



 **Mitocon**

Insieme per lo studio e la cura  
delle malattie mitocondriali

# 9° Convegno Nazionale sulle Malattie Mitocondriali

Pazienti, famiglie, medici e ricercatori in rete.  
Le nuove frontiere della ricerca sulle malattie mitocondriali.

# Atti del convegno



**Mitocon - Insieme per lo studio e la cura delle malattie mitocondriali Onlus**, è l'associazione di riferimento in Italia per i pazienti mitocondriali e di raccordo con la comunità scientifica e le istituzioni, per promuovere la ricerca scientifica e migliorare la qualità della vita dei pazienti e dei loro familiari. Dal 2009, gestisce il Registro Italiano dei Pazienti Mitocondriali, un importante strumento per progredire nella conoscenza delle malattie mitocondriali ed è membro fondatore di IMP (Federazione internazionale associazioni di pazienti e famiglie con malattie mitocondriali). Dal 2011 organizza il Convegno Nazionale delle Malattie Mitocondriali. [www.mitocon.it](http://www.mitocon.it)

# ABSTRACTS RELATORI

**Sessione 1: Storia naturale delle malattie mitocondriali più comuni.....pag. 3**

**Sessione 2: Approcci diagnostici.....pag. 9**

**Sessione 3: Novità e aggiornamenti nel mondo mitocondriale.....pag. 11**

**Sessione 4: Selezione Posters e premio Mitoideas.....pag. 18**

**Sessione 5: Sperimentazioni cliniche in cors.....pag. 20**

**Sessione 6: Dalla scienza di base alle future terapie.....pag. 21**

# Sessione 1: Storia naturale delle malattie mitocondriali più comuni

## Encefalomiopatia neurogastrointestinale Mitocondriale (MNGIE)

**Relatore:** Dott. Massimiliano Filosto

**Affiliazione:** Centro per lo studio delle Malattie Neuromuscolari, U. O. Neurologia, ASST Spedali Civili ed Università degli Studi di Brescia

### Riassunto

L'Encefalomiopatia Neurogastrointestinale Mitocondriale (MNGIE-MTDPS1) è una devastante malattia autosomica recessiva dovuta a mutazioni nel gene TYMP le quali causano una perdita di funzione dell'enzima timidina fosforilasi (TP) con conseguente accumulo di nucleosidi nel plasma e nei tessuti e disfunzione mitocondriale.

I sintomi esordiscono usualmente durante la seconda o terza decade di vita ed il quadro clinico classico è caratterizzato da oftalmoparesi esterna, disfunzione gastrointestinale, neuropatia periferica e leucoencefalopatia.

La disfunzione gastrointestinale (ridotta motilità gastrointestinale, nausea, disfagia, reflusso gastroesofageo, vomito postprandiale, dolore e distensione addominale, diarrea) sono le principali caratteristiche della malattia.

Il decorso clinico lentamente progressivo porta all'exitus di solito nella prima età adulta in seguito a complicazioni di tipo gastrointestinale ed allo stato nutrizionale inadeguato. Sebbene usualmente la malattia si manifesti con un fenotipo relativamente omogeneo, sono stati descritti diversi pazienti con fenotipi atipici o incompleti.

La diagnosi è confermata dal riscontro di elevate concentrazioni di timidina e desossitimidina nel plasma ed attività enzimatica della timidina fosforilasi nei leucociti inferiore al 10% del valore normale e dal test genetico.

Nella pratica clinica sono attualmente disponibili alcune interessanti opzioni terapeutiche (trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche, terapia con timidina fosforilasi "intrappolata" negli eritrociti e trapianto di fegato) ed altre promettenti terapie potrebbero essere disponibili nel prossimo futuro.

Il trattamento deve essere iniziato precocemente al fine di prevenire il più possibile il danno a carico dei mitocondri. Questo obiettivo, tuttavia, non è sempre facile da raggiungere a causa della difficoltà di diagnosticare la malattia, soprattutto quando il fenotipo non è del tutto tipico.

Poiché il successo del trattamento è correlato ad una diagnosi precoce, è importante che i medici siano a conoscenza delle caratteristiche cliniche e biochimiche utili a sospettare la diagnosi di MNGIE.

# Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)

**Presenting Author:** Dr. Massimiliano Filosto

**Affiliation:** Center for Neuromuscular Diseases, Unit of Neurology, ASST Spedali Civili and University of Brescia, Italy

## Abstract

Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE-MTDPS1) is a devastating autosomal recessive disorder due to mutations in the TYMP gene which cause a loss of function of thymidine phosphorylase (TP), nucleoside accumulation in plasma and tissues and mitochondrial dysfunction.

Onset of symptoms occurs during the second or third decade of life and the classical clinical picture is characterized by external ophthalmoparesis, gastrointestinal dysfunction, peripheral neuropathy and leukoencephalopathy.

Gastrointestinal dysfunctions, such as gastrointestinal dysmotility, nausea, dysphagia, gastroesophageal reflux, postprandial emesis, abdominal pain and distention, diarrhea, are prominent features of the disease.

The progressive clinical course leads to death usually in early adulthood from complications of gastrointestinal disorders and inadequate nutritional status.

Although usually the disease presents with a relatively homogeneous phenotype, often patients with atypical or incomplete phenotypes have been described.

The diagnosis is confirmed by plasma and urine thymidine and deoxyuridine elevated concentrations, thymidine phosphorylase enzyme activity in leukocytes less than 10% of control value and molecular genetic testing of TYMP.

Therapeutic options are currently available in clinical practice (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, carrier erythrocyte entrapped thymidine phosphorylase therapy and liver transplantation) and other promising therapies are expected in the next future.

Treatment should be started early in order to avoid the cumulative effects of imbalanced nucleosides on mtDNA and to prevent as much mitochondrial damage as possible. This goal, however, is not always easy to achieve due to the difficulty in diagnosing the disease, especially when the phenotype is not typical.

Since successful treatment is strictly related to early diagnosis, clinicians should be warned about the clinical and biochemical features useful to suspect diagnosis of MNGIE

# Deficit di Timidina Kinasi 2: aspetti clinici e storia naturale

**Relatore:** Dott.ssa Maria Alice Donati

**Affiliazione:** SOC Malattie Metaboliche e Muscolari Ereditarie, Azienda Ospedaliero Universitaria Meyer, Firenze

## Riassunto

La Timidina kinasi 2 (TK2) è un enzima mitocondriale che svolge un ruolo fondamentale nella replicazione e nel mantenimento del DNA mitocondriale (mtDNA). Il difetto di Timidina Kinasi 2 è trasmesso con modalità autosomica recessiva (gene TK2) e una recente studio collaborativo multicentrico internazionale retrospettivo con raccolta di 90 pazienti ha riportato lo spettro fenotipico e la storia naturale del difetto. Lo spettro fenotipico mostra esordio variabile dall'età infantile a quella adulta, secondarie alla deplezione e/o delezione multipla di mtDNA nei tessuti affetti. La presentazione clinica comprende tre principali fenotipi: la miopatia ad esordio infantile, che si manifesta entro i 12 mesi di vita con quadro di severa deplezione di mtDNA muscolare e sopravvivenza mediana di 20 mesi; la miopatia-SMA like ad esordio in età pediatrica, tra i 12 mesi ed i 12 anni, e sopravvivenza mediana maggiore di 9 anni e la forma ad esordio tardivo, generalmente dopo i 12 anni, con miopatia a lento decorso con insufficienza respiratoria e spesso oftalmoparesi in cui è possibile documentare sia deplezioni che delezioni del DNA mitocondriale e sopravvivenza mediana di 50 anni. Il fenotipo precoce infantile è caratterizzato da un quadro di miopatia rapidamente progressiva, ipotonia, perdita delle competenze motorie precedentemente acquisite ed è frequentemente associato ad encefalopatia. Il decesso sopraggiunge spesso entro l'anno d'età, principalmente per insufficienza respiratoria. Il fenotipo tardo-infantile si manifesta con miopatia inizialmente prossimale ad evoluzione più o meno rapida; il segno di Gowers è tipicamente presente. La maggior parte dei pazienti perdono la capacità di deambulare autonomamente e/o richiedono un'assistenza ventilatoria (invasiva o non invasiva) nel corso del follow-up. La forma ad esordio tardivo è caratterizzata da miopatia dei cingoli con frequente coinvolgimento della muscolatura oculare (oftalmoparesi) e della muscolatura della regione testa-collo. La prognosi è comunque meno severa rispetto alle altre forme. Questa raccolta di pazienti con descrizione della storia naturale è molto importante per la valutazione di efficacia di terapia innovativa con nucleosidi/nucleotidi. Riportiamo il caso di un paziente affetto da deficit di TK2 ad esordio infantile, diagnosticato all'età di circa 2,5 anni. Il bambino ha mostrato regressione motoria con severa progressiva intolleranza all'esercizio, debolezza muscolare, progressiva grave difficoltà nell'alimentazione orale, infezioni respiratorie e perdita della capacità di deambulazione entro

gli 8 anni d'età. Il paziente è stato posto in terapia orale con desossinucleosidi monofosfato (nucleotidi: desossicitidina monofosfato [dCMP] e desossitimidina monofosfato [dTMP]), con progressivo miglioramento clinico sia in termini di forza muscolare che di recupero della capacità di alimentarsi e di deambulare autonomamente. E' in fase di raccolta dati di decorso clinico con consistente modifica della storia naturale in 16 pazienti affetti da deficit TK2 in terapia con nucleotidi/nucleosidi.

# Thymine kinase 2 (TK2) deficiency: clinical aspects and natural history

**Presenting Author:** Dr. Maria Alice Donati

**Affiliation:** Metabolic and Neuro-muscular Disease Unit, Meyer Children Hospital, Florence, Italy

## Abstract

Thymidine kinase 2 (TK2) is a mitochondrial enzyme required for mtDNA replication and maintenance. Autosomal recessive TK2 mutations lead to a spectrum of disorders from infantile onset to adult onset developing as consequence of mtDNA depletion and/or multiple mtDNA deletions. We have reported a multicentric study in a cohort of 90 patients and the phenotypic spectrum and retrospective natural history of thymidine kinase 2 deficiency has been reported. Clinical presentation comprises three main phenotypes: infantile-onset myopathy, with onset within 12 months and severe muscle mtDNA depletion; childhood-onset myopathy, presenting between 1 to 12 years, and late-onset myopathy, occurring after 12 years of age and showing mtDNA depletion, multiple deletions or both. Infantile-onset phenotype is characterized by rapidly progressive myopathy, hypotonia or motor regression, frequently associated with encephalopathy; affected children commonly die within the first year due to respiratory failure (median survival of 1,66 years). Childhood-onset myopathy, SMA-like, presents with moderately to rapidly progressive myopathy, limb myopathy with proximal weakness and positive Gower signs. Median post-onset survival is 13 years, with clinical course to wheelchair-bound status and invasive or non-invasive ventilator dependency in the majority. Late-onset form manifests with mild limb weakness and frequent involvement of extraocular (ophthalmoparesis) and facial muscles; the prognosis is more favorable compared to previous forms. We report a patient diagnosed with childhood-onset TK2 deficiency at the age of 2,5 years. He presented with progressive motor regression, feeding difficulties and loss of the ability to walk by the age of 8 years. Oral treatment with deoxynucleoside monophosphate (deoxycytidine monophosphate [dCMP] and deoxythymidine monophosphate [dTMP]) was started, leading to clinical improvement, including increased muscular strength, reacquisition of feeding abilities and gaining of independent deambulation on treatment. An open-label study in 16 TK2-deficient patients indicates favorable side-effect profiles and clinical efficacy of deoxynucleoside monophosphate and deoxynucleoside therapies, under a compassionate use program, for TK2 deficiency. In 5 patients with early onset and severe disease, survival and motor functions were better than historical untreated patients. In 11 childhood- and adult-onset patients, clinical measures stabilized or improved.



