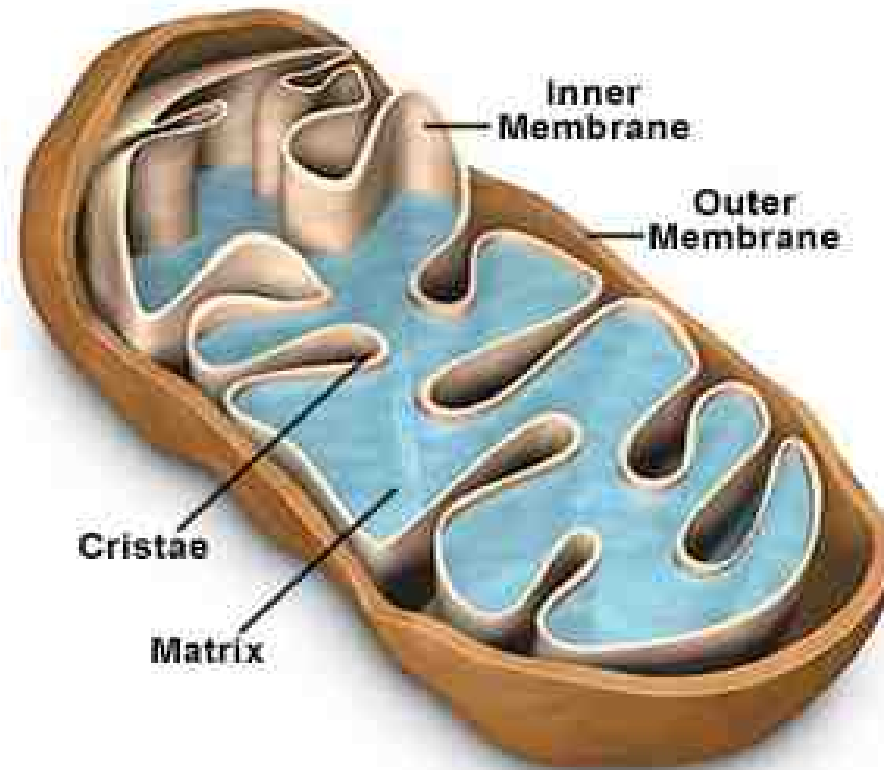




# Eredita' mitocondriale

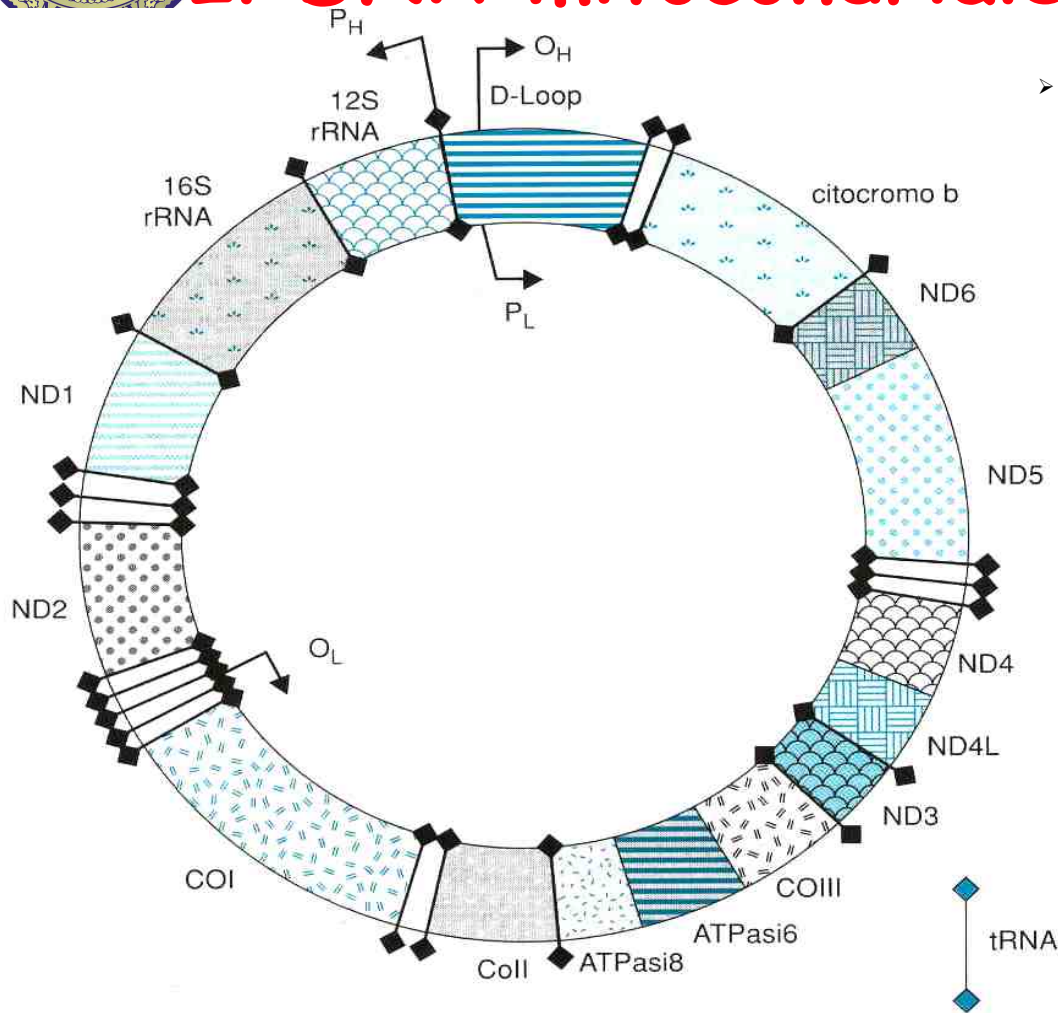


Lezione 11



# Il DNA mitocondriale

0.0005% del genoma umano



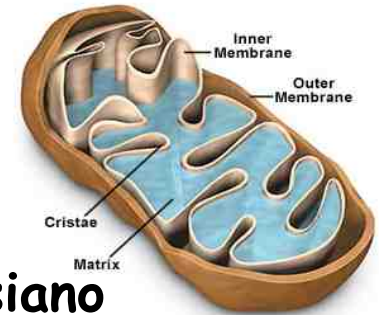
➤ la struttura del genoma mitocondriale mostra una maggiore somiglianza con i genomi procariotici che con quelli eucariotici: i geni sono privi di introni e vengono trascritti come mRNA policistronici a partire da due promotori

➤ su ciascun filamento della doppia elica c'è un sito di inizio della sintesi di DNA

➤ le sequenze di DNA poste tra i geni codificanti per proteine codificano per i tRNA



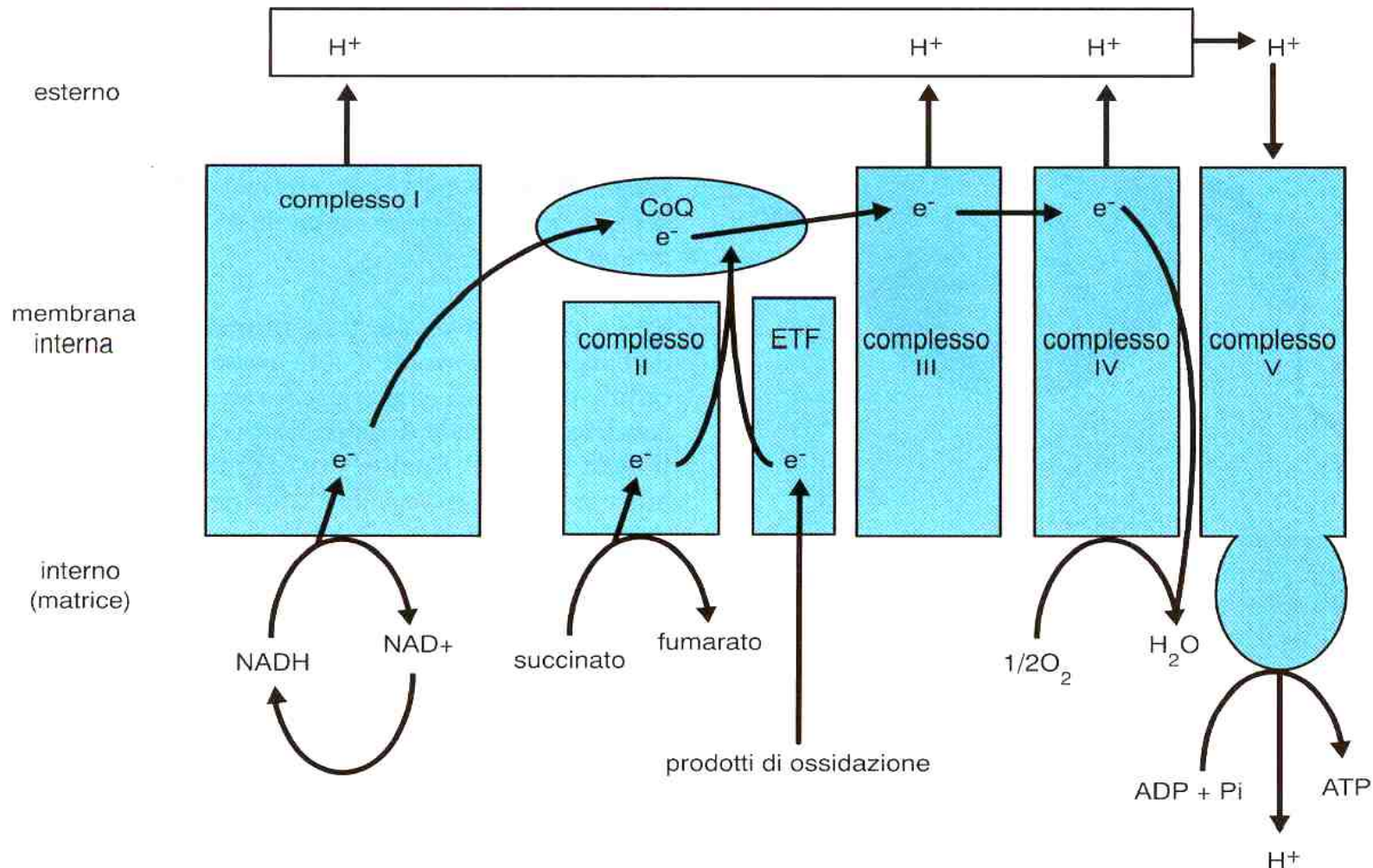
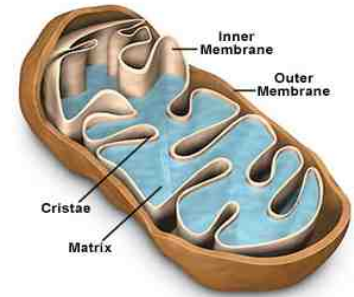
# Il DNA mitocondriale



