

Corso online

# Malattie mitocondriali: 20 anni di storia

22-24 settembre 2021

Organizzato da



Fondazione  
Pierfranco e Luisa Mariani  
neurologia infantile

In collaborazione con



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

Sistema Socio Sanitario



Regione  
Lombardia

col patrocinio di



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI MILANO



SINPIA  
Società Italiana di Neuropsichiatria  
dell'Infanzia e dell'Adolescenza



Mitocon

Insieme per lo studio e la cura  
delle malattie mitocondriali ODV



SIMMESN



associazione  
LUIGI COMINI  
Onlus



Associazione Italiana  
Sistema Nervoso Periferico



WORLD  
MITOCHONDRIAL  
DISEASE WEEK



ASSOCIAZIONE ITALIANA  
MIOLOGIA  
ITALIAN ASSOCIATION OF MYOLOGY

WWW.FONDAZIONE-MARIANI.ORG

Tel. 02 795458



**DIRETTRICE DEL CORSO**  
**COURSE DIRECTOR**

Barbara Garavaglia  
Centro Fondazione Mariani per lo studio delle Malattie  
mitocondriali pediatriche  
UOC Genetica Medica e Neurogenetica  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

**COMITATO SCIENTIFICO**  
**SCIENTIFIC COMMITTEE**

Eleonora Lamantea, Costanza Lamperti, Valeria Tiranti  
Centro Fondazione Mariani per lo studio delle Malattie  
mitocondriali pediatriche  
UOC Genetica Medica e Neurogenetica  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

Anna Ardissonne  
UOC Neuropsichiatria Infantile  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

Daniele Ghezzi  
Centro Fondazione Mariani per lo studio delle Malattie  
mitocondriali pediatriche  
UOC Genetica Medica e Neurogenetica  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano  
Università degli Studi di Milano

**SEGRETERIA SCIENTIFICA**  
**SCIENTIFIC SECRETARIAT**

Maria Pia Iermito  
UOC Genetica Medica e Neurogenetica  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

**STAFF FONDAZIONE MARIANI**

Coordinamento e organizzazione  
Coordination and organization  
Lucia Confalonieri  
Anna Illari  
Marina Denegri

Informazioni e iscrizioni  
Information and enrolment  
Cristina Giovanola  
Marina Antonioli

Comunicazione e promozione  
Promotion  
Renata Brizzi  
Samuele Spinelli

Pubblicazioni  
Publications  
Valeria Basilico

Le Malattie Mitocondriali sono un gruppo di Malattie Metaboliche Rare geneticamente determinate che colpiscono sia gli adulti che i bambini con fenotipi clinici di gravità variabile, da forme infantili molto gravi a forme a insorgenza in età avanzata con caratteristiche cliniche più sfumate. Pur essendo malattie rare, se non rarissime prese singolarmente, nel loro complesso colpiscono circa 1 soggetto su 5000 nati. In queste malattie multisistemiche, sebbene il sistema nervoso centrale sia quello più spesso e severamente colpito, di frequente sono interessati più organi e apparati determinando la coesistenza di cardiopatie, neuropatie, disturbi del nervo ottico, endocrinopatie. Questo comporta una gestione assai complessa dei pazienti che coinvolge diverse figure professionali quali neurologi, pediatri, neuropsichiatri infantili, genetisti, cardiologi, internisti, neuroftalmologi che si devono integrare tra loro e che vedono nel medico di Medicina Generale un fondamentale alleato.

La Fondazione Mariani sin dal 2001 finanzia presso l'Istituto Neurologico Besta il "Centro Fondazione Mariani per la diagnosi e cura delle Malattie Mitocondriali pediatriche". A 20 anni dalla costituzione del Centro viene organizzato un corso di aggiornamento in cui saranno illustrati sia gli aspetti più prettamente clinici, diagnostici e terapeutici e di gestione di pazienti affetti da queste complesse patologie, che le ultime conoscenze nell'ambito dei meccanismi patogenetici e delle terapie avanzate (es. terapia genica). I relatori del corso saranno i maggiori esperti internazionali sul tema.

*Mitochondrial Diseases are a group of Rare Metabolic Diseases genetically caused, that affect both adults and children with clinical phenotypes of varying severity, from a very severe childhood forms to advanced age-onset forms with more indefinite clinical features. Although these diseases are rare, even extremely rare, altogether they affect about 1 in 5,000 births. Concerning these multisystem diseases, the central nervous system is the most often and strongly affected. However, more organs and systems are frequently involved, determining the coexistence of heart disease, neuropathy, optic nerve disorders, endocrinopathies. This means a very complex management of these patients and involves various professional figures such as neurologists, paediatricians, child neuropsychiatrists, geneticists, cardiologists, internists, neurophthalmologists who should cooperate with each other and also rely on the General Practitioner as a fundamental supporter.*

*Since 2001, the Mariani Foundation has financed the "Mariani Foundation Centre for the diagnosis and treatment of paediatric Mitochondrial Diseases" at the Besta Neurological Institute. Twenty years after the constitution of the Centre, will be organized an Update Course concerning both clinical, diagnostic and therapeutic issues, the management of patients affected by these complex pathologies, and the latest knowledge related to the field of pathogenetic mechanisms and innovative therapies (e.g., gene therapy). The speakers of this course will be the major international experts on this topic.*

# RELATORI E MODERATORI

## **Arbustini Eloisa**

Laboratorio Genetica - Trapiantologia e Malattie cardiovascolari  
Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

## **Ardissone Anna**

UOC Neuropsichiatria Infantile  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

## **Bertini Enrico**

Malattie Muscolari e Neurodegenerative  
Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

## **Bianchi Marzoli Stefania**

UO Oftalmologia  
Istituto Auxologico Italiano, Milano

## **Carelli Valerio**

Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie  
Università di Bologna

## **D’Antiga Lorenzo**

UOC Pediatria  
ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

## **Diodato Daria**

Malattie Muscolari e Neurodegenerative  
Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

## **Donati Maria Alice**

UOC Malattie Metaboliche e Muscolari Ereditarie  
Azienda Ospedaliero Universitaria A. Meyer, Firenze

## **Garavaglia Barbara**

Centro Fondazione Mariani per lo studio delle Malattie mitocondriali pediatriche  
UOC Genetica Medica e Neurogenetica  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

## **Ghezzi Daniele**

Centro Fondazione Mariani per lo studio delle Malattie mitocondriali pediatriche  
UOC Genetica Medica e Neurogenetica  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano  
Università degli Studi di Milano

## **Granata Tiziana**

SSD Neurologia - Diagnosi e Terapia di Epilessie Rare e Complesse, Milano  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

## **Horvath Rita**

Department of Clinical Neurosciences  
School of Clinical Medicine  
University of Cambridge, UK

## **Indrieri Alessia**

Telethon Institute of Genetics and Medicine and Institute for Genetic and Biomedical Research, CNR, Napoli

## **Lamantea Eleonora**

Centro Fondazione Mariani per lo studio delle Malattie mitocondriali pediatriche  
UOC Genetica Medica e Neurogenetica  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

## **Lamperti Costanza**

Centro Fondazione Mariani per lo studio delle Malattie mitocondriali pediatriche  
UOC Genetica Medica e Neurogenetica  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

## **Mancuso Michelangelo**

Dipartimento di Neurologia  
Università di Pisa

## **Mandelli Anna**

Ospedale dei Bambini “Vittore Buzzi”  
ASST Fatebenefratelli Sacco, Milano

## **Maresca Alessandra**

IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna  
Programma di Neurogenetica, Bologna

## **Moroni Isabella**

UOC Neuropsichiatria Infantile  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

## **Musumeci Olimpia**

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Università di Messina

## **Prigione Alessandro**

Department of General Pediatrics  
University Children’s Hospital  
Heinrich-Heine-University, Düsseldorf (Germany)

## **Prokisch Holger**

Institute of Human Genetics  
Technical University, Munich (Germany)

## **Renner Magdalena**

Human Organoid Platform  
Institute of Molecular and Clinical Ophthalmology, Basilea (Switzerland)

## **Rötig Agnès**

Genetics of Mitochondrial Diseases  
Imagine Institute, Inserm, Paris (France)

## **Sharma Rohit**

Department of Molecular Biology  
Massachusetts General Hospital, Boston (USA)

## **Suomalainen Anu**

University of Helsinki, Faculty of Medicine  
Stem Cells and Metabolism Research Program, Helsinki (Finland)

## **Szabo Ildiko**

Dipartimento di Biologia  
Università degli Studi di Padova

## **Taroni Franco**

UOC Genetica Medica e Neurogenetica  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

## **Tiranti Valeria**

Centro Fondazione Mariani per lo studio delle Malattie mitocondriali pediatriche  
UOC Genetica Medica e Neurogenetica  
Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

## **Viscomi Carlo**

Dipartimento di Scienze Biomediche  
Università degli Studi di Padova

## **Zeviani Massimo**

Dipartimento di Neuroscienze  
Università degli Studi di Padova

## **Zuccarello Daniela**

UOC Genetica Clinica ed Epidemiologica  
Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino  
Azienda Ospedaliera di Padova

MERCOLEDÌ

Corso di aggiornamento online

22

SETTEMBRE

2021

Malattie Mitocondriali: 20 anni di storia  
Mitochondrial Diseases: 20 years of history

