

I fibroblasti in coltura nella diagnostica delle malattie mitocondriali su base genetica

Barbara Garavaglia, Valeria Tiranti

Centro per lo Studio delle Malattie Mitocondriali Pediatriche, U.O. Neurogenetica Molecolare, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "C. Besta", Milano

ABSTRACT

Cultured fibroblasts in the diagnosis of genetic mitochondrial diseases. Defects of respiratory chain carrying out oxidative phosphorylation (OXPHOS) are the biochemical hallmarks of human mitochondrial disorders. From the genetic point of view, these diseases can be caused by mutations in the mitochondrial DNA (mtDNA) or in the vast repertoire of nuclear genes, which products are functionally related to the OXPHOS. mtDNA encodes only 13 of the ~85 polypeptides comprising the OXPHOS complexes, plus two rRNA and 22 tRNA required for the partially autonomous mitochondrial translational apparatus. While the gene products encoded by mtDNA are essential, they comprise only a tiny fraction of the total number of proteins involved in the functional respiratory chain. All other mitochondrial proteins, including those required for mtDNA maintenance and expression, OXPHOS assembly, and biosynthesis of cofactors, are nuclear-encoded and imported to mitochondria. We have worked out cellular systems in which the nuclear or mitochondrial origin of an OXPHOS defect can be persuasively demonstrated. These systems are based on the creation of cybrids and hybrids that are also used to characterize, by biochemical and molecular-genetic approaches, the pathogenicity of mutations affecting mtDNA.

INTRODUZIONE

I mitocondri, organelli citoplasmatici a doppia membrana, sono i principali fornitori di energia nelle cellule eucarioti. Essi infatti producono la maggior parte dell'ATP cellulare, mediante la respirazione mitocondriale, un processo metabolico costituito da una serie ordinata di reazioni ossidoriduttive effettuate da quattro enzimi multietimerici, i complessi respiratori I, II, III e IV. I complessi respiratori utilizzano gli equivalenti riducenti (elettroni) derivati dalla degradazione ossidativa dei substrati carboniosi (lipidi, carboidrati, amminoacidi) per convertire l'ossigeno molecolare, un elemento molto reattivo e potenzialmente tossico, in acqua. I complessi respiratori sono inseriti nella membrana interna dei mitocondri, in stretto contatto con molecole "scambiatrici" di elettroni: il coenzima Q, un chinone lipoidico, e il citocromo c. I siti catalitici dei complessi contengono eme e/o altri gruppi prostetici. L'energia liberata dalle reazioni ossidoriduttive alimenta la formazione di un gradiente protonico transmembrana che è utilizzato dal complesso respiratorio V, la ATP-sintetasi, per fosforilare ADP ad ATP. L'intero processo è noto come fosforilazione ossidativa (OXPHOS) e i cinque complessi respiratori, insieme agli scambiatori di elettroni, formano la cosiddetta "catena respiratoria" mitocondriale.

Dal punto di vista genetico, la catena respiratoria rappresenta un esempio unico nel mondo dei viventi, essendo il risultato della complementazione tra due distinti sistemi genetici, il genoma nucleare e quello mitocondriale (Figura 1). Geni contenuti nel DNA nucleare (nDNA) codificano la maggior parte delle proteine mitocondriali, comprese molte subunità proteiche dei com-

plexi respiratori. Alcune subunità sono però codificate da geni appartenenti ad un genoma separato da quello nucleare e contenuto nei mitocondri stessi, il DNA mitocondriale (mtDNA). Inoltre, il mtDNA contiene anche i geni che codificano le componenti RNA dell'apparato traduzionale autonomo dei mitocondri.

CENNI DI GENETICA MITOCONDRIALE

La genetica mitocondriale presenta alcuni aspetti specifici che la differenziano dalla genetica classica mendeliana.

Eredità materna

La trasmissione dell'informazione genetica mitocondriale non segue le leggi di Mendel, valide per il patrimonio genetico nucleare, organizzato in geni allelici. Infatti, la madre trasmette il proprio mtDNA alla discendenza e le figlie trasmettono a loro volta il loro mtDNA alla generazione successiva, ma il gamete maschile non dà alcun contributo al genotipo mitocondriale dello zigote.