- ☞ sebbene la maggior parte delle proteine mitocondriali siano codificate da geni nucleari, alcune di esse sono codificate da geni mitocondriali e le mutazioni a loro carico possono condurre a difetti del metabolismo energetico
- ☞ il DNA mitocondriale codifica 13 peptidi, che costituiscono subunita' di proteine necessarie per la fosforilazione ossidativa, 22 tRNA e 2 rRNA
- ☞ la fosforilazione ossidativa richiede piu' di 60 proteine, la maggior parte di esse codificate nel nucleo e trasportate nel mitocondrio



# Fosforilazione ossidativa





# LM Sc.Biosanitarie Ricerca Diagnostica 2013-14

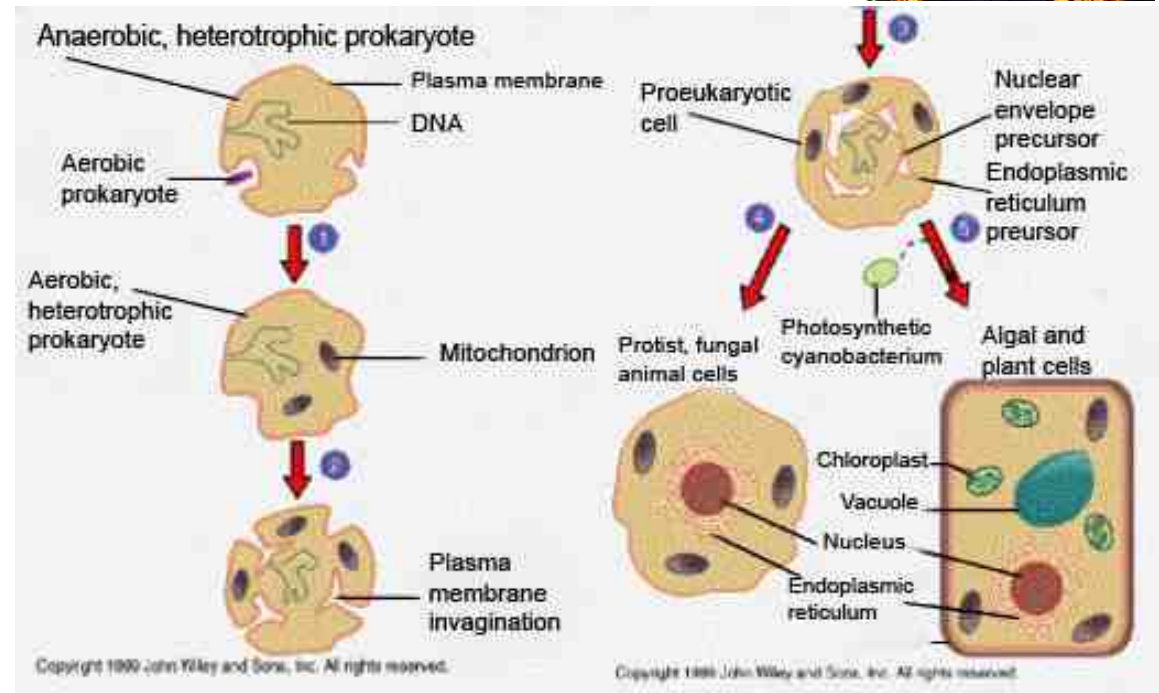
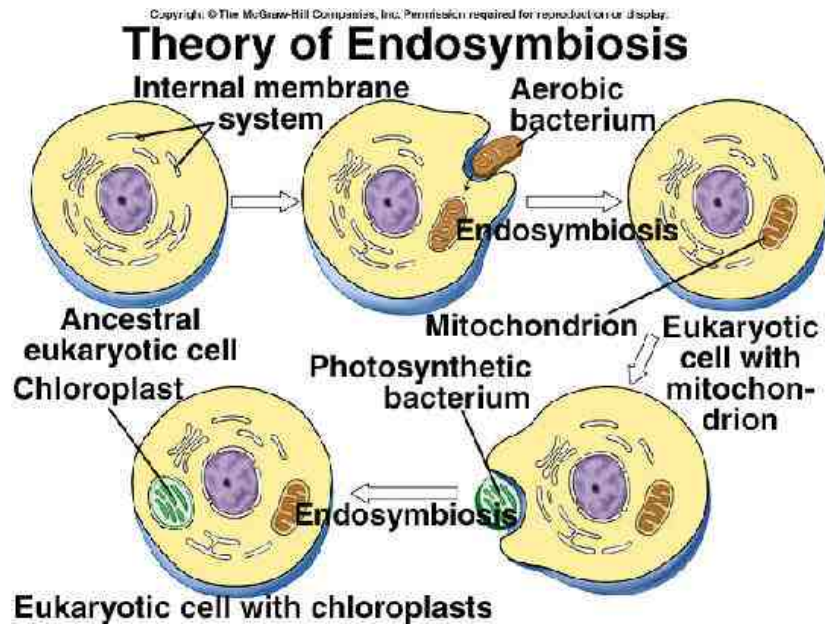
	Prokaryotes	Eukaryotes	Mitochondria of Eukaryotic cells	Chloroplasts of Photosynthetic eukaryotes
<b>DNA</b>	1 single, circular chromosome	Multiple linear chromosomes compartmentalized in a nucleus	1 single, circular chromosome	1 single, circular chromosome
<b>Replication</b>	Binary Fission (1 cell splits into 2)	Mitosis	Binary Fission (1 cell splits into 2)	Binary Fission (1 cell splits into 2)
<b>Ribosomes</b>	"70 S"	"80 S"	"70 S"	"70 S"
<b>Electron Transport Chain</b>	Found in the plasma membrane around cell	Not found in the plasma membrane around cell (found only in the cell's mitochondria and chloroplasts)	Found in the plasma membrane around mitochondrion	Found in the plasma membrane around chloroplast
<b>Size (approximate)</b>	~1-10 microns	~50 - 500 microns	~1-10 microns	~1-10 microns
<b>Appearance on Earth</b>	Anaerobic bacteria: ~3.8 Billion years ago Photosynthetic bacteria: ~3.2 Billion years ago Aerobic bacteria: ~2.5 Billion years ago	~1.5 billion years ago	~1.5 billion years ago	~1.5 billion years ago



## Lynn Margulis

1967 Lynn Sagan (1967). "On the origin of mitosing cells". *J Theor Bio.* 14 (3): 255-274

1981 Lynn Margulis Symbiosis in cell evolution





# Attenzione

molte delle molecole che garantiscono la funzione mitocondriale sono codificate dal DNA nucleare. Quindi alcune patologie mitocondriali sono dovute a mutazioni patogenetiche del DNA nucleare e, secondo le leggi di Mendel nella loro trasmissione, possono essere studiate e diagnosticate come tutte le altre. In questi casi il mitocondrio non è altro che una delle tante strutture della cellula che dipende dal nucleo per la propria funzione. La funzione "produzione di energia" può, quindi, venir compromessa per due ragioni:

1. **mutazione dei geni nucleari**
2. **mutazione dei geni mitocondriali**

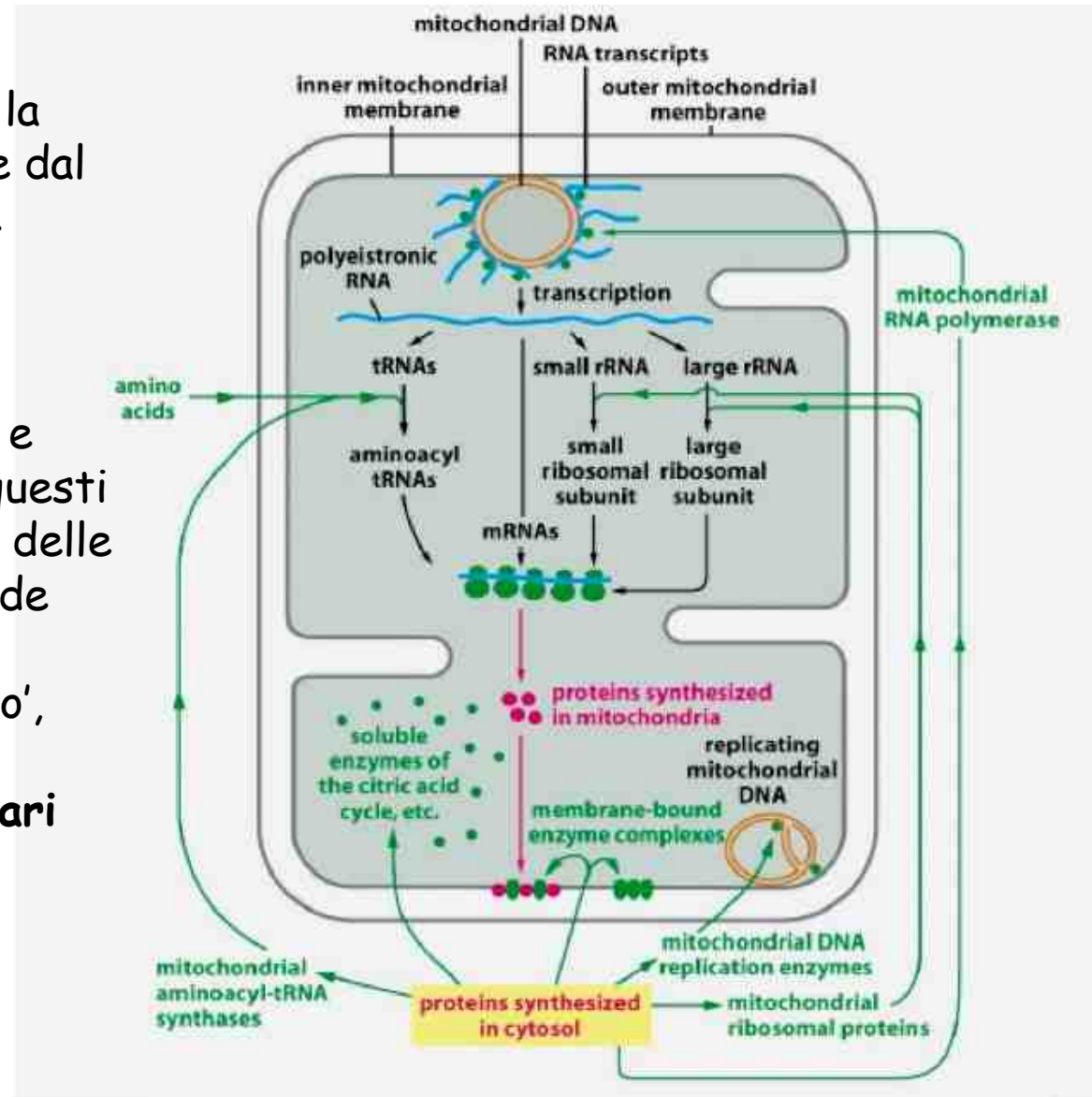


Figure 14-66 Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)



# Frequenza dei disordini mitocondriali

Recent epidemiological studies confirm that pathogenic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations are a major cause of human disease, affecting at least 1 in 5000 of the population. Pathogenic ALLELES are present in > 1 in 200 live births, and occur *de novo* at least every 1000 births.

The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations

L.M. Cree, D.C. Samuels, and P.F. Chinnerya *Biochim Biophys Acta*. 2009 December ; 1792(12): 1097-1102.

**il 93% del DNA mitocondriale e' codificante**

☹️ ha una struttura cromatinica diversa: non e' protetto dagli istoni

☹️ andando incontro a numerosissimi cicli di replicazioni e' piu' soggetto agli errori della macchina replicativa (fonte di mutazioni anche nel nucleare)

☹️ i meccanismi di riparo sono meno efficienti rispetto al DNA nucleare.



Tutto cio' fa si che un certo numero di patologie genetiche siano originate da alterazioni della funzione mitocondriale (produzione di energia). Le malattie "mitocondriali" si manifestano in quei distretti dell'organismo in cui e' richiesta una piu' alta produzione di energia: sistema nervoso, muscolo, occhi, fegato.... e hanno un'elevata variabilita' clinica anche all'interno della stessa famiglia.





## Disordini mitocondriali

Table 2 | **Clinical disorders that are caused by mutations in mitochondrial DNA**

Mitochondrial DNA disorder	Clinical phenotype	mtDNA genotype	Gene	Status	Inheritance	Reference
Kearns-Sayre syndrome	Progressive myopathy, ophthalmoplegia, cardiomyopathy	A single, large-scale deletion	Several deleted genes	Heteroplasmic	Usually sporadic	61,158
CPEO	Ophthalmoplegia	A single, large-scale deletion	Several deleted genes	Heteroplasmic	Usually sporadic	61, 64
Pearson syndrome	Pancytopenia, lactic acidosis	A single, large-scale deletion	Several deleted genes	Heteroplasmic	Usually sporadic	65
MELAS	Myopathy, encephalopathy lactic acidosis, stroke-like episodes	3243A>G; 3271T>C Individual mutations	<i>TRNL1</i> <i>ND1 and ND5</i>	Heteroplasmic Heteroplasmic	Maternal Maternal	159 160, 161
MERRF	Myoclonic epilepsy, myopathy	8344A>G; 8356T>C	<i>TRNK</i>	Heteroplasmic	Maternal	162
NARP	Neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa	8993T>G	<i>ATP6</i>	Heteroplasmic	Maternal	163
MILS	Progressive brain-stem disorder	8993T>C	<i>ATP6</i>	Heteroplasmic	Maternal	67
MIDD	Diabetes, deafness	3243A>G	<i>TRNL1</i>	Heteroplasmic	Maternal	164
LHON	Optic neuropathy	3460G>A 11778G>A 14484T>C	<i>ND1</i> <i>ND4</i> <i>ND6</i>	Hetero- or homoplasmic Hetero- or homoplasmic Hetero- or homoplasmic	Maternal Maternal Maternal	165 62 166
Myopathy and diabetes	Myopathy, weakness, diabetes	14709T>C	<i>TRNE</i>	Hetero- or homoplasmic	Maternal	167,168
Sensorineural hearing loss	Deafness	1555A>G Individual mutations	<i>RNR1</i> <i>TRANS1</i>	Homoplasmic Hetero- or homoplasmic	Maternal Maternal	55 169,170
Exercise intolerance	Fatigue, muscle weakness	Individual mutations	<i>CYB</i>	Heteroplasmic	Sporadic	68
Fatal, infantile encephalopathy; Leigh/Leigh-like syndrome	Encephalopathy, lactic acidosis	10158T>C; 10191T>C	<i>ND3</i>	Heteroplasmic	Sporadic	66

*ATP6*, ATPase 6; CPEO, chronic progressive external ophthalmoplegia; *CYB*, cytochrome *b*; LHON, Leber hereditary optic neuropathy; MELAS, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes; MERRF, myoclonic epilepsy and ragged-red fibres; MIDD, maternally-inherited diabetes and deafness; MILS, maternally-inherited Leigh syndrome; *ND1,3-6*, NADH dehydrogenase subunits 1,3-6; NARP, neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa; *RNR1*, 12S ribosomal RNA; *TRNE, TRNK, TRNL1, TRANS1*, mitochondrial tRNAs.

