



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare e Applicata**

**Approcci molecolari per la caratterizzazione di delezioni multiple in pazienti con difetti del
mantenimento del DNA mitocondriale**

**Mapping of multiple large-scale deletions in patients with mitochondrial DNA
maintenance defects**

Tesi di Laurea Magistrale
di:

MICHELE TODISCO

Relatore
Chiar.ma Prof.ssa

ANNA LA TEANA

Correlatore
Chiar.mo Prof.

VALERIO CARELLI

Sessione I

Anno Accademico 2022/2023

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	4
1. Genoma mitocondriale.....	5
• 1.1. mtDNA: struttura e replisoma	5
• 1.2. mtDNA: replicazione.....	7
• 1.3. Inizio della replicazione ad O _H	9
• 1.4. Terminazione della replicazione e rimozione dei primer	9
2. Patogenesi dei disordini mitocondriali	10
• 2.1. Delezioni singole.....	12
• 2.2. Proteine del replisoma associate a delezioni multiple	13
• 2.2.1 Polimerasi γ : POLG e POLG2	14
• 2.2.2. Twinkle: elicasi mitocondriale	17
• 2.2.3. RNASEH1.....	18
• 2.2.4 DNA2.....	19
• 2.3. Pool dei nucleotidi	20
• 2.3.1. SLC25A4 (ANT1).....	20
• 2.3.2. DGUOK.....	21
• 2.3.3. TYMP.....	21
3. Meccanismi di formazione delle delezioni	22
• 3.1. Replication-slippage mechanism	22
• 3.2. Copy-choice mechanism.....	24
• 3.3. Formazione di frammenti lineari deleti	25
• 3.4. Riparo del mtDNA e formazione delle delezioni.....	26
• 3.5. Altri fattori implicati	28
4. Disordini da delezione del mtDNA.....	29
• 4.1. CPEO	29
• 4.2. Kearns-Sayre Syndrome (KSS).....	31
• 4.3. Pearson Syndrome (PS)	31
5. Next Generation Sequencing (NGS).....	33
• 5.1. NGS – Principi	34
6. Long reads e Third-Generation Sequencing	36

• 6.1. Oxford Nanopore Technology	36
SCOPO DELLA TESI	38
MATERIALI E METODI	40
1. Raccolta campioni.....	40
2. Preparazione campioni NGS	40
• 2.1. MitoSAIt	41
3. Preparazione campioni Nanopore.....	43
• 3.1. Analisi bioinformatica ONT	44
4. ddPCR	45
RISULTATI E DISCUSSIONE	46
1. Metriche corsa.....	46
2. Caratteristiche di delezioni e duplicazioni associati a mutazioni nei singoli geni.....	47
• 2.1. DGUOK.....	47
• 2.2. DNA2.....	48
• 2.3. OPA1	49
• 2.4. POLG	50
• 2.5. SLC25A4 (ANT1)	53
• 2.6. TOP3A	54
• 2.7. TWNK.....	55
• 2.8. TYMP.....	60
3. Comparazione generale dei pattern nei diversi geni.....	61
4. Validazione delle delezioni con Long-Reads	66
5. Comparazione della quantificazione delle delezioni	67
CONCLUSIONI	68
BIBLIOGRAFIA	70

INTRODUZIONE

I mitocondri sono organelli cellulari coinvolti in numerose funzioni biologiche quali l'omeostasi del calcio, la biosintesi dell'eme, la sintesi degli ormoni steroidei e l'apoptosi. Sono responsabili, inoltre, della produzione della maggior parte dell'energia della cellula attraverso i complessi della catena di trasporto degli elettroni (Almannai et al., 2018), (El-Hattab et al., 2017).

I mitocondri sono caratterizzati da una doppia membrana fosfolipidica, di diversa composizione lipidica e proteica fra membrana interna ed esterna. La membrana mitocondriale esterna contiene porine che permettono il passaggio di piccole molecole, mentre la membrana mitocondriale interna è impermeabile alla maggior parte dei soluti, contiene cardiolipina e si presenta altamente ripiegata in strutture chiamate *cristae*. L'ampia superficie della membrana interna ospita i complessi della catena di trasporto degli elettroni (ETC) che portano alla formazione di energia sottoforma di ATP attraverso il processo di fosforilazione ossidativa (OXPHOS), un meccanismo che vede il trasferimento di elettroni attraverso i complessi I-IV e la sintesi di ATP tramite il complesso V. Le due membrane danno origine a due compartimenti, uno detto intermembrana, situato tra la membrana interna e quella esterna, ed uno delimitato dalla membrana interna denominato matrice mitocondriale (El-Hattab et al., 2017).

Ogni cellula può contenere da alcune decine a diverse centinaia di mitocondri, organizzati da oltre 1000 proteine codificate sia nel genoma nucleare (nDNA) che in quello mitocondriale (mtDNA) (Almannai et al., 2018). I mitocondri possiedono, infatti, il proprio DNA costituito da un doppio filamento circolare lungo 16569 bp e codificante 37 geni, che includono solo 13 delle subunità dei complessi della ETC. Il nDNA codifica, invece, la maggior parte delle proteine che compongono e assemblano la catena respiratoria, così come quelle coinvolte nella replicazione del mtDNA, nell'espressione genica del mtDNA, nella stabilizzazione e nella dinamica del network mitocondriale. Mutazioni a carico dei geni del mtDNA o di geni nucleari codificanti per proteine mitocondriali possono portare a disfunzione mitocondriale, con effetti quali un'irregolare omeostasi del calcio, un'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), un aumento di apoptosi e un difetto bioenergetico. Nelle patologie mitocondriali sono colpiti, in maniera sia esclusiva che multisistemica, soprattutto i tessuti ad alto fabbisogno energetico come sistema nervoso, muscolo cardiaco e scheletrico, reni e fegato (Almannai et al., 2018; El-Hattab & Scaglia, 2016),

Ad eccezione dei primi stadi di sviluppo embrionale, il mtDNA è continuamente sintetizzato nelle cellule indipendentemente dal ciclo cellulare, a differenza di quanto accade per il nDNA. Un numero

adeguato di copie di mtDNA è necessario per la produzione dei complessi respiratori e pertanto di energia (El-Hattab et al., 2017), risulta quindi finemente regolato in relazione alle richieste metaboliche ed energetiche di ogni cellula e tessuto. Considerando la relazione diretta tra il numero di copie di mtDNA e la sintesi delle subunità della catena respiratoria, il macchinario replicativo del mtDNA, il cosiddetto *replisoma*, è uno dei fattori più importanti per il corretto mantenimento di questo genoma e per un'appropriate funzione OXPHOS (Oliveira et al., 2020).

1. Genoma mitocondriale

- **1.1. mtDNA: struttura e replisoma**

Il DNA mitocondriale si presenta come una molecola circolare a doppio filamento di 16569 bp (**Figura 1**). Il genoma mitocondriale comprende 37 geni che codificano per 13 componenti essenziali del sistema OXPHOS, 2 RNA ribosomiali (12S and 16S rRNA) e 22 RNA transfer necessari per la traduzione. I tRNA sono inoltre funzionali per separare i trascritti codificanti proteine dopo la trascrizione di un solo RNA policistronico (Falkenberg & Gustafsson, 2020). Il mtDNA inoltre non presenta sequenze introniche e non è avvolto su istoni, si organizza tuttavia in nucleoidi contenenti di solito una molecola di mtDNA, compattati grazie alla proteina TFAM. I due filamenti dell'mtDNA differiscono nella composizione delle basi poiché un filamento è ricco in guanina, ed è possibile separarli in heavy (H) e light (L) strand usando una centrifugazione con gradiente di densità alcalino di CsCl₂ (Berkanddavid & Clayton, 1974).

La regione non codificante (NCR) più importante è la regione di controllo, che include le sequenze regolatrici per la trascrizione di entrambi i filamenti, il light strand promoter (LSP) e l'heavy strand promoter (HSP), e per la replicazione dell'H-strand, l'origine OriH (Gustafsson et al., 2016). L'origine di replicazione per il L-strand (OriL) è invece localizzata in un cluster di tRNA circa 11 kb a valle dell'OriH; le due origini dividono quindi l'mtDNA in due parti: l'arco maggiore e l'arco minore (**Figura 1**) (Falkenberg & Gustafsson, 2020). Parte della NCR, denominata D-loop, assume solitamente una conformazione aperta a triplice elica per la presenza del DNA 7S ([ref](#)).

Nei mammiferi l'mtDNA viene replicato grazie ad una serie di enzimi specifici, distinti da quelli utilizzati nel nucleo. I principali fattori che vanno a costituire il replisoma sono la DNA polimerasi- γ

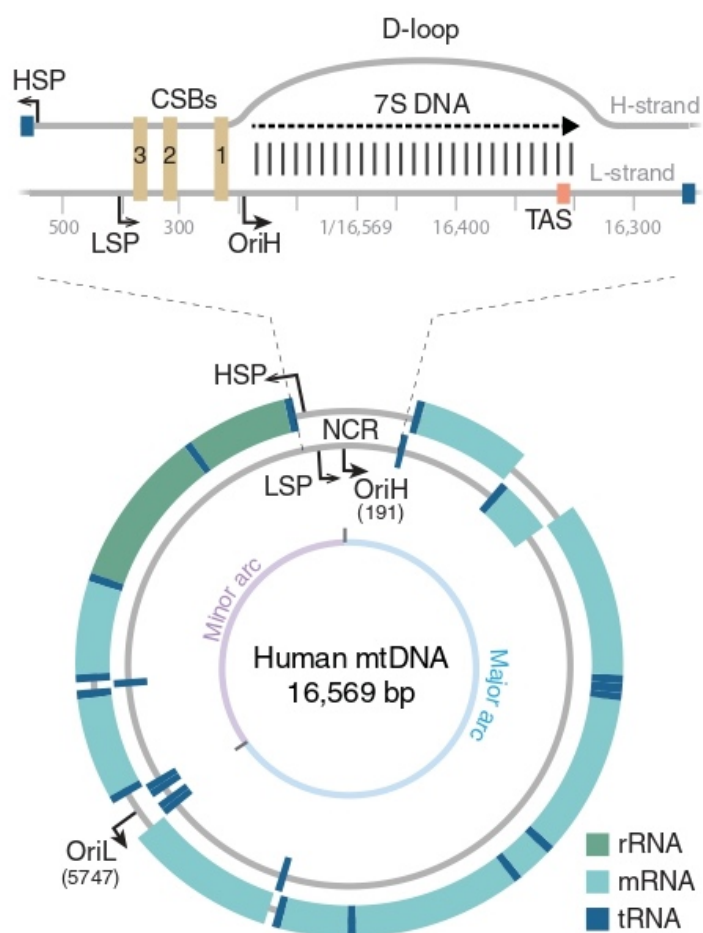


Figura 1. Genoma Mitochondriale: il filamento più interno è rappresentato dal Light Strand e quello più esterno dall'Heavy Strand. In alto è riportato un ingrandimento della regione non codificante. La regione del displacement loop (D-loop) contiene un terzo filamento (7S DNA), che si estende tra OriH e la regione TAS. (Falkenberg & Gustafsson, 2020).

(Poly), l'elicasi Twinkle e la *mitochondrial single-stranded DNA-binding protein* (mtSSB) (Oliveira et al., 2020). La Poly è l'unica polimerasi ad attività replicativa presente nei mitocondri; si presenta come un eterotrimerico con una subunità ad attività catalitica (PolyA) con massa molecolare di 140 kDa e due subunità accessorie (PolyB) con massa molecolare di 55 kDa (Gustafsson et al., 2016). La subunità PolyA possiede un dominio con attività 3'-5' esonucleasica che funge da correttore di bozze del nuovo filamento sintetizzato. Queste caratteristiche rendono la Poly una delle DNA polimerasi più accurate con una frequenza di errore pari a meno del 1×10^{-6} per nucleotide (Longley et al., 2001), mentre la subunità PolyB interviene nell'aumento dell'attività catalitica e nella processività di PolyA, favorendo così l'interazione dei substrati con il DNA (Fan et al., 2006). L'attività di Poly, singolarmente, non sarebbe sufficiente ad utilizzare il doppio filamento di DNA come stampo in quanto la replicazione necessita della DNA elicasi (Twinkle) che viaggia insieme alla Poly nella forca di replicazione catalizzando lo svolgimento, in direzione 5'-3', del doppio filamento (**Figura 2**),

processo NTP dipendente (Milenkovic et al., 2013). Twinkle forma un esamero di massa molecolare di 420 kDa che, per poter funzionare correttamente, necessita di specifici substrati quali una struttura a forcina caratterizzata da un singolo filamento al 5' come sito di attacco ed una piccola coda al 3' (Korhonen et al., 2003). La *mitochondrial single-stranded DNA-binding protein* (mtSSB) va a stimolare l'attività di Twinkle ed a stabilizzare il singolo filamento di DNA a livello della forca di replicazione (Milenkovic et al., 2013). La mtSSB si lega poi a molecole a singolo filamento a formare un tetramero e va a stimolare la sintesi del mtDNA facilitando il riconoscimento dei primer alla Pol γ e la sua processività (Kaguni, 2004).

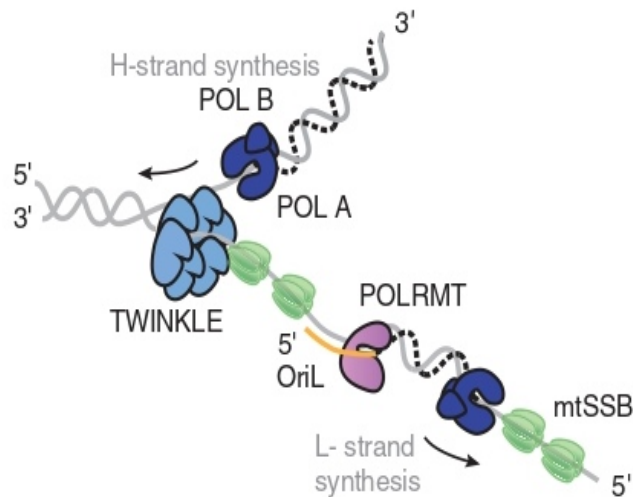


Figura 2. Forca di replicazione: La DNA elicasi Twinkle viaggia sul parental H-strand in direzione 5'-3' mentre svolge il dsDNA. La proteina mtSSB si lega al ssDNA e stimola la Pol γ nella sintesi del nuovo H-strand. Pol γ è responsabile anche della sintesi del L-strand, utilizzando come modello il parental H-strand dislocato. POLRMT sintetizza il primer a RNA necessario per l'avvio della sintesi del L-strand a partire da OriL (Falkenberg & Gustafsson, 2020).

- **1.2. mtDNA: replicazione**

Uno dei primi modelli di replicazione del mtDNA proposto è stato quello dello *strand-displacement model* (SDM) (Robberson et al., 1972). Secondo questo modello la sintesi avviene in maniera continua su entrambi i filamenti e parte da OriH, l'origine di replicazione dell'heavy-strand. La sintesi del nuovo H-strand avviene mediante il dislocamento del parental H-strand. Durante questo primo stadio della replicazione non avviene la simultanea sintesi del complementare light-strand. Twinkle si muove sul parental H-strand di fronte alla Pol γ , con mtSSB che si lega al filamento

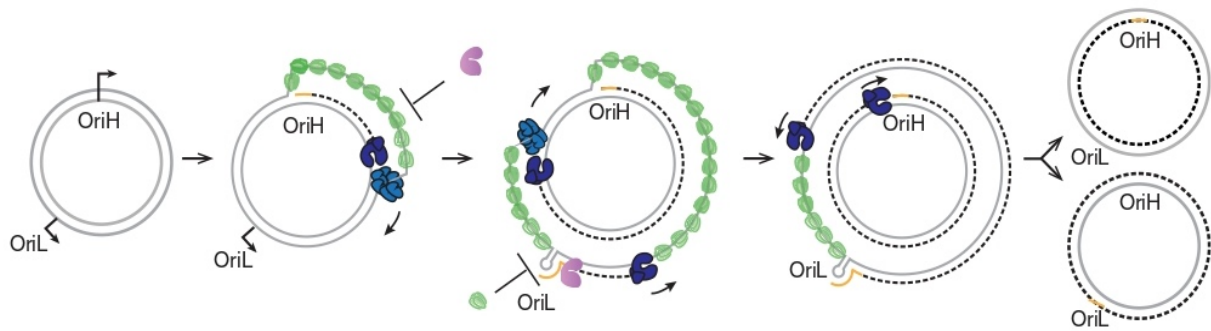


Figura 3. *Replicazione mtDNA – Modello strand-displacement: la replicazione dell’H-strand inizia a livello di OriH e procede in modo unidirezionale. Durante il processo, il parental H- strand viene spostato e legato da mtSSB, che impedisce la formazione di primer non specifici da parte di POLRMT. Quando il macchinario di replicazione raggiunge OriL, l’H-strand a livello dell’origine si ripiega in una struttura ad anello. POLRMT avvia la sintesi di RNA dal tratto di poli-dT nella regione dell’anello, portando alla produzione di un primer breve che viene utilizzato per avviare la sintesi del L-strand del DNA. Il L-strand nascente viene sintetizzato in modo continuo fino alla formazione di due nuove molecole figlie circolari a lunghezza completa (Falkenberg & Gustafsson, 2020).*

dislocato proteggendolo. Una volta completata la sintesi di due terzi dell’H-strand, i fattori della replicazione raggiungono l’origine di replicazione del L-strand (OriL) ed il parental H-strand nella forma a singolo filamento si ripiega a formare uno stem-loop (Miralles Fusté et al., 2014). Questa regione a stem-loop contiene un tratto di residui dT che fungono da punto di inizio per l’attività della RNA polimerasi mitocondriale (POLMRT) che andrà a sintetizzare un primer di circa 25 nucleotidi. Successivamente POLMRT verrà rimpiazzata dalla Pol γ ed inizierà la sintesi del L-strand (Fusté et al., 2010). Una volta iniziata, la sintesi dell’H-strand e del L-strand continua in direzione opposta fino a quando i due eventi replicativi non avranno raggiunto l’intera struttura circolare. Una caratteristica dello *strand-displacement model* è relativa ai siti di inizio e terminazione della replicazione del mtDNA, che differiscono nelle due molecole figlie, in uno inizio e terminazione avvengono ad OriH nell’altro ad OriL. Anche i meccanismi replicativi che intervengono durante la sintesi dei due filamenti sono differenti, in particolare per la sintesi dell’H-strand viene utilizzato come template un dsDNA e necessita quindi dell’attività dell’elicasi Twinkle per poter separare i due filamenti e permettere l’avanzamento della forza di replicazione, invece il processo di sintesi del L-strand è indipendente da Twinkle, in quanto verrà utilizzato come stampo il singolo filamento del parental H-strand (Falkenberg & Gustafsson, 2020).

- **1.3. Inizio della replicazione ad O_H**

La formazione dei primer necessari per l'inizio della sintesi dell'heavy-strand avviene a livello del LSP, localizzato approssimativamente a 200nt a monte dell'O_H. La trascrizione a partire da LSP porta alla formazione di un trascritto policistronico e genera i primer necessari all'inizio della trascrizione (Falkenberg et al., 2007). Uno dei tratti distintivi dell'origine di replicazione è la presenza di un punto di transizione da RNA a DNA, in cui la polimerasi inizia la sintesi del nuovo filamento di DNA a partire dall'estremità 3' del primer a RNA. Nei mitocondri umani, questo punto di transizione è stato mappato a livello della regione CSB2, localizzata a circa 100nt a valle del LSP, insieme ad altre due regioni conservate CSB1 e CSB3 (Xuan et al., 2006a). CSB2 è una regione ricca in guanina e durante la sua trascrizione si ripiega in una struttura *G-quadruplex* insieme al non-template DNA. Questa struttura va ad ancorare stabilmente il filamento trascritto nascente al mtDNA, a formare un R-loop (P. H. Wanrooij et al., 2012). La combinazione della presenza di questa struttura *G-quadruplex* e il debole legame tra adenina e uracile nel RNA-DNA duplex porta alla dissociazione della POLMRT e alla prematura terminazione del trascritto esattamente a valle della sequenza di CSB2 (Xuan et al., 2006b). Nella sua forma nativa l'R-loop non è in grado di funzionare da primer per l'inizio della sintesi del mtDNA, in quanto l'estremità 3' della molecola di RNA risulta inaccessibile. È stata individuata la nucleasi RNase H1 come un componente essenziale per la formazione del primer, in quanto va a clivare la struttura R-loop, rendendo accessibile l'estremità 3' alla Poly (Falkenberg & Gustafsson, 2020).

- **1.4. Terminazione della replicazione e rimozione dei primer**

Una volta terminata la sintesi da parte di Poly, i filamenti neoformati devono essere legati dalla DNA ligasi III. Per permettere un'efficiente ligazione, le estremità 5' e 3' del nuovo filamento devono essere giustapposte. I primer a RNA utilizzati per l'inizio della replicazione, quindi, dovranno essere rimossi (Macao et al., 2015).