# Primary mitochondrial myopathies: from diagnosis to therapy

**Presenting Author:** Dr. Costanza Lamperti

**Affiliation:** , Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan, Italy

## Abstract

Primary mitochondrial myopathy (PMM), are genetic disorders of the mitochondrial respiratory chain affecting predominantly, but not exclusively, skeletal muscle. PMM may present at any age, although typically the more severe phenotypes tend to present earlier in life. The commonest phenotype of PMM, observed in about two-thirds of all cases, is progressive external ophthalmoplegia (PEO). PEO is often associated with other signs of skeletal muscle involvement; typically slow progressive axial and proximal limb weakness affecting predominantly the hip and shoulder girdle muscles often with muscle wasting. Muscle weakness may also cause difficulty swallowing (dysphagia) and respiratory failure. Distal muscle weakness may be present but is rarely seen early in the disease. Major manifestations of PMM are exercise intolerance with myalgia, muscle wasting, fatigue (defined as an overwhelming sense of tiredness, lack of energy and feeling of exhaustion), muscle cramps and recurrent rhabdomyolysis with myoglobinuria triggered by exercise.

Often PEO are secondary to alteration in mtDNA maintenance and the most frequent alterations is mt DNA single deletion, thus multiple deletion secondary to nuclear gene mutation involved in DNA replication or repairing such as POLG1 ( the most frequent nuclear gene associated with PEO) Twinkle, ANT 1, DGUK, TK2, RRM2B, MGM1 and RNAsi H are the second genetic cause of these diseases. Single mutation in mt DNA are less frequent. Actually the NGS technique and the mutigenic approach gives the possibility to improve the diagnosis in terms of % of new diagnosis and number of gene identify. Actually routinely we test at list 22 nuclear genes associated to multiple deletions, nevertheless at list 1/3 of patients remain without diagnosis. Despite the frequency of the disease and the power of new diagnostic approach, still 1/3 of the patients remain without a diagnosis. In the last year we tested 10 patients without a diagnosis that shows all the characteristic of isolated myopathy using WES and searching for single mutations new genes involved in mtDNA maintenance. We identify a new genes in 2 /10 suggesting the possibility of different mechanism involved in the pathogenesis of the disease.

Actually non curative therapy are available for this conditions, nevertheless new strategies and new drugs are now coming put and some trial are now ongoing.

## Sessione 2: Approcci diagnostici

### The diagnosis of mitochondrial disorders by an integrative “multi-omic” approach

**Relator:** Dr. Holger Prokisch

**Affiliations:** Technische Universität München, München, Germany;  
Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany

**Abstract:**

Mitochondrial diseases (MD) pose a diagnostic challenge due to clinical and genetic heterogeneity, propelling unbiased WES into early diagnostics. To date, 330 disease-genes implicated in mitochondrial energy metabolism are recognised, and this number continues to grow. Through global collaboration, initiated by the European Network for Mitochondrial Diseases, GENOMIT, we assimilate data from 1801 paediatric patients investigated by WES under the clinical suspicion of MD.

Systematic analysis establishes a genetic diagnosis in 50% of cases. Genetic diagnoses span 356 genes, the majority of which are seen in single cases, highlighting the vast genetic underpinning of MD. Variants in 70.0% of solved cases harbour within one of 163 MD disease-genes, with defects in ECHS1, ACAD9, PDHA1 and MT-ATP6 arising most frequently. Variants in 30.0% of solved cases harbour within one of 193 non-MD OMIM disease-genes, underlining phenotypic mimicry in other genetic diseases. As is typical for MD, all modes of inheritance, inclusive of autosomal recessive, maternal, autosomal dominant, x-linked inheritance, and de novo inheritance are observed.

However, across a large variety of Mendelian diseases, analysis of the coding sequence does not lead to diagnosis for >50% of patients. This indicates that in many cases the pathogenic variant evaded detection, was detected but remained of uncertain significance (VUS), or involved a more complicated interaction.

We recently demonstrated the power of combining DNA with RNA sequencing to tackle unsolved WES cases. We identified three situations in which to prioritize candidate disease-causing genes for a rare disease. Firstly, genes with expression outside physical range can be identified as expression outliers. Secondly, RNAseq can reveal cases of allele-specific expression. Detection of mono allelic expression can help in re-prioritizing heterozygous rare variants. Thirdly, splicing of a gene can be affected.

Still, many pathogenic alterations cannot be seen at the RNA level, but they may affect protein folding and stability. The large dynamic range and highly sensitive analytical capabilities of recent MS-based proteomics platforms now allows systematic, near comprehensive, quantification of the proteins expressed in cells. We established a protocol that allowed us to quantify about 8,000 proteins per sample. Proteomics of 100 fibroblast cell lines from patients with suspected mitochondrial disorder quantified >700 mitochondrial proteins. Proteomic data helped us to interpret the destabilizing effect of VUS. In summary, quantitative proteomics has proven to be a powerful complementary tool to genome and transcriptome sequencing. It delivers functional data supporting interpretation of VUS not only on the level of the affected protein but also on protein complexes sometimes providing insides in disease mechanisms.

# Sessione 3: Novità e aggiornamenti nel mondo mitocondriale

## Mitochondrial diseases in the ERN-NMD

**Presenting Author:** Dr. Rita Horvath

**Affiliation:** University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

### Abstract

EURO-NMD is a clinically oriented approach to the thematic grouping of neuromuscular disorders that builds on many years of networking experience in the NMD field. NMDs include a broad group of diseases with overall prevalence of 1/3500-1/2500 that represent a major cause of mortality and morbidity in children and adults. Mitochondrial diseases are included as one of the main disease group in EURO-NMD. While individually rare, NMDs collectively affect an estimated 500,000 patients in Europe and result in life-long disabilities with significant costs for families and the healthcare system. Regional and national differences in care and incomplete implementation of standards lead to international disparities and divergent outcomes for patients with mitochondrial disease. These patients often lack timely and accurate diagnosis, and this impacts on survival and quality of life. EURO-NMD aims to decrease time to diagnosis through implementation of diagnostic guidelines. Through next-generation sequencing EURO-NMD aims to diagnose a further patients, as a partner in the SOLVE-RD project that aims exactly at solving the unsolved cases and is also a partner in the European Joint Programme in Rare Diseases (EJP-RD). Mitochondrial diseases require a multidisciplinary team experienced in the specific clinical needs of the conditions. During the last 2 years the working groups have collected and endorsed guidelines and standard operating procedures in collaboration with the learned societies. For the future the ERN aims to increase the teaching initiatives either through teaching courses, e-learning activities or supporting the networking of young professionals

# Il ruolo e la partecipazione dei rappresentanti dei pazienti nelle reti europee - ERN

**Relatore:** Paula Morandi

**Affiliazione:** ePAG ERN EYE, Mitocon Onlus

## **Riassunto:**

Le raccomandazioni EUCERD ERN del 2013 e l'appendice del 2015 hanno riconosciuto il ruolo critico e integrante che i rappresentanti dei pazienti svolgono come membri formali delle strutture che prendono decisioni e presentano le loro opinioni per gli ERN.

Nel 2016 Eurordis, in collaborazione con la European Rare Disease Community, ha fondato 24 gruppi di rappresentanti di pazienti (Epag) per ottimizzare il coinvolgimento dei pazienti negli ERN. Gli Epag sono stati creati per assicurare solidarietà, inclusione e rappresentatività democratica. È ancora così oggi con un approccio saggio e formativo.

## **Dopo un anno, il numero di pazienti coinvolti negli ERN è sostanziale:**

- Oltre 300 pazienti sono coinvolti, compresi 255 Epag che lavorano insieme nei 24 gruppi di Epag;
- Oltre 1760 organizzazioni di pazienti coinvolte nei 24 ERN.

## **Gli Epag advocates rappresentano la vasta comunità di pazienti:**

Rappresentano la voce dei pazienti negli ERN, per assicurare che le necessità delle persone che convivono con una malattia rara siano ben comprese ed incluse nelle strategie operative della rete europea. Creano un ponte tra gli ERN e la più vasta comunità dei pazienti.

GLI Epag Advocates hanno un duplice ruolo:

- Livello Macro, il Consiglio e i gruppi trasversali:

1. Assicurano che le discussioni strategiche e operative siano centrate sul paziente;
2. Forniscono consigli sull'etica, sulla qualità e sicurezza della cura del paziente e della ricerca;
3. Contribuiscono a sensibilizzare sulle attività degli ERN;
4. Aiutano ad identificare risorse alternative di finanziamento.

· Livello Micro, reti specifiche sulle malattie:

1. Informano gli ERN portando testimonianze sulle necessità e l'esperienza di vivere con una malattia rara;
2. Aiutano ad individuare le priorità, a sviluppare e disseminare linee guida, informazioni sulla ricerca scientifica e collaborano ad attività formative;
3. Assicurano trasparenza circa la qualità di cura, gli standard di sicurezza, i risultati clinici e le opzioni di cura.

### **C'è stato un buon progresso nell'ultimo anno:**

I 24 Consigli Direttivi ora includono i rappresentanti dei pazienti. La struttura di Governance degli Epag è attiva ed è stata organizzata la Rappresentazione democratica dei pazienti.

Il cambiamento culturale e la collaborazione hanno fatto progressi, sebbene alcune aree terapeutiche sono più mature di altre e ci vorrà del tempo per portarle tutte allo stesso livello.

Da un ERN all'altro, i pazienti hanno lavorato in stretto contatto con i medici nell'ultimo anno per:

1. Identificare le necessità e richieste di risorse educative e linee guida di pratica clinica;
2. Sviluppare linee guida sul percorso clinico del paziente;
3. Revisionare i codici ontologici di Orphanet;
4. Sviluppare il piano strategico triennale degli ERN.

### **Le sfide per il coinvolgimento dei pazienti negli ERN:**

1. Verificare quando e dove il coinvolgimento dei pazienti è più efficace e offre un maggior valore;
2. Costruire il meccanismo per collaborare efficacemente con la più ampia comunità di pazienti;
3. Migliorare la gestione della conoscenza e scambiare buone pratiche;
4. Creare una cultura di partenariato clinico paziente che è uguale per tutti gli ERN e fornisce ad entrambi le competenze necessarie per far sì che questo accada;
5. Trovare i finanziamenti per sostenere un coinvolgimento significativo del paziente;

## **Priorità**

1. Le operazioni degli ERN devono concentrarsi su quelle attività che possono contribuire a migliorare i risultati sulla salute e il benessere;
2. Espandere l'esperienza e copertura geografica per dare la possibilità a tutti i pazienti di beneficiarne indipendentemente dalla loro condizione o dove vivono;
3. Gli ERN creano una chiara struttura governativa per la condivisione di conoscenza e il coordinamento della cura attraverso la UE ma il sistema non riuscirà ad adempiere nel suo pieno potenziale se la più vasta comunità dei pazienti non ne trae beneficio.
4. Misurare la soddisfazione dei pazienti attraverso un meccanismo standardizzato e comune attraverso gli ERN per assicurare dati e risultati forti e paragonabili attraverso tutti gli ERN.

## **Partenariato tra i pazienti e i clinici**

Ci vuole tempo per sviluppare un approccio di partenariato. Non può succedere dal giorno alla notte. Il partenariato tra pazienti e clinici deve essere nutrito.

Far parte di una squadra significa che i pazienti hanno accesso a tutte le informazioni, non solo ad informazioni selezionate.

I pazienti saranno desiderosi di contribuire finché sentono che le loro opinioni vengono ascoltate e hanno un impatto.

Abbiamo bisogno di potenziare i pazienti per sviluppare fiducia.

Alcuni pazienti potrebbero avere bisogno di formazione per imparare a vedere il quadro generale e alcuni medici hanno bisogno di formazione su come comunicare con i pazienti.

# Nuove sindromi mitocondriali nell'adulto

**Relatore:** Prof. Valerio Carelli

**Affiliazione:** Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie (DIBINEM), Università di Bologna, Bologna;  
IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, Ospedale Bellaria, Bologna.

