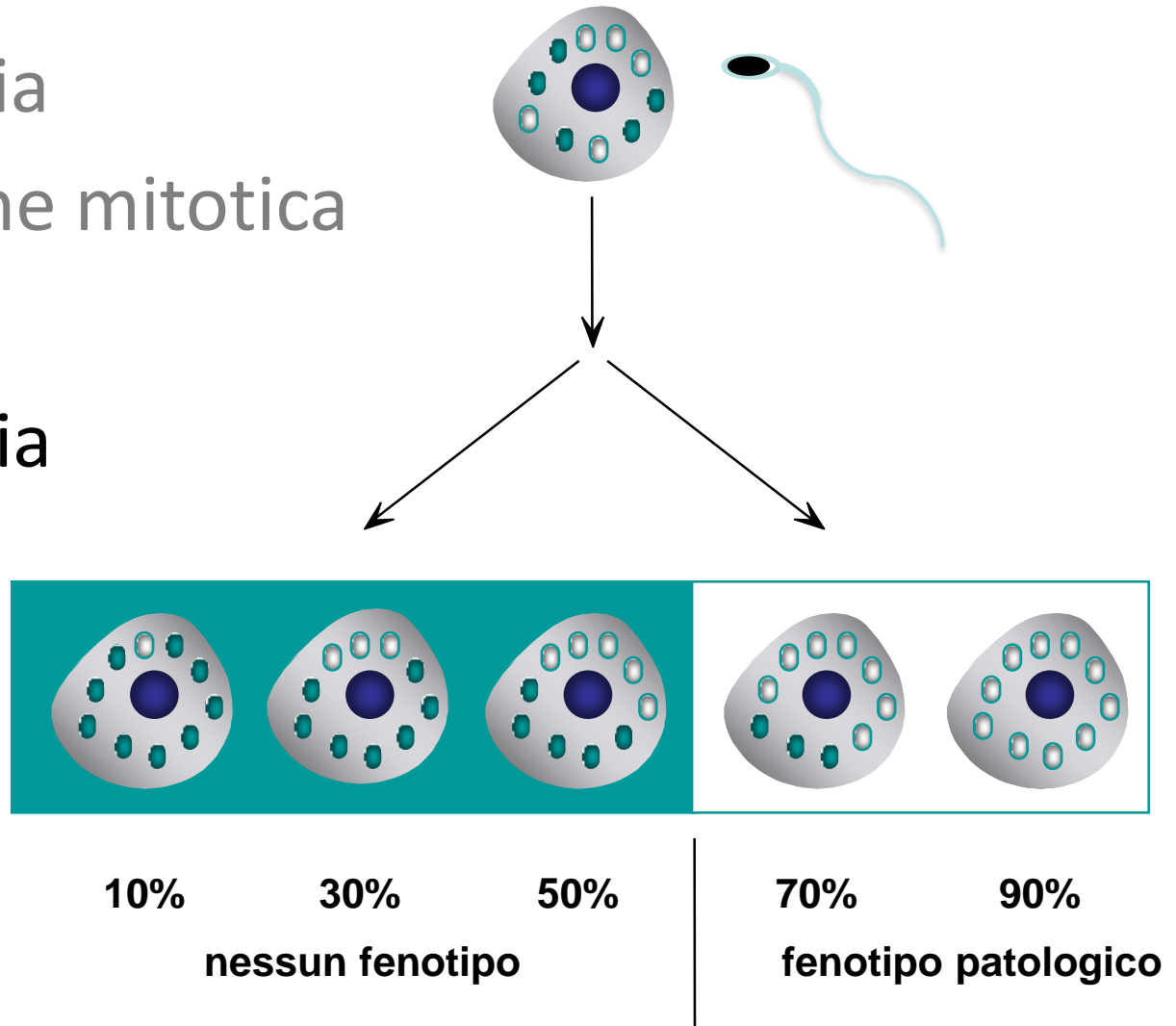
“Le Regole Mitochondriali”

- Eredità materna
- Eteroplasmia
- Segregazione mitotica casuale
- Effetto soglia



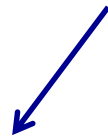
“Le Regole Mitochondriali”

- Eredità Materna
- Eteroplasmia
- Segregazione mitotica casuale
- Effetto Soglia



Difetti del DNA mitocondriale

- Geni correlati alla sintesi proteica mitocondriale (rRNAs, tRNAs)
- Geni codificanti proteine strutturali MRC
- Grosse delezioni

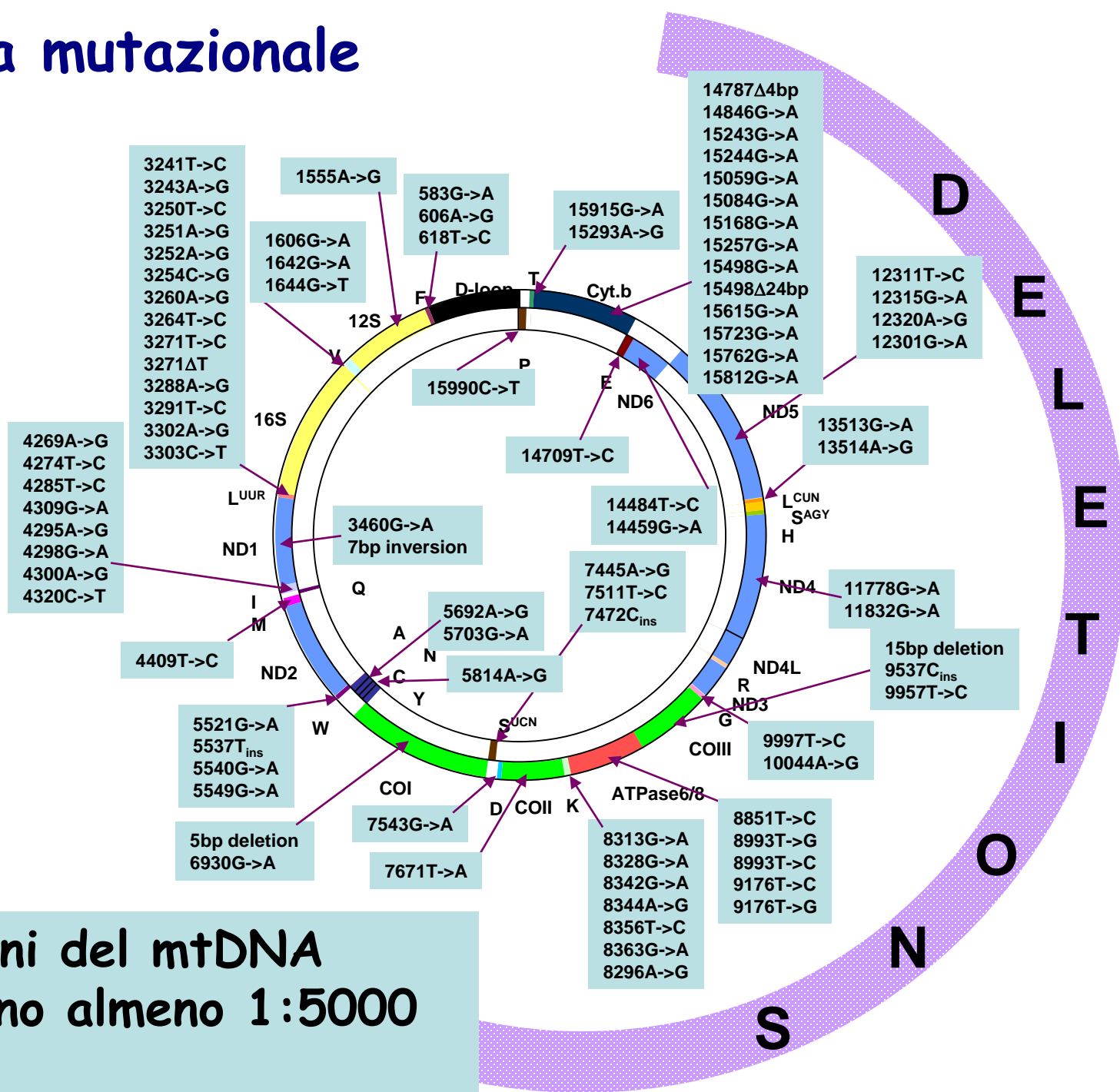


Mutazioni eteroplasmiche



Mutazioni omoplasmiche

Carta mutazionale



Mutazioni del mtDNA colpiscono almeno 1:5000 nati

Mutazioni punto eteroplasmiche

Eredità materna

Correlazione quantitativa tra % di mutazione e gravità del fenotipo

➤ Geni tRNA:

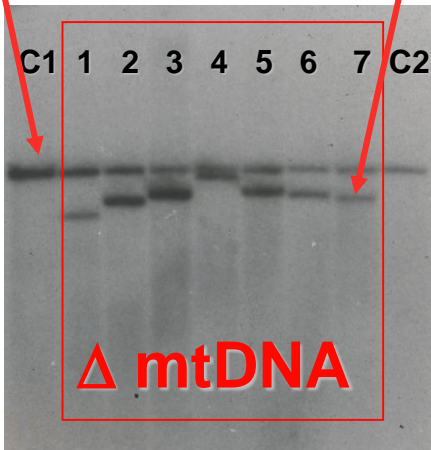
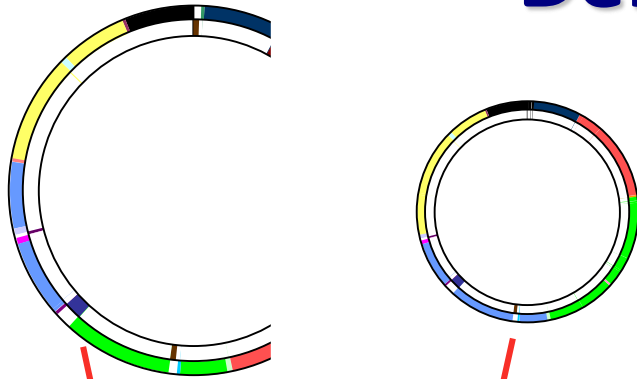
MELAS Mitochondrial Encephalomyopathy Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
m.3243A>G tRNA^L

MERRF Myoclonus Epilepsy with Ragged Red Fibers
m.8344A>G tRNA^K

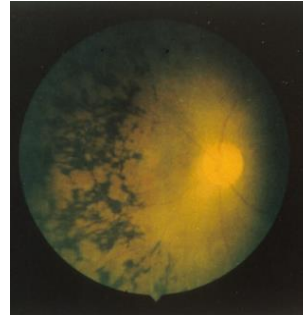
➤ Geni mRNA:

NARP Neurogenic muscle weakness, Ataxia, Retinitis Pigmentosa
m.8993T>G ATP6

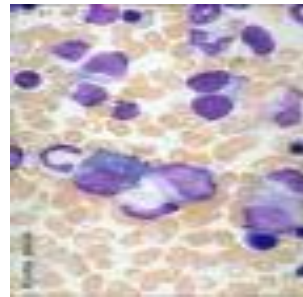
Delezioni singole



PEO sporadica:
Δ solo nel muscolo
PEO, miopatia prossimale



Kearns Sayre :
Δ prevalentemente nel muscolo
esordio giovanile, PEO, miopatia atassia, retinite pigmentosa, danno neurologico progressivo, arresti cardiaci



Pearson's:
Δ in tutti i tessuti
pancitopenia neonatale
danno pancreatico.
Può evolvere in KSS

Sporadiche, Eteroplasmiche

Correlazione qualitativa tra mutazione e fenotipo: KSS, PEO, Pearson

Correlazione con la distribuzione tissutale del mtDNA deleto

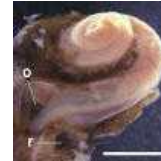
Nella PEO (e spesso nel KSS) sono riscontrate solo nel muscolo

Nessuna correlazione quantitativa tra % o dimensioni della delezione e gravità del fenotipo

Mutazioni punto omoplasmiche

1555A->G, 12S rRNA

Sordità indotta da aminoglicosidi



aminoglycoside-induced
deafness

LHON Leber' s Hereditary Optic Neuropathy

Atrofia ottica ereditaria, degenerazione specifica di cellule ganglionari della retina

Mutazioni primarie:

nt.3460 (ND1), 11778 (ND4), 14484 (ND6)

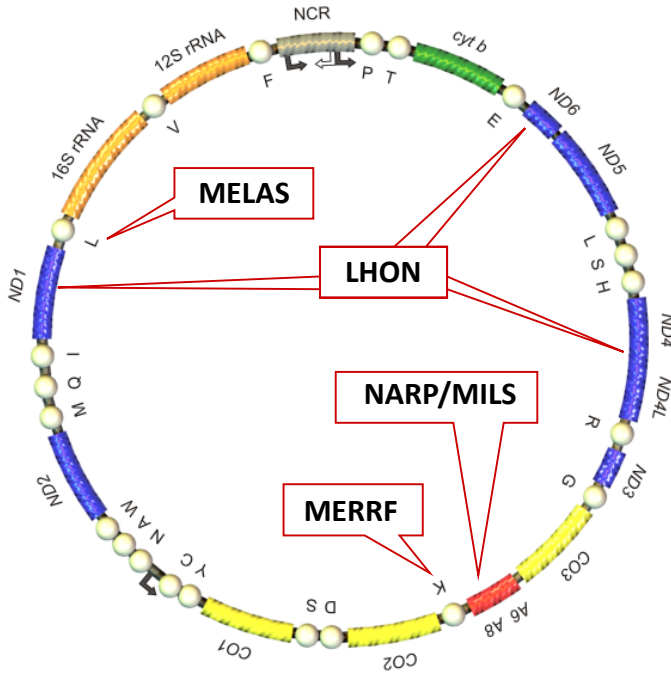


Mutazioni del mtDNA

1988: prima mutazione del mtDNA.

Oggi più di 200 mutazioni descritte, sei le più frequenti:

- m.3460G>A *ND1*
- m.11778G>A *ND4*
- m.14484T>C *ND6*
- m.3243A>G *tRNA^L*
- m.8344A>G *tRNA^K*
- m.8993T>G *ATP6*



LHON: atrofia ottica bilaterale, esordio acuto.

MELAS: emicrania, stroke-like, acidosi lattica, demenza, atassia, epilessia, miopatia, diabete, sordità, bassa statura.

MERRF: epilessia mioclonica, miopatia, atassia, atrofia ottica, sordità, demenza, cardiopatia, lipomatosi.

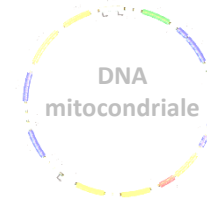
NARP: neuropatia, retinite pigmentosa, atassia, debolezza muscolare, ritardo sviluppo, epilessia, demenza.

MILS: sindrome di Leigh matrilineare, ritardo sviluppo, epilessia, dismorfismi, miopatia.

Classificazione genetica delle malattie mitocondriali

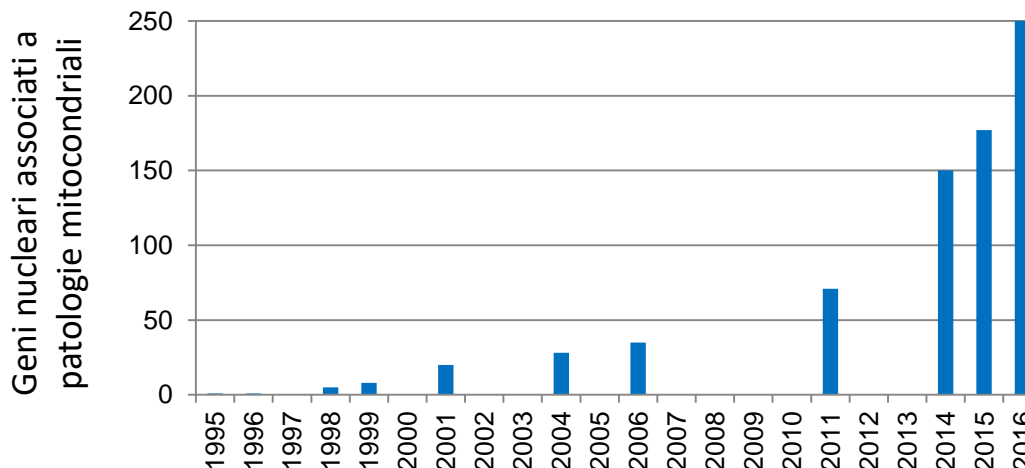
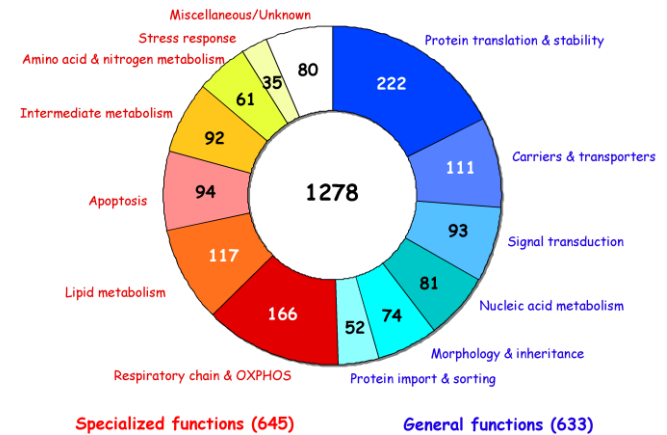
Difetti del DNA mitocondriale

- Geni correlati alla sintesi proteica mitocondriale (rRNAs, tRNAs)
- Geni codificanti proteine strutturali MRC
- Grosse delezioni