Poliploidia

A differenza dei geni nucleari, che sono presenti in due copie (o alleli) per ciascun nucleo, il numero di copie di ciascun gene mitocondriale presente in ogni cellula umana raggiunge l'ordine delle migliaia. In ciascuna cellula vi sono infatti centinaia di mitocondri, ciascuno dei quali a sua volta contiene da due a dieci copie di mtDNA. In condizioni normali il genotipo mitocondriale di un individuo è costituito da una singola specie di mtDNA, una

DA FOTOGRAFARE

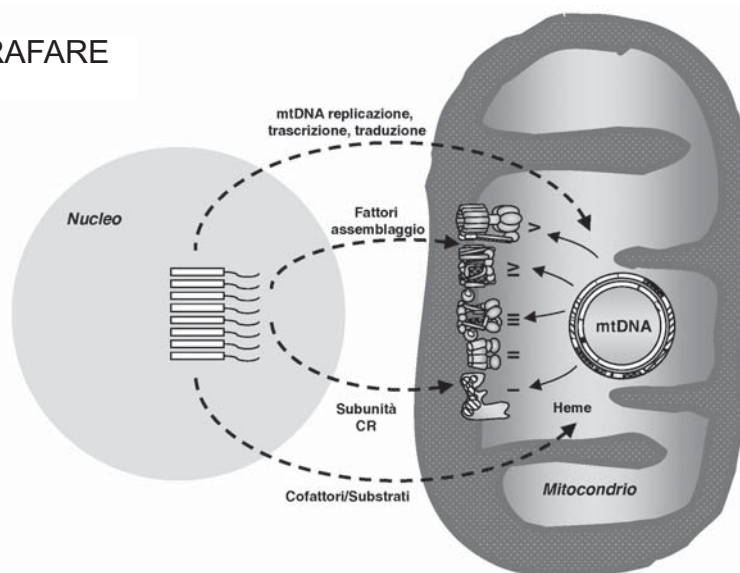


Figura 1

Interazione nucleo-mitocondrio. Il DNA mitocondriale (mtDNA) codifica per alcune subunità dei complessi I, III, IV e V della catena respiratoria (CR), che è localizzata nella membrana interna dell'organello. Il DNA nucleare codifica per le rimanenti subunità della CR, per i fattori di assemblaggio dei complessi respiratori, per una serie di fattori coinvolti nella replicazione, trascrizione, traduzione del mtDNA e per cofattori e substrati.

condizione nota con il termine di omoplasma. Tuttavia, l'insorgere di una mutazione del mtDNA, può determinare una condizione transitoria nota come eteroplasma, in cui genomi mutanti coesistono con genomi selvatici. Durante la divisione cellulare, i genomi mitocondriali seguono la distribuzione (stocastica) degli organelli che li ospitano.

Elevata velocità di mutazione

I mitocondri sembrano mancare di un efficiente sistema di riparazione del DNA. Inoltre, il mtDNA non è protetto da istoni ed è localizzato in prossimità della membrana mitocondriale interna, dove vengono prodotti radicali liberi altamente mutagenici, come sottoprodotti della fosforilazione ossidativa.

Effetto soglia

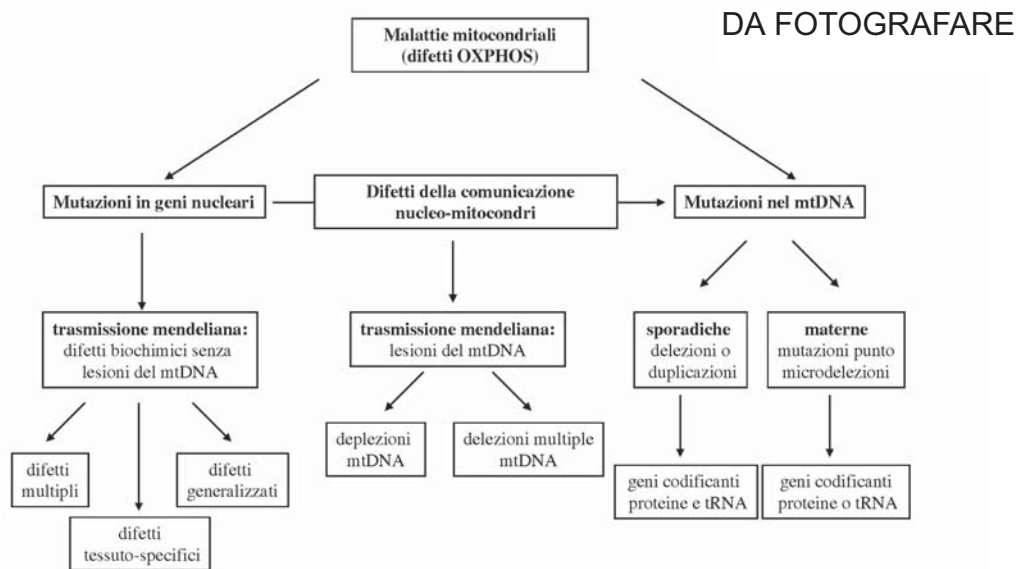
La natura poliploide del genoma mitocondriale fa sì che, a differenza di quanto avviene per il DNA nucleare, in presenza di una mutazione eteroplasmica del mtDNA la percentuale di mutazione trasmessa alle cellule figlie durante la divisione mitotica, così come alla discendenza di un individuo portatore, possa variare secondo uno spettro continuo, in accordo con la distribuzione stocastica degli organelli. In definitiva, si può avere un'enorme variazione della percentuale di mutazione sia da cellula a cellula o da tessuto a tessuto dello stesso individuo, sia tra individui diversi della medesima discendenza materna. Questo fenomeno spiega in parte anche l'estrema variabilità fenotipica delle malattie mitocondriali causate da mutazioni del mtDNA. Tuttavia, gli effetti patologici di una mutazione (eteroplasmica) insorgono,

