

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
MED/26 Ciclo XXIII



IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA CAUSA GENETICA IN UN  
CASO FAMILIARE DI ENCEFALOMIOPATIA MITOCONDRIALE E  
DEFICIT DI CITOCROMO C OSSIDASI

Dott. Dario Ronchi  
Matr. n° R07714

Tutore: Prof. Giacomo COMI

Anno accademico  
2009/2010



## SOMMARIO

Questo studio si è concentrato sull'esame di una famiglia di origine magrebina nella quale tre fratelli, nati da genitori consanguinei, hanno sviluppato una forma di miopatia progressiva con cataratta congenita, sordità e ritardo nello sviluppo.

Studi istologici e biochimici condotti su biopsie muscolari di due differenti affetti hanno evidenziato un chiaro difetto nell'attività della catena respiratoria e in particolare della Citocromo c Ossidasi (COX).

Dopo aver escluso alcune cause molecolari possibili per questo fenotipo, abbiamo eseguito un'analisi di linkage all'interno della famiglia con lo scopo di identificare un nuovo difetto genetico.

Un genotyping genome-wide ottenuto attraverso l'impiego di DNA microarrays, l'analisi di linkage e la realizzazione di una mappa di autozigosità ci hanno consentito di individuare una regione candidata sul cromosoma 16. Un'analisi bioinformatica per la ricerca di proteine mitocondriali ha selezionato un gruppo di geni da sottoporre ad indagine molecolare.

Il sequenziamento diretto di questi geni ci ha permesso di identificare una mutazione (c.581G>A, p.R194H) nel gene GFER, ortologo umano del gene Erv1 di lievito. ERV1 è uno dei principali componenti del cosiddetto "disulfide relay system" (DRS) che gioca un ruolo fondamentale nell'importo di piccole proteine ricche in cisteina nello spazio mitocondriale intermembrana (IMS). Molte di queste proteine sono essenziali per la biogenesi della COX.

Queste osservazioni ci hanno portato a ritenere che mutazioni nel gene umano potessero condurre a una proteina malfunzionante, incapace di provvedere in modo efficiente all'importo nell'IMS di quelle proteine necessarie per la biogenesi della catena respiratoria mitocondriale.

Per provare questa ipotesi abbiamo approfondito il ruolo di GFER nell'uomo. In particolare abbiamo eseguito uno studio funzionale su cellule primarie dei pazienti in precedenza studiati e su modelli cellulari realizzati ad hoc per comprendere le conseguenze della presenza della proteina mutata sulla funzionalità mitocondriale.

E' ragionevole pensare che la catena patogenetica culmini con una disfunzione ossidativa, sintomo di un più ampio danno mitocondriale, con possibili conseguenze anche a livello del DNA mitocondriale, come sembra suggerire la presenza nel muscolo dei soggetti affetti di genomi mitocondriali parzialmente deleti.

Nonostante siano già state descritte patologie umane legate a deficit nei meccanismi di trasporto mitocondriale, per la prima volta il processo d'importo delle proteine mitocondriali dello spazio intermembrana sembra essere direttamente coinvolto nella patogenesi di una malattia umana.

---

## SOMMARIO

---

**ABSTRACT**

Using a linkage whole-genome SNP genotyping, we identified a missense mutation within the GFER gene as the cause of an infantile progressive mitochondrial myopathy. The human GFER (growth factor ERV1 homolog), also called ALR (augmenter of liver regeneration), belongs to the ERV1/ALR sulfhydryl oxidase family, which requires flavin adenine dinucleotide (FAD) as a cofactor. The physiological role of Erv1 has been elucidated in *S. cerevisiae*. ERV1 is an essential gene whose product is localized to the mitochondrial IMS. Together with Mia40, it participates in the DRS that drives the import of small IMS proteins to their final localization.

Briefly, the DRS consists of two essential components: the sulfhydryl oxidase Erv1 (homolog to human GFER) and the redox-regulated import receptor Mia40. The DRS drives the import of cysteine-rich proteins into the IMS by an oxidative folding mechanism. Erv1p is reoxidized within this system, transferring its electrons onto molecular oxygen via interaction with cytochrome c and Cytochrome c Oxidase (COX), thereby linking the DRS to respiratory chain activity.

Proteins belonging to the class of IMS, substrates of the DRS, are only partially identified. These include: a) small Tim proteins, chaperones involved in transport from the outer to the inner mitochondrial membrane; b) proteins involved in COX assembly; c) protein involved in protection from superoxide radicals generated by cellular respiration.

The consequence of the mutation at the muscle and fibroblast levels are: 1) reduction of multiple mitochondrial respiratory chain complexes activity (predominantly Complex IV), which was restored by overexpression of the wild-type protein; 2) impaired import of human cysteine-rich proteins, known to be imported through the DRS in yeast, into mitochondria; 3) abnormal mitochondrial ultrastructural morphology, with enlargement of the IMS; 4) defective mtDNA maintenance, with accelerated time-dependent accumulation of multiple mtDNA deletions. Moreover, the *Saccharomyces cerevisiae* *erv1R182H* mutant strain reproduced the Complex IV activity defect and showed genetic instability of mtDNA and mitochondrial morphological defects.

The aforementioned findings shed light on novel mechanisms of mitochondrial biogenesis and mtDNA maintenance, establish the role of ERV1 homologue in the human DRS, and promote the understanding of pathogenesis of a novel form of mitochondrial-related disease.

---

ABSTRACT

---

## INDICE

SOMMARIO .....	I
ABSTRACT .....	III
INDICE .....	V
ABBREVIAZIONI.....	VII
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 I MITOCONDRI E LE PROTEINE MITOCONDRIALI .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 LA CATENA RESPIRATORIA MITOCONDRIALE .....</b>	<b>1</b>
1.2.1 Complesso I: NADH-coenzima Q ossido reduttasi .....	2
1.2.2 Complesso II: Succinato-Coenzima Q ossido reduttasi .....	2
1.2.3 Complesso III: Coenzima Q-Citocromo c ossido reduttasi ....	2
1.2.4 Complesso IV: Citocromo c Ossidasi .....	2
1.2.5 Struttura e assemblaggio della Citocromo c Ossidasi .....	3
<b>1.3 IMPORTO PROTEICO NEL MITOCONDRIO .....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Pathway di presequenza.....	5
1.3.2 Pathway delle proteine carrier .....	6
1.3.3 Indirizzamento delle proteine verso la membrana esterna ....	7
1.3.4 Assemblaggio dello spazio intermembrana .....	8
1.3.4.1 <i>Il disulfide relay system</i> .....	8
1.3.4.1.1 <i>GFER, l'orologio umano di Erv1</i> .....	10
<b>1.4 EZIOPATOGENESI MOLECOLARE DELLE MALATTIE MITOCONDRIALI.....</b>	<b>10</b>
1.4.1 Mutazioni nel genoma mitocondriale .....	11
1.4.2 Mutazioni in geni nucleari che codificano per proteine mitocondriali.....	12
1.4.3 Deficit di Citocromo c Ossidasi a trasmissione autosomica recessiva .....	14
1.4.4 I difetti di importo mitocondriale nelle patologie umane.....	15
<b>2. OBIETTIVI DELLO STUDIO.....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. ASPETTI CLINICI.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. ANALISI ISTOLOGICA DEI CAMPIONI BIOPTICI MUSCOLARI..</b>	<b>19</b>
<b>3.3. INDAGINI BIOCHIMICHE .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4. ANALISI DEL DNA MITOCONDRIALE .....</b>	<b>20</b>
3.4.1 Southern blot del DNA mitocondriale .....	20
3.4.2 Long-PCR e subclonaggio dei frammenti ottenuti.....	21

3.4.3 Sequenziamento del DNA mitocondriale .....	21
3.5. <i>GENOTYPING E ANALISI DI LINKAGE</i> .....	21
3.6. <i>ANALISI DI SEQUENZA DEI GENI CANDIDATI</i> .....	22
3.7. <i>ESTRAZIONE DELL'RNA E PCR QUANTITATIVA</i> .....	23
3.8. <i>COLTURE CELLULARI</i> .....	23
3.9. <i>COSTRUZIONE DEI VETTORI DI ESPRESSIONE E PROCEDURE DI TRASFEZIONE</i> .....	24
3.10. <i>IMMUNOCITOCHIMICA</i> .....	24
3.11. <i>ISOLAMENTO DEI MITOCONDRI</i> .....	25
3.12. <i>ANALISI WESTERN BLOT</i> .....	26
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>29</b>
4.1. <i>STUDI ISTOLOGICI E ANALISI ULTRASTRUTTURALE</i> .....	29
4.2. <i>STUDI BIOCHIMICI</i> .....	31
4.3. <i>ANALISI DEL DNA MITOCONDRIALE</i> .....	32
4.4. <i>STUDIO DEI GENI NUCLEARI E ANALISI DI LINKAGE</i> .....	34
4.5. <i>STUDI DI ESPRESSIONE</i> .....	37
4.6. <i>PROTEIN MODELLING</i> .....	38
4.7. <i>ANALISI DELLE PROTEINA GFER IN COLTURE PRIMARIE E IN CELLULE HEK293 TRASFETTATE</i> .....	40
4.7.1 <i>Analisi immunocitochimica di GFER in colture primarie</i> .....	40
4.7.2 <i>Analisi Western blot di GFER in cellule HEK293 trasfettate</i> .....	41
4.8. <i>COMPLEMENTAZIONE FUNZIONALE IN COLTURE CELLULARI PRIMARIE</i> .....	42
4.9. <i>ANALISI DELLE PROTEINE DELLO SPAZIO MITOCONDRIALE INTERMEMBRANA</i> .....	43
4.9.1 <i>Analisi immunocitochimica in colture cellulari primarie</i> .....	43
4.9.2 <i>Analisi Western blot in cellule HEK293 trasfettate</i> .....	45
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSIONI</b> .....	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>55</b>
<b>APPENDICI</b> .....	<b>67</b>



## **ABBREVIAZIONI**

**ALR:** Augmenter of Liver Regeneration

**COX:** Citocromo c Ossidasi

**DRS:** Disulfide Relay System

**DTR:** Deep Tendon Refelexes

**GFER:** Growth Factor Erv1 Homologue

**GFP:** Green Fluorescent Protein

**HPO:** Hepatopoietin

**HSP:** Heat Shock Protein

**IMS:** Intermembrane Mitochondrial Space

**MIA:** Machinery Intermembrane Assembly

**MRI:** Magnetic Resonance

**mtDNA:** mitochondrial DNA

**OXA:** Oxidative Assembly Machinery

**OXPHOS:** Oxidative Phosphorylation

**PAM:** Presequence translocase Associated-Motor

**SAM:** Sorting and Assembly Machinery

**SDH:** Succinate Dehydrogenase

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism

**TIM:** Translocase of Inner Membrane

**TOM:** Translocase of Outer Membrane

---

## ABBREVIAZIONI

---

## 1 INTRODUZIONE

### **1.1 I mitocondri e le proteine mitocondriali**

I mitocondri sono organelli intracellulari caratterizzati dalla presenza di due membrane, una esterna e una interna, che danno origine a due compartimenti acquosi: lo spazio intermembrana (delimitato dalle due membrane mitocondriali) e la matrice (circondata dalla membrana mitocondriale interna).

Sebbene sovrintendano a numerosi processi di grande importanza per la fisiologia cellulare tra cui la regolazione dell'apoptosi, la sintesi e il catabolismo di lipidi e amminoacidi, la produzione dei cluster metallici di numerosi metalloenzimi, il loro compito principale è presiedere il metabolismo energetico ossidativo. Tale funzione, essenziale per il bilancio energetico di tessuti e organi, si realizza in un pathway che vede coinvolte tutte le strutture mitocondriali e che culmina nel trasporto elettronico lungo la catena respiratoria e la conseguente sintesi di molecole di ATP indotta dal passaggio unidirezionale di protoni tra lo spazio intermembrana e la matrice attraverso la pompa ATPasica (una reazione biochimica nota come fosforilazione ossidativa).

I mitocondri contengono circa 1000 proteine diverse nel lievito [1,2] e più di 1500 nell'uomo [3,4].

Di queste, sono pochissime (circa l'1%) quelle sintetizzate nei ribosomi della matrice mentre le altre sono prodotte nel citosol.

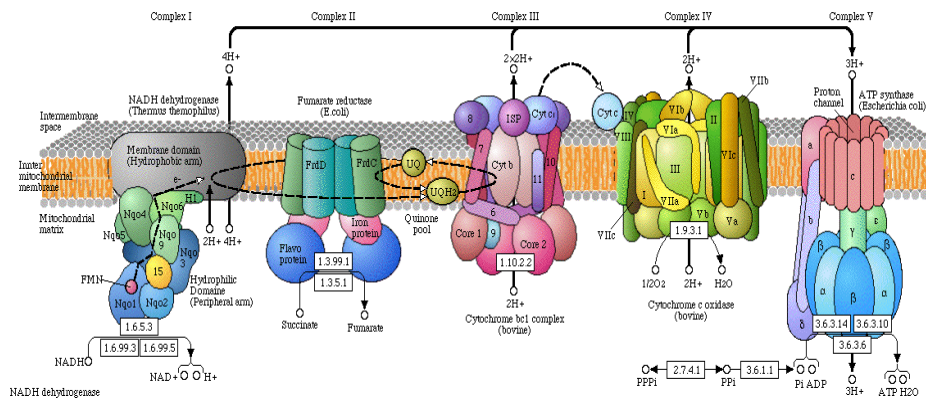
Tredici subunità strutturali della catena respiratoria (appartenenti ai complessi I, III, IV e V), 22 RNA transfer e gli specifici RNA ribosomiali necessari per la sintesi mitocondriale endogena, sono codificati dal DNA mitocondriale.

Tutte le altre proteine necessarie per la struttura e l'assemblaggio della catena respiratoria, gli enzimi deputati al catabolismo e all'anabolismo di substrati energetici, i trasportatori e le proteine che regolano i processi di fusione e fissione mitocondriale sono codificati dal genoma nucleare.

Pertanto, dopo essere state sintetizzate nel citoplasma, vengono indirizzate verso il mitocondrio e sono importate nello specifico distretto submitocondriale dove assolveranno alla loro funzione.

### **1.2 La catena respiratoria mitocondriale**

La catena respiratoria (FIGURA 1) è composta da cinque complessi multienzimatici i cui componenti sono codificati sia dal genoma nucleare che da quello mitocondriale; delle ottantadue subunità strutturali, solo tredici sono codificate dal mtDNA [5].



**FIGURA 1** Schema della struttura della catena respiratoria mitocondriale. Sono indicate le singole subunità che compongono i complessi. La reazione catalizzata dai singoli complessi è indicata dalle frecce e dai box.

### 1.2.1 Complesso I: NADH-coenzima Q ossido reductasi

Il Complesso I catalizza l'ossidazione del NADH per opera del Coenzima Q ed è il più grosso aggregato proteico presente nella membrana mitocondriale interna. Contiene 43 catene polipeptidiche per una massa complessiva di 850 kDa. Il trasporto elettronico nei vari centri redox del Complesso I determina il simultaneo trasferimento di quattro protoni fuori dalla matrice nello spazio intermembrana.

### 1.2.2 Complesso II: Succinato-Coenzima Q ossido reductasi

Il complesso II catalizza l'ossidazione del FADH<sub>2</sub> da parte del Coenzima Q. Esso è formato dalla succinato deidrogenasi e da tre altre piccole subunità idrofobiche. Consente a elettroni con un potenziale relativamente alto di entrare nella catena di trasporto degli elettroni saltando il Complesso I. Quindi, i Complessi I e II non operano in serie, anche se entrambi raggiungono lo stesso risultato: trasferiscono elettroni da substrati ridotti (NADH o succinato) al Coenzima Q.

### 1.2.3 Complesso III: Coenzima Q-Citocromo c ossido reductasi

Il Complesso III catalizza l'ossidazione del Coenzima Q (ridotto) da parte del Citocromo c. Contiene dieci polipeptidi e gruppi eme e un centro ferro-zolfo. Il Complesso III consente a una molecola di Coenzima Q ridotto di ridurre due molecole di Citocromo c. Tale meccanismo determina il passaggio protonico dalla matrice allo spazio intermembrana.

### 1.2.4 Complesso IV: Citocromo c Ossidasi

Contiene tredici polipeptidi e permette il trasferimento di elettroni dal Citocromo c all'ossigeno e il conseguente passaggio dei protoni. In particolare, il complesso IV catalizza l'ossidazione di quattro molecole consecutive di Citocromo c ridotto da parte dell'ossigeno molecolare, accettore

terminale degli elettroni lungo la catena respiratoria. L'ossigeno in questa fase viene ridotto liberando acqua.

Nel momento in cui una coppia di elettroni attraversa in successione i complessi I, III e IV, a ogni tappa viene rilasciata energia libera sufficiente per promuovere la sintesi di una molecola di ATP, grazie all'enzima ATP sintetasi (spesso indicato, per estensione, come Complesso V della catena respiratoria) a seguito del trasferimento di un gruppo fosfato ad una molecola di ADP.

### **1.2.5 Struttura e assemblaggio della Citocromo c Ossidasi**

Negli eucarioti, la Citocromo c Ossidasi (COX) o complesso IV, l'enzima terminale della catena respiratoria mitocondriale, è un metalloenzima multimerico che catalizza il trasferimento di elettroni dal Citocromo c all'ossigeno molecolare attraverso quattro nuclei metallici per l'ossidazione.

Il complesso IV dei mammiferi è un dimero i cui monomeri sono costituiti ciascuno da tredici subunità mentre nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* è costituito da undici subunità [6].

Nei mammiferi tre delle subunità che costituiscono l'enzima sono codificate dal DNA mitocondriale (MT-COI, II e III) mentre le restanti dieci subunità sono codificate da geni nucleari [7].

Le subunità I, II, III formano il core catalitico del complesso. Esso è circondato da un set di piccole subunità codificate dal DNA nucleare, importanti sia per l'assemblaggio che per il funzionamento dell'enzima nonché per la sua dimerizzazione [8]; tali subunità rivestono un ruolo importante anche nella modulazione dell'attività catalitica e nella protezione del core dalle specie reattive dell'ossigeno.

Dalle analisi cristallografiche emerge che l'enzima si ritrova nella membrana mitocondriale interna ed è attivo come dimero; ha due siti di legame per il rame (CuA and CuB), due gruppi heme (a e a<sub>3</sub>), uno ione zinco e uno ione magnesio.

Il sito CuA binucleare è localizzato nella subunità COXII mentre il sito CuB nella COXI: entrambi i siti contengono un gruppo heme.

Il flusso di elettroni va dal Citocromo c ridotto al sito CuA binucleare (heme a) e in seguito nel sito di legame per l'ossigeno all'interno del gruppo heme a<sub>3</sub> del sito CuB.

Per ogni elettrone trasferito, due protoni sono pompati attraverso la membrana interna, producendo in tal modo il gradiente elettrochimico protonico necessario per la successiva sintesi di ATP.

L'assemblaggio della COX richiede numerosi step che includono l'assemblaggio delle subunità sintetizzate nei ribosomi citoplasmatici e mitocondriali, e le successive modificazioni che portano all'incorporazione dei gruppi heme e l'inserimento di ioni rame, zinco e magnesio nel complesso multienzimatico nascente.

La biosintesi e l'assemblaggio della COX sono complicati dalla doppia codifica, mitocondriale e nucleare, delle subunità che la compongono.

Le subunità tradotte nei ribosomi citoplasmatici sono importate come precursori polipeptidici attraverso il complesso TOM [8]; l'importo delle proteine può però

avvenire anche sui ribosomi localizzati sulla superficie mitocondriale esterna, nei punti di contatto tra la membrana mitocondriale esterna e quella interna [9].

Più di trenta proteine agiscono in modo concertato per garantire la formazione sequenziale di intermedi di subassemblaggio nei tessuti dei mammiferi [10].

Alla realizzazione degli intermedi di assemblaggio (S1-S4) partecipa COX10, una farnesil transferasi che con COX15 è coinvolta nella sintesi dell'heme a.

SCO1, SCO2, COX11 e COX17 controllano l'incorporazione degli atomi di rame nelle subunità I e II; SURF1 facilita invece l'assemblaggio dall'intermedio S2-S3, consentendo l'aggiunta della subunità II al complesso costituito dalle subunità I e IV. La presenza della subunità III è necessaria per la stabilizzazione dell'enzima.

### **1.3 Importo proteico nel mitocondrio**

Come detto precedentemente solo l'1% delle proteine mitocondriali è codificato dal mtDNA. Questi polipeptidi, che presentano un'elevata idrofobicità, sono sintetizzati dai ribosomi mitocondriali e vengono inseriti nella membrana mitocondriale interna grazie al complesso di assemblaggio OXA (oxidative assembly machinery) [11,12]. Essi entrano a far parte dei complessi I, III, IV e V della catena respiratoria.

Tutti gli altri membri del proteoma mitocondriale sono invece codificati da geni nucleari e per svolgere il loro compito devono essere traslocati all'interno del mitocondrio [13].

L'importo mitocondriale delle proteine è un processo complesso, con pathways differenti secondo il tipo di substrato che deve essere importato (dimensioni molecolari, idrofobicità, caratteristiche chimico-fisiche) e dipendente dal distretto verso cui va indirizzato (matrice, membrana interna o esterna, spazio intermembrana).

Negli ultimi anni approcci sistematici di analisi proteomica integrati da studi biochimici e genetici, soprattutto in organismi modello come il lievito, hanno fornito un grande contributo alla dissezione di questo complesso fenomeno biologico. Possiamo dire che gran parte dei meccanismi di importo mitocondriale oggi noti sono un guadagno teorico recente. Tale conoscenza è pertanto ancora incompleta: per alcune proteine mitocondriali non è chiaro il meccanismo di importo impiegato e non tutte le proteine coinvolte in questi processi sono state identificate. E' inoltre facilmente ipotizzabile che vi siano altri processi coinvolti nell'attività d'importo proteico.

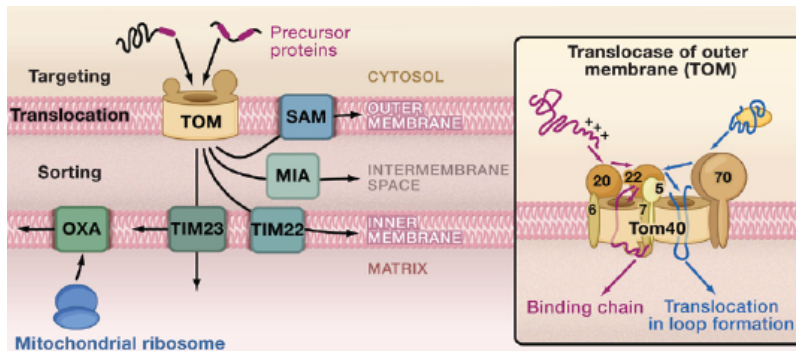
Nonostante ciò, quattro principali pathway sono stati fin qui descritti (FIGURA 2):

- 1) Pathway di presequenza mitocondriale verso la matrice e la membrana mitocondriale interna;
- 2) Pathway delle proteine carriers verso la membrana mitocondriale interna;
- 3) Pathway di trasporto delle proteine nella membrana mitocondriale esterna;
- 4) Importo proteico nello spazio intermembrana mediato da folding ossidativo.

La maggior parte delle proteine mitocondriali possiede una sequenza di sorting ben definita, generalmente localizzata all'estremità N-terminale della proteina e chiamata segnale di target o presequenza che viene tagliata dopo l'ingresso della proteina nel mitocondrio. Altri fattori contengono invece delle sequenze segnale "interne" che non vanno incontro a questa fase di clivaggio.

Il punto d'ingresso comune alla quasi totalità delle proteine mitocondriali è rappresentato dal canale di traslocazione del complesso TOM (translocase of the mitochondrial outer membrane) che media il passaggio attraverso la membrana mitocondriale esterna [14].

In seguito, i precursori delle proteine sono instradati in differenti pathways per raggiungere la destinazione intramitocondriale definitiva. Questi processi [15] saranno descritti brevemente in seguito, con particolare attenzione al macchinario di assemblaggio delle proteine dello spazio mitocondriale intermembrana.



**FIGURA 2** Pathways di indirizzamento delle proteine mitocondriali. La traslocasi della membrana mitocondriale esterna (TOM, nel riquadro) è la principale via di ingresso nel mitocondrio (riquadro). Successivamente i precursori proteici seguono differenti processi di smistamento: MIA (mitochondrial intermembrane space assembly machinery), OXA (oxidative machinery), SAM (sorting and assembly machinery), TIM (translocase of the inner membrane. Riprodotta da Cell. 2009 Aug 21;138(4):628-44.

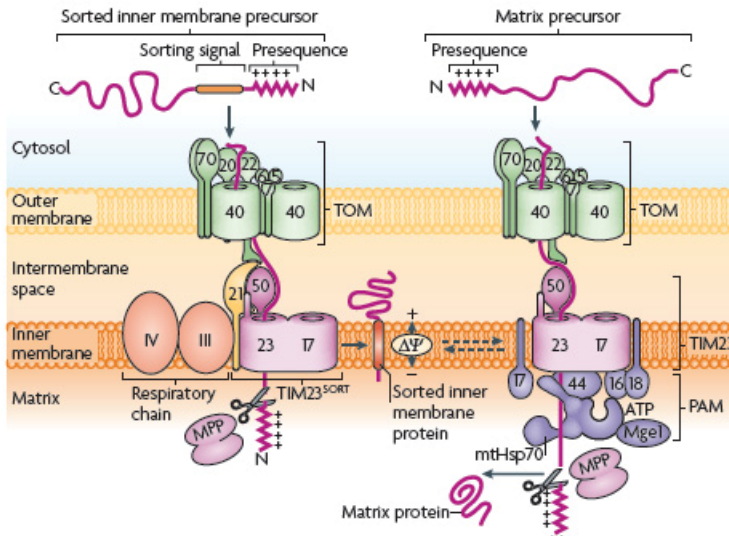
### 1.3.1 Pathway di presequenza

Le preproteine che seguono questa via contengono delle sequenze segnale che sono riconosciute in modo sequenziale dal complesso TOM e dal complesso TIM23 (traslocasi della membrana mitocondriale interna) [16]. Da qui possono essere rilasciate all'interno della membrana mitocondriale interna o completamente importate nella matrice grazie all'ausilio della traslocasi associata alla presequenza (PAM) [17]. Le proteine che si fermano nella membrana interna contengono una seconda sequenza d'indirizzamento a elevata idrofobicità che serve come segnale stop-transfer.

Mediante questa via sono importate la maggior parte delle proteine della matrice mitocondriale e in particolare gli enzimi metabolici (FIGURA 3).

Le membrane mitocondriali sono attraversate in forma lineare come alfa eliche o in conformazione estesa. Tra il complesso TOM e TIM23 sussiste un'interazione strutturale che guida il passaggio delle proteine verso la membrana mitocondriale interna e la matrice in modo regolato [18]. Inoltre, le proteine di raccordo tra i due complessi realizzano anche l'accoppiamento temporaneo di TIM23 con i complessi III e IV della catena respiratoria, supportando il potenziale di membrana che guida l'importo [19].

A livello della matrice la sequenza segnale e quella di smistamento viene clivata da specifiche peptidasi tra cui MPP (mitochondrial processing peptidase), IMP (inner membrane peptidase), Oct1 (octapeptidase) [20,21].

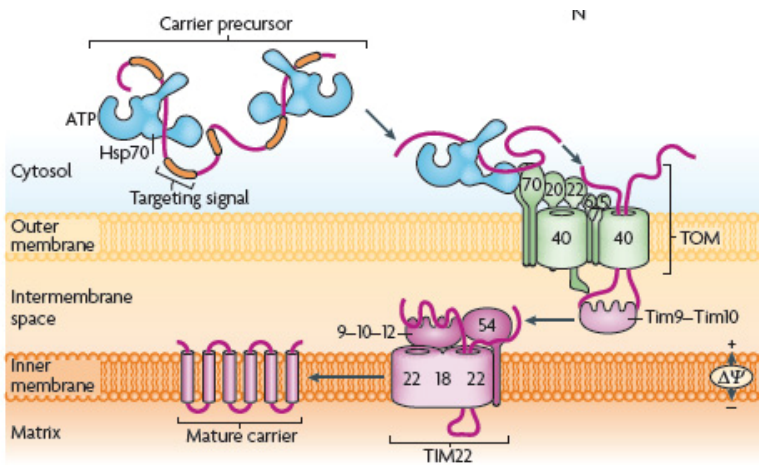


**FIGURA 3** Schema del pathway di presequenza per l'importazione di precursori proteici verso la matrice e la membrana mitocondriale interna. Dopo il passaggio attraverso il complesso TOM, l'importazione è regolata dall'interazione con il complesso TIM e sostenuta mediante l'accoppiamento energetico con la catena respiratoria. Riprodotta da *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Sep;11(9):655-67.

### 1.3.2 Pathway delle proteine carrier

Questo processo d'importazione riguarda proteine idrofobiche della membrana mitocondriale interna che non possiedono sequenze presegnale clivabili ma sequenze segnale multiple all'interno della loro struttura (FIGURA 4). Esempi di questa categoria sono proteine con numerosi domini transmembrana come i trasportatori per ADP/ATP e i carrier di molti metaboliti che agiscono da shuttle tra la matrice e lo spazio intermembrana [22]. Alcune proteine della classe HSP70 e HSP90 (heat shock proteins 70 e 90) agiscono da chaperon per questi substrati guidandoli verso il mitocondrio e promuovendo il loro ingresso, dopo il contatto con il complesso TOM [23,24]. L'attraversamento dello spazio intermembrana è reso possibile da alcuni complessi delle small TIM proteins (Tim9-10 e Tim8-13) che agiscono da chaperon. L'interazione con il complesso TIM22 determina l'inserimento definitivo nella membrana mitocondriale interna di questi fattori [25,26]. L'ingresso nel mitocondrio non è in forma lineare ma come loop.





**FIGURA 4** Il pathway delle proteine carrier. I precursori dei substrati di questo processo di importo contengono segnali interni riconosciuti da specifiche proteine chaperon. L'inserzione in membrana operata dal complesso TIM22 è dipendente dalla differenza di potenziale. Riprodotta da Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Sep;11(9):655-67.

### 1.3.3 Indirizzamento delle proteine verso la membrana esterna

Il processo d'importo verso la membrana esterna è, tra quelli elencati, uno dei meno chiari. Esso determina l'inserimento nella membrana mitocondriale esterna di proteine aventi differenti strutture secondarie [27]. Questi substrati sono privi di sequenze presegnale.

Per le proteine che assumono una conformazione a foglietto beta [28,29], il macchinario di importo prevede l'azione concertata del complesso TOM, di un gruppo di piccole proteine TIM che agiscono come chaperon e del complesso SAM (sorting assembly machinery) che agisce ancorando le proteine dal lato dello spazio intermembrana [30].

A questo gruppo di proteine appartengono alcuni canali mitocondriali e la porina (VDAC, voltage dependent anion channel), la più abbondante delle proteine della membrana mitocondriale esterna [31].

Le proteine in cui predomina la struttura ad alfa elica comprendono numerosi recettori mitocondriali. Il loro importo è ancora largamente inesplorato ma è nota l'interazione con TOM e con specifiche proteine di importo, tra cui Mmm1 (mitochondrial morphology 1) [32,33].

Al gruppo delle proteine della membrana esterna appartengono i membri del complesso MDM (mitochondrial distribution and morphology) [34], che stabiliscono le giunzioni tra mitocondri e reticolo endoplasmatico, strutture di grande importanza e recente scoperta per gli aspetti fisiologici e patologici della cellula [35]. Anche in questo caso l'ancoraggio in membrana vede il coinvolgimento del complesso SAM.

### 1.3.4 Assemblaggio dello spazio intermembrana

Alcune proteine dello spazio intermembrana sono importate mediante la via classica dei precursori proteici dotati di sequenza segnale. Il riconoscimento iniziale è operato dal complesso TOM e in seguito perfezionato da un gruppo di proteine TIM.

Altre proteine residenti dello spazio intermembrana sono invece caratterizzate da sequenze segnale interne che presentano caratteristici motivi cisteinici.

I substrati di questo pathway di importo, sono membri della famiglia delle piccole proteine TIM o fattori che agiscono come chaperon dei nuclei rameici indirizzati verso la catena respiratoria: non possiedono generalmente presequenza e hanno un basso peso molecolare, compresa tra 8 e 17 kDa [36-39].

Esempi di proteine con legami disolfuro sono Ccs1, Cox11, Cox12, Cox17, Erv1, Mia40, Qcr8, proteine ferro-zolfo dei complessi Rieske, Sco1, Sod1 e le piccole proteine TIM, che, come detto, agiscono come mediatori del trasporto di precursori idrofobici nell'IMS.

Questi fattori sono coinvolti nel trasporto delle preproteine attraverso lo spazio intermembrana e nella biogenesi dei complessi della catena respiratoria [40].

Nel citoplasma devono essere tenuti in uno stato ridotto, perché la formazione prematura dei ponti disolfuro previene il loro importo nel mitocondrio.

Dopo aver attraversato in forma lineare la membrana esterna mediante l'interazione con TOM, questi substrati sono ossidati a livello delle cisteine da MIA [41], il macchinario per l'assemblaggio delle proteine dello spazio intermembrana. Il meccanismo peculiare d'importo è la realizzazione di una "trappola ossidativa" che attua il folding di questi substrati, ne promuove la stabilizzazione nell'IMS impedendo il ritorno verso il citoplasma.

Il processo di ossidazione prevede il trasferimento di legami disolfuro tra i membri del MIA e i substrati in ingresso, in quello che è stato definito "disulfide relay system" (DRS) [42] (FIGURA 5).

#### 1.3.4.1 Il disulfide relay system

Uno screening sistematico di proteine mitocondriali in lievito ha portato all'identificazione di Mia40. Esperimenti condotti negli ultimi sei anni hanno portato alla caratterizzazione di questa proteina e a definirne il suo ruolo chiave nel DRS. Mia40 si trova nello spazio intermembrana e promuove la formazione di un ponte disolfuro con i substrati dei MIA in arrivo dalla membrana esterna. L'interazione si instaura a livello di una tasca idrofobica di Mia40. Mia40 stesso riconosce le sequenze segnale di questi fattori organizzate in coppie di motivi CX3C (come le piccole proteine TIM) oppure CX9C (tra cui Cox17 e Cox19), dove l'X rappresenta un residuo amminoacidico non cisteinico. Quindi Mia40 agisce come un recettore o una proteina scaffold a cui i substrati vengono legati attraverso ponti disolfuro transienti [43].