## PROGRAMMA

ore 14

### **Benvenuto/Welcome**

**Breve presentazione del Centro**  
**Short presentation of the Center**

Barbara Garavaglia, Milano

### **I SESSIONE/SESSION** **LE MALATTIE MITOCONDRIALI** **MITOCHONDRIAL DISEASES**

#### **Moderatore/Chairman**

Franco Taroni, Milano

ore 14.30

**Cosa sono le Malattie Mitocondriali**  
**What Mitochondrial Diseases are**

Massimo Zeviani, Padova

ore 15.10

**Le forme pediatriche**  
**The paediatric forms**

Anna Ardissoni, Milano

ore 15.40

**Le forme adulte**  
**The adult forms**

Costanza Lamperti, Milano

ore 16.10

**Coffee break**

### **II SESSIONE/SESSION**

**LE MALATTIE MITOCONDRIALI: UN LAVORO DI**  
**SQUADRA**

**MITOCHONDRIAL DISEASES: A TEAM EFFORT**

#### **Moderatore/Chairman**

Isabella Moroni, Milano

ore 16.30

**L'epilessia nelle Malattie Mitocondriali: pattern speci-**  
**fici e limiti terapeutici**

**Epilepsy in Mitochondrial Diseases: specific patterns**  
**and therapeutic limits**

Tiziana Granata, Milano

ore 16.50

**Cardiopatie**  
**Heart disease**

Eloisa Arbustini, Pavia

ore 17.10

**Manifestazioni extraneurologiche in età pediatrica:**  
**malattie multisistemiche e forme organo specifiche**

**Extraneurological manifestations in paediatric age:**  
**multisystem diseases and specific organ forms**

Maria Alice Donati, Firenze

ore 17.30

**Atrofie ottiche**  
**Optic atrophies**

Stefania Bianchi Marzoli, Milano

ore 17.50

**Chiusura della giornata**  
**End of the day**

**III SESSIONE/SESSION  
LE MALATTIE MITOCONDRIALI:  
LA DIAGNOSI DI LABORATORIO  
MITOCHONDRIAL DISEASES: LABORATORY DIAGNOSIS****Moderatore/Chairman**  
Valerio Carelli, Bolognaore 9  
**La diagnosi biochimica**  
**Biochemical diagnosis**  
Barbara Garavaglia, Milanoore 9.30  
**La diagnosi genetica**  
**Genetic diagnosis**  
Eleonora Lamantea, Milanoore 10  
**Diagnosi genetica preimpianto e prenatale**  
**Preimplantation and prenatal genetic diagnosis**  
Daniela Zuccarello, Padovaore 10.30  
**Coffee break****Nuove frontiere diagnostiche**  
**New diagnostic frontiers**ore 11  
**La Next Generation**  
**The Next Generation**  
Daniele Ghezzi, Milanoore 11.30  
**Biomarcatori per le Malattie Mitocondriali**  
**Biomarkers for Mitochondrial Diseases**  
Alessandra Maresca, Bolognaore 12  
**Il progetto GENOMIT**  
**The GENOMIT project**  
Holger Prokisch, Monaco di Bavieraore 12.30  
**Lunch****IV SESSIONE/SESSION  
MECCANISMI PATOGENETICI DI MALATTIA  
PATHOGENETIC MECHANISMS OF DISEASE****Moderatore/Chairman**  
Massimo Zeviani, Padovaore 14  
**Alterata regolazione dell'omeostasi del ferro citosolico nell'ataxia di Friedreich**  
**Impaired regulation of cytosolic iron homeostasis in Friedreich ataxia**  
Agnès Rötig, Parigiore 14.30  
**Individuare il metabolismo cellulare per trattare le Malattie Mitocondriali tessuto-specifiche**  
**Targeting the cellular metabolism to treat tissue-specific Mitochondrial Diseases**  
Rita Horvath, Cambridgeore 15  
**Lo zebrafish come organismo modello per lo screening di farmaci contro le Malattie Mitocondriali**  
**Exploiting zebrafish as a model organism for drug screening against Mitochondrial Diseases**  
Ildiko Szabo, Padovaore 15.30  
**Modelli murini**  
**Mouse models**  
Carlo Viscomi, Padovaore 16  
**Modelli cellulari/organoidi**  
**Cell/organoid models**  
Magdalena Renner, Basileaore 16.30  
**Coffee break****Biomarkers/Biomarkers**ore 17  
**Nuovi biomarcatori per la miopatia mitocondriale**  
**New biomarkers for mitochondrial myopathy**  
Anu Suomalainen, Helsinkiore 17.30  
**Marcatori circolanti di stress ossidativo nelle Malattie Mitocondriali**  
**Circulating markers of reductive stress in mitochondrial disease**  
Rohit Sharma, Bostonore 18  
**Chiusura della giornata**  
**End of the day**

**V SESSIONE/SESSION**  
**OPZIONI TERAPEUTICHE/THERAPEUTIC OPTIONS**

**Moderatore/Chairman**

Michelangelo Mancuso, Pisa

ore 9

**Terapia convenzionale****Conventional therapy**

Daria Diodato, Roma

ore 9.20

**Terapie di supporto e palliative per la gestione domiciliare del paziente****Supportive and palliative therapies for home management**

Anna Mandelli, Milano

ore 9.40

**Terapia trapiantologica, prospettive e limiti: l'esperienza del trapianto di fegato****Transplant therapy, perspectives and limits: the experience of liver transplantation**

Lorenzo D'Antiga, Bergamo

ore 10

**Trials clinici in corso****Clinical trials in progress**

Olimpia Musumeci, Messina

ore 10.20

**Terapia genica: una sfida possibile per le Malattie Mitocondriali?****Gene Therapy: a possible challenge for mitochondrial diseases?**

Enrico Bertini, Roma

ore 10.50

**Coffee break****Terapie sperimentali/Experimental therapies**

ore 11.10

**Scoprire terapie per la malattia di Leigh tramite neuroni e organoidi cerebrali di pazienti****Discovering treatments for Leigh syndrome using patient-specific neurons and brain organoids**

Alessandro Prigione, Düsseldorf

ore 11.40

**Modulazione di microRNA come strategia terapeutica gene-indipendente per le Malattie Mitocondriali****Modulation of microRNAs as gene-independent therapeutic strategy for Mitochondrial Diseases**

Alessia Indrieri, Napoli

ore 12.10

**Utilizzo di cellule umane iPSCs per lo studio della neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON)****Exploiting hiPSCs in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)**

Valeria Tiranti, Milano

ore 12.40

**Conclusioni****Conclusions**

ore 13.20

**Chiusura del corso****End of the course****Test di apprendimento on line da completare entro 3 giorni dalla fine del corso****Online learning tests to be completed within 3 days from the end of the course**

## INFORMAZIONI PER I PARTECIPANTI

**Il corso si svolgerà interamente online (FAD sincrona):**

partecipazione a sessioni formative remote attraverso una piattaforma multimediale dedicata (webinar), fruibile in diretta tramite connessione a internet. La sincronicità della partecipazione prevede il collegamento dei discenti agli orari prestabiliti dal programma formativo e garantisce un buon livello di interazione tra i docenti/moderatori e i discenti i quali possono richiedere di intervenire tramite domande scritte (chat dedicata).

La presenza dei discenti viene rilevata attraverso la registrazione degli accessi alla piattaforma durante le sessioni di formazione.

Il corso verrà registrato e reso disponibile in modalità asincrona nei 3 giorni successivi la fine del corso.

**Iscrizione e attestato di partecipazione**

Ricordiamo che l'iscrizione comprende:

- la partecipazione alle sessioni del Corso
- il materiale didattico
- l'attestato di partecipazione e la ricevuta di pagamento che saranno reperibili in formato elettronico all'interno del proprio account sul sito [www.fondazione-mariani.org](http://www.fondazione-mariani.org)

**Obiettivo formativo:**

Contenuti tecnico-professionali (conoscenze e competenze) specifici di ciascuna professione, di ciascuna specializzazione e di ciascuna attività ultraspecialistica.

**ECM - EDUCAZIONE CONTINUA IN MEDICINA**

Il Corso è stato accreditato per: Biologo, Fisioterapista, Infermiere, Infermiere pediatrico, Logopedista, Medico chirurgo, Psicologo, Tecnico audiometrista, Tecnico di neurofisiopatologia, Tecnico sanitario di radiologia medica, Tecnico sanitario laboratorio biomedico, Terapista della neuro e psicomotricità dell'età evolutiva e Terapista occupazionale e dà diritto a 21 crediti.

Si ricorda che per poter ricevere i crediti è obbligatorio che sia certificata la presenza di partecipazione al 90% delle sessioni e venga compilato il test di apprendimento ECM che sarà somministrato online e dovrà essere completato entro 3 giorni dalla fine del corso. Ogni partecipante avrà a disposizione 5 tentativi con doppia randomizzazione (dopo ogni tentativo l'ordine di presentazione delle domande verrà modificato automaticamente). Ai fini dell'ottenimento dei crediti l'esito dovrà essere superiore al 75%.

**Modifiche al programma**

La Fondazione Mariani si riserva il diritto di modificare il programma per esigenze scientifiche o organizzative.

# ABSTRACT

Massimo Zeviani, Padova

**What Mitochondrial Diseases are**

Massimo Zeviani, Padova

Massimo Zeviani, Padova

Mitochondrial disorders are amongst the most frequent inborn errors of metabolism, their primary cause being the dysfunction of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS). OXPHOS is composed of the electron transport chain (ETC), formed by four multimeric enzymes (Complex I-IV) and two mobile electron carriers (Coenzyme Q and cytochrome c), plus an ATP synthase (also called complex V).

After stripping electrons from nutrients through metabolic processes including glycolysis, the TCA cycle and fatty acid beta oxidation, electrons are conveyed to the ETC by redox compounds such as NAD+ and FAD.