**Riassunto:**

Sono passati oltre 30 anni dall'inizio del campo della Medicina Mitocondriale nel 1988, con le descrizioni iniziali della delezione singola del DNA mitocondriale (DNAMt) in casi sporadici di pazienti con miopatia mitocondriale e di mutazione puntiforme matrilinearmente ereditata nella neuropatia ottica ereditaria di Leber. Nonostante queste tre decadi abbiano testimoniato un grande numero di scoperte e identificazione di nuove sindromi mitocondriali e di geni, "non stiamo ancora raschiando il fondo del barile". Verranno presentati alcuni esempi paradigmatici di nuove sindromi mitocondriali, focalizzando sull'ampia categoria delle malattie del mantenimento del DNAMt, caratterizzate da due manifestazioni principali, la deplezione del DNAMt e l'accumulo di delezioni del DNAMt o entrambe. In particolare, verranno presentati i dettagli di una nuova malattia mitocondriale caratterizzata da atrofia ottica, distrofia retinica e insufficienza renale necessitante trapianto associate a mutazioni patogene nella proteina 1 che lega la singola catena di DNAMt (SSBP1), così come l'esistenza di un secondo gene mutato in una sindrome virtualmente identica alla MNGIE, la ligasi mitocondriale LIG3. In entrambe le malattie, che colpiscono giovani adulti, il tema comune è la presenza di una parziale deplezione del DNAMt in assenza di delezioni multiple, allargando così lo scenario delle malattie del mantenimento del DNAMt.



# New mitochondrial syndromes in adults

**Presenting Author:** Prof. Valerio Carelli

**Affiliation:** Department of Biomedical and Neuromotor Sciences (DIBINEM),  
University of Bologna, Bologna, Italy;  
IRCCS Institute of Neurological Sciences of Bologna, Bellaria Hospital,  
Bologna, Italy.

**Abstract:**

Over 30 years elapsed since the field of Mitochondrial Medicine started in 1988, with the seminal descriptions of mitochondrial DNA (mtDNA) single deletion in sporadic mitochondrial myopathy patients and point mutation in maternally inherited Leber's hereditary optic neuropathy. Despite these three decades witnessed a great number of discoveries and identification of new mitochondrial syndromes and genes, "we are not yet scraping the bottom of the barrel". A few paradigmatic examples of new mitochondrial syndromes will be presented, focusing on the large category of mtDNA maintenance diseases, characterized by two major features, namely depletion of mtDNA or accumulation of mtDNA deletions or both. In particular, the details of a new mitochondrial disease characterized by optic atrophy, retinal dystrophy and kidney failure requiring transplantation associated with pathogenic mutations in the mitochondrial single strand binding protein 1 (SSBP1) will be presented, as well as the occurrence of a second gene mutated in a syndrome virtually identical to MNGIE, the mitochondrial ligase LIG3. In both diseases, affecting young adults, the common theme is the occurrence of mtDNA partial depletion in the absence of multiple deletions, widening the landscape of mtDNA maintenance disorders

# Guidelines in mitochondrial diseases

**Presenting Author:** Dr. Rita Horvath

**Affiliation:** University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

## Abstract

In the clinical practice, it is almost impossible to keep an overview on all relevant scientific publications and clinical trials, especially in the fields of rare, inherited neurological diseases.

The aims of guidelines for physicians/neurologists are: i) transfer of scientific knowledge to the clinical practice; ii) improve the quality of medical care for the population by providing recommendations in decision-making on appropriate health care for specific problems and iii)

provide recommendations in diagnosis and treatment of neurological diseases. These recommendations should ideally be based on evidence and best scientific knowledge and recommended diagnostic procedures and treatments should ideally show proven efficacy. The presentation will demonstrate the difficulties of the process of developing guidelines for mitochondrial diseases in Germany.

## Sessione 4: Selezione Posters e premio Mitoideas

### Caratterizzazione del profilo metabolico nelle malattie mitocondriali

**Relatore:** Dott. Guido Primiano

**Affiliazione:** UOC Neurofisiopatologia Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Istituto di Neurologia Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

**Riassunto:**

Le malattie mitocondriali rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie su base genetica caratterizzate da un deficit primario della fosforilazione ossidativa (OXPHOS) con conseguente coinvolgimento di organi ad elevato consumo e frequente presenza di manifestazioni neuromuscolari. Anche se nella maggior parte dei casi è possibile identificare le cause genetiche, si è ancora lontani dalla piena comprensione dei meccanismi alla base di tali patologie. In particolare, al momento abbiamo conoscenze limitate delle conseguenze metaboliche dei deficit di fosforilazione ossidativa, che si traduce in una difficoltà nell'identificare target terapeutici efficaci.

Il sistema OXPHOS è connesso con il metabolismo glucidico e amminoacidico mediante il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e lo squilibrio secondario degli elementi del metabolismo intermedio potrebbe contribuire alla patogenesi di tali patologie.

Sulla base di tali osservazioni, in collaborazione con Marilena D'Aurelio, Giovanni Manfredi (Weill Cornell Medical College Brain and Mind Research Institute, New York, United States) e Valerio Carelli (IRCCS Institute of Neurological Sciences of Bologna, Bellaria Hospital, Bologna, Italy) stiamo indagando se quanto riscontrato in esperimenti in vitro e in modelli murini si conferma in pazienti affetti da malattia mitocondriale con predominante coinvolgimento del muscolo scheletrico, definita come Primary mitochondrial myopathy (PMM). Presso l'UO Neurofisiopatologia della Fondazione Policlinico A. Gemelli IRCCS siero/plasma, muscolo e mioblasti/miotubi sono raccolti allo scopo di effettuare la quantificazione di metaboliti mediante LC-MS e di eseguire indagini dei flussi metabolici mediante spettrometria di massa con l'utilizzo di traccianti marcati con isotopi stabili.

I nostri obiettivi sono i seguenti: ottenere, mediante lo studio di plasma/siero e muscolo, profili metabolici completi di differenti PMM in modo da identificare biomarcatori funzionali utili alla stratificazione dei pazienti e alla valutazione dell'efficacia di determinati trattamenti; indagare l'adattamento e la modulazione metabolica nei mioblasti/miotubi derivati dai pazienti affetti da malattia mitocondriale.

# Metabolic characterization of mitochondrial diseases

**Presenting Author:** Dr. Guido Primiano

**Affiliation:** UOC Neurofisiopatologia Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Istituto di Neurologia Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy.

## Abstract

Mitochondrial diseases (MDs) are heterogeneous genetic disorders caused by the impairment of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system which affects tissues that are heavily energy dependent and often manifest with neuromuscular symptoms. Although the primary energetic defects arising from genetic errors are often known, many aspects of the mitochondrial disease pathogenesis are yet to be elucidated. In particular, there is limited understanding of the metabolic consequences of OXPHOS deficiency and therefore no effective treatments are available due to the lack of defined targets. Since the OXPHOS system is strictly connected to carbohydrate, lipids and amino acid metabolism through the tricarboxylic acid (TCA) cycle, a failure in efficiently utilizing the reducing equivalents from the TCA cycle can obviously affect the intermediate metabolism. Therefore, we hypothesized that the metabolic responses to OXPHOS defects can play an important role in both cell survival and pathogenesis of the disease and that in addition to bioenergetic defects, OXPHOS defective tissues suffer from altered intermediary metabolism.

In collaboration with Marilena D'Aurelio, Giovanni Manfredi (Weill Cornell Medical College Brain and Mind Research Institute, New York, United States) and Valerio Carelli (IRCCS Institute of Neurological Sciences of Bologna, Bellaria Hospital, Bologna, Italy) we are investigating if the previously reported results in the mtDNA mutant cells and mouse model of mitochondrial myopathy<sup>1</sup> reflect the situation in mitochondrial patients characterized by the predominant involvement of skeletal muscle, defined Primary mitochondrial myopathy (PMM). Patients affected by PMM are investigated at the Neurophysiopathology Unit of Fondazione Policlinico A. Gemelli IRCCS where serum, muscle and myoblasts/myotubes are collected to perform metabolites quantification with LC-MS and to be utilized experiments using mass spectrometry-based stable isotope tracing analysis.

Our goals are: to obtain complete (muscle and plasma) metabolic profiles of different PMM identifying a functional biomarker panel to be used for patients' stratification and treatment evaluation; to investigate the biochemical remodeling and metabolic modulation in PMM myoblasts/myotubes.

# Sessione 5: Sperimentazioni cliniche

## Overview Trials Clinici in corso

**Relatore:** Prof. Michelangelo Mancuso

**Affiliazione:** Università di Pisa

**Riassunto:**

Dopo 30 anni di medicina mitocondriale, ricchi di scoperte sul versante genetico e di caratterizzazione fenotipica di molte malattie, finalmente negli ultimi anni si sono affacciati numerosi trials clinici nell'uomo, e numerose molecole sono anche in fase di studio su modelli cellulari e animali.

Sul sito [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), alla data 21 maggio 2019 sono presenti 35 studi "interventional (clinical trials)" attivi.

Nella mia relazione, cercherò di fornire una overview dei principali trials clinici in corso sui pazienti, illustrando i risultati preliminari ove disponibili e gli sviluppi prossimi.

## Sessione 6: Dalla scienza di base alle future terapie

### Nuove vie per il trattamento delle malattie mitocondriali

**Relatore:** Dott. Carlo Viscomi

**Affiliazione:** : Università di Cambridge, MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, Regno Unito

**Riassunto:**

Una migliore comprensione dei meccanismi alla base delle malattie mitocondriali è necessaria per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. A sua volta, la ricerca mirata a sviluppare nuove terapie ha contribuito, in diversi casi, a gettare nuova luce sui meccanismi della malattia stessa.

Abbiamo testato la possibilità di utilizzare l'ossidasi alternativa AOX per bypassare il complesso deficit di IV nel modello Cox15sm/sm. Sorprendentemente, i doppi mutanti Cox15sm/sm-AOX mostravano una riduzione della durata della vita e un sostanziale peggioramento della miopatia rispetto ai fratelli Cox15sm/sm. La riduzione della produzione di ROS nei topi Cox15sm/sm -AOX vs Cox15sm/sm determinava un'alterazione delle vie di stimolazione della biogenesi mitocondriale basate sull'asse AMPK/PGC-1a e della rigenerazione muscolare dipendente da Pax7/MyoD. Infine, l'antiossidante N-acetilcisteina, aveva un effetto simile, riducendo la durata della vita dei topi Cox15sm/sm. Questi risultati evidenziano i benefici e l'importanza dei ROS come segnali intracellulari e i potenziali rischi del trattamento con antiossidanti.

In precedenza, abbiamo dimostrato che una sovraespressione moderata della proteina Opa1, che controlla le cristae mitocondriali, può migliorare il fenotipo clinico dei modelli Ndufs4-/- e Cox15sm/sm, attraverso la stabilizzazione dei complessi e supercomplessi respiratori. Partendo da queste osservazioni abbiamo indagato se la sovraespressione di Opa1 possa essere efficace in altri modelli di malattia mitocondriale, in particolare nel modello Mpv17-/-, che manca di una proteina importante per il mantenimento del mtDNA. In contrasto con quanto precedentemente riportato, abbiamo osservato nei topi Mpv17-/- un grave fenotipo renale precoce, simile a quello originariamente descritto per questo modello ed in seguito spostatosi verso età più avanzate. Sebbene non abbiamo una spiegazione per questo cambiamento nel fenotipo, i topi Mpv17-/-Opa1 mostravano un marcato prolungamento della durata della vita, che correleva con il miglioramento della glomerulosclerosi, la prevenzione dell'apoptosi massiva nei glomeruli e la correzione dell'ultrastruttura mitocondriale. Il contenuto di MtDNA nei reni dei topi Mpv17-/-Opa1 era doppio rispetto agli Mpv17-/-.

Questi risultati dimostrano che la sovraespressione di Opa1 può essere utile in diversi modelli di malattia mitocondriale, indipendentemente dalla mutazione coinvolta.

