

Genetica mitocondriale

Una estrema sintesi.

Luca Fusar Bassini

Anno Accademico 2017/18

Scuola Normale Superiore di Pisa

Basato sugli appunti del corso del professor G. Cercignani, paper proposti e il testo Lehninger Biochemistry.

Caratteristiche strutturali ed evolutive del genoma mitocondriale; CoRR Theory. Filogenesi. Nucleoide.

Coerentemente con la teoria endosimbiontica, la quale spiega l'origine del mitocondrio, l'organello possiede un proprio genoma. Si tratta di una molecola di dsDNA circolare, presente in numero variabile (in genere tra 2 e 15) in ciascun mitocondrio di ciascuna cellula eucariotica che è dotata di questo organulo. Il mtDNA consta di 16.569 bp nella specie umana; rispetto ai Metazoi (11-28 kbp), nelle piante e nei funghi si ritrovano genomi mitocondriali più estesi e anche suddivisi in più di una molecola. In piante, funghi e protisti si rinvencono altresì genomi lineari in più molecole. Tornando ai Metazoi, un filamento contiene una maggior percentuale di nucleotidi guanilici e viene perciò detto Heavy Strand, mentre l'altro contiene di conseguenza più citosine e viene detto Light Strand. Il DNA mitocondriale non presenta introni nei Metazoi (ma può presentarli talvolta in piante, funghi e protisti) ed è interamente codificante, con l'eccezione di una regione, la Non-coding Control Region. Tale regione presenta al suo interno un'esternazione del filamento H, con il filamento L che risulta appaiato ad una terza strand, formata da 5'-RNA che si continua con DNA7S (in riferimento al coefficiente di sedimentazione). La regione è detta ansa D (Displaced), si sviluppa tra le Conserved Sequence Blocks e la Termination-Associated Sequence e risulta fondamentale per l'organizzazione del mtDNA, tanto che viene a ricostituirsi immediatamente in genomi mitocondriali che ne sono sperimentalmente privati. Lieviti privati del mtDNA, così come cellule di vertebrato coltivate in laboratorio in

terreni contenenti glucosio, possono sopravvivere con un metabolismo anaerobio, ma nessun multicellulare a vita libera è in grado di fare ciò.

Il genoma mitocondriale comprende 37 geni nella specie umana (28 sul filamento H e 9 sul filamento L) – 22 per tRNA, 2 per rRNA e i restanti 13 per subunità dei complessi OXPHOS (7 per CI, 1 per CIII, 3 per CIV, 2 per CV). Le sequenze sono particolarmente ricche in AT, forse un adattamento contro l'ambiente fortemente ossidante del mitocondrio.

Nel corso dell'evoluzione, al pari dei plastidi nei vegetali, risultano trasferiti orizzontalmente la maggior parte dei geni mitocondriali, dall'organulo al nucleo, dunque sottoposti a più efficiente regolazione, e ci si domanda per quale ragione alcuni geni siano invece ritenuti. Una possibile spiegazione sostiene che i geni ritenuti siano quelli codificanti per proteine che non possono essere sintetizzate nel citoplasma, importate e inserite nella MIM, dovendo essere perciò necessariamente sintetizzate per via diretta in tal posizione. Una seconda spiegazione riguarda un controllo diretto mediato dallo stato redox dei trasportatori della catena elettronica, che garantirebbe una regolazione locale (CoRR Theory), ma il meccanismo è poco spiegato.

Il mtDNA risulta impacchettato con proteine in strutture dette nucleoidi, di diametro 70 nanometri, associate al versante interno della membrana mitocondriale interna. I nucleoidi contengono da 2 a 8 copie di mtDNA e proteine, di cui almeno 30 conservate tra le diverse specie. Spiccano il fattore di trascrizione mitocondriale TFAM, la DNA polimerasi γ , il fattore di trascrizione TFB2M, l'elicasi Twinkle (che in gran parte degli eucarioti è anche primasi), single-strand binding proteins mitocondriali, l'ATPasi ATAD3, poco caratterizzata e forse implicata nella ripartizione dei nucleoidi in eventi di fissione mitocondriale, anche se studi di immunofluorescenza mostrano che essa non interagisce direttamente con il mtDNA. Sembra che la replicazione abbia luogo nel core centrale mentre la traduzione e l'assemblaggio di proteine avvengano alla periferia.

TFAM appartiene alla famiglia High Mobility Group, così come gli istoni; la sua overespressione aumenta il numero di copie di mtDNA ed essa è presente in un rapporto stechiometrico di 1000:1 rispetto al mtDNA, suggerendo un

impacchettamento stretto, fatto supportato da saggi di colocalizzazione. La polimerasi γ è implicata anche in processi di ricombinazione e repair, oggi noti come propri anche del genoma mitocondriale, seppur non ancora studiati approfonditamente. La proteina è semplice e non può replicare il DNA cromosomico di mammifero; nei Metazoi è dimerica, essendo costituita da POLGA, subunità catalitica, e POLGB, che stabilizza l'enzima, è richiesta per la sintesi dell'ansa D e determina il numero di copie di mtDNA per nucleotide.

Il fenomeno di “Eva mitocondriale”. mtDNA e sviluppo ontogenetico. Trasmissione del mtDNA. Conseguenze dell'introduzione di mitocondri da donori in oociti. Terapia mitocondriale.

In gran parte degli organismi a riproduzione sessuata, i mitocondri vengono ereditati dalla madre, al fine di garantire l'omoplasma, ovvero l'identità genetica di tutte le molecole di mtDNA. I mitocondri degli spermatozoi sono marcati con ubiquitina durante la loro genesi e in *Homo sapiens* vengono eliminati allo stadio di 4 cellule o a quello di 8 (in alcune specie invece restano fuori dall'ovulo). Si parla di Eva mitocondriale (Matrilinear most recent common ancestor); l'eredità è detta matrilineare o diagenica. Ciò è utile per rintracciare l'ascendenza attraverso le femmine.

Gli ovogoni dei follicoli primordiali contengono pochi mitocondri e quelli incapaci di performare le funzioni di base sono eliminati per selezione darwiniana (bottleneck mitocondriale, secondo studi recenti ancora antecedente a questo stadio). Gli ovogoni iniziano a replicare i mitocondri, che raggiungono il valore massimo allo stadio di ovulo. Alla fecondazione, la replicazione del mtDNA è bloccata e le successive divisioni che portano alla blastocisti vedono la progressiva riduzione del numero di mitocondri per cellula, poiché essi sono ripartiti ma non replicati. Le ESCs, al pari dei blastomeri pluripotenti di embrioni di mammiferi pre-impianto, hanno pochi mitocondri e mtDNA: la capacità ossidativa è limitata ed esse si affidano primariamente ad un metabolismo anaerobio. Fenomeni di replicazione nello stadio di gastrula sono limitati al mantenimento di un numero minimo costante di

mitocondri per cellula; nel trofoectoderma, deputato alla costruzione della placenta, i mitocondri sono invece replicati abbondantemente e il relativo numero per cellula incrementa. Con l'organogenesi, gli stimoli differenziativi esplicano anche per un numero di mitocondri che risulta citotipo-caratteristico. Embrioni di topo omozigoti knockout per POLGA o TFAM non sono in grado di replicare il mtDNA e muoiono al momento dell'organogenesi. Il differenziamento neuronale, per esempio, stimolato dall'acido retinoico, induce una maggiore trascrizione del mtDNA e la sua replicazione, rispecchiata dall'aumento di TFAM, POLGA e POLGB. Sotto questo stimolo, ESCs di topo mostrano per la prima settimana un livello di espressione di ATPasi β e COXI più elevato di cellule che si differenziano in terreni standard con glucosio 1mM o 5mM, oltre a marker neuronali.

Embrioni anomali umani possono fallire nell'eliminazione dei mitocondri spermatici, i quali sono disponibili per replicazione e trasmissione. È stato riportato il caso di un paziente in cui il mtDNA spermatico ha ricombinato con quello ovulare, creando una molecola ibrida che segregava in un solo tessuto, determinando una miopatia. Alcune specie di Vertebrati e di Invertebrati trasmettono il mtDNA spermatico – interessante il caso delle cozze blu, che trasmettono alla progenie maschile sia il mtDNA paterno che materno, mentre alla progenie femminile il solo mtDNA materno. In *Drosophila* la trasmissione del mtDNA spermatico non sembra conferire vantaggi o svantaggi e patologie alla prole.

Il trasferimento citoplasmatico consiste nell'aggiunta del citoplasma di un ovulo donatore, comprendente i mitocondri, ad un ovulo ricevitore. Si tratta di una tecnica usata negli anni Novanta per potenziare gli ovuli di donne poco fertili, da cui si sono ottenuti individui eteroplasmici. Due casi di sindrome di Turner hanno portato all'abbandono della tecnica. Uno studio longitudinale su topi eteroplasmici riporta una serie di anomalie fisiologiche, come ipertensione vascolare, aumento della massa grassa e anomali parametri ematici, rispetto al controllo. Uno studio recente, invece, dimostra che popolazioni isolate di mitocondri possono venire trasferite da ovuli sviluppo-competenti nelle controparti non competenti, aumentando i tassi di fecondazione e di sviluppo e suggerendo una modalità di

riproduzione assistita per donne con pochi mitocondri funzionanti per ovulo – ricavare mitocondri da un pool di ovuli ottenuti sotto stimolo ormonale e introdurli negli ovuli che saranno fecondati. Tutto questo mette in luce, inoltre, il ruolo cruciale svolto dai mitocondri nello sviluppo embrionale.

Attualmente, nel Regno Unito è stata approvata una tecnica di fecondazione in vitro, detta terapia per sostituzione di mitocondri: una donna che porta malattie mitocondriali può richiedere che il nucleo di un suo uovo in metafase II venga trasferito mediante Maternal Spindle Transfer, assieme con il fuso mitotico e parte del citoplasma, nel citoplasma di un ovulo enucleato di una donatrice, contenente mitocondri sani. Notare, qualche mitocondrio patologico potrebbe venire trasferito, dando luogo ad eteroplasmia. Le tecniche basate su spindle transfer per la donazione di mitocondri sono state contestate in quanto vedono l'unione del materiale genetico di tre diversi individui. La pluripotenza indotta vede lo stabilirsi di un collo di bottiglia, il quale seleziona un certo pool di mitocondri, dando IPSCs diversamente arricchite dei genomi presenti in caso di eteroplasmia. È stato pensato di prelevare cellule somatiche da una femmina, sdifferenziarle in IPSCs e differenziarle in oociti funzionali, infine trasferendo il nucleo di una cellula uovo e fecondando con le tecniche in vitro. In questa maniera, il patrimonio genetico deriva da due soli individui.

Mitocondri di cellule somatiche influiscono negativamente sullo sviluppo embrionale: è stato dimostrato che i tassi di sviluppo da blastocisti di ovuli attivati partenogeneticamente e arricchiti con mitocondri somatici sono inferiori a quelli di controparti arricchite con citoplasma ovulare o non arricchite. Sono stati condotti alcuni esperimenti per decretare le relazioni di nuclei di cellule di diverse specie con mitocondri di specie a varie distanze genetiche – in ‘incroci’ interspecifici fra bovini e fra ovini, sono stati rilevati casi di incompatibilità, dovuta probabilmente all'incapacità di collaborare delle subunità mitocondriali con quelle a codifica nucleare. In ibridi citoplasmatici ratto-topo, il mtDNA di ratto è replicato, trascritto e tradotto efficientemente dai fattori a codifica nucleare del topo, ma essi mostrano un consumo di ossigeno inferiore, una produzione di ATP decrementata, maggiori livelli cellulari di lattato e minori livelli di attività di CI,

III, IV rispetto alle cellule parentali e agli ibridi citoplasmatici topo-topo.