The ETC determines electrons to flow through the respiratory chain complexes, thus performing the redox reactions involved in cellular respiration, ultimately exploiting electrons to reduce molecular oxygen into water. During the ETC-regulated electron flow, a proton motive force is generated by translocating protons from inside to the outside interfaces of the inner mitochondrial membrane, and eventually used by complex V to synthesize ATP through the controlled dissipation of the gradient. OXPHOS biogenesis involves multiple steps, starting from the expression of genes encoded in physically separated genomes, namely the mitochondrial and nuclear DNAs, to the coordinated assembly of components and cofactors building each individual complex and eventually supercomplexes. Despite the substantial progress in genetic diagnosis of mitochondrial disorders, the gene mutations underlying around half of the diagnosed mitochondrial disease cases are currently unknown. Many of the genetically defined cases result from pathogenic variants in mitochondrial DNA encoded genes, or in nuclear genes encoding structural subunits or additional factors directly involved in the assembly of the ETC complexes. Here I shall review the historical and most recent findings concerning the clinical phenotypes and the molecular pathological mechanisms underlying this particular group of disorders.

Keywords:

Mitochondrial respiratory chain; respiratory complex; respiratory supercomplex; oxidative phosphorylation; mitochondrial disease; biogenesis of the respiratory chain; ATP production; mitochondrial potential; mitochondrial electrochemical gradient; mitochondrial proton pumping.

Massimo Zeviani, Padova

**Le forme pediatriche**

Anna Ardissona, Milano

Massimo Zeviani, Padova

Le Malattie Mitochondriali rappresentano nel loro insieme le encefalopatie metaboliche più frequenti in età pediatrica. L’epoca di esordio è variabile, più frequente nei primi anni, l’evoluzione è progressiva.

Sono noti diverse sindromi e fenotipi, i più frequenti sono la sindrome di Leigh e le Leucoencefalopatie; l’interessamento d’organo - isolato o associato al coinvolgimento cerebrale - è meno frequente di quanto si osserva nelle forme adulte e di quanto atteso nel contesto di malattie multisistemiche.

Le mutazioni a carico dei geni nucleari sono più frequenti di quelle a carico del DNA mitocondriale.

La terapia è sintomatica e cofattoriale; sono in corso diversi trial mirati a valutare un approccio più mirato ai meccanismi patogenetici nelle diverse forme fenotipiche e genetiche.

**Le forme adulte**

Costanza Lamperti, Milano

Massimo Zeviani, Padova

I disturbi mitocondriali sono un gruppo geneticamente diversificato di malattie umane singolarmente rare, ma gravi per le quali non sono disponibili trattamenti causali. Le Malattie Mitochondriali sono gli errori congeniti più frequenti del metabolismo, interessando complessivamente 1 individuo su 5.000. Rappresentano un gruppo vasto e altamente eterogeneo di oltre 300 malattie rare causate da alterazioni genetiche con qualsiasi modalità di ereditarietà. Si presentano con forme dell’adulto e del bambino che possono differire tra loro in modo significativo per modalità di insorgenza, per strategie terapeutiche e per prognosi. Di per sé esternamente variabili possono coinvolgere diversi organi e sistemi. A seconda della presenza di un solo organo o di più organi contemporaneamente possono determinare specifiche sindromi quali la sindrome di MELAS (Myopathy Epilepsy Lactic Acidosis and Stroke like episode), MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers), MNGIE (Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy), NARP(Neuroathy Ataxia Retinitis Pigmentosa), KSS (Kearn Sayre Syndorme) o colpire esclusivamente o prevalentemente un organo come si vede nella neuropatia ottica di Leber dove è colpito esclusivamente il nervo ottico o nella PEO in cui la muscolatura oculare è sempre compromessa e si può associare a una miopiapatia più generalizzata.

Gli approfondimenti diagnostici prevedono sia il prelievo di muscolo per indagare aspetti morfologici e per eseguire specifici test biochimici e genetici che il prelievo di sangue per l’estrazione e lo studio del DNA. Benché attualmente non siano disponibili terapie curative per le Malattie Mitochondriali, vi sono terapie di supporto e la possibilità di eseguire un follow-up multidisciplinare che permette di prevenire e gestire dove è possibile gli eventi acuti della malattia.

Massimo Zeviani, Padova

Massimo Zeviani, Padova

Massimo Zeviani, Padova

**Cardiopatie**

Eloisa Arbustini, Alessandro Di Toro, Pavia

Massimo Zeviani, Padova

Introduzione. Le Malattie Mitochondriali derivano da difetti della fosforilazione ossidativa mitocondriale (OXPHOS), una funzione cellulare ubiquitaria sostenuta da 5 complessi enzimatici multisubunità (I-V). I cinque complessi OXPHOS sono costituiti da componenti diversi, ciascuno dei quali contribuisce alla funzione complessiva di 1 o più dei 5 complessi. Le somiglianze fenotipiche (p. es. sindrome di Leigh o sindromi da deplezione mitocondriale) sono spiegate dai difetti di 1 (o >1) complessi OXPHOS quando i difetti influenzano le funzioni ubiquitarie, mentre le differenze sono verosimilmente legate alla quantità del sistema/ complesso difettoso in organi con diverse richieste energetiche. La prevalenza complessiva stimata è di 1:4.000. Queste malattie comunemente coinvolgono sia il cuore (cardiopatie mitocondriali) che il muscolo scheletrico (miopatie mitocondriali), ma causano anche perdita dell’udito, disturbi oculari, ictus criptogenetico, malattie gastrointestinali, insufficienza renale e diabete. A seconda della causa genetica - difetti nel DNA mitocondriale (mtDNA) o nei geni nucleari - l’ereditarietà è rispettivamente matrilineare o mendeliana. Quindi, la classificazione molecolare più semplice raggruppa le malattie causate da mutazioni nel mtDNA (mutazioni puntiformi ereditate dalla madre e delezioni sporadiche su larga scala) e malattie da mutazioni nel DNA nucleare (ereditarietà mendeliana, spesso recessiva).

Difetti del DNA mitocondriale. Il fenotipo cardiaco più comune è l’ipertrofia ventricolare sinistra concentrica, non ostruttiva, che spesso evolve verso dilatazione e disfunzione ventricolare sinistra. Possono essere presenti marker ECG come intervallo PR breve e pre-eccitazione. Due esempi di pertinenza cardiologica sono la cardiomiopiapatia in MELAS e la cardiomiopiapatia da A4300GtRNA<sup>LE</sup>. Nella MELAS (miopiapatia mitocondriale, encefalopatia, acidosi lattica e ictus) da (m.3243A> G) in tRNA<sup>LEU(UUR)</sup> (MTTL1), la cardiomiopiapatia può essere molto severa e presentarsi con un fenotipo cardiaco candidabile al trapianto. Quando la cardiomiopiapatia è la manifestazione clinica principale o più precoce, la prima afferenza può essere quella cardiologica. Se il contesto clinico globale del paziente non viene valutato nel suo insieme, il rischio di diagnosi errate è elevato. Le malattie correlate a difetti di MtDNA sono

Massimo Zeviani, Padova

Massimo Zeviani, Padova

Massimo Zeviani, Padova

potenzialmente letali per episodi ricorrenti di ictus criptogenico, scompenso cardiaco e insufficienza renale. Dal 1998 ad oggi, presso l’IRCCS San Matteo sono stati diagnosticati 13 probandi con MELAS3243A> G: per cardiomiopiapatia ipertrofica (HCM) simmetrica non ostruttiva a evoluzione ipocinetica (n=10) e cardiomiopiapatia dilatativa (DCM) (=3). In nessun caso era stato posto il sospetto di MELAS: le ipotesi cliniche erano HCM in 6, DCM in 3, amiloidosi in 1, malattia di Fabry in 3. Di questi, 5 sono deceduti per scompenso cardiaco terminale, 2 per episodi ricorrenti e ravvicinati di stroke, 2 per multi-organ failure. Di questi 9, 5 sono deceduti entro 5 anni dalla diagnosi di MELAS. In tutti i casi coesistevano diabete, sordità, miopiapatia severa e problemi oculari. Nessuno è stato trapiantato: la condizione sindromica di questi pazienti ha impedito il loro inserimento in lista trapianto. Il fenotipo cardiaco dei pazienti portatori della mutazione A4300GtRNA<sup>LE</sup> (N = 7 probandi non correlati nell’esperienza del San Matteo) è tipicamente ipertrofico, apparentemente isolato, meno suggestivo per una forma sindromica. In 5/7 casi/famiglie abbiamo identificato mutazioni in geni nucleari associati a cardiomiopatie [MYH7 (n=2), MYBPC3 (n=1), LAMA2 (n=1), NKX2-5 (n=1)]; 1 paziente era affetto anche da fenilchetonuria. L’evoluzione di queste cardiomiopatie è principalmente verso lo scompenso cardiaco. Il rischio aritmico può essere elevato ed è, di solito, maggiormente attribuibile a seconde mutazioni in geni correlati a cardiomiopiapatia che a quelle nell’MtDNA. Lo spettro del coinvolgimento cardiaco nelle mitocondriopatie tuttavia è eterogeneo, sia per presentazione clinica, che per evoluzione.

Difetti del DNA nucleare. Con oltre 1.500 proteine mitocondriali codificate da geni nucleari, il numero di malattie di nuova caratterizzazione è in continuo aumento. I neurologi svolgono un ruolo di primo piano in questi progressi scientifici e clinici, che introducono nuovi scenari clinici tra cui quelli cardiaci all’interno dei quali le cardiomiopatie e le aritmie rappresentano potenziali determinanti della prognosi. La classificazione delle miopatie nucleari mitocondriali è attualmente basata sia sul fenotipo che sulla causa. L’HCM è il fenotipo cardiaco più comune, seguito da DCM, RCM e cardiomiopiapatia aritmogena. Le trabecole del ventricolo sinistro possono essere prominenti. Il coinvolgimento del muscolo non striato può manifestarsi clinicamente con disfagia e sintomi gastrointestinali. L’ereditarietà è principalmente AR, con esordio clinico dall’età pediatrica a quella giovanile. I test genetici forniscono diagnosi precise specie quando guidati da un’ipotesi clinica. Entità nuove, come la “cardiomiopiapatia e acidosi lattica”, sono malattie di pertinenza cardiologica: l’--acidosi lattica è riportata nel 100% e l’HCM nell’80% dei pazienti con deficit di mtRNA1 (MTO1), una proteina evolutivamente conservata ed espressa nei tessuti ad alta richiesta di energia. La sua carenza è potenzialmente letale, specialmente nelle forme multi-sistemiche ad esordio precoce. I test genetici forniscono la base per la correlazione genotipo-fenotipo, che può spiegare le diverse severità della malattia.