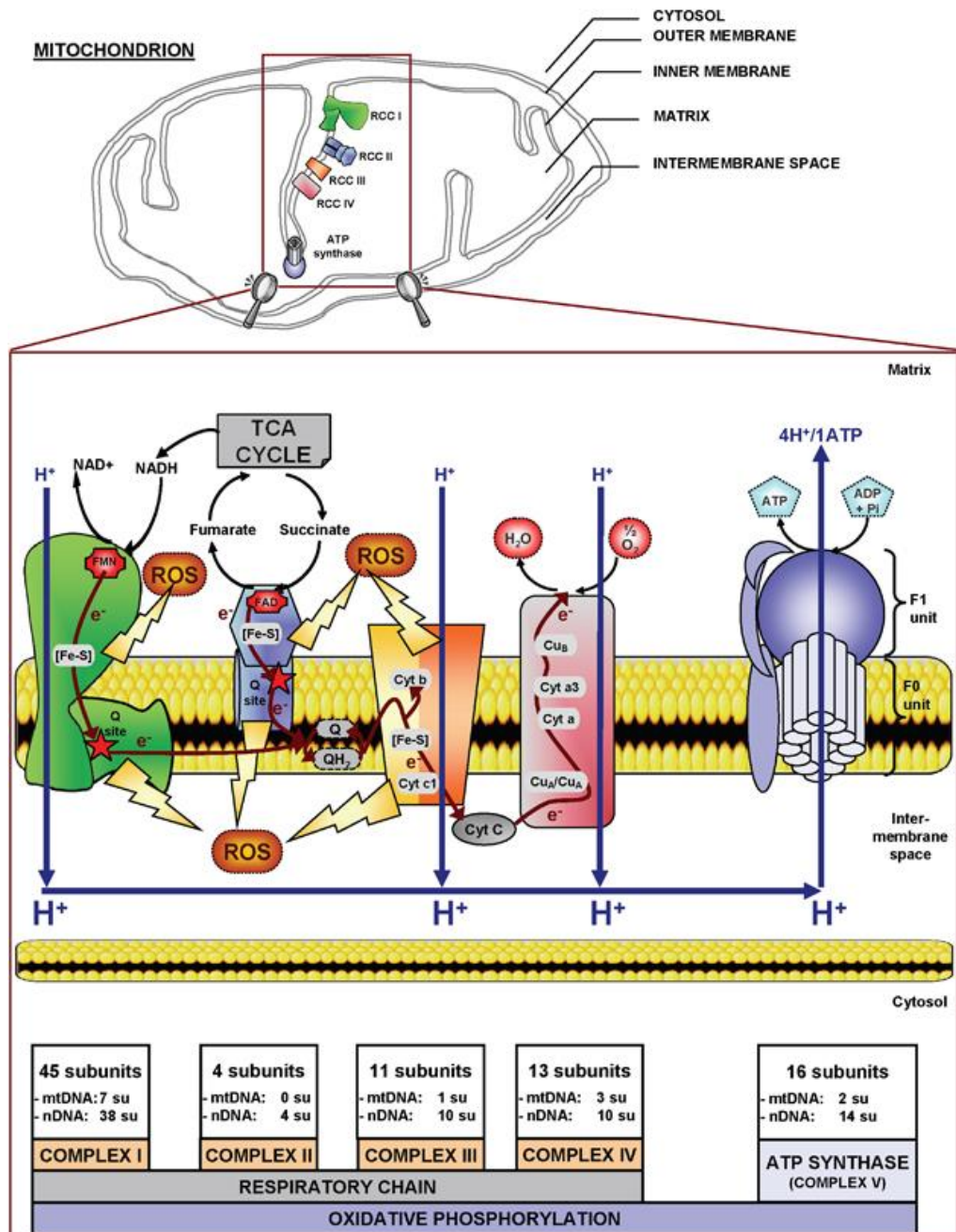
Mutazioni DNA nucleare

- Geni codificanti proteine strutturali MRC
- Geni codificanti fattori d'assemblaggio MRC
- Geni codificanti enzimi per biosintesi di lipidi o cofattori
- Geni codificanti per fattori importanti per mantenimento mtDNA
- Geni codificanti per fattori per la sintesi proteica mitocondriale
- Geni coinvolti nella biogenesi/dinamica mitocondriale
- Geni coinvolti in altre attività: detossificazione, import, apoptosi

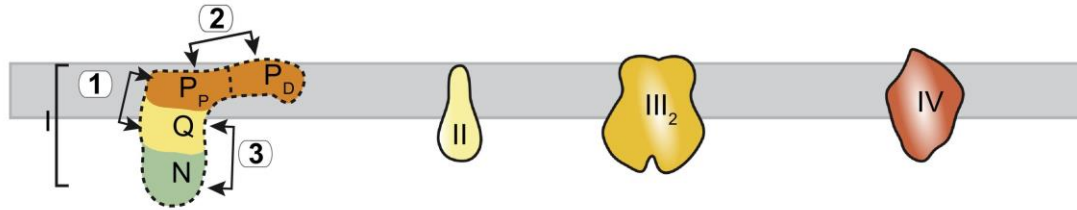


- 2001 Shoudbridge
- 2004 Zeviani&Didonato
- 2006 Zeviani&Carelli
- 2011 Ghezzi&Zeviani
- 2014 Rotig
- 2015 Turnbull&Rustin
- 2016 Mayr et al.

1- Difetti in geni nucleari codificanti componenti strutturali della catena respiratoria



2- Difetti in geni codificanti fattori coinvolti nell'assemblaggio dei complessi della catena respiratoria



Stability and Assembly

P-module	Q-module	N-module
ACAD9	NDUFAF2	
ATP5SL	NDUFAF3	
DMAC1	NDUFAF4	
ECSIT	NDUFAF5	
FOXRED1	NDUFAF7	
MITRAC15	TIMMDC1	
NDUFAF1		
TIMMDC1		
TMEM126B	NDUFAF2	
TMEM186		
NDUFAF6		
NUBPL		

Stability and Assembly

SDHAF1
SDHAF2
SDHAF3
SDHAF4

Stability and Assembly

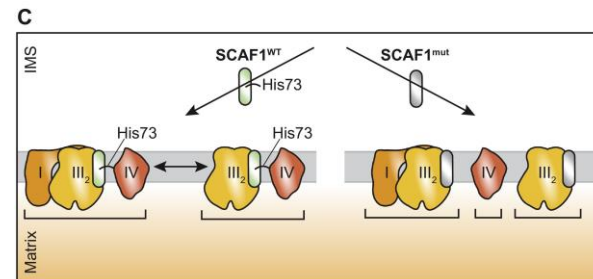
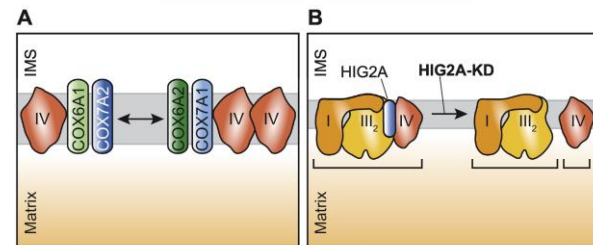
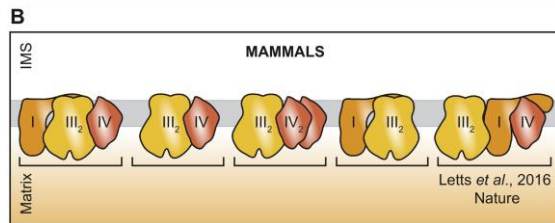
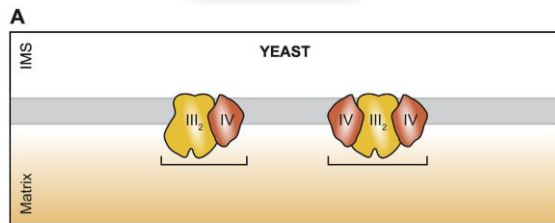
BCSL1
CCHL
LYRM7
UQCC1
UQCC2
UQCC3
TTC19