Per quanto riguarda l'uso di cellule pluripotenti indotte, quanto detto circa lo stato dei mitocondri somatici va tenuto a conto. Inoltre, resta da vedere se queste cellule sono in grado di regolare il proprio numero di copie di mtDNA nello stato indifferenziato, e di seguire pattern specifici al momento del differenziamento, come fanno le staminali embrionali.

Variabilità di sequenza. Varianti del codice genetico. Mutazioni del mtDNA, loro genesi e selezione. Uso nei confronti di sequenza del mtDNA. Malattie mitocondriali.

La maggior variabilità si ritrova a livello della Non-coding Control Region, nelle regioni High Variability 1 e 2, lunghe nel complesso circa 600 bp. Le mutazioni in tali sequenze hanno una frequenza di circa 1 su 50 generazioni e risultano utili per studi filogenetici su intervalli temporali larghi. Per quanto concerne le regioni codificanti, invece, il tasso di variazione aminoacidica è molto basso, ma mutazioni neutrali possono interessare la terza base di un codon e più di rado la seconda – fatti sfruttati, rispettivamente, per indagare parentele a breve e a lunga distanza temporale. Le mutazioni a carico degli RNA mitocondriali sono rare e sostanzialmente patologiche, poiché la sequenza corrisponde alla funzione. Oltre al DNA barcoding (COXI) per finalità filogenetiche, i confronti di sequenza del mtDNA sono usati in medicina legale e contro le frodi commerciali, specialmente nel mercato ittico.

I tRNA mitocondriali rispondono ad un codice genetico differente da quello nucleare e presentano fenomeni di oscillazione della terza base – sono 22, di cui 8 riconoscono classi di 4 codon differenti solo per la terza base ($8 \times 4 = 32$) e 14 riconoscono coppie di codon identiche per le prime due basi e che hanno una purina o una pirimidina per terza ($14 \times 2 = 28$). I 4 codon rimanenti sono di STOP.

Il tasso di mutazione del mtDNA è più alto di quello del DNA nucleare. Il mtDNA è impacchettato dalle proteine nucleoidali, che si suppone fungano da protezione; la presenza di varie copie del genoma dell'organello permette un sorprendente meccanismo di salvaguardia che nel nucleo non può realizzarsi: molecole di mtDNA

mutate vengono degradate e di nuove ne vengono sintetizzate usando come template le molecole non danneggiate. A causa della prossimità alla catena di trasporto elettronica, alcuni sostengono che il mtDNA sia più sottoposto al danno da stress ossidativo da ROS, ma sono stati riportati meccanismi di repair addirittura più efficienti di quelli nucleari per alcune tipologie di danno ossidativo. Il mtDNA può forse ricombinare con copie di se stesso entro lo stesso mitocondrio.

L'eredità mitocondriale segue pattern del tutto diversi da quelli mendeliani del triangolo di Tartaglia. Le copie di mtDNA per cellula sono in numero variabile e in genere elevato; nonostante la teorica omoplasma, talvolta possono insorgere mutazioni patogene durante le replicazioni mitocondriali ovulari o nei primi stadi dello sviluppo. Il pericolo sta nel fatto che ogni mutazione che conferisce ad una molecola di mtDNA un vantaggio replicativo risulterà nella selezione del genotipo mutante al di là del suo effetto sulla funzione mitocondriale. Alcuni studi mostrano che mtDNA con parziali delezioni competono per il macchinario replicativo con le controparti wildtype; replicandosi più in fretta perché più brevi, esse possono seguire più round replicativi ed espandersi numericamente. Parziali duplicazioni possono includere origini di replicazione addizionali, garantendo alle relative molecole di mtDNA un certo vantaggio replicativo. Malattie mitocondriali sono favorite da una mitofagia alterata, per cui differenti versioni mutanti di mitocondri possono prosperare.

La segregazione delle molecole di mtDNA alla fissione e alla mitosi tende a seguire un pattern di deriva genetica stocastica – così, non si riesce a prevedere quali citotipi riceveranno eventuali copie mutate durante lo sviluppo. Si parla di “recessività” per la maggior parte delle mutazioni mitocondriali poiché il fenotipo patologico, che si manifesta spesso nei primi anni di vita, si ha se il mtDNA mutante nel tessuto interessato va dal 60% al 90% del totale. Di recente è stata invece segnalata una mutazione “dominante”, che si manifesta già quando il mtDNA mutante è pari al 25% del totale – l'anticodon mutato (AUU anziché ACU) può leggere il codon stop UAA, ma anche quelli per la tirosina, UAC/UAU, in quanto l'appaiamento con la terza base non risulta critico nel contesto della traduzione mitocondriale. Perciò, il tRNA mutato caricato con Trp può

inserire questo aminoacido al posto della Tyr per errata lettura del codice. In generale, le delezioni causano il fenotipo patogeno a minori percentuali di molecole mutate rispetto alle mutazioni SNP.

Malattie mitocondriali riguardano lo 0,02% della popolazione mondiale e riducono la capacità cellulare di sintetizzare ATP, andando a colpire specialmente i tessuti più suscettibili perché molto attivi metabolicamente (nervoso, muscolare, β -pancreatiche). Encefalomiopatie mitocondriali (anche da deplezione di mtDNA, come nel caso di Charlie Gard), LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy, cecità bilaterale dall'inizio dell'età adulta poiché affligge il nervoso e specialmente i nervi ottici, causata da una mutazione puntiforme nel gene ND4 che specifica per una subunità del CI, che non funziona – l'ATP viene prodotto solo iniziando dalla succinato deidrogenasi, oppure causata da una mutazione puntiforme nel gene per il citocromo b, a dimostrazione del fatto che fenotipi mitocondriali patologici possono avere diversa eziologia), MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fiber syndrome, con movimenti muscolari incontrollabili a scatti, causata da una mutazione del tRNA per Lys – i mitocondri delle fibrocellule scheletriche hanno morfologia anomala e contengono strutture paracristalline), una forma rara di diabete (difetti mitocondriali impediscono il raggiungimento di una quota di ATP soglia per l'attivazione dei canali del potassio, a cui segue la depolarizzazione da cui dipende l'ingresso di calcio e quindi il release dell'insulina – a partire da un difetto genetico si accumulano ROS, che danneggiano il mtDNA). Con l'invecchiamento, i mitocondri accumulano mutazioni e perdono funzionalità; il danno da ROS sembra implicato anche in malattie come Alzheimer e Parkinson. Dati sperimentali suggeriscono che bassi livelli di mutazioni mitocondriali ereditate dalla madre agiscono sinergicamente con le mutazioni mitocondriali nelle linee somatiche, contribuendo all'invecchiamento.

Modelli di replicazione del mtDNA. Studio dei RIs, RITOLS e relativi RNAs.

Un primo modello storico di replicazione per il mtDNA prevede l'allungamento orario del DNA7S dell'ansa D, per la sintesi di un nuovo filamento H su stampo del filamento L; la sintesi del nuovo filamento H spiazzerebbe perciò il

filamento H parentale, stabilizzato da single strand binding proteins. La sintesi del nuovo filamento L su stampo di H procederebbe dall'origine di replicazione del filamento L, posizionata a circa 11kbp, in verso antiorario, una volta che essa è stata scoperta dalla sintesi del nuovo filamento H, risultando perciò nel ritardo del secondo evento replicativo. Si parla di Strand Displacement Model. Il meccanismo prevede la formazione di intermedi a singolo filamento.

I dati sperimentali sembrano sostenere il recente modello RITOLS (Ribonucleotide Incorporation Throughout the Lagging Strand). Questo meccanismo non prevede intermedi a singolo filamento – la sintesi del leading strand da OR (OH o Ori-b) progredirebbe con la contestuale incorporazione di RNA sul lagging strand, fino ad un certo punto, spesso a livello della OL, da cui l'RNA annilato al lagging strand sarebbe rimpiazzato o convertito in DNA.

L'analisi dei Replicative Intermediates (RIs) a partire da 2D-AGE supporta il modello RITOLS. Il DNA viene estratto da un campione di mitocondri casuale – il pool di molecole comprende istantanee di diverse fasi di replicazione – e trattato con enzimi di restrizione mirati, per linearizzare la molecola. Un primo gel d'agarosio è delicato, a maglie larghe; si utilizza un voltaggio ridotto di 0,7-1 V/cm per 15-30 ore: la distanza percorsa è proporzionale al logaritmo della massa. Il secondo gel, ortogonale al primo, è più concentrato e il voltaggio viene alzato a 5V/cm: le molecole di mtDNA migrano diversamente a seconda della forma. In seguito, esse sono marcate con bromuro d'etidio per la rilevazione. Gli enzimi di restrizione che tagliano molecole di mtDNA in replicazione possono rendere forcelle di replicazione, o archi Y, se riescono a tagliare i due filamenti, oppure bolle di duplicazione se non riescono a tagliarne alcuno. La somministrazione di enzimi di restrizione, che non possono tagliare filamenti di DNA monocatenario, agli archi Y rende filamenti singoli non tagliati, in apparente accordo con il modello SDM, ma in base alle masse, è evidente che gli archi a lenta mobilità sono interamente duplex. L'osservazione è confermata somministrando enzimi di restrizione capaci di clivare sia filamenti di DNA singoli sia doppi: gli archi Y a lenta mobilità (SMY) non scompaiono. Il trattamento precoce con proteasi fa escludere che la lenta mobilità sia dovuta ad interazioni del DNA con proteine. L'RNasi H

degrada selettivamente gli RNA appaiati a DNA, rendendosi lo strumento ideale per la verifica che gli SMY contengono eteroduplex DNA/RNA. Il trattamento con RNasi H modifica sia gli SMY che le bolle replicative, che dunque contengono RNA ibridato a DNA; il successivo trattamento con nucleasi S1, che digerisce DNA monocatenario, elimina del tutto queste porzioni.

Non è noto il meccanismo di sintesi dell'RNA sul lagging strand – forse vi è una primasi esuberante, oppure trascritti preformati vengono posizionati sul mtDNA (bootlace model). L'RNA sembra proteggere il lagging strand. Nei plasmidi batterici, ad esempio, l'esposizione di DNA a singolo filamento incrementa la frequenza di formazione di delezioni. I dati attuali supportano una copertura di oltre l'80% del lagging strand con RNA. I vantaggi di tale molecola rispetto a proteine includono l'informazione contenuta nell'RNA, che può essere usata come template per riparare eventuali danni al lagging strand durante la replicazione. L'utilizzo di RNA preformati potrebbe dispensare dalla necessità di sintesi con frammenti di Okazaki. Inoltre, la modalità replicativa RITOLS potrebbe essersi evoluta per evitare la collisione dei macchinari replicativi e trascrittori, inibendo la trascrizione su molecole in replicazione. La lentezza di questo meccanismo e la necessità di copertura con trascritti preformati spiegano invece perché esso non sia stato adottato altrove oltre al mitocondrio.