in genere, solo quando la proporzione relativa tra mtDNA mutato e mtDNA normale supera una determinata soglia. In queste condizioni, il mtDNA normale non è più in grado di complementare il mtDNA difettoso, che potrà quindi esprimere il proprio fenotipo patologico. Gli organi più sensibili a difetti della fosforilazione ossidativa sono, nell'ordine, il sistema visivo e uditivo, il sistema nervoso centrale e periferico, il cuore, i muscoli scheletrici, il pancreas endocrino e i parenchimi renale ed epatico.

LE MALATTIE MITOCONDRIALI

In passato si consideravano come malattie mitocondriali tutte le patologie causate da un deficit del metabolismo energetico mitocondriale. Questa classificazione comprendeva perciò i difetti di trasporto intramitocondriale dei substrati energetici (ad es. il deficit di carnitina), i difetti di utilizzazione dei substrati (ad es. il deficit del complesso della piruvato deidrogenasi (PDHC), i difetti della β -ossidazione, i difetti del ciclo di Krebs) e infine i difetti della OXPHOS. L'enorme espansione delle conoscenze sulle basi molecolari di queste malattie ha però consigliato di mantenere il termine di malattie mitocondriali solamente per definire l'ampia gamma di sindromi cliniche associate con un'insufficienza della OXPHOS (1).

L'identificazione di mutazioni del mtDNA ha fornito le basi per l'attuale classificazione dei disordini mitocondriali (Figura 2). Un primo gruppo di malattie è caratterizzato dalla presenza di mutazioni del mtDNA, ad insorgenza sporadica o a trasmissione materna. Un secondo gruppo numeroso di malattie non è associato a mutazioni note del mtDNA, ma è causato da mutazioni in geni

**Figura 2**

Classificazione delle malattie mitocondriali.

OXPHOS, fosforilazione ossidativa; mtDNA, DNA mitocondriale.

nucleari che fanno parte o controllano la OXPHOS e controllano l'integrità strutturale e la propagazione del mtDNA. Queste malattie sono spesso classificate sulla base delle sole alterazioni biochimiche rilevate dall'analisi dei tessuti affetti (soprattutto muscolo scheletrico), ma molti progressi sono stati recentemente compiuti nella comprensione delle basi genetiche di queste patologie. In particolare, grazie allo sviluppo di sistemi basati sull'utilizzo di cellule di pazienti, siamo in grado di valutare:

- il difetto enzimatico mediante metodi spettrofotometrici, biochimici e radiochimici;
- l'origine nucleare o mitocondriale alla base del difetto biochimico;
- la patogenicità di mutazioni del mtDNA.

Caratterizzazione biochimica

Come detto, le malattie mitocondriali possono colpire qualsiasi organo del corpo. Più spesso, però, interessano il muscolo ed il cervello, data la maggiore richiesta di energia di questi tessuti, specie durante lo sviluppo. Per questo motivo, le malattie mitocondriali sono spesso definite come encefalo-miopatie mitocondriali. E' chiaro, quindi, che questi tessuti sono elettivi per lo studio di queste patologie; l'utilizzo dei fibroblasti in coltura offre però il vantaggio di essere facilmente ottenibili da un prelievo biotipico di cute, molto meno invasivo di una biopsia muscolare, aspetto molto importante tenendo presente che spesso i pazienti sono neonati.