Questi legami non sono però creati *de novo* da Mia40. Infatti Mia40 si comporta da ossido-reduttasi [44] parte di una catena di reazioni che portano al trasferimento di ponti disolfuro. Erv1, il secondo membro fondamentale del ciclo catalitico del DRS, è invece una sulfidril ossidasi che genera un ponte disolfuro intermolecolare con Mia40 [45]. Tale legame è quindi scambiato (disulfide relay) e trasferito verso il substrato in cui, a livello delle cisteine conservate, si realizzano ponti disolfuro

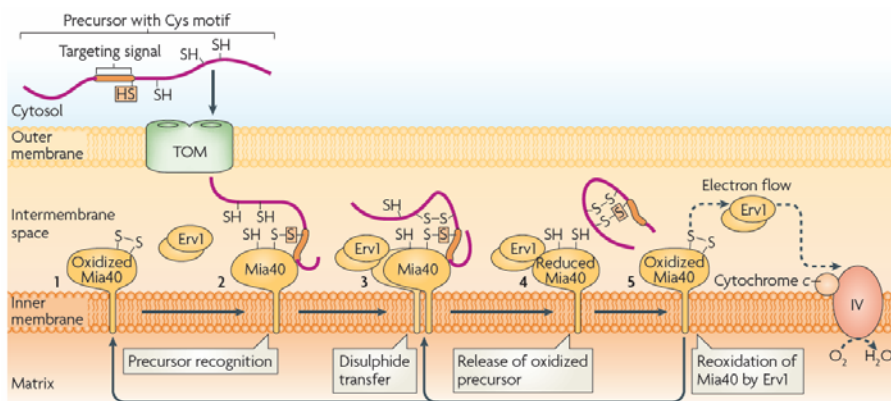
intramolecolari che lo stabilizzano nell'IMS (folding ossidativo). Gli elettroni liberati in questo passaggio di ossidazione rifluiscono dal substrato a Mia40 e quindi a Erv1. Erv1 trasferisce elettroni al Citocromo c nella catena respiratoria per cedere, infine, gli elettroni all'ossigeno molecolare [47,48].

Alternativamente, Erv1 può anche utilizzare l'ossigeno molecolare come accettore diretto di elettroni, liberando perossido di idrogeno [49].

Mia40 è ubiquitariamente espressa in funghi, piante e animali e contiene sei residui di cisteina essenziali, quattro dei quali sono organizzati in due motivi CX9C. La deplezione o la distruzione della funzione di Mia40 mediante mutagenesi, inibisce specificamente l'accumulo di piccole proteine ricche di cisteine dell'IMS, mentre l'importo mitocondriale di altre proteine rimane inalterato [41,50].

Nel lievito, Erv1 è una proteina dell'IMS con attività sulfidril ossidasi FAD-dipendente di 22 kDa [51], omologa ad ALR/GFER nell'uomo. Il precursore di GFER è esso stesso substrato di Mia40 per il proprio importo nell'IMS, interagendo mediante legami disolfuro [52].

Infatti è stato dimostrato che anche proteine più grosse di 22 kDa possono sfruttare questo pathway. Naturalmente, l'importo di Erv1 secondo un pathway MIA-dipendente rivela la capacità di questa via di importare precursori che hanno una sequenza segnale diversa da CX3C o CX9C [53].



**FIGURA 5** La macchina per l'assemblaggio dello spazio mitocondriale intermembrana (MIA) è responsabile dell'importo di piccole proteine che contengono specifici motivi cisteinici con gruppi sulfidrilici (-SH). Il macchinario MIA include il carrier dei disolfidi Mia40 e la sulfidril ossidasi Erv1. Erv1 ossida Mia40 trasferendo un legame disolfuro (S-S) al carrier (1). Mia40 in forma ossidata funziona da recettore per le proteine in ingresso e si lega ai motivi cisteinici formando un ponte disolfuro transiente (2). Mia40 trasferisce il legame disolfuro al substrato (3). Quindi Mia40 si riduce (4) e viene riossidato da Erv1 (5). L'ossidazione delle proteine è accoppiata alla rimozione di elettroni che fluiscono dal substrato a Erv1, attraverso Mia40, e da qui, mediante il Citocromo c, alla catena respiratoria. Riprodotta da Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Sep;11(9):655-67.

Mutanti di *Erv1* in lievito mostrano un'alterazione rilevante della membrana mitocondriale interna [54]. *ERV1p* sembra anche essere essenziale per la maturazione del cluster proteico Fe-S citoplasmatico, e gioca un ruolo importante nella biogenesi delle piccole proteine dell'IMS che sono importate attraverso il pathway *Mia40* dipendente; inoltre il Citocromo *c*, importato in modo indipendente da *Mia40*, è l'ossidante fisiologico di *Erv1* in lievito [45-47].

Esiste quindi una connessione tra la catena respiratoria e il processo di importo proteico mitocondriale mediato dalla comunicazione *Erv1*-Citocromo *c* [48].

#### 1.3.4.1.1 *GFER*, l'ortologo umano di *Erv1*

Nell'uomo, il gene *GFER* è localizzato sul filamento positivo del cromosoma 16 e in particolare occupa la regione tra il nucleotide 1,974,151 e il nucleotide 1,977,751 dal termine del braccio corto, per un totale di 3601 paia di basi [55-57].

La banda citogenetica corrispondente è 16p13.3-p13.12, intervallo contenente anche il locus per la malattia del rene policistico (PKD1).

Il promotore del gene possiede un'insolita architettura per i core promoters, in quanto è del tipo TATA-less ed occupa la posizione da -54 a +42 relativamente al punto di inizio della trascrizione.

Inoltre, il core promoter di *Alr* consiste di un iniziatore funzionale (*Inr*) e tre elementi ripetuti in tandem del tipo CTGGAGGC, che circondano l'*Inr* e sono tutti coinvolti nella trascrizione *Inr*-dipendente.

Il cDNA di *GFER* codificante per questa proteina presenta un'omologia dell'87% con *Gfer* di ratto e un 42% con *Erv1* di lievito

Esistono nei mammiferi, due isoforme di *GFER*.

La proteina più corta consiste di 125 aminoacidi (15 kDa) e manca dei primi 80 aminoacidi all'estremità ammino-terminale; la proteina più lunga consta di 205 aminoacidi (23 kDa).

L'isoforma da 15 kDa è presente apparentemente solo nel nucleo, mentre quella da 23 kDa è principalmente localizzata nel citoplasma e nell'IMS; probabilmente entrambe le forme vengono sintetizzate a partire dallo stesso mRNA ma utilizzando differenti codoni d'inizio per la sintesi proteica.

La proteina attiva si organizza in omodimeri di circa 30 kDa. Il dimero è il prodotto dell'interazione testa-coda di due legami disolfuro intermolecolari; ogni subunità è legata a una molecola di FAD.

In letteratura è disponibile una descrizione della struttura cristallografica della proteina *Alr* di ratto [58].

### **1.4 *Eziopatogenesi molecolare delle malattie mitocondriali***

Il termine "mitocondriopatie" definisce un gruppo eterogeneo di malattie aventi differenti modalità di trasmissione genetica, accomunate da un variabile grado di disfunzione della catena respiratoria mitocondriale, dimostrata tramite rigorosi metodi di indagine morfologica, biochimica e genetica.

Le malattie mitocondriali sono legate ad alterazioni della via finale comune del metabolismo energetico mitocondriale, la fosforilazione ossidativa (OXPHOS), che avviene a livello della membrana mitocondriale interna ad opera di quattro

complessi enzimatici della catena respiratoria (complessi I-IV) e dalla ATP sintetasi mitocondriale (complesso V).

Dal punto di vista clinico, le malattie mitocondriali presentano un fenotipo molto eterogeneo, ad andamento progressivo, con un'elevata variabilità nel grado e tipologia di interessamento di organi e sistemi. In alcune forme, le cosiddette miopatie mitocondriali, la malattia colpisce isolatamente il muscolo e all'analisi istologica del tessuto muscolare scheletrico si possono riscontrare ragged-red fibres, dovute all'accumulo di mitocondri in replicazione e fibre negative per la reazione istochimica dell'attività enzimatica della Citocromo c Ossidasi (fibre COX-negative).

Tuttavia il carattere ubiquitario dei mitocondri e la profonda dipendenza di diversi tessuti dall'attività della catena respiratoria mitocondriale, legata alle elevate esigenze metaboliche degli stessi tessuti, determinano in molti casi un interessamento multisistemico con compromissione del sistema nervoso centrale, degli organi neurosensoriali, dell'apparato endocrino, del tessuto cardiaco ed epatico, dell'apparato gastrointestinale ed ematopoietico.

Le particolari esigenze energetiche del sistema nervoso centrale e del muscolo striato scheletrico rendono questi tessuti maggiormente vulnerabili in caso di deficit della fosforilazione ossidativa: per queste ragioni il termine "encefalomiopia mitocondriale" è spesso utilizzato per indicare disturbi ad interessamento multisistemico e per estensione è sinonimo di mitocondriopatia [59].

Le disfunzioni energetiche organo-specifiche risultano in una varietà estrema di manifestazioni cliniche, in relazione all'età in cui gli organi bersaglio vengono colpiti.

Conseguenza comune delle alterazioni del metabolismo energetico mitocondriale è il frequente riscontro di un aumento dei livelli di acido lattico nel siero e nel liquor, che unitamente a quadri clinici sindromici riproducibili indirizzano verso il sospetto diagnostico di mitocondriopatia.

Le mitocondriopatie sono malattie genetiche a variabile trasmissione; sebbene l'eziologia molecolare di numerose malattie mitocondriali non sia ancora definita, la classificazione su base genetica ha il pregio di ricondurre quadri clinici eterogenei a cause ben definite, consentendo una solida fondazione della diagnosi e dello studio della patogenesi.

Dal punto di vista genetico, le patologie mitocondriali possono essere ricondotte a:

- mutazioni in geni mitocondriali, a insorgenza sporadica o a trasmissione matrilineare;
- mutazioni in geni nucleari, codificanti proteine con localizzazione mitocondriale, che seguono i pattern di ereditarietà tipici delle malattie genetiche mendeliane (FIGURA 6).

#### **1.4.1 Mutazioni nel genoma mitocondriale**

Il DNA mitocondriale umano si mantiene in copie multiple in ogni mitocondrio. Considerando la variabilità del numero dei mitocondri presenti nelle cellule di differenti tessuti, si può spiegare l'eterogeneità del contenuto di mtDNA nei diversi tipi cellulari.

La presenza di una variante nella sequenza del DNA mitocondriale può quindi presentarsi uniformemente in tutte le molecole (omoplasma) oppure nella stessa

cellula o tessuto si può registrare la presenza contemporanea di molecole normali e mutate. Tale fenomeno, detto eteroplasma, è un importante correlato genetico nelle mitocondriopatie dovute a mutazioni nel genoma mitocondriale. L'eteroplasma determina la compartimentalizzazione della mutazione del mtDNA e del difetto a essa associata, con conseguente perdita di specifiche funzioni tissutali. Inoltre a livello genetico e biochimico essa definisce un effetto soglia che previene il manifestarsi di un difetto funzionale entro un certo numero di molecole mutate di mtDNA. Il carico mutazionale in una cellula e in un tessuto è una delle ragioni chiamate a spiegare l'eterogeneità clinica che si osserva nelle malattie dovute ad alterazioni del DNA mitocondriale, perfino nella stessa famiglia. E' ragionevole pensare che altri fattori in grado di influenzare l'esito clinico possano essere modificatori genetici nucleari, fattori epigenetici e ambientali [60].

Sebbene negli ultimi anni l'interesse per le cause genetiche delle malattie mitocondriali si sia concentrato molto sui geni nucleari, il DNA mitocondriale continua ad essere un campo di indagine epidemiologicamente importante. Delle oltre 200 mutazioni puntiformi descritte nel mtDNA, la maggior parte è concentrata nei geni codificanti per i tRNA [61].

Le malattie mitocondriali causate da mutazioni in geni mitocondriali comprendono l'encefalomiopatia mitocondriale con acidosi lattica ed episodi ictali (MELAS, OMIM 540000) e la mioclono-epilessia con ragged red fibers (MERRF, OMIM 545000) causate in prevalenza da mutazioni puntiformi nei geni tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) (mutazione comune m.3243A>G) e tRNA<sup>Lys</sup> (mutazione comune m.8344T>G) del mtDNA, rispettivamente. La neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON, OMIM 535000), a esordio in età giovanile e a prevalenza maschile, è caratterizzata dalla perdita acuta o subacuta dell'acuità visiva per progressiva atrofia del nervo ottico ed è associata in più del 90% dei casi a mutazioni nelle posizioni nucleotidiche 3460, 11778 e 14484, che interessano rispettivamente le subunità ND1, ND4 e ND6 del Complesso I della catena respiratoria.

Sono state riscontrate molteplici mutazioni a carico dei geni mitocondriali codificanti per le subunità della Citocromo c Ossidasi.

Inoltre sono state descritte mutazioni a carico dei geni ATP6 e ATP8 causative di fenotipi clinici dell'adulto e del bambino come la NARP (Neuropatia, Atassia e Retinite Pigmentosa) e la sindrome di Leigh a trasmissione matrilineare (MILS).

Oltre alle patologie dovute a mutazioni puntiformi nei geni mitocondriali, sono relativamente comuni la sindrome di Kearns-Sayre (KSS, OMIM 530000) e la oftalmoplegia estrinseca cronica progressiva (CPEO, OMIM 157640), causate da macrodelezioni del DNA mitocondriale.

Né le dimensioni né la posizione della delezione da sole correlano con uno specifico fenotipo clinico che sembra invece essere influenzato dalle quantità relative di mtDNA deleto e wild-type residuo [59].

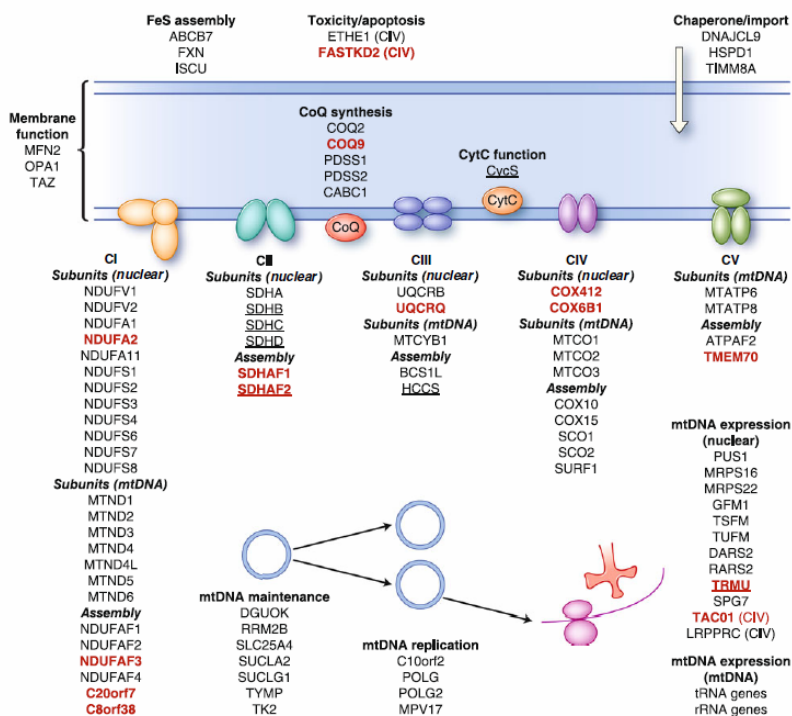
#### **1.4.2 Mutazioni in geni nucleari che codificano per proteine mitocondriali**

Più del 99% del proteoma mitocondriale è codificato da geni nucleari [62]. Anche se il numero di disordini mitocondriali causati da difetti geneticamente definiti in geni nucleari è ancora relativamente piccolo, negli ultimi anni sono stati fatti grandi

progressi. Adesso è possibile stilare una classificazione clinico-genetica di questi difetti in sette gruppi principali:

1. Difetti in geni nucleari che codificano elementi strutturali dei complessi della catena respiratoria [63-66].
2. Difetti in geni che codificano fattori di assemblaggio dei complessi della catena respiratoria [67-75].
3. Difetti in geni implicati nella replicazione e nella stabilità del mtDNA [76-79];
4. Difetti in geni che codificano per componenti essenziali del macchinario traduzionale mitocondriale. [80-82];
5. Difetti in geni che codificano fattori coinvolti nella biogenesi dei mitocondri, incluse le molecole che trasferiscono elettroni [83-85];
6. Difetti in geni che codificano per molecole importanti per l'importo di subunità strutturali funzionali della catena respiratoria [86];
7. Difetti in geni coinvolti nel catabolismo mitocondriale di composti tossici per l'OXPPOS [87-89].

In particolare, lo studio dei meccanismi di assemblaggio dei complessi della catena respiratoria sta riscontrando un crescente interesse: mutazioni nei geni che regolano questi processi sono state associate a gravi sindromi a esordio infantile.



**FIGURA 6** Geni associati a malattie mitocondriali. Sono state descritte mutazioni in geni codificanti per subunità strutturali e fattori di assemblaggio della catena respiratoria, geni coinvolti nell'omeostasi del DNA mitocondriale, nella sua

*replicazione ed espressione, geni che interessano la sintesi di trasportatori di elettroni come il Citocromo C e il Coenzima Q10 o i complessi Fe-S. Inoltre sono state identificate varianti patogenetiche in geni che regolano la sintesi proteica mitocondriale, l'apoptosi e le funzioni di membrana. I geni recentemente coinvolti nelle mitocondriopatie sono indicati in rosso. Sono sottolineati i geni che influenzano la catena respiratoria di cui non si conoscono mutazioni.*

### **1.4.3 Deficit di Citocromo c Ossidasi a trasmissione autosomica recessiva**

I deficit di Citocromo c Ossidasi (COX) rappresentano uno dei difetti più comuni della catena respiratoria umana e sono stati associati a mutazioni sia in geni del DNA mitocondriale (incidenza rara), sia in proteine codificate dal DNA nucleare che promuovono la biogenesi della COX (più frequenti) [7, 90] (TABELLA 1).

Tra le mutazioni riscontrate nei geni codificati dal mtDNA si ricordano varianti nei geni MTCOI-III, tRNA(Ser) e tRNA(Leu) mentre le mutazioni nei geni nucleari includono COX10, SCO1, SCO2, COX15, SURF1 e LRPPRC.

Il deficit di COX si manifesta con fenotipi clinici eterogenei, che vanno dalla miopatia isolata al disordine multisistemico severo, come il deficit di COX infantile fatale, la cardiomiopatia ipertrofica e miopatia e un deficit di COX reversibile confinato al muscolo scheletrico, con esordio che può variare dall'infanzia all'età adulta.

Non sono mai state identificate mutazioni nei dieci geni nucleari che codificano per subunità strutturali con l'unica eccezione di una mutazione recessiva nel gene che codifica per la subunità COX6B1 identificata nel 2008 [66].

Gli screening di mutanti in lievito con deficit respiratori hanno rivelato l'esistenza di un gran numero di geni nucleari che codificano per fattori accessori che regolano l'espressione della Citocromo c Ossidasi e la cui funzione è conservata anche nell'uomo.

Negli ultimi quindici anni la loro alterazione o deregolazione è stata associata a patologie umane, spesso pediatriche, che frequentemente coinvolgono cervello, muscolo scheletrico e cuore.

In particolare, sono state identificate mutazioni recessive nei geni *SURF1*, richiesto per la formazione degli intermedi di assemblaggio precoci, *SCO1* e *SCO2*, richiesti per l'apporto di rame, *COX10* e *COX15* essenziali per la biosintesi dell'heme a e *LRPPRC* richiesto per l'espressione delle subunità della COX.

Tra questi geni, quello coinvolto nel maggior numero di casi di deficit di COX infantili è *SURF1* che codifica per una proteina coinvolta nella biogenesi del complesso IV.

Come questi difetti genetici possano influenzare la funzione della catena respiratoria in differenti tessuti in determinati stadi dello sviluppo, è una domanda cruciale ancora aperta.



PROTEINA	FUNZIONE	FENOTIPO CLINICO	REFERENZE
<b>SURF1</b>	assemblaggio della COX dall'intermedio S2 all'intermedio S3	Sindrome di Leigh con severo deficit di COX; leucodistrofia isolata	67, 91-96
<b>SCO1</b>	trasporto di atomi di rame alla subunità 1 e 2 della COX	Encefalopatia mitocondriale	69
<b>SCO2</b>	trasporto di atomi di rame alla subunità 1 e 2 della COX	Cardiomiopatia ipertrofica infantile fatale; sindrome simile a quella di Leigh e cardiomiopatia; atrofia spinale muscolare	70,96,97
<b>COX10</b>	sintesi dell' <i>heme a</i> , farnesilazione del <i>protohemeB</i>	Leucodistrofia e tubulopatia; anemia e sindrome di Leigh; sordità sensorineurale e cardiomiopatia ipertrofica infantile fatale	68
<b>COX15</b>	sintesi dell' <i>heme a</i> , idrossilazione dell' <i>heme O</i>	Cardiomiopatia ipertrofica infantile fatale	71

**TABELLA 1:** *Elenco dei principali geni nucleari associati deficit del Complesso IV a trasmissione autosomica recessiva.*

#### 1.4.4 I difetti di importo mitocondriale nelle patologie umane

Poche malattie umane sono state attribuite a difetti nei geni coinvolti nell'importo proteico mitocondriale, sebbene siano state identificate mutazioni nelle sequenze di localizzazione mitocondriale di alcuni enzimi come il complesso della piruvato deidrogenasi.

Tra le patologie associate a specifici difetti nel trasporto mitocondriale è di particolare interesse la sindrome di Mohr-Tranebjaerg, una forma di mitocondriopatia associata al cromosoma X, caratterizzata da sordità e distonia causata da mutazioni nel gene *TMM8A* che codifica per la proteina DDP, coinvolta nel pathway mediato da MIA e localizzata nello spazio intermembrana [98,99].

Una seconda condizione è la forma autosomica dominante di paraplegia spastica ereditaria causata da mutazioni nella chaperon d'importo *HSP60* [100,101].



## 2 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il termine “mitocondriopatie” definisce un gruppo eterogeneo di malattie aventi differenti modalità di trasmissione genetica, accomunate da un variabile grado di disfunzione della catena respiratoria mitocondriale, dimostrata tramite rigorosi metodi di indagine morfologica, biochimica e genetica.

Questo studio parte dall’analisi di una famiglia di origine marocchina, nella quale genitori consanguinei hanno generato tre figli affetti da encefalomiopia mitocondriale con cataratta congenita, ipotonia muscolare progressiva, sordità e ritardo nello sviluppo.

Il progetto di ricerca è stato realizzato attraverso le seguenti fasi:

- definizione dei correlati clinici, istologici e biochimici della famiglia in esame. Questa fase raccoglie gli elementi clinici rintracciati nei probandi e caratterizza lo stato del metabolismo ossidativo mediante indagini istologiche e biochimiche condotte su tessuto muscolare e cellule derivate dai pazienti;

- identificazione di un nuovo locus associabile al fenotipo descritto. Considerata la presenza di genomi mitocondriali parzialmente deleti nel muscolo di uno dei pazienti studiati, viene eseguito uno screening preliminare dei geni in precedenza associati a disordini nel mantenimento del DNA mitocondriale. La ricerca di un nuovo difetto genetico è invece affidato a un genotyping genome-wide dei membri della famiglia mediante DNA microarrays e microsatelliti, seguito da una analisi di linkage;

- identificazione dello specifico difetto molecolare alla base del fenotipo descritto. Definiti i limiti della regione candidata, si considerano i geni potenzialmente coinvolti nella patologia. La selezione è affidata a tool bioinformatici per la predizione di proteine aventi una putativa localizzazione mitocondriale. L’analisi molecolare dei geni candidati è eseguita mediante sequenziamento diretto;

- caratterizzazione del difetto osservato mediante lo studio di colture primarie e di modelli cellulari realizzati ad hoc. Questa parte dello studio ha avuto come obiettivo l’indagine delle conseguenze funzionali della mutazione identificata. Gli studi molecolari, proteici e di immunolocalizzazione servono per indagare gli effetti della mutazione sulla funzionalità della catena respiratoria e dei suoi componenti nel tentativo di definire la catena patogenetica che collega il difetto molecolare con il fenotipo osservato nell’uomo.



### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 *Aspetti clinici*

I soggetti II-2, II-4 e II-5 sono nati da genitori marocchini consanguinei (cugini primi) dopo una normale gravidanza. I soggetti II-1 e II-3 sono in uno stato di apparente buona salute. L'anamnesi familiare non ha rivelato elementi pregressi di malattie neurologiche o di cataratta.

I tre fratelli affetti (II-2, II-4 e II-5) sono nati a termine e i loro pesi alla nascita erano appropriati. Tutti presentano cataratta congenita, ipotonia muscolare, perdita dell'udito sensorineurale e ritardo nello sviluppo.

Paziente II-2. Nel primo mese di vita nel paziente II-2 è stata riscontrata un'ipotonia assiale e lo sviluppo di cataratta bilaterale. All'età di un anno è stato sottoposto alla rimozione chirurgica della cataratta con parziale beneficio. Ha presentato segni di ritardo psicomotorio con capacità di deambulazione a 2 anni e di linguaggio a 3 anni. Ha frequentato la scuola elementare con l'aiuto di una insegnante di sostegno, mostrando difficoltà nello studio per via di un deficit visivo progressivo. A 11 anni, dopo diversi interventi chirurgici, ha sperimentato un severo indebolimento visivo conseguente al distacco della retina. Fin dall'età di 12 anni ha presentato una severa e progressiva perdita dell'udito e ptosi bilaterale. A 17 anni l'esame neurologico mostrava ipotonia muscolare generalizzata e ipotrofia, specialmente agli arti inferiori. Il paziente era in grado di camminare solo con un sostegno, non era capace di fissare lo sguardo e si notava un nistagmo rotatorio. La forza muscolare distale e prossimale era normale.

I riflessi profondi tendinei (DTR) degli arti superiori e inferiori erano deboli/assenti. Non si rilevava alcun deficit sensitivo somatico. L'esame audiologico mostrava un deficit uditivo bilaterale; la funzionalità cardiaca era normale. Le analisi del sangue hanno mostrato: ipoferritinemia (25 ng/ml range: 30-270), iperamilasemia (351 U/l range: 0-195) e iperCPKemia (195 U/l). La lattacidemia serica era elevata (24,9 mg/ml range 4,5-19).

E' stata eseguita la biopsia muscolare del bicipite brachiale sinistro. L'immagine MRI del cervello mostrava restringimento del corpo calloso (dati non disponibili).

Paziente II-4. Il paziente II-4 presenta cataratta congenita e ipotonia assiale progressiva. All'età di 17 anni l'esame neurologico rivelava ptosi unilaterale, lieve perdita di udito sensori-neurale, ipotonia ed ipotrofia muscolare diffusa. Le analisi del sangue rivelavano bassi livelli di ferritina serica, iperamilasemia e iperCPKemia. La lattacidemia serica era elevata (34,2 mg/ml range 4,5-19).

Paziente II-5. Il paziente II-5 presenta cataratta congenita e lieve ipotonia assiale rilevata dopo esame neurologico. Non è stata eseguita alcuna biopsia.

#### 3.2 *Analisi istologica dei campioni biotipici muscolari*

Dopo aver ottenuto il consenso informato scritto, sono state eseguite le biopsie dei soggetti II-2 e II-4 prelevando tessuto dal bicipite sinistro, in accordo con un

protocollo approvato dall'Institutional Review Board della "Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena" di Milano.

Il tessuto muscolare è stato congelato in isopentano raffreddato in azoto liquido e tagliato al criostato (10  $\mu\text{m}$ ). Sono state eseguite colorazioni standard con ematossilina eosina e tricromica di Gomori. Le attività enzimatiche della citocromo c ossidasi (COX) e della succinato deidrogenasi (SDH) sono state visualizzate in sezioni di muscolo come descritto precedentemente [102-104]. Le sezioni sono state osservate e fotografate con un microscopio Zeiss Axiophot-2 (Carl Zeiss, Germania).

Per l'analisi di microscopia elettronica i muscoli utilizzati sono stati tagliati in piccoli pezzi e fissati con 2.5% formaldeide e 2.5% glutaraldeide diluite in buffer 0.1 M di sodio cacodilato, pH 7.4 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pa.) per 5 h a 4°C. I campioni sono lavati in una soluzione di saccarosio 0.25 M, postfissati in 1% OsO<sub>4</sub> per 1 h a 4°C, deidratati attraverso un scala di etanoli acetone assoluto a temperatura ambiente, e inclusi in una mix di Epon/Araldite usando Eponate 12-Araldite 502 Kit (Ted Pella, Redding, Calif.). Sezioni ultrafini (75–85 nm) sono state tagliate con un ultramicrotomo, raccolte su retini coperti con formvar e colorate con uranile acetato e citrato di piombo. Le sezioni sono state osservate e fotografate con un microscopio a trasmissione Philips CM-100.

### **3.3 Indagini biochimiche**

Abbiamo compiuto un saggio spettrofotometrico per testare l'attività degli enzimi della catena respiratoria su un omogenato di tessuto derivato dal muscolo scheletrico del paziente II-2, dai fibroblasti (paziente II-4) e dai mioblasti in coltura (paziente II-2).

L'attività specifica dei singoli complessi della catena respiratoria è stata normalizzata sui valori della citrato sintetasi. In particolare, la Citocromo c Ossidasi (COX) è stata valutata spettrofotometricamente misurando la diminuzione dell'assorbanza a 550  $\mu\text{m}$  del Citocromo c ridotto, preparato mediante l'aggiunta di ditionnito di sodio a una soluzione in buffer K-phosphate 10 mM, pH 7.0. Dopo la riduzione, il citocromo c ridotto è stato dializzato per 5 h per eliminare l'eccesso di riducente [105].

La concentrazione proteica dei campioni è stata misurata mediante il metodo di Folin-Ciocalteu.

### **3.4 Analisi del DNA mitocondriale**

#### **3.4.1 Southern blot del DNA mitocondriale**

Il DNA mitocondriale (mtDNA) del soggetto II-2 estratto da tessuto muscolare congelato (attraverso metodiche standard) è stato sottoposto a digestione enzimatica con enzima di restrizione Pvu II a 37°C per 8 ore per linearizzare la molecola. Il prodotto di digestione è stato caricato su un gel di agarosio allo 0,8% e sottoposto a migrazione elettroforetica.

Dopo la denaturazione in NaOH e la successiva neutralizzazione, il DNA è stato trasferito su un filtro di nylon (blot) e fissati mediante calore (30 min a 120°C). La successiva ibridazione con una sonda specifica marcata con <sup>32</sup>P (disegnata nella

zona del D-loop, sequenza su richiesta) e la successiva esposizione su lastra fotografica ha consentito di evidenziare le molecole di DNA mitocondriale.

### **3.4.2 Long-PCR e subclonaggio dei frammenti ottenuti**

Per individuare la presenza di delezioni multiple nel DNA mitocondriale è possibile sfruttare la metodica di amplificazione PCR. In questo processo vengono impiegati come primer due oligonucleotidi (forward 7440-7465 e reverse completare 16135-16110) che delimitano un'ampia regione del DNA mitocondriale più soggetta alla formazione di delezioni. Il template consiste in un'aliquota di DNA estratto da muscolo (300ng/μl). Il protocollo per l'amplificazione prevede una denaturazione iniziale a 94°C per 2 min seguita da 25 cicli (94°C per 30 sec, 55°C per 30 sec, 68°C per 90 sec) e da una estensione finale a 72°C per 2 minuti.

In presenza di molecole delete di DNA mitocondriale si osserva, dopo la corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5%, la comparsa di bande multiple (di dimensioni comprese tra i 500 e i 2000 bp). Esse evidenziano la presenza di genomi mitocondriali difettivi per porzioni di differente ampiezza. Bande di peso molecolare minore sono favorite nel processo di amplificazione e corrispondono a molecole di DNA mitocondriale maggiormente delete.

I prodotti di PCR sono stati subclonati nel vettore TOPO-TA Cloning Vector (Invitrogen). La trasformazione (shock termico a 42°C per 30 sec) è avvenuta in cellule competenti di *Escherichia Coli* (TOP10, Invitrogen) selezionate su piastre di agar in presenza di ampicillina. Le singole colonie sono state amplificate e sequenziale sfruttando i primer universali T3-T7 complementari ad analoghe sequenze presenti nel vettore.

### **3.4.3 Sequenziamento del DNA mitocondriale**

L'intero DNA mitocondriale del soggetto II-2 è stato amplificato mediante 46 coppie di primer (MitoSeq Resequencing System, Applied Biosystems). I prodotti di amplificazione, dopo purificazione con ExoSAP, sono stati sequenziati mediante protocollo BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) su un sistema ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA)

### **3.5 Genotyping e analisi di linkage**

Il DNA genomico dei membri della famiglia in esame è stato estratto da sangue mediante il Flexigene DNA Extraction Kit (QIAGEN) e purificato su colonne Pure Link Genomic Kit (Invitrogen). La concentrazione e la purezza del DNA estratto è stata valutata spettrofotometricamente. La qualità del DNA estratto è stata ulteriormente verificata in elettroforesi su gel di agarosio.

I DNA genomici, così purificati, sono stati impiegati nel protocollo di amplificazione, frammentazione e marcatura GeneChip Human Mapping 50K XbaI (Affymetrix) secondo le specifiche fornite dal produttore. Il DNA marcato è stato ibridato su DNA chip genomici 50K Affymetrix in grado di interrogare più di 50.000 SNP omogeneamente sparsi nel genoma ad una distanza media di 12 kb.

I genotipi sono stati analizzati mediante il software GeneChip DNA Analysis System (GDAS v.3) e l'attribuzione del sesso dei campioni verificata considerando

lo stato degli SNP sul cromosoma X. Controlli di qualità sul processo di ibridazione e di chiamata (call) sono stati eseguiti come richiesto dal protocollo impiegato.