In sintesi, l’ambito fenotipico cardiologico delle Malattie Mitochondriali si configura prevalentemente in contesti di cardiomiopatie sindromiche; è un ambito clinico in rapida espansione la cui traslazione richiederà condivisione multidisciplinare anche extra-cardioneurologica.

Massimo Zeviani, Padova

Massimo Zeviani, Padova

## Extraneurological manifestations in paediatric age: multisystem diseases and specific organ forms

Maria Alice Donati, Firenze

Primary mitochondrial disorders (MD) comprise a group of rare genetic diseases characterized by impaired energy production due to mutations in nuclear or mitochondrial genes involved in oxidative phosphorylation. MD show clinical complexity in childhood and it is important to remember that most children affected do not have a classical syndromic presentation, particularly at earliest stage of their disease when a single organ may be involved. The brain and other organs with high-energy requirements such as heart and skeletal muscle are more severely affected. Cardiovascular involvement (CVI) has been reported to be frequent; a fraction (40%, Scaglia 2004) of the paediatric patients with mitochondrial disease shows cardiomyopathy (CM) with an 18% survival rate at 16 years versus 95% survival at the same age in patients without CM. In our cohort of 86 paediatric patients CVI was observed in 36% (Brambilla 2020), mainly in the form of hypertrophic (HCM), noncompaction (LVNC) or dilated cardiomyopathies (DCM) and pulmonary hypertension. In our cohort CVI has been reported as the presenting manifestation in more than 40% of patients and within the first months of life, in some instances prenatally. Barth syndrome and TMEM70 are systematically associated with early onset CM; 3 methylglutaconic aciduria can be present in both. Barth syndrome, a X-linked disorder, is characterized by CM, neutropenia, myopathy and growth abnormalities. The common type is CMD, other forms include LVNC, HCM, and restrictive CM. Symptomatic CM in infant is the most common presentation and a myocarditis-like picture, including neutropenia, can delay the genetic diagnosis; other cardiac presentation include, ventricular arrhythmia, prolonged QT interval on EKG, or sudden cardiac arrest. Children and adolescents can improve and stabilize the cardiac function. Other causes of mitochondrial CM presenting in infancy are increasingly recognized, either as an isolated finding or as part of a complex multisystem disorder (e.g., PPA2, ADAR, ATAD3A, MTO1). Primary pulmonary hypertension has been reported as presenting manifestation in several MD (e.g., TMEM70, Seryl-tRNASynthetase, m.3243A>G).

The spectrum of ophthalmologic manifestations includes optic atrophy (e.g., LHON, OPA1 mutations; recently variants in SSBP1cauin d) ptosis, nystagmus, pigmentary retinopathy, ophthalmoplegia, cataract. In Sengers syndrome the affected infants present congenital cataract and HCM. Liver involvement is a frequent and early feature; presentation may be with acute or chronic liver failure and is typically progressive and fatal. The most frequent causes are the hepatocerebral mitochondrial depletion syndromes (MDDS) (DGUOK, MPV17, POLG, TWNK, SUCLG1); liver failure may occur before neurological symptoms. Severe neonatal liver dysfunction resolves in 50% of children with SERAC1 mutations. In defect of mitochondrial translational factor TRMU some cases, as in our experience, have been reported reversible. Expanded neonatal screening by MS/MS at 48-72 hours of life can be positive for high tyrosine and/ or metionine, as sign of liver involvement, in MDDS; in our experience 2 new-borns were affected by DGUOK and MPV17. Myopathy usually is part of a multisystem disorder in childhood but may be an isolated finding in some children with a sporadic mtDNA mutation, affecting complex III or IV. In TK2 defect isolated myopathy can be severe and progressive with respiratory insufficiency; early diagnosis is crucial to start therapy with nucleosides/ nucleotides. Recurrent rbdomyolysis is reported in TK2 and COX deficiency. Benign reversible mitochondrial myopathy has been linked to two homoplasmic mtDNA variants at the same nucleotide in the MT-TE gene. A distal myopathy is reported in some cases of POLG disease. MD can involve any endocrine organs; it occurs most frequently in the contest of multisystem disease but isolated endocrine involvement may be the presenting manifestation. Diabetes mellitus is the most frequent endocrine manifestation in m.3243A>G mutation but in childhood is more often seen in Pearson and KSS, together with growth hormone deficiency, hypothyroidism, hypoparathyroidism and adrenal insufficiency. Premature ovarian failure is associated with sensorineural hearing loss (SNHL) in Perrault syndrome linked to several genes (HARS2, LARS2, TWNK, CLPP, POLG, AARS2). Gastrointestinal symptoms are a frequent manifestation of MD and may be amongst the first clinical manifestations in early infancy with vomiting, feeding difficulties and diarrhoea. Intestinal dysmotility and episodes of pseudo-obstruction start several years before the diagnosis in MNGIE. Our patient received a misdiagnosis of celiachia in the first year of life; the correct diagnosis of MNGIE occurs in adult life, after several exams and surgery, following the finding of demyelinating neuropathy and leukoencephalopathy. MNGIE-Like phenotype has been reported in POLG and RRM2B mutations. Dysmotility has been reported, also in our experience, in the m.3243A>G. Diarrhea,

associated to acrocyanosis, petechiae and development delay in ETHE1 mutations. Exocrine pancreatic insufficiency is a major feature in Pearson syndrome and has been reported in other MD (e.g., COX412, TRNT1, PTRH2). In Paediatric MD the kidney frequently is affected: tubulopathy (e.g., Pearson syndrome/KSS, BCS1L, COX10, SURF1, RRM2B) or steroid-resistant nephrotic syndrome (disorders of Coenzyme Q10) associated with focal segmental glomerulosclerosis on renal histology. The tubulopathy may be Fanconi-like or Gitelman-Like with severe hypomagnesemia. Some children (e.g., RMND1) have pseudo hypoaldosteronism with hyperkalaemia-hyponatraemia.

Pearson syndrome is the most common cause of Hematological involvement, with sideroblastic anaemia, trombocitopenia and neutropenia may be present. The syndrome of myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia (MLASA) has been linked to deficiencies of PUS1 and YARS2. Macrocytic anemia has been described in patients with defect in sideroflexin 4 gene. Immune dysfunction with B-cell immune deficiency has been reported in TRNT1deficiency (sideroblastic anemia, immune deficiency, recurrent fever and development delay-SIFD). Abnormalities of skin and hair have been reported in MD: hypertrichosis in SURF1 and in other causes of Leigh Syndrome. Hair abnormalities (pili torti) have been reported in BCS1 (s. Bjornstad) and also in an our BCS1 patient. We have observed hair abnormalities (pili torti) also in a TK2 early onset patient. Cutis laxa syndrome have been associated with pathogenetic variants in PYCR1 and ALDH18A1; alopecia has been reported in UQCRFS1. Characteristic Facies have been reported in Barth syndrome, RARS2, FBXL4 and TMEM70. A clinical approach, with a focus also on possible extraneurological manifestations, can be fundamental to address to MD and to the molecular diagnosis.

### Atrofie ottiche

Stefania Bianchi Marzoli, Milano

La presenza di atrofia ottica nel contesto di malattie genetiche può rappresentare la conseguenza di neuropatia ottica primitiva o, in alcuni casi, secondaria a coinvolgimento delle strutture retiniche, come accade nelle distrofie dei coni.

Le neuropatie ottiche ereditarie rappresentano un gruppo di patologie associate a diversi difetti genetici che possono determinare manifestazioni cliniche molto sovrapponibili ad espressione fenotipica molto variabile anche all’interno della stessa famiglia. In alcune forme, la neuropatia ottica rappresenta l’unica manifestazione clinica mentre in altre può essere associata a diversi quadri degenerativi neurologici o sistemici. L’inquadramento clinico è fondamentale per la definizione della patologia che si basa fundamentalmente sulla modalità di trasmissione: la forma più comune è l’atrofia ottica autosomica dominante (ADOA) associata a mutazioni del gene OPA1 seguita dalla neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON) a trasmissione matrilineare determinata da mutazioni del DNA mitocondriale; più rare, e nel contesto di quadri neurologici più estesi, sono le forme a trasmissione autosomica recessiva. Una neuropatia ottica ereditaria è tipicamente bilaterale e il deficit visivo è centrale da coinvolgimento prevalente di cellule ganglionari e assoni di piccolo calibro corrispondenti al fascio papillomaculare. La conseguenza clinica è uno scotoma centrale o centrocecale a densità ed estensione nell’emicampo temporale molto variabile. L’aspetto del disco ottico è caratterizzato da atrofia inizialmente, e comunque prevalentemente, localizzata nel settore temporale. La LHON in fase acuta, e in forme precliniche, è associata a comparsa di dilatazione microteleangectasica della rete capillare arteriosa epi e peri papillare, aspetto questo che porta diagnosi differenziale con edema del disco ottico caratteristico di neuriti ottiche anteriori. Nell’inquadramento clinico di neuropatie ottiche ereditarie l’analisi OCT è di fondamentale importanza per localizzare e quantificare la perdita assonale e la degenerazione delle cellule ganglionari. Le forme ADOA hanno una manifestazione clinica precoce, senza predilezione di sesso, generalmente entro la prima decade di vita, ma possono rendersi evidenti anche più tardivamente. Diversamente la LHON ha un esordio acuto e colpisce più frequentemente i giovani maschi, pur potendo comparire a qualsiasi età e nel sesso femminile in soggetti geneticamente predisposti. Nella genesi di un danno del nervo ottico di tipo ereditario, in particolare nella LHON, possono essere importanti fattori epigenetici concomitanti quali il fumo, la carenza di folati o vitamina B12. La diagnosi differenziale nelle forme ADOA è con neuropatie ottiche compressive. La consulenza genetica e l’analisi di specifiche mutazioni possono essere orientate da una

classificazione clinica mirata. L’identificazione di mutazioni genetiche, a pattern estremamente variabili, è fondamentale per aspetti prognostici relativi alla funzione visiva e per eventuali piani terapeutici.