Stability and Assembly

CMC1 MITRAC12
COX16 MITRAC15
COX18 MR-1S
COX20 PET100
C12ORF62 PET117
MITRAC7 TMEM177

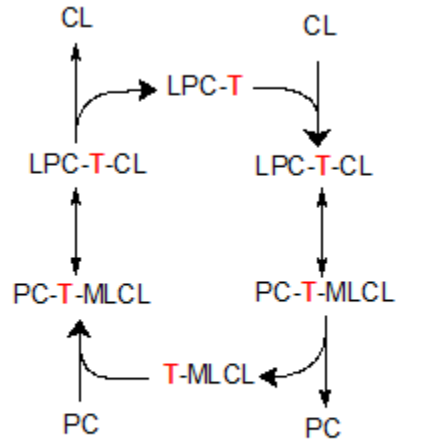
Copper and Heme Insertion

ADR COX15
FDX2 COX17
COA6 COX19
COX10 SCO1-2
COX11 SURF1



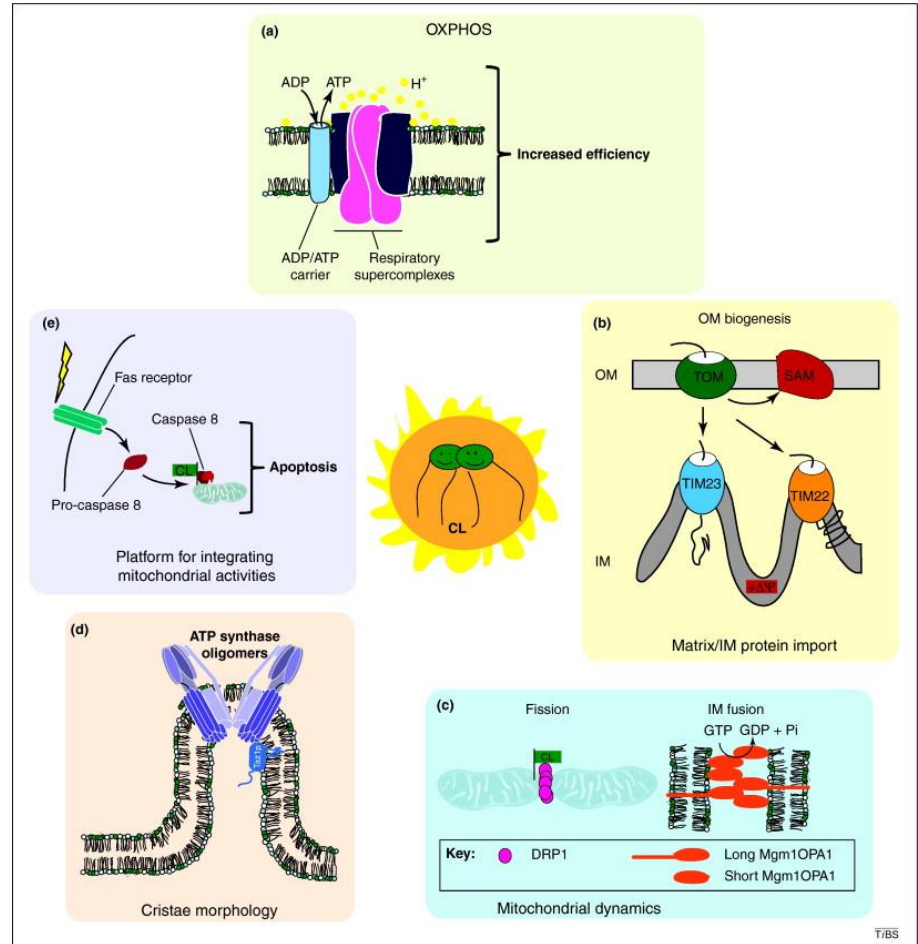
3- Difetti in geni codificanti enzimi per la sintesi di lipidi e cofattori

Fattori relati alla biosintesi dei lipidi



T = Tafazzin, PC = phosphatidylcholine
 CL = cardiolipin, M = mono, L = lyso

TAZ (or **G4.5**) encodes an acyl-coenzyme A synthetase/transacylase (tafazzin)



Nature Genetics 12, 385 - 389 (1996)

A novel X-linked gene, **G4.5**, is responsible for Barth syndrome

Silvia Bione, Patrizia D'Adamo, Elena Maestrini, Agi K. Gedeon, Pieter A. Bolhuis & Daniela Toniolo

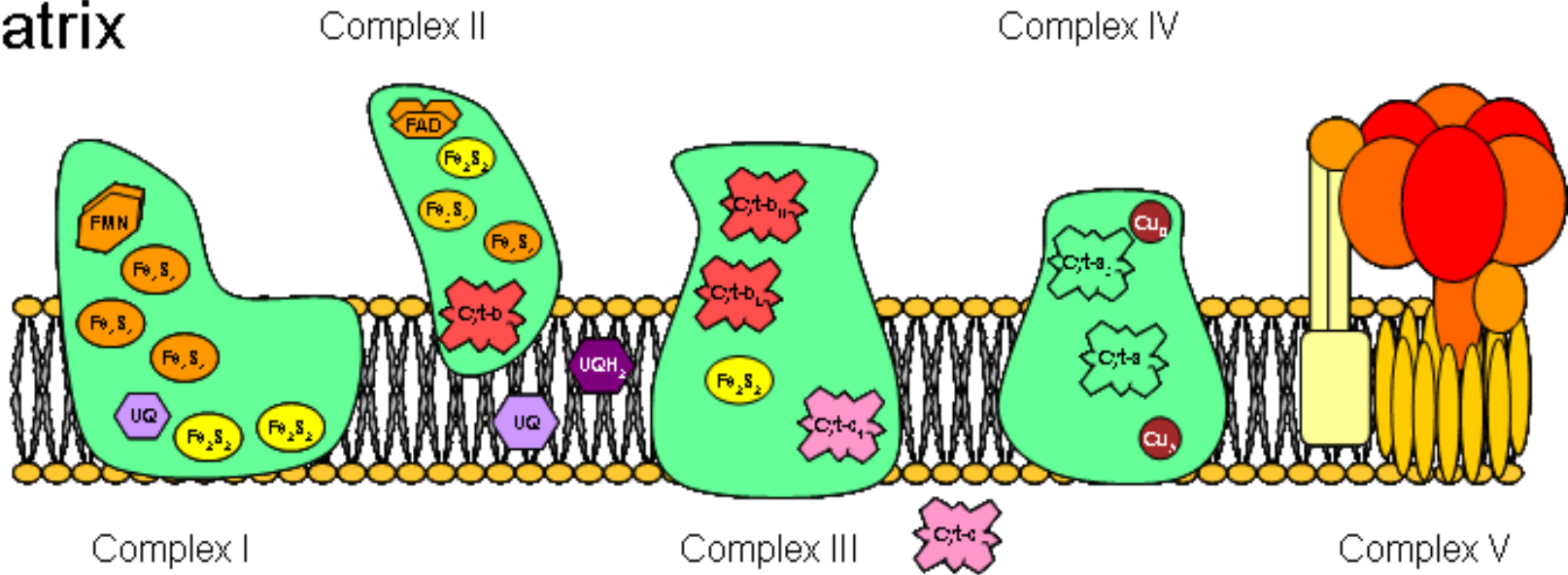
The enigmatic role of tafazzin in cardiolipin metabolism

Biochimica et Biophysica Acta 1788 (2009) 2003–2014



Fattori relati alla biosintesi di cofattori

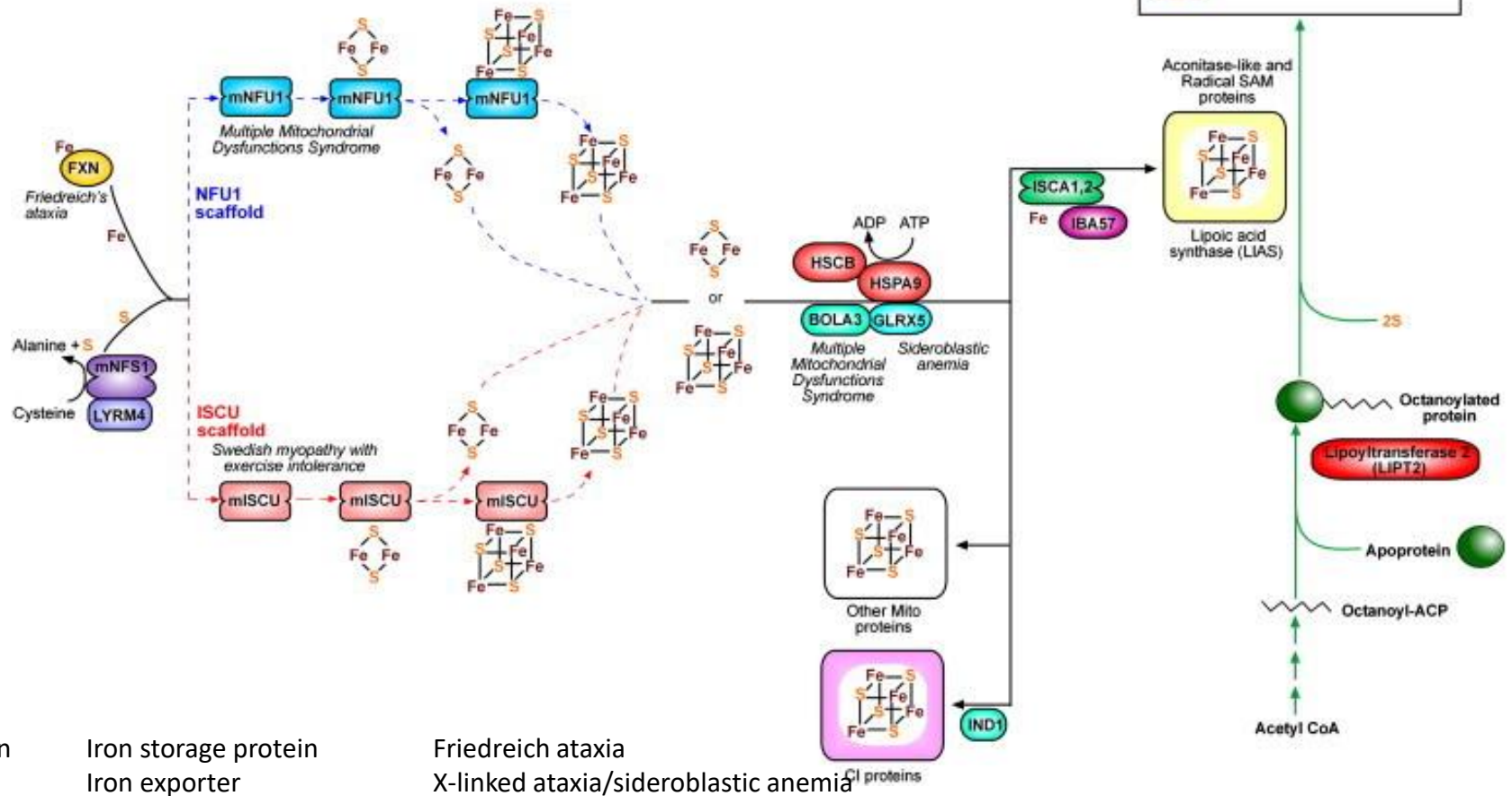
Matrix



Intermembrane space

Thiamine	SLC19A3 SLC25A19 TPK1	Coenzyme Q	ADCK3 ADCK4 COQ2 COQ4 COQ6 COQ9 PDSS1 PDSS2	Haem	COX10 COX15 PPOX SLC25A38 CYCS HCCS
Lipoic acid	LIAS LIPT1 DLD	Biotin	BTD HLCS	CoA	COASY PANK2
		Cu	SCO1 SCO2 COA6	FAD	FLAD1
				NADP	NADK2
				Fe	SFXN4