È emerso che i fattori che vanno a regolare i meccanismi alla base della rimozione dei primer ad OriH e ad OriL siano differenti tra le due origini di replicazione (Uhler et al., 2016). A livello di OriL, i primer vengono processati da RNase H1, tagliando la sequenza di RNA e rimuovendo quasi totalmente il tratto a RNA dal tratto di poly-dT, nella regione a loop, fino al punto di transizione tra RNA e DNA (Falkenberg & Gustafsson, 2020). Da sola, l'attività di RNase H1, non è sufficiente per la

completa rimozione del primer, in quanto l'enzima lascia 1-3 ribonucleotidi nel punto di giunzione con il DNA (Lima et al., 2007). I ribonucleotidi rimanenti rappresentano un problema dal momento che impediscono l'attività della DNA ligasi III, pertanto si rende necessario l'intervento di un altro enzima ad attività nucleasica (Al-Behadili et al., 2018). Un enzima che sembra assistere alla rimozione dei primer a RNA insieme a RNase H1 è la *nuclear flap endonuclease 1 (FEN1)*, che andrà a rimuovere i ribonucleotidi non processati da RNase H1 creando due estremità che potranno essere legate dalla DNA ligasi III (Al-Behadili et al., 2018). In associazione a *FEN1* anche la nucleasi/elicasi mitocondriale *DNA2* sembra essere coinvolta nel processo di rimozione dei primer a RNA; sebbene tali strutture a lembo possano essere processate da *FEN1* da solo per generare estremità di DNA da legare, l'azione cooperativa di *DNA2* e *FEN1* risulta in un'efficienza significativamente maggiore (Zheng et al., 2008). Anche a livello di OriH i primer vengono in parte processati da RNase H1, in particolare andrà a tagliare dalla regione del LSP fino a CSB2, lasciando indietro 1-2 ribonucleotidi attaccati all'estremità 5'. In uno step successivo, un altro enzima *mitochondrial genome maintenance exonuclease-1 (MGME1)* andrà a rimuovere i ribonucleotidi rimanenti, insieme ad un tratto del filamento nascente dell'H-strand DNA (Uhler et al., 2016). *MGME1* genera un pool di prodotti tagliati in maniera diversa. Talvolta lasciando lembi o nick nell'H-strand che non possono essere direttamente legati dalla DNA ligasi III, interviene la Pol γ utilizzando sia la sua attività polimerasica che quella 3'-5' esonucleasica, per estendere o accorciare le estremità 3'. Si crea così un nick che può essere saldato dalla ligasi (Uhler et al., 2016).

2. Patogenesi dei disordini mitocondriali

Le malattie mitocondriali comprendono un elevato numero di patologie rare dalla presentazione clinica eterogenea, la cui prevalenza cumulativa si stima attorno a ~1:5000 individui (Elliott et al., 2008). Le malattie mitocondriali vengono generalmente classificate come *primarie* quando dovute a mutazioni a carico del mtDNA che vanno direttamente a compromettere la funzionalità del sistema OXPHOS, quali mutazioni puntiformi o riarrangiamenti (delezioni, duplicazioni, inversioni). Vengono definite *secondarie* le malattie che compromettono l'integrità del mtDNA in maniera indiretta in quanto causate da mutazioni su geni nucleari (Schon et al., 2012). In particolare, mutazioni di geni nucleari coinvolti nella regolazione e nel mantenimento del mtDNA possono portare ad anomalie quantitative (deplezione) o qualitative (delezioni multiple) del mtDNA.

(Spinazzola, 2011). All'interno di ogni cellula sono presenti multiple copie di mtDNA e può essere presente un mix di molecole mutate insieme a molecole wild-type, in quello che viene definito stato di *eteroplasmia*. Nel caso di varianti patogene esiste il cosiddetto livello soglia di eteroplasmia per cui il fenotipo patologico non si esprime se il limite di genomi mutati non eccede un certo limite soglia. Il livello soglia può variare a seconda delle specifiche mutazioni puntiformi e delle tipologie cellulari ed è particolarmente rilevante per i tessuti post-mitotici quali il tessuto nervoso e muscolare (Tuppen et al., 2010).

La maggior parte di difetti genetici associati a disordini mitocondriali è riconducibile a delezioni e mutazioni puntiformi del mtDNA. Le delezioni, in particolare, sono responsabili della perdita di un'ampia porzione del genoma mitocondriale ed hanno un ruolo rilevante nello sviluppo di patologie in tre differenti scenari clinici. Si possono osservare delezioni singole del mtDNA associate a disordini sporadici; in questi casi un'identica delezione viene individuata in tutte le cellule di un tessuto affetto. Si può inoltre verificare un accumulo patologico di delezioni multiple, in particolare nel muscolo scheletrico e sistema nervoso centrale, derivante da difetti genetici in geni nucleari codificanti proteine coinvolte nel metabolismo dei nucleotidi o nel mantenimento del mtDNA. Infine, un accumulo più ridotto di delezioni multiple del mtDNA è associato ad invecchiamento e allo sviluppo di malattie neurodegenerative (Nido et al., 2018), come osservato per le elevate delezioni nei neuroni della substantia nigra in casi di malattia di Parkinson (Nido et al., 2018).

Approssimativamente il 60% delle delezioni riportate risultano essere fiancheggiate da *direct repeats* (delezioni di classe I), della rimanente parte il ~30% sono fiancheggiate da *imperfect repeats* (delezioni di classe II) ed il ~10% invece non risulta essere fiancheggiato da nessuna sequenza ripetuta (delezioni classe III) (Samuels et al., 2004). Nonostante la diversa origine, le delezioni del mtDNA presentano delle caratteristiche comuni. La maggior parte si origina nell'arco maggiore tra OriH ed OriL, mantenendo entrambe le origini di replicazione; una possibile spiegazione a questo evento è che, per poter accumulare le delezioni all'interno della cellula, le molecole di mtDNA delete dovranno conservare la loro capacità replicativa (Pitceathly et al., 2012). Anche il loro meccanismo di formazione sembra essere identico, indipendentemente dal fenotipo clinico (Reeve et al., 2008), sebbene il metodo esatto con cui si formino le delezioni sia attualmente oggetto di dibattito. La maggior parte dei ricercatori ritiene che la replicazione sia il meccanismo più probabile di formazione delle delezioni (Shoffner et al., 1989), d'altra parte sembrano essere coinvolti anche i meccanismi di riparo del mtDNA danneggiato (Krishnan et al., 2008). La quantità e la distribuzione

tissutale del mtDNA deleto sono i fattori più importanti nel determinare i sintomi clinici, mentre risulta meno influente la dimensione e posizione delle delezioni (Moraes et al., 1995).

- **2.1. Delezioni singole**

Le delezioni singole sono stati i primi difetti genetici del mtDNA ad essere stati descritti ed associati a disordini mitocondriali (Holt IJ et al., 1988). Fenotipicamente possono portare a diverse entità cliniche come sindrome di Pearson (PS), sindrome di Kearns-Sayre (KSS) o oftalmoplegia esterna progressiva (CPEO) (Rocha et al., 2018). Tra i disordini descritti è stata individuata un'alta variabilità nella manifestazione clinica, nell'età di esordio che può andare dall'infanzia all'età adulta, e nei tessuti coinvolti che possono essere singoli o multipli. È ormai generalmente accettato che questo tipo di delezioni sia di tipo sporadico e non a trasmissione materna, eppure nessuna visione unificata degli eventi che portino alla formazione di delezioni singole è stata ancora proposta (Fontana & Gahlon, 2020). Un altro aspetto incerto sul meccanismo di formazione delle delezioni nel mtDNA riguarda la tempistica degli eventi che portano alla loro formazione, che possono rientrare nei primi stadi di sviluppo embrionale o durante l'oogenesi (Pitceathly et al., 2012). Molecole di mtDNA delete sono state individuate in tessuti di origine mesodermica (muscolo scheletrico) ed ectodermica (cervello), suggerendo che le delezioni si originino prima della differenziazione di questi due foglietti embrionali (Tne et al., 1997). Nel caso della CPEO, dove il muscolo scheletrico è l'unico tessuto clinicamente coinvolto, le delezioni potrebbero originarsi più tardi nello sviluppo, ad esempio durante la differenziazione di cellule precursori dei muscoli (López-Gallardo et al., 2009) o durante la maturazione delle cellule germinali, seguita da una segregazione mitotica del mtDNA deleto (Chinnery, 2004). È stata dimostrata, infatti, la presenza di delezioni anche a livello degli oociti prima della fecondazione (Chen, et al., 1995). All'interno degli oociti umani si possono contare ~100.000 molecole di mtDNA ed è stimato che circa la metà di oociti maturi di donne sane contengono ognuno 5-20 molecole di mtDNA con la stessa *common deletion* riscontrata in pazienti con disordini mitocondriali dovuti a delezioni (Chen, et al., 1995).

È stato quindi ipotizzato che le delezioni ereditate possano originarsi negli oociti della nonna di un individuo affetto (Chinnery, et al 2004.). Se un oocita contenete una delezione del mtDNA viene fecondato, lo zigote che si sviluppa è destinato a diventare la madre non affetta di un individuo affetto. Una porzione delle cellule germinali primordiali conterrà un basso numero di molecole delete, che per poter sviluppare malattia nella prole dovrà superare un determinato limite soglia

(Pitceathly et al., 2012). Il cambiamento nell'eteroplasmia tra le generazioni è attribuito alla teoria del *genetic bottleneck* per la trasmissione del mtDNA, secondo la quale solamente una piccola parte del numero totale delle molecole del mtDNA passerà dalla madre alla prole (Stewart & Chinnery, 2015). Se una molecola deleta di mtDNA viene selezionata per l'espansione clonale dopo il *genetic bottleneck*, si potrebbe avere un accumulo di alti livelli di molecole delete in un piccolo numero di ovociti maturi di una madre non affetta (Pitceathly et al., 2012). In questo caso il rischio di ereditare alti livelli di delezione patogena del mtDNA sarebbe pari a 5/100.000, che corrisponde all'incidenza dei disturbi da delezione del mtDNA nella popolazione generale (Chinnery et al., 2000).

Nonostante grandezza e posizione delle delezioni possano variare, circa un terzo dei pazienti è in ogni caso portatore della *common deletion* di 4977bp (Barritt et al., 1999) la più comune delle delezioni patogeniche, fiancheggiata da due *direct repeats* (DR) di 13bp, in posizione 13.477-13.459 all'estremità 5', ed in posizione 8470-8482 all'estremità 3' (Samuels et al., 2004). Conseguentemente, i geni di due subunità del complesso V, una subunità del complesso IV, quattro subunità del complesso I e cinque tRNA vengono persi, causando una disfunzione del sistema OXPHOS.

I primi studi sulle delezioni singole del mtDNA non riportavano nessuna correlazione tra la gravità clinica e il tipo, la dimensione o la localizzazione della delezione (Rotig et al., 1995a), ed ancora oggi i risultati sono contrastanti. Dal momento in cui pazienti con la stessa *common deletion* mostrano differente sintomatologia, si ritiene che altri fattori contribuiscano all'eterogeneità fenotipica osservata: la distribuzione a livello sistemico e la quantità di molecole delete (Pitceathly et al., 2012). Anche il time-point in cui si originano le delezioni viene considerato come un fattore che influenza il tessuto coinvolto, il fenotipo clinico, la percentuale e la posizione delle delezioni (López-Gallardo et al., 2009).

- **2.2. Proteine del replisoma associate a delezioni multiple**

I difetti di mantenimento del DNA mitocondriale (MDMDs) sono un gruppo di malattie causate da varianti patogene nei geni nucleari coinvolti nel mantenimento del mtDNA, con conseguente alterazione della sintesi del mtDNA che porta a difetti quantitativi (deplezione del mtDNA) e qualitativi (delezioni multiple del mtDNA) nel mtDNA. Pertanto, le MDMD sono caratterizzate da deplezione del mtDNA e/o da delezioni multiple del mtDNA negli organi interessati. Le MDMD sono

ereditate in modo autosomico recessivo o dominante e sono associate a un ampio spettro fenotipico che va da una lieve oftalmoplegia nell'adulto a una grave insufficienza epatica infantile fatale. Ad oggi, varianti patogene in 20 geni nucleari noti per essere cruciali per il mantenimento del mtDNA sono state collegate alle MDMDs. Queste varianti sono state rilevate in geni che codificano enzimi del macchinario di replicazione del mtDNA (sintesi del mtDNA: *POLG*, *POLG2*, *TWINK* e *TFAM*; rimozione dei primer: *RNASEH1*, *DNA2*, *MGME1*), geni che codificano proteine coinvolte nel mantenimento del pool dei nucleotidi (via di salvataggio mitocondriale: *TK2*, *DGUOK*, *SUCLG1*, *SUCLA2* e *ABAT*; metabolismo citosolico dei nucleotidi: *RRM2B* e *TYMP*; e importazione mitocondriale dei nucleotidi: *SLC25A4*, *AGK* e *MPV17*) e geni codificanti proteine coinvolte nella dinamica mitocondriale (*OPA1*, *MFN2*) (El-Hattab et al., 2017).

La conseguenza più comune ai difetti nel replisoma è l'accumulo di delezioni multiple nel mtDNA (Rahman & Copeland, 2019), strutturalmente simili alle delezioni singole già descritte (Schon et al., 2012). Le delezioni multiple generate da un replisoma mitocondriale aberrante sono associate in particolar modo a miopatie ed a oftalmoplegia esterna progressiva (PEO) nei pazienti adulti, che possono manifestarsi anche nelle sindromi primarie come la CPEO e la KSS; queste somiglianze possono suggerire che sia le delezioni primarie che quelle secondarie del mtDNA possano emergere in seguito a carenze simili del meccanismo di replicazione del mtDNA (Oliveira et al., 2020).

- **2.2.1 Polimerasi γ : *POLG* e *POLG2***

Il DNA mitocondriale viene replicato e riparato grazie all'attività della DNA polimerasi γ ; questo oloenzima nell'uomo consiste in una subunità catalitica p140 (codificata da *POLG* nel locus cromosomico 15q25) e da una subunità accessoria p55 in forma dimerica (codificata da *POLG2* nel locus cromosomico 17q24.1). *POLG* è uno dei diversi geni associati a disordini mitocondriali legati a deplezione e delezione del mtDNA. In un primo momento sono state descritte 4 mutazioni nel gene di *POLG* associate a oftalmoplegia esterna progressiva (CPEO) (Van Goethem et al, 2001), successivamente sono state individuate circa 250 mutazioni patogene. Le manifestazioni cliniche delle malattie correlate a mutazioni di *POLG* sono notevolmente eterogenee e consistono in un'ampia gamma di disturbi che coinvolgono più organi, con gravità ed età di insorgenza variabili (Tang et al., 2011). I disordini legati a *POLG* sono attualmente definiti da almeno 6 differenti fenotipi di malattie neurodegenerative, tra cui: Alpers–Huttenlocher syndrome (AHS), Childhood

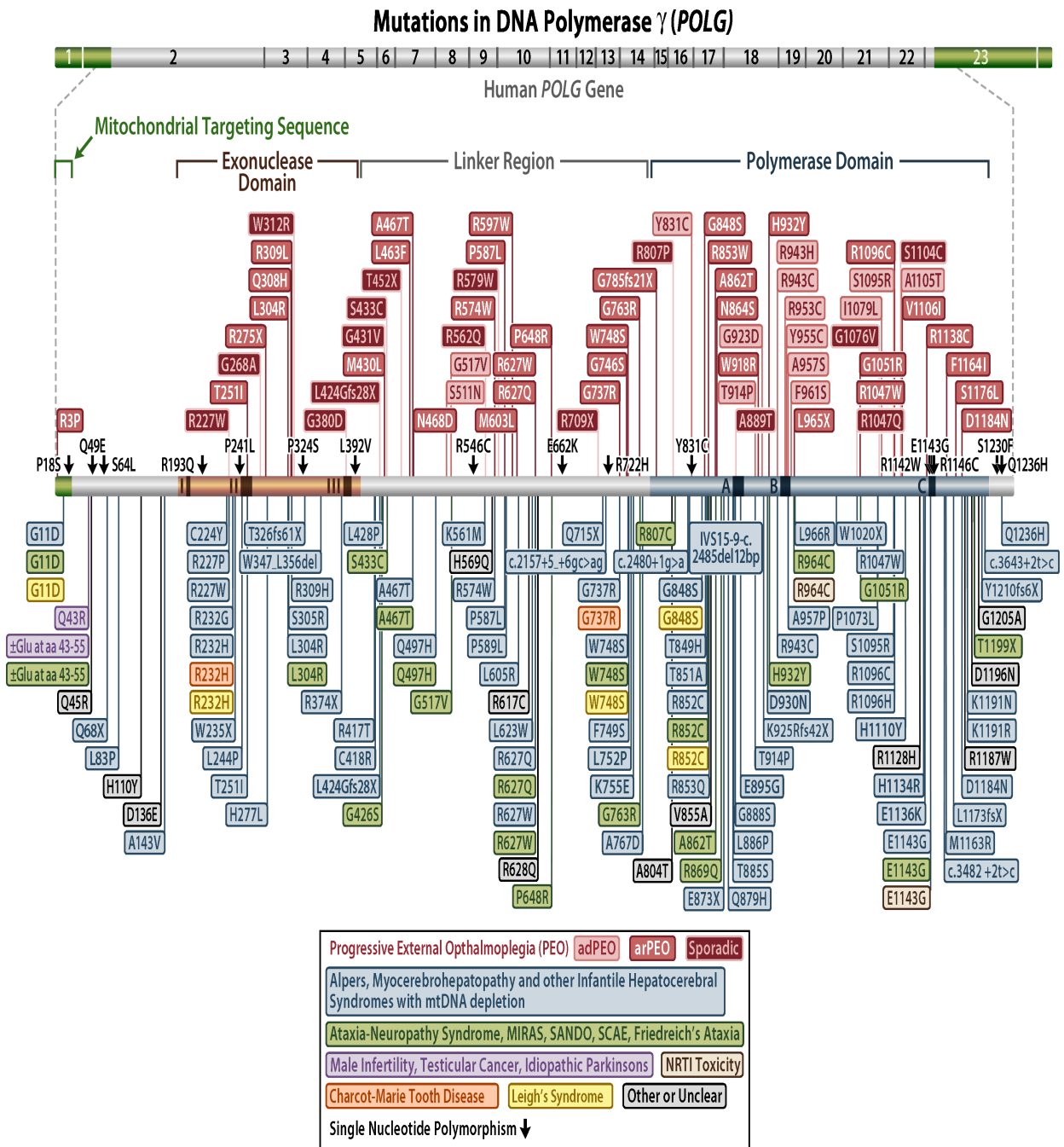


Figura 4. Mutazioni di POLG: mappa delle mutazioni rappresentata con le sostituzioni aminoacidiche associate a malattia.

myocerebrohepatopathy spectrum (MCHS), Myoclonic epilepsy myopathy sensory ataxia (MEMSA), ataxia neuropathy spectrum (ANS), Autosomal recessive PEO (arPEO), Autosomal dominant PEO (adPEO) (Copeland, 2014). Non si tratta di evidenti correlazioni dirette genotipo-fenotipo per le mutazioni *POLG*, in quanto la stessa mutazione può spesso portare a delezioni del mtDNA, deplezione del mtDNA o entrambe, rendendo difficile prevedere il fenotipo sulla base delle mutazioni osservate (Rahman & Copeland, 2019). Il gene *POLG* è unico per il numero di mutazioni

patogene distribuite sul gene e per la varietà di possibili patologie (**Figura 4**), alcune delle quali seguono un modello di ereditarietà autosomica dominante, sebbene la maggior parte sia autosomica recessiva (Copeland, 2014). Mutazioni in questo gene sono la causa più frequente di adPEO (Van Goethem, 2001). Oltre alla CPEO, le caratteristiche principali sono una disfagia e una disfonia gravi e, occasionalmente, disturbo del movimento come parkinsonismo, disfunzione cerebellare o corea (Luoma et al., 2004). Ritardo mentale, ipogonadismo (compresa la menopausa precoce) e dismotilità gastrointestinale possono essere ulteriori manifestazioni che si possono riscontrare (Luoma et al., 2004). La gravità delle sindromi varia in ogni caso in relazione al tipo di mutazione. La mutazione A467T è la mutazione più comune in *POLG* e si stima che sia presente nel 36% di tutti gli alleli associati a disordini legati a *POLG* (Tang et al., 2011). La variante A467T è comunemente associata ad AHS, PEO e ANS. Studi biochimici su questa variante hanno dimostrato un ridotto legame con il template, una minore processività ed un'attività del ~4%; inoltre, questo residuo determina una compromissione dell'interazione con la subunità accessoria p55 (Young & Copeland, 2016). La PEO è l'unico fenotipo in cui si possano trovare mutazioni autosomiche dominanti in *POLG*; la maggior parte di queste mutazioni si va a localizzare nel dominio ad attività polimerasica (Chan & Copeland, 2009). Tre delle sostituzioni, H932Y, R943H e Y955C, modificano le catene laterali che interagiscono direttamente con i dNTP. Questi enzimi mutanti mantengono meno dell'1% dell'attività della polimerasi WT e mostrano una grave diminuzione della processività (Graziewicz et al., 2004). In aggiunta, la sostituzione Y955C aumenta anche gli errori di inserimento di nucleotidi di 10-100 volte in assenza di attività 3'-5' esonucleasica (Copeland, 2008). Pertanto, grandi riduzioni dell'attività della polimerasi γ sono sufficienti a causare disfunzione mitocondriale che è alla base delle malattie legate a *POLG* (Young & Copeland, 2016).

La subunità accessoria nei mammiferi, *POLG2*, è una proteina di 55 kDa (p55) che forma un omodimero. È stato dimostrato che la funzione della subunità accessoria è quella di conferire un'elevata processività alla Pol γ aumentandone l'affinità per il DNA (Lim et al., 1999). La prima mutazione descritta (c.1352G>A; G451E) riguardava un paziente con adPEO ad insorgenza tardiva con delezioni multiple del mtDNA nel muscolo e ptosi (Longley et al., 2006). Altre sette nuove mutazioni in eterozigosi in *POLG2* sono state identificate in una coorte di 112 pazienti con sospetto coinvolgimento di *POLG*, ma privi di mutazioni in *POLG* (Young et al., 2011). Il mancato potenziamento dell'attività della subunità catalitica da parte di queste varianti mutanti causerebbe il blocco del complesso durante la replicazione del mtDNA ed è coerente con l'accumulo di delezioni del mtDNA rilevato nella PEO (Copeland, 2014).