Le metodiche per l'allestimento di colture di fibroblasti sono le stesse utilizzate nella diagnostica delle malattie lisosomiali (2). Nel caso di sospetto difetto degli enzimi della catena respiratoria e, soprattutto, del mtDNA, viene utilizzato un mezzo ad alto contenuto di glucosio

(F 14, Celbio) supplementato con 10% di FetalClone III (Hyclone), insulina, fattori di crescita "fibroblast growth factor" (FGF) ed "epidermal growth factor" (EGF), uridina e piruvato. Queste supplementazioni sono necessarie per prevenire la selezione negativa dei mitocondri con una ridotta capacità ossidativa (3).

La diagnosi biochimica viene eseguita generalmente seguendo un protocollo che prevede l'utilizzo di:

- metodi indiretti,
- metodi diretti,
- metodi di approfondimento molecolare.

Metodi indiretti

Questi consentono di valutare su cellule intatte le capacità ossidative mitocondriali; vengono eseguiti con fibroblasti in monostrato. Le più comuni metodiche prevedono l'uso di substrati radiomarcanti. Utilizzando substrati marcati con ^{14}C si misura la quantità di $^{14}\text{CO}_2$ che si libera durante l'ossidazione. Queste tecniche sono principalmente utilizzate per lo studio dei difetti della β -ossidazione mitocondriale, perché il mancato utilizzo di un substrato permette di orientare lo studio enzimatico verso una precisa via metabolica (es. riduzione dell'ossidazione dell'acido ottanoico nei casi di difetto di acil-CoA deidrogenasi a media catena).

Per la valutazione dell'ossidazione degli acidi grassi a lunga, media e corta catena vengono usati rispettivamente [1- ^{14}C] palmitato, [1- ^{14}C] ottanoato e [1- ^{14}C] butirato, mentre viene usato [1- ^{14}C] piruvato e [1,4- ^{14}C] succinato per indagare sia l'attività della piruvato deidrogenasi che l'attività degli enzimi del ciclo di Krebs e della catena respiratoria (4).

Un altro metodo indiretto è la misurazione della produzione di ATP, che valuta l'integrità e la funzionalità dei complessi della catena respiratoria. I fibroblasti, cresciuti in monostrato, vengono "permeabilizzati" con digitonina che, legandosi al colesterolo della membrana plasmatica, consente il passaggio di substrati esogeni. I fibroblasti vengono quindi incubati con opportuni substrati, in questo caso non marcati (piruvato, malato, ottanoato, ecc.), che vengono metabolizzati dai sistemi enzimatici mitocondriali fino alla produzione di ATP (5). L'ATP prodotto viene dosato con un metodo spettrofotometrico. In base al substrato fornito è possibile valutare il flusso metabolico partendo da livelli differenti. Ad esempio, fornendo come substrato il piruvato si ha produzione di ATP se tutto il sistema è funzionante, dalla piruvato deidrogenasi all'ATP sintetasi, mentre fornendo come substrato il malato si valuta il flusso dal ciclo di Krebs all'ATP sintetasi. Dal confronto della produzione di ATP con i differenti substrati è possibile identificare la presenza di un blocco metabolico.

Metodi diretti

Sono le determinazioni dirette dell'attività di un enzima. Le determinazioni vengono eseguite su omogenati di fibroblasti e la valutazione delle attività enzimatiche viene effettuata o con tecniche spettrofluorometriche in cinetica o con tecniche radioattive. Tutte le metodiche utilizzate sono comunque complesse e comportano costose e lunghe preparazioni di substrati e cofattori non sempre reperibili in commercio. Per l'analisi delle attività degli enzimi della catena respiratoria, i fibroblasti vengono esposti all'azione della digitonina che, permeabilizzando la membrana cellulare, consente la fuoriuscita di citoplasma arricchendo l'omogenato cellulare in mitocondri. I vari complessi vengono poi dosati con metodi spettrofotometrici in presenza/assenza di inibitori specifici (es. rotenone per il complesso I o cianuro per il complesso IV) (6).

Metodi di approfondimento

Una volta individuato il difetto enzimatico è possibile utilizzare i fibroblasti in coltura per eseguire studi di:

- ricerca di anomalie quantitative e/o qualitative della proteina coinvolta,
- biosintesi e degradazione della proteina stessa,
- assemblaggio dei vari complessi enzimatici.