## Exploring new pathways to target mitochondrial diseases

**Presenting Author:** Dr. Carlo Viscomi

**Affiliation:** University of Cambridge, MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, United Kingdom

### Abstract

Better understanding of the mechanisms underlying mitochondrial diseases has been instrumental to the development of new therapeutic approaches. In turn, investigations aimed at developing new therapies have helped, in several cases, to shed new light on the disease mechanisms.

We tested the possibility of using the Alternative Oxidase (AOX) to bypass the complex IV deficiency in the Cox15sm/sm mouse model. Surprisingly, the double Cox15sm/sm - AOX mutants had decreased lifespan and a substantial worsening of the myopathy compared to Cox15sm/sm littermates. Decreased ROS production in Cox15sm/sm -AOX vs. Cox15sm/sm mice led to impaired AMPK/PGC-1 $\alpha$  signaling and Pax7/MyoD-dependent muscle regeneration, blunting compensatory responses. Importantly, the antioxidant N-acetylcysteine had a similar effect, decreasing the lifespan of KO mice. These findings highlight the benefits and importance of ROS signaling and the potential hazards of antioxidant treatment.

We previously showed that mild overexpression of the mitochondria-shaping protein Opa1 improved the clinical phenotype of the Ndufs4 $^{-/-}$  and of the muscle-specific Cox15sm/sm mouse models, by stabilizing respiratory complexes and supercomplexes. We built on these data and investigated if Opa1 overexpression could be beneficial in other models of mitochondrial disease, namely the Mpv17 knockout mouse, lacking a protein involved in mtDNA maintenance. In contrast to what we previously reported, the Mpv17 $^{-/-}$  mice developed a severe and early onset kidney disease, similar to that originally described for this mouse model and lately shifted towards much later ages. Although we don't have an explanation for this shift in the phenotype, we observed a marked prolongation of the lifespan, correlated with the amelioration of the glomerulosclerosis, prevention of the massive apoptosis in the glomeruli and correction of mitochondrial ultrastructure in Mpv17-Opa1 mice. MtDNA content in Mpv17-Opa1 mice was double compared to naïve Mpv17 littermates. These results demonstrate that Opa1 overexpression can be beneficial in several mitochondrial disease models, independently of the underlying mutation.

# Towards therapeutic mitochondrial genome editing using programmable nucleases

**Presenting Author:** Dr. Michal Minczuk

**Affiliation:** MRC Mitochondrial Biology Unit, University di Cambridge, Hills Road, Cambridge, United Kingdom  
CB2 0XY, UK.

## **Abstract**

Mutations in protein or RNA coding genes of mtDNA are the most frequent cause of mitochondrial disease. These disorders are currently incurable and effectively untreatable, with heterogeneous penetrance, presentation and prognosis. In most cases, mutant and wild-type mtDNAs coexist within a single cell, resulting in heteroplasmy. The selective elimination of mutant mtDNA, and consequent enrichment of wild-type mtDNA, can rescue pathological phenotypes in heteroplasmic cells. In our work, we have developed mitochondrially targeted zinc finger-nucleases (mtZFNs) for degradation of mutant mtDNA through site-specific DNA cleavage. We have successfully used mtZFNs to target and cleave mtDNA harbouring disease-associated point mutations or large-scale deletions *in vitro*. More recently, we exploited a unique mouse model that recapitulates common molecular features of heteroplasmic mtDNA disease in cardiac tissue: the m.5024C>T tRNA<sup>Ala</sup> mouse. Through application of mtZFN delivered systemically by adeno-associated virus (AAV), we induced specific elimination of mutant mtDNA across the heart, coupled to a reversion of molecular and biochemical phenotypes. These recent findings constitute proof of principle that mtDNA heteroplasmy correction using programmable nucleases could provide a therapeutic route for heteroplasmic mitochondrial diseases of diverse genetic origin.



# Terapia genica per le malattie mitocondriali, promesse e insidie

**Relatore:** Dott. Carlo Viscomi

**Affiliazione:** : Università di Cambridge, MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, Regno Unito

## **Riassunto:**

I vettori virali adeno-associati (AAV) sono ormai una realtà consolidata per il trattamento di varie malattie neuromuscolari con numerosi studi clinici in corso. Nel corso degli ultimi anni abbiamo esplorato la possibilità di utilizzare gli AAV in modelli di malattie mitocondriali, inclusi modelli di sindrome da deplezione del DNA mitocondriale, deficit del complesso III, MNGIE, encefalopatia etilmalonica e sindrome di Leigh. Anche se i nostri risultati hanno mostrato grandi promesse per l'uso di AAV nelle malattie mitocondriali, restano molti ostacoli da superare. In particolare, l'attraversamento della barriera emato-encefalica (BEE), e la possibilità di colpire ampie popolazioni di neuroni e cellule gliali sono ancora sfide importanti per una terapia genica di successo. Nuovi serotipi recentemente sviluppati hanno rivelato una grande capacità di attraversare la BEE e di infettare diverse popolazioni di cellule gliali e neuronali. Abbiamo testato uno di questi nuovi serotipi nel topo knockout per *Ndufs4*, un modello della malattia di Leigh, caratterizzato da una grave neurodegenerazione. I topi trattati mostravano un significativo prolungamento della vita, un miglioramento del peso corporeo e della coordinazione. Anche se questi dati preliminari dimostrano un grande potenziale, sottolineano anche alcuni problemi che non sono ancora stati risolti. In particolare, diversi topi sono morti nonostante il trattamento per cause ancora da stabilire, ma che potrebbero essere legati a effetti tossici del virus stesso.

# Gene therapy for mitochondrial diseases: promises and pitfalls

**Presenting Author:** Dr. Carlo Viscomi

**Affiliation:** University of Cambridge, MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, United Kingdom

## Abstract

Adenoassociated viral vectors (AAVs) are becoming an established reality for the treatment of neuromuscular diseases with several clinical trials ongoing. We have explored the possibility of using AAV in models of mitochondrial diseases, including models of mitochondrial DNA depletion syndrome, complex III deficiency, MNGIE, ethylmalonic encephalopathy and Leigh syndrome. Although our results showed great promises for the use of AAVs in mitochondrial diseases, several hurdles remain unaddressed. In particular, crossing the blood brain barrier (BBB), and targeting large populations of neurons and glial cells are still major challenges to a successful gene therapy. Recently developed serotypes revealed a great capacity to cross the BBB and extensively spread to several neuronal and glial cell populations. We are testing one these new serotypes in the *Ndufs4* knockout mouse, a model of Leigh disease. The treated mice showed a significant prolongation of lifespan, an improvement in body weight and motor coordination. Although these preliminary data show great potential, they also highlight some problems that have not yet been resolved. In particular, several mice died despite treatment for reasons yet to be determined, but that could be related to toxic effects of the virus itself.

# ABSTRACTS POSTERS

- A. Legati.....pag. 27**
- B. Franco.....pag. 29**
- C. Péron.....pag. 31**
- C. Nesti.....pag. 33**
- F. D'Amore.....pag. 35**
- F. Moro.....pag. 37**
- F. Peluso.....pag. 39**
- G. Amore.....pag. 41**

# **Una strategia innovativa basata su Next Generation Sequencing per analizzare mutazioni del DNA mitocondriale come valida alternativa ai metodi convenzionali**

**Autore Poster:** Dott. Andrea Legati

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

## **Riassunto**

La funzione principale dei mitocondri è quella di produrre ATP e metaboliti per sostenere lo sviluppo e mantenere l'omeostasi cellulare. Essi contengono molteplici copie di un genoma non nucleare (mtDNA) ereditato per via materna e mutazioni puntiformi, riarrangiamenti come delezioni, o deplezione del DNA mitocondriale possono insorgere. Queste alterazioni genetiche causano malattie mitocondriali, caratterizzate principalmente da sintomi che interessano il sistema muscolare e nervoso, con casi molto gravi in cui può anche verificarsi morte prematura. Inoltre, mutazioni del mtDNA possono anche essere associate ad un ampio spettro di altri fenotipi clinici, come ad esempio malattie neurodegenerative, cancro e diabete. Ad oggi, approcci basati su sequenziamento Sanger e su Southern blot hanno rappresentato lo standard per l'analisi del mtDNA, tali tecniche sono però caratterizzate da limitazioni in termini di velocità, risoluzione, numero di campioni analizzabili e costi.

In questo studio presentiamo un'analisi combinata per individuare con elevata accuratezza mutazioni puntiformi e grandi delezioni con un risparmio in termini di tempo e costi se confrontata con gli approcci convenzionali. Inoltre, la possibilità di sequenziare l'intera molecola del genoma mitocondriale con elevata profondità di copertura ci permette di: 1) generare con precisione gli aplogruppi per ciascun campione; 2) indentificare varianti patogeniche nuove o già descritte; 3) misurare direttamente le percentuali di eteroplasmia di una mutazione con elevata sensibilità, anche a livelli molto bassi (3-5%), permettendo di confrontare l'eteroplasmia di una stessa mutazione in tessuti diversi di uno stesso individuo; 4) determinare l'esatta posizione e dimensione di grandi delezioni del mtDNA. Questa procedura rappresenta una valida alternativa ai metodi di analisi convenzionali e presenta molteplici vantaggi sia per scopi diagnostici che di ricerca.

# **Innovative Next Generation Sequencing strategy for screening mitochondrial DNA mutations as a robust alternative of conventional methods**

**Poster Author:** Dr. Andrea Legati

**Affiliation:** Unit of Medical Genetics and Neurogenetics

The Foundation of the Carlo Besta Neurological Institute, IRCCS, Milan, Italy

## **Abstract**

Mitochondria produce ATP and metabolites to support development and maintain cellular homeostasis. These organelles harbor multiple copies of a maternally inherited non-nuclear genome (mtDNA) and point mutations, rearrangements such as mtDNA deletions, or depletion can occur. These genetic alterations can cause mitochondrial disorders, characterized by symptoms primarily affecting muscular and nervous systems and also by early death in most severe cases. Moreover, mtDNA mutations can be associated with a wide range of other clinical phenotypes, including neurodegenerative diseases, cancer, and diabetes. To date, approaches based on Sanger sequencing and Southern blot have formed the basis of mtDNA screening but these techniques are inherently hampered by limitations in speed, throughput, resolution, and associated costs.

In this study, we describe a combined analysis to detect with high accuracy single point mutations and large deletions in a time and cost saving manner if compared with conventional approaches. In addition, the availability of the full length genome sequence with high depth of coverage gives the possibility to: 1) generate full accurate haplogroups for each sample; 2) to identify known/novel variants with a pathogenic role; 3) directly assess heteroplasmy with high sensitivity, even at very low percentages (3-5%), allowing the evaluation of heteroplasmic levels among different tissue types within an individual; 4) detect the exact size and position of mtDNA deletions. This procedure represents a valid alternative for conventional mtDNA screening methods and shows multiple advantages both for diagnostic and research purposes.

# **L'inattivazione dei miR-181a/b migliora il fenotipo neurologico in modelli di malattie mitocondriali**

**Autore Poster:** Dott.ssa Brunella Franco

**Affiliazione:** Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA)

## **Riassunto**

Le malattie mitocondriali costituiscono un gruppo di patologie geneticamente eterogenee, con una progressione clinica severa e spesso letale, dovute ad una non appropriata fosforilazione ossidativa. Tuttavia, nonostante i recenti sforzi non sono ancora disponibili efficaci terapie per questo gruppo di malattie.

Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che i microRNA (miR) miR-181a e miR-181b (miR-181a/b) regolano geni importanti per la biogenesi e la funzione dei mitocondri. Inoltre, i nostri risultati dimostrano anche che questi miRNA hanno un ruolo nella regolazione del ricambio dei mitocondri nel sistema nervoso centrale attraverso l'attivazione coordinata della biogenesi mitocondriale e della mitofagia.