Poco è noto circa la terminazione della replicazione del mtDNA, eccetto la sua localizzazione nei pressi della OH, che fa supporre che la vera origine di replicazione del leading strand sia Ori-b e che da essa un evento replicativo ulteriore, basato su frammenti di Okazaki, abbia luogo verso OH. Sembra che tre proteine della famiglia di mTERF contribuiscano alla terminazione della duplicazione.

Sembra che ulteriori meccanismi replicativi interessino il mtDNA, come alternative, fra cui una forma associata a ricombinazione e una di replicazione bidirezionale convenzionale che può avere inizio su una vasta regione del genoma dell'organello, detta Ori-z. Anche meccanismi comprendenti la sintesi di frammenti di Okazaki sembrano essere presenti. I mitocondri dei Tripanosomi recano quattro DNA polimerasi diverse e l'importanza del mtDNA accredita l'idea per la quale si sono evolute modalità replicative differenti.

In vitro, la sintesi di 16 kbp è possibile utilizzando solamente DNA polimerasi γ , elicasi Twinkle, mtSSB e TFAM; da capire quali enzimi siano strettamente necessari in vivo. Enzimi nucleari per il repair e tutto l'apparato per i frammenti di Okazaki sono presenti nei mitocondri. È evidente che mutazioni nucleari possono determinare deficit nel mantenimento del genoma mitocondriale.

Generazione di ampie delezioni nel mtDNA in cellule umane.

Si ritiene che le ampie delezioni osservate in mitocondri patologici possano derivare da difetti nella replicazione oppure nel repair. DSBs possono formarsi durante pause della duplicazione del mtDNA o in conseguenza a fattori esogeni (eg radiazioni ionizzanti); le modalità di repair sono poco caratterizzate e alcuni studiosi sostengono che pathway di NHEJ siano presenti nei mitocondri. Ad ogni modo, sicuramente più caratterizzata e sostenuta è la formazione di delezioni in conseguenza a scorretto appaiamento per scivolamento nel corso della replicazione asincrona del mtDNA. Infatti, la sintesi del nuovo filamento H su templatato di L scopre il filamento H parentale, all'interno del quale possono formarsi appaiamenti intra-strand grazie alla curvatura del mtDNA, che formano anse che vengono distaccate e degradate; dopodiché, le estremità rimaste vengono ligate, risultando nella formazione di una molecola di DNA con delezione. A conferma del modello enunciato, una buona parte delle delezioni avviene nell'arco maggiore, tra le due origini di replicazione. Sono state trovate regioni ricche in AT, omopirimidiniche e/o omopuriniche e sequenze palindromiche nell'intorno dei punti tipici di delezione, e modelli sul DNA nucleare sostengono la possibile curvatura.

Trascrizione degli mt-RNA.

Il mtDNA viene trascritto in due policistroni, uno antiorario dalla Heavy Strand, a partire dall'Heavy Strand Promoter (HSP) e contenente le sequenze per 12 ORF e i due RNA ribosomali, inframezzate da 14 tRNA con funzione di punteggiatura sterica (ripiegandosi per self-assembly, forniscono indicazioni per il cleavage del policistrone), e uno orario dalla Light Strand, a partire dal Light Strand Promoter (LSP), contenente le sequenze per un ORF e 8 tRNA.

HSP è spesso detto HSP1, in contrasto con un presunto promotore HSP2, dal quale tuttavia non si rileva trascrizione in vitro. Inoltre, contrariamente a HSP1 e LSP, HSP2 è inibito da TFAM e inizia con una pirimidina, mentre i sistemi di trascrizione noti cominciano da purine e non produrrebbe tRNA^{Phe}. Anche la sequenza consenso di HSP2 è divergente rispetto a quelle fra loro somiglianti di HSP1 e LSP.

Il fattore mitocondriale di trascrizione A, TFAM, lega con due domini High Mobility Group il mtDNA. Questi due domini sono inframezzati da un'elica a cerniera, che ripiega flessibilmente il filamento di mtDNA in un'ansa a 180 gradi. Sequenze ad elevata affinità per TFAM si trovano a monte di HSP e LSP; il fattore di trascrizione interagisce mediante un dominio attivatore al C-terminale con TFB2M, secondo fattore di trascrizione mitocondriale, e la mtRNA^{pol}, che sono situati fra -10 e +10 dall'inizio della trascrizione. La polimerasi è piuttosto semplice, costituita da una sola subunità, e forse imparentata con quella del batteriofago T7 e con le polA, famiglia il cui principale rappresentante è la DNA polimerasi I di Escherichia coli. Questo enzima ha forma di una mano, lega magnesio al sito attivo (palmo) e abbraccia l'eteroduplex RNA/DNA decretando una curvatura di 90° nella molecola di DNA. Studi mostrano che per il proseguimento della trascrizione fino ai segnali di terminazione è essenziale il fattore di allungamento, TEFM, che si associa alla polimerasi quando questa lascia il complesso d'inizio trascrizione. mTERF1 media la terminazione della trascrizione, distorcendo la doppia elica ed estroflettendo tre basi grazie a specifiche interazioni con suoi residui. Forse agisce solo sul filamento L, impedendo la sintesi di rRNA antisenso.

È stata pubblicata la struttura cristallina della RNA polimerasi mitocondriale umana (mtRNAP) a 2.65Å – la struttura rivela un ibrido a nove coppie di basi tra stampo di DNA e trascritto di RNA, in forma A, preceduto e seguito da un giro di elica in forma B di duplex di DNA. Confronti con la RNAP affine alla lontana da batteriofago T7 indicano meccanismi conservati per il legame del substrato e l'incorporazione catalitica dei nucleotidi nell'RNA in crescita. La separazione tra filamenti nel DNA a valle è effettuata dal dominio “dita” e somiglia almeno in parte alla separazione tra filamenti nella RNAP da T7. Nell'insieme, il CTD (dominio catalitico al C-terminale)

polimerasico, che adotta il ripiegamento canonico a mano destra tipico delle polA, e i meccanismi basati su questo dominio si sono ampiamente conservati nell'evoluzione delle RNAP a subunità singola. Il dominio N-terminale (NTD) assomiglia a quello di legame al promotore della polimerasi di T7. Invece, la transizione da inizio ad allungamento è assai differente rispetto a T7: in particolare, nella mtRNAP il NTD non si riavvolge in questa fase di transizione. Si suppone che nell'evoluzione di mtRNAP da una RNAP primitiva tipo batteriofago il CTD catalitico e il meccanismo di allungamento siano rimasti assai conservati, mentre il NTD abbia perso la capacità di adottare una conformazione specifica per l'inizio, essendo entrati in gioco fattori d'inizio a rilevare tali funzioni. mtRNAP lascia il promotore dissociandosi dai fattori d'inizio, mentre l'uscita dal promotore della RNAP di T7 comporta il riavvolgimento del NTD. La posizione e la collocazione relativa nel sito attivo dei residui aminoacidici che legano gli ioni metallici catalitici e il substrato NTP sono conservati nei due enzimi. La traiettoria di alcune catene laterali è differente, ma ciò è probabilmente dovuto all'assenza degli ioni metallici e del NTP nella struttura cristallizzata. L'ibrido DNA-RNA forma molti contatti con la polimerasi. Per saggiare il ruolo funzionale del dominio del pollice, sono stati fatti saggi di trascrizione in vitro. La delezione dei residui 734–773 del pollice nella mtRNAP umana non provocava alcun difetto significativo di processività, ma si è osservata una stabilità notevolmente diminuita del complesso di allungamento in saggi di estensione dell'innesco dipendenti dalla forza ionica. Arrestando un complesso di allungamento formato dal mutante con l'ablazione del pollice e sottraendo il substrato CTP, la polimerasi non era in grado di riprendere l'allungamento e si dissociava in saggi di trascrizione run-off, a indicazione di un ruolo chiave delle interazioni pollice-ibrido nel mantenere la stabilità del complesso durante l'allungamento. Mentre la polimerasi avanza, i filamenti del DNA a valle devono separarsi davanti al sito attivo. La struttura mostra che la separazione dei filamenti del DNA coinvolge il dominio "dita". Sull'estremità a monte dell'ibrido, l'RNA è separato dallo stampo di DNA dalla forcina intercalante. L'RNA esce su una superficie a cariche positive, ma ha una densità elettronica debole che indica un'alta mobilità.

Processamento, stabilità e poliadenilazione.

Aminoaciltransferasi.

Epitrascrittoma mitocondriale.

I policistroni trascritti sono clivati. I tRNA punteggiati vengono tagliati al 5' da RNasi P, con le tre subunità 1, 2 e 3 e al 3' dalla RNasi Z, anche detta nucleasi ELAC. I trascritti, eccetto ND6, vengono dotati di poliA di 45–50 A dalla mtPAP (la cui mutazione determina patologie, eg atrofia ottica). Il ruolo della poliA nella stabilizzazione dei messaggeri è ancora da elucidare. Gli rRNA sono modificati, ad esempio metilati, e assemblati nei ribosomi mitocondriali. Ai tRNA vengono aggiunte code 3'-CCA mediante TRNT1 ed essi sono modificati e poi aminocilati. Il CCA funge anche da antideterminante per la RNasi Z. Alcuni tRNA assumono forme non canoniche; loro mutazioni sono gravi. Vengono completati gli STOP codon negli mt-mRNA terminanti al 3' in U o UA, a UAA. Molti eventi, inclusi vaglio della qualità e degradazione degli RNA, sono ancora da chiarire. Una prima fase di processamento dei trascritti sembra aver luogo cotrascrizionalmente in speckles detti granuli di RNA mitocondriali – ad esempio, la RNasi P ivi localizza. Questi MRGs, in studi di microscopia, appaiono in stretta prossimità spaziale rispetto ai nucleoidi. Approcci sistematici per la caratterizzazione del proteoma dei granuli hanno portato all'identificazione di ulteriori proteine coinvolte nel metabolismo posttrascrizionale degli mt-RNA. I granuli sono luogo di concentrazione e concertazione della cinetica di elaborazione dei trascritti; la localizzazione nei MRGs di fattori di assemblaggio e componenti mitoribosomali fa supporre che i granuli siano anche coinvolti nella regolazione della traduzione.

La percentuale di nucleotidi modificati negli mt-RNA non-coding è di circa lo 0,3%, ridotta rispetto all'1% medio delle controparti batteriche e citoplasmatiche. La tendenza evolutiva si specula sia volta alla riduzione dei fattori nucleari da importare, e le modifiche comunque presenti sono perciò ritenute fondamentali per i meccanismi di funzionamento. Esempificativo del ruolo di primo piano di semplici modifiche come la metilazione è il ripiegamento del tRNA^{Lys} – sondato con una FRET, quando non metilato esso assume una forma estesa non fisiologica per appaiamento Watson-Crick tra A9 e U64, che non può

verificarsi nella forma metilata per impedimento sterico: essa assume la forma a trifoglio.

Per i due mRNA bicistronici con spostamento di frame, è possibile che essi siano tradotti a seguito di un singolo evento interattivo tra mRNA e ribosoma, traducendo la 5' ORF, riposizionando e traducendo la 3' ORF, oppure che gli eventi interattivi siano diversi. In questo caso, dev'essere presente qualcosa che nella traduzione della 3' ORF rilevi le basi precedenti come 5'-UTR e quelle successive la 5' ORF come 3'-UTR.

La Leucine-Rich PPR-Containing protein controlla la stabilità degli mRNA e sembra stabilizzare un pool di trascritti non traduzionalmente attivi, tanto che in caso di suo ko nei mammiferi la traduzione diventa caotica. La proteina sopprime anche la degradazione degli RNA, bloccando l'azione della PolyNucleotide Phosphorylase e stimolando mtPAP.