La ricerca di eventuali anomalie quantitative o qualitative viene effettuata con la tecnica del "western-blot". A questo scopo è indispensabile avere gli anticorpi contro la proteina di interesse. I fibroblasti prima di essere sottoposti a tale tecnica vengono omogenati con un tampone contenente triton X-100 al 2% e sodiododecilsolfato 0,25% e centrifugati a 100.000 x g. Data la scarsa quantità di mitocondri presente nei fibroblasti, la rilevazione viene effettuata con un metodo in chemiluminescenza.

Lo studio della biosintesi e degradazione viene effettuato su fibroblasti in monostrato con la tecnica di "pulse/chase" utilizzando ³⁵S-Metionina. Al termine delle

incubazioni i fibroblasti vengono tripsinizzati, lisati ed immunoprecipitati con l'anticorpo specifico. L'immunoprecipitato viene poi sottoposto a "western-blot" e la rivelazione viene effettuata mediante autoradiografia. La maggior parte delle proteine mitocondriali viene sintetizzata in forma di precursore citoplasmatico dotato di una sequenza "leader" (20-70 amminoacidi) indispensabile per la corretta destinazione cellulare. Utilizzando dei disaccoppianti della OXPHOS (dinitrofenolo o rodamina 6G), che bloccano la traslocazione intramitocondriale, è possibile identificare, con lo stesso metodo descritto, anche la corretta sintesi dei precursori (7).

Come accennato nell'introduzione, gli enzimi della catena respiratoria sono complessi proteici costituiti da diverse subunità a codificazione nucleare o mitocondriale. Ad eccezione del complesso II, le cui 4 subunità sono codificate esclusivamente dal DNA nucleare, il complesso I è composto da 43 subunità, di cui 7 mitocondriali, il complesso III da 11 subunità, di cui una mitocondriale, il complesso IV da 13 subunità, di cui 3 mitocondriali, ed il complesso V da 14 subunità, di cui 2 mitocondriali. Lo studio dell'assemblaggio dei vari complessi permette di comprendere se e quali subunità siano coinvolte nel deficit metabolico. La tecnica utilizzata è l'elettroforesi bidimensionale 2D-Blue Native su gel di poliaccrilammide (2D-BN-PAGE). Come per il dosaggio delle attività enzimatiche, i fibroblasti vengono inizialmente trattati con digitonina prima di essere utilizzati. Per una dettagliata descrizione della preparazione e della tecnica elettroforetica si rimanda a Nijtmans et al. (8). La corsa elettroforetica in prima dimensione avviene in condizioni non denaturanti e separa i complessi respiratori in base al loro PM. L'ulteriore separazione dei complessi nelle varie subunità avviene effettuando una corsa elettroforetica in seconda dimensione, perpendicolare alla prima, in condizioni denaturanti. Si rimanda al recente articolo di Fernandez-Vizcarra et al. (9) per un'esauritivo commento sull'interpretazione dei difetti di assemblaggio.

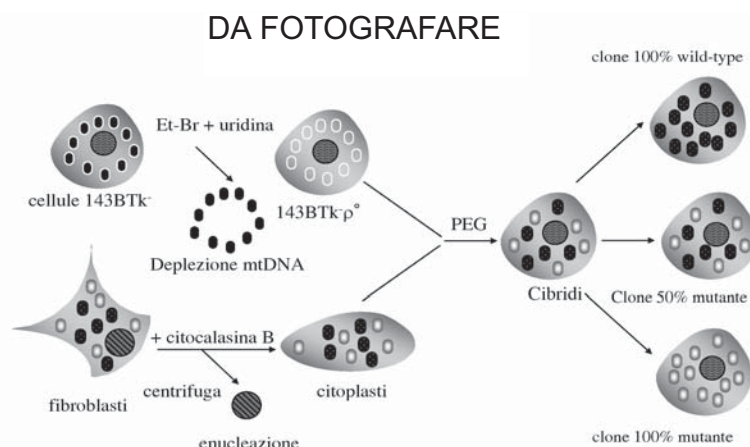
Caratterizzazione genetica

Come anticipato nell'introduzione, il cattivo funzionamento della OXPHOS può essere causato sia da mutazioni in geni nucleari che da mutazioni nel genoma mitocondriale. Una volta identificato un difetto biochimico specifico con i metodi descritti in precedenza, è necessario stabilire l'origine nucleare o mitocondriale del difetto genetico. Anche in questo caso le colture cellulari rappresentano uno strumento d'indagine molto importante.