Abbiamo quindi voluto verificare se la modulazione dell'espressione di questi miRNA potesse essere utilizzata per fini terapeutici in malattie mitocondriali caratterizzate da degenerazione neuronale. La nostra ipotesi si è rivelata corretta ed abbiamo infatti dimostrato che l'inattivazione dei miR-181a/b protegge, in maniera efficace, i neuroni dalla morte cellulare. Questo effetto protettivo porta ad un evidente miglioramento del quadro clinico in differenti modelli di malattia mitocondriale che includono due modelli in pesce di Microftalmia con lesioni cutanee, oltre modelli chimici e genetici di Atrofia ottica di Leber. Inoltre, i nostri dati preliminari dimostrano anche un miglioramento del fenotipo in un modello murino di sindrome di Leigh. I nostri risultati dimostrano che i miR-181a/b regolano l'omeostasi mitocondriale e che questi miRNA possano rappresentare target terapeutici efficaci in malattie mitocondriali caratterizzate da degenerazione neuronale indipendentemente dal gene coinvolto.

# miR-181a/b downregulation exerts a protective action on Mitochondrial Disease models

**Poster Author:** Dr. Brunella Franco

**Affiliation:** Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli (NA), Italy

## Abstract

Mitochondrial diseases (MDs) represent a heterogeneous group of devastating and often fatal disorders due to defective oxidative phosphorylation. Despite the recent advances, effective therapies are still not available for these conditions.

We demonstrated that microRNAs miR-181a and miR-181b (miR-181a/b) regulate key genes involved in mitochondrial biogenesis and function. We also showed that these miRNAs are involved in the global regulation of mitochondrial turnover in the central nervous system through coordinated activation of mitochondrial biogenesis and mitophagy.

We thus tested whether modulation of these miRNAs could be therapeutically exploited in MDs characterized by neuronal degeneration. Indeed, we showed that miR-181a/b downregulation effectively protects neurons from cell death and significantly ameliorates the disease phenotype in different animal models of MDs, including two medaka fish models of Microphthalmia with Linear Skin Lesions, and chemical and genetic models of Leber Hereditary Optic Neuropathy. In addition, our preliminary data also demonstrated amelioration of the disease phenotype in a mouse model of Leigh Syndrome.

Altogether our results demonstrate that miR-181a/b regulate mitochondrial homeostasis and that these miRNAs may be effective gene-independent therapeutic targets for MDs characterized by neuronal degeneration.

# **Modelli *in vitro* per neuropatia ottica di Leber (LHON) e sindrome di Pearson per indagare i meccanismi patogenetici e testare approcci terapeutici**

**Autore Poster:** Dott.ssa Camille Péron

**Affiliazione:** UO Neurogenetica Molecolare - Sede Bicocca  
Fondazione I.R.C.C.S Istituto Neurologico "C.Besta", Milano

## **Riassunto**

Le malattie mitocondriali sono un insieme di malattie molto eterogenee causate da alterazioni nel funzionamento della catena respiratoria, dovute sia a mutazioni del DNA nucleare che a mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA). Lo studio delle malattie dovute a mutazioni del mtDNA è complesso anche per mancanza di modelli in vivo in quanto è difficile manipolare il DNA mitocondriale. Per superare queste difficoltà, abbiamo quindi voluto sviluppare modelli cellulari a partire da fibroblasti di pazienti affetti da malattie mitocondriali. Ci siamo focalizzati su pazienti affetti da atrofia ottica di Leber (LHON), causata da mutazioni missenso omoplasmiche che colpiscono subunità del Complesso I della catena respiratoria, e pazienti con Sindrome di Pearson, causata da macrodelezione eteroplasmica del mtDNA, che rimuove porzioni consistenti del genoma mitocondriale. I fibroblasti dei pazienti e di controlli sani sono stati riprogrammati in iPSC (cellule indotte pluripotenti) con l'utilizzo del Sendai Virus e successivamente differenziati in neuroni, RGC o cardiomiociti in modo da studiare specificatamente i meccanismi implicati in queste patologie. I primi risultati mostrano una riduzione della motilità mitocondriale lungo gli assoni dei neuroni LHON e una diminuzione del numero di copie di mtDNA. Inoltre, la respirazione mitocondriale è ridotta sia nelle cellule dei pazienti LHON che nei pazienti con Sindrome di Pearson. Questi modelli, fisiologicamente più rilevanti rispetto alle tradizionali colture di fibroblasti, rappresentano una piattaforma innovativa per testare approcci farmacologici e, in prospettiva, aprire la strada verso la medicina personalizzata.



# ***In vitro* modeling of Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) and Pearson's Syndrome to unravel pathogenic mechanisms and test therapeutic approaches**

**Poster Author:** Dr. Camille Péron

**Affiliation:** Unit of Medical Genetics and Neurogenetics, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milan, Italy

## **Abstract**

Mitochondrial disorders (MD) are a group of multisystem syndromes due to impairment in the mitochondrial function, as a result of either nuclear (nDNA) or mitochondrial DNA (mtDNA) mutations. Major advances in understanding mtDNA related mitochondrial diseases are prevented by the lack of appropriate *in vivo* models since it is difficult to manipulate mtDNA. We therefore wanted to develop a cellular model starting from cells of patients affected by different mitochondrial diseases. We focused on Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON), caused by homoplasmic missense mutations affecting mitochondrial genes coding for respiratory chain Complex I subunits, and Pearson's syndrome caused by heteroplasmic macro-deletion of mtDNA. Fibroblasts from LHON and Pearson's patients were reprogrammed into iPSC (induced pluripotent stem cells) with the use of the Sendai virus and subsequently differentiated into neurons, RGC or cardiomyocytes in order to specifically study the mechanisms involved in these pathologies. The first results show a reduction in mitochondrial motility along the axons of LHON neurons, a significant decrease in mtDNA copy number in these neurons and a lower mitochondrial respiration both in the cells of LHON and Pearson's patients. This will allow obtaining, for the first time, an *in vitro* system more physiologically relevant than traditional cell cultures. Moreover, these models will represent an innovative platform for pre-clinical drug screening and will pave the way for personalized medicine to identify potential therapeutic options, for each mtDNA mutation or even for each patient.

# Nuove mutazioni nel gene *NARS2* in due bambini affetti da encefalopatia epilettica ad esordio infantile e disfunzione mitocondriale

**Autore Poster:** Dott.ssa Claudia Nesti

**Affiliation:** U.O.C. Medicina Molecolare,  
Malattie Neurodegenerative e Neuromuscolari IRCCS Fondazione Stella  
Maris, Calambrone (Pisa)

## Riassunto

Il gene *NARS2* codifica per l'asparaginil-tRNA sintetasi mitocondriale, un enzima fondamentale nella sintesi delle proteine mitocondriali, che catalizza il legame dell'asparagina con le molecole di tRNA. Mutazioni bialleliche nel gene *NARS2* sono state recentemente associate a fenotipi eterogenei (disabilità intellettiva, epilessia, deficit uditivo e visivo, miopatia, insufficienza epatica e renale) in associazione con disfunzione mitocondriale.

Descriviamo due bambini che presentano un ritardo dello sviluppo psicomotorio ed encefalopatia epilettica infantile. Entrambi i pazienti all'ultimo esame neurologico mostravano tetraparesi aposturale e grave disabilità intellettiva. Nel Paziente 1 la RMN encefalo ha mostrato la presenza di lesioni stroke-like, mentre nel Paziente 2 ha evidenziato lesioni simmetriche che coinvolgono i gangli della base e la faccia anteriore del peduncolo cerebrale, combinate con atrofia corticale bilaterale e marcata iperintensità T2 della sostanza bianca. La biopsia muscolare nel Paziente 2 ha mostrato alterazioni del metabolismo ossidativo e significativo accumulo di lipidi nella maggior parte delle fibre. Usando un pannello Next Generation Sequencing per geni nucleari coinvolti nelle malattie mitocondriali, abbiamo identificato quattro nuove mutazioni in eterozigosi nel gene *NARS2*: c.716G>T/p.Gly239Val e c.749G>A/p.Arg250Gln nel Paziente 1, e c.688G>C/p.Gly230Arg e c.1339A>G/p.Met447Val nel Paziente 2. Le mutazioni segregano nei genitori sani e sono predette patogenetiche mediante analisi *in silico*. Nei fibroblasti dei pazienti, abbiamo osservato in entrambi i casi una riduzione dell'espressione della proteina *NARS2*, un consumo di ossigeno ridotto e bassi livelli di ATP basale.

In conclusione, i nostri dati suggeriscono di prendere in considerazione le malattie correlate a *NARS2* nei bambini che presentano encefalopatia epilettica ad esordio infantile ed episodi di scompenso metabolico.

# Novel NARS2 mutations in two children with early onset epileptic encephalopathy and mitochondrial dysfunction

**Poster Author:** Dr. Claudia Nesti

**Affiliation:** IRCCS Stella Maris Foundation, Molecular Medicine for Neurodegenerative and Neuromuscular Diseases Unit, Pisa, Italy

## Abstract

The *NARS2* gene encodes the mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase, and enzyme critical in mitochondrial protein synthesis where it catalyzes the ligation of asparagine to tRNA molecules. Bi-allelic mutations in *NARS2* have recently been linked to heterogeneous phenotypes including intellectual disability, epilepsy, hearing and visual impairment, myopathy, hepatic and renal failure, all combined with features of mitochondrial dysfunction.

Here we describe two unrelated children presenting with developmental regression and infantile epileptic encephalopathy. Both patients presented episodes of failure to thrive and their latest neurological examination revealed apostural tetraparesis and severe intellectual disability. Brain MRI showed the presence of stroke-like lesions in Pt1 whereas in Pt2 there were symmetric lesions involving basal ganglia and the anterior surface of the cerebral peduncle, combined with bilateral cortical atrophy and marked T2 hyperintensity of the white matter. Muscle biopsy in Pt2 showed alterations of oxidative metabolism and abundant lipid droplets in most fibers.

Using a multigene targeted resequencing panel, we identified four novel heterozygous mutations in *NARS2*: the c.716G>T/p.Gly239Val and c.749G>A/p.Arg250Gln in Pt1, and the c.688G>C/p.Gly230Arg and c.1339A>G/p.Met447Val in Pt2. The mutations segregated in healthy parents and were predictably damaging when examined *in silico*. In patients' fibroblasts, we observed in both cases reduced expression of *NARS2* protein, and a significantly impaired oxygen consumption and low basal ATP levels.

Overall, our data suggest considering *NARS2*-related disorder in infants presenting with early onset epileptic encephalopathy and failure to thrive.

# Identificazione di isodisomia uniparentale materna del cromosoma 10 in un paziente con mutazione in PITRM1 e disfunzione mitocondriale

**Autore Poster:** Dott.ssa Francesca D'Amore

**Affiliazione:** IRCCS Fondazione Stella Maris, Medicina Molecolare, Malattie Neurodegenerative e Neuromuscolari, Calambrone (Pisa)

## Riassunto

PITRM1 è una metallopeptidasi mitocondriale che digerisce oligopeptidi, incluse le sequenze target mitocondriali che vengono così tagliate dalle proteine che sono importate attraverso la membrana mitocondriale. Alcune mutazioni in PITRM1 sono state recentemente associate con atassia cerebrospinale recessiva ad esordio precoce.

Descriviamo il caso clinico un bambino di 6 anni, nato da genitori sani non consanguinei. La storia familiare è negativa per patologie neuromuscolari. Il bambino ha avuto un ritardo nello sviluppo motorio e del linguaggio. Dal 25° mese ha presentato convulsioni febbrili tonico-cloniche. La RMN encefalo ha mostrato severa atrofia cerebellare e modesta atrofia del ponte con una diffusa alterazione del segnale a livello della corteccia cerebellare e subcorticale. All'età di 6 anni l'esame neurologico ha rivelato un disordine del movimento con segni atassici e discinesie distali con disabilità intellettiva ed assenza del linguaggio. Il controllo di RMN encefalo ha mostrato stabilità dell'atrofia cerebellare, ma con un coinvolgimento talamico. La biopsia muscolare ha evidenziato una minima sofferenza muscolare con lievi segni di proliferazione mitocondriale e una ridotta attività degli enzimi del complesso I+III della catena respiratoria.