Nei mitocondri si trovano 19 amminoacil-tRNA sintetasi a codifica nucleare – l'aminoacilazione del tRNA per la glutammina segue un pathway indiretto: viene legato acido glutammico, poi convertito da un'ammidotransferasi mitocondriale.

Si postula che la degradazione degli mt-RNA, ultimo stadio del loro metabolismo, abbia luogo in foci specializzati, detti D-foci, che contengono le componenti del degradosoma mitocondriale, come l'RNA elicasi Suv3 e la PNPasi (esoribonucleasi polinucleotide fosforilasi 3'→5'). Una porzione dei D-foci colocalizza con mRNA neosintetizzati, forse sovrapponendosi ai granuli – potrebbe contenere mt-RNA che richiedono parziale degradazione come evento maturativo oppure organizzare eventi di turnover per gli RNA di nuova sintesi che sono misprocessati.

Mitoribosoma e sua biogenesi.

I ribosomi mitocondriali, anche detti mitoribosomi, presentano differenze sostanziali fra cladi, ma condividono comunque alcuni attributi di base comuni. Strutture complesse dei mitoribosomi includono proteine probabilmente reclutate dall'ambiente circostante, che hanno in seguito perso la loro funzione originale – la pressione evolutiva che ha mantenuto queste aggiunte proteiche fa pensare che esse abbiano sviluppato funzioni utili.

I mitoribosomi hanno un coefficiente di sedimentazione di 55S e sono costituiti da una Large SubUnit (LSU) con RNA da 16S e una Small SubUnit (SSU) con RNA da 12S. Il piccolo RNA batterico 5S della LSU è sostituito nell'uomo dal tRNA^{Val}, nei suini dal tRNA^{Phe} – l'incorporazione di questi tRNA nei mitoribosomi sembra dettata dalla localizzazione genomica, in entrambe le specie, dato che fiancheggiano la sequenza per la LSU, con la quale sono cotrascritti, fatto che garantisce anche adeguate relazioni stechiometriche. In condizioni di scarsa disponibilità di tRNA^{Val}, il mitoribosoma umano è in grado di switchare verso l'incorporazione di tRNA^{Phe} al suo posto, e i ribosomi che ne derivano sono pienamente attivi.

Rispetto ai ribosomi batterici, quelli mitocondriali hanno una quantità di RNA quasi dimezzata, mentre il numero di proteine eccede di quasi il 50%. Queste proteine sono a codifica nucleare e contengono un segnale di localizzazione all'N-terminale. Strutture EM mostrano che l'mt-rRNA è quasi completamente coperto da proteine, mentre nei ribosomi batterici e citosolici le proteine si rinvergono solo in tasche di rRNA. Inoltre, le proteine del mitoribosoma sono distanziate e molecole del solvente entrano nella struttura, diversamente dagli altri ribosomi. Le connessioni fra subunità avvengono soprattutto grazie a legami fra proteine, mentre negli altri ribosomi principalmente per legami fra rRNA.

La biogenesi del mitoribosoma vede un primo evento di assembly delle proteine con l'rRNA durante la trascrizione dello stesso. rRNA metiltransferasi sono state rinvenute negli speckles contenenti mt-RNA neotrascritti, facendo sospettare una prima fase di modifica cotrascrizionale. Ad ogni modo, sicuramente alcune modifiche sono effettuate su intermedi RNA/proteina solo successivamente. Queste includono pseudouridinilazioni (modifica dell'uridina tramite enzimi PUS nell'isomero del nucleoside, unica modifica che non influenza la massa finora identificata per gli RNA). Le presunte pseudouridina sintasi localizzano a livello dei granuli di RNA; in esperimenti, il ko di ciascuna di queste determina un calo di rRNA 16S e perturba la traduzione mitocondriale.

La SSU reca i tipici siti E, P, A e forma il complesso d'inizio, che si unisce in seguito alla LSU. Porta la GTPasi mS29, intrinseca, che interviene nelle tappe in cui è richiesta l'idrolisi di GTP.

La LSU appare costantemente legata alla superficie interna della MIM, tramite la proteina mL45 nella specie umana e l'insertasi che rilascia il polipeptide neosintetizzato nello spessore della MIM. Durante la sintesi di un polipeptide, esso inizia a ripiegarsi mentre attraversa il tunnel; ribosomi citoplasmatici devono accomodare le richieste di polipeptidi assai diversificati, mentre il numero ridotto di quelli a codifica mitocondriale ha permesso la specializzazione del tunnel del mitoribosoma – residui proteici idrofobici del ribosoma simulano l'ambiente nativo della proteina di membrana, agevolando il folding e favorendo le interazioni con i macchinari proteici d'inserzione. Maggiori dettagli stanno venendo ricavati da uno studio di crio-EM di questa estate, che ha risolto il complesso d'inizio mitoribosomale a 3,2 Å. Si è notato che all'inizio della traduzione, il tunnel è bloccato da un'inserzione della porzione N-terminale della proteina mL45, che viene esposta quando il ribosoma cambia conformazione per passare alla modalità di elongazione. Questa proteina potrebbe anche avere un ruolo nel targettare i mitoribosomi ai condotti proteici dei pori della MIM.

Studi di tomografia elettronica mostrano che i mitoribosomi possono organizzarsi in cluster di livello superiore, topologicamente simili ai polisomi, che come questi adottano un'architettura curva che mette le SSU in stretta prossimità. Questo fatto riduce anche la porzione di mRNA esposta al solvente, proteggendo l'mRNA da danni e degradazione da ossidazione. La composizione lipidica del bilayer membranoso sembra avere un'influenza sulla proteinsintesi mitocondriale; i mitoribosomi sono legati preferenzialmente ai domini cristallini, ragionevolmente per facilitare l'inserimento delle proteine durante la traduzione.

Inizio della traduzione. Diversificazione dei macchinari d'inizio negli eucarioti.

I ribosomi ripetono ciclicamente un semplice algoritmo: singolarità (inizio), iterazione (allungamento), singolarità (terminazione). Il ciclo di funzionamento dei mitoribosomi somiglia a quello dei ribosomi batterici; anche l'operazione di formilazione dell'L-metionil-tRNAMet avviene nei mitocondri, mentre non ha luogo nel citoplasma degli eucarioti. La formilazione utilizza come substrato il 10-formiltetraidrofolato, è catalizzata dall'ortologo mitocondriale

dell'enzima batterico metionil-tRNA transformilasi (MTF). I mitocondri usano un solo tRNA per Met e fMet: il fattore di allungamento EF-Tu compete con MTF per il Met-tRNAMet; EF-Tu in vitro non ha affinità misurabile per la versione formilata e sottrae quella non formilata; il fattore d'inizio IF2mt lega invece la formilata, fatto che accelera la cinetica traduzionale, per la quale l'inizio è RDS.

La formazione del complesso d'inizio coinvolge mt-mRNA, SSU e fattori d'inizio – si ritrovano IF2mt e 3mt, ortologi di batterici, mentre manca un corrispondente di IF1, il cui ruolo risulta ricoperto da un'ansa aggiuntiva di IF2mt che va ad occupare il sito A. In mancanza di contesti di sequenza al 5'-UTR che si appaiano all'rRNA, come la sequenza batterica di Shine-Dalgarno, si è visto che i mitoribosomi prediligono il codon AUG, AUA o AUU più prossimo al 5', probabilmente perché non coinvolto nella struttura secondaria; i lieviti posseggono un vero e proprio calibro molecolare (discrimination centre, valuta il rapporto codon-anticodon). La modalità proposta non spiega tuttavia l'inizio della traduzione di mRNA bicistronici con sovrapposizione di frame, quali quelli di ATP8/ATP6 e ND4L/ND4. La proteina mS39 presenta ripetizioni pentatricopeptidiche (eliche alfa linkate e antiparallele che interagiscono con acidi nucleici), le quali sembrano guidare il 5' dell'mt-mRNA. IF3mt promuove la dissociazione tra subunità e ne impedisce la riassociazione; IF2mt legato a fMet-tRNAMet colloca il tRNA sul sito P, scinde il GTP, spiazza IF3mt e la SSU si unisce alla LSU, completando il monosoma. Forse anche MALSU1, come l'ortologo batterico, previene l'associazione prematura delle subunità ribosomali e dev'essere allontanata prima della ricongiunzione delle due. La proteina intrinseca mS29 scinde un altro GTP, spesa che veicola l'informazione che il complesso si è formato adeguatamente. mS29 viene cristallizzata legata a GDP e in vivo è fosforilata su siti adiacenti; forse anche ciò contribuisce all'unione tra subunità. Sembra che la fedeltà dell'inizio della traduzione sia principalmente garantita da attivatori traduzionali specifici. Meccanismi specie-tipici decretano le modalità d'inizio.

IF2mt ha sei domini, di cui IV è una GTPasi e VI interagisce con il tRNA d'inizio. Esperimenti di complementazione su ceppi di E. coli mancanti dei geni per IF1 e IF2 con plasmidi recanti il gene per

IF2mt di bovino mostrano recupero di funzione. Analisi strutturali mostrano che l'ansa aggiuntiva di IF2mt lega proprio la tasca ribosomale nei batteri occupata da IF1.

Le caratteristiche di IF3mt rispecchiano abbastanza quelle dell'ortologo batterico. Esso è coinvolto nella destabilizzazione dei complessi tRNA/mRNA aberranti. Esperimenti di delezione hanno mostrato che buona parte dell'affinità di IF3mt per il ribosoma risiede nel C-terminale: fattori troncati all'N-terminale sono ancora funzionalmente attivi. L'ortologo di *Saccharomyces cerevisiae* ha sequenza altamente divergente rispetto a IF3mt; il suo ruolo di ortologo è stato validato con saggi di recupero di funzione usando IF3mt di *Schizosaccharomyces pombe*.

La divergenza nell'inizio della traduzione mitocondriale rispetto a quella nei batteri potrebbe essere il risultato di una deriva neutrale alimentata dall'alto tasso di mutazione mitocondriale – la deriva può portare ad un incremento della complessità attraverso la fissazione di mutazioni poco deleterie, andando a creare una dipendenza da nuove componenti in un network di macromolecole, tanto che il sistema traduzionale mitocondriale poggia su numerose parti non presenti nei batteri, la cui mutazione può debilitare gravemente l'organello. La complessità totale è aumentata, ma alcuni aspetti sono stati semplificati, come IF1 perso.

Allungamento. Inserimento cotraduzionale di proteine nella MIM.

L'allungamento segue lo schema batterico. L'Elongation Factor EF-Tumt (Thermally unstable) reca un amminoacil-tRNA e lo conduce sul sito A della SSU e idrolizza un GTP se l'appaiamento è corretto; EF-Tsmt (Thermally stable) rigenera la forma legata a GTP di EF-Tumt; nei mammiferi i due EF formano eterodimeri stabili quando EF-Tu non è legato ad un amminoacil-tRNA. In seguito, EF-G1mt catalizza lo scorrimento coordinato di mRNA e tRNA. Le KD per le interazioni tra EF-Tumt e i suoi ligandi sono parecchio diverse rispetto a quelle delle controparti batteriche.

I mt-tRNA sono tenuti dalla LSU solo per il braccio accettore, dunque i contatti sono ridotti – ciò riflette l'esigenza di versatilità di fronte all'alta

variabilità delle regioni gomito dei differenti mt-tRNA.