- **2.2.2. Twinkle: elicasi mitocondriale**

L'elicasi mitocondriale Twinkle è codificata dal gene *TWNK* (anche conosciuto come *PEO1* o *C10orf2*) e, sebbene non sia l'unica elicasi mitocondriale, è l'unica necessaria per il mantenimento del mtDNA (Peter & Falkenberg, 2020). Twinkle presenta una struttura esamerica e ogni monomero di 72 kDa è composto da un dominio N-terminale (NTD) e da uno C-terminale (CTD) tenuti insieme da un'elica flessibile che funziona da linker; il dominio C-terminale è altamente conservato ed è quello che

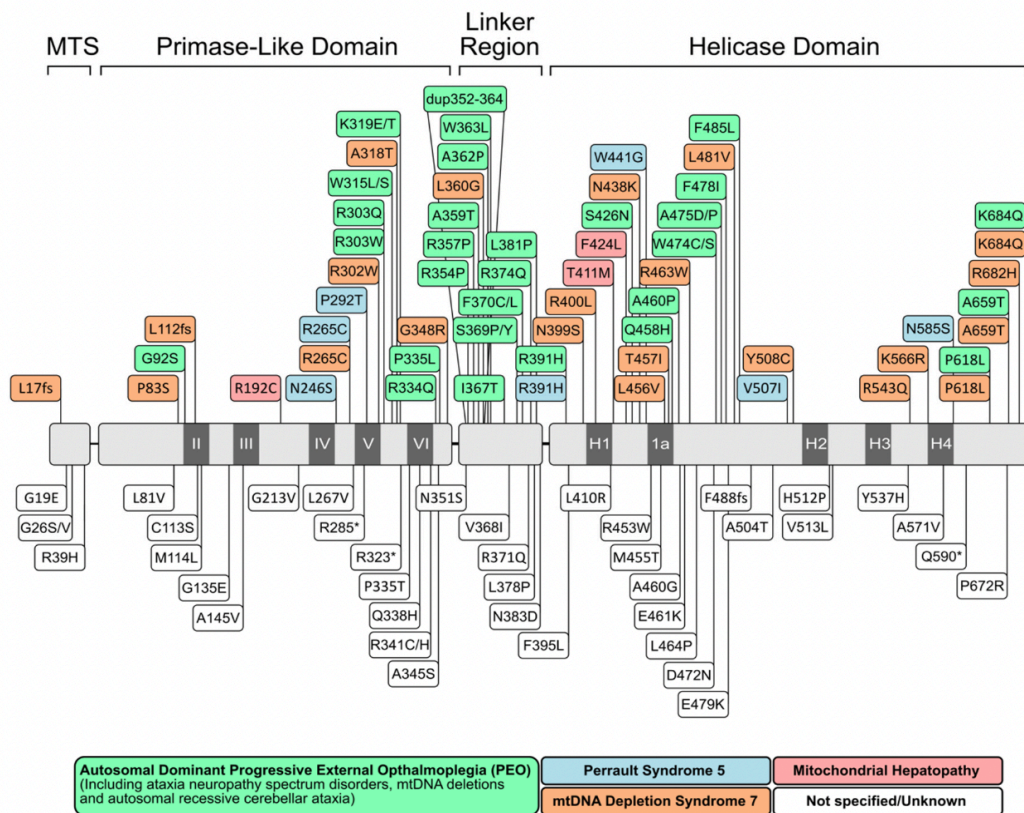


Figura 5. Mutazioni di *TWNK*: mappa delle mutazioni e polimorfismi all'interno dei domini dell'elicasi mitocondriale Twinkle (Peter & Falkenberg, 2020).

presenta attività catalitica per l'idrolisi dei nucleotidi (Peter & Falkenberg, 2020). Mutazioni in eterozigosi in questo gene sono responsabili di adPEO (Spelbrink JN, 2001), con accumulo di delezioni multiple del mtDNA. Le presentazioni cliniche includono CPEO, spesso associata a debolezza muscolare prossimale e facciale, disfagia e disfonia, lieve atassia e neuropatia periferica. Sebbene mutazioni missenso nel gene *TWNK* si associno principalmente a adPEO, sono state descritte mutazioni recessive associate ad *infantile-onset spinocerebellar ataxia* (IOSCA) ed alla

hepatocerebral mtDNA depletion syndrome (Hakonen et al., 2007). Screening del gene *TWNK* in individui con adPEO, associata a delezioni multiple del mtDNA, ha identificato undici diverse mutazioni in 12 famiglie affette (Spelbrink JN, 2001). Successivamente, sono state riportate diverse mutazioni missenso in *TWNK* associate a adPEO (Fratter et al., 2010), di cui la maggior parte si trova a livello della regione linker (**Figura 5**). Si ritiene che l'elica linker abbia un ruolo sia nella formazione della struttura esamerica che nell'attività elicastica; in accordo con il suo ruolo, mutazioni nella regione linker associate a PEO (A359T, I367T, S369P, R374Q e L381P) non permettono la formazione della struttura esamerica, vanno a ridurre l'idrolisi dell'ATP e azzerano l'attività elicastica (Peter & Falkenberg, 2020). È stato inoltre osservato che anche mutazioni a livello del dominio N-terminale vanno a ridurre drasticamente l'attività di idrolisi dell'ATP (Holmlund et al., 2009). A differenza del dominio N-terminale e dell'elica linker, è stato riportato un ristretto numero di mutazioni nel dominio C-terminale associate a PEO. Dato che il CTD è prevalentemente responsabile dell'attività dell'elicasi, le mutazioni deleterie in questo dominio si propagano raramente (Fratter et al., 2010).

- **2.2.3. RNASEH1**

RNASEH1 codifica per le isoforme nucleari e mitocondriali dell'endoribonucleasi *RNASEH1*, che idrolizza i filamenti di RNA negli ibridi RNA-DNA contenenti un tratto di almeno quattro ribonucleotidi (Cerritelli & Crouch, 2009). La *RNASEH1* è composta da quattro domini: una sequenza target mitocondriale (MTS) che dirige la proteina verso i mitocondri che viene tagliata dopo l'importazione, un dominio di legame ibrido (HBD) coinvolto nel riconoscimento di eteroduplex di DNA-RNA, un dominio catalitico responsabile del clivaggio della componente RNA nell'eteroduplex e un dominio di connessione flessibile (CD) che collega gli ultimi due domini (Reyes et al., 2015a). Mutazioni di *RNASEH1* sono state descritte in pazienti con disordini da delezione e deplezione del mtDNA associato a PEO in età adulta e delezioni multiple del mtDNA (Bugiardini et al., 2017). Tutte le sostituzioni amminoacidiche associate a malattia mitocondriale si trovano nel dominio catalitico della *RNASEH1* (Young & Copeland, 2016). Le mutazioni di *RNASEH1* rallentano e bloccano la replicazione del mtDNA, causando deplezione e delezione del mtDNA e, in ultima analisi, portano a una malattia mitocondriale clinicamente evidente (Reyes et al., 2015a). A differenza di *MGME1*, che è esclusivamente mitocondriale, *RNASEH1* e *DNA2*, sono localizzate sia nel nucleo che nei mitocondri. Tutti e tre gli enzimi sono coinvolti nella maturazione del mtDNA e possibilmente nella

sua riparazione, anche se la RNasi H1 sembra svolgere un ruolo diretto nella replicazione del mtDNA processando i primer a RNA dei filamenti nascenti (Reyes et al., 2015a). Ad oggi sono state individuate sei mutazioni di *RNASEH1* in 16 pazienti che presentavano PEO associata a ptosi, debolezza degli arti, atassia cerebellare e disfagia, con accumulo di delezioni multiple di mtDNA e aumento dei livelli di 7S DNA nel muscolo (Manini et al., 2022). Varianti bialleliche patogeniche in *RNASEH1* possono causare encefalomiopatia associata a deplezione e delezioni multiple del mtDNA a trasmissione autosomica recessiva. I soggetti colpiti, solitamente, manifestano nella prima età adulta una complessa sintomatologia caratterizzata da: ptosi, PEO, debolezza e deperimento muscolare, affaticabilità, intolleranza all'esercizio fisico, atassia, disfagia, deterioramento cognitivo, segni piramidali e debolezza della muscolatura respiratoria che si manifesta con dispnea e che può evolvere in insufficienza respiratoria. (El-Hattab et al., 2017).

- **2.2.4 DNA2**

DNA2 codifica per un enzima membro della famiglia delle elicasi/nucleasi che, molto probabilmente, è coinvolto nella replicazione del mtDNA e nel meccanismo di riparazione del mtDNA *long-patch base-excision repair* (LP-BER). L'enzima *DNA2* si localizza sia nel nucleo che nei mitocondri ed è necessario per il mantenimento del mtDNA e del DNA nucleare (Duxin et al., 2009). Varianti monoalleliche nel gene sono associate a miopatia e delezioni multiple; gli individui colpiti presentano (durante l'infanzia o la prima età adulta) i seguenti segni e sintomi: PEO, ptosi, debolezza muscolare prossimale, atrofia muscolare generalizzata e facile affaticabilità e, in alcuni casi, possono manifestarsi anche mialgia, crampi muscolari, CPK elevata e dispnea (El-Hattab et al., 2017). In una coorte di pazienti affetti da disturbi da delezione del mtDNA con insorgenza in età infantile e adulta sono state identificate mutazioni in *DNA2* (Ronchi et al., 2013). I pazienti coinvolti in questo studio presentano delezioni multiple del mtDNA e fibre muscolari COX-negative, mutazioni in eterozigosi di *DNA2* associate a difetti molecolari e istochimici tipici della malattia da delezione (Ronchi et al., 2013).

Le mutazioni missenso in *DNA2* producono spesso un effetto dannoso su più domini, compromettendo sia l'attività nucleasica che ATPasica. Anche le altre varianti identificate in un secondo momento vanno a coinvolgere il domino nucleasico ed elicasico influenzando sia l'attività nucleasica che ATPasica (Ronchi et al., 2019).

- **2.3. Pool dei nucleotidi**

In aggiunta agli enzimi che fanno parte del replisoma, la sintesi del mtDNA si svolge continuamente durante il ciclo cellulare, richiedendo costante apporto di dNTPs, tanto che la velocità e qualità della replicazione del mtDNA risultino particolarmente sensibili a un deficit di nucleotidi. La sintesi dei nucleotidi all'interno dei mitocondri avviene per mezzo della via di salvataggio, grazie alla quale deossinucleosidi preesistenti vengono convertiti in dNTPs all'interno della matrice mitocondriale e anche grazie all'import di dNTPs dal citosol verso la matrice mitocondriale grazie a specifici trasportatori (El-Hattab & Scaglia, 2013). Vengono di seguito riportate alcuni delle proteine coinvolte nel mantenimento del pool dei nucleotidi nel mtDNA implicate nei meccanismi di formazione delle delezioni.

- **2.3.1. SLC25A4 (ANT1)**

ANT1 o adenine nucleotide translocator 1, codificato dal gene *SLC25A4*, è un membro di una famiglia di molecole adibite al trasporto di membrana ampiamente espresse nella membrana mitocondriale interna. *ANT1* forma un canale che trasporta l'ADP all'interno del mitocondrio e l'ATP al di fuori per poi essere utilizzato come energia per la cellula; questa proteina sembra essere anche un componente del *mitochondrial permeability transition pore*, la cui formazione rappresenta una fase importante dell'apoptosi (Simoncini et al., 2017). *ANT1* è altamente espresso nel muscolo scheletrico, cardiaco e anche nel cervello (Stepien et al., 1992). Difetti in questa proteina provocano una carenza e uno squilibrio di nucleotidi mitocondriali che portano ad un'alterata sintesi del mtDNA, con conseguente deplezione e delezioni multiple del mtDNA. Mutazioni nel gene *SLC25A4* sono state dapprima identificate in pazienti con adPEO (Kaukonen et al., 2000). Il decorso dell'adPEO è relativamente benigno e i sintomi sono generalmente limitati al muscolo scheletrico, *ANT1*, infatti, è la principale isoforma del trasportatore ADP/ATP nei mitocondri del muscolo scheletrico. È stata successivamente riportata una mutazione recessiva nel gene *SLC25A4* che, sebbene all'interno di un quadro caratterizzato da difetti biochimici e accumulo di delezioni multiple nel muscolo, è stata associata ad un fenotipo definito da cardiomiopatia ipertrofica, lieve miopatia con intolleranza all'esercizio fisico e acidosi lattica, in assenza di PEO (Palmieri et al., 2005).

- **2.3.2. *DGUOK***

La deossiguanosina chinasi (dGK), codificata dal gene *DGUOK* (cromosoma 2p13), è l'enzima che catalizza la prima reazione della via di salvataggio delle purine nella matrice mitocondriale. È necessaria per il mantenimento del pool di dNTP mitocondriali e la sua carenza comporta un'alterata sintesi di dNTP con conseguente deplezione del mtDNA (Montano et al., 2019). I fenotipi associati a mutazioni di questo gene sono più frequentemente rappresentati da sindrome da deplezione del mtDNA (tipo epatocerebrale) (Mandel et al., 2001) ed ipertensione portale non cirrotica (Vilarinho et al., 2016) e, meno frequentemente, da oftalmoplegia esterna cronica progressiva (CPEO) con delezioni del mtDNA (Ronchi et al., 2012). Mutazioni autosomiche recessive di *DGUOK* sono state per prima descritte in neonati o bambini piccoli con grave encefalopatia associata a insufficienza epatica e deplezione del DNA mitocondriale epatico che spesso porta a morte prematura (Mandel et al., 2001). In seguito, sono stati identificati cinque pazienti con delezioni multiple e mutazioni autosomiche recessive nel gene *DGUOK*, con caratteristiche neuromuscolari eterogene, riportando per la prima volta il ruolo di *DGUOK* nella patogenesi dei disordini dell'adulto, associati a instabilità e delezioni multiple del DNA mitocondriale nel muscolo scheletrico (Ronchi et al., 2012). È stato successivamente ancora riportato il ruolo di *DGUOK* in due famiglie nel coinvolgimento multi-sistemico con CPEO, miopatia mitocondriale, parkinsonismo e delezioni del mtDNA (Caporali et al., 2018).

- **2.3.3. *TYMP***

La timidina fosforilasi (TF) è un enzima citosolico, codificato dal gene *TYMP*, coinvolto nella via di salvataggio dei nucleotidi e nel riciclo delle basi pirimidiniche che regola la disponibilità di timidina per la biosintesi del DNA. La TF catalizza la fosforilazione reversibile della timidina o deossitimidina e della deossiuridina in 2-deossiribosio 1-fosfato e nelle rispettive basi, timina e uracile (Nishino et al., 1999). Mutazioni nel gene *TYMP* sono responsabili dello sviluppo della Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE), un raro disordine autosomico recessivo associato a delezioni multiple del mtDNA nel muscolo scheletrico (Nishino et al., 1999). Nell'uomo la timidina fosforilasi è abbondantemente espressa nelle cellule del sangue (piastrine, macrofagi, linfociti periferici, cellule stromali e reticolociti), nel fegato, nei polmoni, nel cervello e nei tessuti

del tratto digestivo; non è invece espressa nel muscolo scheletrico, nei reni, e nel tessuto adiposo (Fox et al., 1995). Sebbene la timidina fosforilasi non sia fisiologicamente espressa nel muscolo scheletrico, il muscolo di pazienti con MNGIE mostra alterazioni del mtDNA e difetti enzimatici della catena respiratoria (Nishino et al., 1999). Ad oggi si attribuisce il coinvolgimento del tessuto scheletrico presumibilmente ad un accumulo a livello sistemico dei nucleosidi pirimidinici, piuttosto che ad un'assenza dell'attività della TF (Pacitti et al., 2018). La sintomatologia clinica della MNGIE comprende dismotilità gastrointestinale e cachessia, oftalmoplegia con ptosi, neuropatia periferica, miopatia e leucoencefalopatia (El-Hattab et al., 2017). L'esordio della malattia avviene solitamente tra la prima e la quinta decade di vita, con un'età media di esordio di 18 anni. La dismotilità gastrointestinale progressiva è causata principalmente dalla miopatia enterica e si sviluppa in tutti gli individui affetti. Inoltre, circa la metà dei soggetti colpiti presenta anche una neuropatia assonale. I sintomi neuropatici comprendono parestesie e debolezza che di solito è asimmetrica, inizialmente distale e che colpisce le estremità inferiori più di quelle superiori (El-Hattab et al., 2017). La leucoencefalopatia è un'altra caratteristica comune, ma di solito è asintomatica. La malattia è progressiva, con una prognosi infausta e un'età media di morte di circa 35 anni.

3. Meccanismi di formazione delle delezioni

- **3.1. Replication-slippage mechanism**

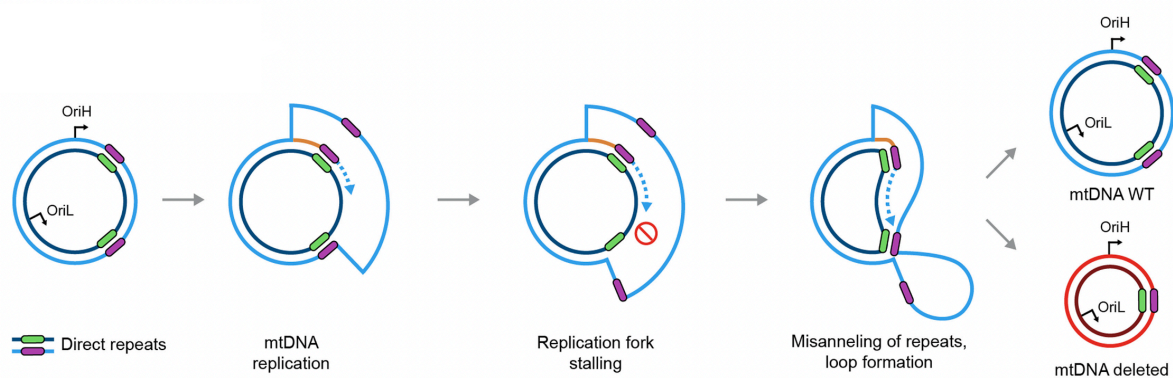


Figura 6. *mtDNA replication slippage: si ipotizza che lo stallo della forza di replicazione promuova l'errato allineamento di regioni di mtDNA a singolo filamento contenenti direct repeats. Il loop generato durante la replication slippage viene estruso dalla molecola di mtDNA, dando luogo a delezioni (Fontana & Gahlon, 2020).*

Il fatto che la maggior parte delle delezioni del mtDNA si verifichi all'interno dell'arco maggiore, tra OriH e OriL, potrebbe indicare che meccanismi simili siano coinvolti nella formazione di queste delezioni. Il primo meccanismo che descrive la formazione delle delezioni è quello utilizzato per spiegare la formazione della *common deletion* osservata in pazienti con KSS (Shoffner et al., 1989). Nella *common deletion*, due *direct repeats* di 13 bp fiancheggiano il *breakpoint* della delezione con una sola delle ripetizioni mantenuta all'interno del costrutto, suggerendo così un *replication-slippage*. Si ipotizza che durante la sintesi del nuovo filamento, a causa di una rottura del parental heavy-strand a singolo filamento, la *direct repeats* al 3' del parental heavy strand si vada ad appaiare alla *direct repeats* al 5' del parental light-strand, che si avvicinano tra loro a causa di riarrangiamenti durante la sintesi del nuovo heavy-strand (**Figura 6**) (Shoffner et al., 1989). La successiva sintesi a partire da OriL ometterebbe il tratto tra il *breakpoint* e le ripetizioni accoppiate, generando una delezione. Si ipotizza che lo stallo della forca di replicazione promuova l'errato appaiamento di regioni di mtDNA a singolo filamento contenenti *direct repeats*; il loop generato durante il *replication-slippage* viene estruso dalla molecola di mtDNA, dando luogo così a delezioni (Fontana & Gahlon, 2020). Lo stallo della forca di replicazione sembra essere una conseguenza comune di vari difetti dei componenti del replisoma che precludono la rottura del heavy-strand, innescando direttamente la formazione delle delezioni. Tuttavia, nel caso delle delezioni primarie, l'origine delle rotture è ancora poco chiara, poiché tutti i componenti del replisoma sono presumibilmente funzionali (Oliveira et al., 2020). Numerose evidenze hanno portato a credere che il *replication-slippage mechanism* sia il meccanismo alla base della generazione delle delezioni del mtDNA; tuttavia, ci sono alcuni dubbi a riguardo. Ad esempio, affinché si possa applicare questo meccanismo, è necessaria l'esposizione di un singolo filamento durante la replicazione, e questo è possibile solamente se si considera come meccanismo di replicazione quello della replicazione asincrona, ma non sarebbe valido per gli altri meccanismi di replicazione proposti. Inoltre, questo meccanismo di formazione delle delezioni spiegherebbe le delezioni di classe I e II, ma non la generazione di delezioni di classe III, in quanto non si osserva la presenza di sequenze ripetute a livello dei *breakpoint* della delezione (Chen et al., 2011).