Usando un pannello Next Generation Sequencing per geni nucleari coinvolti nelle malattie mitocondriali, abbiamo identificato una nuova mutazione omozigote nel gene *PITRM1*. Dall'analisi di segregazione la madre è risultata portatrice eterozigote per la variante, mentre il padre wild-type. Dopo aver confermato la paternità ed escluso la presenza di una delezione in eterozigosi del gene sull'allele paterno, abbiamo effettuato un Array-CGH e uno SNP-Array, confermando la trasmissione isodisomica segmentale uniparentale (UPD) del cromosoma 10 materno. In una delle regioni di isodisomia si trova il gene *PITRM1* omozigote mutato. A livello funzionale, l'analisi western blot eseguita sui fibroblasti ha rivelato nel paziente una significativa riduzione della proteina PITRM1, mentre la microscopia ha mostrato una grave compromissione della funzione mitocondriale.

Concludendo, questo caso espande le correlazioni genotipo-fenotipo delle mutazioni nel gene *PITRM1* e sottolinea l'importanza di una completa analisi molecolare nei casi con apparenti mutazioni omozigoti in geni nucleari associati a malattie mitocondriali.

# Identification of maternal uniparental disomy of chromosome 10 in a patient with PITRM1 mutation and mitochondrial dysfunction

**Poster Author:** Dr. Francesca D'Amore

**Affiliation:** IRCCS Stella Maris Foundation, Molecular Medicine for Neurodegenerative and Neuromuscular Diseases Unit, Pisa, Italy

## Abstract

PITRM1 is a mitochondrial metallopeptidase, which digests oligopeptides including the mitochondrial targeting sequences, cleaved from proteins imported across the inner mitochondrial membrane. Mutations in *PITRM1* have recently been associated with early onset autosomal recessive spinocerebellar ataxias.

We describe a six-year-old boy, born from healthy unrelated parents, presenting delayed motor and language development. Since 25 months of age, the child showed febrile tonic-clonic seizures with brain MRI showing a severe cerebellar atrophy and moderate atrophy of the pons with a diffuse signal alteration of cerebellar cortical and subcortical areas. At the age of 6 years, neurological examination revealed ataxic and distal dyskinesias, severe intellectual disability and absent speech. Brain MRI demonstrated that the cerebellar atrophy was stable but a thalamic involvement was highlighted. Muscle biopsy showed slight mitochondrial proliferation and reduced enzyme activity of the respiratory chain complexes I+III.

Using a targeted multigene panel, we identified a new homozygous mutation in *PITRM1*. Segregation analysis showed that the mother was heterozygous whereas the father was wild-type. We then performed high-density SNP-CGH array analyses demonstrating a segmental uniparental disomy (UPD) in chromosome 10, by localizing interspersed regions of heterodisomy and isodisomy with maternal UPD10. In 10p15.3 region is located the mutated *PITRM1*, in homozygosity. In skin fibroblasts, we detected a significant reduction of PITRM1 protein expression in the patient, with low oxygen consumption and impaired basal respiration.

This report expands the genotype-phenotype correlations of *PITRM1* mutations and corroborates the need of a full molecular examination of apparently homozygous changes in mitochondrial disorders.

# Neuropatie Mitocondriali sembrano meno comuni del previsto: studio trasversale di un singolo centro

**Autore Poster:** Dott.ssa Francesca Moro

**Affiliazione:** UOC Medicina Molecolare Malattie Neurodegenerative e Neuromuscolari IRCCS Fondazione Stella Maris, Calambrone (Pisa)

## Riassunto

Le Neuropatie Periferiche ereditarie (NP) sono condizioni cliniche che colpiscono in primo luogo i nervi periferici motori e sensitive e sono caratterizzate da una significativa eterogeneità clinica e genetica. Il corretto metabolismo energetico costituisce un elemento cruciale per favorire il trasporto lungo l'assone e per il mantenimento e la funzione della mielina e dell'assone stesso.

La neuropatia assonale può essere l'unica o la principale manifestazione clinica di un limitato numero di patologie mitocondriali e in uno studio recente del Network Italiano delle Malattie Mitocondriali è stato dimostrato che fino al 12% dei pazienti con una diagnosi definitiva di patologia mitocondriale mostrano segni di neuropatia (all'insorgenza della malattia o durante il suo decorso). In collaborazione con altri centri italiani negli ultimi tre anni abbiamo testato presso il nostro laboratorio 124 pazienti con NP (53F/71M) che si presentavano con quadri variabili di Charcot-Marie-Tooth (CMT). Usando un approccio di sequenziamento NGS con pannelli contenenti tutti i geni noti associati a CMT, abbiamo cercato di indagare quanto frequente sia il coinvolgimento di alterazioni mitocondriali nella genesi della neuropatia periferica.

Abbiamo identificato 9 varianti predette patogenetiche in geni mitocondriali noti (4F/5M). Tutte le varianti erano eterozigoti, note per essere associate a forme autosomiche dominanti di CMT, esoniche, rare (MAF<0.01) e segregavano perfettamente nella famiglia.

Prendendo in considerazione altri geni non propriamente "mitocondriali" ma che sono coinvolti nei meccanismi di dinamica e mantenimento mitocondriale, noi abbiamo identificato mutazioni patogenetiche in ulteriori 11 casi (5F/6M). Complessivamente sembra che circa il 16 % dei pazienti CMT non selezionati potrebbe presentare un'eziologia mitocondriale per la loro patologia neurologica. Questi dati suggeriscono che una disfunzione mitocondriale potrebbe contribuire significativamente ai casi familiari affetti da neuropatie periferiche.

# Identification of maternal uniparental disomy of chromosome 10 in a patient with PITRM1 mutation and mitochondrial dysfunction

**Poster Author:** Dr. Francesca Moro

**Affiliation:** IRCCS Stella Maris, Pisa, Italy

## Abstract

Inherited peripheral neuropathies (IPNs) are clinical conditions primarily affecting the peripheral motor and sensory neurons and are characterized by a significant genetic and clinical heterogeneity. Critical to peripheral nerve function is a correct energy metabolism to favour axonal transport and axonal and myelin formation and maintenance.

Peripheral neuropathy is the single or predominant manifestation of a limited number of mitochondrial disorders. A recent study of the Italian Network of Mitochondrial Disease has proved that up to 12% of patients with a definitive diagnosis of mitochondrial disorder show (at onset or as disease progresses) features of IPNs. We tested in the past three years 124 IPN patients (53F/71M) presenting with features of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease in a single center study. Using a targeted multigene panel including all known genes associated with CMT, we asked how frequent could be a mitochondrial origin of the patients' peripheral nerve involvement.

We identified nine predictably pathogenic variants in known mitochondrial CMT genes (4F /5M) . All these variants were heterozygous, known to be associated with autosomal dominant CMT forms, annotated as exonic and rare (MAF<0.01), and perfectly segregated in families.

Considering other not canonical "mitochondrial" genes that are putatively involved in mitochondrial dynamics and maintenance, we also identified pathogenic mutations in 11 further cases (5F/6M). Overall, it seems that up to 16% of unselected CMT patients might present a mitochondrial etiology of their neurological disorder. These data suggest that a mitochondrial dysfunction may contribute significantly to families with peripheral neuropathies.

# Utilità clinica del Whole exome sequencing (WES) nelle patologie mitocondriali: caratterizzazione dei pazienti con mutazioni nel gene PUS1 con spettro MLASA

**Autore Poster:** Dott.ssa Francesca Peluso

**Affiliazione:** SOD Genetica Medica, A.O.U. Meyer, Firenze

## Riassunto

Le malattie mitocondriali sono la causa più comune di malattie metaboliche ereditarie. I difetti dei complessi della catena respiratoria sono causati da mutazioni del mtDNA e dei geni nucleari coinvolti nel meccanismo di traduzione del mtDNA. PUS1 è un gene nucleare che codifica per la Pseudouridina Sintasi 1, sia l'isoforma citoplasmatica che mitocondriale, che converte l'uridina in pseudouridina in diverse posizioni del tRNA aumentandone l'efficienza della sintesi proteica in entrambi i compartimenti. Le mutazioni in PUS1 causano la sindrome MLASA, una rara malattia autosomica recessiva che coinvolge la fosforilazione ossidativa e il metabolismo del ferro, caratterizzata clinicamente da miopatia mitocondriale, da acidosi lattica e da anemia sideroblastica. Riportiamo i risultati clinici, biochimici e molecolari di un paziente in cui il Whole Exome Sequencing (WES) ha rivelato la presenza di mutazioni bialleliche in PUS1 non ancora riportate in letteratura. La revisione dei dati dei 17 pazienti con mutazioni nel gene PUS1 pubblicati fino ad oggi, dimostra un'enorme eterogeneità con disabilità intellettiva, microcefalia e anemia come tipici elementi clinici. Data l'esiguità dei pazienti descritti, non è possibile delineare un quadro fenotipico completo e l'evoluzione clinica associata, e non è possibile stabilire un'accurata correlazione genotipo-fenotipo che ci permetta di indicare una prognosi e un follow-up adeguati. Inoltre, il nostro paziente presentava una grave osteoporosi con fratture multiple mai riportate in letteratura scientifica e un'evoluzione più precoce dei sintomi neuromuscolari rispetto agli altri pazienti. Il WES sta aumentando il rendimento diagnostico nelle malattie mitocondriali in particolare aumentando la capacità di identificare potenziali mutazioni dei gene nucleari in pazienti con difetti biochimicamente definiti che interessano più complessi della catena respiratoria mitocondriale e con fenotipo complesso.



# Clinical utility of Whole exome sequencing (WES) in mitochondrial diseases: characterization of patients with PUS1 gene mutations and MLASA spectrum

**Poster Author:** Dr. Francesca Peluso

**Affiliation:** Medical Genetics Unit, Department of Biomedical Experimental and Clinical Sciences, Florence, Italy

## Abstract

Mitochondrial diseases (MD) are the most common cause of inherited metabolic diseases. Combined respiratory chain (RC) complexes defects are caused by mutations in the mtDNA-encoded RNA products and mutations in nuclear genes involved in mtDNA translation machinery. PUS1, a nuclear gene, encodes for cytoplasmic and mitochondrial tRNA pseudouridine-synthase-1, that converts uridine into pseudouridine in several tRNA positions increasing the efficiency of protein synthesis on both compartments. Mutations in PUS1 cause MLASA syndrome, a rare autosomal recessive disorder of oxidative phosphorylation and iron metabolism, clinically characterized by Mitochondrial Myopathy, Lactic Acidosis and Sideroblastic Anemia. We report clinical, biochemical and molecular findings of unreported patient in which Whole Exome Sequencing (WES) revealed the presence of new biallelic mutations in PUS1. Review of the 17 PUS1 mutant patients published to date demonstrates a huge clinical heterogeneity with intellectual disability, microcephaly and anemia as typical clinical elements. Given the paucity of the patients described, it is not possible to delineate a complete phenotypic picture and the associated clinical evolution, and it is not possible to establish an accurate genotype - phenotype correlation that allows us to indicate a proper prognosis and follow-up. Moreover, our patient had severe osteoporosis with multiple fractures that were never previously reported in the literature and a more early evolution of neuro-muscular symptoms than the other patients did. WES is increasing the diagnostic yield in MD, in particular enhancing the ability to identify potential nuclear gene mutations in patients with biochemically defined defects affecting multiple mitochondrial RC and complex phenotype.

# Atrofia Ottica Dominante (DOA): non solo OPA1

**Autore Poster:** Dott.ssa Giulia Amore

**Affiliazione:** Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie,  
Università di Bologna

## Riassunto

**Obiettivi:** L'Atrofia Ottica Dominante (DOA) è in genere causata da mutazioni in eterozigosi a carico del gene OPA1, tuttavia in circa il 30-40% dei pazienti non viene individuata una mutazione responsabile. Lo scopo del nostro studio è di fare chiarezza sulla diagnosi molecolare della DOA.