Strategie per identificare l'origine nucleare o mitocondriale di un difetto OXPHOS

Cibridi transmitocondriali

Per poter stabilire quale dei due genomi sia responsabile di un dato fenotipo biochimico vengono utilizzati sistemi cellulari, quali gli ibridi citoplasmatici o cibridi. I cibridi vengono generati mediante fusione, con agenti chimici, di cellule prive di mtDNA (cellule ρ^0), che funzionano da donatrici di nucleo, con citoplasti, ovvero cellule

**Figura 3**

Creazione di cibridi transmitocondriali. Le cellule 143BTK- da osteosarcoma umano vengono private del DNA mitocondriale (mtDNA) a seguito di trattamento con etidio bromuro (Et-Br). I fibroblasti dei pazienti vengono enucleati in presenza di citocalasina B mediante centrifugazione ottenendo i citoplasti. Questi vengono fusi con le cellule ρ° . Si possono poi ottenere cloni di cibridi con diverse percentuali di eteroplasmia.

prive di nucleo che fungono da donatori di mitocondri (Figura 3). I citoplasti derivano solitamente da fibroblasti di pazienti che esprimono un difetto biochimico misurabile della catena respiratoria. Si ottengono così delle linee cellulari in cui il genoma nucleare e mitocondriale hanno origine diversa e possono essere studiati separatamente.

Le cellule ρ°

La tecnica della fusione di citoplasti con cellule ρ° è stata sviluppata da King e Attardi nel 1989 (10) e si basa sulla creazione di cellule ρ° mediante esposizione prolungata di cellule in coltura a basse concentrazioni dell'agente intercalante bromuro di etidio (EtBr). Questo consente di bloccare la replicazione del mtDNA e di ridurre progressivamente il contenuto di mtDNA (deplezione) nelle generazioni successive. È stato dimostrato che anche concentrazioni molto basse di EtBr (20 ng/mL) risultano in una inibizione della sintesi di mtDNA e nella riduzione dei livelli medi di mtDNA (11). La specificità e selettività dell'EtBr sono dovute ad un inefficiente meccanismo di riparazione del danno al mtDNA. I danni generati dall'EtBr vengono quindi facilmente riparati nel nucleo, mentre nel mitocondrio inducono una progressiva deplezione del mtDNA.

Teoricamente è possibile ottenere cellule ρ° da qualsiasi linea cellulare; tuttavia, le linee più usate sono derivate da cellule tumorali, quali le cellule 143BTK- di osteosarcoma umano. La sigla TK- si riferisce alla mancanza dell'enzima timidina chinasi, deputato alla sintesi di timidina monofosfato a partire da timidina.

Nonostante le cellule ρ° siano prive di mtDNA, i mitocondri mantengono alcune funzioni fisiologiche peculiari; ad esempio, mantengono il potenziale di membrana che è indispensabile per importare nell'organello le proteine codificate dal nucleo.

Le cellule ρ° non avendo la possibilità di produrre ATP

attraverso la OXPHOS vivono soprattutto sfruttando la glicolisi e vengono mantenute in coltura grazie ad un terreno ricco di glucosio a cui si aggiunge piruvato, per riossidare il NADH ridotto durante la glicolisi, e pirimidine (10). La dipendenza da pirimidine è dovuta al fatto che la diidroorotato deidrogenasi, un enzima appartenente alla via biosintetica delle pirimidine, è localizzato nella membrana mitocondriale interna e il suo funzionamento dipende dalla catena di trasporto degli elettroni. Nelle cellule ρ° la catena respiratoria è assente e quindi l'enzima è inattivo. È necessario quindi fornire un precursore delle pirimidine nella forma di uridina. Il terreno di coltura delle cellule ρ° è quindi composto da Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), siero fetale al 5%, 1% piruvato e 50 μ g/mL di uridina.

Fusioni e meccanismi di selezione

Le cellule ρ° vengono fuse mediante utilizzo di glicole polietilenico (PEG) con cellule enucleate, generalmente fibroblasti, derivate da pazienti. Secondo la metodica di generazione dei cibridi, dopo la fusione è previsto un periodo di selezione di circa 2 settimane mediante terreni specifici. La selezione serve per eliminare dalla coltura le cellule ρ° che non hanno acquisito mitocondri, i fibroblasti dei pazienti donatori di mitocondri e gli ibridi binucleati.

Le cellule donatrici e gli ibridi binucleati vengono eliminati utilizzando la bromodeossiridina nel medium di coltura. Questo composto, un analogo tossico della timidina, viene utilizzato nella sintesi del DNA dall'enzima timidina chinasi. Le cellule TK-, cioè le cellule ρ° e i cibridi, non sono in grado di processare la bromodeossiridina e quindi sopravvivono alla selezione, mentre le cellule donatrici di mitocondri e gli ibridi binucleati, che sono TK+, non sopravvivono.