La prima proteina identificata come connessione tra mitoribosoma e MIM, collocata all'uscita del tunnel ribosomale, è Oxa1, che sembra facilitare l'inserimento in membrana dei polipeptidi nascenti, anche se studi genetici mostrano che essa non è essenziale. Il corrispettivo batterico favorisce l'oligomerizzazione e l'inserimento in membrana di piccoli polipeptidi idrofobici. L'inserimento inizia già durante la traduzione.

Terminazione, rilascio del polipeptide e riciclo del ribosoma. Effetti pleiotropici di una traduzione alterata.

Quando nel sito A viene a trovarsi un codon UAA o UAG, il fattore di rilascio RF1mt si lega e termina la traduzione. Nei mitocondri dei Metazoi in genere non si trovano omologhi di RF2 batterico. Il riciclo standard dei mitoribosomi prevede il legame con il fattore di riciclo del ribosoma, coadiuvato da un paralogo di EF-G specializzato, EF-G2mt. Le subunità vengono svincolate.

Solo 11 delle 13 ORF degli mRNA mitocondriali però terminano in UAA nei mitocondri umani: due ORF terminano con AGA e AGG, prive di tRNA corrispondenti e non lette da fattori di rilascio. Si pensava ad uno slittamento indietro di una posizione della cornice di lettura, ma non tutte le ORF così terminanti dei Vertebrati vedono una U a precederle. Si pensa che terminazione e rilascio siano affidati ad una peptidil-tRNA idrolasi indipendente da codon, sistema mutuato da quello batterico che recupera i ribosomi in stalling su codon indecifrabili. Nei batteri, ArfB lega il sito A e scaccia il polipeptide dal tRNA – un'elica con cariche positive entra nel canale d'uscita per mRNA a valle del sito A, e può solo se l'mRNA è tronco, dando un segnale che attiva la sopra citata idrolisi. Nei mitoribosomi di mammifero si trova ICT1 (Immature colon Carcinoma Transcript), strutturalmente affine ad ArfB, che però è legata e non può raggiungere il sito. Si suppone che essa sia presente anche in soluzione e la forma legata equilibri il pool, impedendo terminazioni precoci indesiderate. Molto resta da capire, anche perché i due trascritti in questione hanno 3'-UTR: non sono tronchi e andrebbero prima modificati.

La pleiotropia fenotipica causata da mutazioni puntiformi patogene nel mtDNA per tRNA è in gran parte incompresa; si specula che la distribuzione tissutale di mtDNA mutante ed il contesto genico nucleare siano determinanti.

Attivatori traduzionali. Cox1 e citocromo b: esempi di regolazione traduzionale.

Gli attivatori traduzionali sono proteine a codifica nucleare, che orchestrano la traduzione mitocondriale in maniera specifica per ciascun mRNA, evolutisi specificamente, essendo gli RNA in numero ridotto. Gli attivatori sono coinvolti nell'inizio della traduzione, come suggerito dalle loro interazioni geniche e dalla copurificazione con i mitoribosomi, ma hanno un ruolo anche nel legame dei mitoribosomi in traduzione alla membrana e nell'organizzazione dell'assembly delle proteine neosintetizzate in complessi. Spesso, gli attivatori traduzionali costituiscono circuiti a feedback negativo: l'attivatore promuove la traduzione e al suo termine resta intrappolato nella proteina, fatto che inibisce l'ulteriore traduzione del messaggero per quella proteina; l'attivatore viene rilasciato a seguito dell'incorporazione della proteina nel relativo complesso macromolecolare. Questo assicura una corretta stechiometria nella produzione delle proteine mitocondriali e permette di diminuire la sintesi di una subunità quando il suo montaggio fallisce. Gli attivatori sono dunque fattori limitanti per la sintesi dei relativi messaggeri, stabilendo un link regolatorio dal nucleo verso la sintesi proteica mitocondriale. L'aumento della concentrazione di attivatori traduzionali avviene durante la transizione delle cellule da un metabolismo anaerobio ad uno aerobio.

Gli attivatori traduzionali sono altresì implicati nella definizione di microambienti ottimali per la biogenesi di singoli prodotti di traduzione, come dimostrato da esperimenti in cui i trascritti mitocondriali sono stati modificati con 5'-UTR eterologhe, così da reclutare differenti attivatori traduzionali. Infatti, anche se la proteinsintesi non è affetta, l'assembly in complessi di OXPHOS ne risente profondamente – l'assemblaggio al di fuori del microambiente adeguato risulta anche in fenomeni di accumulo e l'efficienza dell'inserimento in complessi è ridotta.

Analisi proteomiche e con STED mostrano che il mitoribosoma interagisce con grandi assemblaggi, contenenti fattori del metabolismo posttrascrizionale degli RNA. Si parla di complessi MIOREX, all'interno dei quali si verifica l'iter che va dall'espressione genica al feedback posttraduzionale, stabilendo una potenziale via d'interconnessione.

Buona parte degli studi sugli attivatori traduzionali sono stati condotti su *S. cerevisiae*, i cui mt-mRNA posseggono 5'-UTR riconoscibili specificamente dai relativi attivatori. Nei mammiferi, tuttavia, i messaggeri mancano in genere di 5'-UTR; è noto solamente l'attivatore TACO1, ma la sua modalità d'azione resta da spiegare. Nei Tripanosomi è stato notato che, pur in mancanza di sequenze UTR nel genoma, gli mRNA sono processati con l'aggiunta di estensioni al 3', che regolano l'efficienza della traduzione.

La sintesi di Cox1 in *S. cerevisiae* necessita di Mam33, Pet309, Mss51. Cox1 neosintetizzata interagisce con Mss51 e fattori di montaggio; Coa1 si lega a questo intermedio, che intrappola Mss51. Quest'ultima è rilasciata in seguito a causa di un segnale ignoto e può stimolare nuovi cicli di sintesi di Cox1, ma se il montaggio è bloccato rimane intrappolata, quindi non vi è sintesi di ulteriore Cox1, poiché ciò costituirebbe un inutile dispendio energetico. Inoltre, Mss51 è attiva solo se è presente sufficiente eme b, che si lega ad essa; la sintesi del cofattore è quindi anch'essa un fattore limitante l'espressione di Cox1, costituendo un punto di regolazione. È difficile stabilire se i meccanismi nei mammiferi siano comparabili – gli attivatori traduzionali del lievito non sono conservati.

La regolazione traduzionale del citocromo b in *S. cerevisiae* prevede un circuito retroattivo. La sintesi del citocromo b prevede il legame di Cbs1, Cbs2, Cbp1, Cbp3-Cbp6 al mitoribosoma (solo dell'ultima è nota l'interazione); completata la traduzione, il polipeptide inserito in membrana resta legato con Cbp3-Cbp6; l'aggiunta del primo eme b e l'interazione di Cytb con il fattore di montaggio Cbp4 danno vita all'Intermedio I. Cbp3-Cbp6 si distacca con l'aggiunta del secondo eme b, in modo che Cytb interagisca con le prime subunità a codifica nucleare del complesso bc1 – Qcr7 e 8, costituendo l'Intermedio II. Esso si accumula in buona dose allo stato stazionario, garantendo una riserva efficace di Cytb. Cbp3-

Cbp6 liberato può attivare nuovi cicli di sintesi; se il montaggio è bloccato, o manca eme b, la proteina risulta sequestrata e non può attivare nuove sintesi. Essendo i fattori di montaggio a codifica nucleare, l'espressione genica nel nucleo evidentemente regola la traduzione nell'organulo.

Importo di proteine a codifica nucleare: localizzazione degli mRNA citoplasmatici sui mitocondri.

La MIM si distingue in Inner Bound Membrane e membrane ripiegate in creste, connesse alla IBM tramite giunzioni cristali. Questa membrana ha un contenuto proteico particolarmente elevato. La MIM e la MOM presentano siti di contatto, implicati nell'importo di polipeptidi, tramite traslocasi e motori di montaggio. Queste proteine di membrana collaborano anche a definire l'architettura cristale – questa è determinata dall'antagonismo tra Mitochondrial Contact Site (MICOS) e oligomeri della F1-Fo-ATP sintasi. MICOS è richiesto per la formazione delle giunzioni cristali e cellule prive della sua subunità centrale (Mic60) mancano di giunzioni cristali e formano pile concentriche di MIM. Gli oligomeri della F1-Fo-ATP sintasi, invece, promuovono la generazione dei bordi e dei tubuli delle creste – cellule mancanti della subunità 'e' dimerizzano le ATP sintasi male e portano membrane cristali longitudinali, da capo a capo. Le subunità 'e' e 'g' dell'ATP sintasi ne permettono la dimerizzazione, che piega la membrana a 98°.

Circa metà degli mRNA citoplasmatici per polipeptidi mitocondriali viene selettivamente tradotta da ribosomi sull'esterno della MOM, mentre altri sono tradotti selettivamente da polisomi citoplasmatici oppure non hanno preferenza. La localizzazione di alcuni mRNA citoplasmatici a ridosso della MOM promuove l'importo delle proteine che essi codificano. Le attuali evidenze indicano il coinvolgimento nell'allocazione di sequenze alla 3'-UTR, che legherebbero all'esterno della MOM questi mRNA. Infatti, usando la 3'-UTR dell'mRNA di ATM1, GFP reporter localizza a ridosso della MOM, ma ciò non è comunque sufficiente per il suo importo nel mitocondrio. La sostituzione della 3'-UTR sul messaggero di ATP2, inoltre, rallenta la normale crescita, presumibilmente a causa di una riduzione dell'attività dell'ATP sintasi, e accumula il messaggero nei polisomi citoplasmatici liberi. In questo esperimento, la

frazione di precursore di pre-Atp2 che si associa alla MOM, una volta tradotta dai polisomi, è molto più alta che nelle wildtype, in cui prevale Atp2 matura, che viene anche importata: probabilmente, la traduzione a livello della MOM favorisce il primo processamento del polipeptide, che diviene così competente per essere importato.

Un gruppo significativo di precursori proteici, ragionevolmente in attesa di processamento e importo, localizza sulla superficie dei mitocondri; ben 16 di queste proteine sono codificate dai 25 mRNAs più selettivamente localizzati sui polisomi vincolati ai mitocondri. Alcuni suggeriscono che invece la localizzazione sulla MOM dei ribosomi sia volta all'importo cotraduzionale di proteine e che i precursori sopra citati non siano da importare, ma da degradare. Interessante notare che gli mRNA che localizzano più selettivamente sui polisomi sulla MOM tendono a codificare per proteine la cui origine evolutiva sembra radicata tra Archea e Bacteria, dunque proteine antiche e conservate, essenziali per il funzionamento di base del sistema di OXPHOS e del suo apparato di montaggio. Le subunità di origine eucariotica sembrano preferire la traduzione citoplasmatica; è questo il caso della citocromo c ossidasi.