### La diagnosi biochimica

Barbara Garavaglia, Milano

I mitocondri sono organelli presenti nelle cellule in copie multiple. Maggiore è il fabbisogno energetico di un tessuto e maggiore è il numero di mitocondri presenti. L’attività principale dei mitocondri è infatti quella di produrre l’energia necessaria alla cellula per vivere e svolgere le sue funzioni mediante un processo chiamato fosforilazione ossidativa (OXPHOS) svolto dagli enzimi della catena respiratoria mitocondriale. Oltre a produrre energia, i mitocondri regolano il metabolismo, l’infiammazione, l’invecchiamento e la morte cellulare e quindi una loro alterazione funzionale può causare diverse patologie: da malattie metaboliche a patologie neurodegenerative e a tumori. Con il termine Malattie Mitocondriali (o mitocondriopatie) si intende però solamente quelle patologie causate da un deficit di OXPHOS. Le Malattie Mitocondriali possono interessare diversi tessuti ma i più colpiti sono in genere i tessuti con la maggior richiesta energetica quali muscolo e cervello e sono causate o da mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA), presente in più copie all’interno del mitocondrio, o da mutazioni in geni nucleari che concorrono alla sintesi e al mantenimento del mtDNA, alla sintesi proteica degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale e dei cofattori coinvolti nel processo di OXPHOS (es Coenzima Q10). Attualmente sono noti più di 300 geni coinvolti in questi meccanismi. Poiché le Malattie Mitocondriali sono caratterizzate da quadri clinici complessi e variabili è importante per il clinico poter indirizzare la diagnosi mediante utilizzo di approcci biochimici. Esami chimico-clinici che possono confermare o indirizzare verso altri difetti metabolici sono il dosaggio dell’acido lattico nel sangue e/o nel liquor, il dosaggio degli acidi organici urinari e il dosaggio delle carnitine. L’esame biochimico più importante nel sospetto di malattia mitocondriale è il dosaggio delle attività enzimatiche degli enzimi della catena respiratoria eseguibile preferenzialmente su tessuto muscolare che è ricco di mitocondri. In alternativa è possibile eseguire l’analisi su fibroblasti in coltura soprattutto se il paziente è un neonato e la biopsia muscolare risulta di difficile esecuzione. Il processo OXPHOS avviene nella membrana interna dei mitocondri attraverso una serie sequenziale di reazioni di ossido-riduzione svolte dai quattro complessi enzimatici della catena respiratoria mitocondriale: NADH-ubichinone reduttasi o Complesso I (CI); SDH-ubichinone reduttasi o Complesso II (CII); ubichinolo-citocromo c reduttasi o Complesso III (CIII); citocromo-c-ossidasi (COX) o Complesso IV (CIV). In queste reazioni, gli elettroni liberati dalle attività ossido-riduttive vengono combinati con l’ossigeno molecolare per produrre acqua. L’energia rilasciata durante queste reazioni viene utilizzata dall’ATP-sintetasi o Complesso V (CV) per produrre ATP, il combustibile fondamentale per il metabolismo cellulare. Dal punto di vista genetico, la catena respiratoria ha una caratteristica unica poiché è composta da proteine codificate da due diversi sistemi genetici: il genoma nucleare e il genoma mitocondriale, il primo ereditato da entrambi i genitori, il secondo ereditato esclusivamente dalla madre. Nel corso della presentazione verranno illustrati alcuni esempi di analisi biochimiche condotte su biopsie muscolari e fibroblasti di pazienti con sospetta malattia mitocondriale che hanno permesso di indirizzare verso le successive analisi genetiche

### La diagnosi genetica

Eleonora Lamantea, Milano

La diagnosi delle Malattie Mitocondriali è un processo integrato multidisciplinare che si basa sull’inquadramento clinico, strumentale e biochimico dei pazienti che vengono poi riferiti al laboratorio per le indagini genetiche. Come noto, le Malattie Mitocondriali sono disordini monogenici nei quali la corretta funzionalità della catena respiratoria e del sistema della fosforilazione ossidativa è compromessa e, poiché il regolare funzionamento dei complessi multienzimatici deputati al trasporto degli elettroni e alla produzione di energia è il risultato dell’interazione di prodotti proteici codificati dal DNA mitocondriale (mtDNA) e da geni nucleari, nella diagnosi di queste patologie deve essere considerato lo studio di entrambi i genomi.



Inoltre, le Malattie Mitocondriali sono eterogenee per età d’esordio, segni e sintomi, coinvolgimento di organi e tessuti e per modalità di trasmissione, conseguentemente non esiste un percorso diagnostico unico. Ci sono infatti sindromi mitocondriali ben definite, associate a specifiche mutazioni puntiformi del mtDNA (LHON, MELAS, MERRF, NARP) oppure ad alterazioni qualitative del mtDNA (sindrome di Pearson, sindrome di Kearn-Sayre, PEO); in questi casi l’iter diagnostico prevede l’esecuzione di un esame mirato, sul DNA estratto dal tessuto più appropriato, volto a confermare il sospetto clinico della specifica malattia. In caso di negatività del risultato è possibile effettuare la sequenza completa del mtDNA, che consente di identificare eventuali mutazioni rare, già riportate in poche famiglie, oppure private, cioè mai associate a patologia, che necessitano di un’attenta validazione per giungere a confermare la correlazione con il quadro clinico. Oltre a queste, esistono altre sindromi mitocondriali correlate ad alterazioni in geni nucleari (es. sindrome di Leigh, sindrome di Alpers, MNGIE, etc.) per le quali può essere indicato lo studio di uno o pochi geni nucleari. Presentazioni cliniche che non rientrano in alcuna sindrome, ma per le quali si sospetta una malattia mitocondriale, o forme sindromiche che restano prive di diagnosi vengono generalmente inquadrate mediante lo studio morfologico e biochimico del tessuto muscolare o di altri tessuti, prima di avviare gli studi molecolari. Anche in questi casi, si può operare su entrambi i versanti, mitocondriale o nucleare, mantenendo una visione più ampia. Si procede quindi sia sequenziando l’intero mtDNA sia valutando la presenza di possibili riarrangiamenti; mentre per lo studio di alterazioni nucleari, dopo l’avvento delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS), si è consolidato l’utilizzo di pannelli di geni-malattia che consentono di analizzare parallelamente da decine a centinaia di geni. Per le Malattie Mitocondriali i geni nucleari associati a patologia sono ad oggi >340 e questo tipo di analisi è rapidamente divenuta la metodica più utilizzata nel nostro Centro, consentendo di incrementare lo score diagnostico da < 25%, in epoca pre-NGS, a >50%. La diagnosi genetica di certezza è fondamentale per i pazienti e per le loro famiglie poiché è alla base delle valutazioni prognostiche, della consulenza genetica e della possibilità di accedere ad eventuali trial terapeutici.

Daniela Zuccarello, Padova

### Diagnosi genetica preimpianto e prenatale

Daniela Zuccarello, Padova

Daniela Zuccarello, Padova

I test diagnostici prenatali comportano l’analisi del feto prima della nascita (sull’embrione prima del trasferimento o durante la gravidanza) per determinare se il feto ha ereditato o meno la malattia genetica dal genitore affetto o dal portatore sano. Le metodiche di diagnosi prenatale si dividono in non invasive (test del DNA fetale circolante - NIPD) e invasive (test genetico preimpianto - PGT; celocentesi; CVS; amniocentesi) e vengono eseguite in diversi periodi gestazionali.

In particolare, la PGT-M si riferisce al test per la/e variante/i patogenetica/e del DNA che causano malattie monogeniche, legate all’X, autosomiche dominanti o recessive, per le quali sono stati inequivocabilmente identificati loci patogeni (nucleari o mitocondriali).

Nei casi in cui la variante patogena causale della malattia mitocondriale è codificata dal DNA nucleare, il test è lo stesso di altre malattie monogeniche e consente una diagnosi precisa dell’embrione colpito.

Al contrario, la PGT-M per i disordini mitocondriali causati da varianti patogenetiche del DNA mitocondriale (mtDNA) consente la selezione solo per embrioni con un carico di varianti patogene del mtDNA al di sotto della soglia di espressione clinica, fornendo un’efficace strategia di riduzione del rischio per la variante patogena eteroplasmica del mtDNA (non a rischio zero). Poiché questa soglia spesso non è nota per varianti patogene rare o private, recenti studi di letteratura indicano che gli embrioni con un carico di mutazione inferiore al 18% hanno più del 95% di probabilità in più di non essere affetti, indipendentemente dalla variante patogena del mtDNA e possono essere considerato per il trasferimento. Per tutte le varianti patogene del mtDNA testate finora, il carico della variante patogena nei singoli blastomeri (biopsia dell’embrione di 3 giorni) è ritenuto rappresentativo per l’intero embrione, a causa dell’assenza di replicazione del mtDNA nella fase di clivaggio. Resta da determinare se lo stesso è vero per la blastocisti, poiché la replicazione del mtDNA è già iniziata in questa fase, portando a maggiori variazioni. Pertanto, è più corretto affermare che la PGT-M per le mutazioni del mtDNA restituisce una classificazione degli embrioni piuttosto che una diagnosi di certezza. La PGT-M non è indicata in caso di bassa riserva ovarica e in caso di variante omoplasmica.