L'analisi di varianti di sequenza semplice (STR) è stata eseguita amplificando le regioni contenenti i microsattelliti target mediante PCR con primer commerciali (Linkage Mapping Set 2.5) o disegnati ad hoc. Per l'amplificazione è stata usata la TrueAllele PCR Master Mix (Applied Biosystems). I prodotti di amplificazione sono stati separati in una corsa elettroforetica capillare sull'ABI Prism Genetic Analyzer 3100 ed analizzati mediante software commerciali (Genemapper v4 e Peakscanner v1 di Applied Biosystems).

I dati di genotipizzazione derivanti dai suddetti esperimenti sono stati analizzati mediante il seguente procedimento.

Gli errori mendeliani sono stati individuati e rimossi con Pedcheck . Gli errori non-mendeliani sono stati identificati usando l'algoritmo MERLIN: 13 genotipi improbabili per campioni imparentati sono stati rimossi.

Abbiamo eseguito un'analisi di linkage parametrica con l'algoritmo ALLEGRO e con una nuova versione di MERLIN che permette, per i cluster di marker, di compensare il linkage disequilibrium (LD) tra marker adiacenti. Gli aplotipi sono stati ricostruiti con ALLEGRO versione 2 e presentati graficamente con HaploPainter.

Tutti i trattamenti dei dati sono stati compiuti utilizzando l'interfaccia EASYLINKAGE [106].

### **3.6 Analisi di sequenza dei geni candidati**

L'analisi di sequenza dei geni candidati è stata fatta a partire dal DNA estratto da sangue del soggetto II-2. Il padre è stato impiegato come soggetto-controllo.

Le sequenze esoniche e quelle introniche adiacenti dei geni individuati nell'analisi di linkage sono stati selettivamente amplificati usando primer specifici con una denaturazione iniziale a 95°C per 2 min, seguita da 35 cicli (94°C per 30 sec, 59°C per 30 sec e 72°C per 40 sec) ed una estensione finale a 72°C per 5 min (Invitrogen Platinum Taq Polymerase). Dove necessario l'amplificazione è stata favorita mediante l'aggiunta di DMSO 10% e Betaina 5M.

I prodotti di PCR, dopo essere stati verificati su gel di agarosio e purificati mediante trattamento con ExoSAP (37°C 15 min, 80°C 15 min) sono stati sequenziali come descritto sopra.

I primer utilizzati per amplificare GFER sono riportati nella seguente tabella (TABELLA 2).

<b>Nome del primer</b>	<b>Sequenza del primer (5'→3')</b>
GFER_1aF	TGGCTCCGCCTCCACACG
GFER_1aR	TCCACGTCTTGAAGTCGACG
GFER_1bF	TGACCCGGCAGGCCTTGC
GFER_1bR	AGGTTTCAGGGACAGGCAACC
GFER_2F	GATCGTCTGCAGGACTTTGG
GFER_2R	CATCCGTTTCTCTACGTTCC
GFER_3F	GGTGTAGTTCACAGCAGTGC
GFER_3R	TGAGACACAACAGGCTCTGG



GFER_2cDNAF	GTCGACTTCAAGACGTGGATG
GFER_1bis-cDNAF	CCTTGCGCGGGCAACATG
GFER_1RevX=>L	CAAGTCACAGGAGCCATCCTTC

**TABELLA 2** Primer impiegati nel processo di amplificazione, sequenziamento e clonaggio del gene GFER.

### 3.7 Estrazione dell'RNA e PCR quantitativa

L'RNA totale è stato estratto con Eurozol (Euroclone) da 50 mg di biopsia muscolare crioconservata dopo frantumazione e polverizzazione in capsule di porcellana sterile a freddo (azoto liquido). Gli acidi nucleici sono stati isolati mediante estrazione in cloroformio e centrifugazioni seriali per separare le proteine. Si è quindi proceduto alla precipitazione con isopropanolo. L'RNA ottenuto è stato dosato spettrofotometricamente e un'aliquota (circa 1 µg) è stata caricata su un gel di agarosio all'1% per accertarne l'integrità e la qualità.

Il DNA complementare (cDNA) è stato prodotto a partire da 1 µg di RNA totale retrotrascritto a 37°C per 1h mediante random examers-priming, utilizzando un kit commerciale (Ready-To-Go RT-PCR kit, Amersham Pharmacia).

La quantità di mRNA di GFER è stata quantificata mediante Real-Time PCR, utilizzando il saggio Taqman Hs00193365\_m1 e l'housekeeping GAPDH (Hs99999905\_m1) come controllo interno. L'amplificazione e l'analisi dei dati sono stati condotti su un sistema ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems).

L'entità dell'espressione di GFER è stata anche valutata in 20 diversi tessuti umani di controllo (Human Total Master Panel II, Clontech) secondo modalità analoghe a quelle precedentemente descritte.

### 3.8 Colture cellulari

I mioblasti e i fibroblasti primari sono stati ottenuti da biopsie muscolari umane di controllo e coltivati in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Euroclone) + 15% FBS (Fetal Bovine Serum) + Penicillina e Fungizone (Gibco). Le cellule dei pazienti (II-2 e II-4) sono state allevate in terreno di coltura Cloni (500 ml di F10, 0,5 ml di Gentamicina, 2 ml di Fungizone, 6 ml di Penicillina, 6 ml di Sodio Piruvato, L-Glutammina; 0,09 g di Insulina, 0,25 g di Fetuina, 0,25 g di Albumina, 250 µl di EGF, Uridina 50 mg) supplementati da FBS 15%.

Le cellule HEK293 sono state mantenute in coltura in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplementato con 1% di penicillina G (sale di potassio) e streptomina solfato (Gibco), 1% Fungizone (Gibco) e 15% di siero bovino fetale (FBS, Invitrogen-Gibco).

Tutte le cellule sono state seminate in piastre Φ10 e cresciute in incubatore al 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **3.9 Costruzione dei vettori di espressione e procedure di trasfezione**

Il cDNA wildtype per GFER è stato retrotrascritto dall'RNA totale estratto da tessuti muscolari controllo (derivati da Telethon Genetic Biobanks Network GTB07001E, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Milano) e clonato nel vettore di espressione pAcGFP-N2 (Clontech Laboratories, Mountain view, CA).

Il cDNA mutato (p.R194H) di GFER è stato retrotrascritto a partire da RNA totale isolato da un campione di tessuto muscolare di uno dei soggetti affetti e clonato nel vettore di espressione pAcGFP-N2.

Il vettore ricombinante è stato propagato nelle cellule ultracompetenti di E.Coli XL10-Gold (Stratagene, La Jolla, CA). I vettori sono stati verificati mediante taglio enzimatico, analisi PCR e sequenziamento diretto nelle varie fasi della loro realizzazione.

La trasfezione per la complementazione funzionale del fenotipo mutato con il vettore esprimente GFER wildtype è stata condotta in fibroblasti primari mediante elettroporazione utilizzando il kit Human Dermal Fibroblast (Amaya, Gaithersburg, MD).

La trasfezione in cellule HEK293 per introdurre i vettori esprimenti GFER wildtype e mutato (p.R194H) è stata eseguita mediante FuGene HD (Roche). Sono stati impiegati sia vettori in grado di esprimere la proteina nativa che in fusione con la proteina fluorescente AcGFP. La selezione per l'ottenimento di linee cellulari stabili è stata eseguita aggiungendo l'antibiotico G418 nel medium di coltura (500 ug/ml).

Il tasso di trasfezione ed espressione di GFER in fusione con la proteina fluorescente AcGFP è stato valutato mediante microscopia a fluorescenza e citofluorimetria (analisi FACS, dati non mostrati). Nelle HEK293 trasfettate con i vettori per l'overespressione di GFER, i livelli di trascritto non hanno presentato differenze significative tra wildtype e mutato alla PCR quantitativa (dati non mostrati).

### **3.10 Immunocitochimica**

I mitocondri sono stati evidenziati in colture di fibroblasti e mioblasti e in cellule HEK293 con uno staining con MitoTracker Red (Invitrogen) per 30 min a 37°C.

Per il doppio immunostaining, le cellule sono state lavate con PBS e quindi fissate con paraformaldeide al 4% per 2 minuti, lavate con PBS e permeabilizzate con Triton X100 0,2% per 5 minuti. In seguito le colture sono state incubate con l'anticorpo primario overnight a 4°C per valutare sia l'espressione di GFER che quella di TIMM13, COX17, COX6B1 che vengono importate con il sistema GFER.

Gli anticorpi primari utilizzati per riconoscere selettivamente GFER, TIMM13 e COX17 sono anticorpi policlonali prodotti in coniglio (PTG) mentre quello per riconoscere la COX6B1 è un anticorpo monoclonale prodotto in topo (Molecular Probes, Invitrogen).

Dopo ripetuti lavaggi in PBS, segue l'incubazione per 2 ore a temperatura ambiente al buio in PBS con l'anticorpo secondario coniugato alla R-Phycoerythrin (RPE) oppure con anticorpo secondario coniugato con TRITC (1:100; DAKO).

Dopo opportuni lavaggi in PBS, i vetrini sono stati fissati con glicerolo e colorati con DAPI (Sigma) ed infine osservati in microscopia confocale (Leica).

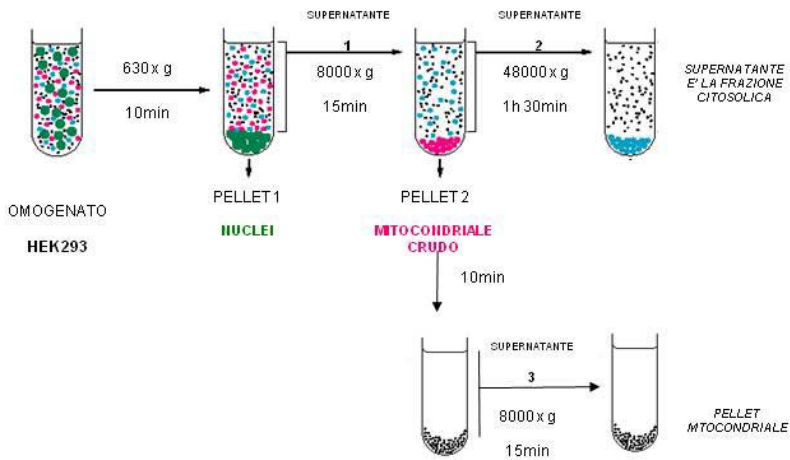
### 3.11 Isolamento dei mitocondri

L'isolamento dei mitocondri è stato eseguito modificando un metodo precedentemente pubblicato [107] (FIGURA 7).

Per ottenere un pellet mitocondriale adatto agli studi proteici sono state raccolte circa 10 milioni di cellule per ogni condizione da analizzare ed omogenizzate passandole attraverso l'ago di una siringa 27G per 40 volte in un buffer contenente saccarosio 250 mM, Tris 10 mM ed EGTA 0.1 mM, a pH di 7.4 e centrifugate a 630 x g per 10 minuti.

Il supernatante (SUPERNATANTE 1) è stato separato dal pellet contenente sostanzialmente i nuclei delle cellule ed i residui cellulari più pesanti e centrifugato a 8000 x g per 15 minuti per produrre un primo pellet mitocondriale "crudo" che attraverso successive centrifugate sarà ulteriormente purificato. Quindi, il supernatante ottenuto (SUPERNATANTE 2) è stato ulteriormente centrifugato a 48000 x g per 1 h e 30 minuti e il supernatante finale ottenuto è la frazione citosolica. Il pellet mitocondriale crudo è stato lavato una volta con il buffer di estrazione e sedimentato a 630 x g per 10 minuti.

Il supernatante rimanente (SUPERNATANTE 3) è stato ulteriormente centrifugato a 8000 x g per 15 minuti e il pellet residuo è la frazione mitocondriale.



**FIGURA 7** Procedura di isolamento della frazione mitocondriale da cellule impiegate in questo studio.

### **3.12 Analisi Western blot**

Gli estratti proteici derivati dalle colture primarie e dalle cellule HEK293 sono stati analizzati mediante SDS-PAGE senza l'aggiunta di agenti riducenti nel tampone di caricamento (Sample buffer).

I campioni proteici sono stati denaturati a 85°C in Sample buffer.

Per le analisi in condizioni riducenti, durante la preparazione del campione è stato aggiunto DTT (ditiotreitolo) a una concentrazione finale di 50mM mentre le analisi in condizioni non riducenti sono avvenute senza aggiunta di DTT.

Dopo un lavaggio con TBS-T (0.1% Tween-20 in TBS 1X), le membrane sono incubate con l'anticorpo primario nell'opportuno tampone. Dopo ripetuti lavaggi in TBS-T, le membrane di nitrocellulosa sono incubate, in opportuno tampone, con l'anticorpo secondario anti-IgG coniugato con perossidasi (IgG-HRP), che permette la successiva analisi quantitativa delle bande proteiche con reagenti chemiluminescenti: le bande immunoreattive sono in tal modo rilevate mediante chemiluminescenza ed impressionate su di una lastra fotografica (tecnica ECL, reagenti di sviluppo forniti da Amersham).

GFER è stato saggiato utilizzando un anticorpo policlonale sviluppato in coniglio (Proteintech Group, Manchester, UK). La proteina di fusione GFER-GFP è stata rilevata utilizzando il Living Colour GFP Monoclonal antibody (Clontech).

Le proteine dello spazio intermembrana, sono state saggate in condizioni riducenti su gel di poliaccrilammide Tricine- SDS al 10% (Schagger e von Jagov) e le bande sono state rilevate mediante anticorpi commerciali (TABELLA 3).

Antigene	Reattività	kDa	Ab I Diluzione	Ab II Host	PRODUTTORE
<b>BETA ACTINA</b>	H-M-R	45	1:500	MOUSE	AbD SEROTEC
<b>HSP60</b>	H-R-M	60	1:200	MOUSE	SANTA CRUZ
<b>COXIV</b>	H	19	1:300	MOUSE	INVITROGEN
<b>GFER</b>	H-M	15 (30)	1:400	RABBIT	PROTEIN TECH GROUP
<b>COX6B1</b>	H-R-M	10	1:600	MOUSE	INVITROGEN
<b>COX11</b>	H	31	1:1000 - 1:2000	MOUSE	ABNOVA
<b>COX17</b>	H-M	7	1:700	RABBIT	PROTEIN TECH GROUP
<b>COX19</b>	H	14	1:250	RABBIT	SIGMA
<b>SCO1</b>	H	35	1:800	MOUSE	PROTEIN TECH GROUP
<b>SCO2</b>	H	29	1:1000 - 1:2000	MOUSE	ABNOVA
<b>TIMM8A</b>	H	10	1:200 - 1:1000	MOUSE	ABCAM
<b>TIMM9</b>	H-M	10	1:1000	RABBIT	PROTEIN TECH GROUP
<b>TIMM13</b>	H	11	1:2000 - 1:3000	MOUSE	ABNOVA

**TABELLA 3** Elenco degli anticorpi usati per le analisi immunocitochimiche e Western blot in questo studio (H: Human, M: Mouse, R: Rat).



## 4 RISULTATI

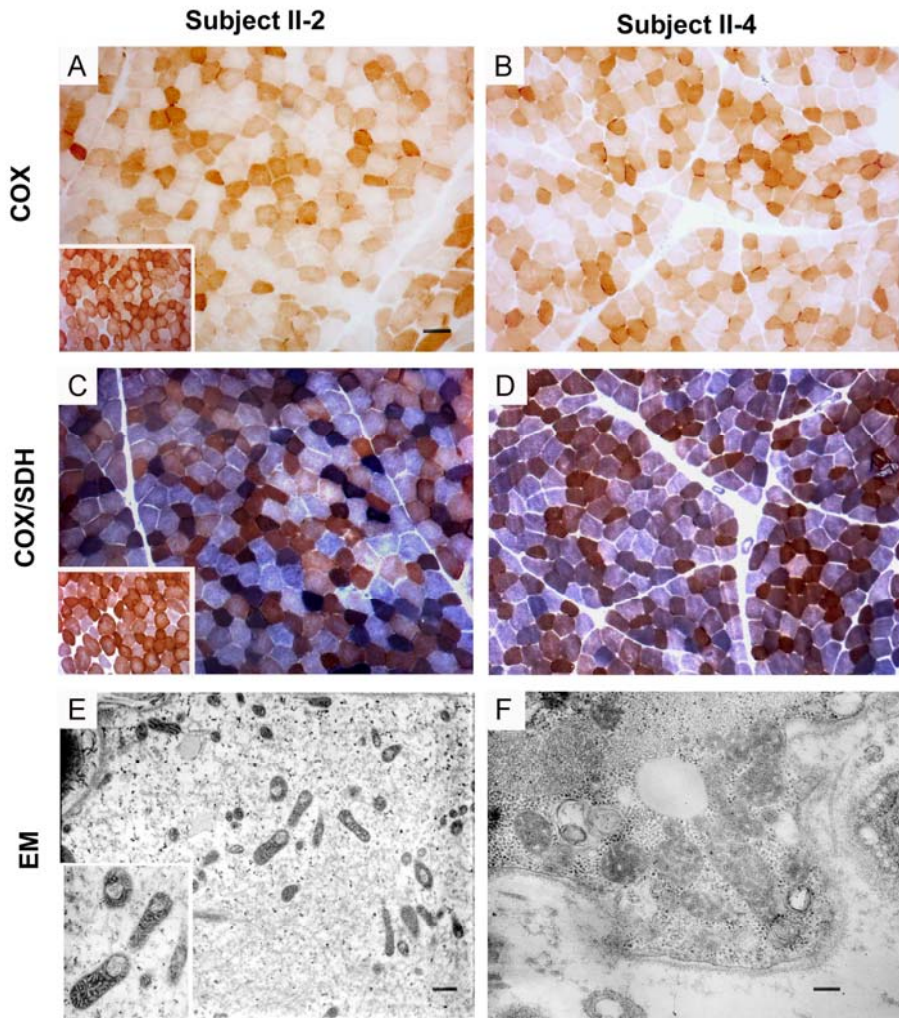
I soggetti esaminati in questo studio (II-2 e II-4) appartengono a una famiglia di origine marocchina e sono figli di cugini primi. L'insieme dei rilievi clinici ha suggerito un interessamento mitocondriale che abbiamo studiato dal punto di vista istologico, biochimico e genetico.

### ***4.1 Studi istologici e analisi ultrastrutturale***

L'esame istologico condotto sulla biopsia del muscolo brachiale sinistro del soggetto II-2 ha evidenziato la presenza di numerose fibre COX negative, molte delle quali con un aumentato staining per SDH.

Anche nel soggetto II-4 la reazione istochimica per la Citocromo c Ossidasi ha evidenziato la presenza di fibre COX negative, sebbene in numero inferiore rispetto al fratello. La doppia colorazione COX-SDH mostra alcune fibre intensamente colorate per la SDH, sebbene la quantità di fibre COX-/SDH+ sia inferiore rispetto al soggetto II-2.

L'analisi ultrastrutturale del muscolo del paziente II-2 ha rivelato importanti alterazioni nella morfologia mitocondriale. Oltre ad apparire ingrossati, i mitocondri presentano un anomalo ispessimento delle creste mitocondriali. In un sottogruppo di mitocondri, l'osservazione ad un maggiore ingrandimento ha messo in luce un fenomeno di vacuolizzazione, probabile conseguenza di un'abnorme dilatazione dello spazio mitocondriale intermembrana (FIGURA 8).



**FIGURA 8** Analisi istochimica e ultrastrutturale del muscolo scheletrico dei probandi. (A-D) L'istochimica per la COX mostra la presenza di molte fibre COX-negative nei probandi II-2 e II-4 (A e B). La doppia reazione COX/SDH mostra fibre sparse con aumento del segnale SDH, indicanti proliferazione mitocondriale, nel paziente II-2. Il deficit di COX è confermato nei due pazienti (C e D rispettivamente). I riquadri nei pannelli A e C rappresentano i controlli normali. (E-F) L'analisi al microscopio elettronico mostra molti mitocondri con creste allargate, alcuni dei quali presentano una evidente vacuolizzazione (E).  
 Scale bars: 25 micron (A–D), 700 nm (E), o 250 nm (F).



## 4.2 Studi biochimici

Per valutare l'efficienza della catena respiratoria mitocondriale abbiamo dosato l'attività dei complessi della catena respiratoria in differenti tessuti: muscolo (campione biptico), fibroblasti e mioblasti in coltura. Tutti i dati ottenuti sono stati normalizzati all'attività della citrato sintetasi (CS).

I singoli complessi della catena respiratoria nel tessuto muscolare del soggetto II-2 risultano generalmente ridotti. In particolare il complesso I e il complesso IV mostrano una notevole diminuzione dell'attività catalitica residua (rispettivamente 56% e 45%).

Il deficit di attività della Citocromo c Ossidasi è risultato evidente anche nei mioblasti derivati dalla biopsia del soggetto II-2. Il confronto con gli specifici valori di riferimento ha confermato una attività residua al di sotto del 50%.

Il dosaggio effettuato sui fibroblasti in coltura del soggetto II-4 ha mostrato una riduzione nell'attività nel complesso IV meno marcata (attività residua pari al 66%) rispetto a quanto osservato nel fratello (TABELLA 4).

	Complesso I	Complesso II	Complesso I+III	Complesso II+III	Complesso IV
<b>Muscolo Controllo</b>	16,2± 2,6	11,6± 1,8	34,6± 7,8	12,3± 2,7	44,8± 5,6
<b>Muscolo Pz. II-2</b>	5,6	7,2	16,4	8,0	20,1
<b>Fibroblasti controllo</b>	68,8± 2,8	6,9±1,2	225,8± 70,8	4,9± 1,3	44,8± 4,7
<b>Fibroblasti Pz. II-4</b>	54,8	6,1	311,3	4,9	31,7
<b>Mioblasti controllo</b>	50,9± 8,5	9,4± 2,2	209,4± 27,1	6,0± 1,2	58,8± 7,4
<b>Mioblasti Pz. II-2</b>	33,8	4,4	255,6	5,4	27,8

**Tabella 4** Analisi biochimica dell'attività dei complessi della catena respiratoria nei tessuti dei probandi e nei relativi controlli. Le attività sono espresse come nM/min per mg di proteine. Le determinazioni sono state effettuate in triplicato.

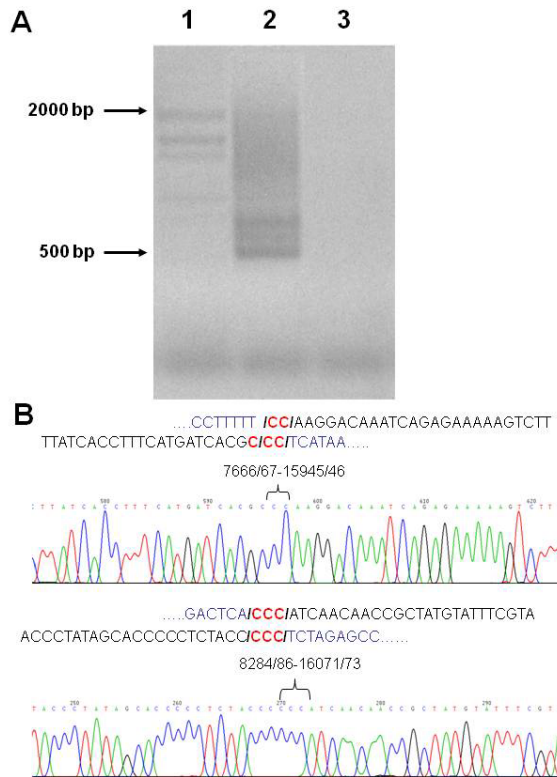
### **4.3 Analisi del DNA mitocondriale**

La presenza di un quadro biotipico e biochimico che mostra un netto deficit nel complesso IV della catena respiratoria mitocondriale ci ha spinto a valutare il DNA mitocondriale dei soggetti affetti.

L'analisi Southern blot del DNA estratto da muscolo del soggetto II-2 non ha evidenziato differenze rispetto ai controlli da un punto di vista quantitativo o qualitativo.

Lo stesso DNA è stato utilizzato come template in una reazione di PCR specifica per evidenziare molecole di DNA mitocondriale parzialmente delete. Questo approccio ci ha permesso di osservare la presenza di delezioni multiple a carico del genoma mitocondriale nel soggetto II-2 (FIGURA 9A). Lo stesso saggio condotto su DNA estratto da sangue del soggetto II-4 ha dato esito negativo.

Per confermare la natura deletiva delle bande, i prodotti di PCR sono stati subclonati e quindi sequenziati. La sequenza di alcuni cloni ha rivelato punti di breakpoint caratteristici negli eventi di delezione del DNA mitocondriale. In particolare sono stati osservati i punti di rottura corrispondenti alle posizioni nucleotidiche 8282/85-16071/73 e 7665/67-15947/45 del mtDNA (FIGURA 9B).



**FIGURA 9** Analisi del DNA mitocondriale. (A) Evidenza di delezioni multiple del DNA mitocondriale nel tessuto muscolare mediante analisi PCR. Lane 1: probando II-2; lane 2: controllo positivo (Paziente con delezioni multiple associate a mutazioni in POLG1); lane 3: controllo negativo (soggetto sano). (B) I prodotti di PCR, dopo subclonaggio in vettori TOPO-TA sono stati sequenziati. Gli elettroferogrammi mostrano due dei breakpoints individuati nel DNA mitocondriale del soggetto II-2.

Per escludere la presenza di variazioni del DNA mitocondriale potenzialmente associabili al deficit biochimico osservato, abbiamo eseguito l'amplificazione e il sequenziamento dell'intero genoma mitocondriale del soggetto II-2. Le varianti individuate (dati non riportati) confrontate con la sequenza di riferimento del mtDNA e con alcune banche dati disponibili (mtDB, Human Mitochondrial Genome Database, <http://www.genpat.uu.se/mtDB/> e MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database, <http://www.mitomap.org>, 2008) non risultano essere rilevanti per la patogenesi della malattia (TABELLA 5).

mtDNA variation	Amminoacid Change	Region	Frequency
T72C		D-loop	1794-71
T204C		D-loop	1741-23
A263G		D-loop	6-1861
C7TC6		D-loop	
A1438G		12S	84-2620
A2706G		16S	525-2178
G4580A	Syn	ND2	2627-77
A4769G	Syn	ND2	30-2674
C7028T	Syn	COI	505-2199
A8860G	Thr-Ala	ATP6	6-2698
A13861G	Thr-Ala	ND5	2694-10
A15326G	Thr-Ala	CYTB	17-2687
C15904T		tRNA Thr	2627-76
T16298C		D-loop	1698-169

**Tabella 5** Varianti identificate nel DNA mitocondriale del soggetto II-2 in omoplasma. La tabella mostra i cambi nucleotidici, gli eventuali effetti a livello proteico, il gene mitocondriale che le ospita e per quante volte le varianti sono state descritte in accordo con il mtDB, Human Mitochondrial Genome Database (<http://www.genpat.uu.se/mtDB/>),

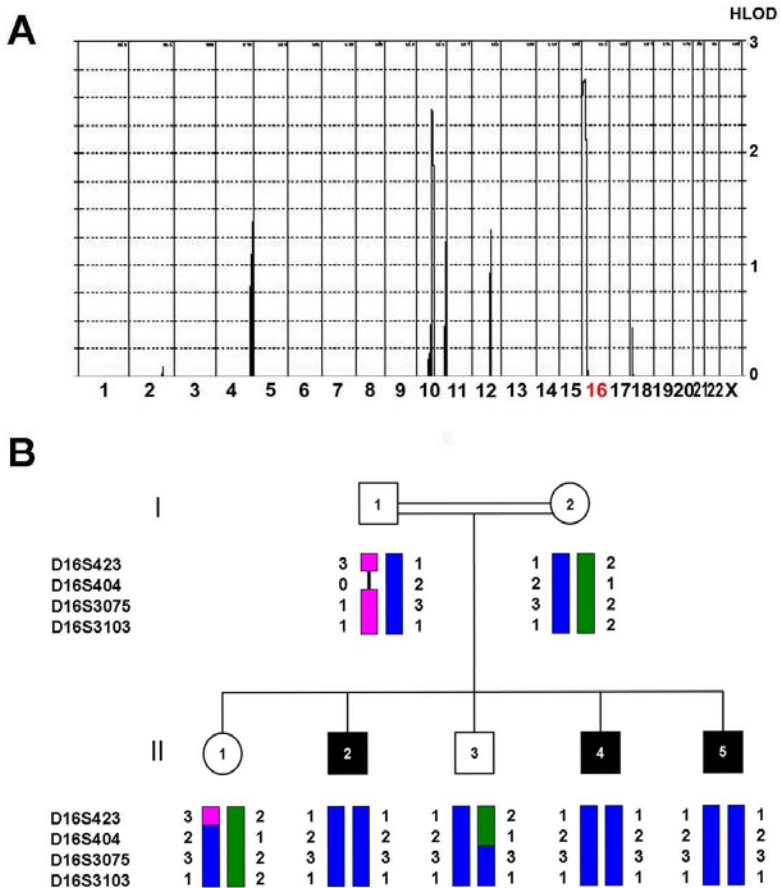
#### 4.4 Studio dei geni nucleari e analisi di linkage

Per escludere il coinvolgimento di geni causativi di patologie associate a delezioni multiple del DNA mitocondriale, le sequenze esoniche ed introniche adiacenti dei geni *POLG1*, *PEO1*, *ANT1*, *POLG2* sono state analizzate mediante sequenziamento diretto [108] con esito negativo. L'eventuale coinvolgimento dei loci che ospitano questi geni (sedi potenziali di eventi di riarrangiamento quali duplicazioni, inserzioni e delezioni) è stato escluso attraverso analisi con microsatelliti (dati non mostrati).

Abbiamo quindi intrapreso un'analisi di linkage mediante genotipizzazione genome-wide alla ricerca di nuovi geni causativi del fenotipo descritto. L'analisi dei dati prodotti da microarray genomici ibridati con il DNA proveniente dai membri della famiglia studiata ha evidenziato tre regioni condivise da tutti gli affetti di cui

solo una in autozigosità sul cromosoma 16 (lod score pari a 2,657, FIGURA 10A). La rappresentazione grafica dei genotipi mediante HaploPainter ha permesso di ricostruire questa porzione del cromosoma 16 e di attribuirne gli alleli in base alla discendenza ed al fenotipo.

I confini della regione identificata sono stati ulteriormente rifiniti grazie all'analisi con microsatelliti (FIGURA 10B).



**FIGURA 10** Analisi di linkage nel pedigree oggetto dello studio. (A) Multipoint linkage analysis dopo genome-wide scan eseguito con Affymetrix GeneChip Human Mapping 50K Array Xba240. (B) Pedigree della famiglia in esame e aplotipo del locus del gene GFER. Gli individui affetti sono indicati con simboli neri.

Il locus identificato è di 12,1 Mb e comprende 271 geni annotati. Per capire quali di essi possono codificare per proteine a localizzazione o funzione mitocondriale abbiamo utilizzato Maestro, uno strumento bioinformatico per la predizione di putativi geni mitocondriali [62]. Sfruttando questo algoritmo siamo stati in grado di

ottenere una scala di priorità dei geni potenzialmente causativi del fenotipo mitocondriale osservato. Questa gerarchia dei geni ha suggerito un ordine da impiegare per l'indagine genetica dei geni candidati.

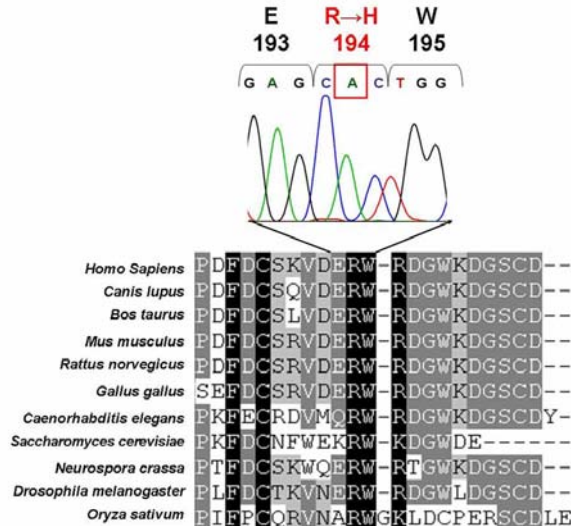
Abbiamo quindi amplificato e sequenziato gli esoni, le sequenze introniche adiacenti e le regioni non tradotte al 5' e al 3' di dieci geni, codificanti per proteine indicate da Maestro (lo score è riportato in parentesi) come polipeptidi a localizzazione mitocondriale: *NDUFB10* (29,9), *DNAJA3* (26,6), *TRAP1* (15,6), *MAGMAS* (14,1), *FAHD1* (14,5), *NTHL1* (8,7), *NME4* (7,1), *NUBP2* (5,8), *MPG* (3,1), *GFER* (6,2).

L'analisi dei primi nove geni ha evidenziato polimorfismi con frequenze alleliche note, varianti introniche o sostituzioni nucleotidiche silenti. Tra le varianti non note e non silenti, nessuna mostrava la segregazione con il fenotipo descritto nella famiglia.

Il sequenziamento diretto del gene *GFER* ha invece rivelato nel soggetto II-2 una transizione omozigote c.581G>A nell'esone 3. Il padre è risultato invece eterozigote nella medesima posizione.

La variante cosegrega con il fenotipo: è presente in omozigosi nel DNA dei pazienti mentre è eterozigote nei genitori e nei fratelli sani.

Questa variazione nucleotidica produce nella proteina codificata da *GFER* la sostituzione dell'arginina in posizione 194 con una istidina (p.R194H). L'arginina sostituita è altamente conservata dal punto di vista evolutivo nei geni orloghi di molte specie (FIGURA 11).



**FIGURA 11** Allineamento multiplo con CLUSTALW delle sequenze della regione di *GFER* che contiene il residuo amminoacidico mutato nella famiglia in esame. L'elettroferogramma della mutazione c.581G>A identificata nell'esone 3 di *GFER* produce la sostituzione p.R194H.