Le cellule ρ° vengono eliminate mediante terreno

privo di piruvato e uridina, a cui si aggiunge siero fetale dializzato al 5%.

Analisi biochimica dei ibridi

I ibridi ottenuti dopo selezione vengono analizzati per valutare il recupero dell'attività OXPHOS. Questo consente di stabilire l'origine genetica alla base del difetto biochimico poiché si possono avere i seguenti casi:

a) se il difetto biochimico permane nelle linee ibride, possiamo attribuire la sua origine al mtDNA contenuto nelle cellule del paziente che ha donato i mitocondri. Infatti le cellule 143B, che hanno donato il DNA nucleare, non hanno alcun difetto biochimico della catena respiratoria;

b) se il difetto biochimico non è più presente, significa che l'alterazione genetica che causa il cattivo funzionamento della OXPHOS, è presente nel DNA nucleare delle cellule del paziente donatore di mitocondri. Infatti, nei ibridi ottenuti, il DNA nucleare del paziente è stato sostituito dal DNA nucleare delle cellule 143B che non hanno difetti biochimici.

Un'ulteriore dimostrazione sperimentale, una specie di "prova del nove", si può ottenere mediante creazione dei "ibridi inversi" (Figura 4) (12). In questo caso si generano cellule ρ^0 dai fibroblasti del paziente con difetto biochimico e si fondono con citoplasti derivati da cellule di controllo, che possono essere sia fibroblasti normali che cellule 143BTK-. Quindi nei "ibridi inversi" il DNA nucleare deriva dal paziente e il mtDNA da un controllo. E' necessario avere un marcatore nucleare presente nei fibroblasti del paziente (solitamente si usa la resistenza al G418) per poter effettuare la selezione dopo la fusione.

Ancora una volta si possono osservare due condizioni:

a) se il difetto biochimico permane nelle linee ibride, significa che l'alterazione genetica che causa il cattivo funzionamento della OXPHOS è presente nel DNA nucleare delle cellule del paziente donatore di nucleo;

b) se il difetto biochimico non è più presente, significa che esso è associato a mutazioni del mtDNA del paziente.

Strategie per stabilire il ruolo patogenetico di mutazioni del mtDNA che causano un difetto OXPHOS

Una volta stabilito che un difetto biochimico ha origine mitocondriale (l'origine nucleare non verrà trattata in questo articolo) è necessario analizzare il mtDNA per identificare la mutazione a livello di sequenza nucleotidica. Nel caso in cui venga identificata una mutazione del mtDNA, i ibridi sono, ancora una volta, lo strumento di elezione per definire il ruolo patogenetico della mutazione e consentono di stabilire una correlazione genotipo/fenotipo. Il vantaggio di questa tecnica è che consente di ottenere cloni omogenei che presentano contenuti diversi (eteroplasmia) di mtDNA in un ambiente nucleare omogeneo. Una condizione ideale è il caso in cui la mutazione sia eteroplasmica nei fibroblasti di partenza. In questo caso si possono ottenere cloni di ibridi con lo stesso "background" nucleare, in cui la percentuale di mutazione può variare da 100% a 0% e cloni di ibridi con percentuali intermedie. Andando quindi a valutare l'attività biochimica in cloni con diverso grado di eteroplasmia è possibile determinare una correlazione tra fenotipo biochimico e genotipo e stabilire così il ruolo patogenetico della mutazione. In particolare, la mutazione è considerata patogena se ad un aumento della percentuale di mutazione corrisponde un aumento della gravità del difetto biochimico; viceversa, un lieve difetto o l'assenza di un difetto biochimico sono correlati a bassi livelli o all'assenza della mutazione.

Questo sistema consente anche di determinare la soglia di espressione fenotipica di una data mutazione. Infatti, l'analisi biochimica di cloni con percentuali intermedie di mutazione è utilizzata per definire qual è la quantità di mtDNA mutato necessaria affinché il difetto biochimico si manifesti.