**Metodi:** Nei pazienti negativi per mutazioni in OPA1 è stato eseguito un pannello specifico di Next Generation Sequencing (NGS) comprendente 35 geni precedentemente associati con forme genetiche di atrofia ottica (TruSeq Custom Amplicon, Illumina). Abbiamo inoltre valutato i pazienti dal punto di vista neuro-oftalmologico includendo: acuità visiva (VA), campi visivi computerizzati, tomografia a coerenza ottica (OCT) dello strato delle fibre nervose retiniche (RNFL) e della macula e foto del fundus.

**Risultati:** Il pannello NSG ha identificato in quattro probandi italiani mutazioni in eterozigosi a carico del gene AFG3L2 (codificante per una subunità della proteasi mitocondriale m-AAA, le cui mutazioni sono associate ad Atassia Spinocerebellare tipo 28). Due dei probandi, appartenenti a famiglie multigenerazionali di DOA non imparentate tra loro del Sud Italia, presentavano la stessa mutazione c.1385C>T responsabile della sostituzione aminoacidica p.D407G, mentre la mutazione c.1220A>G, responsabile della sostituzione p.D407G, è stata trovata nel terzo probando e nel padre. La mutazione de novo c.1394G>A, responsabile della sostituzione aminoacidica p.R465K, è stata riscontrata nel quarto caso. Abbiamo valutato con visita neuro-oftalmologica in totale 12 soggetti portatori di mutazioni in AFG3L2 di età media  $39.8 \pm 18.5$ . La VA media è risultata  $0.51 \pm 0.37$ , associata a discromatopsia in 10/12 pazienti. L'esame del fundus ha evidenziato pallore temporale del nervo ottico in tutti i pazienti eccetto uno. L'OCT ha dimostrato una riduzione diffusa del RNFL in 7 soggetti e assottigliamento temporale in 4 pazienti. I campi visivi hanno evidenziato uno scotoma centrale di dimensioni variabili (mean deviation  $-8.1 \pm 8$ ). Il fenotipo neurooftalmologico è dunque indistinguibile dai pazienti con DOA dovuta a mutazioni in OPA1.

**Conclusioni:** Abbiamo descritto 3 famiglie e un caso de novo di pazienti affetti da DOA associati a mutazioni a carico del gene AFG3L2 (Charif M, Roubertie A, Salime S, et al. A novel mutation of AFG3L2 might cause dominant optic atrophy in patients with mild intellectual disability. Front Genet. 2015;6:311).

# Dominant optic atrophy (DOA): not only OPA1

**Poster Author:** Dr. Giulia Amore

**Affiliation:** Department of Biomedical and Neuromotor Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy

## Abstract

**Purpose:** Dominant optic atrophy (DOA) is caused in the majority of cases by heterozygous mutations in the OPA1 gene, however about 30%-40% of patients lack a causative mutation. The aim of our study was to fill this gap in molecular diagnosis of DOA.

**Methods:** OPA1-negative DOA patients were investigated by Next Generation Sequencing (NGS) targeted panel including 35 genes previously associated with genetic forms of optic atrophy. The library was generated using a 250 bp amplicon based approach (TruSeq Custom Amplicon, Illumina). Neuro-ophthalmological exam included assessment of visual acuity (VA), visual field (VF), optical coherence tomography (OCT) of retinal nerve fiber layer (RNFL) and macula and fundus pictures.

**Results:** NGS targeted resequencing of the genes included in our diagnostic panel for optic atrophy identified heterozygous causative mutations in the AFG3L2 gene (encoding a subunit of the mitochondrial m-AAA protease whose mutations are known to cause Spinocerebellar Ataxia type 28) in four Italian probands. Two of the probands, belonging to unrelated DOA multigenerational families from southern Italy, carried the same c.1385C>T mutation, causing the amino acid substitution p.A462V, whereas the change c.1220A>G, causing the amino acid substitution p.D407G, affected the third proband and his father. The change c.1394 G>A, causing the amino acid substitution p.R465K, was found in the fourth case, as a de-novo mutation. Overall, 12 individuals segregating these AFG3L2 mutations were assessed by Neuro-ophthalmological exam, mean age was  $38.8 \pm 18.5$ . Mean VA was  $0.51 \pm 0.37$  and color vision was impaired in 10/12 patients. Fundus oculi demonstrated temporal optic nerve pallor in all but one patient. OCT showed diffuse RNFL thinning in 7 patients (with relative nasal sparing in 3/7 cases), while temporal thinning was present in other 4 patients. VF showed variable degree of central scotoma (Mean Deviation  $-8.1 \pm 8$ ). The phenotype was virtually indistinguishable from that of OPA1-related DOA.

**Conclusions:** We described three families and one de-novo case of patients affected by DOA associated with heterozygous causative mutations in AFG3L2 gene (Charif M, Roubertie A, Salime S, et al. A novel mutation of AFG3L2 might cause dominant optic atrophy in patients with mild intellectual disability. *Front Genet.* 2015;6:311).

# MITOIDEAS

**L. L. Gramegna.....pag. 44**

**V. G. Montano.....pag. 46**

**D. Tolomeo.....pag. 49**

# **Ruolo dell'infiammazione della parete vasale nella patogenesi degli episodi stroke-like nella sindrome melas**

**Autore:** Dott.ssa Laura Ludovica Gramegna

**Affiliazione:** Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna

## **Riassunto**

La sindrome MELAS è una encefalomiopatia mitocondriale caratterizzata da una variabile combinazione di episodi stroke-like, demenza, epilessia, acidosi lattica, miopatia, cefalea, sordità, diabete e bassa statura, ed è di solito associata alla mutazione m.3243A>G nel gene MT-TL11.

Gli episodi stroke like sono tipici della MELAS, anche se possono essere presenti in altre patologie mitocondriali<sup>2</sup>, avvengono in aree non corrispondenti a territori vascolari e sono prevalenti in sede posteriore<sup>2</sup>. Si ritiene siano dovuti alla concomitanza di una disfunzione globale del metabolismo energetico nei mitocondri neurali, della glia, e delle cellule della barriera ematoencefalica<sup>2</sup> insieme ad un'alterata vasoregolazione dei vasi cerebrali piali e del microcircolo<sup>1</sup>.

L'alterata vasoregolazione dei vasi cerebrali piali e del microcircolo si associa ad un'alterata proliferazione mitocondriale a livello del muscolo liscio perivasale e delle cellule endoteliali ed ad una ridotta sintesi di NO, un mediatore prodotto dall'endotelio al fine di mantenere il tono dei piccoli vasi del microcircolo<sup>1</sup>. La disfunzione endoteliale e l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) concorrono ad una riduzione della sintesi di NO nei pazienti MELAS<sup>1</sup>.

L'angiografia di risonanza magnetica (MRA) è una tecnica di imaging convenzionale che permette la valutazione del diametro del lume dei vasi cerebrali. La risonanza magnetica (MR) della parete dei vasi intracranici è un nuovo approccio diagnostico grazie al quale è possibile rilevare e quantificare alterazioni infiammatorie a carico della parete dei vasi.

Abbiamo condotto una revisione sistematica degli studi di angiografia di RM (MRA) nei pazienti con MELAS. Sono stati valutati 18 studi, pubblicati dal 2005 al 2018, includendo un totale di 49 pazienti (29 M, età media:  $33,7 \pm 15,1$  anni). Trenta pazienti sono stati studiati durante la fase acuta di episodi stroke-like e la tecnica di MRA ha mostrato una dilatazione dei principali vasi piali in n=13 di essi, stenosi in n=7, mentre in n=9 pazienti è stata riportata nella norma (Tabella 1). Ad oggi nessuno studio è stato invece condotto utilizzando la sequenza di risonanza della parete dei vasi nei pazienti con MELAS.

Lo scopo primario del progetto che proponiamo è la valutazione di eventuali anomalie nel diametro e nella parete delle arterie intracraniche nei pazienti affetti da MELAS, tramite angiografia di risonanza magnetica e RM della parete dei vasi, durante la fase acuta/subacuta di episodi stroke-like. Lo stesso protocollo di imaging sarà ripetuto nel corso del follow-up al fine di valutare il grado di reversibilità delle alterazioni vascolari dopo terapia<sup>34</sup> e di identificare marcatori RM predittivi di successiva insorgenza di un episodio Stroke-like.

I protocolli suggeriti per la MRI e MRA cerebrali nei MELAS, per una durata totale di circa 40 minuti, da eseguirsi prevalentemente con magneti ad alto campo, comprendono le seguenti sequenze: T1 mprage Sagittale (05'30''); 3D T2-FLAIR/T2-weighted (05'30''); DWI assiale (05'30''); SWI assiale (05'30''); Arterial Spin Labelling (4'30); CS-TOF (02'30''); CS-SPACE T1 isotropico pre-contrasto (4'30''); CS-SPACE T1 isotropico post-contrasto 4'30''.

# **Spectroscopical and morphological Evaluation of genetically confirmed mitochondrial adulthood Encephalopathy at 7Tesla**

**Author:** Dr. Vincenzo Giovanni Montano

**Affiliation:** Neurological Institute, University of Pisa

## **Abstract**

We aim to investigate the neuroradiological features of central nervous system in three mitochondrial encephalopathy syndromes (MEs): MELAS, KSS and mitochondrial Parkinsonisms, by using a 7 Tesla (7T) magnetic resonance (MR) and proton spectroscopical studies at the time of the enrolment and after 12 months of clinical follow-up, correlating the neuroimaging features with specific clinical scales of disease severity. Moreover, if a MELAS patients followed at our center develop an acute stroke-like episode, the 7T MRI will be performed, to highlight MR differences between acute and the inter-critical phase of the disease. High resolution imaging achievable using ultra-high field MR systems 7T will provide: 1. specific anatomical or signal changes in MEs marking the biological basis of neurodegeneration, 2. the morphological and metabolic features in the natural course of disease. The longitudinal evaluation of the specific MR alterations, from acute phase to steady state will be useful to monitor efficacy of any new emerging therapy, especially in the subacute phase of MELAS. This study is anticipated to provide a better characterization of MEs, to deepen the insights into pathogenesis and natural history of these complex diseases. Overall, we expect to identify radiological disease biomarkers for monitoring therapeutic efficacy.

## **Central Hypothesis, Background and Rationale**

Mitochondrial diseases (MDs) are one of the most common inborn errors of metabolism, with a conservative prevalence estimation of approximately 1:5,000, being among the commonest adult forms of inherited neurological disorders (Gorman et al. 2015, Schaefer et al. 2008). Among MDs there are some “classical” recognized syndromes affecting the Central Nervous System, such as “MELAS” (mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes), characterized by juvenile stroke-like episodes and variably by deafness, diabetes, progressive external ophthalmoplegia, myopathy, cardiomyopathy, seizures, migraine, ataxia, cognitive impairment, gastro-intestinal dysmotility, and short stature, mostly due to the m.3243A>G tRNA<sup>Leu</sup> mutation; “KSS” (Kearns–Sayre syndrome) classically described with ptosis/ophthalmoparesis associated with pigmentary retinopathy, onset before age 20 and at least one among cerebellar ataxia, cardiac conduction block and protein elevation in CSF (DiMauro et al. 2002). Recently, the Italian Network has redefined the KSS spectrum, characterised by the

presence of ptosis and/or ophthalmoparesis due to an mtDNA single large-scale deletion and at least one of the following: retinopathy, ataxia, cardiac conduction defects, hearing loss, failure to thrive/short stature, cognitive involvement, tremor, cardiomyopathy (Mancuso et al. J Neurology 2015). Finally, mitochondrial Parkinsonisms are characterized by extrapyramidal involvement leading to a Parkinsonian syndrome usually associated with other mitochondrial red flags, i.e. neuropathy, ptosis, myopathy (Giannoccaro et al, 2017).