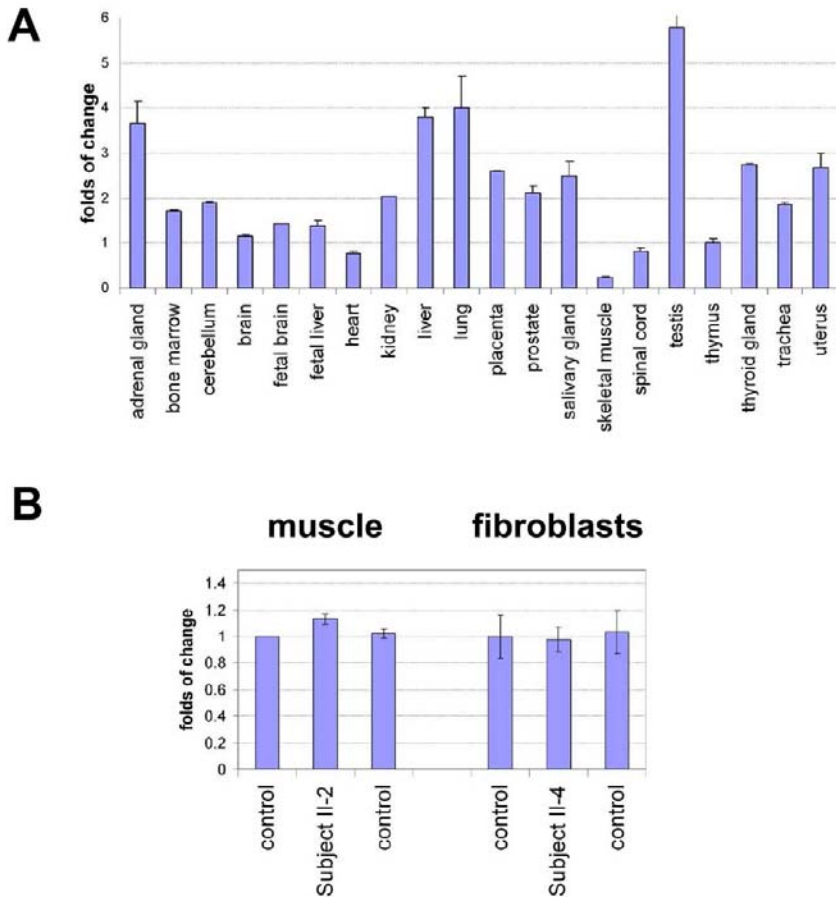
La putativa mutazione è stata verificata mediante saggio di restrizione PCR-RFLP (dati non mostrati) ed è stata ritrovata sequenziando il prodotto di amplificazione dell'intero cDNA prodotto a partire dall'RNA estratto dal tessuto muscolare del soggetto II-2.

Abbiamo ricercato la variante in 380 controlli caucasici e 183 controlli indipendenti di origine araba (di cui 156 marocchini) senza trovarla in nessuno degli alleli studiati (in totale 1126 alleli).

#### ***4.5 Studi di espressione***

Dati ottenuti mediante PCR quantitativa hanno mostrato che GFER è ubiquitariamente espresso e presente ad alti livelli in molti tessuti umani soprattutto in fegato e testicoli, ma anche in cuore, reni, pancreas e cervello.

La valutazione dell'espressione di GFER nel muscolo del soggetto II-2 non ha mostrato differenze rispetto a campioni di muscolo di controllo (valori mediati) suggerendo che la mutazione non influisce sulla stabilità del trascritto. I bassi livelli di espressione del gene GFER nei tessuti muscolari della nostra banca, confermano quanto osservato sul pool di muscoli controllo del pannello commerciale (i livelli di espressione nel rene sono stati utilizzati come normalizzatore comune ai due esperimenti) (FIGURA 12).



**FIGURA 12** Studi di espressione del gene *GFER*. (A) Analisi quantitativa RT-PCR dell'espressione di *GFER* in venti tessuti umani controllo. *GAPDH* è stato impiegato come housekeeping. I livelli di espressione del timo sono stati utilizzati per la normalizzazione dei dati. Tutte le determinazioni sono state effettuate in replicati ( $n=6$ ). (B) Analisi quantitativa RT-PCR dell'espressione di *GFER* nel muscolo e nei fibroblasti di pazienti e controlli. I dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard.

#### 4.6 Protein modelling

*GFER* è una proteina di mammifero omodimerica. La struttura dimerica e l'estrema stabilità di *GFER* sono attribuibili ad un insolito network di ponti salini che sono presenti solo nelle proteine di mammifero e non negli orotolghi *Erv1/Erv2* di lievito.



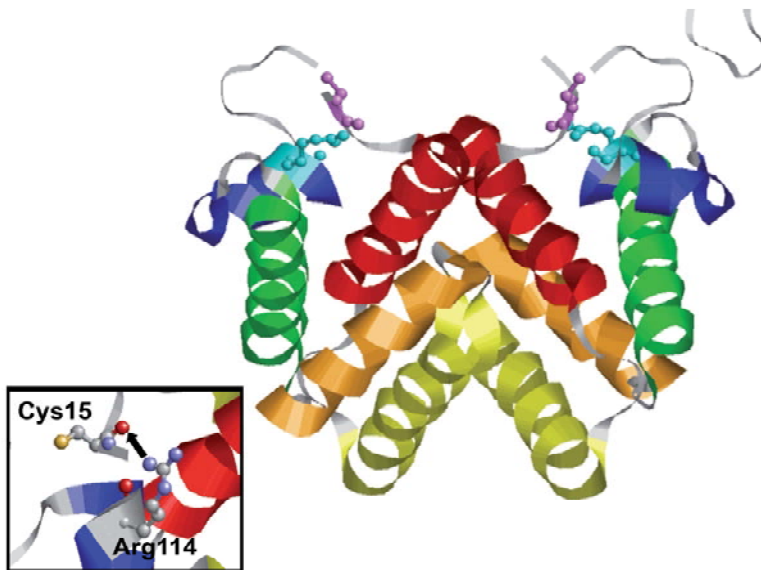
La proteina funzionale si organizza in omodimeri che risultano dall'interazione testa-coda di due legami disolfuro intermolecolari; ogni subunità è legata ad una molecola di FAD.

La struttura cristallina dell'Augmenter of Liver Regeneration (ALRp) ricombinante di ratto è stata determinata con una risoluzione di 1,8Å [58]. Sono presenti 20 residui amminoacidici all'interfaccia del dimero che contribuiscono alle interazioni idrofobiche che lo stabilizzano (FIGURA 13).

Per quanto riguarda le interazioni di legame, sono stati identificati 4 legami a idrogeno, due ponti salini e due ponti disolfuro. In particolare, uno dei legami a idrogeno interessa l'arginina in posizione 114 di un monomero e la cisteina in posizione 15 dell'altro monomero.

Poiché la proteina GFER umana e di ratto mostrano un'identità di sequenza amminoacidica di circa l'86%, è stata fatta una predizione della struttura della proteina umana, la cui struttura non è stata ancora risolta.

L'amminoacido in posizione 114 della sequenza amminoacidica della proteina GFER nel ratto corrisponde all'arginina in posizione 194 nella sequenza della proteina umana. Una mutazione in questo residuo potrebbe portare ad una destabilizzazione del dimero funzionale.



**FIGURA 13** La struttura cristallografica della proteina Gfer (dimero) nel ratto (PDB accession number: 1OQC). Le cinque alfa eliche in ogni monomero sono colorate in modo differente. L'arginina 114 (omologa del residuo umano Arg 194) è colorata in azzurro mentre la cisteina 15 è evidenziata in violetto. Nel riquadro c'è l'ingrandimento della posizione spaziale reciproca di Arg 114 e Cys 15 appartenenti a differenti monomeri di GFER. La freccia indica il legame idrogeno, ritenuto importante per stabilizzare il dimero.

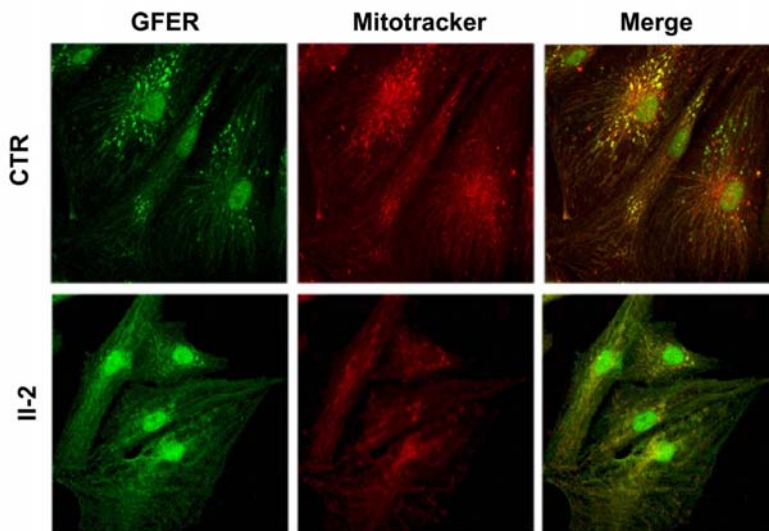
## 4.7 Analisi della proteina GFER in colture primarie e in cellule HEK293 trasfettate

### 4.7.1 Analisi immunocitochimica di GFER in colture primarie

Per valutare eventuali differenze di localizzazione della proteina GFER wild-type e mutata abbiamo eseguito un'indagine immunocitochimica nei mioblasti primari di soggetti controllo e in mioblasti ottenuti dal paziente II-2 (FIGURA 14).

La proteina wildtype (rilevata con anticorpo policlonale e anticorpo secondario coniugato con una proteina fluorescente nel verde) colocalizza con un marcatore mitocondriale fluorescente nel rosso (Mitotracker) producendo un segnale di sovrapposizione (merge: giallo). Inoltre si osserva un segnale di colocalizzazione tra GFER e DAPI (marcatore nucleare fluorescente nel blu) ed una scarsa presenza nel citoplasma.

Nei mioblasti primari del paziente II-2 il pattern specifico di immunofluorescenza per GFER non mostra la stessa fluorescenza punteggiata dei mitocondri del vetrino controllo, rivelando invece uno staining diffuso nel citoplasma e nel nucleo (Pannello 12, figura 20). Non si apprezzano differenze del segnale dal punto di vista quantitativo



**FIGURA 14** Studi di immunocitochimica in colture cellulari primarie. Un anticorpo diretto contro GFER (in verde) mostra la specifica colocalizzazione con MitoTracker (in rosso) e DAPI nei mioblasti controllo. L'immunofluorescenza è praticamente assente nel citoplasma. Al contrario, nei mioblasti primari ottenuti dal paziente II-2 si osserva una ridotta colocalizzazione mitocondriale e un segnale più diffuso nel citoplasma. Scale bar: 40 micron.

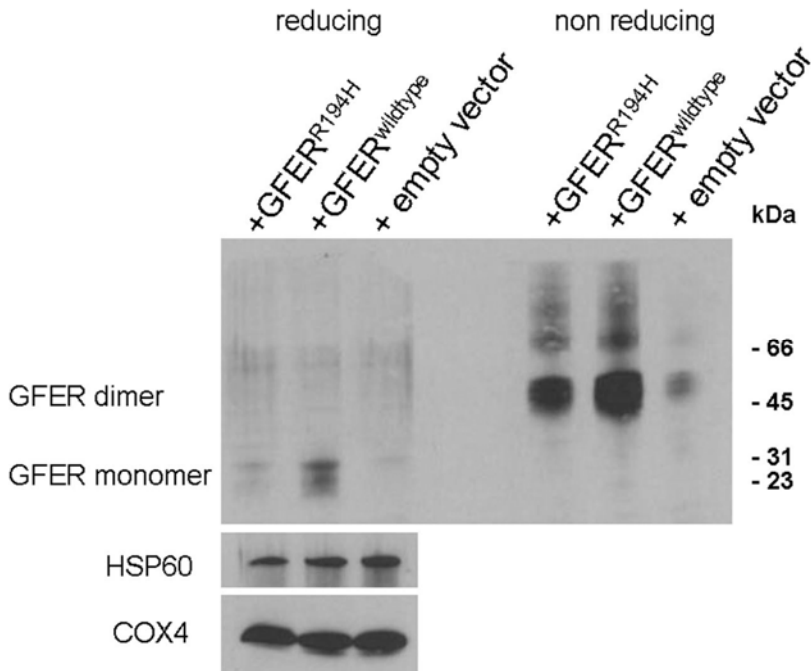
#### 4.7.2 Analisi Western blot di GFER in cellule HEK293 trasfettate

Per verificare se la mutazione p.R194H è in grado di alterare la stabilità proteica o la formazione del dimero funzionale, abbiamo condotto un'analisi proteica mediante Western Blot delle frazioni mitocondriali delle cellule HEK293 overesprimenti GFER wildtype o mutato (FIGURA 15).

Sia in condizioni riducenti che non riducenti abbiamo osservato una chiara riduzione della proteina mutata GFER-R194H in forma di monomero (condizioni riducenti ottenute mediante l'aggiunta in largo eccesso di DTT) e di dimero (immunoblotting DTT-free) rispetto alla proteina wildtype.

L'esperimento è stato ripetuto utilizzando cellule HEK293 esprimenti GFER wildtype e mutato, in fusione con la proteina AcGFP (che determina un incremento nel peso molecolare atteso di GFER di circa 31 kDa).

Anche l'immunoblotting effettuato con un anticorpo commerciale contro la proteina fluorescente, in grado di rilevare solo il prodotto proteico esogeno, ha confermato i precedenti risultati sulle frazioni mitocondriali isolate sia in condizioni riducenti che non riducenti.



**FIGURA 15** Immunoblotting per GFER in frazioni mitocondriali di cellule HEK293 stabilmente trasfettate con un vettore esprime il cDNA di GFER wildtype e mutato. Le analisi di Western Blot mostrano una riduzione della proteina mutata nelle frazioni mitocondriali sia in condizioni riducenti, che non riducenti. COX4 e HSP60 residenti nella membrana mitocondriale interna e nella matrice mitocondriale, rispettivamente, sono state impiegate per scopi di normalizzazione.

Questi risultati suggeriscono che la proteina mutata è meno stabile all'interno dello spazio mitocondriale intermembrana.

Alternativamente, poiché Erv1 (essential for respiration and vegetative growth 1, omologo di lievito di GFER/ALR umano in lievito) è esso stesso substrato del sistema di importo Mia40-Erv1 che costituisce il Disulfide Relay Sistem [52], la proteina mutata GFER potrebbe essere importata in modo meno efficiente o meno ritenuta all'interno dello spazio intermembrana (IMS).

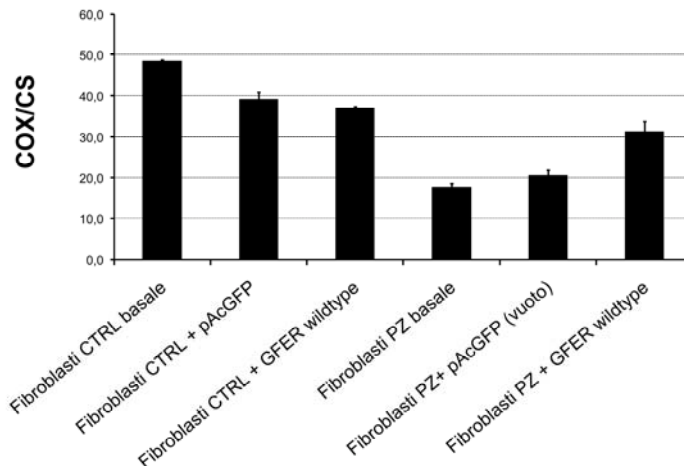
La presenza di GFER endogeno e la natura artificiale del sistema di overespressione non ci consentono comunque di fornire una risposta definitiva su questo punto.

#### 4.8 Complementazione funzionale in colture cellulari primarie

Per verificare se la mutazione p.R194H può essere la causa del deficit nell'attività della Citocromo c Ossidasi (COX) evidenziata nei fibroblasti dei pazienti, abbiamo trasfettato in modo transiente tali cellule con un vettore di espressione per la sequenza wildtype del cDNA di GFER e parallelamente abbiamo trasfettato fibroblasti primari controllo.

L'analisi biochimica ha rivelato un incremento del 30% nell'attività della Citocromo c Ossidasi nelle cellule del paziente trasfettate, mentre l'attività rimane invariata nelle cellule che sono state trasfettate con il vettore vuoto (FIGURA 16).

Questi risultati dimostrano che la mutazione p.R194H oggetto del nostro studio è associata con il difetto funzionale della COX evidenziato nei pazienti e sottolineano l'importanza che il gene GFER ha nel regolare l'attività del Complesso IV.



**FIGURA 16** Analisi biochimica nei fibroblasti del paziente trasfettati con il cDNA wildtype di GFER. L'analisi dell'attività della COX, normalizzata rispetto a quella della Citrato Sintetasi, mostra un parziale ripristino dell'attività del Complesso IV.

## **4.9 Analisi delle proteine dello spazio mitocondriale intermembrana**

### **4.9.1 Analisi immunocitochimica in colture cellulari primarie**

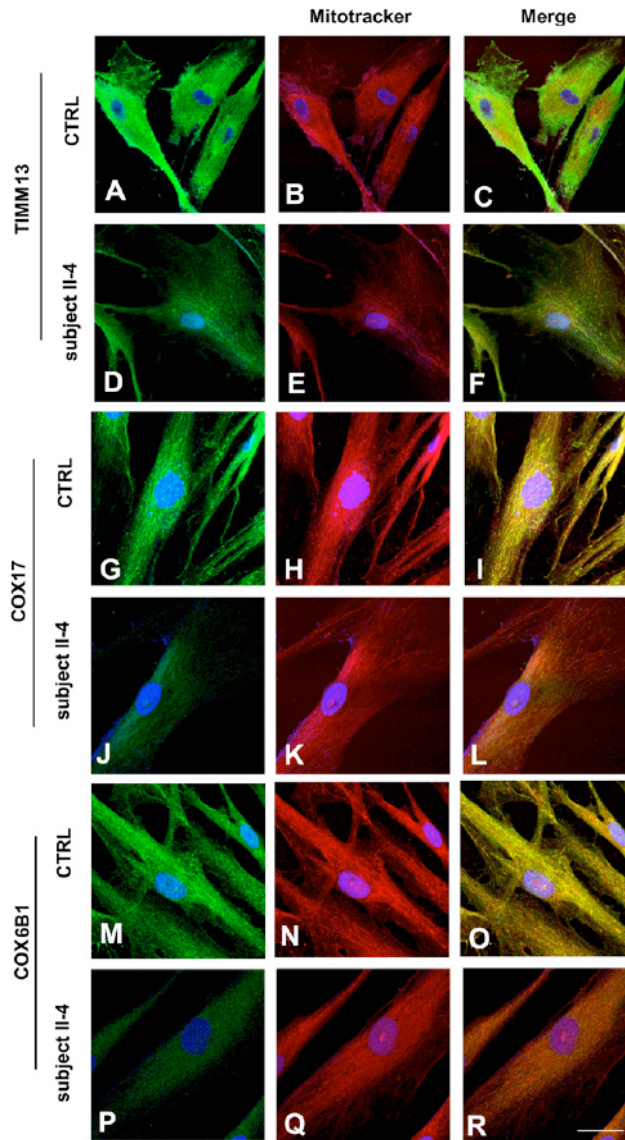
Per caratterizzare il ruolo di GFER nella biogenesi dei complessi della catena respiratoria mitocondriale, abbiamo condotto un'analisi immunocitochimica di COX17, TIMM13 e COX6B1 nei fibroblasti ottenuti dai pazienti con la mutazione p.R194H nella proteina GFER (FIGURA 17).

COX17 è una proteina essenziale nell'assemblaggio della Citocromo c Ossidasi ed è implicata nel fornire ioni rame per la formazione dei siti CuA e CuB necessari per ottenere l'oloenzima della COX.

TIM13 è una subunità della traslocasi della membrana interna mitocondriale, un complesso multimerico necessario per consentire il passaggio di substrati proteici all'interno e attraverso la membrana mitocondriale interna.

Abbiamo analizzato inoltre la proteina COX6B1, componente strutturale del complesso IV della catena respiratoria.

L'analisi al microscopio confocale ha rivelato nelle cellule derivate dai pazienti una ridotta colocalizzazione del segnale delle proteine COX17, TIMM13 e COX6B1 con quello del tracciante mitocondriale MitoTracker.



**FIGURA 17** Analisi immunocitochimica al microscopio confocale delle proteine dell'IMS nei fibroblasti dei pazienti e nei fibroblasti controllo, utilizzando anticorpi che riconoscono TIMM13, COX17 e COX6B1. Le analisi al microscopio confocale rivelano una ridotta colocalizzazione di COX17, TIMM13 e COX6B1 con MitoTracker rispetto al segnale di colocalizzazione osservato nelle cellule controllo da donatori sani.

#### **4.9.2 Analisi Western blot in cellule HEK293 trasfettate**

Per approfondire e verificare ulteriormente il dato relativo alla riduzione della quantità delle proteine dell'IMS nel modello cellulare HEK293 con la mutazione R194H in GFER abbiamo eseguito l'immunoblotting delle proteine COX17, TIMM13 e COX6B1 su frazioni mitocondriali isolate.

L'analisi ha dimostrato una chiara diminuzione del segnale relativo a queste proteine nelle cellule overesprimenti GFER-R194H rispetto a quelle overesprimenti il controllo wildtype.

I marker mitocondriali COX-IV e HSP60 non presentano invece alcuna variazione nelle condizioni analizzate.

Data la recente disponibilità di nuovi anticorpi diretti contro le proteine dello spazio intermembrana mitocondriale umano, abbiamo effettuato l'immunoblotting nelle frazioni mitocondriali isolate di cellule HEK293 per nuovi substrati: SCO2, COX19, COX11, TIMM8.

SCO2 è una proteina legata alla membrana mitocondriale interna importante nel fornire il rame per il corretto assemblaggio della Citocromo c Ossidasi. Mutazioni nel gene SCO2 sono state associate a cardioencefalomiopatie fatali.

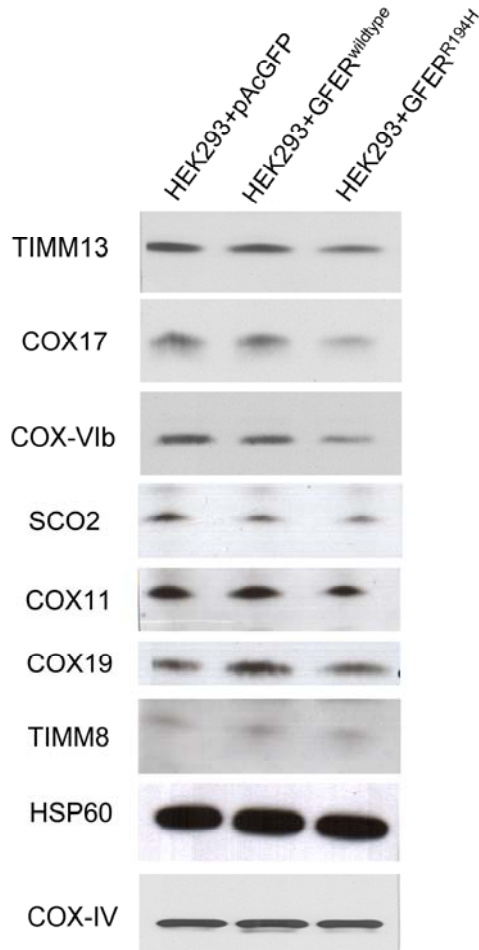
COX19 è una metallo proteina con funzione di chaperone importante nell'assemblaggio della COX ed identificato nel lievito quale substrato del DRS.

COX11 è una proteina dell'IMS coinvolta nell'omeostasi dello ione rame, essenziale affinché il complesso enzimatico della COX sia attivo.

TIMM8 interagisce con TIMM13 e costituisce il fulcro del sistema di traslocazione della membrana mitocondriale interna.

L'immunoblotting ha confermato la riduzione di queste proteine in presenza della forma mutata di GFER, in grado variabile a seconda della proteina indagata.

L'insieme di queste evidenze ci permette di dire che un'alterazione dell'attività e/o della quantità di GFER ha un effetto negativo sui livelli mitocondriali di queste molecole, un elemento che suggerisce che esse sono substrato del DRS umano analogamente a quanto osservato in lievito. Vista la primaria importanza che molti di questi fattori hanno nella biogenesi della catena respiratoria, e in particolare della COX, il ridotto importo mitocondriale è verosimilmente parte integrante della catena patogenetica che porta dalla mutazione in GFER al difetto biochimico osservabile nei pazienti (FIGURA 18).



**FIGURA 18** Western Blot delle proteine TIM13, COX17, COX6B1, SCO2, COX11, COX19, TIMM8 nella frazione mitocondriale di cellule HEK293 stabilmente trasfettate con un vettore che overesprime GFER wildtype e mutato. Appare evidente la riduzione delle proteine nelle cellule oversprimenti GFER mutato rispetto a quelle oversprimenti il GFER wildtype. HSP60 e COXIV utilizzate a scopi di normalizzazione.



## 5. DISCUSSIONE

Il quadro clinico dei pazienti in esame comprende vari aspetti, tra cui cataratta congenita, ipotonia muscolare, perdita dell'udito sensorineurale e ritardo nello sviluppo. La contemporanea presenza di segni clinici attribuibili all'interessamento di tessuti diversi suggerisce un coinvolgimento mitocondriale, ulteriormente avvalorato da dati istologici e biochimici.

L'analisi istologica mostra nel soggetto II-2 un marcato deficit istochimico di Citocromo c Ossidasi. Questo dato indica una ridotta attività enzimatica del Complesso IV della catena respiratoria mitocondriale in un numero elevato di fibre muscolari. La netta riduzione osservata è ancora più interessante considerando la giovane età del soggetto in esame. L'osservazione si ripete nel fratello minore anche se in modo meno significativo (una variazione compatibile con la differenza nel grado di progressione della malattia).

L'analisi ultrastrutturale condotta su sezioni di tessuto muscolare mostra una profonda alterazione nella struttura mitocondriale con organelli dismorfici e ingrossati. Le anomalie riscontrate nell'organizzazione dei compartimenti interni al mitocondrio sono suggestivi di un difetto in grado di modificare il corretto trasporto e la fisiologica distribuzione degli elementi costitutivi la membrana interna mitocondriale (e gli spazi che essa delimita).

La conferma di un problema mitocondriale si ottiene considerando la ridotta attività enzimatica di alcuni complessi della catena respiratoria, in particolare il quarto, dosata sia su tessuto muscolare che in cellule provenienti dai soggetti affetti. I mioblasti ricalcano abbastanza fedelmente il difetto biochimico registrato nel muscolo da cui provengono, mentre i fibroblasti hanno un'attività residua più elevata. Questa divergenza è presente anche in altri disordini mitocondriali.

Sebbene il pedigree in studio (considerando la parentela tra i genitori) e lo stato patologico di alcuni dei figli della coppia, deponga per un difetto ereditato con trasmissione autosomica recessiva, non è possibile escludere a priori un problema legato al DNA mitocondriale che potrebbe essere causa primaria di un deficit di COX o bersaglio secondario dell'azione di mutazioni presenti in geni nucleari. Per questo motivo abbiamo valutato il genoma mitocondriale con approcci qualitativi e quantitativi.

Sebbene il Southern blot non abbia rilevato anomalie nel soggetto II-2, una tecnica più sensibile come l'amplificazione selettiva di genomi parzialmente deleti ha consentito di evidenziare delle bande di delezioni multiple nel più grande degli affetti. Il pattern di amplificazione non è così intenso come quello riscontrato in patologie che interessano direttamente il mantenimento del DNA mitocondriale (es. oftalmoplegia esterna progressiva con mutazioni nei geni nucleari *POLG1*, *ANT1*, *PEO1*). Anche in questo caso la giovane età dei probandi rende ancora più interessante il rilevamento di questi eventi deletivi. Il sequenziamento dei cloni derivanti da questi prodotti di amplificazione ha confermato la presenza di caratteristici breakpoint, già evidenziati in letteratura e in precedenti lavori nel nostro laboratorio come hotspot privilegiati per l'interruzione della doppia elica polinucleotidica mitocondriale.

L'approfondita indagine molecolare dei geni coinvolti nel mantenimento del DNA mitocondriale ha dato esito negativo.

Il DNA mitocondriale è stato infine interamente sequenziato: tutte le varianti identificate, considerata l'etnia dei soggetti analizzati, sono state considerate come polimorfiche nel confronto con i database mitocondriali di riferimento.

Mutazioni in numerosi geni nucleari possono determinare forme di encefalomiopatia con marcato deficit di Citocromo c Ossidasi [90]. Questi fenotipi, causati da una primaria riduzione strutturale della COX mostrano generalmente un quadro clinico molto severo ed una rapida progressione che porta alla morte nei primi mesi di vita. Altri disordini che evidenziano deficit di COX, a eziologia ignota, si presentano invece con quadri più eterogenei dal punto di vista dell'età d'esordio, del grado di progressione, dei sistemi coinvolti.

L'inquadramento del fenotipo clinico dei nostri pazienti in una di queste forme autosomica recessiva di deficit di COX non consentiva un'esauriente spiegazione della patologia. Per questi motivi abbiamo considerato improbabile l'interessamento dei suddetti geni.

Abbiamo quindi effettuato un'analisi di linkage genome-wide in tutti i membri della famiglia. Questo approccio ci ha consentito di identificare una transizione omozigote nel gene *GFER*. Riteniamo che questa variante possa essere considerata patogena per i seguenti motivi:

- 1) segrega con il fenotipo descritto nella famiglia esaminata;
- 2) non è presente in un ampio numero di controlli (compresi 136 soggetti della stessa nazionalità). Considerato l'elevato numero degli alleli studiati, appare difficile ritenere che questa variante sia un polimorfismo (per quanto raro);
- 3) la sostituzione nucleotidica provoca il cambiamento di un'arginina altamente conservata nelle specie. Questo residuo si trova nella posizione C-terminale e non sembra coinvolto direttamente nell'attività catalitica di *GFER*, né nel legame con l'indispensabile cofattore FAD;
- 4) la cristallografia della proteina omologa del ratto [58] mostra come l'analogo di questo residuo sia fondamentale per la formazione di uno dei tre ponti idrogeno che stabilizzano il dimero attivo della proteina. L'elevato grado di omologia con la proteina umana rende questa osservazione ancora più importante e lascia supporre un medesimo effetto nell'uomo;
- 5) la localizzazione della proteina wildtype e mutata, mediante studi di immunocitochimica condotti su mioblasti primari appare alterata. In particolare nelle cellule dei pazienti c'è una ridotta colocalizzazione del segnale di *GFER* e del mitocondrio;
- 6) l'analisi Western Blot mostra come la mutazione comprometta la stabilità sia della forma monomerica che dimerica suggerendo che la proteina mutata vada incontro ad una rapida degradazione ad opera dei sistemi deputati al controllo della qualità proteica cellulare (e nello specifico mitocondriali) oppure che, più probabilmente, la mutazione riduca la quota di *GFER* ritenuto nel mitocondrio. Solo studi ulteriori in grado di inibire i pathways di degradazione proteica (proteolisi, degradazione proteasoma-dipendente, autofagia) e specifici saggi di importo mitocondriale della proteina *GFER* potranno fornire ulteriori dati per chiarire tali aspetti;

7) il ripristino parziale dell'attività della COX, in seguito ad un esperimento di complementazione funzionale in colture primarie derivate da paziente, è una prova sufficiente per ritenere che la mutazione presente in omozigosi nelle cellule primarie sia responsabile del difetto biochimico osservato.

8) i dati presentati mostrano, sia mediante analisi immunocitochimica in cellule primarie che mediante Western blot in modelli cellulari overesprimenti la proteina mutata, che il difetto identificato in GFER si estende verosimilmente ad altre proteine coinvolte nel disulfide relay system tra cui TIMM13 e COX17. Inoltre si osserva una riduzione del segnale per varie proteine dello spazio intermembrana che condividono specifici motivi strutturali. Tra queste COX6B1 che contiene un motivo CX9C e che pertanto appare un buon candidato per l'importo mediato dal sistema GFER-Mia40 nell'uomo. L'esistenza di un fenotipo mitocondriale parzialmente sovrapponibile a quello osservato in presenza di una mutazione nel gene che codifica per COX6B1 [66] è un'ulteriore prova del legame che intercorre tra una ridotta stabilità/importo di questa subunità e il deficit della Citocromo c Ossidasi comune alle due condizioni cliniche descritte. Inoltre, esperimenti di RNA interference condotti sulla subunità COX6B1 in cellule umane mostrano che un silenziamento del 60% di COX6B1, determina una riduzione dell'attività della COX di circa il 70%. I pazienti COX6B1-mutati, presentano una clinica caratterizzata da encefalopatia leucodistrofica, miopatia, ritardo della crescita associato a deficit di COX [66].

9) è stato realizzato un modello in lievito che presenta la variante omologa a quella individuata nei nostri pazienti ( $\Delta$ erv1/erv1R182H). Il modello è stato realizzato presso il laboratorio della professoressa Ileana Ferrero presso il Dipartimento di genetica, antropologia ed evoluzione dell'Università di Parma.

Gli aspetti metodologici e i risultati ottenuti non sono discussi per esteso in questa sede. Ci limitiamo ad osservare alcune evidenze in parte sovrapponibili a quelle emerse studiando i pazienti:

- Erv1p contribuisce sia direttamente che indirettamente, all'assemblaggio dei componenti della catena respiratoria;
- Erv1p è importante nel mantenimento dell'integrità del DNA mitocondriale;
- la mutazione determina un aumento della mutagenicità del DNA mitocondriale;
- le analisi ultrastrutturali dei mutanti in lievito mostrano clusters di mitocondri con creste semplificate o assenti.

Infine, una prova della patogenicità della variante trovata risiede nello stesso gene che la ospita. Non solo la localizzazione chiaramente mitocondriale del prodotto di GFER, ma soprattutto le funzioni cui sembra assolvere possono ricapitolare l'intero insieme delle evidenze fin qui raccolte nell'uomo e nel modello in lievito.

Il gene GFER umano, chiamato anche ALR (augmenter of liver regeneration) o HPO (epatopoiatina), appartiene alla famiglia delle proteine ERV1/ALR, i cui membri sono stati ritrovati negli eucarioti inferiori e superiori dal lievito all'uomo e anche nel genoma di alcuni virus a DNA doppio filamento [55,56].