- **3.2. Copy-choice mechanism**

Più recentemente è stato proposto un altro meccanismo di formazione delle delezioni, il *copy-choice mechanism* (Persson et al., 2019), già osservato in precedenza in E.coli. Secondo questo meccanismo la formazione delle delezioni avverrebbe durante la sintesi del *lagging-strand* del DNA, quando il filamento stampo si trova nella sua forma a single strand (Albertini et al., 1982). Nei mitocondri la sintesi del light-strand avviene in maniera analoga a quanto accade nella *lagging-strand replication*, utilizzando come template il parental heavy strand a singolo filamento. La sintesi dell'light-strand, a partire da OriL, vede un lungo tratto dell'heavy-strand nella forma a singolo filamento, che può essere particolarmente incline alla *copy-choice ricombination* in quanto le sequenze ripetute sono più esposte (**Figura 7**). Strutture secondarie nel mtDNA possono avvicinare

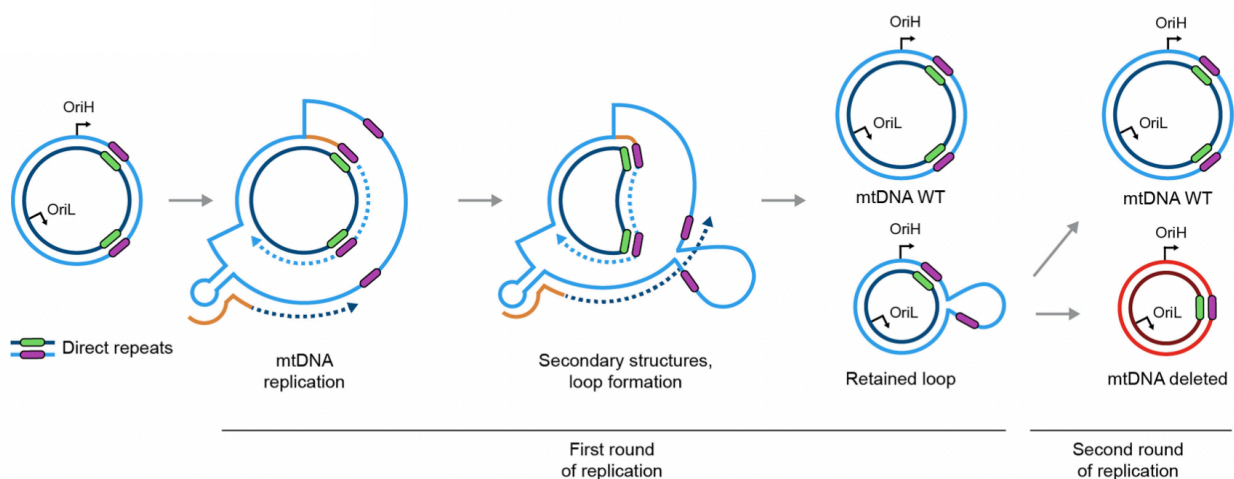


Figura 7. Copy-choice mechanism: durante la replicazione, le regioni a singolo filamento esposte, contenenti ripetizioni dirette potrebbero formare strutture secondarie e loop. Le sequenze comprese in questa conformazione aberrante del mtDNA vengono eliminate durante il secondo ciclo di replicazione (Fontana & Gahlon, 2020).

due sequenze ripetute e se durante la sintesi della prima sequenza ripetuta la Poly si dissociasse dal template, l'estremità 3' del nuovo filamento si potrebbe distaccare dal parental heavy-strand ed appaiarsi erroneamente ad una seconda sequenza ripetuta più a valle sullo stesso filamento (**Figura 7**). Quando la Poly riprende la sintesi del light strand, a partire dall'estremità 3' riappaiata, una ripetizione ed un tratto di sequenza verrà perso. In questo modo si forma una molecola heteroduplex che, quando verrà utilizzata come template per il secondo ciclo di sintesi del mtDNA, porterà alla formazione di una molecola di mtDNA completa ed una molecola contenente una delezione. Questo meccanismo di formazione richiede solo il macchinario di replicazione mitocondriale ed è

indipendente dai meccanismi di riparazione, è stimolato, inoltre, dalla presenza di sequenze ripetute sia più lunghe che più corte, ma anche dall'assenza di ripetizioni, andando così a spiegare la formazione delle delezioni di classe III (Persson et al., 2019).

Il *copy-choice mechanism* dimostra il perché le delezioni si formino prevalentemente a livello dell'arco maggiore. Durante la replicazione, secondo il modello dello *strand-displacement*, un lungo tratto di sequenza dell'heavy-strand si trova in forma di singolo filamento; questo costituisce un rischio poiché, se la Poly si blocca e si dissocia durante la sintesi del light-strand, si creano molte opportunità di ricombinazione con regioni a valle dell'heavy-strand esposto. La ricombinazione è una conseguenza del rilascio temporaneo della Poly dal template, quindi, è facile capire perché il processo sia stimolato da tutto ciò che compromette la processività della replicazione del mtDNA, ad esempio da mutazioni in proteine necessarie per la replicazione del mtDNA o per il mantenimento di un corretto pool di nucleotidi mitocondriali. Pertanto, varianti patogene nei geni del replisoma (*POLG*, *TWINK*, *TOP3A*) o in geni coinvolti nel trasporto dei nucleotidi (*ANT1*), possono tutte stimolare la formazione di delezioni (S. Wanrooij & Falkenberg, 2010).

- **3.3. Formazione di frammenti lineari deleti**

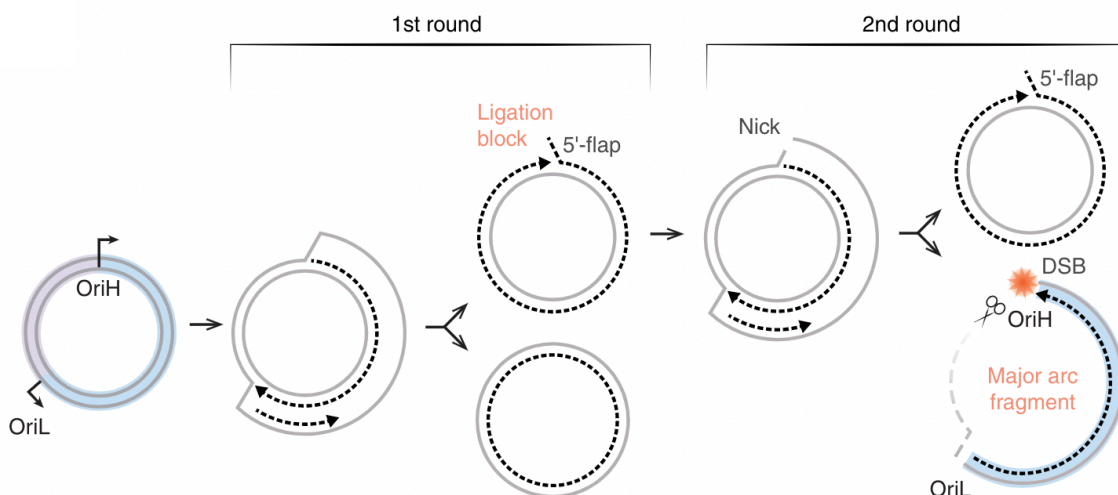


Figura 8. Formazione di frammenti lineari: mutazioni in *MGME1* o la perdita dell'attività 3'-5' esonucleasica della Poly possono portare alla formazione di frammenti lineari del mtDNA corrispondenti alla regione dell'arco maggiore compresa tra OriH ed OriL (Falkenberg & Gustafsson, 2020).

In aggiunta alla presenza di delezioni circolari sono state osservate anche delezioni lineari del mtDNA. Mutazioni nel gene che codifica per la nucleasi *MGME1* portano alla formazione di frammenti lineari del mtDNA, che corrispondono alla regione compresa tra OriH ed OriL (Nicholls et al., 2014). Poiché questi frammenti mancano delle origini di replicazione, non possono replicarsi e vengono perciò prodotti *de novo*. La formazione di questi frammenti deleti del mtDNA può essere spiegata dallo *strand-displacement model*. Come menzionato precedentemente, l'attività della nucleasi *MGME1* e l'attività esonucleasica della Poly lavorano insieme per produrre dei nick ligabili durante la terminazione della replicazione dell'heavy-strand del mtDNA (Uhler et al., 2016). Mutazioni a carico dei geni *MGM1* o la perdita dell'attività 3'-5' esonucleasica della Poly possono impedire la formazione di estremità ligabili a livello di OriH, lasciando così un nick nell'heavy-strand (**Figura 8**). Durante il round successivo della replicazione, la prima fase di sintesi dell'heavy-strand procede indisturbata in quanto il template risulta intatto, invece la sintesi a partire da OriL utilizzerà come template il filamento dell'heavy-strand con il nick e pertanto si avrà una terminazione prematura della sintesi all'altezza di OriH, con formazione di un filamento lineare delecto (**Figura 8**) (Falkenberg & Gustafsson, 2020). La regione di ssDNA verrà degradata, lasciando solamente un filamento lineare di dsDNA rappresentativo dell'intero arco maggiore del mtDNA.

- **3.4. Riparo del mtDNA e formazione delle delezioni**

Rispetto ai meccanismi che regolano la replicazione del mtDNA, le vie ed i meccanismi di riparazione del DNA nei mitocondri sono poco caratterizzati e risolti rispetto alla riparazione del DNA nucleare. Tuttavia, sta diventando sempre più evidente l'attività di riparazione del DNA da parte dei mitocondri, anche se con differenze chiave rispetto alle vie nucleari. Mentre il DNA nucleare è salvaguardato da un controllo orientato verso la riparazione, le molecole di mtDNA vengono o riparate o degradate (Fontana & Gahlon, 2020). È stata avanzata l'ipotesi che alla base della formazione delle delezioni nel mtDNA entrino in gioco i meccanismi di riparo dei double-strand breaks (DSBs) (Krishnan et al., 2008). Nelle cellule di mammifero i DSBs nel mtDNA si possono verificare a causa di radiazioni ionizzanti o da un blocco nella replicazione (Haber J.E., 2000). Esistono due vie di riparo dei DSBs: la ricombinazione omologa e la *nonhomologous end-join* (NHEJ). Durante la ricombinazione omologa, le estremità dei DSBs sono suscettibili all'azione 3'-5' esonucleasica, in questo modo le ripetizioni omologhe saranno in grado di appaiarsi e le due

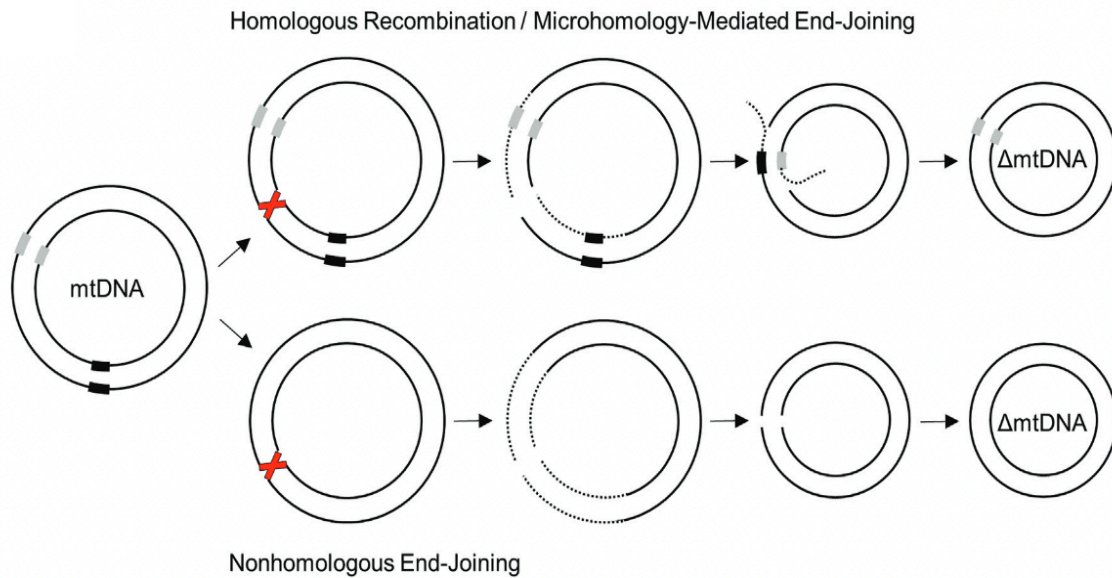


Figura 9. Ricombinazione omologa e NHEJ: questi meccanismi di formazione delle delezioni sono avviati da una rottura del doppio filamento (indicata da una X rossa), che si verifica prevalentemente nella regione tra le due origini di replicazione. L'escissione di entrambi i filamenti pesanti e leggeri in direzione 3'-5' (linee tratteggiate) consente l'appaiamento delle regioni fiancheggiatrici complementari (riquadri grigi e neri). In questo modo l'escissione delle estremità e la successiva ligazione generano una molecola di mtDNA figlia che porta la delezione e conserva una regione di affiancamento (pannello superiore). Si è ipotizzato che le delezioni del mtDNA di classe III si formino attraverso la nonhomologous end-joining di molecole lineari (pannello inferiore), che tutt'oggi rimangono non caratterizzate (Oliveira et al., 2020).

estremità rimanenti a singolo filamento saranno degradate, formando così una molecola di mtDNA deleta (**Figura 9**). Nel meccanismo NHEJ, invece, avverrebbe il riallineamento delle estremità blunt-end dei DSBs, spiegando così anche la formazione delle delezioni che non implicano la presenza di ripetizioni (classe III; **Figura 9**). (Fukui & Moraes, 2009). Mentre i meccanismi di riparo dei DSBs sono ancora poco studiati, il legame tra i DSBs non riparati e la formazione delle delezioni è ormai già noto (Nissanka & Moraes, 2018). La rapida rimozione delle molecole di mtDNA danneggiate potrebbe essere considerata una compensazione per la mancanza di una riparazione efficiente dei DSBs, nonché un meccanismo che limita il potenziale mutageno derivante da tentativi improduttivi di riparazione delle rotture del mtDNA. In effetti, a causa della natura eteroplasmica del mtDNA, la ricerca dell'omologia necessaria per avviare la ricombinazione potrebbe promuovere eventi di ricombinazione erronei, portando a delezioni (Fontana & Gahlon, 2020).

- **3.5. Altri fattori implicati**

La composizione degli acidi nucleici, comprese le ripetizioni, strutture non canoniche e danni, giocano un ruolo fondamentale nei meccanismi di formazione delle delezioni del mtDNA. Sulla base della sequenza dei *breakpoint*, le delezioni del mtDNA possono essere classificate in base alla presenza o all'assenza di ripetizioni nelle loro regioni fiancheggianti. Analizzando il database online Mitomap (<https://www.mitomap.org/MITOMAP>), è stato calcolato che il 69% delle delezioni riportate risulta fiancheggiato da *direct repeats* nei *breakpoint* della delezione, con una ripetizione incorporata nel costrutto; invece, le ripetizioni indirette sono riportate nell'1% delle delezioni e il restante 30% dei casi riguarda delezioni che non presentano alcuna sequenza ripetuta (Fontana & Gahlon, 2020). La presenza di ripetizioni ha fatto ipotizzare che la formazione di delezioni derivi o da un mispairing durante la replicazione o dalla riparazione del DNA danneggiato (Krishnan et al., 2008). Nei riarrangiamenti del mtDNA, i *breakpoint* al 5' hanno una tipica distribuzione con un massimo intorno a 8-9 kb, mentre i *breakpoint* al 3' sono preferibilmente raggruppati sopra le 13 kb (Samuels et al., 2004). Questa distribuzione ha portato a pensare all'esistenza di un meccanismo unico e simile coinvolto nella formazione di tutte le delezioni del mtDNA, indipendentemente dai *breakpoint* della delezione (Samuels et al., 2004). In seguito, un'analisi computazionale ha confutato l'ipotesi proposta precedentemente, dimostrando essenzialmente che la distribuzione delle delezioni negli individui privi della coppia di ripetizioni di 13 bp, tipica della *common deletion*, è sostanzialmente la stessa di quella riscontrata nei campioni di controllo che la contengono (X. Guo et al., 2010). In alternativa, suggeriscono che le delezioni si formino preferenzialmente attraverso la formazione di segmenti distanti di mtDNA in grado di formare duplex stabili. Secondo questo punto di vista, dopo la formazione del duplex, la delezione si verificherà in una delle numerose *direct repeats* disponibili nelle vicinanze (X. Guo et al., 2010). È stato anche osservato che i *breakpoint* delle delezioni più frequenti si verificano all'interno o in prossimità di regioni che mostrano conformazioni non canoniche (Lakshmanan et al., 2012), dimostrando il ruolo delle strutture secondarie nel meccanismo di formazione delle delezioni.

Il genoma mitocondriale è costituito da un heavy-strand ricco in guanina e da un light-strand complementare, ricco in citosina. A causa della sua natura chimica, il filamento ricco di guanina (G-rich) è incline a formare del DNA G-quadruplex (G4), una struttura alternativa del DNA caratterizzata da pile planari di quattro guanine che interagiscono mediante legami idrogeno Hoogsteen. Il DNA G4 è poi stabilizzato da un catione monovalente (tipicamente Na⁺ o K⁺) che risiede nel barilotto

centrale della struttura a quadruplex. L'analisi dei *breakpoint* delle delezioni nelle malattie umane ha mostrato un'associazione con il potenziale di formazione di strutture G4 in PEO, KSS, PS, in vari tipi di cancro e nell'invecchiamento (Bharti et al., 2014). La presenza di G4 nel mtDNA suggerisce poi un ruolo potenziale nel compromettere la processività della replicazione del DNA attraverso lo stallo della forca di replicazione (Bharti et al., 2014). Diventa sempre più chiaro che nessuna delle teorie proposte finora sia abbastanza ampia da spiegare tutte le varianti degli spettri mutazionali e che sia necessario, quindi, avviarsi collettivamente verso una visione multifattoriale dell'instabilità del mtDNA umano.

4. Disordini da delezione del mtDNA

- **4.1. CPEO**

La condizione di external progressive ophthalmoplegia (PEO), caratterizzata da una ptosi bilaterale progressiva e da una riduzione diffusa e simmetrica della motilità oculare, rappresenta un dato clinico descrittivo piuttosto che una diagnosi. Quando si presenta isolatamente viene spesso definita chronic external progressive ophthalmoplegia (CPEO). La PEO si presenta frequentemente in concomitanza con altri sintomi da disfunzione mitocondriale (sindrome CPEO plus) o come una caratteristica di una definita citopatia mitocondriale sistemica (McClelland et al., 2016). La ptosi progressiva è di solito la caratteristica più evidente, che spesso porta alla graduale acquisizione di una posizione compensativa della testa con il mento verso l'alto. La ptosi si manifesta quasi sempre prima o contemporaneamente all'oftalmoparesi che passa inosservata sia dal paziente che dall'esaminatore meno esperto (Petty et al., 1986). Mentre le sequele neuro-oftalmiche oculomotorie sono predominanti nella PEO, la retinopatia e la neuropatia ottica possono verificarsi e sono importanti dal punto di vista diagnostico; la retinopatia pigmentosa è una caratteristica distintiva della sindrome di Kearns-Sayre (KSS), che include la PEO. Pazienti con CPEO (che non rientrano nei criteri diagnostici della KSS) possono anche presentare una retinopatia pigmentosa, spesso descritta come retinopatia "salt and pepper": presenta un pattern a chiazze di aggregazione dell'epitelio pigmentato retinico (RPE) alternato ad aree prive di RPE normale (Mullie et al., 1986). La retinopatia pigmentosa solo raramente causa una grave perdita della vista e la maggior parte dei pazienti conserva un'acuità e campi visivi normali o quasi normali. La PEO è caratterizzata da una notevole

eterogeneità genetica, si presenta come sporadica in circa il 50% dei casi ed è associata a delezione singola de novo del mtDNA. Prima della diffusa disponibilità di test genetici mitocondriali, l'atrofia ottica è stata occasionalmente riportata in associazione alla retinopatia pigmentosa associata a PEO e alla disfunzione del sistema nervoso centrale (Mullie et al., 1985). È ora dimostrato che le mutazioni del gene *OPA1*, note per causare atrofia ottica dominante (DOA), possono anche causare un sottogruppo di sindromi CPEO plus con atrofia ottica (Yu-Wai-Man et al., 2010). La PEO caratterizzata da delezione singola del mtDNA può presentare un'ampia espressione fenotipica che va dalla CPEO alla KSS, fino alla sindrome di Pearson caratterizzata da insufficienza midollare e pancreatica. Nel restante 50% dei casi la PEO si presenta come un disordine ereditato per via autosomica dominante, autosomica recessiva o per trasmissione materna (McClelland et al., 2016). Nei pazienti con adPEO, i sintomi possono iniziare dalla prima infanzia o anche in tarda età adulta. Le mutazioni in geni codificati dal DNA nucleare possono causare adPEO, tra cui *POLG*, *POLG2*, *ANT1*, *TWNK*, *RRM2B*, *DNA2*, con *POLG* che è il più comune. In queste patologie, la PEO può presentarsi isolatamente o più frequentemente come parte di una sindrome CPEO plus, che si manifesta con demenza, parkinsonismo, atassia spinocerebellare, mioclono, disartria e debolezza bulbare, crisi epilettiche con predominanza occipitale, polineuropatia sensoriale atassica, ipogonadismo (sindrome di Perrault) o insufficienza epatica grave/fatale a esordio infantile (Alpers syndrome). La sindrome CPEO plus si osserva più spesso nelle mutazioni di *POLG*, ma può verificarsi anche nelle mutazioni di *ANT1* o *TWNK*. Meno comune è la arPEO dovuta a mutazioni nei geni *TYMP*, *POLG*, *DGUOK*, *TK2*, *MGME1* e *RNASEH1*. Le mutazioni recessive nei geni nucleari possono portare a delezioni multiple del mtDNA o influenzare la stabilità del mtDNA e causare deplezione. In questi disturbi la PEO non è tipicamente una sindrome isolata, ma piuttosto parte di una sindrome più complessa come la MNGIE (miopatia, neuropatia, sindrome gastrointestinale, encefalopatia) causata da mutazioni di *TYMP* (Nishino et al., 1999), sensory ataxic neuropathy, dysarthria, and ophthalmoparesis (SANDO) causata da mutazioni di *POLG* (Hanisch et al., 2015), l'insufficienza epatica, la raddomiolisi o la sindrome del motoneurone inferiore (*DGUOK*), la miopatia prossimale con insufficienza respiratoria (*MGME1*) (Kornblum et al., 2013) o intolleranza all'esercizio con encefalopatia (*RNASEH1*) (Reyes et al., 2015b). L'età di insorgenza in queste condizioni è tipicamente più giovane (<20 anni). La PEO, quindi, è un sintomo miopatico della malattia mitocondriale che si manifesta in una moltitudine di sindromi cliniche diverse. Lo spettro della PEO, quindi, è estremamente ampio in termini di età di insorgenza, gravità, ereditarietà, mutazioni genetiche causali e caratteristiche cliniche associate.