Da: MITOCHONDRIAL DNA  
MUTATIONS IN HUMAN  
DISEASE

Robert W. Taylor and Doug M.  
Turnbull

NATURE REVIEWS | GENETICS  
VOLUME 6 | MAY 2005 | 389-  
402



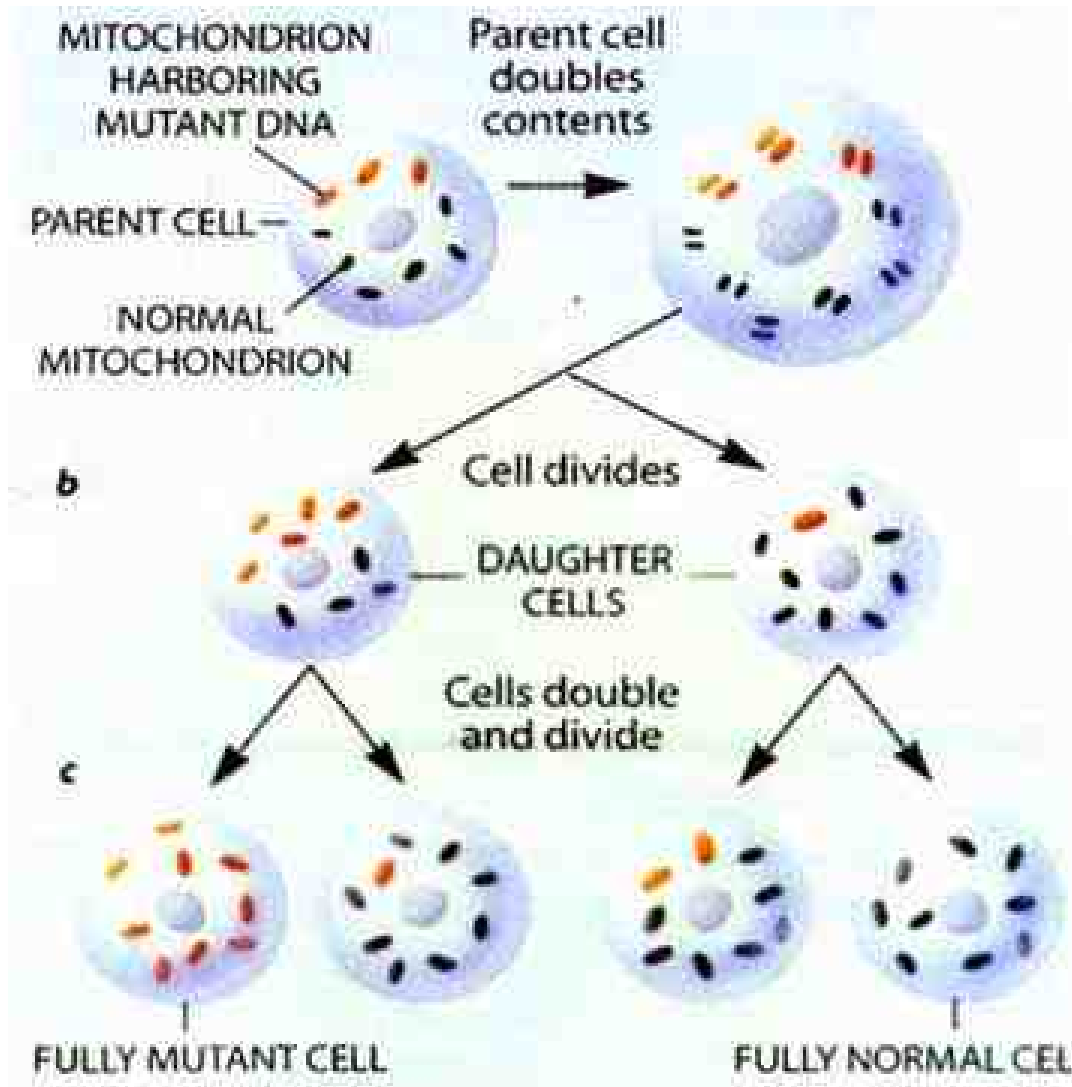
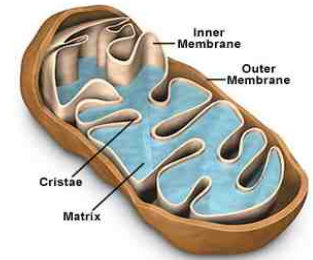
## Attenzione

**mutazione dei geni mitocondriali: un' ulteriore complicazione**

**la segregazione casuale dei mitocondri fa sì che le cellule figlie non possiedano la stessa quantità di mitocondri mutati (eteroplasmia) e quindi il fenotipo può essere diverso da soggetto a soggetto. Solo poche malattie da alterazioni del DNA mitocondriale sono caratterizzate dalla presenza della stessa mutazione in tutte le cellule (omoplasmia).**

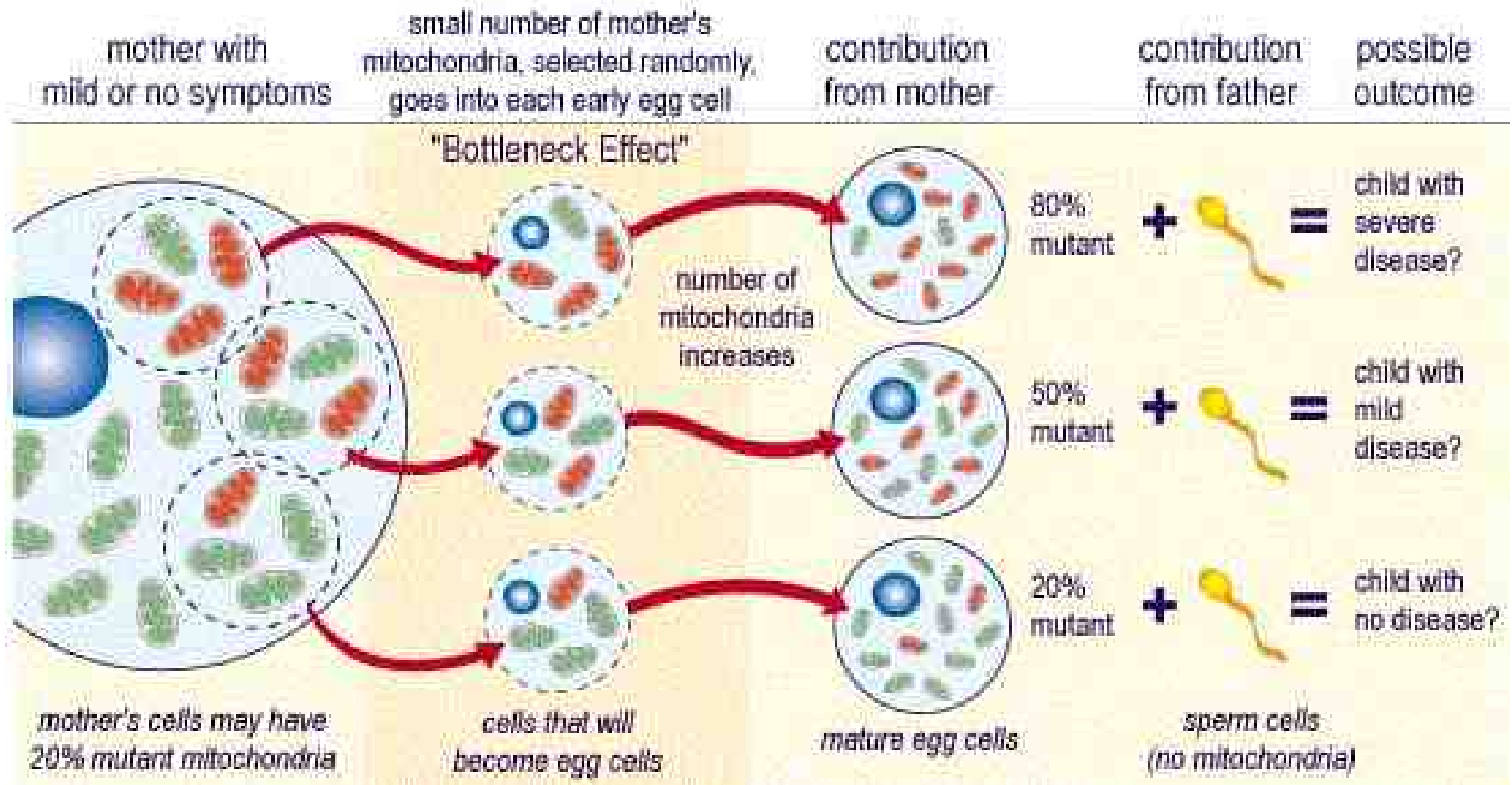
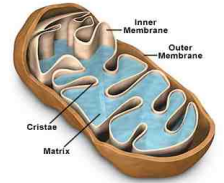


# Eteroplasmia



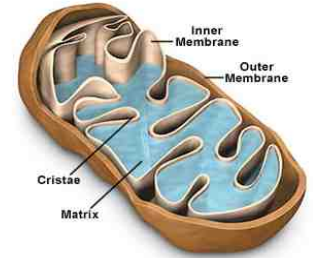


# Eteroplasmia





# Eteroplasmia



- ➡ le patologie mitocondriali mostrano un vasto spettro di variabilità dell'espressione sia all'interno di una famiglia che tra famiglie
- ➡ durante la divisione cellulare ciascuna molecola di DNA mitocondriale si replica e segrega passivamente nelle cellule figlie
- ➡ le cellule possono quindi contenere sia mitocondri wild-type che mutanti in differenti quantità relative



## Perche' variabilita' clinica

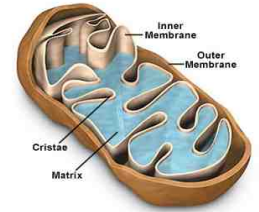
**Le malattie "mitocondriali" si manifestano in quei distretti dell'organismo in cui e' richiesta una piu' alta produzione di energia: sistema nervoso, muscolo, occhi, fegato.... e hanno un'elevata variabilita' clinica anche all'interno della stessa famiglia.**

**Va considerato tuttavia che la funzione che viene persa e' sempre la stessa: produzione di energia. La vasta gamma di deficit nelle proteine mitocondriali nelle malattie mitocondriali e' legata (oltre all'eteroplasmia che giustifica la diversa gravita') al fatto che dei 37 geni presenti, 22 codificano per tRNA e 2 per rRNA, necessari per la sintesi dei 13 polipeptidi codificati dai restanti geni.**

**E' percio' chiaro il perche' della variabilita'?**



# Eteroplasmia



⇒ L'eteroplasmia contribuisce notevolmente alla spiegazione della variabilità clinica

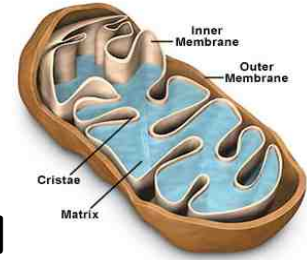
⇒ Le quantità relative di mitocondri normali e mutanti possono variare da tessuto a tessuto e questo spiega in parte le differenze nell'espressione

⇒ Inoltre non è detto che una donna portatrice di una mutazione mitocondriale debba per forza trasmettere alla prole sia mitocondri mutanti che normali, perché ciò può non avvenire o può essere difficile da dimostrare.