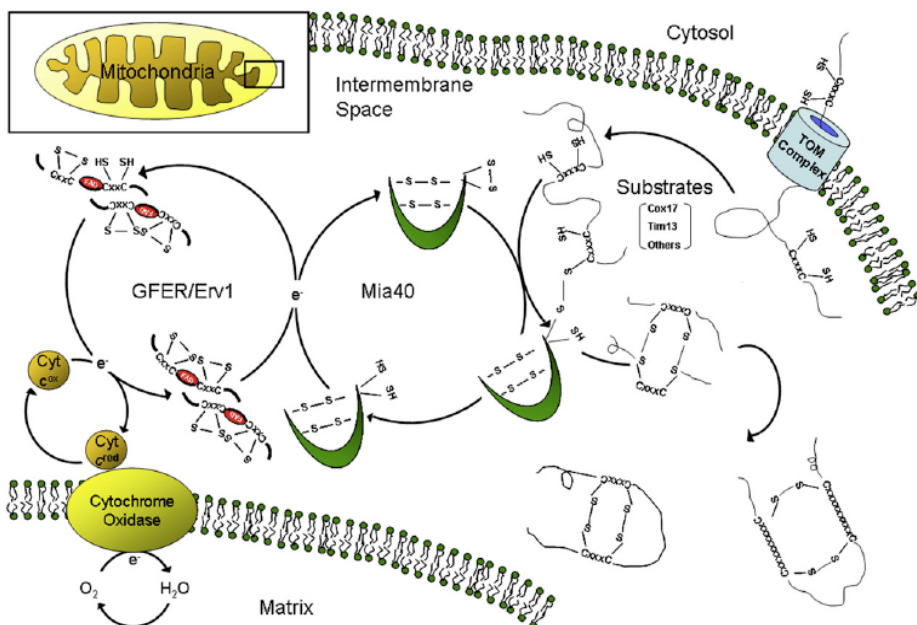
Sono state descritte in letteratura molte funzioni biologiche essenziali di GFER. Si pensa che la proteina umana possa essere uno dei fattori responsabili per la straordinaria capacità rigenerativa del fegato nei mammiferi. Nei nostri pazienti non abbiamo osservato segni di sofferenza epatica, sebbene siano state riscontrate

una marcata iperamilasemia e ipoferritinemia senza nessuna altra causa apparente in tutti e tre gli affetti.

La famiglia Alr/Erv1p fa parte di un gruppo di sulfidril ossidasi legate al FAD che partecipano nella formazione dei legami disolfuro [54].

Lisowsky e colleghi hanno identificato l'attività enzimatica della proteina GFER di ratto e umana come quella di una sulfidril ossidasi in grado di ossidare gruppi tiolici in un substrato proteico. Le proteine presentano un dominio carbossi-terminale in grado di legare il FAD e formano dimeri in vivo [54].

In lievito Erv1 catalizza la formazione di ponti disolfuro in Mia40, che permettono a quest'ultima di catturare transientemente le proteine importate contenenti gruppi tiolici ridotti [45-47]. Le proteine importate formano un ponte disolfuro transiente con Mia40; il rilascio del polipeptide è facilitato da reazioni di scambio disulfidico che risultano in un ponte disolfuro all'interno delle proteine importate (disulfide relay system) [42] (FIGURA 19).



**FIGURA 19** Modello del Disulfide Relay System.

Erv1 ha un motivo CXXC attivo riducente vicino al FAD, il quale forma un iniziale ponte disolfuro. Attraverso lo scambio disulfidico, il ponte disolfuro viene trasferito ad un motivo CXXC all'N-terminale ed a sua volta veicolato verso il suo target Mia40. Questa funzione consente la riossidazione di Mia40 e la possibilità di riciclo del meccanismo Mia40-Erv1 nell'importo di proteine mitocondriali nello spazio intermembrana. Substrati di questo pathway di importo sono numerose proteine con motivi strutturali caratteristici nella loro sequenza. Tra questi target si trovano

vari fattori coinvolti nel processo di assemblaggio della catena respiratoria, ed in particolare del complesso IV. Una riduzione di GFER/Erv1 può dunque avere come conseguenza finale la perturbazione del processo di formazione della COX e, quindi, una riduzione della sua attività catalitica.

Inoltre, Farrell and Thorpe hanno dimostrato che, almeno in vitro, GFER è in grado di ridurre il citocromo c ossidato [49]. Gli elettroni provenienti dalle reazioni di ossidazione sono trasportati al citocromo c mediante Erv1. Questa osservazione porta all'interessante ipotesi che il disulfide relay system mitocondriale possa interagire con la catena di trasporto degli elettroni della membrana interna. Non possiamo escludere che la variante individuata nei nostri pazienti contribuisca alla patogenesi della malattia anche a questo livello. La proteina GFER mutata potrebbe interagire in modo anomalo con il citocromo c e prediligere l'ossigeno molecolare come accettore finale di elettroni. Questa reazione ha come conseguenza la formazione di specie molecolari radicaliche in grado di aumentare lo stress ossidativo determinando, secondariamente, problemi alla catena respiratoria e al DNA mitocondriale.

Numerosi aspetti devono ancora essere esaminati.

Tra questi segnaliamo i limiti del sistema cellulare HEK293 overesprimenti la proteina mutata che abbiamo allestito (i); il grado di espressione di GFER in vari tessuti umani (ii) e la presenza di segni clinici che non hanno ancora una spiegazione a livello molecolare (iii).

i) Il sistema di overespressione che abbiamo messo a punto è in grado di saturare il sistema Mia40-GFER endogeno delle cellule HEK293 e quindi di compromettere la naturale fisiologia del meccanismo di importo, creando una situazione simile a quella osservata nei pazienti. Prova di questa ipotesi è la riduzione di numerose proteine dello spazio intermembrana mitocondriale rilevate sia mediante saggi di immunocitochimica (COX17, COX6B1, TIMM13) che in analisi Western Blot quantitative su frazioni mitocondriali isolate.

Le differenti proteine scelte mostrano infatti una riduzione di entità differente in presenza della proteina mutata, convalidando ciò che si era precedentemente osservato in colture cellulari primarie. Naturalmente, i limiti di queste osservazioni sono numerosi:

- si tratta di saggi quantitativi che non valutano specificatamente il processo di importo;
- sono esperimenti condotti in linee cellulari che hanno derivazione differente rispetto a quella dei tessuti affetti nell'uomo;
- le cellule manifestano una overespressione disregolata dal contesto fisiologico di GFER wildtype e mutato;
- le cellule contengono una quantità residua di GFER endogeno che, per quanto esiguo rispetto all'esogeno, non può essere trascurato.

ii) Gfer risulta particolarmente espresso in tessuti quali il fegato e i testicoli [57]. Questa osservazione condotta in precedenza sui tessuti di ratto (Northern blot) viene riconfermata nel nostro studio in tessuti umani (mediante RT-PCR quantitativa). Nei soggetti affetti della nostra famiglia, la presenza di una proteina GFER anomala (R194H) non interessa clinicamente questi organi. Va però

osservato che GFER/ALR è stato associato alla capacità rigenerativa dell'organo in seguito ad eventi dannosi [109]. Rimane così difficile valutare la risposta della proteina mutata in una condizione fisiologica. D'altra parte, nei testicoli GFER è importante per la maturazione degli spermatozoi e, per ora, non siamo in grado di analizzare se nei soggetti affetti questo processo abbia subito delle alterazioni.

I livelli di espressione di GFER nei tessuti maggiormente affetti nella patologia esaminata (muscolo, cervello) sono invece particolarmente bassi. La scarsa espressione di *GFER* in questi tessuti potrebbe esacerbare gli effetti della mutazione identificata.

Contrariamente a queste osservazioni, una recente ricerca ha mostrato l'elevata espressione di GFER/ALR nelle fibre muscolari ricche in mitocondri, attraverso studi di PCR quantitativa e immunomicroscopia elettronica [110].

Non è da escludere la possibile presenza di isoforme alternative tessuto-specifiche ancora non scoperte. Una più approfondita analisi dei trascritti in questi e altri tessuti (es. RACE-PCR) potrà chiarire questi fenomeni.

iii) La cataratta congenita [111] sembra essere un elemento caratteristico del fenotipo che abbiamo studiato. Non abbiamo alcuna evidenza sperimentale che possa collegare la proteina GFER mutata con questo segno clinico. E' però possibile ipotizzare l'esistenza di proteine specificatamente espresse dal cristallino o da tessuti limitrofi, per la cui funzione GFER rivesta un ruolo importante.

Sebbene molti aspetti molecolari relativi a GFER, al pathway in cui è coinvolto e ai fattori con cui interagisce debbano ancora essere indagati a livello genetico, biochimico e proteico ci sentiamo di affermare che la mutazione R194H in questa proteina possa essere causativa del fenotipo osservato e sia in grado di spiegarne molte caratteristiche cliniche e laboratoristiche.

Per la prima volta il meccanismo di importo delle proteine mitocondriali dello spazio intermembrana sembra essere direttamente coinvolto nella patogenesi di una malattia umana. L'indagine di GFER e delle altre proteine coinvolte in questo meccanismo potrà contribuire ad assegnare una causa molecolare alle forme autosomico recessive di deficit di Citocromo c Ossidasi a eziologia finora ignota.

## 6 CONCLUSIONI

La denominazione di "malattie mitocondriali" si applica alle sindromi cliniche associate ad anomalie nella via finale del metabolismo ossidativo [59]. A tale processo sono preposti i mitocondri, la cui biogenesi è il risultato della complessa interazione tra il genoma nucleare e quello mitocondriale (mtDNA). Le malattie mitocondriali possono così essere provocate da mutazioni in entrambi i genomi. La loro eziologia molecolare è spesso irrisolta in un ampio gruppo di pazienti, in particolare quelli della fascia neonatale, infantile e giovanile [90]. Ne consegue che molti pazienti non ricevono mai una diagnosi genetica.

Questo studio ci ha permesso di scoprire un nuovo meccanismo coinvolto alla base di una malattia umana in grado di compromettere l'attività della catena respiratoria.

Utilizzando un'analisi di linkage, con un genotyping dell'intero genoma basato su SNP, abbiamo identificato una mutazione missense nel gene GFER come causa di una miopatia mitocondriale infantile progressiva.

GFER è l'ortologo umano di Erv1 il cui ruolo fisiologico è stato evidenziato in lievito [42]. Insieme a Mia40, partecipa nel disulphide relay system (DRS) che guida l'importo di piccole proteine nello spazio mitocondriale intermembrana.

Abbiamo dimostrato che questa mutazione determina una serie di conseguenze a livello del muscolo e dei fibroblasti: 1) riduzione dell'attività di alcuni complessi della catena respiratoria, in particolare il quarto, parzialmente compensata overesprimendo la proteina wildtype; 2) riduzione nel compartimento mitocondriale di alcune proteine ricche in cisteina, substrati noti del DRS in lievito; 3) anomala morfologia mitocondriale con allargamento dello spazio intermembrana, valutato in microscopia elettronica; 4) alterazione della capacità di mantenimento del DNA mitocondriale con accumulo di delezioni multiple a livello muscolare.

Questi risultati hanno chiarito alcuni aspetti della biogenesi mitocondriale e del mantenimento del mtDNA, stabilendo il ruolo dell'omologo di ERV1 nel DRS umano e promuovendo la comprensione della patogenesi di nuove forme di malattie mitocondriali [112].

Sebbene non sia il primo difetto di importo mitocondriale associato ad una patologia umana, la disfunzione del DRS nell'uomo definisce un nuovo tipo peculiare di meccanismo patogenetico nell'ambito delle mitocondriopatie. Come osservato da Salvatore Di Mauro della Columbia University (NYC, USA) in un commento al nostro studio dopo la sua pubblicazione, il fenotipo descritto pone un problema di classificazione situandosi al confine tra una malattia di importo proteico e un difetto nell'assemblaggio della catena respiratoria. Questi due aspetti sono direttamente collegati nel DRS.

Un recente lavoro pubblicato da un altro gruppo di ricerca (da anni impegnato nell'analisi biochimica delle flavo proteine in lievito e mammifero) ha portato avanti la caratterizzazione della mutazione da noi identificata [113]. L'analisi in vitro condotta sulle isoforme di GFER lunga e corta, dopo mutagenesi, ha mostrato una forte perdita di stabilità evidenziata da un aumentato tasso di dissociazione del FAD, una maggiore sensibilità alla proteolisi e alla riduzione dei ponti disolfuro e

una perdita di ordine conformazionale osservato alla NMR-2D. L'attività catalitica dell'enzima non è invece compromessa in presenza della mutazione. Il forte impatto di questa variante sulla stabilità del dimero attivo è, secondo gli autori, abbastanza sorprendente e pone l'accento sull'importanza dei ponti disolfuro intercatena, dei residui amminoacidici nelle loro vicinanze e del legame con il cofattore FAD. L'instabilità delle flavoproteine deprivate di FAD è nota dalla letteratura. Questo interessante contributo, oltre a completare il set di analisi biochimiche da noi intrapreso, può suggerire la supplementazione di riboflavina come possibile intervento terapeutico.

Accanto al ruolo ormai consolidato nell'importo di proteine rilevanti per la biogenesi dei complessi della catena respiratoria, il disulfide relay system è stato recentemente coinvolto anche nella regolazione della traslocazione nello spazio intermembrana mitocondriale di altre proteine [114]. Tra di esse si ricorda p66shc, un fattore chiave della longevità biologica [115], che sembra essere importato nell'IMS in condizioni di stress secondo un meccanismo dipendente da un processo ossidativo. Ancora più importante è la scoperta che la traslocazione mitocondriale della proteina SOD1 è regolata dallo stato ossidativo della cellula e mediata da CCS1, lo chaperone del rame di SOD1, noto per essere un substrato del DRS [116]. Mutazioni in SOD1 sono state associate a casi familiari e sporadici di sclerosi laterale amiotrofica [117]. Alcune di queste varianti sembrano disregolare il processo di importo fisiologico determinando la riduzione mitocondriale della proteina SOD1 wildtype (con funzione antiossidante) o l'anomalo accumulo tossico di SOD1 mutata [118-120].

Queste evidenze dimostrano che il meccanismo del DRS, che per primi abbiamo associato a una mitocondriopatia, potrebbe contribuire alla patogenesi anche di altre patologie dell'uomo.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schönfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C. "The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 100, no. 23, 2003, pp. 13207-13212.
2. Perocchi F, Jensen LJ, Gagneur J, Ahting U, von Mering C, Bork P, Prokisch H, Steinmetz LM. "Assessing systems properties of yeast mitochondria through an interaction map of the organelle". *PLoS Genet*. Vol. 2, no. 10, 2006, e170.
3. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha VK. "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology". *Cell* Vol. 134, no. 1, 2008, pp. 112-123.
4. Taylor SW, Fahy E, Zhang B, Glenn GM, Warnock DE, Wiley S, Murphy AN, Gaucher SP, Capaldi RA, Gibson BW, Ghosh SS. "Characterization of the human heart mitochondrial proteome". *Nat Biotechnol* Vol. 21, 2003, pp. 281-286.
5. Hosler JP, Ferguson-Miller S, Mills DA. "Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes". *Annu Rev Biochem*. Vol. 75, 2006, pp. 165-187.
6. Barrientos A, Gouget K, Horn D, Soto IC, Fontanesi F. "Suppression mechanisms of COX assembly defects in yeast and human: insights into the COX assembly process". *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1793, no. 1, 2009, pp. 97-107.
7. Pecina, P. Houstkova, H. Hansikova, H. Zeman, J. and Houstek, J. "Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly". *Physiol. Res*. Vol. 53, Suppl 1, 2004, S213–S223.
8. Pfanner N, Chacinska A. "The mitochondrial import machinery: preprotein-conducting channels with binding sites for presequences". *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1592, no. 1, 2002, pp. 15-24.
9. Cobine PA, Pierrel F, Winge DR. "Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes". *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1763, no. 7, 2006, pp. 759-772.
10. Tzagoloff A, Capitanio N, Nobrega MP, Gatti D. "Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of COX11, a homolog of the *P. denitrificans* protein encoded by ORF3". *EMBO J*. Vol. 9, no. 9, 1990, pp. 2759-2764.

11. Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. & Lithgow, T. "Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria". *Science* Vol. 313, 2006, pp. 314–318.
12. Neupert, W. & Herrmann, J. M. "Translocation of proteins into mitochondria". *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 76, 2007, pp. 723–749.
13. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms". *Cell* Vol. 138, no. 4, 2009, pp. 628-644.
14. Walther, D. M. & Rapaport, D. "Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins". *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1793, 2009, pp. 42–51.
15. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. "Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms". *Nat Rev Mol Cell Biol.* Vol. 11, no. 9, 2010, pp. 655-667.
16. Geissler A, Chacinska A, Truscott KN, Wiedemann N, Brandner K, Sickmann A, Meyer HE, Meisinger C, Pfanner N, Rehling P. "The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel". *Cell* Vol. 111, 2002, pp. 507–518.
17. Frazier AE, Dudek J, Guiard B, Voos W, Li Y, Lind M, Meisinger C, Geissler A, Sickmann A, Meyer HE, Bilanchone V, Cumsy MG, Truscott KN, Pfanner N, Rehling P. "Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor". *Nature Struct. Mol. Biol.* Vol. 11, 2004, pp. 226–233.
18. Chacinska A, Lind M, Frazier AE, Dudek J, Meisinger C, Geissler A, Sickmann A, Meyer HE, Truscott KN, Guiard B, Pfanner N, Rehling P. "Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17". *Cell* Vol. 120, 2005, pp. 817–829.
19. Wiedemann, N., van der Laan, M., Hutu, D. P., Rehling, P. & Pfanner, N. "Sorting switch of mitochondrial presequence translocase involves coupling of motor module to respiratory chain". *J. Cell Biol.* Vol. 179, 2007, pp. 1115–1122.
20. Gakh, O., Cavadini, P. & Isaya, G. "Mitochondrial processing peptidases". *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1592, 2002, pp. 63–77.
21. Vögtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, Kellermann J, Voos W, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C. "Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability". *Cell* Vol. 139, 2009, pp. 428–439.
22. Wiedemann, N., Pfanner, N. & Ryan, M. T. "The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria". *EMBO J.* Vol. 20, 2001, pp. 951–960.

23. Young, J. C., Hoogenraad, N. J. & Hartl, F. U. "Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70". *Cell* Vol. 112, 2003, pp. 41-50.
24. Zara, V., Ferramosca, A., Robitaille-Foucher, P., Palmieri, F. & Young, J. C. "Mitochondrial carrier protein biogenesis: role of the chaperones Hsc70 and Hsp90". *Biochem. J.* Vol. 419, 2009, pp. 369–375.
25. Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W. & Koehler, C. M. "The Tim9p–Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier". *EMBO J.* Vol. 21, 2002, pp. 942–953.
26. Davis, A. J., Alder, N. N., Jensen, R. E. & Johnson, A. E. "The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on TIM23 during mitochondrial protein import". *Mol. Biol. Cell* Vol. 18, 2007, pp. 475–486.
27. Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schönfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C. "Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane". *Nature* Vol. 424, 2003, pp. 565–571.
28. Kutik S, Stojanovski D, Becker L, Becker T, Meinecke M, Krüger V, Prinz C, Meisinger C, Guiard B, Wagner R, Pfanner N, Wiedemann N. "Dissecting membrane insertion of mitochondrial  $\beta$ -barrel proteins". *Cell* Vol. 132, 2008, pp. 1011–1024.
29. Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D, Neupert W. "Evolutionary conservation of biogenesis of  $\beta$ -barrel membrane proteins". *Nature* Vol. 426, 2003, pp. 862–866.
30. Chan, N. C. & Lithgow, T. "The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis". *Mol. Biol. Cell* Vol. 19, 2008, pp. 126–136.
31. Popov-Celeketic, J., Waizenegger, T. & Rapaport, D. "Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane". *J. Mol. Biol.* Vol. 376, 2008, pp. 671–680.
32. Stojanovski, D., Guiard, B., Kozjak-Pavlovic, V., Pfanner, N. & Meisinger, C. "Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of  $\alpha$ -helical TOM proteins". *J. Cell Biol.* Vol. 179, 2007, pp. 881–893.
33. Otera H, Taira Y, Horie C, Suzuki Y, Suzuki H, Setoguchi K, Kato H, Oka T, Mihara K. "A novel insertion pathway of mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments". *J. Cell Biol.* Vol. 179, 2007, pp. 1355–1363.
34. Boldogh IR, Nowakowski DW, Yang HC, Chung H, Karmon S, Royes P, Pon LA. "A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery". *Mol. Biol. Cell* Vol. 14, 2003, pp. 4618–4627.

35. de Brito, O. M. & Scorrano, L. "Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria". *Nature* Vol. 456, 2008, pp. 605–610.
36. Curran, S. P., Leuenberger, D., Oppliger, W. & Koehler, C. M. "The Tim9p–Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier". *EMBO J.* Vol. 21, 2002, pp. 942–953.
37. Davis, A. J., Alder, N. N., Jensen, R. E. & Johnson, A. E. The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on TIM23 during mitochondrial protein import. *Mol. Biol. Cell* 18, 475–486 (2007)
38. Gabriel K, Milenkovic D, Chacinska A, Müller J, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C. "Novel mitochondrial intermembrane space proteins as substrates of the MIA import pathway". *J. Mol. Biol.* Vol. 365, 2007, pp. 612–620.
39. Leary SC, Winge DR, Cobine PA. "'Pulling the plug" on cellular copper: The role of mitochondria in copper export". *Biochim Biophys Acta.* Vol. 1793, no. 1, 2008, pp.146-153.
40. Gabriel K, Pfanner N. "The mitochondrial machinery for import of precursor proteins". *Methods Mol Biol.* Vol. 390, 2007, pp. 99-117.
41. Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuán Szklarz LK, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N. "Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins". *EMBO J.* Vol. 23, 2004, pp. 3735–3746.
42. Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K, Herrmann JM. "A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import". *Cell* Vol. 121, 2005, pp. 1059–1069.
43. Kawano S, Yamano K, Naoé M, Momose T, Terao K, Nishikawa S, Watanabe N, Endo T. "Structural basis of yeast Tim40/ Mia40 as an oxidative translocator in the mitochondrial intermembrane space". *Proc. Natl Acad. Sci. USA* Vol. 106, 2009, pp. 14403–14407.
44. Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Martinelli M, Sideris DP, Katrakili N, Tokatlidis K. "MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria". *Nature Struct. Mol. Biol.* Vol. 16, 2006, pp. 198–206.
45. Rissler M, Wiedemann N, Pfannschmidt S, Gabriel K, Guiard B, Pfanner N, Chacinska A. "The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins". *J. Mol. Biol.* Vol. 353, 2005, pp. 485–492.
46. Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D. P., Lisowsky, T. & Tokatlidis, K. "Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a

- functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c". *J. Mol. Biol.* Vol. 353, 2005, pp. 937–944.
47. Dabir DV, Leverich EP, Kim SK, Tsai FD, Hirasawa M, Knaff DB, Koehler CM. "A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1". *EMBO J.* Vol. 26, 2007, pp. 4801–4811.
48. Bihlmaier K, Mesecke N, Terziyska N, Bien M, Hell K, Herrmann JM. "The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain". *J. Cell Biol.* Vol. 179, 2007, pp. 389–395.
49. Farrell SR, Thorpe C. "Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity". *Biochemistry.* Vol. 44, no. 5, 2005, pp. 1532-1541.
50. Hofmann S, Rothbauer U, Mühlenbein N, Baiker K, Hell K, Bauer MF. "Functional and mutational characterization of human MIA40 acting during import into the mitochondrial intermembrane space". *J Mol Biol.* Vol. 353, no. 3, 2005, pp. 517-528.
51. Coppock DL, Thorpe C. "Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases". *Antioxid Redox Signal.* Vol. 8, no. 3-4, 2006, pp. 300-311.
52. Terziyska, N., Grumbt, B., Bien, M., Neupert, W., Herrmann, J.M., and Hell, K. "The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway". *FEBS Lett.* Vol. 581, 2007, pp. 1098–1102.
53. Koehler, C.M. "The small Tim proteins and the twin Cx3C motif". *Trends Biochem. Sci.* Vol. 29, 2004, pp. 1–4.
54. Lisowsky, T., Lee, J.E., Polimeno, L., Francavilla, A., and Hofhaus, G. "Mammalian augmenter of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase". *Dig. Liver Dis.* Vol. 33, 2001, pp. 173–180.
55. Gatzidou, E., Kouraklis, G., and Theocharis, S. "Insights on augmenter of liver regeneration cloning and function". *World J. Gastroenterol.* Vol. 12, pp. 4951–4958.
- 56 Li, Y., Wei, K., Lu, C., Li, Y., Li, M., Xing, G., Wei, H., Wang, Q., Chen, J., Wu, C. "Identification of hepatopoietin dimerization, its interacting regions and alternative splicing of its transcription". *Eur. J. Biochem.* Vol. 269, 2002, pp. 3888–3893.
57. Giorda R, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sakai H, Michaelson J, Francavilla A, Starzl TE, Trucco M. "Analysis of the structure and expression of the augmenter of liver regeneration (ALR) gene". *Mol Med.* Vol. 2, no. 1, 1996, pp. 97-108.
58. Wu CK, Dailey TA, Dailey HA, Wang BC, Rose JP. "The crystal structure of augmenter of liver regeneration: A mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase". *Protein Sci.* Vol. 12, no.5, 2003, pp. 1109-1118.

59. DiMauro, S., and Schon, E.A. "Mitochondrial disorders in the nervous system". *Annu. Rev. Neurosci.* Vol. 31, 2008, pp. 91–123.
60. Schapira AH. "Mitochondrial disease". *Lancet.* Vol. 368, 2006, pp. 70-82.
61. Scaglia F, Wong LJ. "Human mitochondrial transfer RNAs: role of pathogenic mutation in disease". *Muscle Nerve.* Vol. 37, 2008, 150-171.
62. Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, Spinazzola A, Zeviani M, Carr SA, Mootha VK. "Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics". *Nat Genet* Vol. 38, 2006, pp. 576-582.
63. Malfatti E, Bugiani M, Invernizzi F, de Souza CF, Farina L, Carrara F, Lamantea E, Antozzi C, Confalonieri P, Sanseverino MT, Giugliani R, Uziel G, Zeviani M. "Novel mutations of ND genes in complex I deficiency associated with mitochondrial encephalopathy". *Brain.* Vol. 130, 2007, pp. 1894-1904.
64. Barel O, Shorer Z, Flusser H, Ofir R, Narkis G, Finer G, Shalev H, Nasasra A, Saada A, Birk OS. "Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRQ". *Am J Hum Genet* Vol. 82, 2008, pp. 1211–1216.
65. Hoefs SJ, Dieteren CE, Distelmaier F, Janssen RJ, Epplen A, Swarts HG, Forkink M, Rodenburg RJ, Nijtmans LG, Willems PH, Smeitink JA, van den Heuvel LP. "NDUFA2 complex I mutation leads to Leigh disease". *Am J Hum Genet* Vol. 82, 2008, pp. 1306–1315.
66. Massa V, Fernandez-Vizarra E, Alshahwan S, Bakhsh E, Goffrini P, Ferrero I, Mereghetti P, D'Adamo P, Gasparini P, Zeviani M. "Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase". *Am J Hum Genet.*82, 2008, pp.1281-1289.
67. Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De Bie I, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J, Chevrette M, Brown GK, Brown RM, Shoubridge EA. "SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome". *Nature Genet* Vol. 20,1998, pp. 337-343.
68. Valnot I, von Kleist-Retzow JC, Barrientos A, Gorbatyuk M, Taanman JW, Mehaye B, Rustin P, Tzagoloff A, Munnich A, Rötig A. "A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency". *Hum. Molec. Genet.* Vol. 9, 2000, pp. 1245-1249.
69. Valnot I, Osmond S, Gigarel N, Mehaye B, Amiel J, Cormier-Daire V, Munnich A, Bonnefont JP, Rustin P, Rötig A. "Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy". *Am. J. Hum. Genet.* Vol. 67, 2000, pp. 1104-1109.
70. Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, Krishna S, Walker W, Selby J, Glerum DM, Coster RV, Lyon G, Scalais E,

Lebel R, Kaplan P, Shanske S, De Vivo DC, Bonilla E, Hirano M, DiMauro S, Schon EA. "Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene". *Nature Genet.* Vol. 23, 1999, pp. 333-337.

71. Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, Kennaway NG, Shoubbridge EA. "Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy". *Am J Hum Genet.* Vol. 72, no. 1, 2003, pp. 101-114.

72 Cizková A, Stránecký V, Mayr JA, Tesarová M, Havlíčková V, Paul J, Ivánek R, Kuss AW, Hansíková H, Kaplanová V, Vrbacký M, Hartmannová H, Nosková L, Honzík T, Drahotá Z, Magner M, Hejzlarová K, Sperl W, Zeman J, Houstek J, Kmoč S. "TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy". *Nat Genet.* Vol. 40, 2008, pp. 1288-90.

73. Fernández-Vizarra E, Tiranti V, Zeviani M "Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects". *Biochim Biophys Acta.* Vol. 1793, 2009, pp. 200-211.

74. Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G, Horvath R, Klopstock T, Lochmüller H, D'Adamo P, Gasparini P, Strom TM, Prokisch H, Invernizzi F, Ferrero I, Zeviani M. "SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy". *Nat Genet* Vol. 41, 2009, pp. 654–656.

75 Sugiana C, Pagliarini DJ, McKenzie M, Kirby DM, Salemi R, Abu-Amero KK, Dahl HH, Hutchison WM, Vascotto KA, Smith SM, Newbold RF, Christodoulou J, Calvo S, Mootha VK, Ryan MT, Thorburn DR. "Mutation of C20orf7 disrupts complex I assembly and causes lethal neonatal mitochondrial disease". *Am J Hum Genet* Vol. 83, 2008, pp. 468–478.

76. Copeland WC. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med* Vol. 59, 2008, pp. 131-46.

77. Spinazzola A, Invernizzi F, Carrara F, Lamantea E, Donati A, Dirocco M, Giordano I, Meznaric-Petrusa M, Baruffini E, Ferrero I, Zeviani M. Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *J Inherit Metab Dis.* Vol. 32, no. 2, 2009, pp. 143-158.

78. Tynynmaa H, Ylikallio E, Patel M, Molnar MJ, Haller RG, Suomalainen A. "A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions". *Am J Hum Genet.* Vol. 85, no. 2, 2009, pp.290-295.

79. Stewart JD, Hudson G, Yu-Wai-Man P, Blakeley EL, He L, Horvath R, Maddison P, Wright A, Griffiths PG, Turnbull DM, Taylor RW, Chinnery PF

“OPA1 in multiple mitochondrial DNA deletion disorders”. *Neurology*. Vol. 71, 2008, pp. 1829-1831.

80 Weraarpachai W, Antonicka H, Sasarman F, Seeger J, Schrank B, Kolesar JE, Lochmüller H, Chevrette M, Kaufman BA, Horvath R, Shoubridge EA. “Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome”. *Nat Genet* Vol. 41, 2009, pp. 833–837.

81. Valente L, Tiranti V, Marsano RM, Malfatti E, Fernandez-Vizarra E, Donnini C, Mereghetti P, De Gioia L, Burlina A, Castellan C, Comi GP, Savasta S, Ferrero I, Zeviani M. “Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu”. *Am J Hum Genet*. Vol. 80, 2007, pp. 44-58.

82. Zeharia A, Shaag A, Pappo O, Mager-Heckel AM, Saada A, Beinat M, Karicheva O, Mandel H, Ofek N, Segel R, Marom D, Rötig A, Tarassov I, Elpeleg O. “Acute infantile liver failure due to mutations in the TRMU gene”. *Am J Hum Genet* Vol. 85, 2009, pp. 401–407.

83. Duncan AJ, Bitner-Glindzicz M, Meunier B, Costello H, Hargreaves IP, López LC, Hirano M, Quinzii CM, Sadowski MI, Hardy J, Singleton A, Clayton PT, Rahman S. “A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease”. *Am J Hum Genet* Vol. 84, 2009, pp. 558–566.

84. Rouault TA, Tong WH. “Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease”. *Trends Genet*. Vol. 8, 2008, pp. 398-407.

85. Quinzii CM, López LC, Naini A, DiMauro S, Hirano M. “Human CoQ10 deficiencies”. *Biofactors*. Vol. 32, no. 1-4, 2008, pp. 113-118.

86. Koehler CM, Leuenberger D, Merchant S, Renold A, Junne T, Schatz G. “Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease”. *PNAS* Vol. 96, 1999, pp. 2141-2146

87 Ghezzi D, Saada A, D'Adamo P, Fernandez-Vizarra E, Gasparini P, Tiranti V, Elpeleg O, Zeviani M. “FASTKD2 nonsense mutation in an infantile mitochondrial encephalomyopathy associated with cytochrome c oxidase deficiency”. *Am J Hum Genet* Vol. 83, 2008, pp. 415–423.

88. Tiranti V, D'Adamo P, Briem E, Ferrari G, Mineri R, Lamantea E, Mandel H, Balestri P, Garcia-Silva MT, Vollmer B, Rinaldo P, Hahn SH, Leonard J, Rahman S, Dionisi-Vici C, Garavaglia B, Gasparini P, Zeviani M. “Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein”. *Am J Hum Genet*. Vol. 74, 2004, pp. 239-52.

89. Tiranti V, Viscomi C, Hildebrandt T, Di Meo I, Mineri R, Tiveron C, D Levitt M, Prella A, Fagiolari G, Rimoldi M, Zeviani M. “Loss of ETHE1, a



mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy". *Nat Med.* Vol 15, no. 2, 2009, pp. 200-205.

90. Tucker EJ, Compton AG, Thorburn DR. "Recent advances in the genetics of mitochondrial encephalopathies". *Curr Neurol Neurosci Rep.* Vol. 10, no. 4, 2010, pp. 277-285.

91. Bruno C, Biancheri R, Garavaglia B, Biedi C, Rossi A, Lamba Ld, Bado M, Greco M, Zeviani M, Minetti C "A novel mutation in the SURF1 gene in a child with Leigh disease, peripheral neuropathy, and cytochrome-c oxidase deficiency." *J Child Neurol* Vol. 17, 2002, pp. 233-236.