Fattori relati alla biosintesi dei centri FeS



Frataxin
ABC7

Iron storage protein
Iron exporter

Friedreich ataxia
X-linked ataxia/sideroblastic anemia

ISCU
NFU1

FeS scaffold protein
FeS cluster scaffold

Myopathy with lactic acidosis
Weakness, lethargy, and severe lactic acidosis

BOLA3

reductases interacting
with glutaredoxins

Cardiomyopathy and epileptic encephalopathy

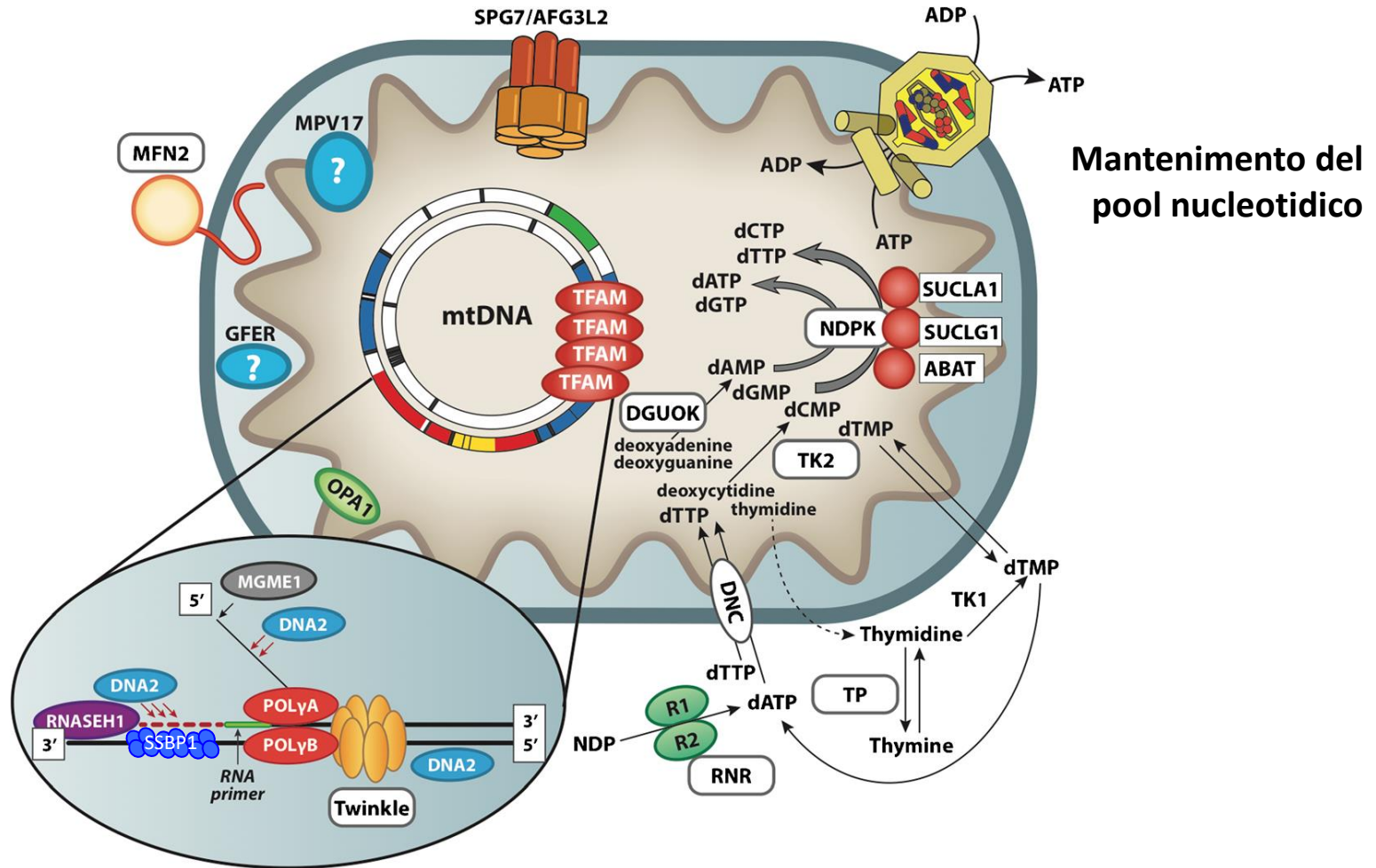
IBA57
ISCA2

maturation of 4Fe-4S
proteins

Leukodystrophy

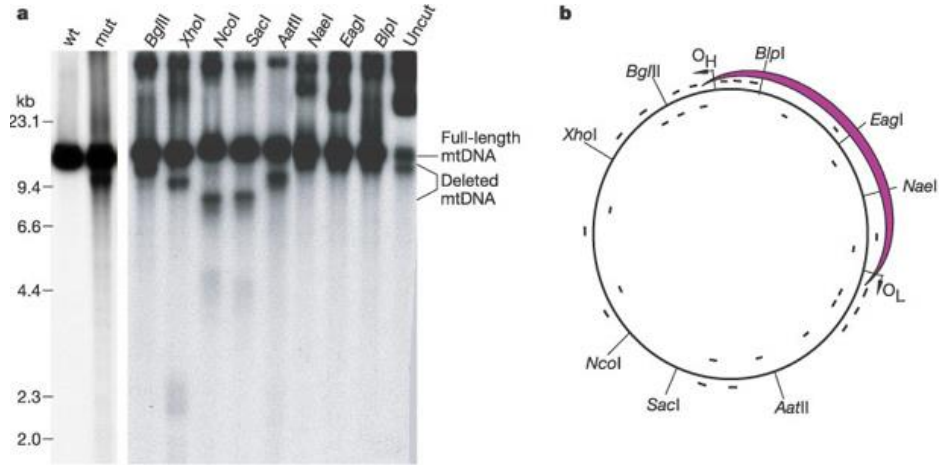
MMDS

4- Difetti in geni codificanti fattori coinvolti nel mantenimento del mtDNA



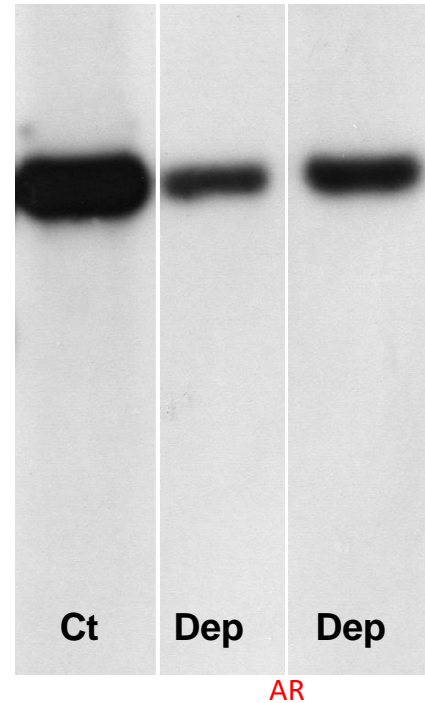
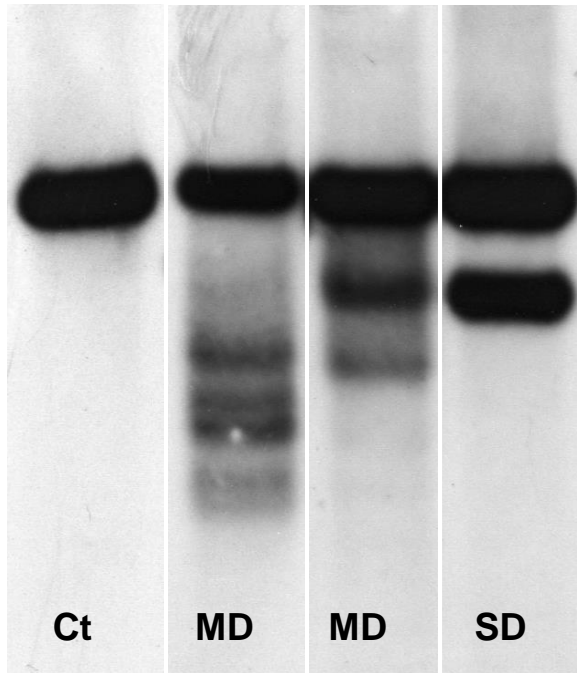
Apparato di replicazione del mtDNA