💣 quando si esegue un test per una mutazione di DNA mitocondriale è spesso necessario utilizzare più tessuti, poiché, a causa dell'eteroplasmia, alcuni tessuti possono contenere pochi mitocondri mutanti o non contenerne affatto



## Eredita' matroclina



☞ sia geni nucleari che mitocondriali possono dare origine a difetti del metabolismo energetico e le modalita' di trasmissione genetica possono essere autosomiche o materne; quando si parla di malattie mitocondriali si intendono quelle legate a mutazioni del mtDNA

☞ soltanto le femmine trasmettono il carattere

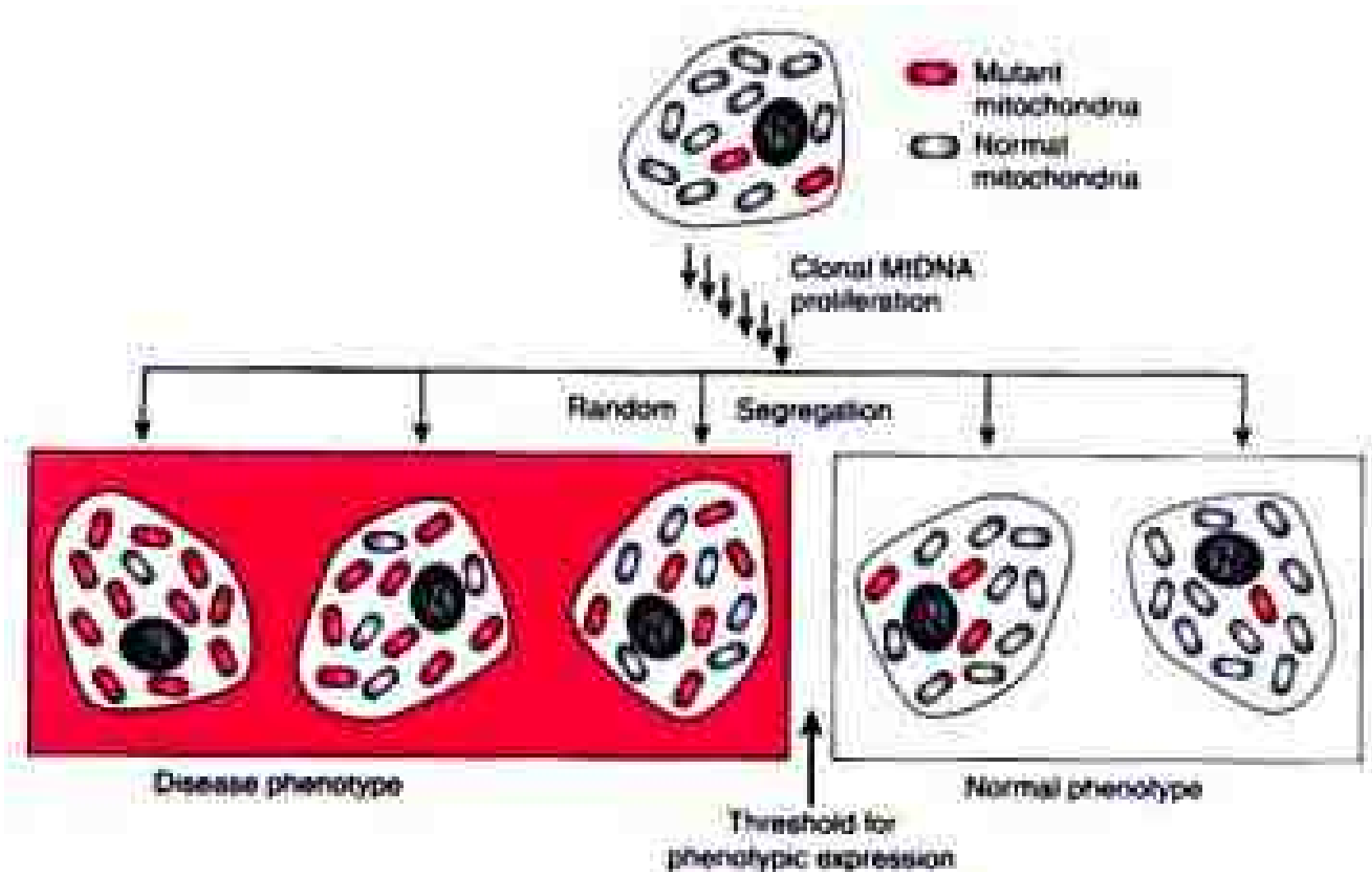
☞ la madre puo' trasmettere il carattere a tutti i propri figli tuttavia e' impossibile prevedere il livello di gravita' della malattia di un figlio.

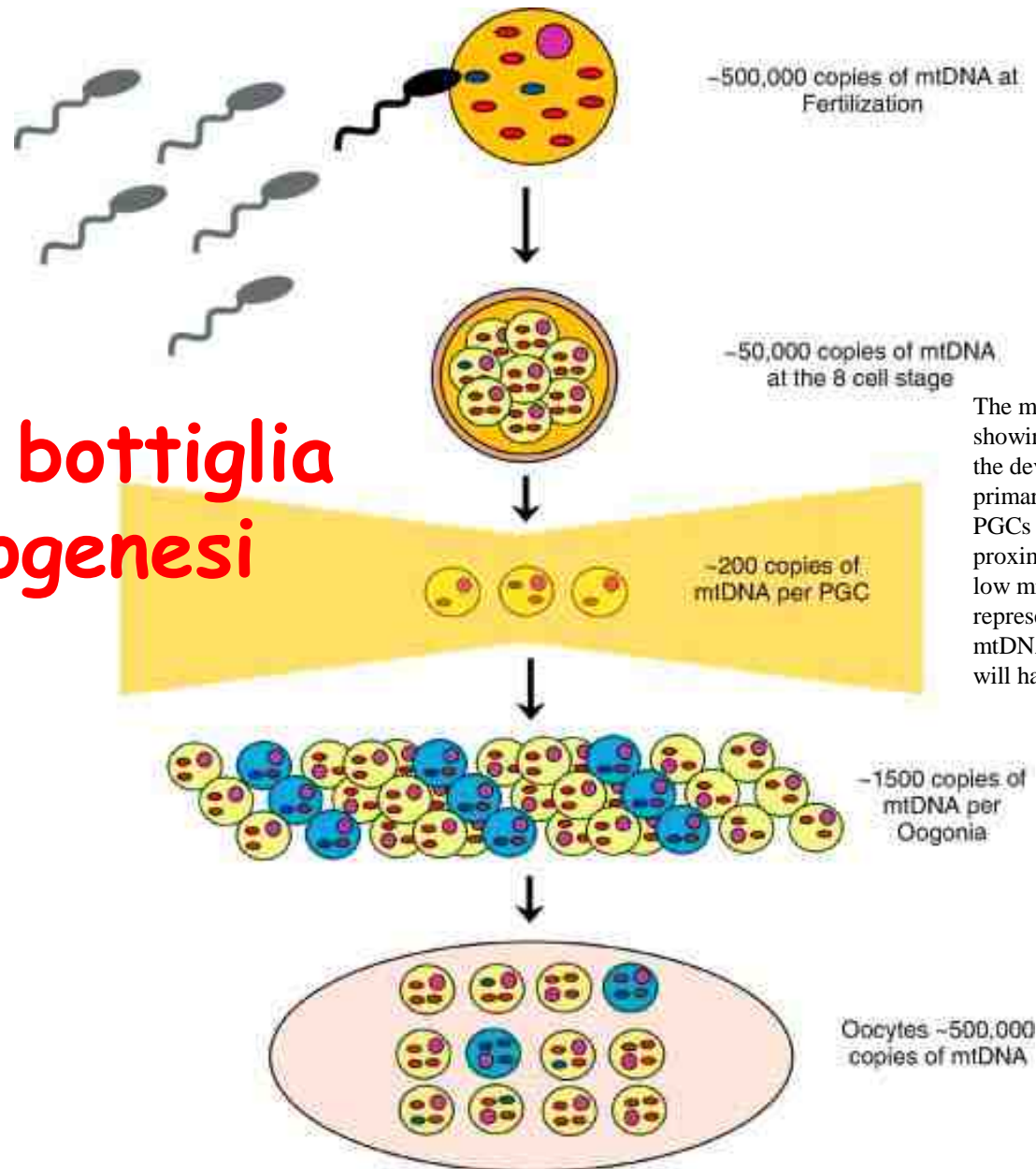
☞ la segregazione casuale dei mitocondri fa si che le cellule figlie non possiedano la stessa quantita' di mitocondri mutati (eteroplasmia) e quindi il fenotipo puo' essere diverso da soggetto a soggetto anche all'interno della stessa famiglia. Solo poche malattie da alterazioni del DNA mitocondriale sono caratterizzate dalla presenza della stessa mutazione in tutte le cellule (omoplasmia). (LHON)





# Effetto soglia





primordial germ cell (PGC)

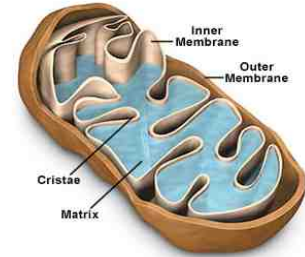
**collo di bottiglia nell'oogenesi**

The mitochondrial genetic bottleneck. Schematic diagram showing a heteroplasmic oocyte being fertilized followed by the development of the embryo. During this development primary oocytes develop from a founder population of 40 PGCs recruited by induction from the epiblast in the posterior-proximal embryonic pole.<sup>144</sup> The PGCs are believed to have a low mitochondrial number of around 200. The red circles represent wild-type mtDNA, blue circles represent mutant-type mtDNA; cells with mutant mtDNA having passed a threshold will have a biochemical defect and are shown in blue.