- **4.2. Kearns-Sayre Syndrome (KSS)**

La sindrome di Kearns-Sayre (KSS), è una patologia mitocondriale (CPEO plus) descritta per la prima volta da Kearns e Sayre nel 1958, con una prevalenza di ~1-3 su 100.000 individui (L. Guo et al., 2020). Nei pazienti con KSS l'insorgenza della malattia avviene di solito prima dei 20 anni di età ed è caratterizzata da una tipica triade clinica: CPEO accompagnata da ptosi, retinopatia pigmentosa e almeno un sintomo tra anomalie della conduzione cardiaca (che può portare a blocco cardiaco), atassia cerebellare e/o elevata concentrazione di proteine nel liquido cerebrospinale (Nlm Citation: Goldstein et al., 2003). Altre manifestazioni cliniche possono includere debolezza muscolare, compromissione delle funzioni intellettive e cognitive, ipoacusia neurosensoriale e neuropatia periferica, varie anomalie endocrine, anomalie nefropatiche e dentali (L. Guo et al., 2020). A differenza della CPEO, che presenta un'alta percentuale di mutazioni a trasmissione autosomica, la KSS è sporadica nel 90% dei casi e associata a delezioni del mtDNA. Le delezioni variano in dimensioni e abbondanza tra gli individui affetti, ma mtDNA deleto di una determinata lunghezza è presente in ogni individuo; nel 90% dei casi la KSS è causata da delezioni singole *de novo* del mtDNA che si originano a livello delle cellule germinali durante lo sviluppo embrionale e possono andare da 1,1 kb a 10 kb (Nlm Citation: Goldstein et al., 2003). La *common deletion* nel mtDNA (m.8470_13446del4977) è presente in circa un terzo degli individui affetti. Esiste una sovrapposizione tra le sindromi CPEO e CPEO-plus (compresa la KSS) causate da delezioni comuni del mtDNA, che si ipotizza siano il risultato di un'eteroplasma diversa nei vari tessuti. Si ritiene che la tempistica nella formazione della delezione del mtDNA durante lo sviluppo svolga un ruolo importante nella distribuzione tissutale dei mitocondri colpiti, in quanto la delezione che causa la KSS si verifica più precocemente rispetto alla CPEO e di conseguenza colpisce più sistemi di organi (Kisilevsky et al., 2020).

- **4.3. Pearson Syndrome (PS)**

La sindrome di Pearson è una rara citopatia mitocondriale multiorgano che deriva da un sistema OXPHOS difettoso causato da delezioni del DNA mitocondriale (Maria Manea et al., 2009). La PS è stata descritta per la prima volta nel 1979 da Howard Pearson come un disturbo caratterizzato da anemia sideroblastica refrattaria con vacuolizzazione dei precursori midollari e disfunzione

pancreatica esocrina (Pearson et al., 1979). Solo successivamente la PS è stata associata a delezione del mtDNA (Rötig et al., 1988). La prevalenza della PS è di circa 1: 1.000.000 e ad oggi sono stati segnalati meno di 150 casi in tutto il mondo (Farruggia et al., 2016). Sebbene la stragrande maggioranza dei casi di PS sia sporadica e causata da un evento mutazionale somatico durante lo sviluppo embrionale precoce, ci sono alcune segnalazioni di madri con CPEO che hanno avuto figli con PS (Chinnery et al., 2004). La PS è una malattia mitocondriale primaria unica nel suo genere che si presenta tipicamente con una grave anemia ipoproliferativa nella prima infanzia, seguita da sintomi progressivi e disfunzioni multiorgano, tra cui acidosi lattica, insufficienza pancreatica, tubulopatia renale, difetti nella crescita, ipotonia muscolare e disturbi endocrini (Yoshimi et al., 2022). È interessante notare che circa due terzi dei pazienti con PS vanno incontro a risoluzione spontanea dell'anemia, ma diventano dipendenti dalle trasfusioni durante il decorso clinico. Gli approcci terapeutici sono finora solo sintomatici e i pazienti con PS hanno una prognosi infausta: la maggior parte dei pazienti muore prima dei 6 anni di età (Yoshimi et al., 2022). La PS è causata da delezioni singole mtDNA di dimensioni da 1,5 kb a 8,0 kb con localizzazione variabile; circa il 40-50% dei pazienti con PS è portatore della *common deletion* con una lunghezza di 4977 bp (Rotig et al., 1995b). È stato ipotizzato che quantità diverse di mtDNA delecto nei diversi tessuti siano la causa principale dei diversi tipi di malattia: pazienti con PS possono avere una proporzione più alta di mtDNA delecto nei vari tessuti rispetto a quelli che si presentano nella KSS o CPEO (Mcshane et al., 1991). Il recupero ematologico nella PS può essere dovuto a una selezione positiva delle cellule staminali ematopoietiche (HSC) che ospitano una bassa quantità di mtDNA delecto; a differenza delle cellule ematopoietiche, il mtDNA delecto può accumularsi nel tempo in tessuti come i muscoli, dando luogo allo sviluppo delle complicanze neuro-muscolari osservate nella KSS (Yoshimi et al., 2022).

5. Next Generation Sequencing (NGS)

Il sequenziamento di nuova generazione descrive collettivamente gli approcci di sequenziamento che hanno ridotto tempi e costi, aumentando enormemente la produzione di sequenze se comparati al metodo Sanger. La tecnologia NGS è caratterizzata dall'esecuzione di milioni o miliardi di reazioni di sequenziamento che avvengono simultaneamente in un processo denominato *sequenziamento massivo in parallelo*. Queste tecnologie hanno dimostrato di essere estremamente utili nel campo della genetica medica sia tramite il sequenziamento di geni target che mediante il sequenziamento dell'intero genoma (WGS). Negli ultimi anni, il settore del sequenziamento è stato dominato dalla tecnologia di Illumina, che adotta un approccio di sequenziamento per sintesi (SBS).

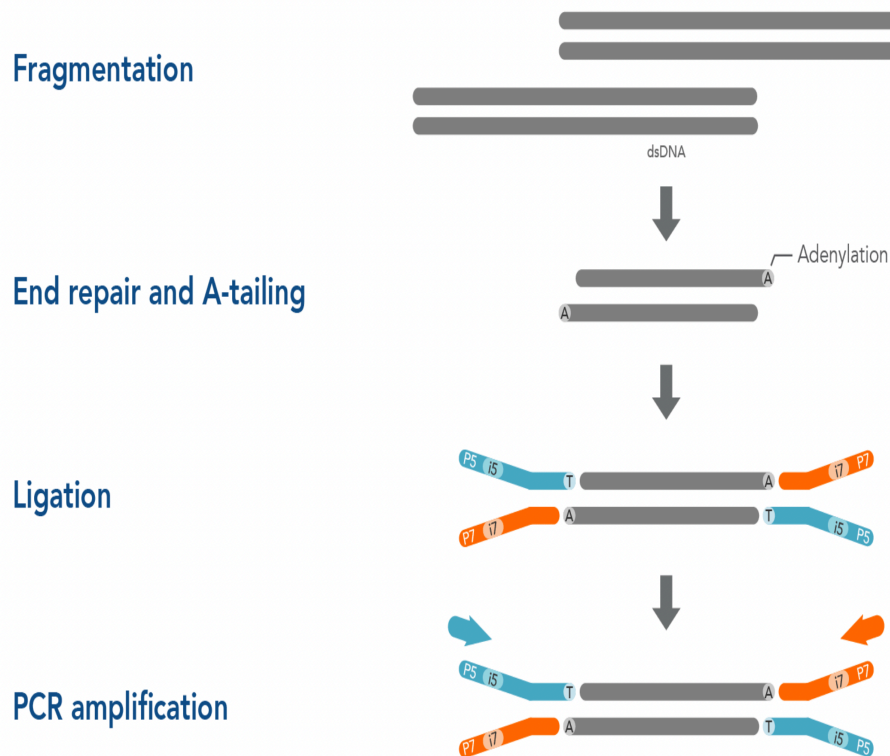


Figura 10. NGS workflow: Frammentazione del gDNA, riparazione delle estremità e aggiunta di una coda di A, ligazione di UMI-UDI index, amplificazione in PCR.

- **5.1. NGS – Principi**

Il workflow NGS per il sequenziamento di DNA target, compatibile con la piattaforma Illumina, include la preparazione di una libreria, target enrichment e sequenziamento. La preparazione della libreria inizia a partire da DNA genomico (gDNA) e dalla formazione di corti frammenti, che verranno poi sequenziati e che presentano ad entrambe le estremità degli specifici oligonucleotidi che funzionano da barcode e da adapter. La frammentazione del gDNA avviene in maniera enzimatica ed è seguita dal riparo enzimatico delle estremità dei frammenti e dall'aggiunta di una coda di adenina (**Figura 10**). I frammenti così ottenuti possono essere ligati ai full-length adapters, che includono dei barcodes oligonucleotidici per identificare i singoli campioni in maniera univoca e permettere il legame della library sulla flow cell dello strumento. Le librerie possono quindi essere amplificate mediante PCR qualora necessario per avere sufficiente materiale da sequenziare (**Figura 10**).

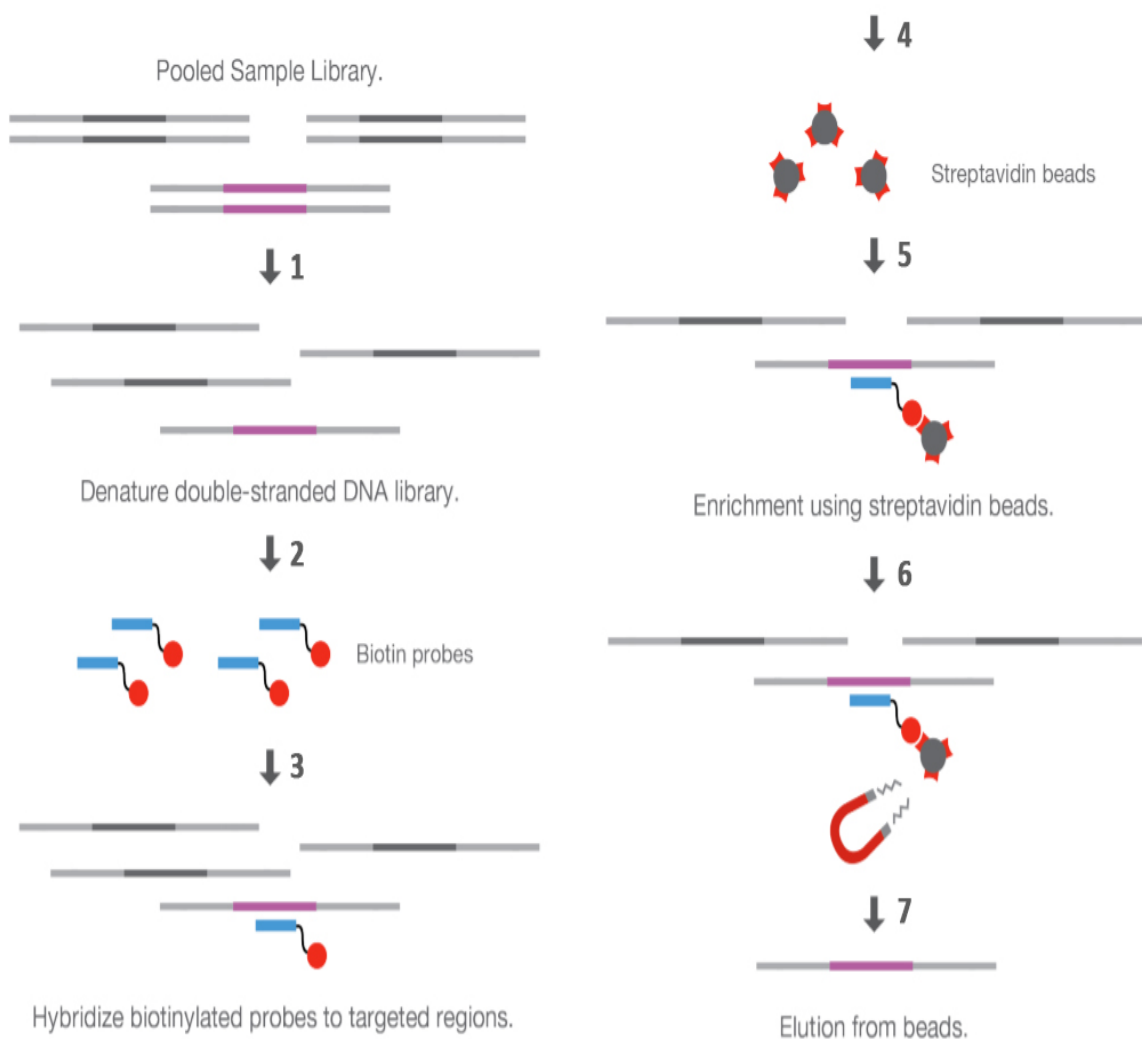


Figura 11. NGS target enrichment: ibridizzazione delle probe e cattura con biglie magnetiche.

Le librerie genomiche così preparate sono sottoposte ad un processo di arricchimento delle regioni target di interesse, che nel caso del mtDNA riguarderà l'intera sequenza del genoma mitocondriale. I protocolli di enrichment, nella maggior parte dei kit commerciali, prevedono l'ibridazione di probes biotinilate che vanno a coprire tutte le regioni target. I frammenti ibridizzati vengono poi catturati con biglie magnetiche coniugate con streptavidina e amplificati se necessario per aumentare la resa (**Figura 11**). I pool di librerie arricchite vengono a questo punto combinati insieme e diluiti a seconda delle specifiche del sequenziatore Illumina e in base alla resa e alla qualità del dato che si vuole ottenere. Nello strumento, i frammenti della libreria si ibridano a degli oligonucleotidi attaccati alla flow cell e vengono successivamente amplificati attraverso bridge-PCR (**Figura 12A**). In questo step si vanno così a creare dei cluster di frammenti con una sequenza identica, che saranno in grado di emettere un segnale fluorescente abbastanza intenso da essere rilevato dal sensore Illumina CMOS. Nel sequenziamento per sintesi, i quattro nucleotidi terminatori marcati in fluorescenza (dNTPs) vengono aggiunti insieme ed entreranno in competizione per legarsi alle basi complementari presenti sul frammento.

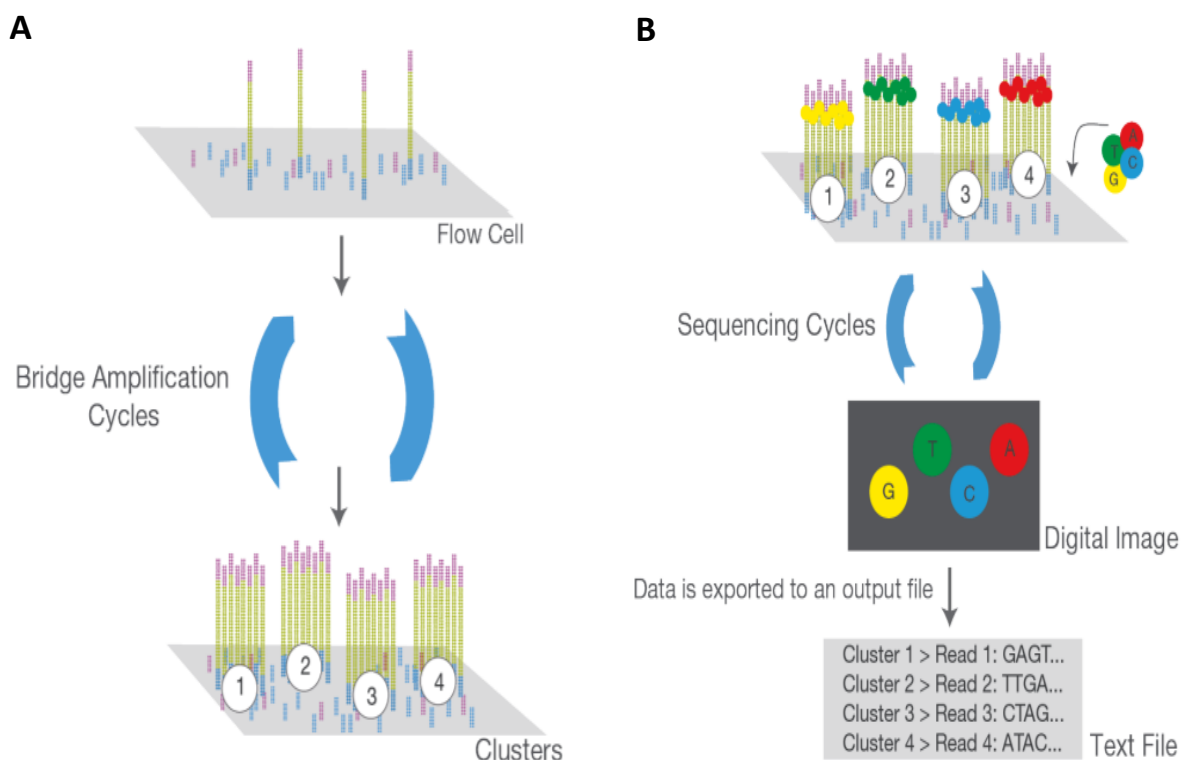


Figura 12. (A) Generazione dei cluster mediante bridge-PCR su flow cell Illumina seguita dal **(B)** sequenziamento per sintesi

Quando un nucleotide viene incorporato, il fluoroforo viene eccitato e vengono catturate delle immagini della flow cell; a questo punto il fluoroforo viene rimosso e può iniziare un nuovo ciclo (**Figura 12B**). Ad ogni ciclo lo strumento prende un'immagine di tutti i cluster, leggendo una singola base per ogni cluster.

Se si esegue un sequenziamento *paired end*, che garantisce più accuratezza nell'allineamento delle read, tutto il processo viene ripetuto a partire dall'altra estremità di ogni frammento, per un totale di 100-300 cicli, a seconda dello strumento e della chimica utilizzata.

6. Long reads e Third-Generation Sequencing

La complessità nell'assemblaggio di *short reads*, provenienti dai dati di sequenziamento con NGS, e l'incapacità di risolvere in modo affidabile le sequenze ripetute o i grandi riarrangiamenti genomici sono state superate dalla Third-Generation Sequencing, caratterizzata dal sequenziamento di *long reads* (> 1 kb - 2 Mb). A differenza dei metodi NGS, che richiedono copie multiple di ogni frammento di DNA genomico, queste nuove tecniche di sequenziamento hanno stabilito metodi che decodificano un singolo filamento di DNA. L'arricchimento dei geni target che si vogliono sequenziare, sottoforma di *long reads*, si può ottenere mediante long range PCR (LR-PCR). La LR-PCR rimane una scelta veloce, efficiente ed economica per il sequenziamento di regioni genomiche candidate, permettendo di amplificare fino a 15kb di DNA circa.

- **6.1. Oxford Nanopore Technology**

Nel 2014, Oxford Nanopore Technologies ha rilasciato un metodo di sequenziamento basato sui nanopori sotto forma di MinION, un sequenziatore portatile che utilizza una griglia di nanopori biologici incorporati in una membrana. La membrana in cui si trovano i nanopori separa due soluzioni ioniche e consente il passaggio di una corrente elettrica attraverso i nanopori.

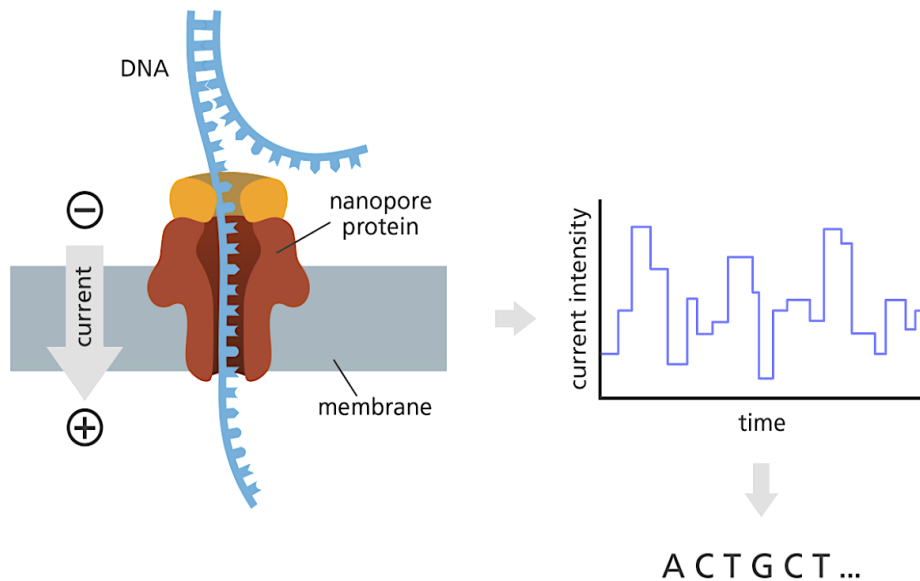


Figura 13. Oxford Nanopore Technology: le proteine dei nanopori sono incorporate in una membrana artificiale all'interno della flow cell di sequenziamento. Una corrente viene applicata attraverso la membrana, costringendo i filamenti di DNA caricati negativamente a muoversi attraverso i nanopori. L'ostruzione di un nanoporo da parte di un frammento di DNA porta a una variazione della corrente che viene misurata continuamente da un chip elettronico integrato nella flow cell. Un algoritmo di chiamata delle basi converte la variazione di corrente nella sequenza originale del DNA.

La libreria contiene solitamente due adattatori, il leader adapter e l'hairpin adapter (HP adapter), ciascuno legato a un'estremità del dsDNA. Un enzima motore precaricato sul leader adapter all'estremità 5', insieme ad una corrente ionica, svolge il dsDNA e muove il singolo filamento (template) attraverso il poro.

Una volta raggiunto HP adapter, una proteina (hairpin protein) permette al filamento complementare del DNA di passare attraverso il nanoporo in modo analogo. Il DNA passa quindi attraverso un nanoporo, ovvero una piccola apertura in una membrana di circa 1 nm di diametro. Il diametro è così piccolo da consentire il passaggio di un solo filamento di DNA alla volta. Mentre il DNA a singolo filamento attraversa il poro, un rilevatore registra le variazioni di corrente del canale (**Figura 13**). Ogni base ha una struttura leggermente diversa e quindi ogni base provoca un diverso cambiamento nel voltaggio registrato. I vantaggi di questa tecnologia sono l'alta velocità e la capacità di gestire lunghe molecole di DNA, con costi competitivi anche se non ancora paragonabili al sequenziamento SBS. Inoltre, molti nanopori possono essere assemblati in una regione molto piccola e molti lunghi frammenti di sequenza di DNA possono essere determinati simultaneamente.

SCOPO DELLA TESI

L'accumulo di delezioni multiple del genoma mitocondriale (mtDNA) nel muscolo scheletrico è una caratteristica tipica di pazienti affetti da oftalmoplegia esterna progressiva (PEO) o da altre forme di miopatia mitocondriale. Tale difetto è una conseguenza della presenza di varianti patogenetiche in geni nucleari coinvolti nel macchinario replicativo dell'mtDNA, nel mantenimento del pool di nucleotidi all'interno dei mitocondri o altre funzioni, come la dinamica mitocondriale.