So far, neuroimaging in patients with mitochondrial encephalopathies has never been investigated at UHF. 7T MR, with the high signal-to-noise ratio, the extraordinary spatial resolution of images and the improved contrasts and spectral resolution of signals, which can allow a detailed depiction of the anatomy of several brain regions and their changes associated to different brain diseases, such as Parkinson's disease (PD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Indeed, 7T MR has been recently used to study patients with PD (Cosottini et al. 2014), ALS (Cosottini et al. 2016, Costagli et al. 2016) and Alzheimer's disease (AD) revealing specific hallmarks of neurodegeneration, but there are no available studies on mitochondrial neurodegeneration to date that is, differently from PD, AD and ALS, more a "metabolic degeneration".

Progresses in diagnostics and elucidation of pathomechanisms in MDs are necessary steps to drive major advances in treatment. There is very limited knowledge on the natural course of MDs in particular of the specific syndromic MDs, including those leading to neurodegeneration. Current biomarkers used for diagnosis and/or prediction of the severity of MDs lack sensitivity and specificity, thus limiting the correct interpretation, reproducibility and comparability of clinical trials in patients with MDs (Mancuso et al. 2009).

### **Specific Aims, Experimental Approaches and Expected Results**

The goal of the current proposal is to analyse by 7T MR defined cohorts of patients with MELAS, KSS and mitochondrial Parkinsonism, to provide additional details on neuroimaging findings and their changes over time in strict correlation with the clinical features. Our result will be useful to monitor the efficacy of upcoming therapies.

Specific aims are:

- to evaluate morphological and proton spectroscopical data in patients with specific MEs: MELAS, KSS and mitochondrial Parkinsonisms;
- to perform a longitudinal (12 months) MR assessment in those encephalopathies without acute episodes;
- to correlate MRI findings with clinical assessments (NMDAS, SARA, ACE-R) in all patients, plus UPDRS in mitochondrial Parkinsonisms;
- to analyse and compare neuroimaging features among these different MEs
- to evaluate morphological and spectroscopical data during a stroke-like episode in a subgroup of MELAS patients;

These aims point to a new characterization by UHF 7T imaging of the brain features of these rare diseases in their natural evolution and during the key acute events eventually



occurring during the natural disease course, to better characterize their phenotypes, to provide a new tool for disease-monitoring and prognosis, ultimately to provide valid imaging markers for monitoring drug-response in clinical trials.

### **Experimental Conduction**

We expected to recruit in one year a cohort of at least 15 patients with MELAS, KSS and mitochondrial Parkinsonisms. Diagnosis will be defined on the clinical ground and confirmed by genetic analysis.

A detailed clinical history for family history, disease onset, comorbidity and therapies will be performed and patients will be characterized phenotypically by disease form, disease duration and severity by using the following clinical scores:

- The Newcastle Mitochondrial Disease Scale for Adults (NMDAS) that is a semi-quantitative clinical rating scale designed specifically for all forms of MDs (Schaefer et al. 2006);
- Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA): a clinical scale made up of 8 items related to gait, stance, sitting, speech, finger-chase test, nose-finger test, fast alternating movements and heel-shin test (Trouillas et al. 1997);
- Addenbrookes Cognitive Examination Revised (ACE-R) is a brief 'bedside' cognitive screening instrument that has been reported to have excellent sensitivities and specificities for the diagnosis of dementia in the setting of a university hospital clinic (Mioshi et al. 2006).

All patients will undergo two MR exams, the first at the time of the enrolment and the second after 12 months. MELAS patients with a stroke-like episode at the time of the first evaluation will be reassessed with MR at the end of the acute phase of the disease and at the stabilized state, respectively. MR exams will be performed with a 7T system; whole brain sequences as well sequences targeting affected brain areas will be performed, and both morphological images and metabolic data will be acquired.

# Sarà possibile connettersi alla transizione? Proposta per le malattie mitocondriali

**Autore:** Dott.ssa Deborah Tolomeo

**Affiliazione:** UOC Medicina Molecolare Malattie Neurodegenerative e Neuromuscolari, IRCCS Fondazione Stella Maris. Pisa

## Riassunto

I pazienti affetti da malattie mitocondriali che raggiungono l'età adolescenziale e le loro famiglie si trovano a dover affrontare il delicato momento della transizione dal sistema di presa in carico pediatrica ad un sistema orientato sull'adulto. Al momento attuale non esiste una rete assistenziale organizzata né in ambito territoriale né ospedaliero, rendendo necessario ed urgente un intervento di sanità pubblica per la costruzione di percorsi assistenziali idonei. Il nostro progetto propone la creazione di un'applicazione web sia per il paziente che per i clinici che possa rendere informazioni cliniche di base, informazioni relative alla fase del percorso di transizione in atto e alla gestione delle emergenze cliniche, fruibili con maggiore rapidità e facilità. Modalità e tempistiche delle fasi di transizione, nonché la selezione delle informazioni da rendere più facilmente disponibili, saranno il frutto di quanto emerso da un sondaggio preliminare online da eseguire con MITOCON e rivolto a soci e centri clinici affiliati. Nel fornire ai clinici uno strumento di monitoraggio del paziente in questa fase critica, l'obiettivo è incentivare una transizione organizzata e coordinata, nella quale il paziente e la famiglia divengano progressivamente soggetti agenti consapevoli, in dialogo con il proprio referente medico e con il resto del Team clinico.

## 1. Introduzione

Le malattie mitocondriali rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie multisistemiche, che complessivamente rappresentano il gruppo più comune di disordini metabolici ereditari [1]. Nelle patologie croniche e rare, la transizione dall'adolescenza all'età adulta costituisce da sempre un periodo cruciale in considerazione dei rilevanti cambiamenti fisici, psicologici e sociali, propri dell'età, ma anche per le differenti necessità di presa in carico che si presentano [2]. Appare pertanto necessario che l'alleanza terapeutica instaurata in età pediatrica sia rinnovata anche nell'ambito della progressiva presa in carico in età adulta, ponendosi come obiettivi principali la progressiva maggiore consapevolezza e capacità di gestione della propria condizione, la maturazione della propria efficacia personale e lo sviluppo di un'adeguata e regolare comunicazione con il proprio referente medico [3]. Sebbene ad oggi la letteratura relativa al periodo della transizione si sia concentrata soltanto su un limitato numero di malattie croniche dell'età pediatrica, l'argomento è di primaria importanza per tutte le condizioni

che necessitano di una presa in carico a lungo termine [2]. Ad eccezioni di pochi modelli organizzativi locali, attualmente non esiste una rete assistenziale organizzata né in ambito territoriale né ospedaliero propria per i pazienti in età evolutiva con malattia mitocondriale nel delicato e complesso passaggio all'età adulta. Tuttavia, secondo il Piano Nazionale della Cronicità del 2016 [4], nella gestione della cronicità, viene sottolineata l'importanza di identificare obiettivi e linee di intervento nel rispetto delle evidenze scientifiche, dell'appropriatezza delle prestazioni e della condivisione dei Percorsi Diagnostici Terapeutici Assistenziali (PDTA). Infine, la garanzia di un'adeguata continuità assistenziale risulta essere strettamente dipendente da canali privilegiati di comunicazione tra i differenti Team multidisciplinari, nonché tra i clinici e gli adolescenti stessi e/o le loro famiglie [2].

## **2. Evidenze scientifiche**

Nella più recente letteratura internazionale sulla gestione del periodo di transizione da una presa in carico incentrata sul bambino ad un sistema orientato sull'adulto [5–6], le modalità di intervento basate su supporti tecnologici sono considerate tra le più efficaci nel migliorare l'outcome [3,6]. Esiste, inoltre, un numero crescente di risorse on-line volte ad agevolare il percorso di transizione [7] che mettono a disposizione di clinici e pazienti strumenti informativi e di verifica del percorso.

## **3. Attività previste**

Utilizzando l'esperienza maturata negli ultimi anni nel nostro Istituto nella gestione della transizione in malattie croniche e rare dell'età pediatrica, preliminarmente si effettuerà un sondaggio circa la gestione attuale della fase di transizione clinica (età di inizio, durata del percorso, modalità di esecuzione, criticità emerse, etc.) per pazienti con malattie mitocondriali attraverso la somministrazione di questionari a risposta multipla accessibili on-line e rivolti a pediatri, neuropsichiatri infantili, neurologi dei centri di riferimento, ed ai soci MITOCON (pazienti e rispettive famiglie). I dati raccolti, in un periodo di 6 mesi, saranno successivamente elaborati al fine di consentire l'identificazione degli step fondamentali che il paziente mitocondriale e la propria famiglia si ritiene debbano percorrere, nonché delle informazioni teoriche e pratiche che debbano essere messe a disposizione di medico e paziente in ciascuna fase del periodo di transizione. Successivamente svilupperemo un'applicazione web per rendere fruibili con maggiore rapidità e facilità informazioni cliniche di base, informazioni relative alla fase del percorso in atto e alla gestione delle emergenze cliniche, pur sempre nel rispetto della privacy del paziente.

## **4. Materiali e metodi**

Nella prima fase del progetto è prevista la creazione di due differenti questionari on-line (versione rivolta ai clinici, versione rivolta alle famiglie/pazienti) attraverso l'utilizzo di un link (se possibile, reso disponibile sul sito di MITOCON) che li indirizzerà ad una pagina di registrazione gratuita per la compilazione del questionario stesso. Le

informazioni che si intende raccogliere riguarderanno la situazione attuale del percorso di transizione nei centri MITOCON in Italia (con la prospettiva sia del medico che del paziente/famiglia), le criticità riscontrate sia dal personale medico che dai pazienti e dalle loro famiglie, ed indicazioni su modalità desiderabili per una efficace gestione della transizione. I dati ottenuti in un intervallo di tempo non inferiore ai 6 mesi saranno elaborati per identificare gli step fondamentali da percorrere e le informazioni teoriche e pratiche da mettere a disposizione di medico e paziente in ciascuna fase. In un secondo momento è previsto lo sviluppo di un'applicazione web gratuita alla quale il paziente potrà accedere con le proprie credenziali da PC e dispositivi portabili. L'applicazione consentirà una scelta tra 4 aree disponibili: a) dati clinici di base (es. generalità del paziente, diagnosi, codice di esenzione, età d'esordio, quadro clinico, farmaci sconsigliati, gestione delle emergenze), gestibili unicamente da personale medico e forniti al paziente anche in formato cartaceo; b) fase della transizione in atto con relativa documentazione (informativa, questionari di monitoraggio); c) appuntamenti previsti con possibilità di attivazione di promemoria attraverso connessione ad applicazioni web esistenti; d) servizio di comunicazione rapida con il centro clinico in caso di necessità, con un sistema che permetta di selezionare i sintomi del paziente da un elenco predeterminato, suddivisi per apparato, successiva elaborazione dei dati inseriti e determinazione del criterio di urgenza. Su questa base si invia una notifica al medico referente del paziente (richiesta di intervento urgente, entro le 24 ore o differibile, entro le 48-72 ore) oppure segnale di indicazione di emergenza con riferimento del Pronto Soccorso più vicino (e invio di immediata una notifica mail al Team clinico del paziente).





Insieme per lo studio e la cura  
delle malattie mitocondriali  
Onlus

**CON IL PATROCINIO DI:**



ROMA



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA



FONDAZIONE



UNIVERSITÀ  
CATTOLICA  
del Sacro Cuore

con il patrocinio di  
**UNIAMO**  
FEDERAZIONE ITALIANA  
MALATTIE RARE  
ONLUS  
Rare Diseases Italy

**E CON IL PATROCINIO DELL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

Mitocon Insieme per lo studio e la cura delle malattie mitocondriali Onlus

Via F. Benaglia, 13 - 00153 Roma

tel. 06 66991333 - [segreteria@mitocon.it](mailto:segreteria@mitocon.it)

[www.mitocon.it](http://www.mitocon.it)