# Eredita' matroclina nella LHON

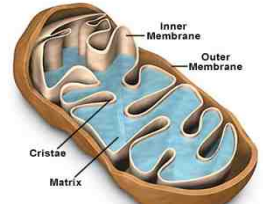
Da: MITOCHONDRIAL DNA  
MUTATIONS IN HUMAN DISEASE  
*Robert W. Taylor and Doug M. Turnbull*  
NATURE REVIEWS | GENETICS VOLUME 6 | MAY 2005 | 389-402



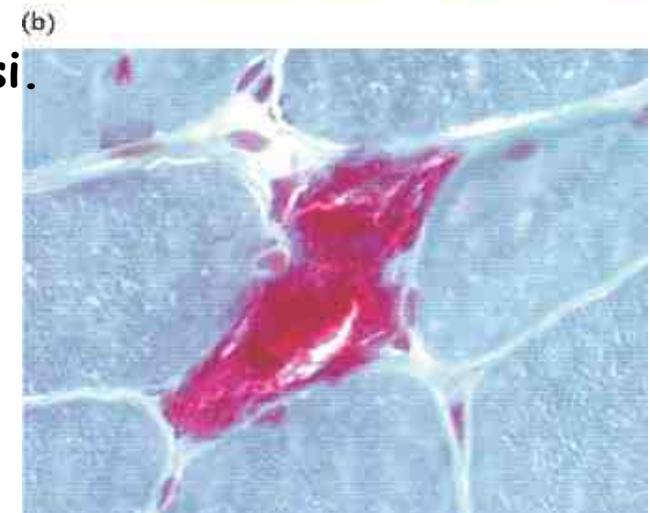
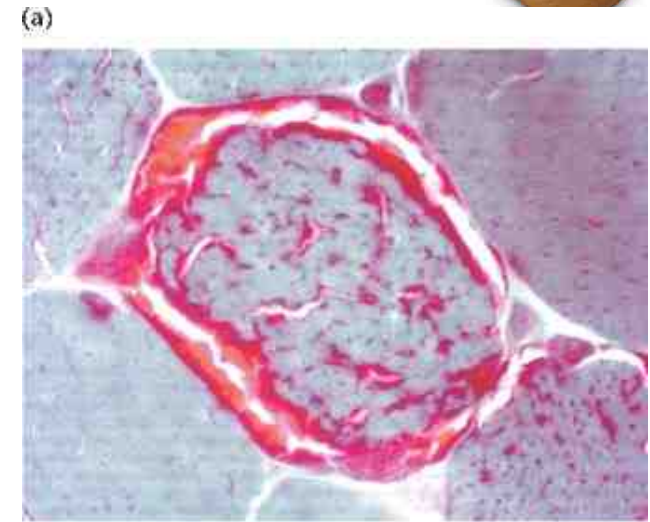
Although all offspring inherit the mutation, only some will develop the disease. Approximately 50% of males, but only 10% of females, develop impaired vision, which certainly indicates that nuclear genetic factors are important in the expression of the disease. Another homoplasmic mtDNA mutation, the 1555A>G 12S ribosomal RNA (*RNR1*) mutation<sup>55</sup>, is an important cause of post-lingual deafness. Its clinical expression depends on the administration of aminoglycoside antibiotics, which highlights the importance of environmental factors in the expression of homoplasmic mtDNA disease.



## MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers)

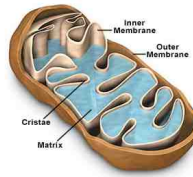


- ⇒ mioclonia: improvvisa contrazione di un gruppo di muscoli che causa un movimento spasmodico
- ⇒ fibre rosse sfilacciate: cellule muscolari con un anello di materiale a colorazione rossa circondante la periferia: mitocondri dall'aspetto anormale che suggeriscono fortemente che si tratta della sede della patologia nei soggetti affetti dalla MERRF.
- ⇒ altri fenotipi: atassia, spasticità, demenza, sordità neurosensoriale e atrofia ottica
- ⇒ Anche l'eredità materna è compatibile con quest'ipotesi.
- ⇒ La patogenesi della malattia può essere vista come un diffuso deficit della produzione di energia nei mitocondri.
- ⇒ I tessuti più sensibili al danneggiamento della funzione mitocondriale sono i tessuti aerobi (es. neuroni e cellule muscolari)





## MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers)



⇒ La presenza di un gran numero di mitocondri dall'aspetto anormale (fibre rosse sfilacciate) nelle cellule muscolari suggerisce fortemente che il mitocondrio sia la sede della patologia nei soggetti affetti dalla MERRF.

⇒ Anche l'eredita' materna e' compatibile con quest'ipotesi.

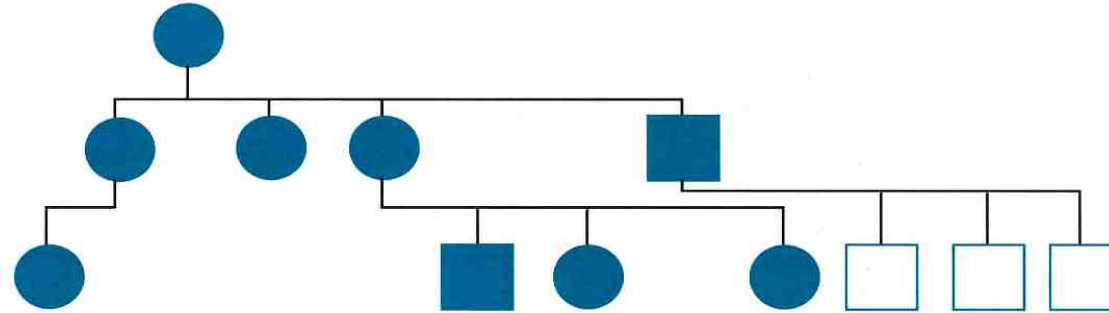
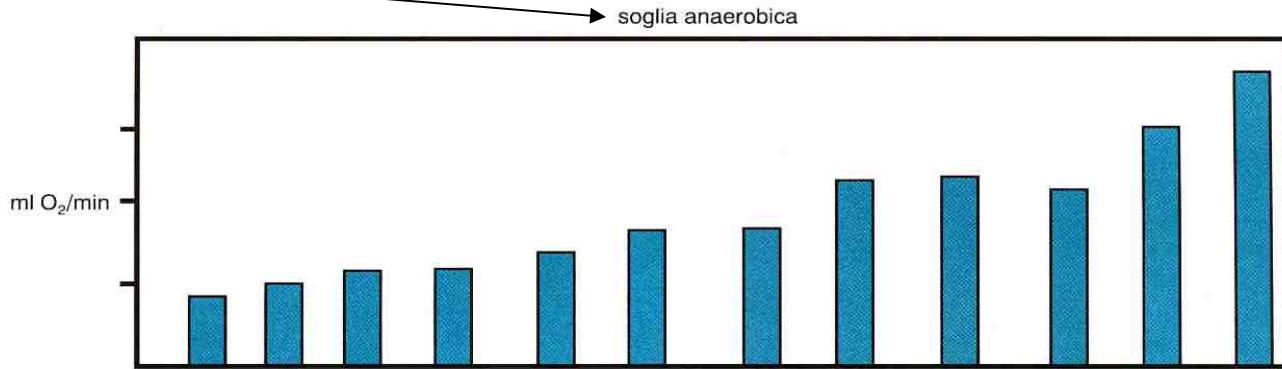
⇒ La patogenesi della malattia puo' essere vista come un diffuso deficit della produzione di energia nei mitocondri.

⇒ I tessuti piu' sensibili al danneggiamento della funzione mitocondriale sono i tessuti aerobi (es. neuroni e cellule muscolari)



# MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers)

misura della capacita' del muscolo di eseguire la fosforilazione ossidativa



Visual Evoked Response	→ VER	3+	2+	2+	+	+	+	+	+	+	-	ND	ND
Elettroencefalografia	→ EEG	5+	4+	+	4+	4+	+	2+	3+	2+	-	ND	ND
	miopatia	3+	2+	2+	2+	2+	+	+	+	-	-	-	-
	sordità	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	epilessia	2+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	demenza	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



## MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers)

⇒ Si è dimostrato un deficit dell'attività dei complessi I e IV nella MERRF, coerentemente col fatto che essi sono costituiti da peptidi codificati nel mitocondrio.