La diversa quantità di delezioni generate in caso di mutazione su diversi geni, così come la distribuzione di queste rispetto all'intera molecola di mtDNA, sono state studiate principalmente con metodiche classiche di biologia molecolare, come *Southern Blot* o *qPCR*, e principalmente al fine diagnostico. Manca quindi una caratterizzazione aggiornata della caratterizzazione dei *breakpoint* e della loro distribuzione lungo il genoma mitocondriale con approcci di nuova generazione e analizzata su una casistica ampia e rappresentativa di questa rara patologia.

Lo scopo di questo lavoro è valutare mediante sequenziamento NGS e successiva analisi bioinformatica il pattern di distribuzione e la quantità delle delezioni e duplicazioni in una casistica di pazienti con difetti in geni nucleari che causano macroriarrangiamenti del DNA mitocondriale. Il dato qualitativo sulla posizione delle delezioni verrà inoltre verificato mediante sequenziamento di terza generazione con *long-reads*, mentre il dato quantitativo sarà confermato tramite quantificazione assoluta con *droplet digital PCR*.

MATERIALI E METODI

1. Raccolta campioni

Per diagnosi del fenotipo miopatico è stata effettuata una biopsia di muscolo scheletrico (tricipite). I campioni utilizzati per le analisi sono stati raccolti presso i laboratori di Neurogenetica dell'IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, sotto direzione del prof. Valerio Carelli. I dettagli dell'intera casistica sono riportati in **Tabella 1**.

Il DNA totale è stato estratto da biopsia muscolare congelata con protocollo standard fenolo/cloroformio.

2. Preparazione campioni NGS

Il gDNA è stato quantificato con il fluorimetro Qubit 4 (Invitrogen) con kit dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific) per la determinazione dell'input iniziale di DNA e per la quantificazione delle librerie e con kit 1X dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific) per la quantificazione dei pool.

Le librerie di mtDNA sono state preparate con kit xGen DNA Library Prep EZ (Integrated DNA Technologies) utilizzando 100ng di gDNA come input iniziale. In un unico step di preparazione enzimatica avviene la frammentazione del dsDNA, il riparo delle estremità e la formazione di una coda di adenina. Segue la fase di ligazione dei full-length adapter o xGen UDI-UMI index (IDT) e di purificazione con biglie magnetiche MagSi-NGS^{PREP} Plus. Le librerie sono sottoposte ad amplificazione in PCR utilizzando primer costruiti sulle regioni P5 e P7 degli adapters e nuovamente purificate con biglie magnetiche. Infine, 600ng di ciascuna libreria vengono riuniti in un pool da 12 campioni per iniziare il protocollo xGen hybridization protocol (Integrated DNA Technologies). Il pool viene ibridizzato per 16h in presenza di xGen Human mtDNA Hyb Panel (Integrated DNA Technologies), caratterizzato da 138 probes che vanno a ricoprire interamente il genoma mitocondriale (>16kb). Le probes utilizzate sono biotinilate e permettono lo step successivo di cattura con biglie magnetiche coniugate con streptavidina presenti all'interno del xGen Hybridization and Wash kit (Integrated DNA Technologies). Dopo la cattura il pool viene lavato, amplificato in PCR e purificato con biglie magnetiche. Il pool finale delle librerie è stato analizzato al Fragment Analyzer 5200 (Agilent) con HS NGS Fragment Kit (1-6000bp) per una valutazione della dimensione delle librerie, successivamente quantificato al Qubit 4 e diluito fino alla concentrazione

di 1.5 nM. Il sequenziamento è stato eseguito con NovaSeq 6000 (Illumina) su flow cell SP e impostazioni di sequenziamento *paired end* 2x101 cicli.

- **2.1. MitoSAlt**

I dati ottenuti da sequenziamento NGS sono stati analizzati con MitoSAlt (Basu et al., 2020), un metodo di analisi bioinformatica per l'identificazione, la quantificazione e la visualizzazione accurata di delezioni e duplicazioni dell' mtDNA da dati provenienti da sequenziamento genomico. La pipeline di MitoSAlt è composta da tre moduli combinati in un'unica pipeline: (1) allineamento delle reads di sequenziamento (2) analisi delle reads allineate per identificare i *breakpoint* (PERL e R) e (3) plotting dei risultati sul genoma mitocondriale circolare e analisi delle ripetizioni dei *breakpoint* (R). Nel dettaglio, le reads ottenute dal sequenziamento vengono convertite in un file FASTQ concatenato utilizzando *reformat.sh* (<https://github.com/BioInfoTools/BBMap>), successivamente allineate sul genoma mitocondriale di riferimento utilizzando *lastal*, processate con *last-split* e convertite con *maf-convert* da formato MAF a BAM e TAB; i tools utilizzati fanno parte del software LAST (Kiełbasa et al., 2011). In seguito, l'output in formato TAB viene utilizzato per l'analisi mediante PERL, per rimuovere i duplicati e generare come output tre file: BED, che riporta una lista delle *split-reads* che potrebbero contenere una delezione o duplicazione; *BREAKPOINT* file, che riporta una lista dei *breakpoint* identificati; CLUSTER file, che raggruppa i *breakpoint* ad una determinata soglia di distanza e stima l'eteroplasmia in una determinata coppia di clustered *breakpoint* come rapporto tra reads che supportano i *breakpoint* e il numero di reads wildtype che si sovrappongono ai *breakpoint*.

I file CLUSTER e *BREAKPOINT* vengono poi utilizzati da uno script R per generare una tabella finale, classificando ogni cluster come duplicazione o delezione a seconda che i *breakpoint* prevedano una molecola che include o meno entrambe le origini di replicazione del mtDNA; questo report contiene anche informazioni sulle *direct repeats* che si sovrappongono o affiancano i *breakpoint*. Infine, le posizioni dei *breakpoint* (a livello dei cluster) vengono tracciate su un grafico circolare (delle dimensioni del genoma mitocondriale) come archi utilizzando il pacchetto R *plotrix* (<https://github.com/plotrix/plotrix>), dove i singoli archi sono colorati per indicare se rappresentano delezioni (in blu) o duplicazioni (in rosso) e dove l'eteroplasmia stimata è indicata dall'intensità del colore.

Codice	Sesso	Età	Fenotipo	Gene	Trascritto	Cambio nucleotidico	Cambio aminoacidico
DEL_1	F	60	CPEO	DGUOK	NM_080916.3	c.[3G>A];[586C>T]	p.[(Met11le)];[(Pro196Ser)]
DEL_2	F	45	CPEO	DGUOK	NM_080916.3	c.[462T>A];[749T>C]	p.[(Asn154Lys)];[(Leu250Ser)]
DEL_3	F	64	CPEO	DNA2	NM_001080449.3	c.[662C>G]	p.[(Ala221Gly)]
DEL_4	F	69	CPEO	DNA2	NM_001080449.3	c.[1655C>T]	p.[(Ser552Leu)]
DEL_5	F	20	DOA plus	OPA1	NM_130837.3	c.[1499G>A]	p.[(Arg500His)]
DEL_6	M	49	DOA plus	OPA1	NM_130837.3	c.[1499G>A]	p.[(Arg500His)]
DEL_7	M	63	DOA plus	OPA1	NM_130837.3	c.[1627G>A]	p.[(Gly543Arg)]
DEL_8	M	51	DOA plus	OPA1	NM_130837.3	c.[3011T>C]	p.[(Leu1004Pro)]
DEL_9	F	79	Encefalomiopatia mitocondriale	POLG	NM_002693.3	c.[752C>A;1760C>T];[3311C>G]	p.[(Thr251Asn;Pro587Leu)];[(Ser1104Cys)]
DEL_10	M	27	Encefalomiopatia mitocondriale	POLG	NM_002693.3	c.[752C>A;1760C>T];[3550G>A]	p.[(Thr251Asn;Pro587Leu)];[(Asp1184Asn)]
DEL_11	M	53	Encefalomiopatia mitocondriale	POLG	NM_002693.3	c.[934T>C];[3629dup]	p.[(Trp312Arg)];[(Tyr1210Ter)]
DEL_12	F	73	Encefalomiopatia mitocondriale	POLG	NM_002693.3	c.[934T>C];[934T>C]	p.[(Trp312Arg)];[(Trp312Arg)]
DEL_13	F	45	Encefalomiopatia mitocondriale	POLG	NM_002693.3	c.[1399G>A];[2243G>C]	p.[(Ala467Thr)];[(Trp748Ser)]
DEL_14	M	52	Encefalomiopatia mitocondriale	POLG	NM_002693.3	c.[1399G>A];[2243G>C]	p.[(Ala467Thr)];[(Trp748Ser)]
DEL_15	F	57	Encefalomiopatia mitocondriale	POLG	NM_002693.3	c.[1943C>G];[1943C>G]	p.[(Pro648Arg)];[(Pro648Arg)]
DEL_16	M	52	Encefalomiopatia mitocondriale	POLG	NM_002693.3	c.[2794C>T];[3151G>C]	p.[(His932Tyr)];[(Gly1051Arg)]
DEL_17	F	52	CPEO	SLC25A4	NM_001151.4	c.[340G>C]	p.[(Ala114Pro)]
DEL_18	M	75	CPEO	SLC25A4	NM_001151.4	c.[340G>C]	p.[(Ala114Pro)]
DEL_19	F	48	CPEO	SLC25A4	NM_001151.4	c.[340G>C]	p.[(Ala114Pro)]
DEL_20	F	34	Encefalomiopatia mitocondriale	TOP3A	NM_004618.5	c.[899_900del];[1723A>G]	p.[(Tyr300SerfsTer17)];[(Met575Val)]
DEL_21	M	47	CPEO	TWNK	NM_021830.5	c.[907C>T]	p.[(Arg303Trp)]
DEL_22	M	73	CPEO	TWNK	NM_021830.5	c.[907C>T]	p.[(Arg303Trp)]
DEL_23	F	48	CPEO	TWNK	NM_021830.5	c.[908G>A]	p.[(Arg303Gln)]
DEL_24	M	40	CPEO+DOA	TWNK OPA1	NM_021830.5 NM_130837.3	c.[907C>T] c.[868C>T]	p.[(Arg303Trp)] p.Arg290Ter
DEL_25	M	79	CPEO	TWNK	NM_021830.5	c.[1001G>A]	p.[(Arg334Gln)]
DEL_26	F	66	CPEO	TWNK	NM_021830.5	c.[1001G>A]	p.[(Arg334Gln)]
DEL_27	F	68	CPEO	TWNK	NM_021830.5	c.[1001G>A]	p.[(Arg334Gln)]
DEL_28	F	55	CPEO	TWNK	NM_021830.5	c.[1075G>A]	p.[(Ala359Thr)]
DEL_29	M	51	Miopatia mitocondriale	TWNK	NM_021830.5	c.[1172G>A]	p.[(Arg391His)]
DEL_30	F	52	CPEO	TWNK	NM_021830.5	c.[1277G>A]	p.[(Ser426Asn)]
DEL_31	F	80	CPEO	TWNK	NM_021830.5	c.[1883_1885del]	p.[(Phe628del)]
DEL_32	M	39	MNGIE	TYMP	NM_001953.5	c.[457G>A];[457G>A]	p.[(Gly153Ser)];[(Gly153Ser)]
DEL_33	M	40	MNGIE	TYMP	NM_001953.5	c.[524T>A];[524T>A]	p.[(Val175Glu)];[(Val175Glu)]
DEL_34	M	26	MNGIE	TYMP	NM_001953.5	c.[1160-1G>A];[1160-1G>A]	p.?,?

Tabella 1. Coorte di pazienti analizzati con: sesso, età del paziente al momento del campionamento, fenotipo clinico, gene, trascritto, cambio nucleotidico e aminoacidico

3. Preparazione campioni Nanopore

I campioni di DNA totale sono stati amplificati mediante LR-PCR, che include l'intero genoma mitocondriale ad eccezione della regione di controllo (da 142 a 16253, primer riportati in **Tabella 2**, utilizzando la PrimeSTAR GXL DNA polimerasi (Takara) con protocollo standard per 2-step PCR. Gli ampliconi sono stati purificati con biglie ferromagnetiche MagSi-NGS^{PREP} Plus (Magtivio) e quantificati mediante fluorimetro Qubit 4 con kit 1X dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific).

ONT_142F_LR_mtDNA	TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCTGCCTCATCCTATTATTTATCGCACCTACG
ONT_16253R_LR_mtDNA	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCTTGGAGTTGCAGTTGATGTGTGATAGTTGA

Tabella 2. LR-PCR Primer

Un input iniziale di 100ng di ampliconi ottenuti mediante LR-PCR è stata utilizzato per la preparazione di una libreria con Native Barcoding Kit 24 V14 (Oxford Nanopore Technology, ONT). Il primo step prevede il riparo del dsDNA e la preparazione delle estremità mediante aggiunta di una coda di adenina necessaria per lo step successivo di legame con i Native Barcodes (ONT) (**Figura 1**). Può essere utilizzato un solo barcode per campione. Una volta avvenuto il legame dei barcodes i campioni vengono riuniti in un pool di librerie a cui vengono aggiunti i Native Adapter (ONT) su cui è precaricato l'enzima motore (**Figura 1**). Il pool ottenuto è stato purificato con biglie magnetiche, quantificato al Qubit 4 e diluito fino a raggiungere una concentrazione tra 10 e 20 fmol. Infine, la libreria così diluita è stata caricata su una flow cell R9 e sequenziata con tecnologia MinION (ONT).

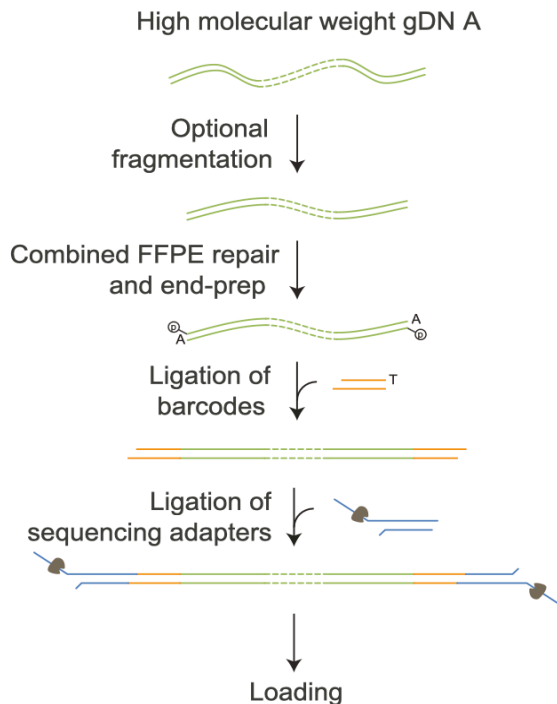


Figura 1. ONT workflow: riparo del DNA e preparazione delle estremità, ligazione barcodes ed adapters, caricamento.

• 3.1. Analisi bioinformatica ONT

Dopo verifica della qualità della corsa ONT tramite *pycoQC* (<https://github.com/a-slide/pycoQC>), le reads ottenute sono state demultiplexate, in modo da separarle tutte in base ai barcodes corrispondenti ai singoli campioni. Dopo il demultiplexing, si ottengono dei file fastq su cui effettuare ulteriori controlli di qualità e filtraggi prima della fase di allineamento. Il controllo della qualità è stato effettuato utilizzando *fastQC* (<https://github.com/s-andrews/FastQC>) che utilizza i file fastq e genera un report html che presenta tutte le statistiche. La fase di filtraggio invece è stata eseguita utilizzando due diversi software chiamati *Filtlong* (<https://github.com/rrwick/Filtlong>) e *Nanofilt* (<https://github.com/wdecoster/nanofilt>), in modo da eliminare le reads con qualità inferiore al 10% e lunghezza inferiore a 1000bp. Si procede poi alla fase di allineamento rispetto al genoma mitocondriale di riferimento (rCRCS, NC_012920.1.) realizzata con *minimap2* (Li, 2018) per generare come output un file bam. Successivamente, sono stati rimossi i duplicati presenti nelle reads utilizzando *picard tools MarkDuplicates* (<https://broadinstitute.github.io/picard/>). Per la visualizzazione dei file bam risultanti si è utilizzato il software IGV (Integrative Genome Viewer, Robinson et al., 2011). Infine, viene effettuata la chiamata delle varianti genetiche rispetto alla sequenza di riferimento attraverso i tool *sniffles* (Sedlazeck et al., 2018) e *cutesv* (Jiang et al., 2020), applicati in parallelo per ottenere una cross validazione delle chiamate.

4. ddPCR

La quantificazione assoluta delle delezioni è stata eseguita anche attraverso la tecnologia Droplet Digital PCR (ddPCR, BioRad), amplificando contemporaneamente una regione nel gene MT-ND1 e nel gene-MT-ND4, per ricavarne il rapporto che corrisponde a molecole delete nell'arco maggiore del mtDNA.

I campioni sono stati diluiti ad una diluizione intermedia di 10 ng/μl, e poi ancora diluiti fino alla concentrazione di 0,05 ng/μl. La mix per la *duplex* PCR (ND1, ND4) è stata preparata con supermix ddPCR supermix for Probes (no dUTP) (Bio-Rad Laboratories), i primer ND1 (900nM) con il relativo probes FAM (250nM), i primers ND4 (900nM) con il probe HEX (250nM). In seguito, la miscela di reazione viene emulsionata in olio minerale, per la generazione delle gocce e il partizionamento, e amplificata tramite termociclatore T100 (Bio-Rad Laboratories). Dopo l'amplificazione, l'emulsione è stata analizzata con il lettore QX200 droplet reader (Bio-Rad Laboratories) e il dato analizzato mediante software QuantaSoft™Pro (Bio-Rad).

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Metriche corsa

Sono stati analizzati in totale $n=34$ campioni mediante sequenziamento target del mtDNA. In **Tabella 1** viene riportata la profondità del coverage medio per ogni campione.

Codice	Coverage	Codice	Coverage
DEL_1	7916	DEL_18	7916
DEL_2	7913	DEL_19	7915
DEL_3	7915	DEL_20	7901
DEL_4	7916	DEL_21	7915
DEL_5	7910	DEL_22	7915
DEL_6	7912	DEL_23	7912
DEL_7	7912	DEL_24	7915
DEL_8	7915	DEL_25	7916
DEL_9	7914	DEL_26	7917
DEL_10	7900	DEL_27	7916
DEL_11	7910	DEL_28	7915
DEL_12	7909	DEL_29	7916
DEL_13	7914	DEL_30	7917
DEL_14	7915	DEL_31	7916
DEL_15	7910	DEL_32	7907
DEL_16	7911	DEL_33	7908
DEL_17	7915	DEL_34	7903

Tabella 1. Profondità coverage medi

2. Caratteristiche di delezioni e duplicazioni associati a mutazioni nei singoli geni

- 2.1. *DGUOK*

Sono stati analizzati $n=2$ campioni di pazienti con fenotipo arPEO caratterizzati dalla presenza di una mutazione in eterozigosi composta nel gene *DGUOK* (NM_080916.3) che codifica per la deossiguanosina chinasi. I pazienti DEL_1 con mutazione c.[3G>A];[586C>T] e DEL_2 con mutazione c.[462T>A];[749T>C] mostrano un importante accumulo di delezioni, a costituire un pattern complessivo molto simile (**Figura 1A e 1B**). Il campione DEL_1 con età maggiore di DEL_2 mostra, come atteso, un accumulo di delezioni più marcato (57.2% vs 45.4% eteroplasmia totale). I valori sono comunque paragonabili ed associati a scarsa presenza di delezioni dell'arco minore, circa 2% di frazione eteroplasmica, e una significativa presenza di duplicazioni, oltre al 10% in entrambi i casi.