92. Ogawa Y, Naito E, Ito M, Yokota I, Saijo T, Shinahara K, Kuroda Y "Three novel SURF-1 mutations in Japanese patients with Leigh syndrome". *Pediatr Neurol* Vol. 26, 2002, pp. 196-200.

93. Péquignot MO, Dey R, Zeviani M, Tiranti V, Godinot C, Poyau A, Sue C, Di Mauro S, Abitbol M, Marsac C. "Mutations in the SURF1 gene associated with Leigh syndrome and cytochrome C oxidase deficiency". *Hum Mutat.* Vol. 17, no. 5, 2001, pp. 374-381.

94. Williams SI, Taanman Jw, Hansíková H, Houšťková H, Chowdhury S, Zeman J, Houštěk J "A novel mutation in SURF1 causes skipping of exon 8 in a patient with cytochrome c oxidase-deficient Leigh syndrome and hypertrichosis". *Mol Genet Metab* Vol. 73, 2001, pp. 340-343.

95. Piekutowska-Abramczuk D, Popowska E, Pronicka E, Karczmarewicz E, Pronicki M, Kmieć T, Krajewska-Walasek M. "SURF1 gene mutations in Polish patients with COX-deficient Leigh syndrome". *J Appl Genet.* Vol. 42, no.1,2001, pp.103-118.

96. Sacconi S, Salviati L, Sue Cm, Shanske S, Davidson Mm, Bonilla E, Naini Ab, De Vivo Dc, Dimauro S: "Mutation screening in patients with isolated cytochrome c oxidase deficiency". *Pediatr Res* Vol. 53, 2003, pp. 224-230.

97. Jaksch M, Ogilvie I, Yao J, Kortenhaus G, Bresser Hg, Gerbitz Kd, Shoubridge Ea: "Mutations in SCO2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency". *Hum Mol Genet* Vol. 9, 2000, pp. 795-801.

98. Jin, H.; May, M.; Tranebjaerg, L.; Kendall, E.; Fontan, G.; Jackson, J.; Subramony, S. H.; Arena, F.; Lubs, H.; Smith, S.; Stevenson, R.; Schwartz, C.; Vetrie, D. "A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness". *Nature Genet.* Vol. 14, 1996, pp. 177-180.

99. Roesch, K., Curran, S. P., Tranebjaerg, L. & Koehler, C. M. "Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex". *Hum. Mol. Gen.* Vol. 11, 2002, pp. 477-486.

100. Cheng, M. Y.; Hartl, F.-U.; Martin, J.; Pollock, R. A.; Kalousek, F.; Neupert, W.; Hallberg, E. M.; Hallberg, R. L.; Horwich, A. L. "Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria". *Nature* Vol. 337, 1989, pp. 620-625.
101. Hansen, J. J.; Durr, A.; Cournu-Rebeix, I.; Georgopoulos, C.; Ang, D.; Nielsen, M. N.; Davoine, C.-S.; Brice, A.; Fontaine, B.; Gregersen, N.; Bross, P. "Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60". *Am. J. Hum. Genet.* Vol. 70, 2002, pp. 1328-1332.
102. Heckmatt, J.Z., and Dubowitz, V. "Needle biopsy of skeletal muscle. *Muscle Nerve* Vol 7, 1994, pp. 594.
103. Sciacco, M., and Bonilla, E. "Cytochemistry and Immunocytochemistry of Mitochondria in Tissue Sections". *Methods Enzymol.* Vol. 264, 1996, pp. 509–521.
104. Dubowitz, V. *Muscle Biopsy, a Practical Approach, Second Edition* Baillie`re Tindall, 1985.
105. Bresolin N, Zeviani M, Bonilla E, Miller RH, Leech RW, Shanske S, Nagagawa M, Di Mauro S. "Fatal infantile c oxidase deficiency: decrease of immunologically detectable enzyme in muscle". *Neurology* Vol. 35, 1985, pp. 802-812.
106. Hoffmann, K., and Lindner, T.H. "EasyLINKAGE-Plus automated linkage analyses using large-scale SNP data". *Bioinformatics* Vol. 21, 2005, pp. 3565–3567.
107. Okado-Matsumoto, A., and Fridovich, I. "Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria". *J. Biol. Chem.* Vol. 276, 2001, pp. 38388– 38393.
108. Virgilio R, Ronchi D, Hadjigeorgiou GM, Bordoni A, Saladino F, Moggio M, Adobbati L, Kafetsouli D, Tsironi E, Previtali S, Papadimitriou A, Bresolin N, Comi GP. "Novel Twinkle (PEO1) gene mutations in mendelian progressive external ophthalmoplegia". *J Neurol.* Vol. 255, no. 9, 2008, pp. 1384-1391.
109. Francavilla, A., Hagiya, M., Porter, K.A., Polimeno, L., Ihara, I., and Starzl, T.E. "Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* Vol. 20, 1994, pp. 747–757.
110. Polimeno L, Pesetti B, Giorgio F, Moretti B, Resta L, Rossi R, Annoscia E, Patella V, Notarnicola A, Mallamaci R, Francavilla A. "Expression and localization of augmenter of liver regeneration in human muscle tissue". *Int J Exp Pathol.* Vol. 90, no. 4, 2009, pp. 423-430.
111. van Ekeren, G.J., Stadhouders, A.M., Smeitink, J.A., and Sengers, R.C. "A retrospective study of patients with the hereditary syndrome of congenital

cataract, mitochondrial myopathy of heart and skeletal muscle and lactic acidosis". *Eur J Pediatr*. Vol. 152, 1993, pp. 255–259.

112. Di Fonzo A, Ronchi D, Lodi T, Fassone E, Tigano M, Lamperti C, Corti S, Bordoni A, Fortunato F, Nizzardo M, Napoli L, Donadoni C, Salani S, Saladino F, Moggio M, Bresolin N, Ferrero I, Comi GP. "The mitochondrial disulfide relay system protein GFER is mutated in autosomal-recessive myopathy with cataract and combined respiratory-chain deficiency". *Am J Hum Genet*. Vol. 84, no. 5, 2009, pp. 594-604.

113. Daithankar VN, Schaefer SA, Dong M, Bahnson BJ, Thorpe C. "Structure of the human sulfhydryl oxidase augments liver regeneration and characterization of a human mutation causing an autosomal recessive myopathy". *Biochemistry*. Vol. 49, no.31, 2010, pp. 6737-6745.

114. Riemer J, Bulleid N, Herrmann JM. "Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process". *Science*. Vol. 324, no. 5932, 2009, pp. 1284-7.

115. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG. "The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals". *Nature*. Vol. 402, no. 6759, 1999, pp. 309-13.

116. Reddehase S, Grumbt B, Neupert W, Hell K. "The disulfide relay system of mitochondria is required for the biogenesis of mitochondrial Ccs1 and Sod1". *J Mol Biol*. Vol. 385, no.2, 2009, pp. 331-338.

117. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis". *Nature*. Vol. 362, no. 6415, pp. 59-62.

118. Kawamata H, Manfredi G. "Import, maturation, and function of SOD1 and its copper chaperone CCS in the mitochondrial intermembrane space". *Antioxid Redox Signal*. Vol. 19, no. 9, 2010, pp. 1375-1384.

119. Magrané J, Hervias I, Henning MS, Damiano M, Kawamata H, Manfredi G. "Mutant SOD1 in neuronal mitochondria causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities". *Hum Mol Genet*. Vol. 18, no. 23, 2009, pp. 4552-4564

120. Kawamata H, Manfredi G. "Different regulation of wild-type and mutant Cu,Zn superoxide dismutase localization in mammalian mitochondria". *Hum Mol Genet*. Vol. 17, no. 21, 2008, pp. 3303-3317.



## APPENDICI

Articoli scientifici pubblicati durante il periodo di dottorato.

Gli articoli inerenti a questo studio sono riportati *in extenso*.

- Guglieri M., Magri F., D'Angelo MG, Prella A., Morandi L., Rodolico C., Cagliani R., Mora M., Fortunato F., Bordoni A., Del Bo R., Ghezzi S., Pagliarani S., Lucchiari S., Salani S., Zecca C., Lamperti C., Ronchi D., Aguenouz M., Ciscato P., Di Blasi C., Ruggieri A., Moroni I., Turconi A., Toscano A., Moggio M., Bresolin N., Comi GP.

**Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients.**

*Hum Mutat.* 2008 Feb;29(2):258-66

- Corti S., Bordoni A., Ronchi D., Musumeci O., Aguenouz M, Toscano A., Lamperti C., Bresolin N., Comi G.P.

**Clinical features and new molecular findings in Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency.**

*J Neurol Sci.* 2008 Mar 15;266(1-2):97-103.

- Roberta Virgilio, Dario Ronchi, Georgios M. Hadjigeorgiou, Andreina Bordoni, Francesca Saladino, Maurizio Moggio, Laura Adobbati, Demetra Kafetsouli, Evangelia Tsironi, Stefano Previtali, Alexandros Papadimitriou, Nereo Bresolin,, Giacomo P. Comi

**Novel Twinkle (PEO1) gene mutations in mendelian Progressive External Ophthalmoplegia**

*J Neurol.* 2008 Sep;255(9):1384-91. Epub 2008 Jun 30.

- Stefania Corti,, Monica Nizzardo, Martina Nardini, Chiara Donadoni, Sabrina Salani, Dario Ronchi, Francesca Saladino, Andreina Bordoni, Francesco Fortunato, Del Bo R, Dimitra Papadimitriou, Federica Locatelli, Giorgia Menozzi, Sandra Strazzer, Nereo Bresolin,, and Giacomo P. Comi,

**Neural stem cells transplantation ameliorates spinal muscular atrophy phenotype.**

*J Clin Invest.* 2008 Oct;118(10):3316-30.

- Corti S, Donadoni C, Ronchi D, Bordoni A, Fortunato F, Santoro D, Del Bo R, Lucchini V, Crugnola V, Papadimitriou D, Salani S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.

**Amyotrophic lateral sclerosis linked to a novel SOD1 mutation with muscle mitochondrial dysfunction.**

*J Neurol Sci.* 2009 Jan 15;276(1-2):170-4. Epub 2008 Nov 8.

- Virgilio R, Ronchi D, Bordoni A, Fassone E, Bonato S, Donadoni C, Torgano G, Moggio M, Corti S, Bresolin N, Comi GP.

**Mitochondrial DNA G8363A mutation in the tRNA Lys gene: clinical, biochemical and pathological study.**

*J Neurol Sci.* 2009 Jun 15;281(1-2):85-92. Epub 2009 Mar 10.

- Di Fonzo A, Ronchi D, Lodi T, Fassone E, Tigano M, Lamperti C, Corti S, Bordoni A, Fortunato F, Nizzardo M, Napoli L, Donadoni C, Salani S, Saladino F, Moggio M, Bresolin N, Ferrero I, Comi GP.

**The mitochondrial disulfide relay system protein GFER is mutated in autosomal-recessive myopathy with cataract and combined respiratory-chain deficiency.**

*Am J Hum Genet.* 2009 May;84(5):594-604. Epub 2009 Apr 30.

- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Simone C, Falcone M, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP.

**Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice.**

*Brain.* 2010 Feb;133(Pt 2):465-81. Epub 2009 Dec 23.

- Ronchi D, Virgilio R, Bordoni A, Fassone E, Sciacco M, Ciscato P, Moggio M, Govoni A, Corti S, Bresolin N, Comi GP.

**The m.12316G>A mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(CUN)) gene is associated with mitochondrial myopathy and respiratory impairment.**

*J Neurol Sci.* 2010 May 15;292(1-2):107-10. Epub 2010 Feb 18.

- Crugnola V, Lamperti C, Lucchini V, Ronchi D, Peverelli L, Prella A, Sciacco M, Bordoni A, Fassone E, Fortunato F, Corti S, Silani V, Bresolin N, Di Mauro S, Comi GP, Moggio M.

**Mitochondrial respiratory chain dysfunction in muscle from patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis.**

*Arch Neurol.* 2010 Jul;67(7):849-54.

- Orcesi S, La Piana R, Uggetti C, Tonduti D, Pichiecchio A, Pasin M, Viselner G, Comi GP, Del Bo R, Ronchi D, Bastianello S, Balottin U. **Spinal cord calcification in an early-onset progressive leukoencephalopathy.**

*J Child Neurol* (accettato per la pubblicazione)

Roberta Virgilio  
Dario Ronchi  
Georgios M. Hadjigeorgiou  
Andreina Bordoni  
Francesca Saladino  
Maurizio Moggio  
Laura Adobbati  
Demetra Kafetsouli  
Evangelia Tsironi  
Stefano Previtalli  
Alexandros Papadimitriou  
Nereo Bresolin  
Giacomo P. Comi

## Novel Twinkle (*PEO1*) gene mutations in mendelian progressive external ophthalmoplegia

Received: 15 October 2007  
Received in revised form: 30 January 2008  
Accepted: 5 March 2008  
Published online: 30 June 2008

D. Kafetsouli · E. Tsironi  
Dept. of Ophthalmology  
School of Medicine  
University of Thessaly  
Larissa, Greece.

S. Previtalli  
Neuropathology Unit  
Dept. of Neurology  
San Raffaele Scientific Institute  
Milan, Italy

N. Bresolin  
I.R.C.C.S. E. Medea  
Associazione La Nostra Famiglia  
Bosisio Parini  
Lecco, Italy

R. Virgilio · D. Ronchi · A. Bordoni ·  
F. Saladino · M. Moggio · N. Bresolin ·  
G. P. Comi (✉)  
Centro Dino Ferrari  
Dipartimento di Scienze Neurologiche  
Università degli Studi di Milano  
Fondazione I.R.C.C.S. Ospedale Maggiore  
Policlinico, Mangiagolli e Regina Elena  
Via Sforza 35  
20122 Milano, Italy  
Tel.: +39-02/5503-3817  
Fax: +39-02/5030-20430  
E-Mail: giacomo.comi@unimi.it

G. M. Hadjigeorgiou · A. Papadimitriou  
Neurogenetics Unit  
Dept. of Neurology  
School of Medicine  
University of Thessaly  
Larissa, Greece

L. Adobbati  
Dept. of Neuroscience  
Dino Ferrari Centre  
University of Milan  
I.R.C.C.S. Istituto Auxologico Italiano  
Milan, Italy

**Abstract** Multiple deletions of mitochondrial DNA (mtDNA) are associated with different mitochondrial disorders inherited as autosomal dominant and recessive traits. Causative mutations have been found in five genes, mainly involved in mtDNA replication and stability. They include POLG1, the gene encoding the catalytic subunit of mtDNA polymerase ( $\text{pol } \beta$ ), POLG2 encoding its accessory subunit, ANT1 coding the adenine nucleotide translocator and PEO1 which codes for Twinkle, the mitochondrial helicase. Finally OPA1 missense mutations are involved in

phenotypes presenting optic atrophy as a major feature.

To define the relative contribution of POLG1, POLG2, ANT1 and PEO1 genes to the mtDNA multiple deletion syndromes, we analysed them in a cohort of 67 probands showing accumulation of multiple mtDNA deletions in muscle. The patients were predominantly affected with a mitochondrial myopathy with or without progressive external ophthalmoplegia (PEO). Genetic analysis revealed that 1) PEO1 has a major role in determining familial PEO, since it accounts for 26.8% of familial cases, followed by ANT1 (14.6%) and POLG1 (9.8%); 2) no mutations in any of the known genes were found in 53.7% of probands of this series. Six novel missense mutations contributing to the mutational load of PEO1 gene (p.R334P, p.W315S, p.S426N, p.W474S, p.F478I, p.E479K) were associated with an adult onset PEO phenotype.

**Key words** mtDNA deletions · progressive external ophthalmoplegia

## Introduction

The Mendelian forms of progressive external ophthalmoplegia (PEO) are clinically and genetically heterogeneous disorders characterized by the accumulation of multiple deletions and point mutations of mitochondrial DNA (mtDNA) in postmitotic tissues. Most of the autosomal dominant PEO (adPEO) families carry heterozygous mutations in either one of five genes. They include *POLG1* that encodes the catalytic subunit of DNA polymerase  $\gamma$  (pol  $\gamma$ ) [1], *POLG2* encoding the p55 accessory pol  $\gamma$  subunit [2], *ANT1* coding for the mitochondrial adenine nucleotide translocator [3], and *PEO1* (formerly *C10ORF2*) which codes for Twinkle, a mitochondrial protein with structural similarity to the phage T7 primase/helicase [4]. Heterozygous missense mutations in the *OPA1* gene leading to accumulation of mtDNA deletions in muscle tissue have been observed in families with optic atrophy, PEO and other variable signs such as ataxia, deafness and a sensory-motor neuropathy [5–7].

Mutations in *POLG1* can also cause autosomal recessive PEO (arPEO) [8]. In addition, recessive *POLG1* mutations are responsible for different neurological disorders, including sensory-ataxic neuropathy, dysarthria and ophthalmoplegia (SANDO) [9], juvenile spino-cerebellar ataxia-epilepsy syndrome (SCAE) [10], Alpers-Huttenlocher hepatopathic poliodystrophy [11, 12] and levo-dopa responsive parkinsonism with premature ovarian failure [13]. So far, a lower degree of clinical pleiomorphism has been observed in patients with *PEO1* gene mutations, although recessive mutations have been observed in infantile onset spinocerebellar ataxia [14], encephalopathic and hepatocerebral forms of mtDNA depletion syndrome [15, 16], while a heterozygous dominant mutation has been associated with familial parkinsonism and ophthalmoplegia [17].

As far as autosomal dominant or recessive PEO are concerned, *POLG1* is believed to represent the most commonly mutated gene, while mutations in *ANT1* and *PEO1* are relatively rare [18].

Mendelian PEO patients usually present ptosis and ophthalmoparesis due to the accumulation of multiple mitochondrial DNA (mtDNA) deletions in extraocular skeletal muscle. Many patients also develop limb weakness and some have multisystemic involvement including hearing loss and psychiatric abnormalities [19].

To define the relative contribution of the known genes to the etiology of Mendelian PEO, we reviewed the clinical and molecular features of a large sample of mitochondrial myopathy patients with muscle multiple mtDNA deletions, with special reference to inheritance, age of onset and progression, type of tissue and organ involvement. The complete screening of the *POLG1*, *POLG2*, *PEO1* and *ANT1* showed that 1) *PEO1* gene has a major role in determining familial PEO and 2) undetermined familial cases may represent up to the 48.8%.

## Materials and methods

### Sample

We first analysed *Twinkle* and *POLG2* genes in 39 patients, previously resulted negative for mutations in *POLG1* and *ANT1* genes. Then we reviewed clinical and genetic data of an entire series of 82 patients (45 with an autosomal dominant transmission and 37 sporadic), collected at our department over the last 20 years and belonging to 67 independent families and presenting muscle multiple mtDNA deletions.

Gender distribution was as follows: 40 males and 42 females. Mean age at the diagnosis was 54.1 years (range 18–75 yrs) and mean age at disease onset of 43.9 yrs (range 17–75 yrs). All patients underwent a detailed clinical characterization and a muscle biopsy that showed the presence of ragged red fibres and cytochrome c oxidase negative fibres.

Written informed consent was obtained from all subjects or their caregivers at the moment of primary diagnostic procedures, with explicit consent to future uses for research purpose, according to the Declaration of Helsinki. This protocol was approved by our Institutional Review Board.

### Molecular studies

Southern Blot analysis and long-range polymerase chain reaction (PCR) of the muscle DNA showed multiple mtDNA deletions. Therefore patients with a low level of mtDNA deletions were not included in this study. The coding sequences and splicing sites of *ANT1*, *PEO1* (*C10ORF2*), *POLG1* and *POLG2* genes were analysed as described [1–4].

All newly identified mutations were confirmed by restriction fragment length polymorphisms (RFLP) analysis on independent PCR products using the following restriction enzymes (New England Biolabs) with appropriate buffer: Hpy188I (W313S), NlaIV (R334P), MseI (E479K), BsrI (W474S), TspRI (S426N), Transgenomics Surveyor™ Nuclease (F478I).

To prove that W474S and E479K are de novo mutations, patient F II-1 and G II-1 and their parents were examined by microsatellite analysis on chromosome X using ABI PRISM Linkage Mapping Sets 2.5 (Applied Biosystems). The following markers were checked: DXS1227, DXS990, DXS987, DXS993, DXS1073, DXS8091, DXS1106, DXS1001, DXS1068, DXS1214, DXS8055, DXS8043, DXS1060, DXS991.

In order to evaluate the possibility of a common allele in patients who presents R303W, we analysed the following intronic SNPs: c.1485–5, c.1485–3, c.1734+16 and the microsatellite markers D10S185, D10S192 and D10S1668.

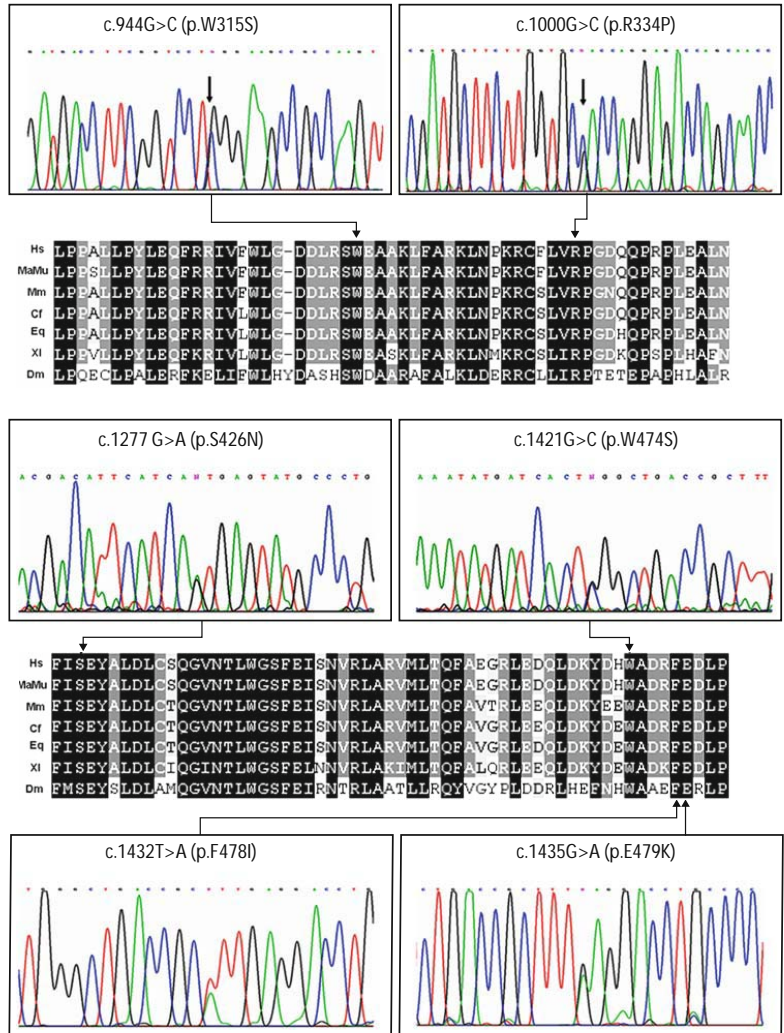
## Results

### *PEO1* and *POLG2* gene analysis

We identified seven heterozygous missense mutations in the *PEO1* gene in ten independent families. Six of them are novel (c.G1001C leading to p.R334P amino acid substitution, c.G944C resulting in p.W315S, c.G1277A: p.S426N, c.G1421C: p.W474S c.T1432A: p.F478I, c.G1435A: p.E479K) (Fig. 1). A further mutation (R303W) has been previously described, but its pathogenetic role needed confirmation. The R303W mutation was found in four unrelated Italian PEO patients. Evidence of disease segregation with the mutation was present in three pedigrees, one of whom showed several affected members



**Fig. 1** New PEO1 gene mutations in PEO probands. Electropherograms of the heterozygous nucleotide sequence changes observed in each proband are shown, in a 5'-3' order. The corresponding patients are as follows. Proband of family H carried the W315S; patient II-3 of family D carried the R334P mutation; patient III-4 of family E showed the S426N mutation, the sporadic patient III-3 of family F carried the W474S mutation; proband I carried F478I, and the sporadic patient G II-1 presented the de novo E479K mutation. A table of phylogenetic conservation is also shown: Hs Homo sapiens; seq. ref. MaMu Macaca Mulatta; Mm Mus musculus; Cf canis familiaris; Eq Equus Caballus; Xi Xeanopus laevis; Dm Drosophila Melanogaster



along four generations (Fig. 2, families A–C). Notably, all patients carrying this mutation share a common haplotype on chromosome 10 from marker D10S185 to D10S1668. Their clinical features are presented in Table 1.

The novel R334P mutation co-segregated with a pure phenotype in a Greek family (Fig. 2, family D). The S426N amino acid change was found in a 66 year-old female proband, affected with severe PEO, upper and lower limb proximal weakness and hypothyroidism; her disease was transmitted as an autosomal dominant trait (Fig. 2, family E, III-4).

The W474S mutation was observed in a 34 year-old woman affected with migraine since her menarche, with PEO by the age of 20 years, premature ovarian failure at the age of 29 years, followed by depression and proximal myopathy (Fig. 2, F, III-3). Her parents were healthy as well as her first and second degree relatives. Molecular analysis showed a wild-type PEO1 sequence in both parents; paternity was confirmed.

Another “de-novo” E479K mutation was identified in a 19 year-old female PEO patient; indeed, her parents had a normal clinical examination and molecular analysis of PEO1 gene (Fig. 2, G). Also in this case, paternity

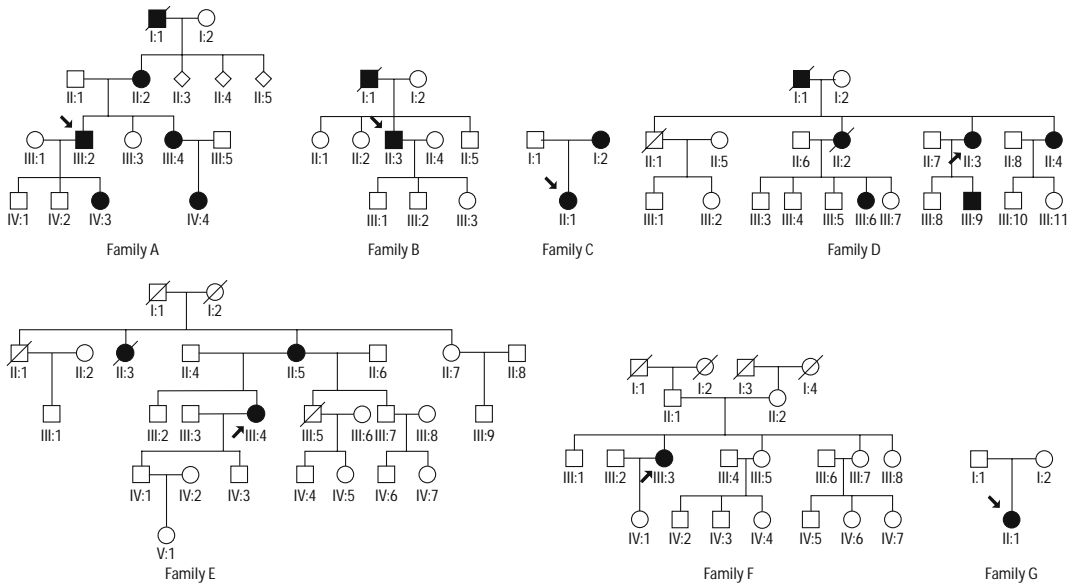


Fig. 2 Genealogic trees of PEO1 gene mutated families. Dark signs denote affected individuals

Table 1 Clinical features of probands and affected relatives carrying PEO1 gene mutations

Patient	Sex	Age (years)	Onset (years)	Family history	Clinical features	Country of origin	Aminoacid changes	cDNA <sup>a</sup>
A III 2	M	55	45	AD	Ptosis, severe restriction of horizontal and vertical eye movements, progressive diplopia in right lateral and vertical position	Italy	R303W	C907T
B	M	73	68	AD	Ptosis, severe restriction of horizontal and vertical eye movements, bilateral cataract	Italy	R303W	C907T
C I	F	81 <sup>b</sup>	60	AD	Ptosis, diplopia, dysphagia and dysphonia	Italy	R303W	C907T
C II	F	65	48	AD	Ptosis, diplopia, dysphagia and dysphonia			
D II 3	F	64	62	AD	Ptosis and mild restriction of horizontal eye movements	Greece	R334P	G1001C
D II 4	F	61	55	AD	Ptosis and mild restriction of horizontal eye movements	Greece	R334P	G1001C
D III 9	M	49	36	AD	Ptosis	Greece	R334P	G1001C
D III 6	F	40		AD	Mild ptosis	Greece	R334P	G1001C
E III 4	F	66	50	AD	Ptosis, ophthalmoplegia, upper and lower limb proximal weakness and hypothyroidism	Italy	S426N	G1277A
E II 5	F	87	70		Ptosis, ophthalmoplegia	Italy	S426N	G1277A
F	F	34	20	Sporadic	Ptosis, ophthalmoplegia, migraine, premature ovarian failure, depression and proximal myopathy	Italy	W474S	G1421C
G	F	20	18	Sporadic	Ptosis and severe mild restriction of horizontal eye movements	Italy	E479K	G1435A
H	F	78 <sup>b</sup>	64	AD	Ptosis and ophthalmoplegia	Greece	W315S	G944C
I	M	75	50	AD	Ptosis and ophthalmoplegia	Greece	F478I	T1432A
L	F	64	56	AD	Ptosis and severe restriction of horizontal and vertical eye movements	Italy	R303W	C907T

<sup>a</sup> All nucleotide changes are heterozygous; <sup>b</sup> Age at death

was confirmed by molecular analysis. As observed with the W474S mutation, this mutation determines an early disease onset, as well, although the clinical picture was relatively stable after a five-year follow-up period.

Other two mutations (W315S, F478I) were observed in Greek late-onset PEO patients: their family history was positive, but family members were unavailable for further investigations.

All these PEO1 mutations were missense changes, located within exon 1 and 2 coding sequence, while no mutation was found in other exons of the gene (Fig. 3). The amino acid changes predicted by the novel coding sequence mutations affect conserved amino acids within evolutionarily conserved Twinkle domains (Fig. 1). Furthermore, all mutations were not observed in 200 Italian and 100 Greek control subjects.

Finally, all probands had a normal POLG2 gene analysis.

### Genetic heterogeneity of patients with multiple mtDNA deletions

To estimate the relative frequency of mutations of genes responsible for ad/ar-PEO within a larger series of patients, we reviewed all the consecutive cases from our department over the last 20 years (67 probands) and screened for all known genes.

This extended series includes two familial PEO1 mutations (R345P, A359T) that have been previously described [4]. Therefore, the incidence of PEO1 gene mutations in independent probands of our cohort is 17.9% of cases.

The screening of POLG1 gene in cases of new occurrence revealed a new mutation: it was a heterozygous nucleotide change (c.G3556C, p.D1186H) (not shown) that affects a highly conserved amino acid and was absent in 200 Italian control subjects. This mutation occurs in trans- with the relatively common heterozygous haplotype T2511-P587L. The affected patient is an apparently sporadic 74 year-old Italian male, whose illness started at the age of 64 years and presented ptosis, dysphagia and neurosensory hypoacusia. Interestingly, in

another newly diagnosed patient, the common haplotype T2511-P587L was present in homozygosis: the affected patient is a 50 year-old female with a recent onset of myopathy, without PEO.

In the past, we and others have identified 13 mutations in the POLG1 gene in 15 of these independent families [5, 20]. Nine of them showed autosomal recessive transmission, while four have an autosomal dominant pattern of inheritance. Overall the POLG1 gene is mutated in 19.4% of our probands. Clinically, POLG1-mutated patients are more heterogeneous; in fact they usually present PEO phenotype, but signs of other tissue involvement are also observed: axonal neuropathy (4 patients), myopathy (7 patients), neurosensory hypoacusia (1 patient), cerebellar signs (3 patients), retinitis pigmentosa (1 patient), lactic acidosis (two patients).

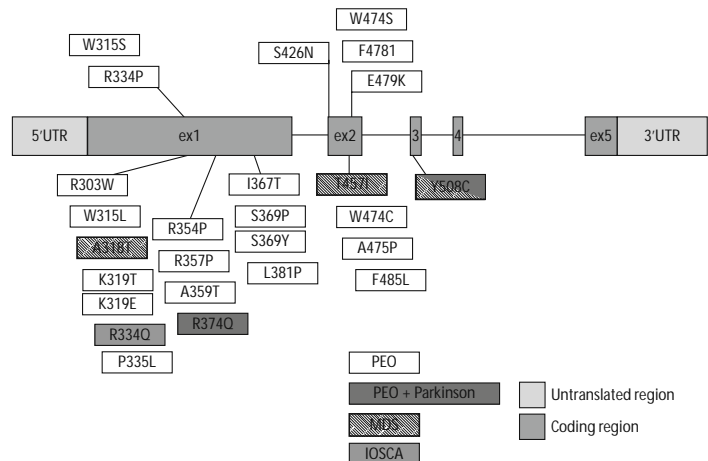
Finally ANT1 mutations were relatively rare and occurred in 8.9% of the sample. We did not identify new ANT1 mutations in recently diagnosed patients. The previously identified ANT1 mutations consisted in two heterozygous missense mutations in six independent families (L98P, A114P) [3, 21]. All ANT1 mutated patients

Table 2 Relative proportion of genetically diagnosed cases

	Probands	Familial cases	Sporadic cases
PEO1	12 (17.91 %)	11 (26.8 %)	1 (3.8 %)
ANT1	6 (8.95 %)	6 (14.6 %)	0 (0 %)
POLG1	13 (19.40 %)	4 (9.8 %)	9 (34.6 %)
POLG2	0	0	0
ND	36 (53.73 %)	20 (48.8 %)	16 (61.5 %)
TOTAL	67	41	26

ND not diagnosed

Fig. 3 Schematic representation of intron/exon organization of PEO1 gene and distribution of mutations along the gene. The six new mutations described in the present manuscript are shown above the scheme, while the previously described are below the scheme. Phenotypes are also associated with mutations: MDS mitochondrial DNA depletion syndrome; IOSCA infantile onset spino-cerebellar ataxia



belonged to families with autosomal dominant transmission: these patients were predominantly affected by PEO, with facial and proximal upper limb myopathy, with the possible additional features of axonal polyneuropathy and hypothyroidism.