Pumilio-homology domain Family (PUFs) codificano per proteine leganti RNA, come Puf3. Essa localizza sulla MOM e lega con strabillante specificità gli mRNA per proteine mitocondriali: su 154 suoi bersagli di funzione nota, 135 codificano per proteine mitocondriali, 80 delle quali con un ruolo nella traduzione mitocondriale. Una sequenza che lega Puf3 è stata identificata nella 3'-UTR di questi mRNA. Puf3 promuove la degradazione degli mRNA del metabolismo respiratorio: la sua overespressione riduce la crescita del lievito su terreni con fonti di carbonio non fermentabili (i.e. per cui il metabolismo deve essere aerobio). Cellule mancanti di Puf3 invece hanno grandi quantità di complessi respiratori ed elevato consumo d'ossigeno.

mRNA attivamente tradotti possono iniziare l'importo contestualmente alla traduzione e venire legati alla superficie del mitocondrio per interazione tra il polipeptide nascente e un suo recettore. Ciò avviene almeno per alcuni mRNA localizzati sui mitocondri. In mancanza della 3'-UTR che localizza il messaggero di ATM1 sulla MOM, un reporter GFP vede la localizzazione del polipeptide tradotto sulla MOM, sintomo dell'interazione mediante un qualche segnale di

targeting della catena polipeptidica di ATM1 con proteine della MOM. I pathway di localizzazione degli mRNA e importazione sembrano parzialmente ridondanti, dal momento che delezioni anche multiple di componenti di questi sistemi riducono ma non eliminano la vitalità dei mutanti.

Importo di proteine a codifica nucleare per MOM, spazio intermembrana, MIM e matrice. Presequenze scindibili anfipatiche a carica positiva. Degradazione.

Le proteine per la MOM sono sintetizzate nel citoplasma e nessuna proteina nota di queste viene clivata per proteolisi durante importazione o assemblaggio. I segnali di target sono poco compresi, ma sembra che provengano dai domini transmembrana.

Le proteine con β -barrel, tra cui la più abbondante, Por1, la proteina formante i pori del TOM, Tom40, e il Voltage Gated Anion Channel, sono tradotte da polisomi citoplasmatici liberi; queste proteine, in forma sfoldata, in seguito vengono riconosciute da recettori del TOM e transitano per i pori del complesso, di Tom40, vengono passate a chaperoni eteroesamERICI tentacolari dello spazio intermembrana, quali Tim9 e Tim10 e infine al Sorting and Assembly Machinery (SAM), che si trova nella MOM, nella quale inserisce lateralmente queste proteine, che allora nella membrana assumono la forma a β -barrel.

Alcune proteine integrali della MOM con molti TransMembrane Domains (TMDs) contattano il recettore Tom70 del complesso TOM, interagiscono con i complessi multimerici di Tim1 e sono inserite nel doppio strato dall'esterno, senza usare Tom40. Probabilmente esistono più pathway alternativi per le proteine transmembrana della MOM.

Le proteine ancorate mediante un singolo dominio transmembrana al C-terminale, dette tail-anchored, come Fis1 (per la fissione) vengono inserite del tutto indipendentemente dalle componenti note di TOM e SAM. Fis1 può essere inserita in vescicole lipidiche con basso contenuto in ergosterolo, indicando che presumibilmente anche il contenuto lipidico gioca la sua parte in vivo.

Le proteine destinate allo spazio intermembrana sono generalmente modificate covalentemente in tale sede, risultando intrappolate. L'apocitocromo c (Cyc1), sintetizzato su polisomi posti sui mitocondri, crossa la membrana dal TOM e la liasi Cyc3, residente esternamente sulla MIM, attacca un eme, cosicché l'apocitocromo c ora non può traslocare. Le proteine Twin-Cys sono importate in forma ridotta e ossidate nello spazio intermembrana dal sistema di relé (cioè comandato da variazioni di corrente) a disolfuri Mia40-Erv1, legato esternamente alla MIM. I neoformati ponti disolfuro intramolecolari impediscono la traslocazione inversa verso l'esterno. Resta ancora da chiarire quale segnale diriga queste Twin-Cys ai mitocondri.

Le proteine con domini nella MIM sono importate tramite i pori del TOM. I trasportatori di metaboliti e altre proteine multispanning seguono una via d'importazione che non prevede tagli proteolitici. Le proteine multispanning contengono numerosi siti di targeting mitocondriale, generalmente fiancheggiati da domini transmembrana. Le proteine di trasporto neosintetizzate nel lievito interagiscono con Hsp70, che partecipa al riconoscimento con la subunità recettoriale Tom70 del TOM. Il rilascio dipendente da ATP da Hsp70 permette l'ingresso della proteina nel poro. N- e C- terminali inizialmente rimangono fuori, con forma della proteina importata ad ansa. I complessi chaperone Tim9-Tim10 oppure Tim8-Tim12 guidano la proteina nello spazio intermembrana fino al complesso insertasi-traslocasi TIM22, il cui core è un poro ad ingresso voltaggio-dipendente, formato da Tim22. Il legame con TIM22, la traslocazione e l'inserimento in membrana dei TMDs sfruttano l'energia immagazzinata nel gradiente di potenziale elettrochimico transmembrana e non consumano ATP. Proteine funzionanti come carrier seguono paths di self-assembly in dimeri in membrana appena a seguito dell'inserimento.

Proteine con presequenze scindibili all'N-terminale anfipatiche e cariche positive (generalmente α -eliche) costituenti segnali di targeting, in mancanza di consensi specifici, costituiscono oltre il 60% delle proteine importate nel mitocondrio di lievito. Alcune di esse necessitano di Hsp70 per l'importazione e si pensa che il chaperone le mantenga distese e parzialmente sfoldate. Un dominio del recettore

Tom20/Tom22 sul lato citoplasmatico della MOM riconosce le superfici idrofobe delle α -eliche anfipatiche della presequenza, che sono legate da Tom22 attraverso interazioni elettrostatiche e dirette nel poro di Tom40. Tom70 non è essenziale, ma sembra svolga una funzione ridondante sullo schema di Tom20 – il ko di uno dei due non inficia la sopravvivenza, quello di ambedue sì. Il complesso TIM23, intermembrana della MIM, porta il recettore Tim50 a copertura sigillante del poro Tim23, che, in mancanza della proteina substrato, preserva così il potenziale di membrana. Il passaggio delle presequenze a carica positiva attraverso TIM23 è guidato elettroforeticamente dalla differenza di potenziale elettrico; ciò porta i segnali idrofobici nel poro di TIM23, fatto che previene un'ulteriore traslocazione del polipeptide. La presequenza è ora localizzata nella matrice e rimossa per proteolisi dalla Mitochondrial Processing Protease (MPP), con meccanismo sequenza-peculiare. Il polipeptide intanto è rilasciato lateralmente da TIM23 e risulta inserito nel bilayer della MIM. La scissione proteolitica alla superficie esterna della MIM può rilasciare una proteina solubile nello spazio intermembrana.

I polipeptidi per la MIM con segnali di smistamento idrofobici, i quali funzionano da stop del transfer, distanti dalla sequenza positivamente carica necessitano di qualcosa di più della traslocazione basata sul potenziale di membrana affinché il segnale di smistamento raggiunga la traslocasi di TIM23. Interviene allora la Presequence translocase-Associated Motor (PAM), chaperone basato su Hsp70, che investe ATP fin quando la sequenza di stop del transfer entra nel canale di TIM23. Questo previene un ulteriore uptake PAM-dipendente della catena polipeptidica; non è noto se ciò sia dovuto ad un segnale trasdotto dal canale a PAM oppure se una barriera energetica s'ingeneri e ostacoli un ulteriore import. In mancanza di segnale si smistamento idrofobico, il polipeptide è traslocato per intero e rilasciato nella matrice. Alcune proteine possono ripiegarsi rapidamente mentre vengono importate nella matrice e processate e lo fanno in una certa frazione. Se il C-terminale non si piega rapidamente, esse sono rilasciate nella matrice, mentre se il folding è rapido vengono respinte retrogradamente nel citoplasma dall'N-terminale – questo è uno dei meccanismi che permettono ad una stessa proteina di essere

rappresentata sia nel mitocondrio che nel citoplasma.

Oxa1 è una traslocasi/insertasi della MIM, che esporta domini proteici mitosintetizzati dalla matrice. L'N-terminale è rivolto allo spazio intermembrana e il C-terminale verso la matrice. Durante l'import, il primo dominio transmembrana di Oxa1 crossa la MIM, seguendo la presequenza; l'N-terminale viene riesportato in concomitanza con l'inserimento in membrana del primo dominio, mediante l'attività di traslocasi di Oxa1 preesistenti. Resta da chiarire come siano inseriti gli altri domini transmembrana.

Gli studi mostrano che i macchinari TOM e TIM non sono semplici condotti, bensì sono soggetti a fine modulazione. TOM è regolata per fosforilazione di Tom70 dalla PKA, la cui attività è elevata in presenza di glucosio. In tal situazione, essa fosforila anche Tom40, decrementandone la capacità d'interagire con Hsp70, che reca le proteine trasportatrici di metaboliti.

Abbiamo visto che gran parte dei processi molecolari a carico dei mitocondri sono ancora in fase di chiarimento. Non va diversamente per quanto riguarda la degradazione delle proteine mitocondriali. Studi recenti portano evidenze di più pathway concorrenti ai processi degradativi, la cui entità è infatti variabile. La proteina Ydr049 trasloca nei mitocondri in caso di stress e le cellule che ne sono mancanti sono ipersensibili allo stress ossidativo e presentano una durata di vita inferiore. Questa proteina interagisce con proteine note per avere un ruolo nella degradazione proteasomica di proteine misfolded del reticolo endoplasmatico. I mitocondri devono anche essere in grado di degradare i polipeptidi sintetizzati in eccesso al loro interno, mal assemblati o danneggiati dallo stress ossidativo. L'eliminazione può coinvolgere i lisosomi, ma si iniziano a conoscere anche pathway proteolitici mitocondriali interni. Quando il carico di danni all'interno del mitocondrio è eccessivo, comunque, sono avviati i pathway mitofagici. Le proteine della membrana esterna sono in stretto rapporto con il citoplasma ed è stato riportato che alcune di esse possono essere degradate dalla via proteasomica.

Coordinamento dell'espressione genica nucleare e mitocondriale. I fattori di trascrizione Nuclear

Respiratory Factors. Coattivatori della famiglia PGC-1. Saggi EMSA per la dimostrazione in vitro del legame tra fattori di trascrizione e ChIP per il legame ai promotori.

Il controllo nucleare sull'espressione del proteoma mitocondriale fa riferimento alla segnalazione anterograda mitocondriale; ragionevolmente esistono meccanismi di segnalazione retrograda (a cui forse fanno riferimento Ca^{2+} e ROS), ma non sono ancora ben caratterizzati. L'analisi in silico delle regioni a monte dei siti di start della trascrizione nucleare per i fattori di trascrizione mitocondriali mostra una prevalenza di siti riconosciuti dai fattori di trascrizione nucleare Nuclear Respiratory Factors NRF-1 e -2 e per Specificity protein 1, Sp1. Queste sequenze si rinvenivano anche a monte delle sequenze per TFAM, RNAPol γ , subunità dei complessi OXPHOS a codifica nucleare.

NRF-1 agisce in forma omodimerica e lega il DNA con più vigore se fosforilata su due residui di serina all'N-terminale. Le regioni A e B di transattivazione si trovano al C-terminale. NRF-2 forma eterodimeri $\alpha\beta$ 1 con subunità unite da domini a ripetizione di ankirina (eliche antiparallele connesse da loop); gli eterodimeri omodimerizzano quando legati al DNA. La subunità α lega il DNA con il dominio ETS (E-Twenty-Six), a struttura Helix-Turn-Helix, detta winged-HTH. Sp1 ha molti ruoli nella specie umana, ad esempio nello sviluppo, ruoli generalmente attivatori, ma talvolta inibitori. Lega il DNA con tre moduli zinc-finger Cys2/His2 su consenso specifico.