È di fondamentale importanza discutere con la coppia i potenziali rischi e benefici di queste tecniche durante la consulenza genetica, valutando anche la possibilità di eseguire la riproduzione assistita femminile eterologa.

Daniele Ghezzi, Milano

### The Next Generation

In the field of genetic analysis for inherited diseases, the advent of new technologies called Next Generation Sequencing (NGS) has dramatically improved the diagnostic yield for diverse inherited conditions and the possibility to identify novel genetic defects. NGS is suitable to study clinically and genetically heterogeneous diseases, like mitochondrial disorders. Indeed, patients with these rare conditions often experience a “diagnostic odyssey” lasting for several years.

The term NGS encompasses different approaches with different target size: multigene panel sequencing, Whole Exome Sequencing (WES) and Whole Genome Sequencing (WGS). Nowadays, panel NGS (together with mitochondrial DNA sequencing) represents the first step in genetic diagnosis for mitochondrial disorders; its utility has been proven by our own experience and diverse published studies. The use of WES in routine genetic screening is hampered by economic, instrumental, data management issues; nevertheless, its advantages are obvious: by capturing all coding genes, WES not only increase the diagnostic rate, but also facilitate novel disease gene discovery and the identification of new, atypical clinical presentations, expanding our knowledge about genotype-phenotype correlations in Mitochondrial Diseases. A definite molecular diagnosis is of great importance for genetic counselling to patients and families while the identification of new disease-genes, and novel pathological mechanisms, could provide novel potential therapeutic targets.

Besides all the positive aspects of NGS, it has introduced a great challenge that concerns prioritization of candidate variants and assessment of their pathogenicity. These analyses represent the limiting-step in the NGS workflow, which should end with a final classification of all the identified variants as pathogenic or benign. However, each NGS analysis lead to a large set of “Variants of Uncertain Significance” (VUS), the interpretation of which is extremely difficult.

Despite the increasing use of NGS for identification of the genetic basis for Mitochondrial Diseases, the diagnostic yield is still about 50%. RNA sequencing coupled to WES has been suggested for improving the diagnosis of inherited disorders, and has been exploited for the study of mitochondrial disorders. More recently, additional “omics “approaches (e.g., proteomics, metabolomics...) have been tested and proposed to further increase the diagnostic yield and to functionally validate the identified variants.

Alessandra Maresca, Bologna

### Biomarcatori per le Malattie Mitocondriali

Alessandra Maresca, Bologna

I biomarcatori possono essere definiti come indicatori biologici di processi sia fisiologici che patologici, o della risposta ad interventi terapeutici. Partendo da campioni biologici derivati da pazienti, solitamente ottenuti con procedure poco invasive, l’identificazione di biomarcatori può avere tre possibili applicazioni: 1) previsione dello stato di malattia, 2) il monitoraggio della progressione della malattia o 3) la valutazione dell’efficacia delle terapie. L’individuazione di biomarcatori per le Malattie Mitocondriali ha come vantaggi l’implementazione dell’algoritmo diagnostico, spesso complicato dell’elevata eterogeneità dei difetti genetici e delle manifestazioni cliniche che caratterizzano queste patologie, e del follow-up clinico, fornendo inoltre degli endpoints secondari per i trial clinici e terapie sperimentali. Oltre ai biomarcatori tradizionalmente associati alle Malattie Mitocondriali, come acido lattico, alanina e piruvato, negli ultimi anni sono stati proposti nuovi possibili marcatori, spesso però specifici per singoli fenotipi clinici o per tipologia di difetto genetico, come FGF21 (Fibroblast growth factor 21) e GDF15 (Growth Differentiation Factor 15).

In uno studio condotto nel nostro centro su 123 pazienti mitocondriali con differenti fenotipi clinici abbiamo testato la validità di quattro biomarcatori: FGF21, GDF15, creatina e DNA mitocondriale circolante (ccf-mtDNA). I risultati di questo studio hanno confermato l’aumento

di FGF21 e GDF15 nei pazienti con miopatia e difetti genetici nei tRNA mitocondriali, nello specifico Sindrome MELAS e Sindrome MERRF. L’associazione con la miopatia è stata inoltre confermata dalla correlazione positiva di FGF21 e GDF15 con l’acido lattico plasmatico, marcatore di danno muscolare. Al contrario, nella nostra coorte la creatina non è risultata associata a uno specifico fenotipo clinico. Il ccf-mtDNA è risultato invece significativamente aumentato nel gruppo dei pazienti MELAS e la valutazione longitudinale in quattro pazienti ha mostrato livelli aumentati di ccf-mtDNA in relazione a eventi acuti (stroke-like/stato epilettico) o progressione della neurodegenerazione. Inoltre, nei pazienti MELAS, il ccf-mtDNA è correlato negativamente con l’alanina plasmatica.

In conclusione, i nostri risultati hanno confermato il potenziale uso di FGF21 e GDF-15 e identificato un nuovo potenziale biomarcatore per la Sindrome MELAS, il ccf-mtDNA, che potrebbe essere utilizzato per monitorare il decorso della malattia o per valutare l’efficacia delle terapie, specialmente durante gli episodi acuti.

Holger Prokisch, Monaco di Baviera

### The GENOMIT project

Background The spectrum of mitochondrial disease is genetically and phenotypically diverse, resulting from pathogenic variants in over 400 genes, with aerobic energy metabolism defects as a common denominator. Such heterogeneity poses a significant challenge in making an accurate diagnosis, critical for precision medicine.

Methods In an international collaboration initiated by the European Network for Mitochondrial Diseases, GENOMIT, we recruited 2,023 pediatric patients at 11 specialist referral centers between October 2010 and January 2021, accumulating exome sequencing and HPO-encoded phenotype data. An exome-wide search for variants in known and potential novel disease genes, complemented by functional studies, followed ACMG guidelines. Results 1,109 cases (55%) received a molecular diagnosis, of which one fifth have potential disease-modifying treatments (236/1,109, 21%). Functional studies enabled diagnostic uplift from 36% to 55% and discovery of 62 novel disease genes. Pathogenic variants were identified within genes encoding mitochondrial proteins or RNAs in 801 cases (72%), while, given extensive phenotype overlap, the remainder involved proteins targeted to other cellular compartments. To delineate genotype-phenotype associations, our data was complemented with registry and literature data to develop “GENOMITexplorer”, an open access resource detailing patient- (n=3,940), gene- (n=427), and variant-level (n=1,492) associations (prokischlab.github.io/GENOMITexplorer/).

Conclusions Reaching a molecular diagnosis was essential for implementation of precision medicine and clinical trial eligibility, underlining the need for genome-wide screening given inability to accurately define Mitochondrial Diseases clinically. Key to diagnostic success were functional studies, encouraging early acquisition of patient- derived tissues and routine integration of high-throughput functional data to improve patient care by uplifting diagnostic rate.

Agnès Rötig, Parigi

### Impaired regulation of cytosolic iron homeostasis in Friedreich ataxia

Friedreich's ataxia (FRDA) is a frequent autosomal recessive disease caused by a GAA repeat expansion in the FXN gene encoding frataxin, a mitochondrial protein involved in iron-sulfur cluster (ISC) biogenesis. Resulting frataxin deficiency affects ISC-containing proteins and causes iron to accumulate in the brain and heart of FRDA patients. Here we report on abnormal cellular iron homeostasis in FRDA fibroblasts inducing a massive iron overload in the cytosol and mitochondria. We observe membrane transferrin receptor 1 (TfR1) accumulation, increased TfR1 endocytosis, and delayed transferrin recycling, ascribing this to impaired TfR1 palmitoylation. Frataxin deficiency is shown to reduce coenzyme A (CoA) availability for TfR1 palmitoylation. Finally, we demonstrate that artesunate, CoA, and dichloroacetate improve TfR1 palmitoylation and decrease iron overload, paving the road for evidence-based therapeutic strategies at the actionable level of TfR1 palmitoylation in FRDA.

## Targeting the cellular metabolism to treat tissue-specific Mitochondrial Diseases

Rita Horvath, Cambridge

Reversible infantile respiratory chain deficiency (RIRCD) is a rare mitochondrial myopathy leading to severe metabolic disturbances in infants, which recover spontaneously after 6 months of age. RIRCD is associated with the homoplasmic m.14674T>C mitochondrial DNA mutation, however only ~1/100 carriers develop the disease. We studied 27 affected and 15 unaffected individuals from 19 families and found additional heterozygous mutations in nuclear genes interacting with mt-tRNAGlu including EARS2 and TRMU in the majority of affected individuals, but not in healthy carriers of m.14674T>C, supporting a digenic inheritance. Our transcriptomics and proteomics analysis in patient muscle suggests a step-wise mechanism where first, the integrated stress-response associated with increased FGF21 and GDF15 expression enhances the metabolism modulated by serine biosynthesis, one carbon metabolism, TCA, lipid oxidation and amino acid availability, while in the second step mTOR activation leads to increased mitochondrial biogenesis. Our data suggests that the spontaneous recovery in infants with digenic mutations may be modulated by the above-described changes. Similar mechanisms may explain the variable penetrance and tissue specificity of other mtDNA mutations and highlight the potential role of amino acids in improving mitochondrial disease.