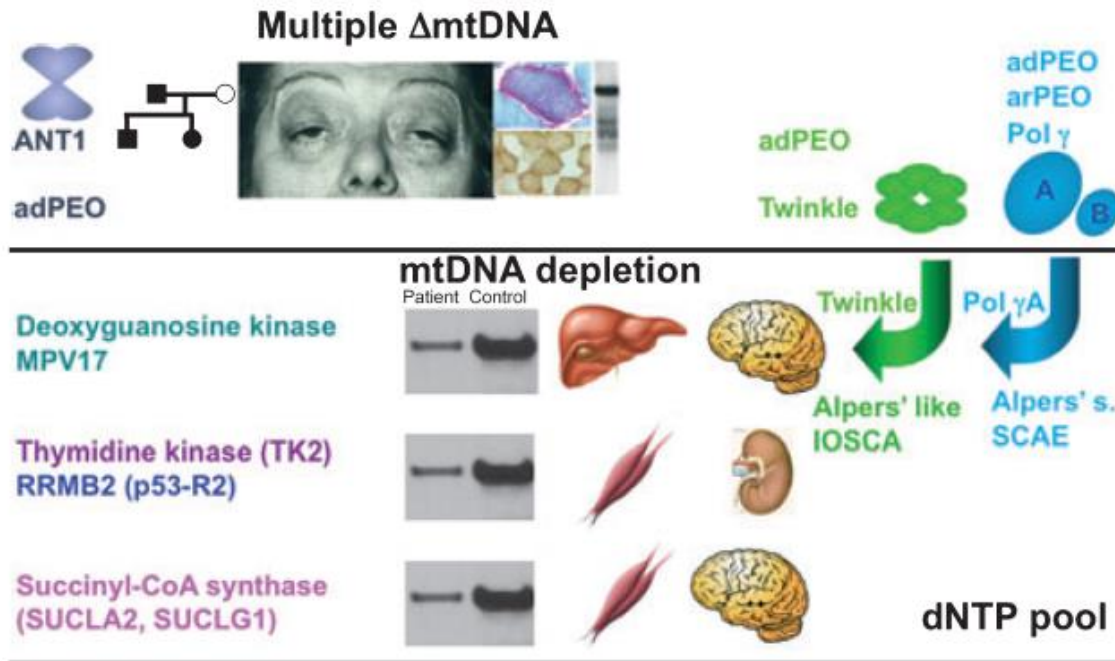
Southern blot analysis



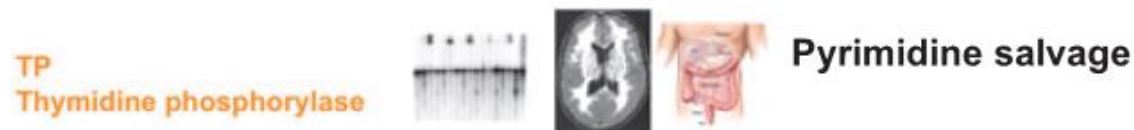
Alterazioni qualitative: delezioni

Alterazioni quantitative: deplezione





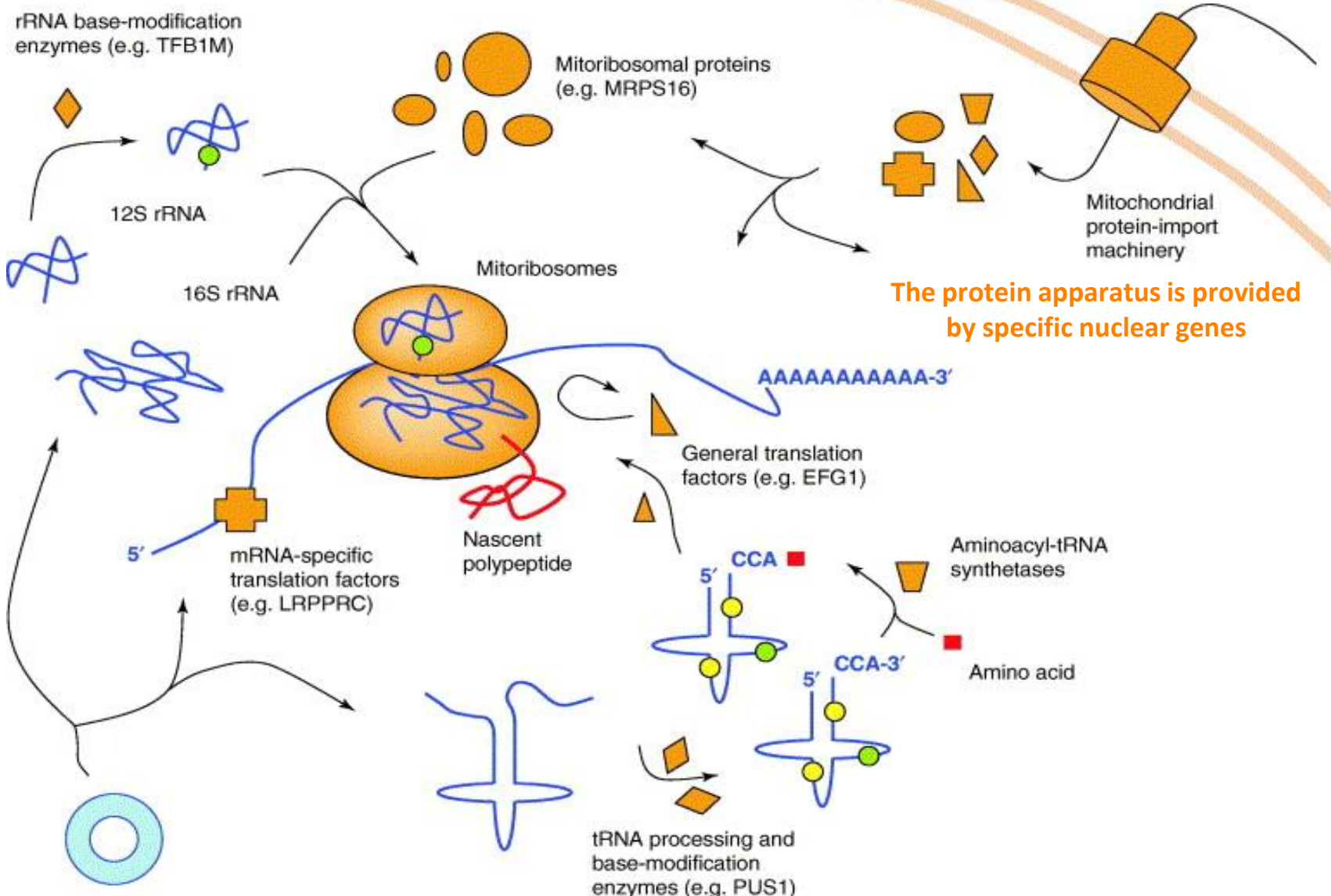
Replication	POLG
	POLG2
Nucleotides	C10orf2
	MGME1
	DNA2
	DGUOK
	MPV17
	RRM2B
	SLC25A4
	SUCLA2
	SUCLG1
	TK2
	TYMP



Gene	mtDNA alteration	Inheritance	Main clinical phenotype	Gene	mtDNA alteration	Inheritance	Main clinical phenotype
SLC25A4	Multiple deletions	AD	ad/arCPEO	MPV17	Depletion	AR	Hepatocerebral syndrome
	Multiple deletions	AR	myopathy and cardiomyopathy		Multiple deletions	AR	arCPEO, leukoencephalopathy and parkinsonism
	Depletion	AD	myopathy and cardiomyopathy				
TWNK	Multiple deletions	AD	adCPEO	OPA1	Multiple deletions	AD	DOA
	Multiple deletions	AR	IOSCA		Multiple deletions	AD	DOA plus
	Depletion	AR	Alpers-like	MFN2	Multiple deletions	AD	DOA plus
POLG	Multiple deletions	AD	adCPEO	SPG7	Multiple deletions	AR	arCPEO and ataxia
	Multiple deletions	AR	arCPEO	AFG3L2	Multiple deletions	AD	arCPEO and ataxia
	Depletion	AR	Alpers-Huntenlocher	TYMP	Multiple deletions and depletion	AR	MNGIE
	Multiple deletions	AR	SANDO/SCAE				
POLG2	Multiple deletions	AD	adCPEO	SUCLA2	Depletion	AR	Hepatocerebral syndrome
TFAM	Depletion	AR	Hepatocerebral syndrome	SUCLG1	Depletion	AR	Hepatocerebral syndrome
MGME1	Multiple deletions	AR	arCPEO	ABAT	Multiple deletions	AR	Encephalomyopathy
DNA2	Multiple deletions	AD	adCPEO	FBXL4	Depletion	AR	Encephalomyopathy
RNASEH1	Multiple deletions	AR	arCPEO	GFER	Multiple deletions	AR	Myopathy
RRM2B	Multiple deletions	AD	adCPEO				
	Depletion	AR	myopathy and tubulopathy				
TK2	Depletion	AR	myopathy				
	Multiple deletions	AR	arCPEO				
DGUOK	Depletion	AR	Hepatocerebral syndrome				
	Multiple deletions	AR	Myopathy with or w/o CPEO				
	Multiple deletions	AR	lower motor neuron syndrome				