PPAR-Gamma Coactivator 1 (PGC-1) interagisce su un versante con NRF legato al DNA e sull'altro con alcuni fattori generali del complesso d'inizio, tipo mediatore, agevolando la trascrizione. L'interazione con le altre proteine ha luogo grazie a residui ricchi in Pro, Arg, Ser.

Il legame tra fattori di trascrizione e DNA può essere vagliato in vitro attraverso un'Electroforetic Mobility Shift Assay (EMSA): un estratto nucleare viene incubato con oligo specifico marcato; la corsa viene svolta con e senza proteine. L'idea è che il legame della proteina d'interesse con il DNA ne causi il ritardo nella corsa; per screditare legami aspecifici delle

proteine con il DNA si aggiunge il DNA targettato non marcato (competitore che dovrebbe far scomparire le bande marcate in ritardo) e a parte a sequenza diversa (che non dovrebbe interessare lo shift dovuto al legame specifico). Uno supershift, vale a dire un ulteriore rallentamento, può essere ottenuto utilizzando anticorpi per epitopi esclusivi della proteina legante la porzione di DNA studiata.

Per valutare gli effetti di sequenze prossimali del promotore in situ si clona il segmento genico e, mediante enzimi di restrizione, si effettuano progressive delezioni dal 5' verso il 3', ponendo sotto il controllo del promotore un reporter, tipicamente GFP, e rilevandone l'espressione. In alternativa, dal 5' in giù si può sostituire un linker a sequenza qualunque rispetto alla sequenza wildtype (linker scanning), rilevando l'attività del promotore al variare della posizione di tale linker, che permette dunque di risalire alle posizioni degli elementi di controllo.

L'interazione tra sequenza di DNA e fattore di trascrizione in vivo può essere valutata con un'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP): la formaldeide crosslinka DNA e proteine, che vengono in seguito purificati da un lisato nucleare; sonicando o con enzimi di restrizione, il DNA viene frammentato e anticorpi per il fattore di trascrizione, legati a beads, raccolgono le proteine verso cui sono diretti, insieme con il DNA che esse legano. Seguono operazioni di de-crosslinking, distruzione delle proteine con proteinasi K e PCR delle sequenze purificate, che sono successivamente proiettate sulla mappa del genoma. Questo permette di definire i cistromi, ovvero l'insieme delle sequenze cis-attive targettate da un fattore trans-attivo.

La COX fornisce un esempio di regolazione bigenomica trascrizionale; essa è formata da 3 subunità codificate nel mtDNA e 10 codificate dal DNA nucleare, su 9 cromosomi diversi. I meccanismi regolatori sono ancora in fase di studio. Si suppone che nei neuroni la proteina Sp1 regoli l'espressione delle dieci subunità nucleari per via diretta e quella delle subunità mitocondriali indirettamente, agendo sulla trascrizione dei fattori di trascrizione mitocondriali, TFAM, TFB1M (in misura minore) e TFB2M. Ciò è sostenuto da analisi in silico su sequenze, saggi di shift e supershift, ChIP, interferenza da RNA, saggi di sovraespressione.

Poco si sa sulla segnalazione retrograda dai vari mitocondri al nucleo. Il pathway più noto in *S. cerevisiae* è detto Rtg e permette la regolazione dell'espressione genica nucleare in relazione allo stato metabolico mitocondriale, attraverso una combinazione di regolatori positivi e negativi culminanti nell'importato differenziale di fattori trascrizionali nel nucleo. Tali regolatori cambiano stato in virtù dell'integrazione di un certo numero di segnali che sono in grado di sensing. Il circuito ha un'architettura a feedback negativo. Sembra che i pathway retrogradi servano anche a percepire la concentrazione di nutrienti e siano integrati nel pathway TOR (responsabile per la reazione cellulare in risposta a disponibilità energetica, stress e ipossia, altamente integrato) oltre che a migliorare il mantenimento del mtDNA. Nei mammiferi, è stata identificata la proteina GPS2 (G-protein Pathway Suppressor 2) come un mediatore del signaling retrogrado e un fattore trascrizionale dei geni per subunità mitocondriali codificate nel nucleo. La traslocazione regolata di questa proteina nel nucleo dai mitocondri è essenziale per l'attivazione trascrizionale della risposta allo stress e per supportare la biogenesi mitocondriale di base nei tessuti adiposi di topo. GPS2 sui promotori regola la demetilazione dell'istone H3K9 e l'attivazione della RNAP2.

Approcci per la cura dei disordini mitocondriali. Editing del genoma mitocondriale. Uso di endonucleasi per manipolare il mtDNA. CRISPR/Cas9 e ZFNs.

L'approccio citologico alla cura dei disordini mitocondriali si scontra con una serie di problemi, fra cui l'effetto di soglia variabile per percentuale di copie di mtDNA mutato oltre della quale si manifesta il fenotipo mutante (genetica popolazionale, non mendeliana semplice), le difficoltà nell'importo di materiali all'interno dei mitocondri e la mancanza di sistemi solidi di ricombinazione omologa e non omologa. Sono stati proposti differenti approcci, al fine di individuare possibili tecniche di ripristino della funzione mitocondriale, sia attraverso l'importo di prodotti nucleici (mediante adenoassociati) e proteici dall'esterno del mitocondrio (strategia poco fruttuosa) o la sostituzione di mitocondri, che attraverso una genetica inversa – in riferimento alla modifica per inserimento, eliminazione o sostituzione di specifiche sequenze nel mtDNA già

esistente. Questo ultimo approccio viene altresì utilizzato per generare modelli di malattie mitocondriali.

Molti organismi importano tRNA codificati dal nucleo nei mitocondri; studi in vitro dimostrano che tRNA da *S. cerevisiae* possono essere importati in mitocondri umani isolati. Esprimendo questi tRNA di lievito nei nuclei di fibroblasti di pazienti di MERRF, l'importo del tRNA^{Lys} migliora la respirazione. Miglioramenti ulteriori si ottengono facendo esprimere l'RNA Import Complex del *Trypanosoma Leishmania* sp.; anche la polinucleotide fosforilasi, ad attività 3'-5' esonucleasi e poli(A)-polimerasi, sembra favorire l'importo di ncRNAs a codifica nucleare, specialmente per tRNA modificati con aggiunta di una breve sequenza stelo-ansa di 20 nucleotidi. Il meccanismo non è ben compreso.

L'espressione allotopica nel nucleo e la traduzione citosolica per proteine della ETC a codifica mitocondriale è stata dimostrata in *S. cerevisiae*; in cellule umane, la fusione con una sequenza d'indirizzamento mitocondriale a mtATP6 espressa nel nucleo è risultata in una buona incorporazione della proteina codificata nel C5 e un miglioramento nella sintesi di ATP. Resta da capire quali effetti collaterali sulle funzioni cellulari possano derivare da proteine ricodificate allotopicamente.

Un'alternativa consiste nell'inserire geni mitocondriali direttamente nell'organello via adenoassociati ingegnerizzati (i quali non producono mai patologie nell'uomo). Viene aggiunta una sequenza d'indirizzamento ai mitocondri su una proteina del capsido. Con questa modalità, è stata inserita una versione mutante di ND4 in mitocondri di occhi di topo wildtype, producendo un fenotipo simile alla LHON; con una versione wt di ND4, per contro, in mitocondri di occhi di topo con la patologia, il fenotipo normale è stato ripristinato in buona parte. Rimangono molte perplessità, ad esempio se l'ingresso di AAV potrebbe interagire malevolmente con le funzioni mitocondriali. Si noti infine che il materiale trasdotto non si integra da nessuna parte in mancanza di HR e NHEJ, ma rimane episomale per un tempo ignoto.

Un'altra strategia consiste nella captazione per co-cultura con mitocondri isolati, fenomeno che dipende dalla temperatura. Il meccanismo non coinvolge clatrina e la captazione sembra sfruttare

una macropinocitosi non selettiva (caveole, trasporto coinvolgente l'actina). In vivo, mitocondri autologhi sono stati iniettati in un modello di coniglio con ischemia regionale e lo studio riporta un miglioramento del fenotipo patologico. Sembra tuttavia che buona parte dei mitocondri in questo caso restino extracellulari.

È stato osservato in Natura il trasferimento di mitocondri da cellula a cellula: tunnel di nanotubi con diametro di 50-200nm, detti citonemi, sono generalmente una via per il trasferimento unidirezionale di mitocondri. Infatti, si osservano trasferimenti dai cardiomiociti alle cellule endoteliali, ma non viceversa, come da staminali mesenchimali ad epiteliali. Si suppone che cellule stressate siano in grado di sviluppare citonemi verso cellule non stressate. In modelli di ratto con broncopneumopatia cronica ostruttiva, il trasferimento di mitocondri da iPSCs-staminali mesenchimali verso stromali del midollo osseo (sommministrando per endovena) attenua la distruzione degli alveoli e correla con la capacità delle cellule staminali di riparare le epiteliali danneggiate. In modelli murini di tumori sperimentalmente privati di mtDNA, inoltre, si è visto che in qualche maniera le cellule tumorali riescono ad ottenere mtDNA dal microambiente circostante, aumentando la respirazione e quindi la tumorigenicità.

È stata proposta la microiniezione come metodo di trasferimento per mitocondri – il metodo però è abbastanza devastante per le cellule, richiede aghi facilmente occludibili ed è time-consuming. Con questa modalità, sono stati trasferiti mitocondri resistenti all'eritromicina (e indipendentemente con cloramfenicolo) in cellule di paramecio sensibili all'antibiotico, producendo cellule resistenti. La selezione con antibiotico ha permesso in questi casi di rimpiazzare i mitocondri nativi dei parameci entro la 35esima generazione (cloramfenicolo), a partire da un solo mitocondrio resistente. Risultati misti sono stati ottenuti quanto alla persistenza dei mitocondri trasferiti in cellule e organismi.

Recentemente è stata sviluppata una nanolama fototermica, con una punta di diametro di 3 micrometri con titanio che assorbe la luce, posizionata in modo da toccare lievemente una membrana cellulare. Un impulso di luce laser provoca una bolla di vapore, che si espande e collassa sulla punta della pipetta, che genera un'incisione transitoria nella membrana,

consentendo l'inserimento, spinto dalla pressione, di carichi voluminosi nelle cellule. La vitalità delle cellule trattate è elevata. È stata sviluppata una piattaforma per il trasferimento in parallelo, che può inserire nanoparticelle, proteine, batteri intracellulari in cellule di mammifero, con alta efficienza: BLAST (Biophotonic Laser-Assisted Surgery Tool).

Per quanto riguarda il delivery di materiale, specialmente DNA, ai mitocondri, nanoparticelle basate su liposomi, dette MITO-Porter, sono state impiegate per importare macromolecole, come GFP, nella matrice mitocondriale. Non è chiaro se DNA esogeno inserito con questa modalità sarebbe degradato una volta nei mitocondri, come è stato osservato per altre molecole. L'elettroporazione è stata impiegata per trasferire un vettore plasmidico di *E. coli* con mtDNA di topo clonato in mitocondri di topo isolati privati di mtDNA; il materiale inserito veniva trascritto nell'organulo. Approfittando dell'origine procariotica dei mitocondri, inoltre, un plasmide con il promotore di T7 è stato trasferito con successo mediante coniugazione tra un batterio F+ e un mitocondrio F-. Notare che la coniugazione trasferisce un solo filamento di DNA, perciò non si sa cosa succeda nei mitocondri e come possa avvenire la sintesi del secondo filamento. Infine, non si ha idea di come si potrebbe dirigere il mtDNA esogeno, privo di proteine, nei nucleoidi mitocondriali.