## Exploiting zebrafish as a model organism for drug screening against Mitochondrial Diseases

Ildiko Szabo, Padova

The respiratory chain and mitochondrial function are evolutionary conserved across nearly all living species, allowing to gain insight into pathophysiologic mechanisms and therapeutic targets for Mitochondrial Diseases using different model organisms. Zebrafish (*Danio rerio*) is a small vertebrate, often exploited to model a series of human diseases, including those related to mitochondrial disorders. The effects of mutations and/or possible therapeutic drugs affecting mitochondrial function can be evaluated *in vitro* as well as *in vivo*, investigating development, growth, survival and motor activity. In addition, reporter lines with fluorescence-based indicators of mitochondrial pathophysiology can be exploited in the transparent zebrafish embryos and larvae. These fluorescent markers, when combined, can provide information about multiple parameters such as mitochondrial content, mitophagy membrane potential and oxidative stress, thereby facilitating drug screening. Examples of studies addressing Mitochondrial Diseases and their pathological consequences in zebrafish will be discussed.

## Mouse models

Carlo Viscomi, Padova

Mitochondrial Diseases are extremely heterogeneous genetic disorders due to faulty oxidative phosphorylation (OxPhos). No cure is currently available for these conditions, beside supportive interventions aimed at relieving complications. Mitochondria are under a double genetic control carried out by the mitochondrial DNA (mtDNA) and by nuclear DNA. Thus, not surprisingly, mutations in either genome can cause mitochondrial disease. Although mitochondria are usually associated with respiration and ATP synthesis, they play fundamental roles in a large number of other biochemical, signalling and execution pathways, each being a potential target for therapeutic interventions. These can be classified as general therapies, *i.e.*, potentially applicable to a number of different mitochondrial conditions, or therapies tailored to a single disease, *i.e.*: personalized approaches, such as gene therapy, cell therapy and organ replacement.

Mitochondrial medicine is a particularly lively research field, and the last few years witnessed a steady increase in the number of clinical applications. The availability of mouse models has been instrumental to the translation of the findings from basic research into the clinics. I will present some examples of how we exploited mouse models to test new therapies for Mitochondrial Diseases.

## Cell/organoid models

Magdalena Renner, Basilea

Human organoids are 3D cellular ensembles that are grown *in vitro* from adult or pluripotent stem cells and reproduce some morphological, functional and transcriptomic features of human organs. Organoids engineered to harbour disease-causing mutations or grown directly from patient cells could provide mechanistic insights into diseases. We performed single cell RNA sequencing of developing retinal organoids and from the periphery, fovea, pigment epithelium and choroid of light-responsive adult human retinas. Cell types in organoids matured *in vitro* to a stable ‘developed’ state at a rate similar to human retina development *in vivo* and the transcriptomes of organoid cell types converged towards the transcriptomes of adult peripheral retinal cell types. The expression of disease-associated genes was significantly cell-type specific in adult retina and cell-type specificity was retained in organoids. We implicate unexpected cell types in diseases such as macular degeneration.

## New biomarkers for mitochondrial myopathy

Anu Suomalainen, Helsinki

The vast spectrum of mitochondrial disease manifestations is unprecedented in the field of medicine making the diagnosis of these disorders exceptionally challenging. Curative treatments typically do not exist, but recent preclinical models and increased knowledge of molecular physiology of specific disease groups have raised hopes for development of interventions. Therefore, quantitative and reliable biomarkers that allow follow-up of disease progression or therapy effects are needed. By omics analyses of different sample types from patients and tailored disease models we have identified both single and multi-metabolite biomarkers, secreted and tissue-specific, which are specific for disease-groups and advance understanding of pathophysiology and are valuable as biomarkers. Some of these factors respond to interventions and therefore are useful for diagnosis, follow-up and therapy effect assessment.

## Circulating markers of reductive stress in mitochondrial disease

Rohit Sharma, Boston

A major hurdle in the management of and therapeutic development for mitochondrial disease is the lack of facile biomarkers of severity. To identify robust and reliable markers of severity for mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) caused by the m.3243A>G variant we undertook a two-pronged approach consisting of: 1) a discovery phase, and 2) a validation phase.

We first performed proteomics, targeted metabolomics and untargeted metabolomics on a discovery cohort of 102 patients and 32 controls. This cohort had also been deeply phenotyped through MRS measurements and Karnofsky scores. The metabolites emerging from analysis of this cohort were nominated for the validation phase in which we measured concentrations of the prioritized metabolites in an independent cohort with the m.3243A>G variant. Our pipeline validated 20 analytes consisting of 1 protein and 19 metabolites that distinguish MELAS patients from controls. In addition to classic markers (lactate, alanine) the validated markers also include recently identified markers (GDF15 and 2-hydroxybutyrate). Additionally, through chemoinformatic mining of untargeted mass spectra we uncovered 3 less-well metabolite families: 1) N-lactoyl-amino acids, beta-hydroxy acylcarnitines, and beta-hydroxy fatty acids. Many of the 20 validated analytes correlate strongly with measures of severity including MRS lactate and Karnofsky scores. Nearly all of these markers are attributable to an elevated NA-DH-NAD+ ratio, or reductive stress. We found that several markers in our validated panel are also significantly altered in mitochondrial myopathy and in Leigh Syndrome French Canadian Variant (LSFC). Several markers appear to be stable through exercise increasing their clinical robustness. This work begins to define a mitochondrial function test that is mechanistically related to NADH-reductive stress and should enable both classification and monitoring of mitochondrial disease.

## Terapia convenzionale

Daria Diodato, Roma

Allo stato attuale, purtroppo, non esistono ancora approcci terapeutici per le Malattie Mitochondriali che si siano dimostrati risolutivi in trials clinici randomizzati. L’eterogeneità clinica e genetica delle Malattie Mitochondriali, la mancanza di misure di outcome validate e di studi storia naturale ha reso particolarmente difficile lo sviluppo di trials clinici volti a dimostrare l’efficacia di specifici approcci terapeutici. Nella pratica clinica e in letteratura è uso comune l’impiego di integratori/sostanze che costituiscono quello che viene definito “cocktail mitochondriale”. Sebbene l’utilizzo del suddetto cocktail sia pratica comune, la scelta delle sostanze e i relativi dosaggi variano molto tra gli specialisti e non esistono specifiche linee guida per l’utilizzo di tali composti, ma piuttosto la loro scelta viene spesso guidata dall’esperienza centro-specifica. Molti degli agenti terapeutici utilizzati, la cui funzione è prevalentemente antiossidante o quella di supportare vie energetiche alternative, non ha effetti collaterali anche se ad alti dosaggi. Da qui la pratica comune di iniziare il trattamento combinando più fattori. Per alcuni di essi, come ad esempio la riboflavina, è raccomandato l’utilizzo in specifiche Malattie Mitochondriali in quanto hanno ne è stata dimostrata la maggiore efficacia in letteratura.

## Terapie di supporto e palliative per la gestione domiciliare del paziente

Anna Mandelli, Milano

Le Malattie Mitochondriali sono un gruppo di sindromi cliniche accomunate dal deficit del metabolismo energetico cellulare.

Hanno genetica e fisiopatologia molto complessa e variegata e questo si traduce in una grande eterogeneità clinica.

Nelle forme più severe, con un potenziale coinvolgimento delle funzioni vitali la priorità della cura è mantenere l’equilibrio il più a lungo possibile e rendere i caregiver autonomi in condizioni di benessere e di patologia lieve.

Questo avviene attraverso la presa in carico del servizio di Cure Palliative Domiciliari, secondo le indicazioni date dall’OMS e raccolte dallo Stato Italiano nel 2010.

Il servizio, attraverso un sistema di valutazione multidisciplinare, si farà carico di tutti gli aspetti che possono portare a una rottura dell’equilibrio in un’ottica di prevenzione e di benessere globale del paziente e della sua famiglia. La famiglia stessa verrà formata, addestrata e messa nelle condizioni di poter gestire il paziente e i suoi bisogni il più possibile al domicilio. L’insufficienza respiratoria, che è la più precoce e significativa delle conseguenze della patologia mitocondriale è spesso inapparente e si può manifestare clinicamente per la prima volta:

- acutamente, in corso di un episodio intercorrente non necessariamente di natura respiratoria;
- insidiosamente, per progressione della malattia.
- In ogni caso, una diagnostica attenta permette di riconoscere i pazienti a rischio, che già in benessere sfruttano i fisiologici meccanismi di compenso. Riconoscere precocemente questi pazienti permette di avviarli a un programma di ventilazione domiciliare e di controlli programmati che riducono drammaticamente il ricorso a ricoveri in generale e, soprattutto, in Terapia Intensiva in condizioni di emergenza.
- Quando si presente l’emergenza deve essere gestita secondo le linee guida internazionalmente riconosciute. Tuttavia i pazienti affetti da queste patologie presentano caratteristiche peculiari:
- bilancio energetico: è assolutamente necessario mantenere un adeguato bilancio energetico e quindi vanno attuate tutte le strategie che consentono di mantenere una nutrizione completa, preferibilmente per via enterale;
- terapie croniche: per quanto si tratti di terapie comunemente ritenute solo di supporto, se non addirittura cosmetiche, per questi pazienti sono importanti. Purtroppo, non tutte possono essere somministrate per via endovenosa, ma vanno mantenute o almeno ripristinate il prima possibile;
- insufficienza respiratoria cronica: questi pazienti hanno sviluppato una serie di meccanismi di compenso che consentono loro di tollerare ipercapnia e ipossia meglio di altri. Pertanto, andrebbero gestiti il più a lungo possibile con metodiche non invasive, privilegiando trattamenti intensi di fisioterapia respiratoria, trattamenti posturali e utilizzo di tecniche (incentivatore della tosse, VEST, accelerazioni di flusso, NIV) a cui le famiglie

- sono in genere ben addestrate o su cui vanno istruite;
- trasferimento: a discrezione dei curanti e a stabilizzazione avvenuta, può essere utile trasferire il paziente nei centri territoriali di riferimento per patologia o, nel caso di bambini, nei centri di CPP per la gestione cronica.