Finally, this series does not include any mutation in POLG2.

Thirty-six of the screened patients resulted negative for ANT1, POLG1, POLG2 and PEO1 gene mutations, but presented a phenotype and diagnostic exams that are characteristic of a mtDNA multiple deletions syndrome. This subgroup is composed by 20 familial and 16 sporadic cases. Clinical features of patients without mutations and unlinked to known genes are relatively heterogeneous. In particular, muscle weakness is the most frequent symptom (86.3%), followed by other features such as ptosis (75.0%), ophthalmoplegia (54.5%), hyperCKemia (64.4%), axonal sensori-motor neuropathy (50%), lactic acidosis (30%), neurosensorial hypoacusia (30%), cerebellar signs (33%), diabetes (27.8%), cognitive impairment (25%), bulbar symptoms (22%), short stature (15.8%), cataract (20%), extrapyramidal signs (10.5%) and cardiopathy (8%). A major cluster of clinical features was represented by patients with PEO, myopathy, axonal neuropathy, hypoacusia and diabetes; nine patients had isolated proximal myopathy without PEO.

## Discussion

Our data increase the genetic and clinical heterogeneity of progressive external ophthalmoplegia associated with muscle multiple mtDNA deletions. It has been described that mutations in three nuclear genes (POLG1, PEO1, which codes for the protein Twinkle, and ANT1) are found in 70% of families with dominant PEO and 1/3 of sporadic cases of PEO with multiple mtDNA deletions [18]. A heterozygous dominant mutation in POLG2 was also shown to cause PEO [2]. Mutations in OPA1 gene are also emerging as a new cause of autosomal dominant "optic atrophy plus" phenotype with muscle accumulation of multiple mtDNA deletions [5–7]. Although the involvement of this gene in patients without optic nerve atrophy as a prominent clinical feature cannot be excluded at this moment, the absence of optic neuropathy in the undiagnosed patients of the present study makes this hypothesis unlikely.

We identified one POLG1 and six PEO1 novel heterozygous mutations: all of them are likely to be pathogenic. Several lines of evidence support their role. As far as the PEO1 gene is involved, the R334P, W315S, S426N, W474S, F478I and E479K amino acid changes affect position highly conserved among several eukaryotic homologues, within conserved regions of the protein (Fig. 2). All mutated amino acid positions are encoded

by Twinkle exon 1 and 2, suggesting that mutations 3' in the gene are either lethal or more tolerated than mutations in the NH2 terminus. Second, the mutations were not present in 600 control chromosomes. Third, the R334P and S426N mutations co-segregated with ad-PEO in the affected families. Similar evidence could not be obtained for two other familial mutations (W315S and F478I), while we demonstrated that the two apparently sporadic mutations (W474S and the very close E479K) were indeed *de novo* changes. The complete coding sequences of the POLG1, POLG2 and ANT1 genes were normal in all these cases, strongly suggesting a causative role for the new Twinkle amino acid changes. However, their mutational status should remain provisional, until new cases are described. Finally, the novel recessive D1186H POLG1 mutation is likely to be pathogenic, since it is absent in controls and affects a region of the protein conserved among several eukaryotic homologues.

Twinkle and ANT1 genes mutations are almost exclusively associated with adult onset PEO phenotypes, in this selected series. Usually these PEO patients belong to ad families. However, the identification of *de novo* sporadic mutations in Twinkle suggests that also sporadic patients should be investigated for PEO1 as well as for the other genes.

Reviewing our data, we confirmed that POLG1 gene mutations may cause a relatively heterogeneous phenotype [21]. Most of our patients presented PEO, but a large proportion of them had signs of multisystemic involvement (neuropathy, myopathy, hypoacusia, cerebellar signs, retinitis pigmentosa, lactic acidosis). This contrasts with the predominantly milder phenotype seen in Twinkle and ANT1 mutated patients.

Considering the relative causative role of PEO-associated genes, POLG1 is considered the most commonly mutated nuclear gene. In this relatively large series of patients with muscle mtDNA multiple deletions, 19.4% of the probands carry mutations in the POLG1 gene. Instead PEO1 mutations occur in 17.9% of cases. Finally ANT1 mutations are relatively rare and occur in 8.9% of this sample. As pointed out previously, we did not find any mutations in the POLG2 gene. Similar data regarding the POLG1 gene were reported in a U.S.A. resident group of PEO patients (13% of 30 probands irrespective of inheritance pattern and 15% of those with a positive family history [21]), while the relative proportions were different in another study involving 27 Italian and British patients was as follows: POLG1 26%, PEO1 7.4%, ANT1 3.7% [17].

However, taking into consideration a positive family history, Twinkle results as the most commonly mutated gene in ad-PEO, with its mutation occurring in 26.8% of patients, while ANT1 and POLG1 account for 14.6% and for 9.8% of familial PEO, respectively. On the contrary, POLG1 is the most commonly mutated gene in our spo-

radic cases of PEO (34.6%), while Twinkle mutations occur in 3.8% of these patients.

In this series no recessive mutations in *ANT1* and *PEO1* genes have been identified. The number of patients unlinked to any known genes is relatively high and the percentage is higher in sporadic cases (61.53%) compared to familial cases (48.8%). This high proportion of genetically undiagnosed patients suggests that other genes cause autosomal dominant and recessive adult-onset mitochondrial myopathy with mtDNA multiple deletions, often without PEO. The clinical characterization in clusters of undiagnosed patients and the

identification of multigenerational families may support the search of new causative genes.

**Acknowledgments** We thank the patients and their families for their support and collaboration. This research received support by the "Associazione Amici del Centro Dino Ferrari" and by a Research Grant from Italian Ministry of University and Research "PRIN 2006" entitled "Un approccio integrato allo studio della eziopatogenesi delle mitocondriopatie" to G.P.C. The Telethon "Bank of DNA, Nerve and Muscle Tissues" (no. GTF02008) was the source of the skeletal muscle samples and DNA used in this study. The Eurobiobank project QLTR-2001-02769 is also gratefully acknowledged.

## References

1. Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C (2001) Mutation of *POLG* is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 28:211–212
2. Longley MJ, Clark S, Yu Wai Man C, Hudson G, Durham SE, Taylor RW, Nightingale S, Turnbull DM, Copeland WC, Chinnery PF (2006) Mutant *POLG2* disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet* 78:1026–1034
3. Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kyttala A, Zeviani M, Comi GP, Keranen S, Peltonen L, Suomalainen A (2000) Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289:782–785
4. Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M, Larsson C (2001) Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* 28:223–231
5. Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, Griffiths PG, Ahlqvist K, Suomalainen A, Reynier P, McFarland R, Turnbull DM, Chinnery PF, Taylor RW (2008) Mutation of *OPA1* causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131(Pt 2):329–337
6. Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissière A, Campos Y, Rivera H, de la Aleja JG, Carroccia R, Iommarini L, Labauge P, Figarella-Branger D, Marcorelles P, Furby A, Beauvais K, Letournel F, Liguori R, La Morgia C, Montagna P, Liguori M, Zanna C, Rugolo M, Cossarizza A, Wissinger B, Verny C, Schwarzenbacher R, Martin MA, Arenas J, Ayuso C, Garesse R, Lenaers G, Bonneau D, Carelli V (2008) *OPA1* mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 131(Pt 2): 338–351
7. Ferraris S, Clark S, Garelli E, Davidzon G, Moore SA, Kardon RH, Bienstock RJ, Longley MJ, Mancuso M, Gutiérrez Ríos P, Hirano M, Copeland WC, Dimauro S (2008) Progressive External Ophthalmoplegia and Vision and Hearing Loss in a Patient With Mutations in *POLG2* and *OPA1*. *Arch Neurol* 6:125–131
8. Lamantea E, Tiranti V, Bordoni A, Toscano A, Bono F, Servidei S, Papadimitriou A, Spelbrink H, Silvestri L, Casari G, Comi GP, Zeviani M (2002) Mutations of mitochondrial DNA polymerase gamma A are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Ann Neurol* 52:211–219
9. Van Goethem G, Martin JJ, Dermaut B, Lofgren A, Wibail A, Ververken D, Tack P, Dehaene I, Van Zandijcke M, Moonen M, Ceuterick C, De Jonghe P, Van Broeckhoven C (2003) Recessive *POLG* mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromusc Dis* 13:133–142
10. Winterthun S, Ferrari G, He L, Taylor RW, Zeviani M, Turnbull DM, Engelsens BA, Moen G, Bindoff LA (2005) Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase-gamma mutations. *Neurology* 64:1204–1208
11. Naviaux RK, Nguyen KV (2004) *POLG* mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 55:706–712
12. Ferrari G, Lamantea E, Donati A, Filosto M, Briem E, Carrara F, Parini R, Simonati A, Santer R, Zeviani M (2005) Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gamma A. *Brain* 128:723–731
13. Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A (2004) Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 364:875–882
14. Nikali K, Suomalainen A, Saharinen J, Kuokkanen M, Spelbrink JN, Lonnqvist T, Peltonen L (2005) Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Hum Mol Genet* 14:2981–2990
15. Hakonen AH, Isohanni P, Paetau A, Herva R, Suomalainen A, Lonnqvist T (2007) Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain* 130(Pt 11): 3032–3040
16. Sarzi E, Goffart S, Serre V, Chrétien D, Slama A, Munnich A, Spelbrink JN, Rotig A (2007) Twinkle helicase (*PEO1*) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 62(6):579–587

17. Baloh RH, Salavaggione E, Milbrandt J, Pestronk A (2007) Familial parkinsonism and ophthalmoplegia from a mutation in the mitochondrial DNA helicase *twinkle*. *Arch Neurol* 64: 998–1000
18. Agostino A, Valletta L, Chinnery PF, Ferrari G, Carrara F, Taylor RW, Schaefer AM, Turnbull DM, Tiranti V, Zeviani M (2003) Mutations of *ANT1*, *Twinkle*, and *POLG1* in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO). *Neurology* 60:1354–1356
19. Spinazzola A, Zeviani M (2005) Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene* 354:162–168
20. Di Fonzo A, Bordoni A, Crimi M, Galbiati S, Del Bo R, Bresolin N, Comi GP (2003) *POLG* mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions. *Hum Mutat* 22: 498–499
21. Napoli L, Bordoni A, Zeviani M, Hadjigeorgiou GM, Sciacco M, Tiranti V, Terentiu A, Moggio M, Papadimitriou A, Scarlato G, Comi GP (2001) A novel missense Adenine Nucleotide Translocator-1 gene mutation in a Greek adPEO family. *Neurology* 57: 2295–2298
22. Filosto M, Mancuso M, Nishigaki Y, Pancrudo J, Harati Y, Gooch C, Mankodi A, Bayne L, Bonilla E, Shanske S, Hirano M, DiMauro S (2003) Clinical and genetic heterogeneity in progressive external ophthalmoplegia due to mutations in polymerase gamma. *Arch Neurol* 60: 1279–1284



# The Mitochondrial Disulfide Relay System Protein GFER Is Mutated in Autosomal-Recessive Myopathy with Cataract and Combined Respiratory-Chain Deficiency

Alessio Di Fonzo,<sup>1,2</sup> Dario Ronchi,<sup>1,2</sup> Tiziana Lodi,<sup>3</sup> Elisa Fassone,<sup>1,2</sup> Marco Tigano,<sup>3</sup> Costanza Lamperti,<sup>1,2</sup> Stefania Corti,<sup>1,2</sup> Andreina Bordoni,<sup>1,2</sup> Francesco Fortunato,<sup>1,2</sup> Monica Nizzardo,<sup>1,2</sup> Laura Napoli,<sup>1,2</sup> Chiara Donadoni,<sup>1,2</sup> Sabrina Salani,<sup>1,2</sup> Francesca Saladino,<sup>1,2</sup> Maurizio Moggio,<sup>1,2</sup> Nereo Bresolin,<sup>1,2,4,5</sup> Iliana Ferrero,<sup>3</sup> and Giacomo P. Comi<sup>1,2,4,\*</sup>

A disulfide relay system (DRS) was recently identified in the yeast mitochondrial intermembrane space (IMS) that consists of two essential components: the sulfhydryl oxidase Erv1 and the redox-regulated import receptor Mia40. The DRS drives the import of cysteine-rich proteins into the IMS via an oxidative folding mechanism. Erv1p is reoxidized within this system, transferring its electrons to molecular oxygen through interactions with cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase (COX), thereby linking the DRS to the respiratory chain. The role of the human Erv1 ortholog, GFER, in the DRS has been poorly explored. Using homozygosity mapping, we discovered that a mutation in the GFER gene causes an infantile mitochondrial disorder. Three children born to healthy consanguineous parents presented with progressive myopathy and partial combined respiratory-chain deficiency, congenital cataract, sensorineural hearing loss, and developmental delay. The consequences of the mutation at the level of the patient's muscle tissue and fibroblasts were 1) a reduction in complex I, II, and IV activity; 2) a lower cysteine-rich protein content; 3) abnormal ultrastructural morphology of the mitochondria, with enlargement of the IMS space; and 4) accelerated time-dependent accumulation of multiple mtDNA deletions. Moreover, the *Saccharomyces cerevisiae* *erv1*<sup>R182H</sup> mutant strain reproduced the complex IV activity defect and exhibited genetic instability of the mtDNA and mitochondrial morphological defects. These findings shed light on the mechanisms of mitochondrial biogenesis, establish the role of GFER in the human DRS, and promote an understanding of the pathogenesis of a new mitochondrial disease.

## Introduction

Classic mitochondrial disorders result from mutations in the mitochondrial or nuclear DNA that disrupt mitochondrial respiratory function. These diseases typically have brain and skeletal muscle manifestations and are, therefore, often referred to as mitochondrial encephalomyopathies.<sup>1</sup>

Nuclear DNA mutations leading to mitochondrial diseases have been described in genes encoding respiratory-chain subunits, oxidative phosphorylation assembly factors, proteins involved in mtDNA maintenance, factors related to mitochondrial protein synthesis, biosynthetic enzymes, and proteins promoting mitochondrial biogenesis.<sup>2</sup> Many of these proteins are synthesized in the cytosol in the form of precursor proteins and posttranslationally transported to the mitochondria in an unfolded state.

A subgroup of small cysteine-containing proteins, which localize in the intermembrane space (IMS), requires the cooperation of the translocase of the mitochondrial outer membrane (TOM) complex with the Mia40-Erv1 disulfide relay system (DRS) for intramitochondrial import.<sup>3</sup> These molecules include (1) proteins with a twin Cx<sub>3</sub>C motif (two cysteines separated by three other amino acid residues), such as the entire family of small chaperone translo-

con of the inner membrane (Tim) proteins, namely Tim8, Tim9, Tim10, Tim12, and Tim13 in *Saccharomyces cerevisiae*; (2) proteins with a twin Cx<sub>9</sub>C motif, such as the copper chaperone Cox17, which is required for the biogenesis of cytochrome *c* oxidase (COX), and Cox19 and Cox23, two additional molecules relevant to COX assembly; and (3) other proteins with disulfide bonds, such Cox12, and the copper chaperone for superoxide dismutase 1, Ccs1.<sup>4</sup>

Proven substrates of the DRS include many proteins relevant to COX biogenesis, as well as many TIM chaperones; therefore, a defect in this pathway is likely to result in pleiotropic effects due to a defective IMS and matrix import of proteins relevant to complex IV biogenesis and a number of yet uncharacterized mitochondrial functions.

We ascertained an inbred Moroccan family with three siblings affected by congenital cataract, progressive muscular hypotonia, sensorineural hearing loss, and developmental delay. Linkage analysis, followed by the sequencing of candidate genes, revealed the presence of a missense mutation in *GFER* (growth factor, augmenter of liver regeneration *ERV1* homolog, *S. cerevisiae*, MIM 600924) that affects the protein content of the IMS, including some proteins involved in COX biogenesis, and leads to a progressive mitochondrial myopathy.

<sup>1</sup>Dino Ferrari Centre, Department of Neurological Sciences, University of Milan, 20122 Milan, Italy; <sup>2</sup>Fondazione I.R.C.C.S. Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, 20122 Milan, Italy; <sup>3</sup>Department of Genetics, Anthropology and Evolution, University of Parma, 43100 Parma, Italy; <sup>4</sup>Centre of Excellence on Neurodegenerative Diseases, University of Milan, 20133 Milan, Italy; <sup>5</sup>I.R.C.C.S. Eugenio Medea, 23842 Bosisio Parini, Lecco, Italy

\*Correspondence: giacomo.comi@unimi.it

DOI 10.1016/j.ajhg.2009.04.004. ©2009 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

## Subjects and Methods

### Subjects

Written informed consent was obtained from the parents of the patients, and investigations were carried out according to the guidelines of the Ethical Committee of "Fondazione I.R.C.C.S. Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena" in Milan, Italy in agreement with Italian and European Union laws.

Subjects II-2, II-4, and II-5 were born of consanguineous Moroccan parents after normal pregnancies. There was no neurological disease or congenital cataract in the family. All patients were born at term, and their birth weights were appropriate for their ages. All patients presented with congenital cataract, muscular hypotonia, sensorineural hearing loss, and developmental delay.

Patient II-2 presented with axial hypotonia and congenital cataract during the first month of life. At the age of one year, II-2 underwent surgery for the cataract with partial benefit. The patient also had a psychomotor delay with the ability to walk at 2 years and to speak at 3 years; he attended basic school and needed tutorial help for difficulties in his studies as a result of a progressive visual deficit. At 11 years old, after several surgeries, the patient suffered from retinal detachment and severe visual impairment. Since the age of 12 years, II-2 has presented with severe progressive hearing loss and bilateral ptosis. At the age of 17 years, neurological examination revealed generalized muscular hypotonia and hypotrophy, especially in the lower limbs, he could walk only with help, he was unable to fix his gaze, and rotatory nystagmus was noted. Proximal and distal muscle strength was normal. The upper- and lower-limb deep-tendon reflexes were weak or absent. No defects of the deep or superficial sensations were noted. Audiological examination showed a severe bilateral hearing deficiency. The ECG and echocardiography were normal. Blood analysis revealed hypoferritinemia (25 ng/ml, range 30–270), hyperamylasemia (351 U/l, range 0–195), and hyperCKemia (195 U/l). Serum lactate was elevated to 24.9 mg/dl (normal range 4.5–19). A muscle biopsy of the right brachial biceps was performed. An MRI of the brain performed at that time showed a thin corpus callosum; the signal from other telencephalic structures and the ventricular size was normal.

Patient II-4 presented with congenital cataract and progressive axial hypotonia. When the patient was 7 years of age, a neurological examination revealed unilateral ptosis, slight sensorineural hearing loss, diffuse muscle hypotrophy, and hypotonia. Blood analysis revealed low serum ferritin levels, hyperamylasemia, and hyperCKemia. The patient's serum lactate was high (34.2 mg/dl). A muscle biopsy of the right brachial biceps was performed.

Patient II-5 had congenital cataract, and a neurological examination performed when the patient was 3 years of age revealed slight axial hypotonia. No muscle biopsy was performed.

### Skeletal Muscle Biopsy and Ultrastructural Analysis

After written informed consent was obtained, biopsies of the left biceps muscle were performed in patients II-2 and II-4 according to a protocol approved by the Institutional Review Board of the Fondazione I.R.C.C.S. Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena in Milan, Italy. Ten-micron cryostatic cross sections were processed according to standard histological and histochemical techniques.<sup>5</sup> Mitochondrial enzymatic activity was demonstrated by COX and a double reaction for COX and succinate dehydrogenase (SDH).<sup>6</sup> A sequential demonstration of COX and

SDH activities was performed on 10  $\mu$ m slices of the cryostat sections from the muscle biopsies. The ultrastructural analysis was performed with a TEM Philips CM-100 microscope as previously described.<sup>7</sup> The yeast ultrastructural analysis was performed as previously described.<sup>8</sup>

### mtDNA Analysis

PCR assay for detecting multiple deletions used two primers (forward 7440–7465 and reverse complement 16135–16110) and the following amplification protocol: an initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 25 cycles (94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 68°C for 90 s) and a final extension for 2 min at 72°C (Platinum HiFi Taq Polymerase by Invitrogen, Carlsbad, CA). For the identification of deletion breakpoints, PCR products were subcloned in TOPO-TA cloning vector (Invitrogen) and sequenced on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer via Big Dye Terminator 3.1 protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### Genetic Studies and Linkage Analysis

Blood-derived DNA samples from all family members were genotyped via the Affymetrix GeneChip Human Mapping 50K Xba240 Array according to protocols provided by the manufacturer (Affymetrix, Santa Clara, CA). Up to 50,000 SNPs were investigated, with an average spacing of approximately 12 kb. Genotypes were called with the GeneChip DNA Analysis Software (GDAS v.3). Mendelian errors were evaluated by Pedcheck and removed from further analysis. A parametric linkage analysis was performed with ALLEGRO software. Haplotypes reconstructed by ALLEGRO were presented graphically by HaploPainter. All data handling was performed with the graphical user interface Easy Linkage.<sup>9</sup>

A sequence analysis of genes previously reported to be mutated in patients with multiple deletions in mtDNA (*POLG*, *POLG2*, *ANT1*, *PEO1*) was performed as described above. Results were normal in affected individuals. The coding exons of candidate genes belonging to the identified region were amplified via oligonucleotide primers, which are available upon request.

We amplified the exons and intronic boundaries of *GFER*, using specific primers (Table S1, available online) and performing an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 59°C for 30 s, and 72°C for 40 s, and a final extension at 72°C for 5 min (Invitrogen Platinum Taq Polymerase plus 10% DMSO and 5 M Betaine). After purification, the PCR products were sequenced as described above.

Healthy control subjects were screened for the identified mutation in the *GFER* gene via sequence analysis.

### Cell Cultures and Transfection Procedures

Cell cultures were established from the patients' skin and muscle biopsies as previously described.<sup>10</sup> The control muscle biopsies and cell cultures used in this study were derived from the Telethon Genetic Biobanks Network GTB07001E, Department of Neurological Sciences, University of Milan, Italy). Primary myoblasts were cultured in skeletal muscle cell growth medium (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Primary fibroblasts were cultured in DMEM medium (Invitrogen) with 15% FBS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. For determination of the rate of primary cell proliferation, the mean population doubling (MPD) was calculated as previously described.<sup>11</sup> A comparison of quantitative parameters between groups was performed with the Mann-Whitney U test. A p value below 0.05 was considered significant.



Wild-type GFER cDNA was retrotranscribed with the use of total RNA extracted from control muscle tissue and cloned into the pAcGFP1-N2 expression vector (Clontech Laboratories, Mountainview, CA). The recombinant vector was propagated in XL-10 Gold Ultracompetent *E. coli* cells (Stratagene, La Jolla, CA). Plasmid transfection was carried out in patient and control primary fibroblasts via electroporation with the Human Dermal Fibroblast kit (Amaxa, Gaithersburg, MD).

We evaluated GFER by using the HEK293 cell line, which was stably transfected with two vectors overexpressing wild-type and mutated GFER cDNA. Transfections were carried out as described above, and selection was performed through the addition of G418 to the culture medium (500 µg/ml). Rates of transfection and the expression of GFP-tagged GFER were evaluated by fluorescence microscopy and FACS analysis (data not shown).

### Biochemical Assays

The specific activities of individual respiratory-chain complexes were measured in cells and muscle homogenates.<sup>12</sup> Proteins were extracted from muscle tissue after motor-driven homogenization and from cells after sonication in resuspension buffer. The protein concentration was measured via the Lowry method. The specific activity of each complex was normalized to that of citrate synthase.

### GFER mRNA Quantification

Total RNA from the probands' tissues was reverse transcribed (First Strand cDNA Synthesis Kit, GE Healthcare) and quantified by quantitative PCR via the  $\Delta\Delta Ct$  method on a 7500 Real Time PCR System (Software 2.01, Applied Biosystems, Foster City, CA). The GFER mRNA was evaluated with the Taqman gene expression assay (Hs00193365\_m1), and *GAPDH* was used as the control housekeeping gene (Hs99999905\_m1). The expression of *GFER* was also quantified in several control human tissues contained in Human Total Master Panel II (Clontech Laboratories, Mountainview, CA). The rates of *GFER* expression were also evaluated in transfected HEK293 cell lines. Overexpression (>50-fold change) was observed in transfected HEK293 cells, and comparable levels were observed in cells containing wild-type or mutated *GFER* expression vectors (data not shown).

### Immunocytochemistry

Myoblasts, fibroblasts, and HEK293 mitochondria were stained with MitoTracker Red (Invitrogen) in fresh culture medium for 30 min at 37°C. For double immunostaining, cells were fixed with 4% formaldehyde for 15 min at 37°C. After rinsing with PBS and preincubation with 0.25% Triton X-100 in PBS, the cultures were incubated with the primary antibodies at 4°C. The following proteins were evaluated: GFER, TIMM13, and COX17 with rabbit polyclonal antibodies (Proteintech Group, Manchester, UK), COX6B1 with mouse monoclonal antibody (Molecular Probes, Invitrogen). After repeated rinses with PBS, the primary unconjugated antibodies were further incubated with R-Phycocerythrin (RPE) or TRITC-conjugated secondary antibodies (1:100; DAKO) in PBS for 2 hr in the dark at room temperature, then rinsed with PBS and coverslipped.

### Subcellular Fractionation

Mitochondria were purified through modification of a published protocol.<sup>13</sup> HEK293 cells (roughly 10 million cells) were collected and passed 40 times through a 27-gauge needle in a buffer contain-

ing 250 mM sucrose, 10 mM Tris, and 0.1 mM EGTA (pH 7.4) and centrifuged at 630 × g for 10 min. The supernatant was then centrifuged at 8000 × g for 15 min for isolation of a crude mitochondrial pellet. The supernatant was subjected to further centrifugation at 48,000 × g for 1 hr 30 min, and the final supernatant was designated the cytosolic fraction. The crude mitochondrial pellet was washed once with the extraction buffer and sedimented at 630 × g for 10 min. The remaining supernatant was further centrifuged at 8000 g for 15 min, and the residual pellet was designated the mitochondrial fraction.

### Protein Blot Analyses

Mitochondrial fractions derived from HEK293 cells were analyzed by SDS-PAGE according to Laemmli without the addition of reducing agents in the sample buffer. For reducing conditions, dithiothreitol (DTT) at a final concentration of 15 mM was added during sample preparation, whereas nonreducing analyses were completely DTT free.

The polyacrylamide gels (11%) were run for 2 hr and blotted. The GFER protein was assayed with a commercial polyclonal antibody developed in rabbit (Proteintech Group). After incubation with a peroxidase-conjugated secondary antibody, the GFER signal was detected with ECL-detection reagents (Amersham). The HSP60 (Santa Cruz Biotechnology) and COX4 (Molecular Probes) proteins were used as a normalization control of the mitochondrial fractions.

### Yeast Model

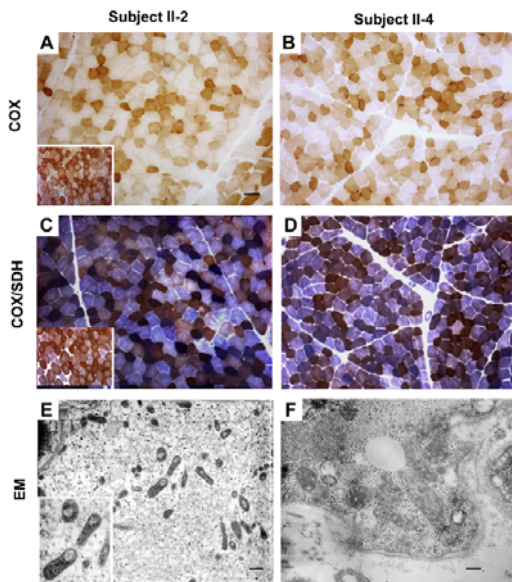
#### Construction of Yeast Strains

Yeast strains were derived from the diploid DWW, obtained from the cross between strains W303-1A (Mata *ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100*) and W303-1B (Mata *ade2-1 leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 can1-100*). Being that *ERV1* is an essential gene, the construction of a null *erv1* strain carrying either *ERV1* or the *erv1<sup>R182H</sup>* allele required a particular procedure. One copy of the *ERV1* ORF was deleted in the diploid DWW and substituted with the Kan<sup>r</sup> marker, resulting in the heterozygous diploid DMT1 (*ERV1/Δerv1*) strain. The *ERV1* gene, amplified by PCR from the W303-1B strain and cloned into the centromeric pFL38 vector containing the auxotrophic marker *URA3*, was then introduced into DMT1. By sporulation and tetrad analysis, the haploid DMT1-4C/38E strain (*Δerv1*, carrying a plasmid-borne *ERV1* wild-type copy) was then obtained. This strain was transformed with the *erv1<sup>R182H</sup>* allele, which was produced by site-directed mutagenesis, via the overlap-extension technique<sup>14</sup> and cloned into the centromeric pFL39 vector containing the auxotrophic marker *TRP1*. The preferred yeast codon encoding histidine (CAT) was used in the sequence of the mutagenic oligonucleotides, maximizing the expression of the mutant allele. It was then possible to isolate the DMT1/39e strain (*Δerv1*, carrying the plasmid-borne *erv1<sup>R182H</sup>* mutant allele) devoid of pFL38*ERV1* and completely isogenic with the DMT1-4C/38E strain by plasmid shuffling in the presence of 5-fluoro orotic acid (5FOA, SIGMA), which is toxic to *URA3* strains but not to the *ura3* mutants.

#### Miscellaneous Yeast Methods

Cells were cultured in a 0.67% yeast nitrogen base (YNB) without amino acids (Difco), supplemented with appropriate amino acids and bases for auxotrophy to a final concentration of 40 mg/ml. Various carbon sources were added at 2% (w/v).

Cytochrome spectra were determined as described previously.<sup>15</sup> The spectrum profile was recorded in cells grown at 28°C, so that



**Figure 1. Histochemical and Ultrastructural Analysis of Probands' Skeletal Muscle**

(A–D) COX histochemistry reveals the presence of several COX-deficient fibers in probands II-2 and II-4 (A and B). Double staining for COX/SDH. Scattered fibers with increased SDH staining, indicative of mitochondrial proliferation, are present in patient II-2. A COX deficiency is confirmed in both patient II-2 and patient II-4. (C and D) Insets within panels (A) and (C) represent the normal controls. (E and F) Electron microscopy shows several mitochondria with thickened cristae; many mitochondria are also present with large vacuolization in (E). Scale bars represent 25  $\mu$ m (A–D), 700 nm (E), or 250 nm (F).

the required biomass could be obtained, then shifted to 37°C for 15 hr. Spectrophotometric measurements of COX activity were performed for 120 s at 30°C in isolated mitochondria after the decrease

of absorbance at 550 nm as a result of cytochrome *c* oxidation.<sup>16</sup> The specific activity was normalized to that of citrate synthase.

For a respiratory-deficient diagnosis (*petite* colonies), cells from cultures grown for 15 generations at 37°C in YNB supplemented with glucose were plated onto solid YNB medium containing 2% ethanol and 0.3% glucose and maintained for 5 days at 28°C. A mit<sup>-</sup>-complementation-based analysis of mtDNA was performed on respiratory-deficient colonies as previously described.<sup>17</sup>

## Results

### Morphological and Biochemical Studies

The muscle biopsies from subjects II-2 and II-4 exhibited scattered COX-negative fibers (Figures 1A–1D). Biochemical studies revealed a consistent moderate reduction (30%–50% of normal mean values) of complex IV activity in multiple tissues from both probands (Table 1).

Interestingly, patient II-2 displayed a multicomplex alteration, including a complex I and II defect in both muscle and myoblasts, whereas an analysis of patient II-4's fibroblasts revealed only reduced complex IV activity.

The ultrastructural analysis of patient II-2's muscle tissue showed striking mitochondrial structural abnormalities. In addition to being abnormally enlarged, these organelles exhibited increased electron density and thickened cristae. In a subset of mitochondria, large electron-dense vacuolizations were observed, probably representing an abnormal IMS (Figures 1E and 1F). Multiple mtDNA deletions were found by PCR analysis of muscle from patient II-2 (not shown).