Le strategie di genetica inversa attualmente più studiate convergono tutte alla formazione di un DSB nei mtDNA mutati, a seguito del quale, si rileva, queste molecole vengono degradate. Segue, con cinetiche variabili, una nuova sintesi di mtDNA su template delle molecole non mutate, fatto che altera i rapporti eteroplasmici fra le due forme, a favore di quella che specifica il fenotipo sano. I meccanismi molecolari rimangono in gran parte da indagare.

Un primo approccio per ottenere lo shift eteroplasmico prevede l'uso di endonucleasi di restrizione. Tuttavia, è difficile identificare siti bersaglio presenti solo nel mtDNA wt o in quello mutante di una cellula ed è limitato il numero di endonucleasi con siti di taglio noti. Una linea ibrida topo-ratto è stata la prima ad essere utilizzata per provare l'approccio – mtDNA di topo contengono due siti per PstI mentre mitocondri di ratto non ne contengono alcuno. Esprimendo una mito-PstI, si è ottenuto uno shift

nel rapporto fra le frequenze dei due mtDNA a favore del mtDNA di ratto, come previsto. Enzimi di restrizione sono stati usati con eleganza in modelli murini, eteroplasmici asintomatici BALB/NZB. I due mtDNA differiscono per 93 posizioni e l'aplotipo (cluster di geni ereditati assieme) BALB contiene un sito per ApaLI, che manca in NZB. Su cellule da questi modelli, l'induzione dell'espressione di mito-ApaLI ha permesso di analizzare la cinetica dello shift e della risintesi di mtDNA non clivato – in 24h la quantità di mtDNA è tornata a livelli standard. mito-ApaLI è stato inserito in cervello e muscolo mediante adenovirus, dimostrando la fattibilità dell'approccio su modelli animali per la prima volta. Esperimenti di questo genere hanno confermato quanto appena spiegato.

I domini zinc-finger Cys2-His2 sono motivi a 34 aminoacidi contenenti un foglietto β antiparallelo e un' α -elica, stabilizzati da uno ione zinco. Ogni dominio riconosce una tripletta e una combinazione di varie zinc-fingers può targettare diverse sequenze. L'aggiunta della endonucleasi aspecifica FokI al C-terminale e il disegno di proteine che legano il DNA in stretta prossimità coda-coda permette la dimerizzazione dell'endonucleasi in un punto specifico del DNA, sul quale essa effettua il cleavage. Resta che le ZFNs presentano un tropismo innato per il nucleo (si associano alle macchine d'importazione nucleare), quindi ai costrutti d'ingegneria genetica per mitocondri si aggiunge una sequenza d'esportazione dal nucleo fra il segnale di localizzazione per il mitocondrio e il sito di legame per il DNA. Inoltre, per evitare l'accoppiamento self-self di FokI, i due monomeri della stessa sono stati modificati in modo da dimerizzare soltanto in maniera etero, oppure connessi con un linker aminoacidico flessibile, formando una molecola unica.

Purtroppo, non esiste un modulo zinc-finger per ogni tripletta nucleotidica; le TALEN non hanno questo limite, ma richiedono un importante lavoro d'ingegneria proteica per ogni costrutto generato. I costrutti codificanti, in entrambi i casi, sono molto ingombranti per essere deliverati alle cellule mediante adenoassociati (limite 5kbp) e queste endonucleasi devono essere espresse abbondantemente. Per quanto concerne CRISPR/Cas9, l'importo delle gRNA sembra essere difficoltoso e la rarità degli eventi di HR e NHEJ nei mitocondri costituisce un ostacolo

importante. Le macchine proteiche responsabili di tali meccanismi sono idealmente importabili nei mitocondri, ma non si sa se funzionerebbero in modo simile a quanto operano sulla cromatina ricca di istoni. Uno studio del 2015 riporta che CRISPR/Cas9 con NLS mostra una distribuzione che interessa anche citoplasma e mitocondri, e segnali di localizzazione mitocondriale importerebbero il macchinario adeguatamente nei mitocondri. Gli autori avrebbero rilevato cleavage del mtDNA con buona specificità e risposte cellulari in linea con le attese. Inoltre, essi hanno individuato risposte compensatorie nella sintesi di proteine nucleari alla mancata sintesi di proteine mitocondriali per via dell'azione degradativa sul mtDNA. Tuttavia, gli studi con mitoCas9 sono contestati e sostanzialmente fermi. Per tutte e tre le tecniche, inoltre, si corre il rischio che il contenuto di mtDNA per cellula sia temporaneamente ridotto al di sotto di una soglia funzionale, fatto che può scatenare nuovi problemi.

Che cos'è TALEN. Eliminazione specifica di genomi mitocondriali mutanti in cellule di pazienti tramite mitoTALEN.

Attualmente, lo strumento più adatto per l'editing mitocondriale risultano essere le TALENs. Gli effettori Transcription Activator-Like (TAL) sono proteine secrete dai batteri del genere *Xanthomonas* (sistema di secrezione di tipo III) quando infettano vegetali, al fine di riprogrammare l'espressione genica. Gli effettori TAL legano sequenze di DNA tramite un dominio centrale che contiene da 1,5 a 33,5 ripetizioni lunghe generalmente 34 residui aminoacidici (e l'ultima semiripetizione di soli 20). I residui 12 e 13 sono ipervariabili (Repeat Variable Di-residue, RVD) e determinano la specificità per la base, anche se in realtà si tratta più di una preferenza – ad esempio, HD legge 69% C, 19% A, 5% T, 0% G. È stato dedotto il codice TALE; generalmente si usano NI per A, NN per G (ma anche A), NG per T (ma anche 5-met-C), per HD C; NS legge accetta qualunque nucleotide. C'è un numero minimo di ripetizioni richiesto per l'attivazione trascrizionale da parte degli effettori – usando effettori artificiali con numero variabile di ripetizioni e il gene reporter beta-glucuronidasi (controllo positivo: promotore da virus del mosaico del cavolfiore), in *Nicotiana benthamiana* l'attivazione trascrizionale inizia ad essere rilevante a 10.5 ripetizioni, mentre

a 15.5 risulta calare. Strutture di TAL legati a DNA mostrano che essi sono costituiti da due α -eliche unite da una breve ansa contenente il RVD – il secondo residuo contatta specificamente il DNA, mentre il primo stabilizza l'ansa. I siti bersaglio di TAL tendono ad includere una T fiancheggiante la sequenza al 5', la quale lega la prima ripetizione, contattando un triptofano conservato. I costrutti TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) si costruiscono fondendo un dominio di legame al DNA di effettori TAL al dominio endonucleasico a sequenza aspecifica di FokI, che effettua un taglio sfalsato (solitamente 4 basi, comunque un DSB) a distanza precisa dal sito a cui è legata. Come detto in precedenza, FokI lavora come dimero: occorre predisporre due TAL mirati a punti vicini sul genoma, sulle strand opposte, ciascuno con un monomero di FokI.

Sono state costruite mitoTALENs dirette ai mitocondri per eliminare specificamente mtDNA mutati e modificare così il grado di eteroplasmia, restaurando la funzione di OXPHOS (Moraes et al., 2013; 2015).

Nel 2013, i ricercatori hanno sviluppato due coppie di mitoTALENs (le quali si ripiegano bene all'interno dei mitocondri) per scindere mtDNA recanti due classi di mutazioni patogene, una puntiforme nel gene ND6 e la delezione comune (5kbp, presente nel 30% dei pazienti con delezioni a livello del mtDNA). La delezione comune è associata alla sindrome di Pearson (disordine infantile fatale a rapido decorso, con anemia sideroblastica – cioè a livello del midollo osseo compaiono eritroblasti nucleati con granuli di ferro non emoglobinico ma sottoforma di ferritina - e disfunzione del pancreas esocrino), alla sindrome di Kearns-Sayre (insorge prima dei vent'anni, multi sistemica; blocco dei movimenti oculari, retinopatia pigmentata, blocco cardiaco), alla oftalmoplegia esterna cronica progressiva (meno precoce, simile alla Kearns-Sayre). ND6 invece risulta mutato in malati di sindrome di Leigh (disordine cerebrale progressivo che insorge nell'infanzia) e di LHON: un'alana è mutata in valina nella subunità 6 del CI, il cui montaggio normale risulta alterato. Per migliorare i livelli di espressione e la stechiometria, le due metà mitoTALEN e i marcatori sono stati montati in un unico plasmide. I costrutti sono i seguenti: CMV promoter – MLS – 3xHA – right TALE – FokI – T2A' – EGFP – 3'UTR mitocondriale; CMV

promoter – MLS – 3xFLAG – left TALE – FokI – T2A' – mCherry – 3'UTR mitocondriale. HA e FLAG sono epitopi per detectare mediante WB l'avvenuta espressione in proteine di piena lunghezza; le MLS tipicamente derivano da SOD2 o COX8A e sono clivate da peptidasi mitocondriali. I marcatori fluorescenti sono espressi dallo stesso cistron delle TALENs grazie alla sequenza T2A', che apparentemente agisce da idrolasi (CHYSEL: Cis-acting HYdrolase ELement). Questo meccanismo deriva da virus eucariotici con genomi a ssRNA o dsRNA e funziona sui ribosomi eucariotici ma non procariotici. La sequenza tradotta simula una scissione e comanda il rilascio del primo polipeptide e un nuovo inizio con prolil-tRNA, con ribosome skipping. Cellule sono state trasfettate e selezionate al FACS – gialle esprimono entrambe le TALENs, nere nessuna (o espressione molto bassa). Rispetto a cellule non trasfettate e cellule nere, nelle cellule gialle qPCR (e analisi RFLPs per la delezione comune) rivelano un aumento percentuale della forma non patologica di mtDNA, cui si associa un recupero di funzione (attività enzimatica). Il mtDNA totale cala i primi giorni, in virtù della degradazione delle molecole mirate dalle TALENs, ma poi aumenta per effetto della risintesi su templati di mtDNA sano. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule con diversi gradi di eteroplasmia. Notare che l'espressione transiente nel mitocondrio di mitoTALENs dovrebbe essere sufficiente per garantire cambiamenti duraturi nel grado di eteroplasmia. L'espressione transiente di TALENs nei mitocondri di tessuti di topo è ben tollerata. Nel 2015, sullo stesso schema, i ricercatori hanno costruito TALENs per scindere i mtDNA recanti mutazioni per tRNA^{Lys} (associata a MERRF) e ND5 (associata a sindrome di Leigh). Sono state costruite anche versioni "abbreviate", ancora funzionali, per riuscire ad impacchettare le lunghe sequenze in vettori virali. Si evidenzia che comunque l'eliminazione di mtDNA recanti mutazioni patogene non è completa e l'efficienza di editing con TALENs risulta inferiore a quella con le classiche endonucleasi di restrizione. Attenzione anche agli off-targets extramitocondriali. Un ulteriore problema riguarda l'associazione MLS-TALEN: alcune accoppiate non funzionano.

"Se conosci il tuo nemico e te stesso, la tua vittoria è sicura." (Sun Tzu)

"Beauty is Truth, Truth Beauty." (John Keats)