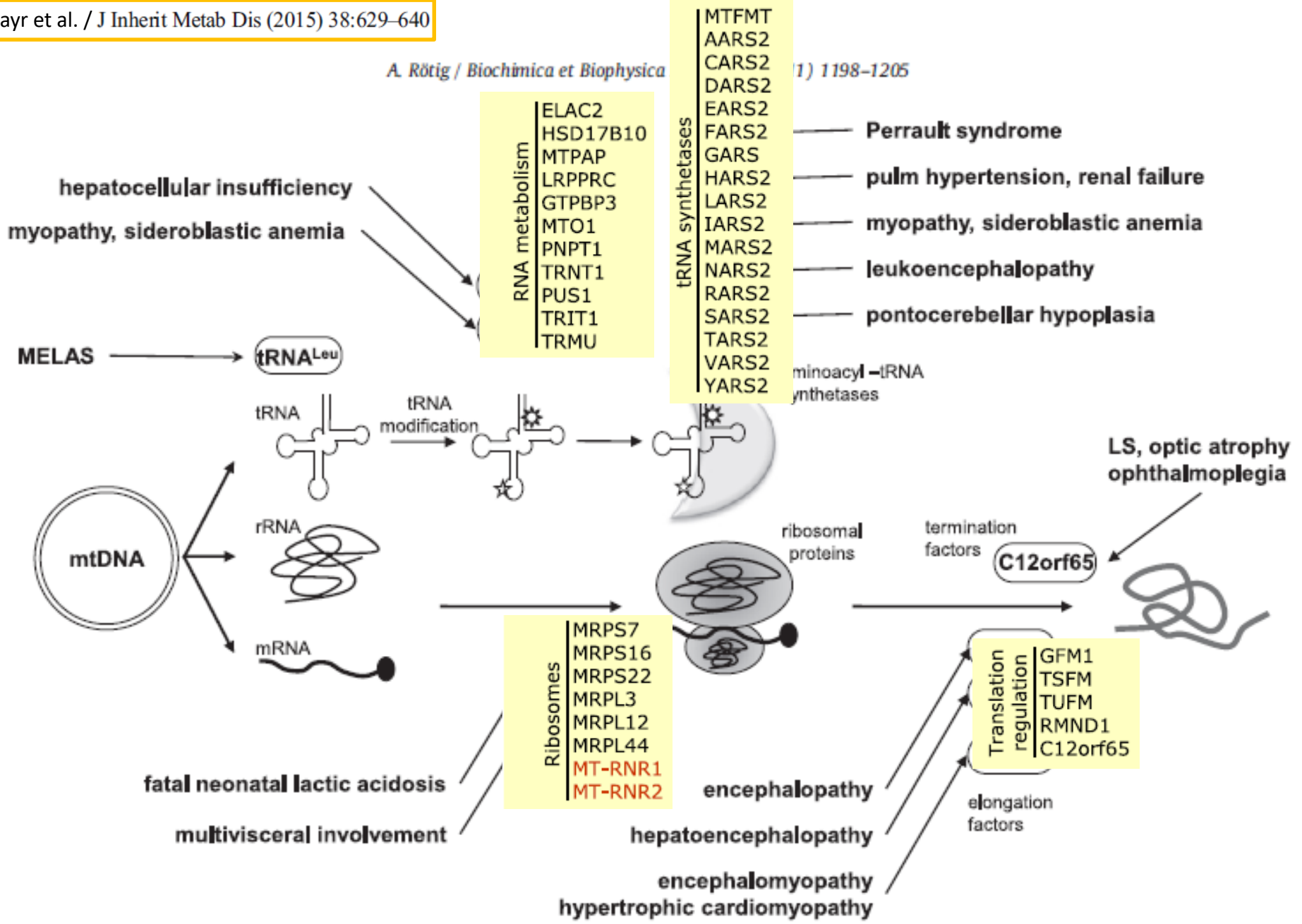
5- Difetti in geni codificanti fattori coinvolti nella sintesi proteica mitocondriale

mtDNA translation takes place in mitochondria



The RNA apparatus is provided by mtDNA genes (tRNAs, rRNAs)

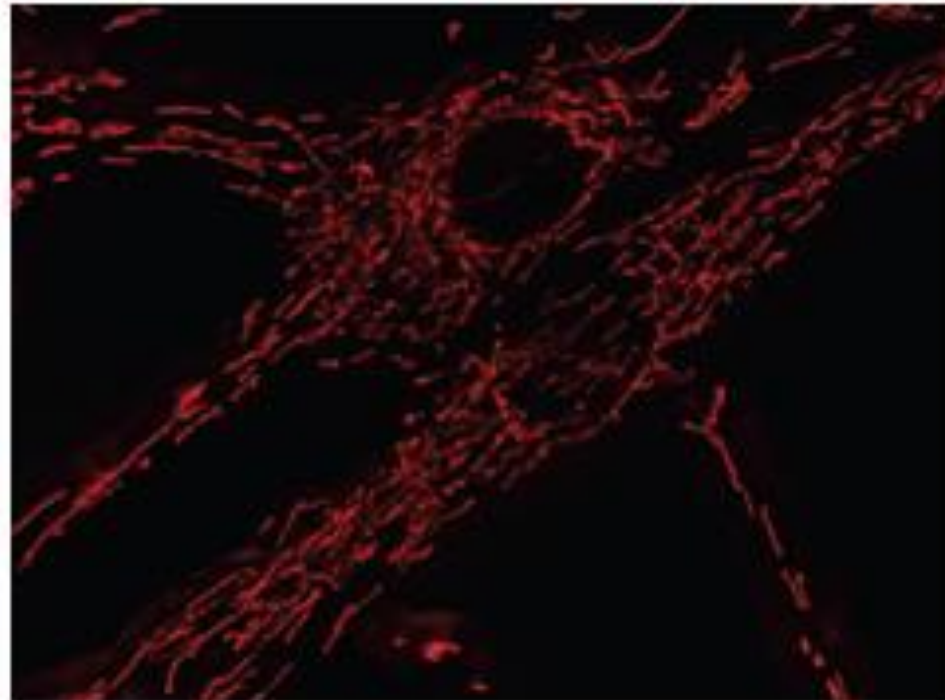
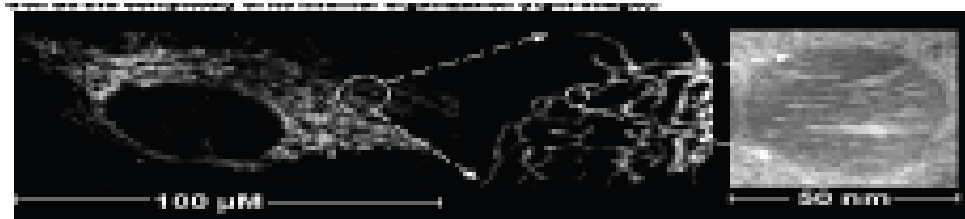
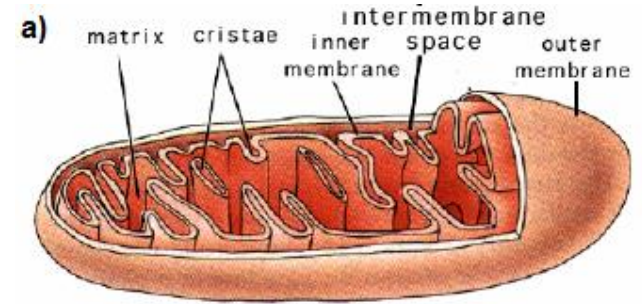
A. Rötig / *Biochimica et Biophysica*



6- difetti in geni codificanti fattori coinvolti nella dinamica mitocondriale

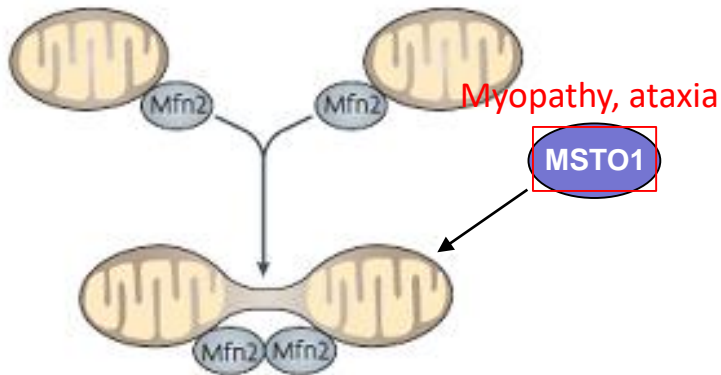
Mitochondria can change their shape, size and inner membrane structure in a dynamic fashion. In addition, the mitochondria of a single cell do not function in isolation, but form a complex reticulum whose morphology undergoes continuous changes in response to metabolic stimuli and signaling pathways.