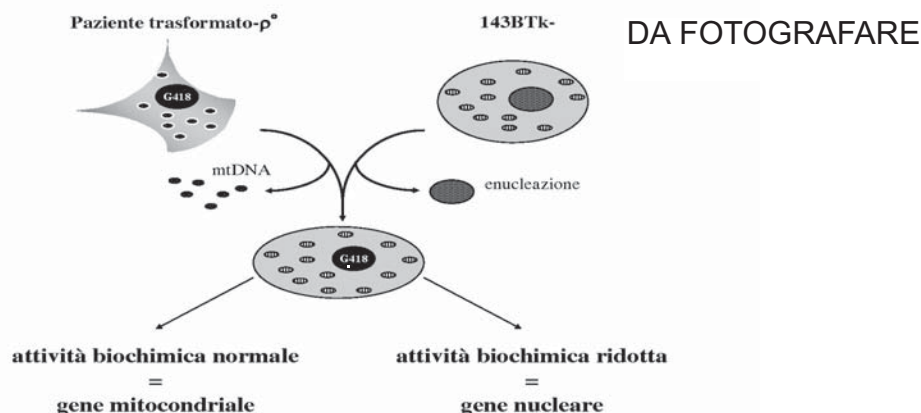


Figura 4

Creazione di ibridi inversi. Le cellule del paziente vengono private di DNA mitocondriale (mtDNA) mediante trattamento con etidio bromuro e fuse con cellule di controllo (nell'esempio le 143BTK-). La valutazione dell'attività biochimica discrimina tra difetto mitocondriale o nucleare.

CONCLUSIONI

La caratterizzazione biochimica e molecolare delle malattie mitocondriali è un processo complesso basato su indagini sofisticate che solo centri di riferimento accreditati possono svolgere. L'utilizzo dei fibroblasti in coltura consente di effettuare diagnosi di certezza per le patologie mitocondriali da difetto genetico noto. I sistemi cellulari che si possono creare a partire da fibroblasti dei pazienti e da cellule immortalizzate rappresentano uno strumento molto potente per le indagini biochimiche e genetiche volte alla caratterizzazione delle malattie mitocondriali da difetto non noto.

In questo articolo abbiamo trattato solo alcuni aspetti legati alla caratterizzazione di malattie associate a mutazioni del mtDNA. Tuttavia, altre tecnologie sono disponibili per caratterizzare la vasta gamma di patologie mitocondriali causate da mutazioni nel DNA nucleare. I vantaggi che derivano dall'utilizzo di cellule sono ovviamente legati al fatto di poter lavorare in vitro con sistemi controllati di coltura e selezione, di avere sempre a disposizione materiale da cui partire per effettuare delle analisi e di poter studiare il genoma nucleare e mitocondriale in maniera separata. Un'ulteriore possibilità riguarda gli studi retrospettivi: ad es. è possibile, a distanza di anni, e grazie ad eventuali nuove scoperte, rianalizzare delle cellule di pazienti in cui non si era giunti alla definizione di una diagnosi genetica.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia per le figure Eleonora Lamantea.

BIBLIOGRAFIA

1. Zeviani M, Carelli V. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 2007;20:564-71.
2. Chigorno V, Pitto M, Sonnino S, et al. Utilizzo dei fibroblasti in coltura nella diagnostica biochimica delle malattie da accumulo lisosomiale. *Biochim Clin* 2009;33:112-22.
3. Mariotti C, Tiranti V, Carrara F, et al. Defective respiratory capacity and mitochondrial protein synthesis in transformant cybrids harboring the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with maternally inherited myopathy and cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1994;93:1102-7.
4. Garavaglia B, Uziel G, Dworzak F, et al. Primary carnitine deficiency: heterozygote and intrafamilial phenotypic variation. *Neurology* 1991;41:1691-3.
5. Shepherd RK, Checcarelli N, Naini A, et al. Measurement of ATP production in mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:86-91.
6. van den Heuvel LP, Smeitink JA, Rodenburg RJ. Biochemical examination of fibroblasts in the diagnosis and research of oxidative phosphorylation (OXPHOS) defects. *Mitochondrion* 2004;4:395-401.
7. Finocchiaro G, Colombo I, Garavaglia B, et al. cDNA cloning and mitochondrial import of the b-subunit of the human electron-transfer flavoprotein. *Eur J Biochem* 1993;213:1003-8.
8. Nijtmans LG, Henderson NS, Holt IJ. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 2002;26:327-34.
9. 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* 2008;46:281-7.
10. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989;246:500-3.
11. King MP. Use of ethidium bromide to manipulate ratio of mutated and wild-type mitochondrial DNA in cultured cells. *Methods Enzymol* 1996;264:339-44.
12. Tiranti V, Munaro M, Sandonà D, et al. Nuclear DNA origin of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome: genetic evidence based on patient's-derived rho degrees transformants. *Hum Mol Genet* 1995;4:2017-23.