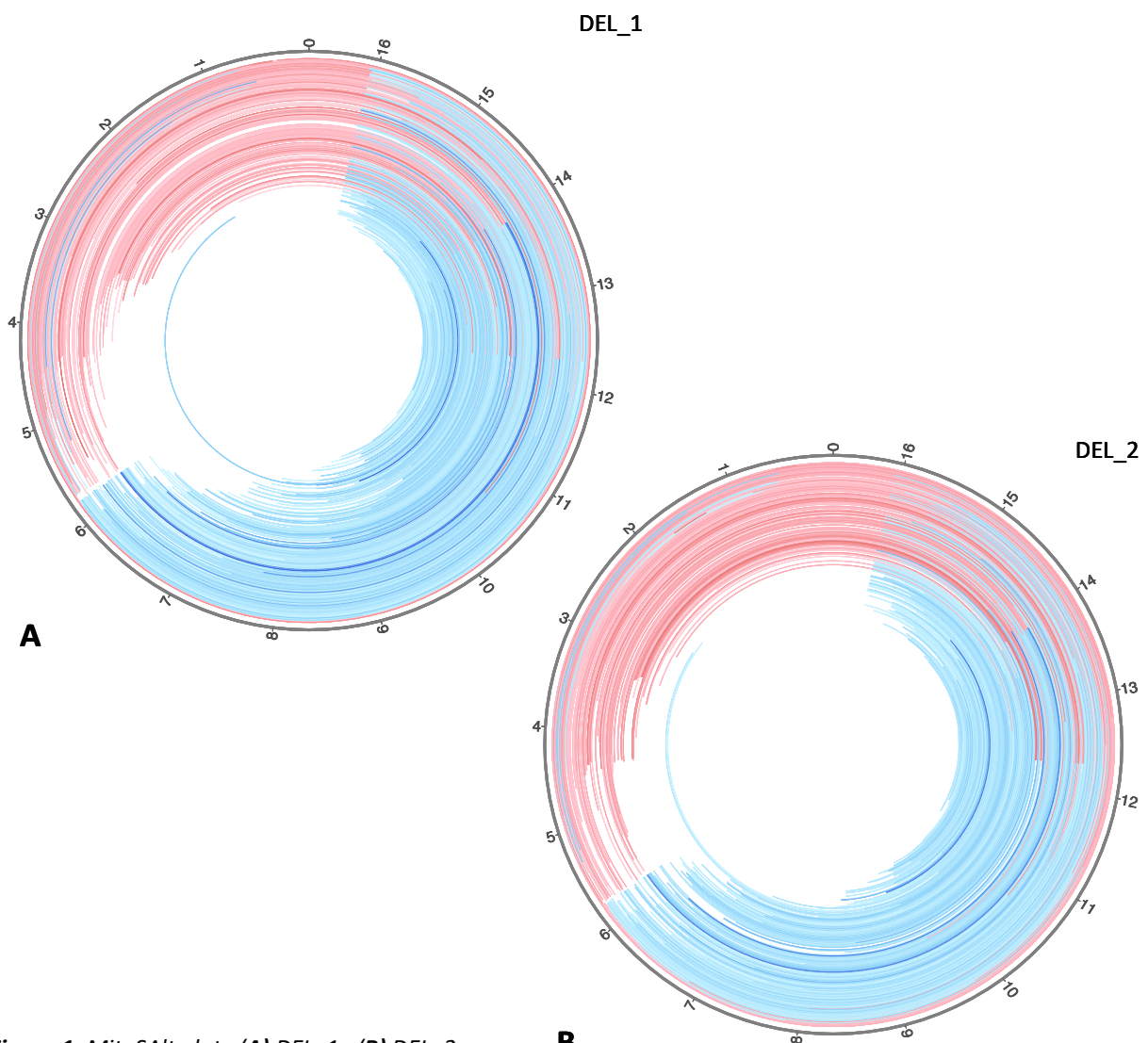
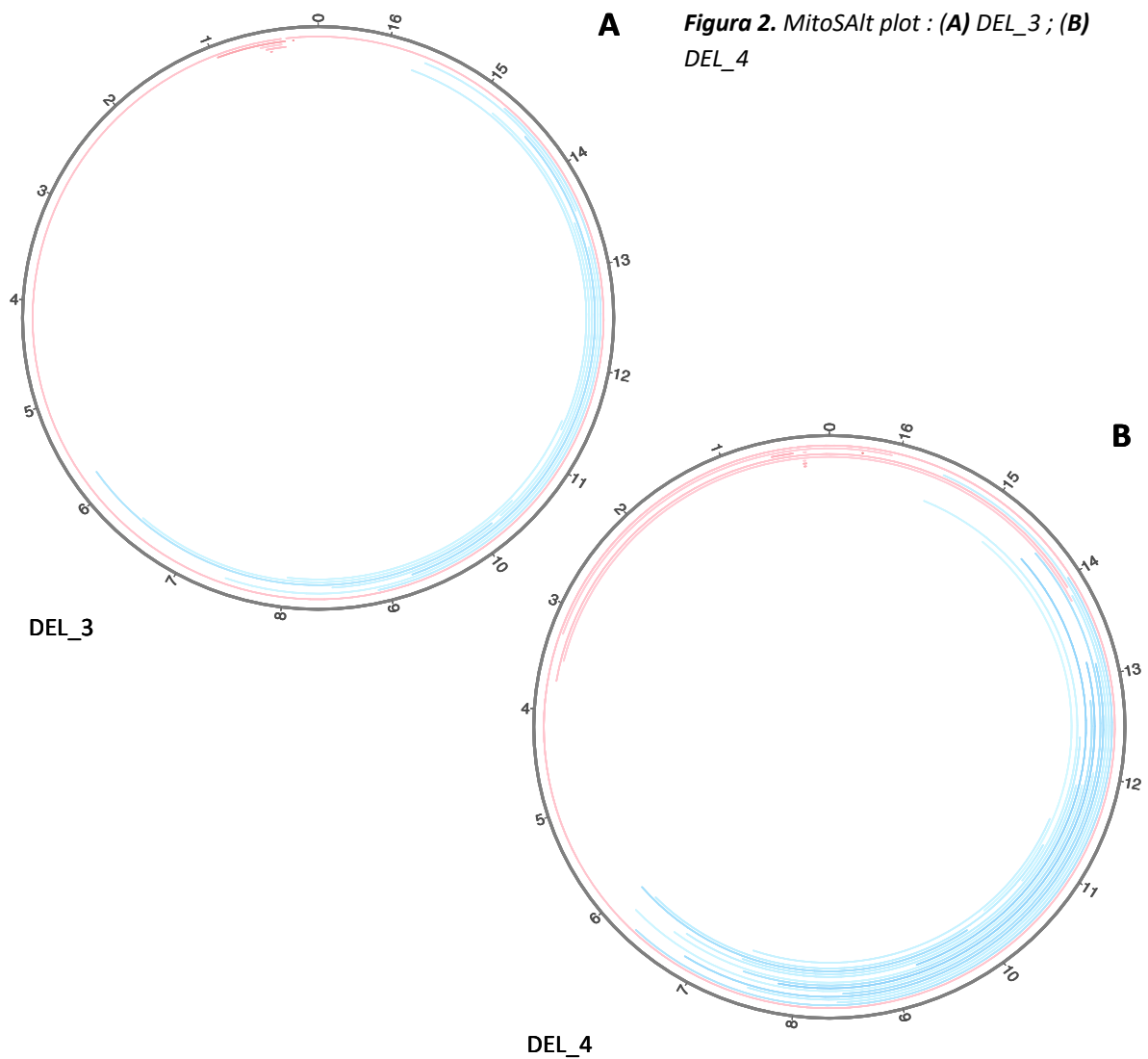


Figura 1. MitoSAlt plot : (A) DEL_1 ; (B) DEL_2

- **2.2. DNA2**

Sono stati analizzati $n=2$ campioni di pazienti con fenotipo adPEO definiti dalla presenza di varianti in eterozigosi nel gene *DNA2* (NM_001080449.3) che codifica per un enzima membro della famiglia delle elicasi/nucleasi. I pazienti DEL_3 con mutazione c.[662C>G] e DEL_4 con mutazione c.[1655C>T] mostrano, con un pattern paragonabile (**Figura 2A e 2B**), la presenza di delezioni esclusivamente a livello dell'arco maggiore con valori di eteroplasmia rispettivamente pari a 0.5% e 1.6%. Nei due campioni non sono state rilevate delezioni a livello dell'arco minore. In entrambi i casi si può osservare, a livelli poco significativi (0.2%), la presenza di duplicazioni.



- **2.3. OPA1**

Sono stati analizzati $n=4$ campioni di pazienti con fenotipo DOA plus, di cui DEL_5 e DEL_6 che presentano la stessa variante in eterozigosi NM_130837.3:c.[1499G>A], DEL_7 con mutazione NM_130837.3:c.[1627G>A] e DEL_8 con mutazione NM_130837.3:c.[3011T>C]. I pazienti DEL_5 e DEL_6 non mostrano la presenza di delezioni né nell'arco maggiore e né nell'arco minore, così come le duplicazioni (**Figura 3A e 3B**). Il paziente DEL_7 mostra livelli poco significativi di delezione nel solo arco maggiore 0.4% (**Figura 3C**). In DEL_8 si osservano bassi livelli di delezioni sia nell'arco maggiore 0.3% che nell'arco minore 0.4% (**Figura 3D**). DEL_7 e DEL_8 mostrano entrambi livelli di duplicazioni poco rilevanti. Non essendo la proteina OPA1 direttamente implicata nella replicazione del mtDNA, ma solo nel suo mantenimento attraverso il controllo della dinamica del network, livelli particolarmente bassi di delezioni sono prevedibili.

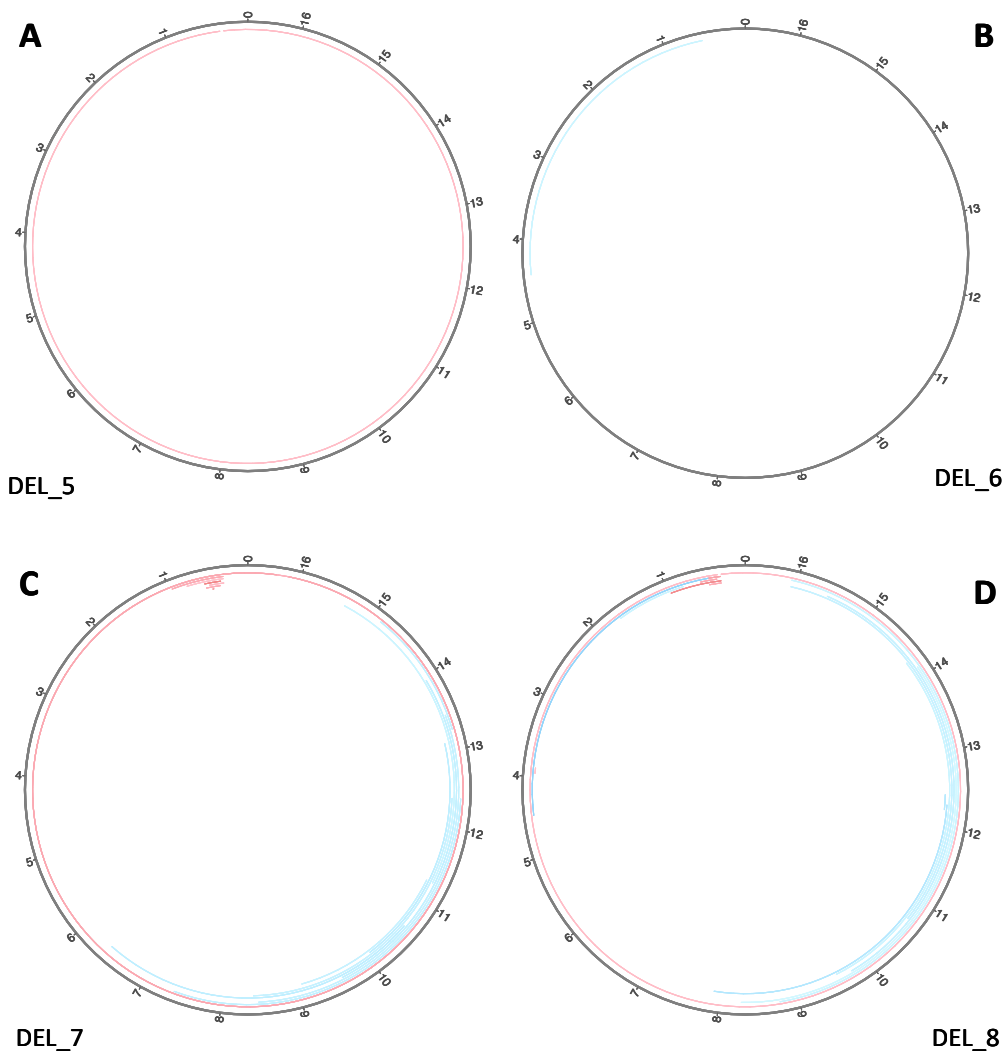


Figura 3. MitoSAlt plot : (A) DEL_5 ; (B) DEL_6 ; (C) DEL_7 ; (D) DEL_8

- **2.4. POLG**

Sono stati analizzati $n=8$ campioni di pazienti con fenotipo ascrivibile a forme di encefalomiopia mitocondriale con varianti a carico del gene *POLG* (NM_002693.3) che codifica per la polimerasi γ . I pazienti DEL_9 con mutazione c.[752C>A;1760C>T];[3311C>G] e DEL_10 con mutazione c.[752C>A;1760C>T];[3550G>A], pur condividendo uno stesso allele, differiscono significativamente per accumulo di delezioni a livello dell'arco maggiore, con un valore totale di eteroplasma pari a 58.2% e 9.9%, forse anche in rapporto all'età alla biopsia (79 e 27 anni) (**Figura 4A e 4B**). In aggiunta, DEL_9 mostra un lieve accumulo di delezioni a livello dell'arco minore 2%, a differenza di DEL_10 con solo lo 0.6%, mentre in DEL_10 si osserva la presenza di duplicazioni con valore totale di eteroplasma pari a 2.4%.

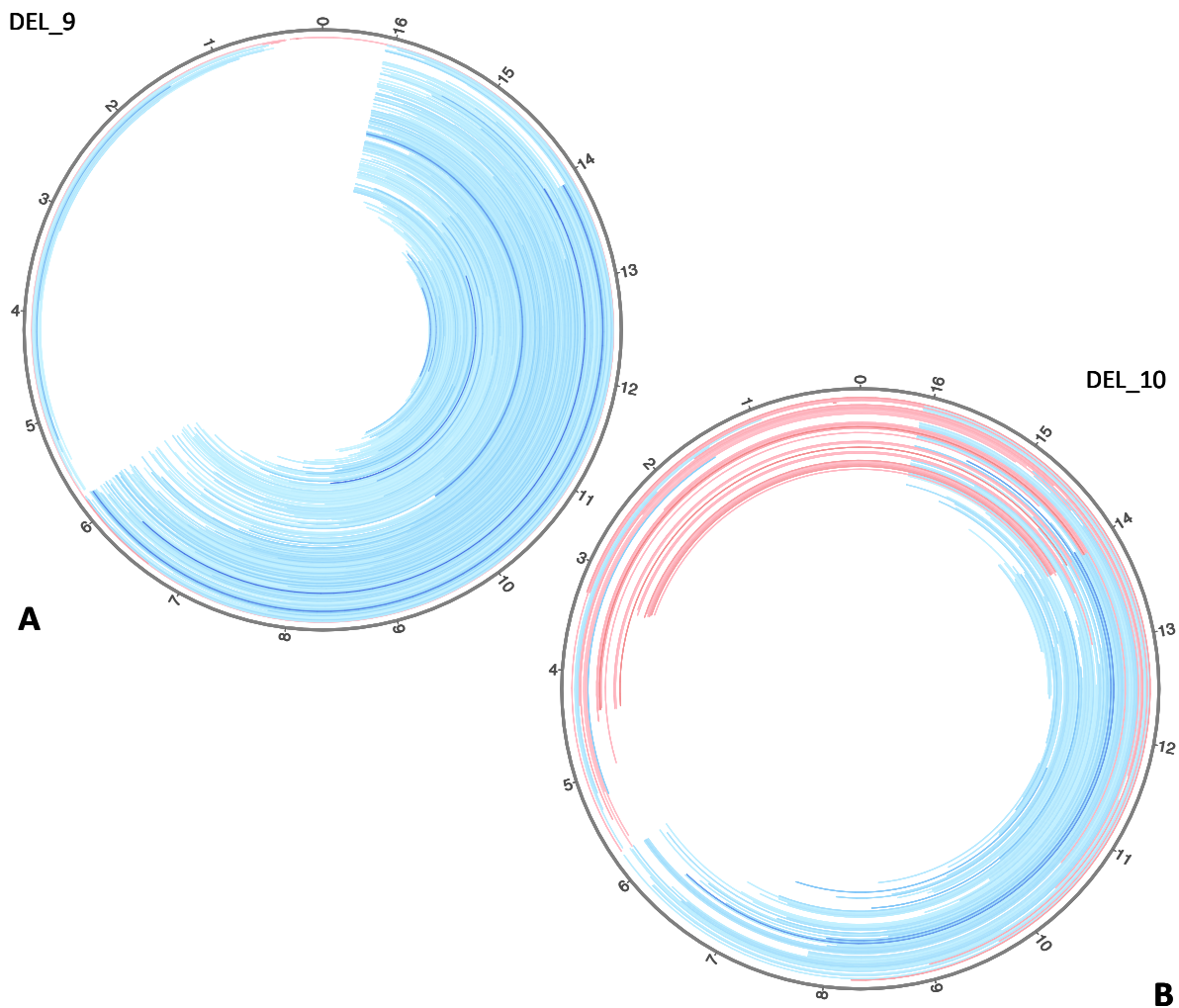


Figura 4. MitoSAlt plot: **(A)** DEL_9; **(B)** DEL_10

I pazienti DEL_11 con mutazione eterozigosi composta c.[934T>C];[3629dup] e DEL_12 con mutazione in omozigosi c.[934T>C];[934T>C], mostrano un pattern di distribuzione delle delezioni sovrapponibile (**Figura 5A e 5B**). La variante c.[934T>C] presente nei due pazienti risulta cadere nel dominio esonucleasico della proteina *POLG*, e in entrambi i casi risulta essere l'unica forma espressa dell'enzima. Come atteso, quindi, il profilo di alterazione del mtDNA è ben riproducibile fra i due pazienti, con accumulo consistente di delezioni a livello dell'arco maggiore (etroplasmia totale pari a 84.5% e 80%, rispettivamente). Anche a livello dell'arco minore si può notare la presenza delezioni con valori rilevanti della frazione eteroplasmica rispettivamente 9.7% e 19%. In entrambi i casi invece si trovano bassi valori di duplicazioni pari a 2.7% e 5%. I pazienti DEL_13 e DEL_14 portano entrambi la stessa mutazione eterozigosi composta c.[1399G>A];[2243G>C]. Le due varianti si trovano a livello della regione linker della proteina e sembra che in entrambi i pazienti non abbiano un grande impatto nello sviluppo delle delezioni (**Figura 5C e 5D**), presentano infatti valori di eteroplasmia totale pari a 0.7% e 1,1%.

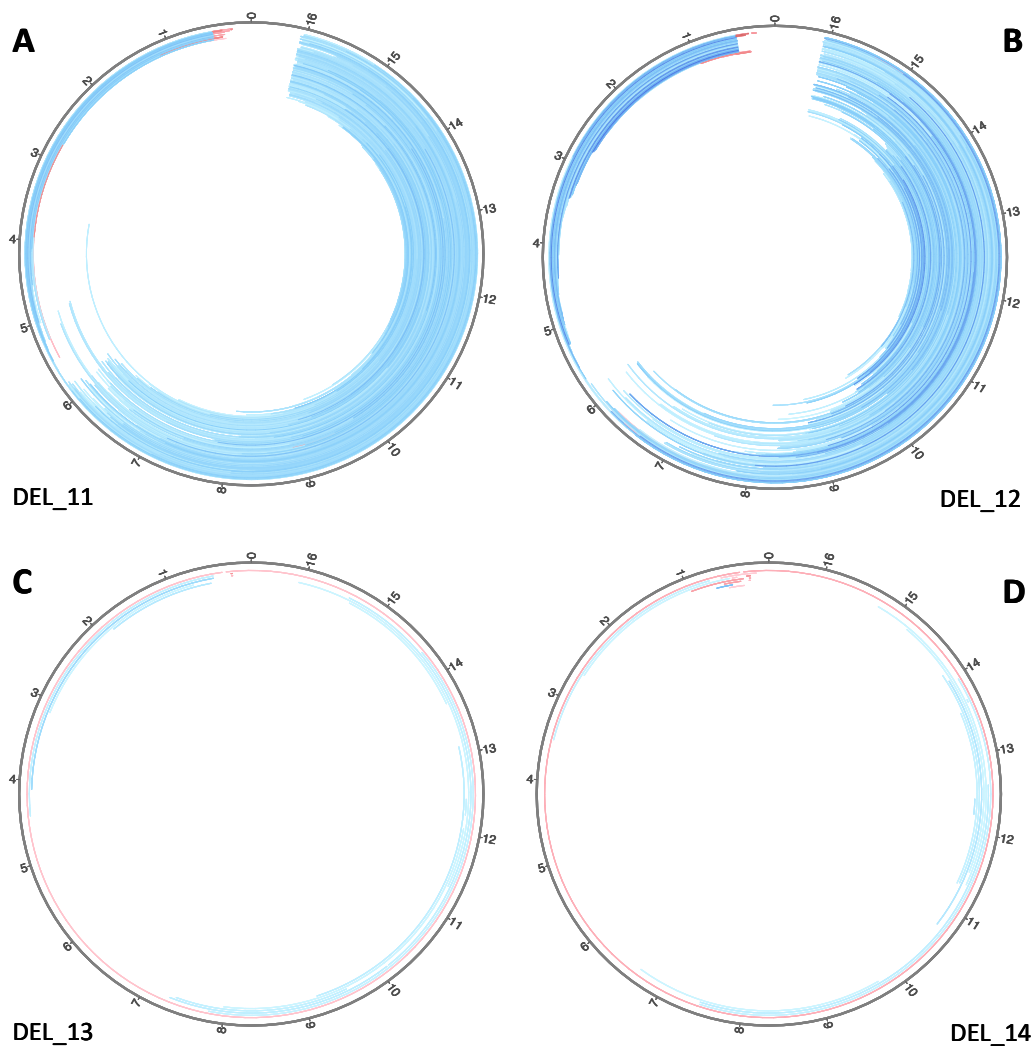


Figura 5. MitoSAlt plot : (A) DEL_11 ; (B) DEL_12; (C) DEL_13; (D) DEL_14

Infine, i pazienti DEL_15 con mutazione in omozigosi c.[1943C>G];[1943C>G] e DEL_16 con mutazione etrozigosi composta c.[2794C>T];[3151G>C] mostrano a loro volta un pattern di delezioni comparabile a DEL_9, DEL_10, DEL_11 e DEL_12. Sia DEL_15 che DEL_16 presentano un rilevante accumulo di delezioni nell'arco maggiore (**Figura 6A e 6B**), con valori di eteroplasmia totale pari a 58.4% e 50.8%, ed una poco rilevante presenza di delezioni a livello dell'arco minore 1% e 3.8%. In entrambi i pazienti non si osservano valori significativi di duplicazioni. La variante c.[1943C>G] in DEL_15, cade nella regione linker della proteina *POLG* invece entrambe le varianti in DEL_16 si trovano all'interno del dominio polimerasico.