⇒ Nelle cellule di questi soggetti le proteine mitocondriali ad alto peso molecolare venivano sintetizzate in misura minore rispetto alla norma.

⇒ Come può un'alterazione mitocondriale spiegare questi dati?

⇒ transizione A\*G in posizione 8344 nel tRNA per la lisina trovata in 3 soggetti affetti da MERRF



# Altre patologie mitocondriali

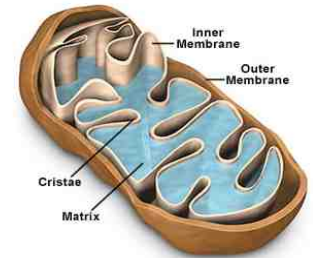


TABELLA 7.1 Principali sindromi associate a mutazioni nel DNA mitocondriale

Sindrome	Caratteristiche cliniche
Kearns-Sayre	Oftalmoplegia esterna, retinopatia pigmentosa, blocco cardiaco, atassia, aumento delle proteine del liquido cerebrospinale
MERRF	Epilessia mioclonica, miopatia, demenza
MELAS	Acidosi lattica, episodi tipo ictus, miopatia, attacchi epilettici, demenza
Neuropatia ottica ereditaria di Leber	Cecità, difetti della conduzione cardiaca
Sindrome di Leigh	Atassia, discinesia respiratoria, regressione psichica
Altre (diabete mellito familiare, encefalomiopatie infantili)	Varie

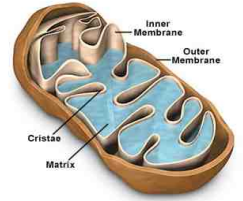
☞ Possono essere causate da mutazioni puntiformi, delezioni o riarrangiamenti di vaste proporzioni.

☞ Le prime sono di origine materna, mentre le seconde si verificano sporadicamente.





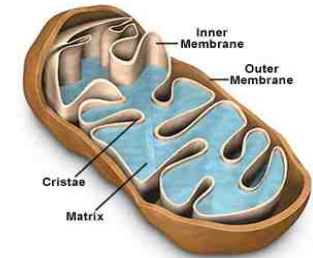
## Sindrome di Kearns-Sayre



- ⇒ consiste in oftalmoplegia esterna progressiva, retinopatia pigmentosa e altri fenotipi come atassia cerebellare e aumento di proteine a livello del liquido cerebro-spinale;
- ⇒ l'esordio avviene prima dei 20 anni con decorso progressivo, decesso di solito prima dei 50 anni;
- ⇒ e' causata da delezioni del DNA mitocondriale (in rari casi duplicazioni) causanti la rimozione di numerosi geni mitocondriali per proteine e tRNA, generalmente sporadiche ed eteroplasmiche

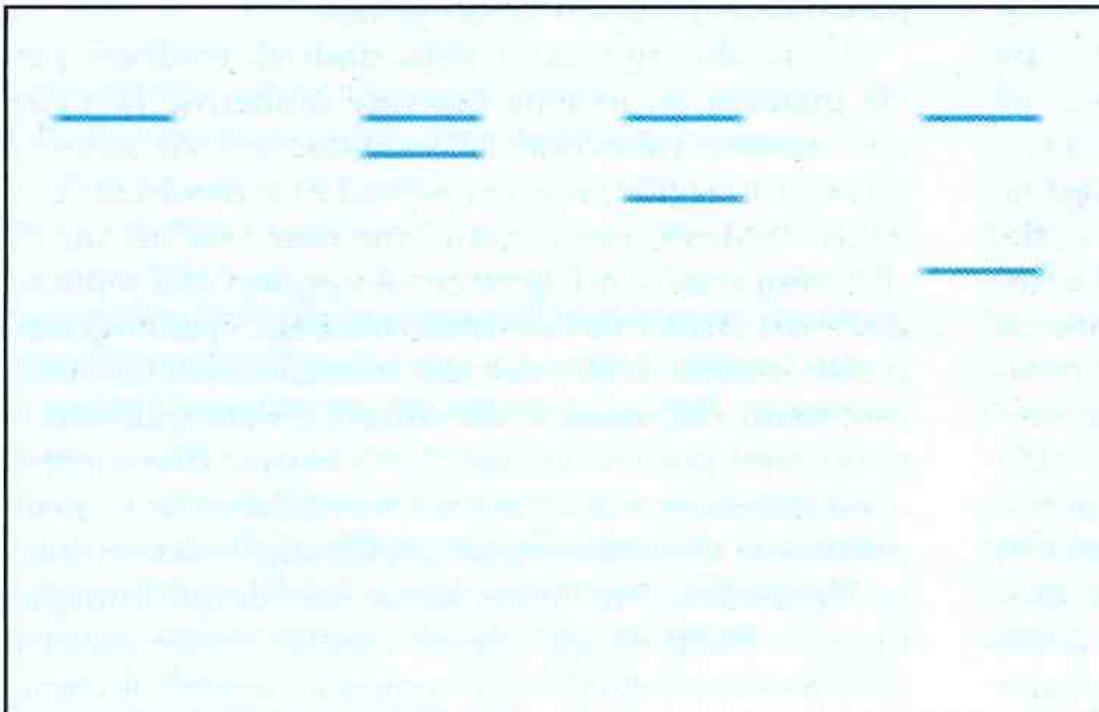
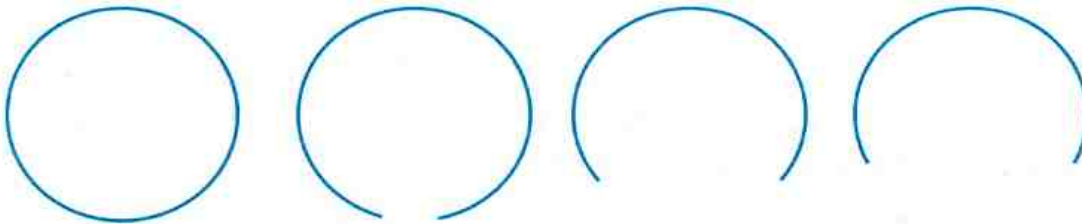


# Sindrome di Kearns-Sayre



controllo

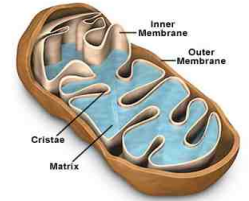
DNA mitocondriale deleto



**FIGURA 7.12** Delezioni nel DNA mitocondriale in biopsie muscolari da individui affetti da sindrome di Kearns-Sayre. Il DNA è stato digerito con *PvuII*, che taglia il DNA mitocondriale a livello di un unico sito, producendo un frammento di 16.5kb che viene evidenziato, mediante analisi *Southern*, con una sonda per il DNA mitocondriale. Ogni individuo affetto dalla sindrome presenta due popolazioni di DNA mitocondriale: una di dimensioni normali ed una di dimensioni inferiori, che corrisponde ad una delezione. (Modificata da Zeviani M, Moraes CT, Di Mauro S, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988;38:1339-1346.)



# MELAS LHON NARP



☹️ MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes)

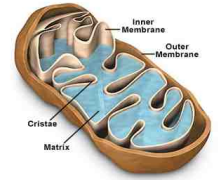
mutazione puntiforme in pos. 3243 o 3771 all'interno del gene del tRNA<sup>Leu</sup> (eteroplasmica e variabile nell'espressione)

☹️ LHON (Leber hereditary optic neuropathy)  
diverse mutazioni puntiformi

☹️ NARP (Neuropathy, Ataxia e Retinitis Pigmentosum)  
mutazione puntiforme in pos. 8993 nel gene dell'ATPasi



# Polimorfismi del DNA mitocondriale



☞ si calcola che la velocità di accumulo delle alterazioni a carico del DNA sia per i mitocondri dalle 5 alle 10 volte maggiore di quella del DNA nucleare

☞ l'assenza di ricombinazione rende più semplice seguire l'eredità dei polimorfismi mitocondriali