Bueler et al. 2010



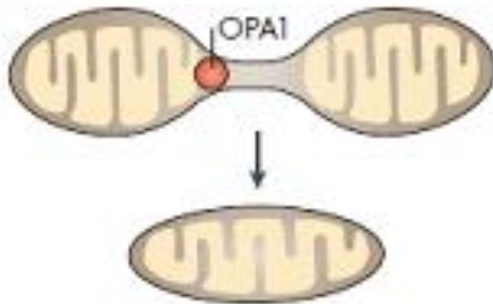
Fusion

a Outer membrane fusion



Mitofusins 1 e 2, MFN1 e MFN2
CMT2A

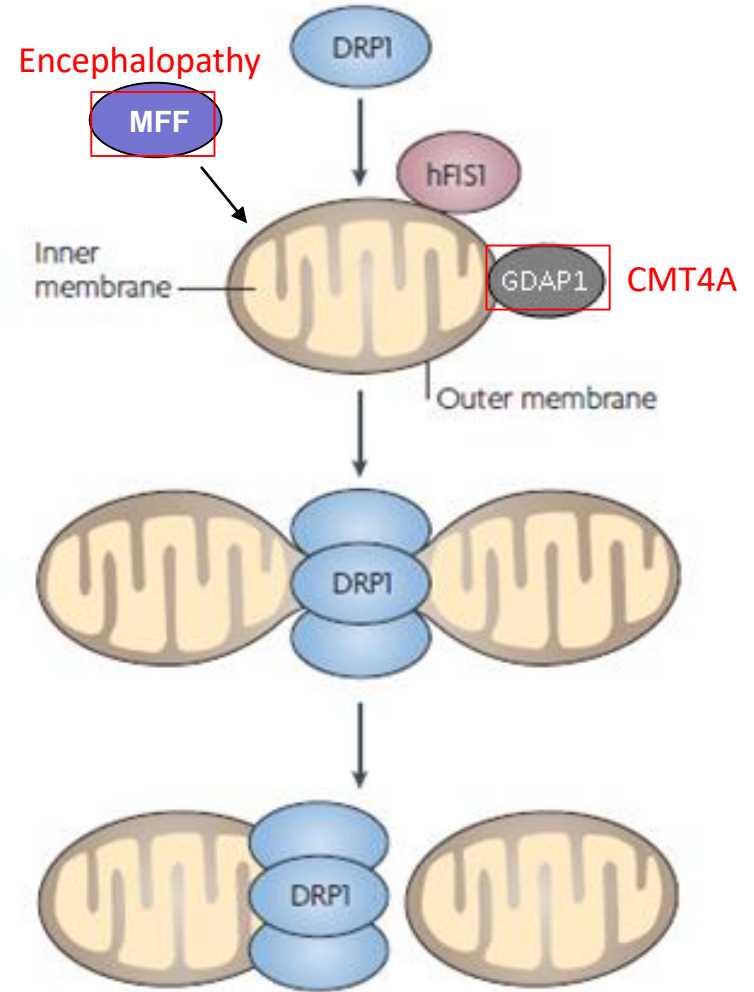
d Inner membrane fusion



Optic atrophy 1, OPA1
OA

Fission

a Mitochondrial fission



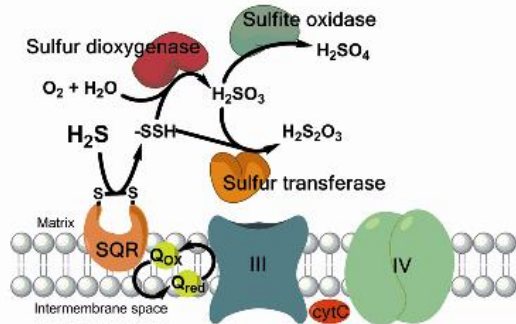
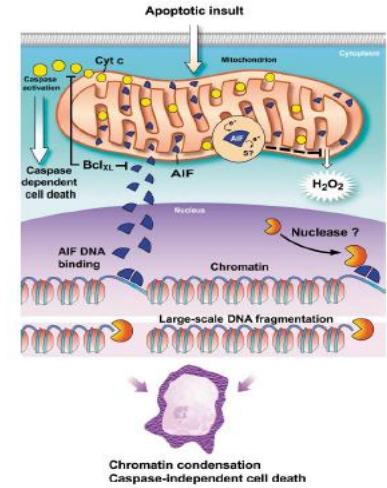
Dynamin-related protein 1, DRP1
Encephalopathy

7- Miscellanea

Apoptosi

AIF1 Programmed cell death inducer, NADH-dependent oxidoreductase

Progressive mitochondrial encephalomyopathy with muscle mtDNA depletion
Prenatal ventriculomegaly and infantile encephalomyopathy



Detossificazione

ETHE1 Exploitation and detoxification of sulfide

Encephalopathy, microangiopathy, chronic diarrhea, ethylmalonic aciduria

Import delle proteine all'interno dei mitocondri

TIMM8A Transporter of carrier proteins

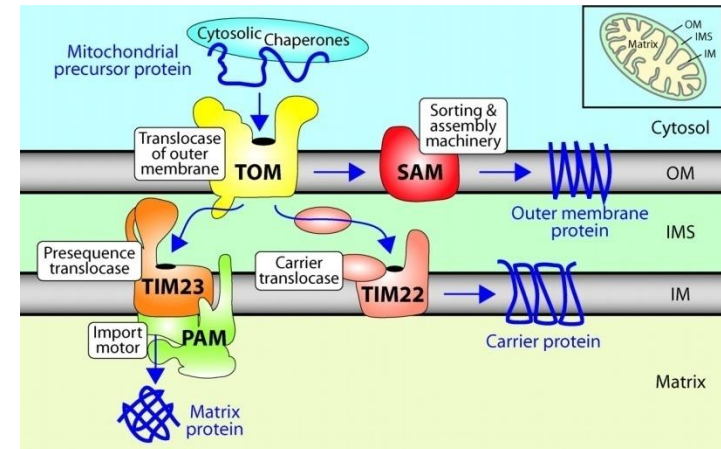
X-linked deafness–dystonia (Mohr–Tranebjaerg syndrome)

DNAJC19 Mitochondrial import

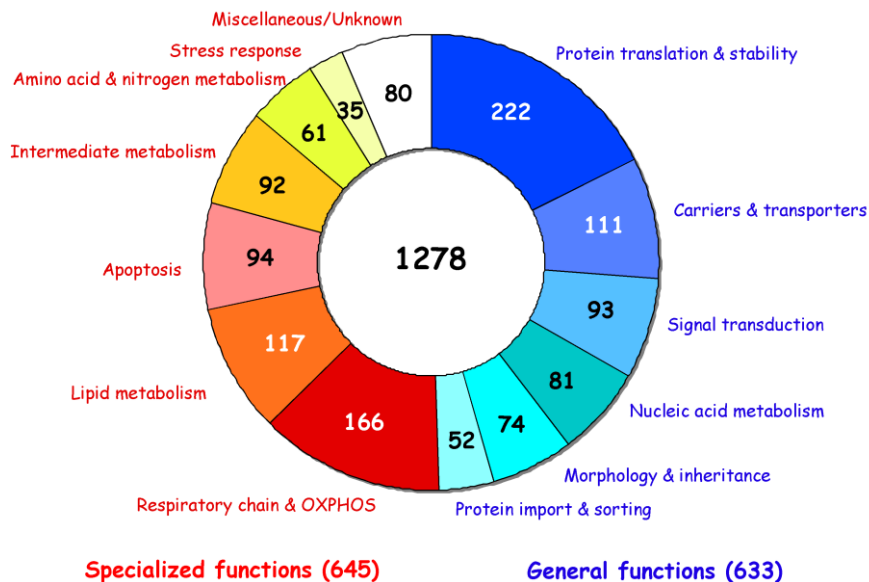
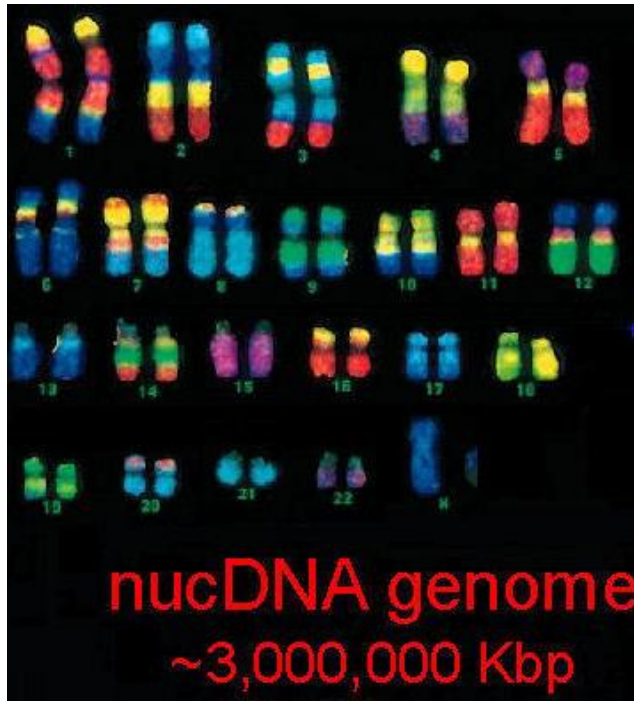
Cardiomyopathy with ataxia

GFER Sulfhydryl oxidase, mitochondrial import

Myopathy, cataract, sensorineural hearing loss, and developmental delay



La genetica delle malattie mitocondriali



Difetti del DNA mitocondriale

- Geni coinvolti nella sintesi proteica (rRNAs, tRNAs)
- Geni che codificano subunità dei complessi respiratori
- Delezioni

UO Genetica Medica e Neurogenetica

direttore Franco Taroni

SS Genetica dei Disturbi del
Movimento e dei Disordini del
Metabolismo Energetico

Barbara Garavaglia

Federica Invernizzi
Eleonora Lamantea
Chiara Reale
Celeste Panteghini
Manuela Spagnolo

SS Patologia Molecolare delle
Malattie Mitocondriali

Valeria Tiranti

Ivano Di Meo
Camille Peron
Chiara Cavestro
Tommaso Cabassi
Antonello Manocchio
Costanza Lamperti
Silvia Marchet
Alessia Catania

Laboratorio di Genetica Istituto
Besta/Università degli Studi di
Milano

Daniele Ghezzi

Alessia Nasca
Andrea Legati



GRAZIE