### Transplant therapy, perspectives and limits: the experience of liver transplantation

Lorenzo D'Antiga, Bergamo

While the list of potential Inborn Metabolic Defects (IMDs) amenable to treatment with liver transplantation (LT) has increased, the evaluation of the risk-benefit ratio has become more complicated. When the primary cause of the disease resides within the liver cells, or is due to a structural liver disease (liver-specific metabolic disorders), there is the opportunity for LT to correct the underlying defect and provide a 'cure' for the disorder. When the metabolic defect is also expressed in other tissues, LT is of potential use for metabolic disorders in which toxic intermediary metabolites from multiple organ systems can freely interchange with other organs through the systemic circulation. In this setting, the residual abnormal metabolites generated by the rest of the body can be efficiently cleared by the donor liver. Therefore, some IMDs that have significant extrahepatic expression may be effectively cured by LT. In these cases, the benefit of LT depends on the extent of extrahepatic manifestations, in particular neurological damage, at the time of LT. Even in the cases where LT cannot completely compensate the extrahepatic defects, it may provide substantial benefit by reducing the risk of acute metabolic crises, allowing a less stringent dietary restriction and reducing the progression of long-term organ dysfunctions, thereby significantly improving quality of life. On the contrary, when a genetically normal liver is insufficient to compensate the extrahepatic defect, LT usually provides no or little benefit. Mitochondrial disorders (MDs) are systemic diseases in which organ transplantation is generally contraindicated. Those presenting with liver involvement are related to nuclear gene products (inherited with autosomal recessive pattern in 90% and autosomal dominant and X-linked pattern in 10%), responsible for mitochondrial DNA replication (POLG1), maintenance of deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) pools (DGUOK) and membrane mitochondrial integrity (MPV17). Therefore, mutations in these genes cause mitochondrial DNA depletion, characterised by hepato-cerebral forms inherited with an autosomal recessive pattern. Currently, the indication for LT in mitochondrial hepatopathies is controversial. Although LT can lead to normal hepatic function, it neither stabilises nor normalises mitochondrial function in extrahepatic-affected tissues. Thus, severe systemic manifestations of mitochondrial disease are generally considered a contraindication to LT. In patients selected for transplant, the surgical outcome in published case series has been relatively poor, with late-onset extrahepatic manifestations of mitochondrial dysfunction appearing even after initial negative screens. However, good outcomes in selected patients without neurological findings have been described as well. In general, patients with mitochondrial hepatopathy and central nervous system (CNS) involvement have significantly worse post-LT survival rates, therefore are usually considered not amenable to treatment with this procedure.

### Clinical trials in progress

Olimpia Musumeci, Messina

Mitochondrial disorders are a quite heterogeneous group of diseases that are associated with mitochondrial dysfunction leading to multi-organ disease. In the recent years, the knowledge of the pathomechanisms of these disorders has been greatly expanded. However, the therapeutic approaches for mitochondrial disorders are so far limited mainly to symptom specific therapies and supportive measures. An increasing number of clinical trials in mitochondrial disorders focusing on more specific and effective therapies is emerging. Some therapeutic approaches are applicable in multiple mitochondrial disorders as activation of mitochondrial biogenesis, regulation of mitophagy and mitochondrial dynamics, bypass of biochemical defects, mitochondrial replacement therapy. Other strategies aimed to treat specific mitochondrial disorders as scavenging of toxic compounds, deoxynucleoside and deoxynucleotide treatments, cell replacement therapies, gene therapy, shifting mitochondrial DNA mutation heteroplasmy, and stabilization of mutant mitochondrial transfer RNAs. Some of these approaches are already translated in some ongoing clinical trials in patients with mitochondrial disorders with quite promising expectations.

### Scoprire terapie per la malattia di Leigh tramite neuroni e organoidi cerebrali di pazienti

Alessandro Prigione, Düsseldorf

Metabolism is essential for providing the energy necessary to ensure proper cellular function. Mutations in genes regulating this process lead to inherited metabolic disorders that can be organ-specific or multi-organs. Among inherited metabolic diseases, Mitochondrial Diseases represent a major therapeutic challenge, given that they can be caused by mutations in oxidative phosphorylation (OXPHOS) genes that are encoded by either the mitochondrial DNA (mtDNA) or the nuclear DNA (nDNA). This fact hampers the generation of suitable model systems, due to the challenges associated with mtDNA engineering. In my lecture I will discuss the role of stem cell metabolism in cell fate transition. I will show how human somatic cells converted into induced pluripotent stem cells (iPSCs) reprogram their mitochondrial state and switch from OXPHOS metabolism to glycolysis, while retaining individual-specific mtDNA mutations. I will then discuss how it is possible to apply the iPSC model to investigate Mitochondrial Diseases. I will primarily focus on Leigh syndrome (LS), which is the most frequent and most severe mitochondrial disease in children, affecting 1/40,000 newborns. I will present our data showing how neural progenitor cells (NPCs) differentiated from LS patient iPSCs exhibit phenotypic abnormalities that can be used to establish compound screening strategies (5). Finally, I will discuss how iPSC-derived three-dimensional cerebral organoids could recapitulate the neurodevelopmental features of LS and thus shed light on the underlying molecular disease mechanisms (6). Altogether, in my talk I will highlight the importance of human stem cell models to advance the understanding and therapy of incurable mitochondrial disorders.

### Modulazione di microRNA come strategia terapeutica gene-indipendente per le Malattie Mitochondriali

Alessia Indrieri, Napoli

Mitochondrial Diseases (MDs) are a heterogeneous group of rare disorders caused by defective oxidative phosphorylation, resulting in the dysfunction of different organs and tissues. They show extreme genetic heterogeneity with several different mutations identified in either

mitochondrial or nuclear DNA. This variability makes the development of efficient treatments particularly difficult. Indeed, despite progress made lately, no effective therapies are still available for MDs. For this reason, gene/mutation-independent approaches acting downstream of the genetic defect are highly desirable.

MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs acting as key regulators of gene expression and represent promising therapeutic tools for their capability to simultaneously modulate multiple pathways involved in disease pathogenesis and progression. We recently demonstrated that the miR-181a and b (miR-181a/b) regulate mitochondrial biogenesis and function, and that downregulation of these miRNAs enhances mitochondrial turnover in the Central Nervous System through the coordinated activation of mitochondrial biogenesis and mitophagy, thus pointing to a crucial role of these microRNAs in the global regulation of mitochondrial homeostasis. Interestingly we also found that miR-181a/b inactivation protects neurons from cell death and ameliorates the disease phenotype of different in vivo models of MDs, i.e., Microphthalmia with Linear Skin Lesions (MLS), Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) and Leigh syndrome. Interestingly our data demonstrated that the beneficial effect of miR-181a/b downregulation is independent from etiopathogenetic event underlying the development of these disorders thus suggesting that miR-181a/b could represent new gene/mutation-independent therapeutic targets for MDs.

We thus decided to test if miR-181a/b downregulation may be exploited as a therapeutic strategy in MDs. To achieve long-term loss-of-function of miR-181a/b in vivo, we generated an Adeno Associated Viral (AAV) vector expressing a miRNA sponge able to specifically bind miR-181a/b and inhibit their activity. We are currently studying the effect of miR-181a/b sponge in the Ndufs4 KO mouse, which is a widely used murine model of both Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) and Leigh syndrome, two of the most frequent MDs affecting the eye and the brain, respectively. To achieve an efficient transduction of the retina and the brain we used the AAV.PHP.B serotype that successfully overcomes the blood-brain barrier and show a good transduction of retinal cells. Interestingly our data show a significant amelioration of the visual function and an improvement of the locomotor activity in mice treated with the miR-181a/b sponge respect to controls. These findings highlight the therapeutic potential of miR-181a/b downregulation for MDs and for other neurodegenerative disorders associated with mitochondrial dysfunctions.

### Utilizzo di cellule umane iPSCs per lo studio della neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON)

Valeria Tiranti, Milano

La neuropatia ottica di Leber (LHON), è una delle più frequenti Malattie Mitochondriali ed è stata la prima, ormai 30 anni fa, ad essere associata a mutazioni missenso del DNA mitocondriale. La malattia, che porta a cecità, ha caratteristiche peculiari poiché colpisce in modo selettivo le cellule ganglionari della retina (RGC), i cui assoni formano il nervo ottico. Le mutazioni più frequenti sono omoplasmiche e colpiscono subunità del Complesso I della catena respiratoria. I fibroblasti dei pazienti affetti da LHON e di controlli sani sono stati riprogrammati in iPSC (cellule indotte pluripotenti) con l'utilizzo del Sendai Virus e successivamente differenziati in neuroni. I primi risultati mostrano una riduzione della motilità mitocondriale lungo gli assoni dei neuroni LHON, una diminuzione del numero di copie di mtDNA e una ridotta capacità respiratoria mitocondriale. Inoltre, abbiamo osservato una attivazione patologica di processi di auto e mitofagia nei neuroni LHON che sono stati corretti da trattamenti con molecole regolatrici dell'autofagia e con modulatori del sistema redox. Questi modelli, fisiologicamente più rilevanti rispetto alle tradizionali colture di fibroblasti, rappresentano una piattaforma innovativa per testare approcci farmacologici e, in prospettiva, aprire la strada verso la medicina personalizzata.



WWW.FONDAZIONE-MARIANI.ORG