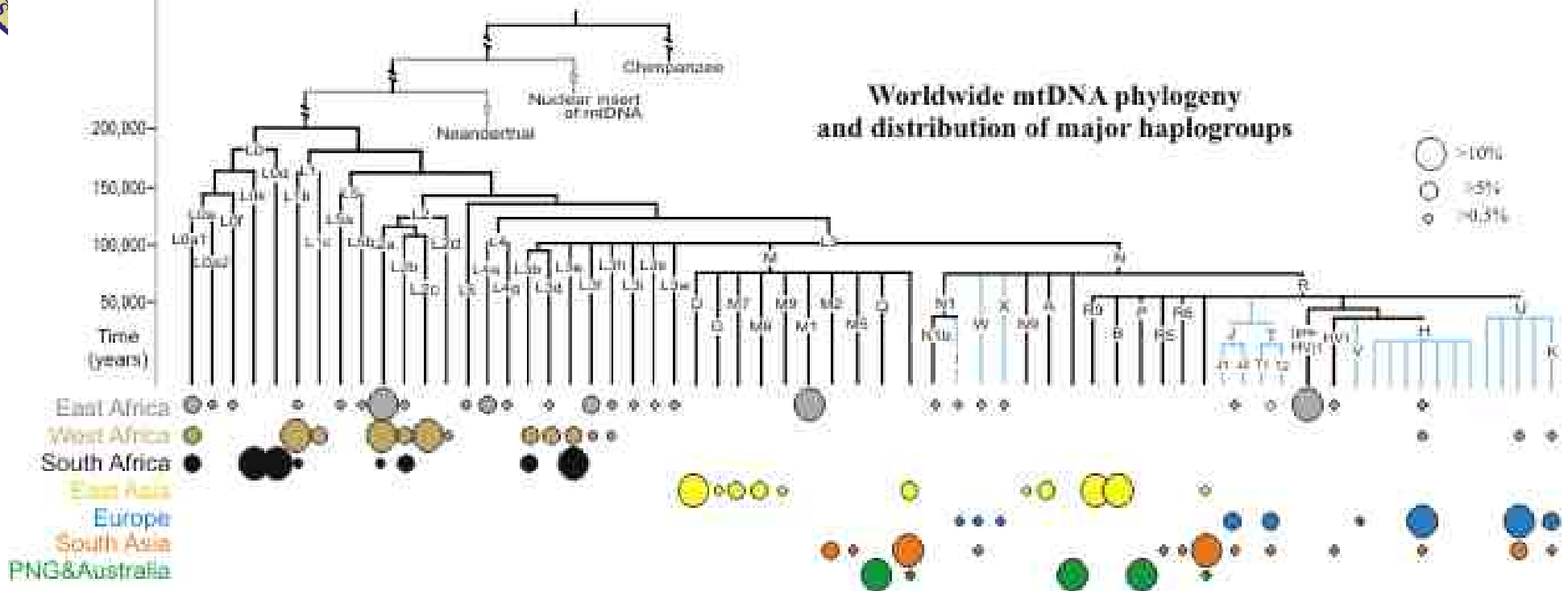
## Applicazioni

antropologia

l'origine della variazione del DNA mitocondriale umano risale a 150000 anni fa in Africa

medicina legale

i marcatori genetici sono usati per confrontare il genotipo dei sospetti con gli elementi trovati sul luogo del delitto

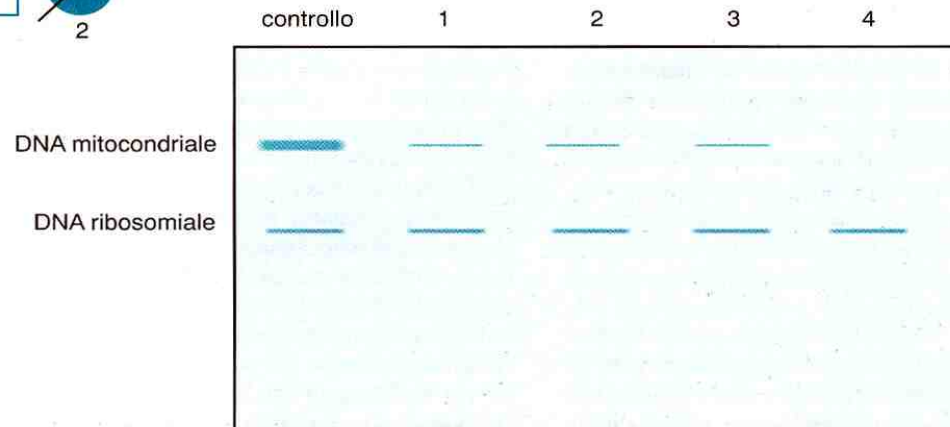
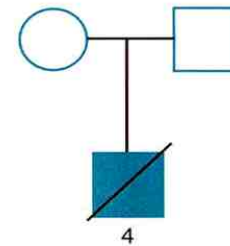
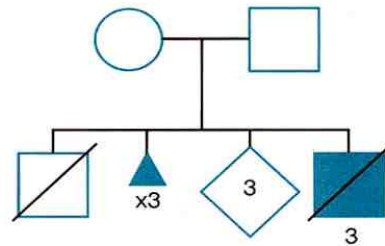
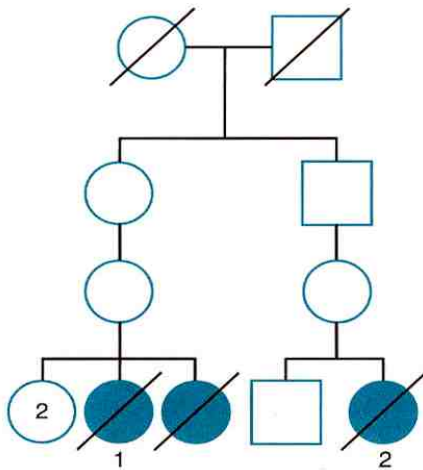


Uno standard comune per la nomenclatura degli aplogruppi mitocondriali è stato stabilito negli anni novanta, quando gli aplogruppi A, B, C e D furono caratterizzati per primi nei Nativi Americani (Torroni et al. 1993). Studi successivi iniziarono a delineare la struttura degli aplogruppi anche nelle popolazioni degli altri continenti e nel contempo venne determinato, a livello filogenetico, l'ordine gerarchico dei vari aplogruppi e sottoaplogruppi (Richards et al. 1998, 2000). Tutti questi studi furono condotti mediante analisi di restrizione ad alta risoluzione (utilizzando 14 enzimi) e/o sequenziando la regione di controllo dell' mtDNA. A partire dal 2000, con il miglioramento tecnologico delle metodiche di sequenziamento del DNA, un numero sempre crescente di studi ha cominciato a produrre sequenze mitocondriali complete. Questi lavori basati su sequenze complete hanno permesso di definire meglio la struttura complessiva della filogenesi mondiale dell' mtDNA umano e la distribuzione etnico-geografica degli aplogruppi più comuni.



# Mutazioni nucleari

In alcuni casi, delezioni mitocondriali differenti tra loro sono causate da una mutazione nucleare che conduce ad un'instabile replicazione del DNA mitocondriale

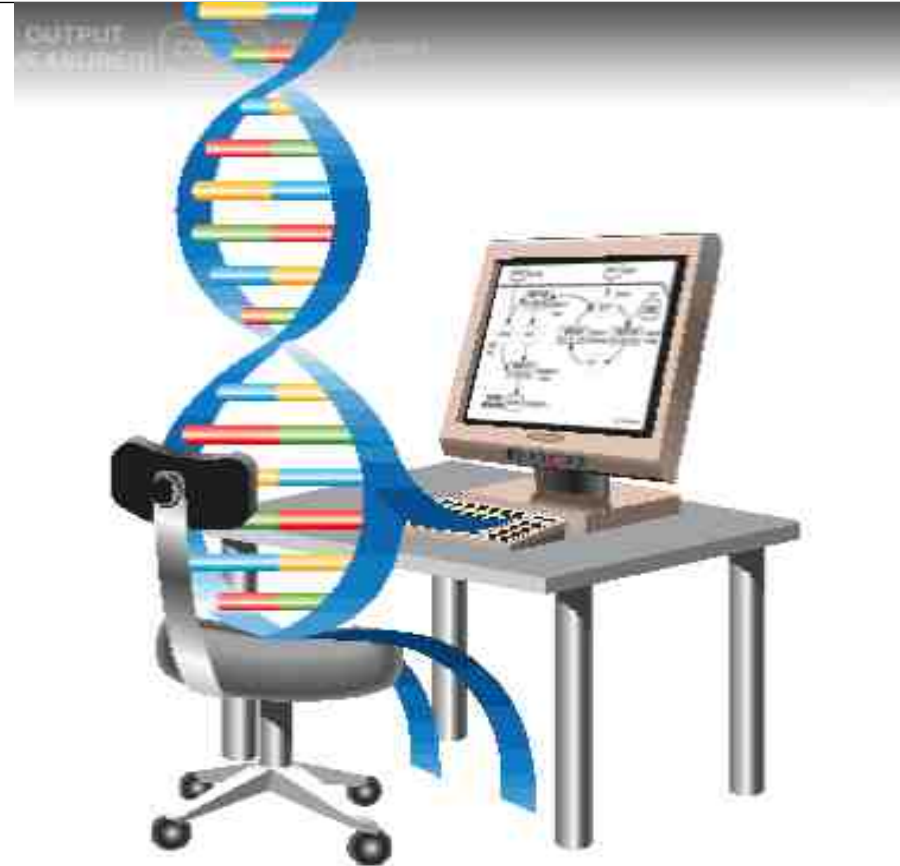


Riduzione della  
quantita' di  
DNA  
mitocondriale!!



# Diagnostica

la diagnostica di queste mutazioni si avvale sempre delle stesse tecniche utilizzate per il DNA nucleare, complicata dal fatto che bisogna esaminare piu' tessuti perche' alcuni, a causa dell'eteroplasmia, potrebbero non avere mitocondri mutati, averne pochissimi (ricordate che dimostrare che una cosa non c'e' e' piu' difficile che dimostrarne la presenza).  
Va da se' che per le mutazioni mitocondriali non e' possibile eseguire diagnosi prenatale



**NON sono dispense, ma un ausilio allo studio sul libro**