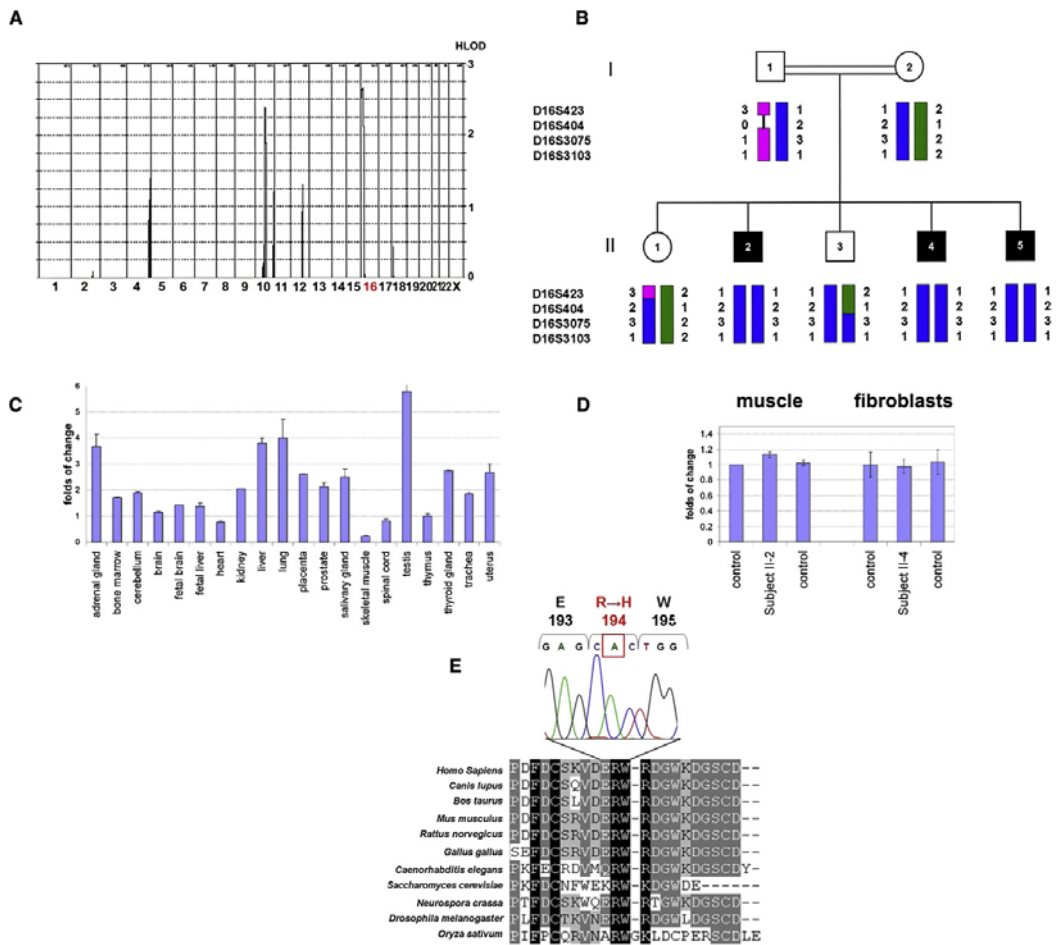
### Linkage Analysis and Mutation Screening

We performed a genome-wide linkage analysis in all family members, using the Affymetrix GeneChip SNP array. A single region of autozygosity on chromosome 16p13.3 (LOD score 2.657) was identified (Figure 2A). This region (0–12.1 Mb), confirmed by microsatellite analysis (Figure 2B), encompasses 271 genes. Candidate genes were

**Table 1. Activities of the Respiratory-Chain Complex**

	CI/CS	CII/CS	CI+III/CS	CII+III/CS	CIV/CS
<b>Muscle</b>					
Proband II-2	<b>6.6 (46.5%)</b>	<b>7.2 (62.1%)</b>	<b>16.4 (47.4%)</b>	<b>8.0 (65.0%)</b>	<b>20.1 (44.8%)</b>
Normal (n = 38)	14.2 $\pm$ 2.6	11.6 $\pm$ 1.8	34.6 $\pm$ 7.8	12.3 $\pm$ 2.7	44.8 $\pm$ 5.6
<b>Fibroblasts</b>					
Proband II-4	54.8	6.1	311.3	4.9	<b>31.7 (70.0%)</b>
Normal (n = 16)	68.7 $\pm$ 22.7	6.8 $\pm$ 1.2	225.78 $\pm$ 71	4.91 $\pm$ 1.2	44.8 $\pm$ 4.7
<b>Myoblasts</b>					
Proband II-2	<b>33.8 (66.4%)</b>	<b>4.4 (46.8%)</b>	255.6	5.4	<b>27.8 (47.3%)</b>
Normal (n = 12)	50.9 $\pm$ 8.5	9.4 $\pm$ 2.2	209.4 $\pm$ 27.1	6.0 $\pm$ 1.2	58.8 $\pm$ 7.4

Mean values ( $\pm$  1 SD) of the activities of the respiratory-chain complex are normalized to citrate synthase (CS). Activities are expressed as nM/min/mg protein. Activities reduced by at least 30% of the normal mean values are shown in bold. n = number of controls. Biochemical determinations on probands' tissues were performed in triplicate.



**Figure 2. Linkage Analysis, Expression Studies, and Mutation Analysis**

(A) Multipoint linkage analysis of the genome-wide scan with the Affymetrix GeneChip Human Mapping 50K Array Xba240.

(B) Family pedigree and haplotype analysis of the *GFER* locus. Affected individuals are indicated by black symbols.

(C) Quantitative RT-PCR of *GFER* expression in 20 human control tissues. *GAPDH* was used as the control housekeeping gene. The thymus mRNA level was used for normalization of the expression data. All determinations have been performed in replicates ( $n = 6$ ).

(D) Quantitative RT-PCR of *GFER* expression in muscle and fibroblasts from patients and controls. Results are presented as mean  $\pm$  SD.

(E) CLUSTALW multiple-alignment sequence of the *GFER* region containing the mutated residue in our family. The electropherogram of the c.581 G  $\rightarrow$  A mutation in exon 3 of *GFER*, resulting in a p.R194H substitution, is shown above.

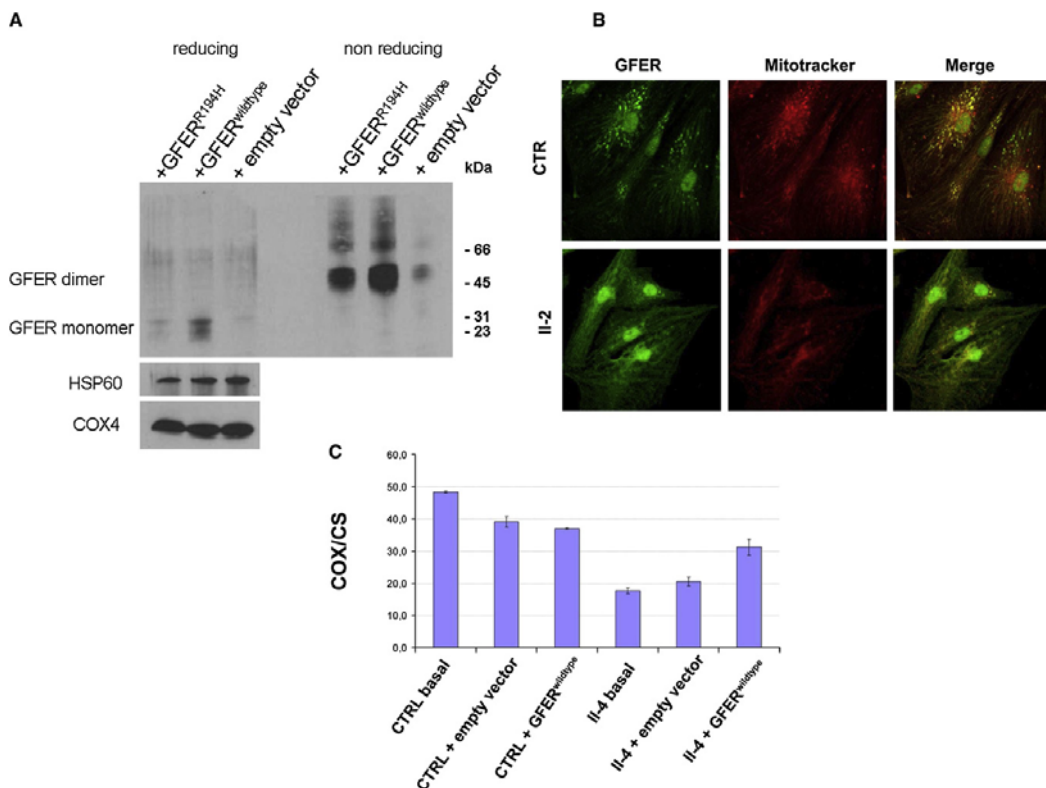
prioritized according to the likelihood score of mitochondrial localization, as implemented in the "Maestro" data set.<sup>18</sup>

We sequenced the exons and flanking intronic regions of ten genes encoding known or putative mitochondrial proteins: *GFER*, *FAHD1*, *NDUFB10*, *NUBP2*, *DNAJA3*, *NME4*, *Magma*, *NTHL1*, *TRAP1*, and *MPG*. Sequencing of *GFER* revealed a c.581 G  $\rightarrow$  A homozygous mutation in all affected individuals (Figure S1), which results in the p.R194H substitution. This mutation was absent in 380 samples from unre-

lated European individuals and 183 samples from unrelated Arab individuals (156 Moroccan).

### Expression Analysis

The *GFER* gene is ubiquitously expressed (Figure 2C) in human tissues, the highest expression in the testis and liver and low expression in muscle. Quantitative RT-PCR analysis of the muscle RNA from patient II-2, fibroblast RNA from patient II-4, and relative controls showed no significant difference in the *GFER* expression level (Figure 2D).



**Figure 3. Western Blot Analysis of Overexpressed GFER, Immunocytochemical Analysis of Endogenous GFER in Patient Myoblasts, and Functional Rescue in Patient Fibroblasts**

(A) HEK293 cells were stably transfected with vector overexpressing GFER<sup>wild-type</sup> and GFER<sup>R194H</sup> cDNA. Immunoblot analysis showed a reduction of GFER<sup>R194H</sup> in mitochondrial fractions under both reducing (DTT 15 mM) and nonreducing conditions. COX4 and HSP60 were used for normalization.

(B) Antibodies against human GFER showed specific GFER colocalization with MitoTracker and DAPI in control myoblasts, whereas immunofluorescence was almost absent in the cytoplasm. Instead, primary myoblasts from patient II-2 showed a reduced punctuate mitochondrial fluorescence compared to control cells with more diffuse cytoplasmic staining. Scale bar represents 40  $\mu$ m.

(C) Biochemical functional rescue in proband II-4 fibroblasts that were transfected with GFER<sup>wild-type</sup> cDNA. The analysis of COX activity (normalized to citrate synthase [CS]) shows a restoration of mitochondrial cytochrome *c* oxidation (complex IV). Results are presented as mean of triplicate determinations  $\pm$  SD.

#### GFER Analysis in Probands and Transfected HEK293 Cells

To test whether the p.R194H mutation (Figure 2E) can affect protein stability and dimer formation, we carried out an immunoblot analysis of HEK293 mitochondrial fractions overexpressing either wild-type or mutant GFER. Immunoblots using the antibody against GFER under reducing and nonreducing conditions showed a reduction of both the GFER<sup>R194H</sup> monomer and the dimer as compared to the wild-type protein (Figure 3A). Quantitative RT-PCR found no significant differences at the transcriptional level in the total RNA from HEK293 transfected with the wild-type or mutant constructs (data not shown). These results suggest that GFER<sup>R194H</sup> is less stable in the IMS. Alterna-

tively, being that ERV1 is a substrate of the Mia40-Erv1 import pathway,<sup>19</sup> the GFER<sup>R194H</sup> protein could be either less efficiently imported into or less retained by the IMS. Further study will address this issue.

To test whether the p.R194H mutation affects GFER protein localization, we performed an immunocytochemical analysis of myoblasts from patient II-2 and controls. Throughout our experiments, primary cells from patients presented with a lower rate of proliferation compared to control cells (myoblast MPD II-2,  $13 \pm 2$ ; control MPD,  $28 \pm 3$ ;  $p < 0.00001$ ). In control myoblasts, the GFER-specific immunofluorescence pattern colocalized with that of MitoTracker and DAPI and was almost absent in the cytoplasm. Primary myoblasts from patient II-2 showed reduced



punctuate mitochondrial fluorescence compared to control cells, with more diffuse cytoplasmic staining (Figure 3B).

### Complementation Studies in Human Cells

As previously mentioned, the fibroblasts from patient II-4 exhibited a COX deficiency, whereas other respiratory-chain activities were normal. To evaluate whether the mutated *GFER* gene was the cause of the complex IV deficiency, we transiently transfected primary fibroblasts from patient II-4 and several controls with *GFER*<sup>wf</sup> cDNA. Biochemical analysis revealed a 30% increase in COX activity in *GFER*<sup>wf</sup>-transfected patient fibroblasts, normalized to the citrate synthase activity, whereas COX activity remained unchanged in cells transfected with empty vector (Figure 3C). These results demonstrate that the p.R194H mutation is associated with the functional COX defect found in our patients, and they also clearly establish the key role of GFER in complex IV activity in humans.

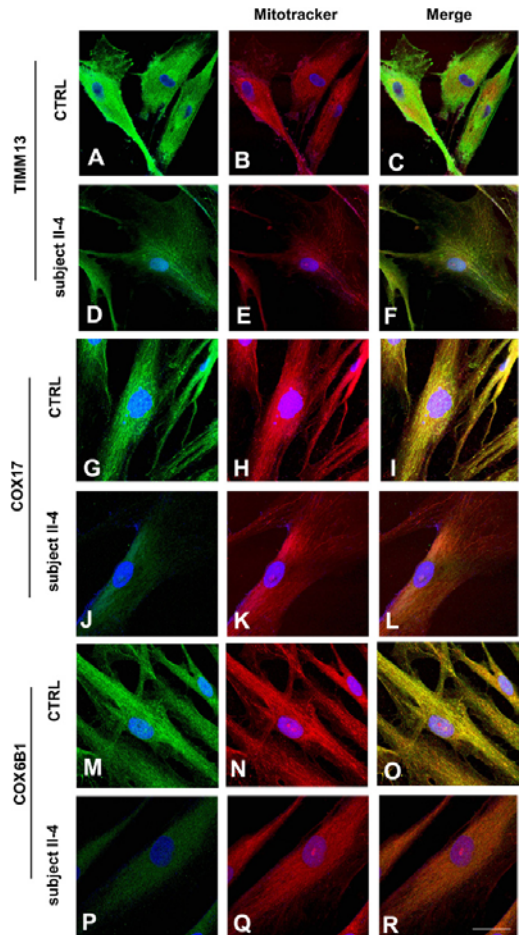
### Analysis of IMS Proteins

To further characterize the role of GFER<sup>R194H</sup> in mitochondrial biogenesis, we carried out an immunocytochemical analysis of two known DRS substrates, COX17 and TIMM13, as well as COX6B1, in fibroblasts from patient II-4. Confocal analysis revealed reduced colocalization of COX17, TIMM13, and COX6B1 immunostaining with MitoTracker compared to the colocalization signal observed in control cells from healthy donors (Figure 4).

### Yeast Model

In order to validate the pathogenicity of the human mutation, we set up a recombinant system in *S. cerevisiae*. The R194H mutation was introduced into the fully conserved R182 position of ScERV1, and this mutant allele was expressed in the null *erv1* strain. The resulting *erv1*<sup>R182H</sup> mutant strain ( $\Delta erv1//erv1^{R182H}$ ) grew on both glucose and oxidative substrates, but it displayed a thermosensitive phenotype. Growth was delayed on solid medium (Figure 5A) and blocked in liquid medium at 37°C (data not shown). Measurement of the mitochondrial cytochrome content is an index of the structural integrity of the respiratory-chain complexes. The strain carrying *erv1*<sup>R182H</sup> displayed a significant reduction in cytochrome *aa3* but not cytochromes *b* and *c* (Figure 5B). Indeed, in mitochondria isolated from the *erv1*<sup>R182H</sup> mutant, COX activity was reduced by 45% (Figure 5C).

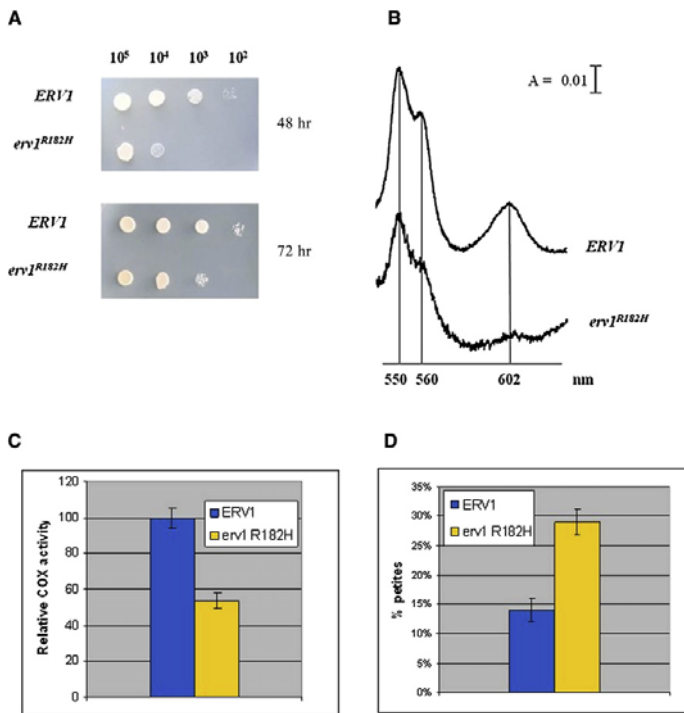
Erv1p is not known to import proteins necessary for the mtDNA replication machinery. Therefore, *erv1* mutations should not increase mtDNA mutability. However, Erv1p contributes, either directly or indirectly, to the assembly of components of the inner mitochondrial membrane, where the mtDNA is replicated. To evaluate whether the *erv1*<sup>R182H</sup> mutation is associated with mtDNA instability, we measured the frequency of *petite* mutants in the haploid  $\Delta erv1$  strain carrying either the wild-type or the *erv1*<sup>R182H</sup> allele. The mtDNA instability in *S. cerevisiae* is associated with the increased segregation of respiratory-deficient *petite*



**Figure 4. Confocal Immunocytochemical Analysis of IMS Proteins in Patient Fibroblasts**

Immunocytochemistry of patient and control fibroblasts, using antibodies against TIMM13, COX17, and COX6B1. Confocal analysis revealed reduced colocalization of COX17, TIMM13, and COX6B1 immunostaining with MitoTracker compared to the colocalization signal observed in control cells from healthy donors. Scale bars represent 40  $\mu$ m (A–F) or 20  $\mu$ m (G–R).

mutants. In the presence of the *erv1*<sup>R182H</sup> allele, the *petite* frequency was approximately twice that determined in the  $\Delta erv1$  strain transformed with *ERV1* (Figure 5D), suggesting a role for Erv1p in maintaining the integrity of mtDNA. *Petite* mutants can be either  $\rho^-$  (that is, cells in which the mtDNA is partially deleted) or  $\rho^0$  (that is, cells in which the mtDNA is completely lost). To evaluate the nature of the *petite* mutations ( $\rho^-$  versus  $\rho^0$ ), we crossed *petite* clones with  $\text{mit}^-$  strains, each harboring a different point mutation in three genes encoding respiratory proteins.



**Figure 5. Yeast Model**

(A) Phenotypic analysis of the DMT1-4C strain ( $\Delta erv1$ ) carrying either *ERV1* or the *erv1<sup>R182H</sup>* allele. The growth phenotype was that observed at 37°C. Equal amounts of serial dilutions of cells from exponentially grown cultures were spotted onto YNB medium supplemented with 2% glucose.

(B) Cytochrome spectra of cells grown on YNB medium supplemented with 2% glucose at 28°C and then shifted to 37°C overnight (A denotes absorbance).

(C) COX activity measured in the *ERV1* and *erv1<sup>R182H</sup>* strains.

(D) *Petite* frequency of  $\Delta erv1$  strain transformed with wild-type *ERV1* and the *erv1<sup>R182H</sup>* mutant allele. COX activity and *petite* frequency determinations were performed in triplicate. The error bars represent SD.

When  $\rho^-$  mutants are crossed with a  $\text{mit}^-$  mutant, respiratory-competent  $\rho^+$  cells are produced by recombination, provided that the  $\text{mit}^-$  point mutation maps to a region conserved in the  $\rho^-$  mtDNA. Contrariwise,  $\rho^0$  mutants, which are completely devoid of mtDNA, are unable to produce  $\rho^+$  cells. By this analysis, it is possible to establish whether the *erv1<sup>R182H</sup>* mutation causes mtDNA deletion or depletion. This complementation test revealed that approximately 70% of the *petite* clones resulted in  $\rho^-$ , in the presence of both *erv1<sup>R182H</sup>* and *ERV1* alleles (data not shown), indicating that the mutation determines an increase in mtDNA mutability not associated with increased mtDNA depletion, which would result in an increase in  $\rho^0$  mutants.

The ultrastructural analysis of the *erv1<sup>R182H</sup>* mutant showed clusters of mitochondria with simplified or absent cristae (Figure S2).

## Discussion

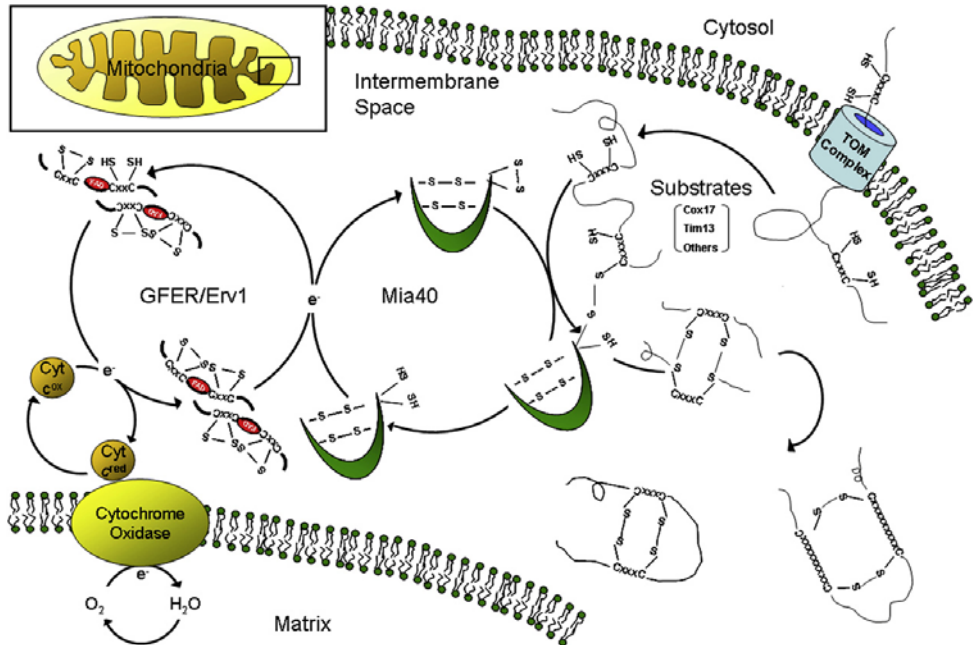
We describe three patients who presented with progressive myopathy, congenital cataract, sensorineural hearing loss, and developmental delay. In the probands' muscle tissue, the activities of respiratory-chain complexes I, II, and IV were decreased by 50%, 33%, and 50%, respectively, compared to mean control values. Using homozygosity mapping, we identified a missense mutation in the *GFER* gene affecting a conserved residue, and it was associated

probably synthesized from the same mRNA with the use of different initiation codons. The long isoform (205 aa, 23 kDa) is located mainly in the mitochondrial IMS, and it exists under nonreducing and nondenaturing conditions as a homodimer and a heterodimer. The shorter isoform (125 aa, 15 kDa), which lacks 80 amino acids at its N terminus, is present predominantly in the nucleus.<sup>21</sup>

The yeast ortholog Erv1p is the key protein of the mitochondrial DRS. Through its flavin-linked sulfhydryl oxidase activity, Erv1p oxidizes the disulfide carrier protein Mia40, which in turn transfers a disulfide to the newly synthesized small cysteine-containing proteins arriving in the IMS<sup>22-24</sup> (Figure 6). Erv1p is then reoxidized, transferring its electrons to molecular oxygen via interactions with cytochrome *c* and COX, linking the DRS to respiratory-chain activity.<sup>25</sup> Erv1p depletion prevents the import of those essential proteins and leads to mtDNA aberrations and abnormal mitochondrial morphology.<sup>26</sup>

The role of mammalian GFER in the mitochondrial DRS has been poorly explored. The rat and human GFER proteins act as sulfhydryl oxidases<sup>27</sup> and probably play a role similar to that of yeast Erv1p.

Using confocal immunocytochemistry and immunoblot analysis, we showed that GFER<sup>R194H</sup> is less stable than the wild-type protein within the mitochondria. This relative mitochondrial depletion may disturb the mitochondrial import of several DRS substrates. We showed by confocal analysis that primary fibroblasts from an affected individual



**Figure 6. The Mitochondrial Disulfide Relay System**

Schematic representation of the mitochondrial DRS, which mediates the import of cysteine-rich substrates into the IMS by an oxidative trapping mechanism. Mia40 performs the oxidation of these proteins and is reoxidized by Erv1/GFER in a disulfide-transfer reaction. For Erv1 to be recycled into its oxidized form, electrons are transferred to cytochrome *c*, connecting the DRS to the electron-transport chain of the mitochondria.

probably have a reduced mitochondrial signal for COX17 and TIMM13, which are known DRS substrates in yeast,<sup>3</sup> as well as COX6B1, a protein with a twin Cx<sub>9</sub>C motif. A partial mitochondrial depletion of COX17 and COX6B1 may result in COX-defective biogenesis. Indeed, the copper metallochaperone COX 17 specifically and physically interacts with SCO2 in order to deliver copper to COX.<sup>28</sup> Furthermore, the p.R19H change in COX6B1 was recently shown to be associated with the reduced stability of COX holoenzyme and with severe early-onset leukodystrophic encephalopathy, myopathy, and growth retardation.<sup>29</sup> In complementation assays, we observed a functional restoration of COX upon the transfection of fibroblasts from patient II-4 with the wild-type cDNA. Moreover, yeast  $\Delta erv1/erv1^{R182H}$  displayed a marked reduction in COX activity. We can also speculate that mutated Erv1/GFER might be less efficient in shuttling electrons to oxidized cytochrome *c*, from whence they flow through COX to molecular oxygen. In this pathway, the connection of the disulfide relay with the respiratory chain would significantly decrease the efficiency of the oxidase activity.

Taken together, these data establish a role for the GFER mutation in causing a moderate complex IV deficiency in our affected individuals.

The intramitochondrial level of other DRS substrates, as observed for TIMM13, may be equally affected by a defective Mia40-GFER system. The involvement of complexes I and II among the respiratory-chain-deficient activities within the probands' muscle suggests that other components or assembly factors of these two complexes could be less efficiently imported into the inner mitochondrial compartment, perhaps through a TIM-dependent process. The molecular dissection of these faulty mechanisms remains to be elucidated.

Furthermore, both patients' muscle and yeast  $\Delta erv1/erv1^{R182H}$  displayed abnormal ultrastructural mitochondria morphology and mtDNA instability. It is tempting to speculate that still uncharacterized DRS-dependent proteins being imported into the mitochondria with a lower efficiency might cause the observed alteration of mitochondrial morphology. Impairment of the connection between the inner and outer mitochondrial membranes might also affect the link to nucleoids, probably leading to mtDNA disorganization and instability. Furthermore, the mtDNA abnormality could be a consequence of a reduced interaction between Erv1/GFER and cytochrome *c*. This interaction directly connects the relay system to the respiratory chain and prevents the generation of hydrogen peroxide, which

might perturb mtDNA stability. Although we consider the small amount of muscle mtDNA deletions a secondary consequence of a defective GFER-dependent mechanism, it is noteworthy that, in *S. cerevisiae*, *erv1p* carrying p.F124S leads to mtDNA depletion and impaired cell survival.<sup>26</sup>

Human GFER is also known as ALR (augmenter of liver regeneration) or HPO (hepatopoietin), and it is thought to be one of the factors responsible for the extraordinary regenerative capacity of the mammalian liver.<sup>30</sup> We did not observe signs of hepatic involvement in patient II-4 on the abdominal ultrasound, although marked hyperamylasemia and hypoferritinemia, without any other apparent cause, were found in all three probands. Except for the congenital cataract, which has already been demonstrated to be associated with some mitochondrial diseases,<sup>31</sup> the clinical phenotype and histological and biochemical features described here were more prominent in the oldest sibling, as was the presence of multiple mtDNA deletions. These findings suggest a progressive course for the pathology associated with the identified mutation.

Taken together, these results show a role for GFER in causing an infantile disorder with combined respiratory-chain deficiency, and they unravel the importance of the DRS in the pathogenesis of human mitochondrial diseases.

#### Supplemental Data

Supplemental Data include two figures and one table and can be found with this article online at <http://www.ajhg.org/>.

#### Acknowledgments

We wish to thank the patients and their families for their support and collaboration. This research received support from Associazione Amici del Centro Dino Ferrari. G.P.C. and I.F. received funding from Research Grant PRIN 2006 2006069034 from the Italian Ministry of University and Research for the project entitled "An integrated approach to the study of the etiopathogenesis of mitochondrial disorders." G.P.C. was also funded by the Italian Ministry of Health for the 2009 project entitled "Mitochondrial disorders: From medical genetics to molecular mechanisms, toward the development of therapeutic strategies." The Telethon Network of Genetics Biobanks (no. GTB07001E) was the source of muscle, DNA, and cells used in this study. Eurobiobank project QLTR-2001-02769 is also gratefully acknowledged. We thank M. Aguenouz and V. Bonifati for providing DNA from healthy Moroccan subjects. We also thank T. G. Weiss for providing a control GFER antibody.

Received: February 2, 2009

Revised: March 13, 2009

Accepted: April 8, 2009

Published online: April 30, 2009

#### Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

HaploPainter, <http://haploPainter.sourceforge.net/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

#### References

1. DiMauro, S., and Schon, E.A. (2008). Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* *31*, 91–123.
2. Zeviani, M., and Carelli, V. (2007). Mitochondrial disorders. *Curr. Opin. Neurol.* *20*, 564–571.
3. Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., and Herrmann, J.M. (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* *121*, 1059–1069.
4. Hell, K. (2008). The *Erv1*-*Mia40* disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1783*, 601–609.
5. Heckmatt, J.Z., and Dubowitz, V. (1984). Needle biopsy of skeletal muscle. *Muscle Nerve* *7*, 594.
6. Sciacco, M., and Bonilla, E. (1996). Cytochemistry and Immunocytochemistry of Mitochondria in Tissue Sections. *Methods Enzymol.* *264*, 509–521.
7. Dubowitz, V. (1985). *Muscle Biopsy, a Practical Approach*, Second Edition (Philadelphia: Baillière Tindall).
8. Wright, R. (2000). Transmission electron microscopy of yeast. *Microsc. Res. Tech.* *51*, 496–510.
9. Hoffmann, K., and Lindner, T.H. (2005). EasyLINKAGE-Plus-automated linkage analyses using large-scale SNP data. *Bioinformatics* *21*, 3565–3567.
10. Salani, S., Lucchiari, S., Fortunato, F., Crimi, M., Corti, S., Locatelli, F., Bossolasco, P., Bresolin, N., and Comi, G.P. (2004). Developmental and tissue-specific regulation of a novel dysferlin isoform. *Muscle Nerve* *30*, 366–374.
11. Périé, S., Mamchaoui, K., Mouly, V., Blot, S., Bouazza, B., Thornell, L.E., St Guily, J.L., and Butler-Browne, G. (2006). Premature proliferative arrest of cricopharyngeal myoblasts in oculo-pharyngeal muscular dystrophy: Therapeutic perspectives of autologous myoblast transplantation. *Neuromuscul. Disord.* *16*, 770–781.
12. Bresolin, N., Zeviani, M., Bonilla, E., Miller, R.H., Leech, R.W., Shanske, S., Nakagawa, M., and DiMauro, S. (1985). Fatal infantile cytochrome c oxidase deficiency: decrease of immunologically detectable enzyme in muscle. *Neurology* *35*, 802–812.
13. Okado-Matsumoto, A., and Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* *276*, 38388–38393.
14. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* *77*, 51–59.
15. Fontanesi, F., Palmieri, L., Scarcia, P., Lodi, T., Donnini, C., Limongelli, A., Tiranti, V., Zeviani, M., Ferrero, I., and Viola, A.M. (2004). Mutations in *AAC2*, equivalent to human adPEO-associated *ANT1* mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 923–934.
16. Wharton, D.C., and Tzagoloff, A. (1967). Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol.* *10*, 245–250.
17. Baruffini, E., Ferrero, I., and Foury, F. (2007). Mitochondrial DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* caused by functional interactions between DNA polymerase gamma mutations associated with disease in human. *Biochim. Biophys. Acta* *1772*, 1225–1235.



18. Calvo, S., Jain, M., Xie, X., Sheth, S.A., Chang, B., Goldberger, O.A., Spinazzola, A., Zeviani, M., Carr, S.A., and Mootha, V.K. (2006). Identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat. Genet.* *38*, 576–582.
19. Terziyska, N., Grumbt, B., Bien, M., Neupert, W., Herrmann, J.M., and Hell, K. (2007). The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway. *FEBS Lett.* *581*, 1098–1102.
20. Gatzidou, E., Kouraklis, G., and Theocharis, S. (2006). Insights on augmenter of liver regeneration cloning and function. *World J. Gastroenterol.* *12*, 4951–4958.
21. Li, Y., Wei, K., Lu, C., Li, Y., Li, M., Xing, G., Wei, H., Wang, Q., Chen, J., Wu, C., et al. (2002). Identification of hepatopoietin dimerization, its interacting regions and alternative splicing of its transcription. *Eur. J. Biochem.* *269*, 3888–3893.
22. Koehler, C.M. (2004). The small Tim proteins and the twin Cx3C motif. *Trends Biochem. Sci.* *29*, 1–4.
23. Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuán Szklarz, L.K., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* *23*, 3735–3746.
24. Tokatlidis, K. (2005). A disulfide relay system in mitochondria. *Cell* *121*, 965–967.
25. Bihlmaier, K., Mesecke, N., Terziyska, N., Bien, M., Hell, K., and Herrmann, J.M. (2007). The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J. Cell Biol.* *179*, 389–395.
26. Becher, D., Kricke, J., Stein, G., and Lisowsky, T. (1999). A mutant for the yeast scERV1 gene displays a new defect in mitochondrial morphology and distribution. *Yeast* *15*, 1171–1181.
27. Lisowsky, T., Lee, J.E., Polimeno, L., Francavilla, A., and Hofhaus, G. (2001). Mammalian augmenter of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig. Liver Dis.* *33*, 173–180.
28. Leary, S.C., Kaufman, B.A., Pellicchia, G., Guercin, G.H., Mattman, A., Jaksch, M., and Shoubridge, E.A. (2004). Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet.* *13*, 1839–1848.
29. Massa, V., Fernandez-Vizarra, E., Alshahwan, S., Bakhsh, E., Goffrini, P., Ferrero, I., Mereghetti, P., D'Adamo, P., Gasparini, P., and Zeviani, M. (2008). Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 1281–1289.
30. Francavilla, A., Hagiya, M., Porter, K.A., Polimeno, L., Ihara, I., and Starzl, T.E. (1994). Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* *20*, 747–757.
31. van Ekeren, G.J., Stadhouders, A.M., Smeitink, J.A., and Sengers, R.C. (1993). A retrospective study of patients with the hereditary syndrome of congenital cataract, mitochondrial myopathy of heart and skeletal muscle and lactic acidosis. *Eur J Pediatr.* *152*, 255–259.