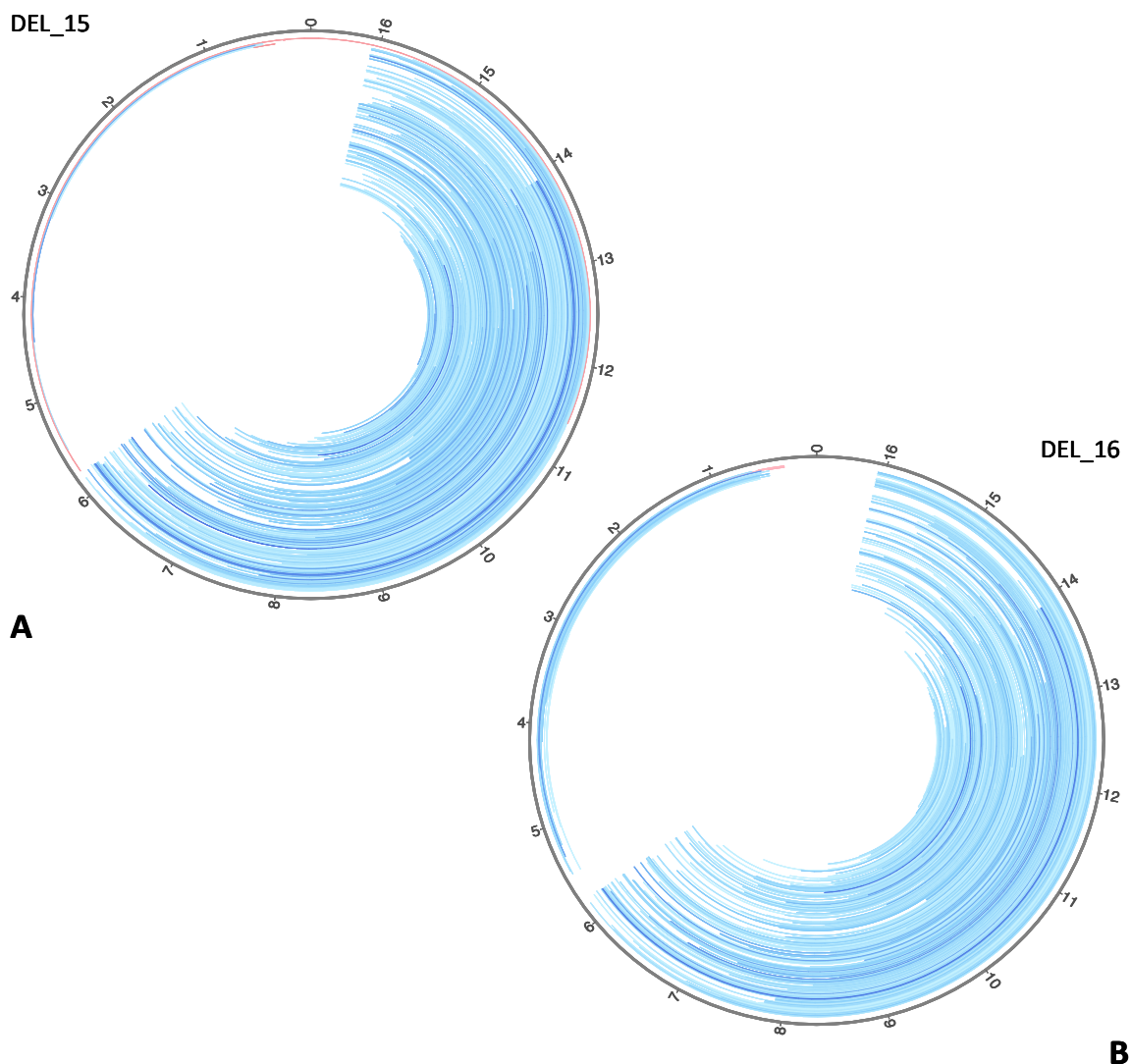


Figura 6. MitoSAlt plot: **(A)** DEL_15; **(B)** DEL_16

- **2.5. SLC25A4 (ANT1)**

Sono stati analizzati $n=3$ campioni di pazienti con fenotipo adPEO tutti caratterizzati dalla presenza della variante in eterozigosi NM_001151.4:c.[340G>C] nel gene *ANT1*, che codifica per un trasportatore di membrana, la quale risulta essere probabilmente localizzata nel terzo dominio transmembrana di *ANT1* o appena adiacente ad esso, nel loop che unisce il secondo e il terzo dominio transmembrana nello spazio intermembrana. I pazienti DEL_17, DEL_18 e DEL_19 mostrano una comparabile distribuzione delle delezioni (**Figura 7A, 7B, 7C**), presenti in grande maggioranza a livello dell'arco maggiore rispettivamente 6,7%, 36,5% e 47%. I valori di etroplasmia a livello dell'arco minore, così come quelli delle duplicazioni risultano meno evidenti.

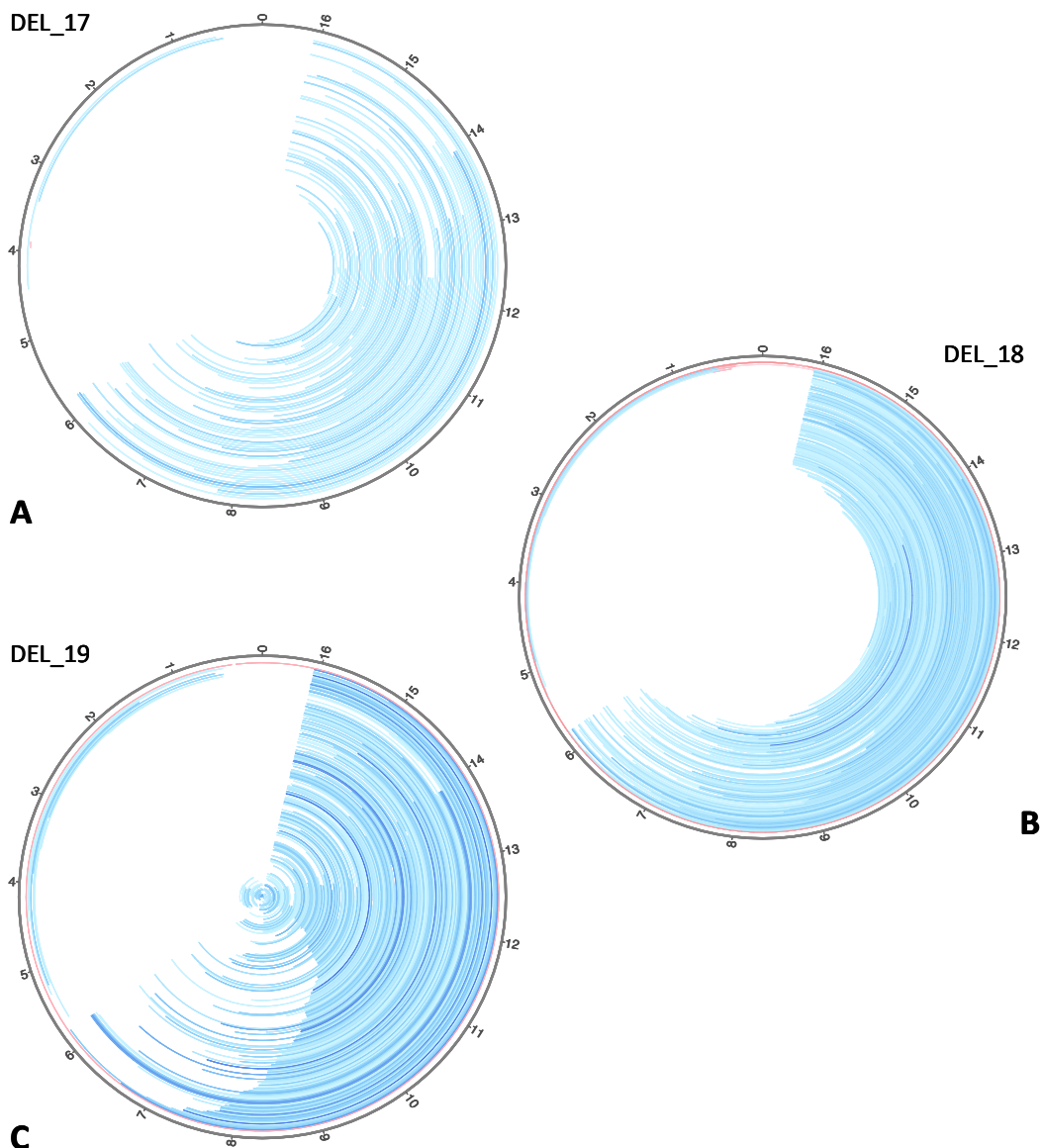


Figura 7. MitoSAlt plot: (A) DEL_17; (B) DEL_18; (C) DEL_19

- **2.6. TOP3A**

È stato analizzato $n=1$ campione con fenotipo relativo a encefalomiopatia mitocondriale con mutazione eterozigosi composta NM_004618.5:c.[899_900del];[1723A>G] nel gene della topoisomerasi III alpha (*TOP3A*). Nel paziente DEL_20 si possono osservare scarse delezioni distribuite tra arco maggiore ed arco minore con valori di eteroplasma pari a 1.7% e 2% rispettivamente. Interessante notare come ci sia un accumulo di duplicazioni con frazione eteroplasmica pari a 27.1% di cui la maggior parte situate a livello dell'origine di replicazione OriH (**Figura 8**), che potrebbe essere spiegato dal ruolo della topoisomerasi, la quale al termine della replicazione del mtDNA va a separare le due molecole figlie, tenute insieme da emicatene proprio a livello dell'OriH. Varianti patogene nel gene *TOP3A* possono quindi portare a formazione di molecole di mtDNA concatenate, presumibilmente responsabili della formazione delle duplicazioni osservate.

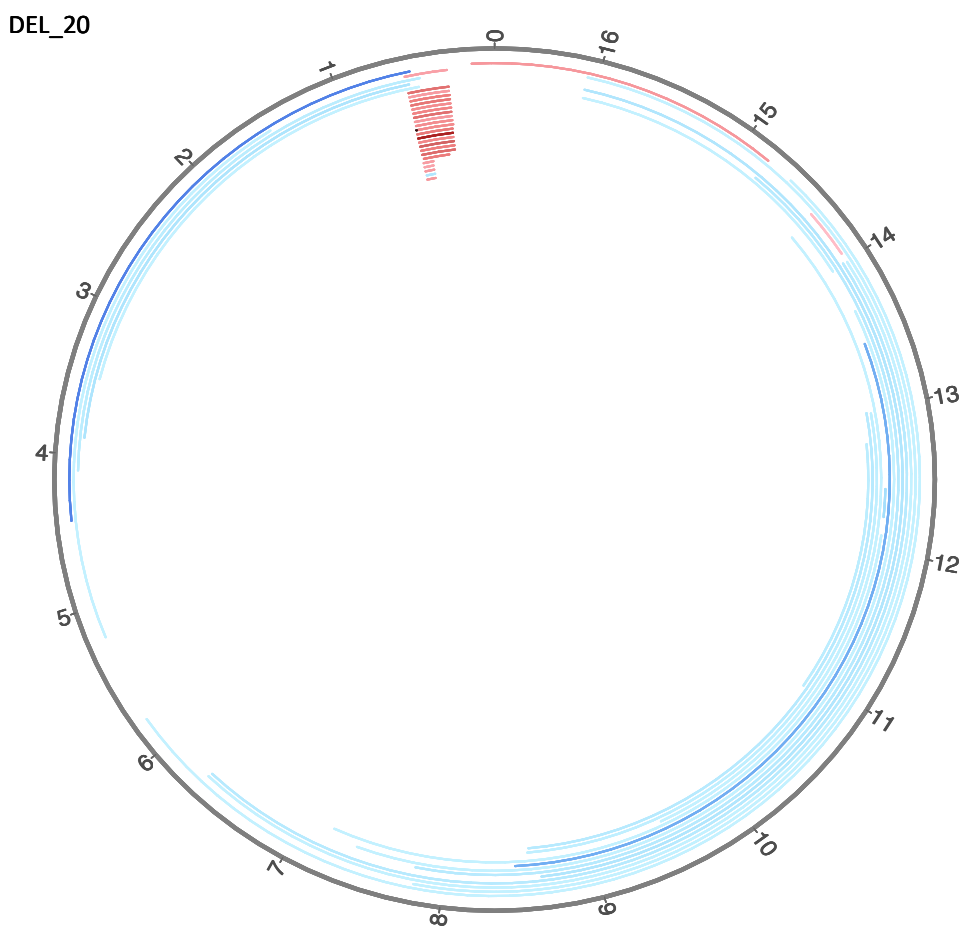


Figura 8. MitoSAlt plot: DEL_20

- **2.7. TWNK**

Sono stati analizzati $n=3$ campioni di pazienti con fenotipo adPEO che presentano varianti nel gene *TWNK* (NM_021830.5) codificante per l'elicasi mitocondriale, di cui DEL_21 e DEL_22 con la stessa mutazione c.[907C>T] e DEL_23 con mutazione c.[908G>A], rispettivamente corrispondono al cambio amminoacidico R303W e R303Q localizzati a livello del *Primase-Like Domain* della proteina Twinkle. Tutti e tre i pazienti mostrano un accumulo di delezioni prevalentemente a livello dell'arco maggiore con livelli di eteroplasmia totale pari a 1.1%, 9.1% e 9.3% rispettivamente (**Figura 9A, 9B e 9C**). La presenza di duplicazioni in tutti e tre i pazienti risulta poco significativa.

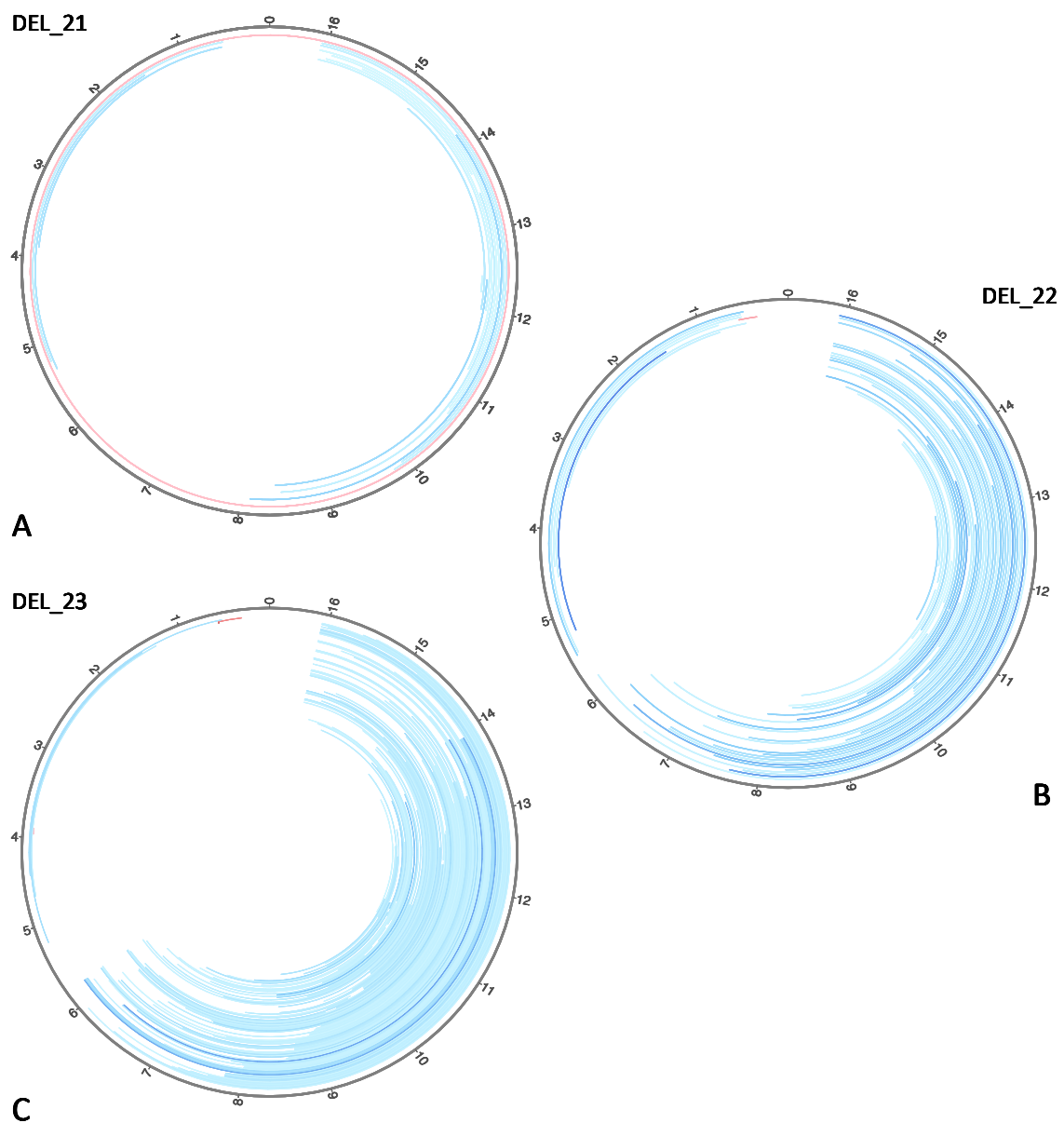


Figura 9. MitoSAlt plot: (A) DEL_21; (B) DEL_22; (C) DEL_23

È stato analizzato $n=1$ campione di un paziente con fenotipo adPEO + DOA che presenta una variante nel gene *TWNK* NM_021830.5: c.[907C>T] più una variante nel gene di *OPA1* NM_130837.3: c.[868C>T]. Il paziente DEL_24 presenta la stessa variante in *TWNK* di DEL_21 e DEL_22 ma mostra un difetto molecolare più marcato con accumulo di delezioni a livello dell'arco maggiore fino al 26.8% di frazione eteroplastica totale (**Figura 10**), nonostante la giovane età (40 anni). Sembra quindi che nel paziente DEL_24 il ruolo della variante in *TWNK*, in sinergia con il ruolo di quella in *OPA1*, porti ad un aumento dell'accumulo di delezioni rispetto ai pazienti DEL_21 e DEL_22 con solo la variante in *TWNK*.

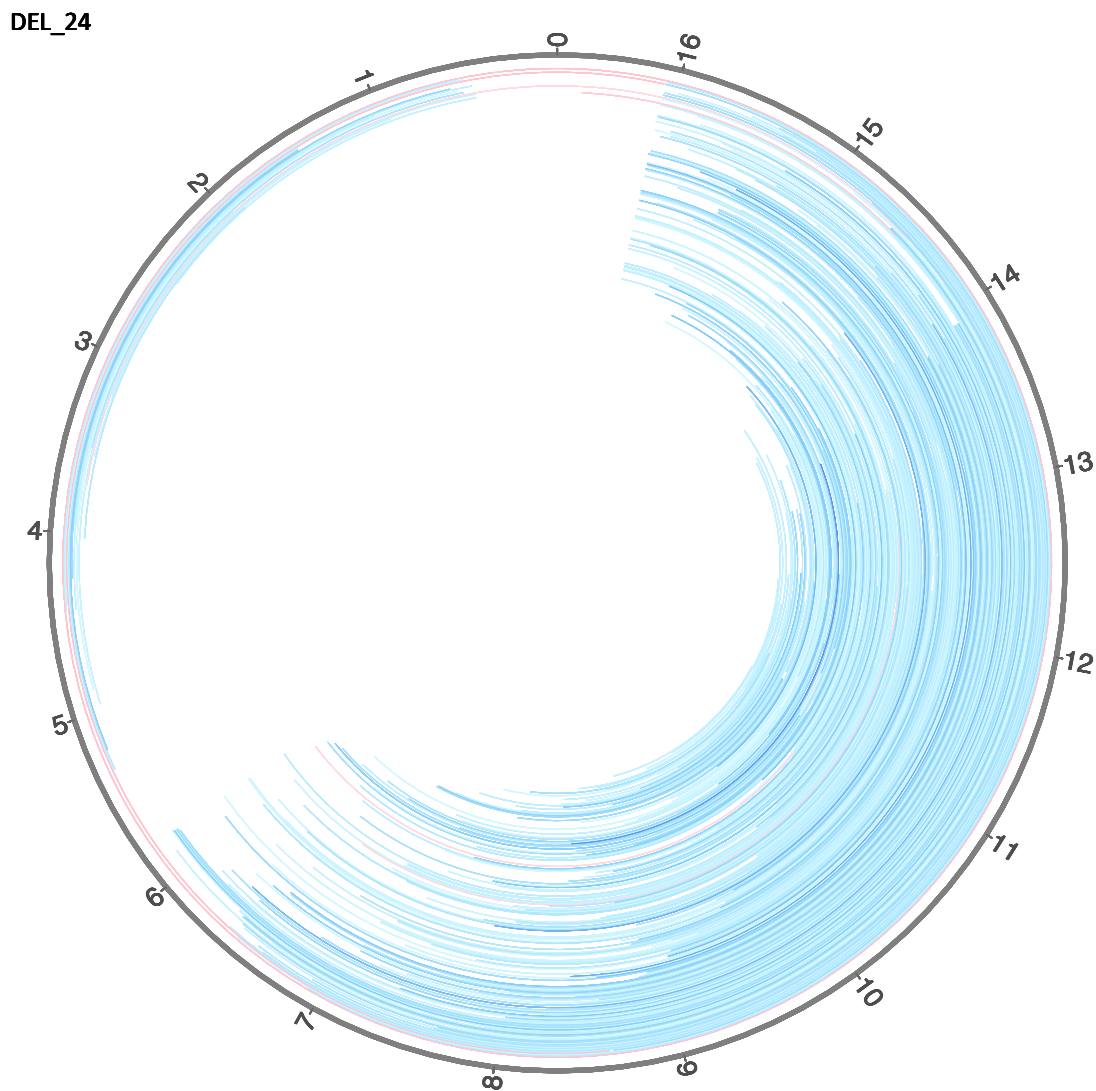


Figura 10. MitoSAlt plot: DEL_24

Sono stati analizzati $n=3$ campioni di pazienti con fenotipo adPEO, tutti e tre presentanti la stessa variante in *TWINK* c.[1001G>A] con cambio amminoacidico R334Q che cade al termine del *Primase-Like Domain* della proteina Twinkle. I pazienti DEL_25, DEL_26 e DEL_27 mostrano una distribuzione delle delezioni abbastanza sovrapponibile con accumulo prevalente a livello dell'arco maggiore, con valori di eteroplasmia pari a 0.4%, 1.2% e 1.7% rispettivamente, ed una bassa percentuale anche a livello dell'arco minore (0.8% in tutti e tre i pazienti; **Figura 11A, 11B e 11C**). Si può anche osservare una poco significativa presenza (1.2%) di duplicazioni in DEL_25.

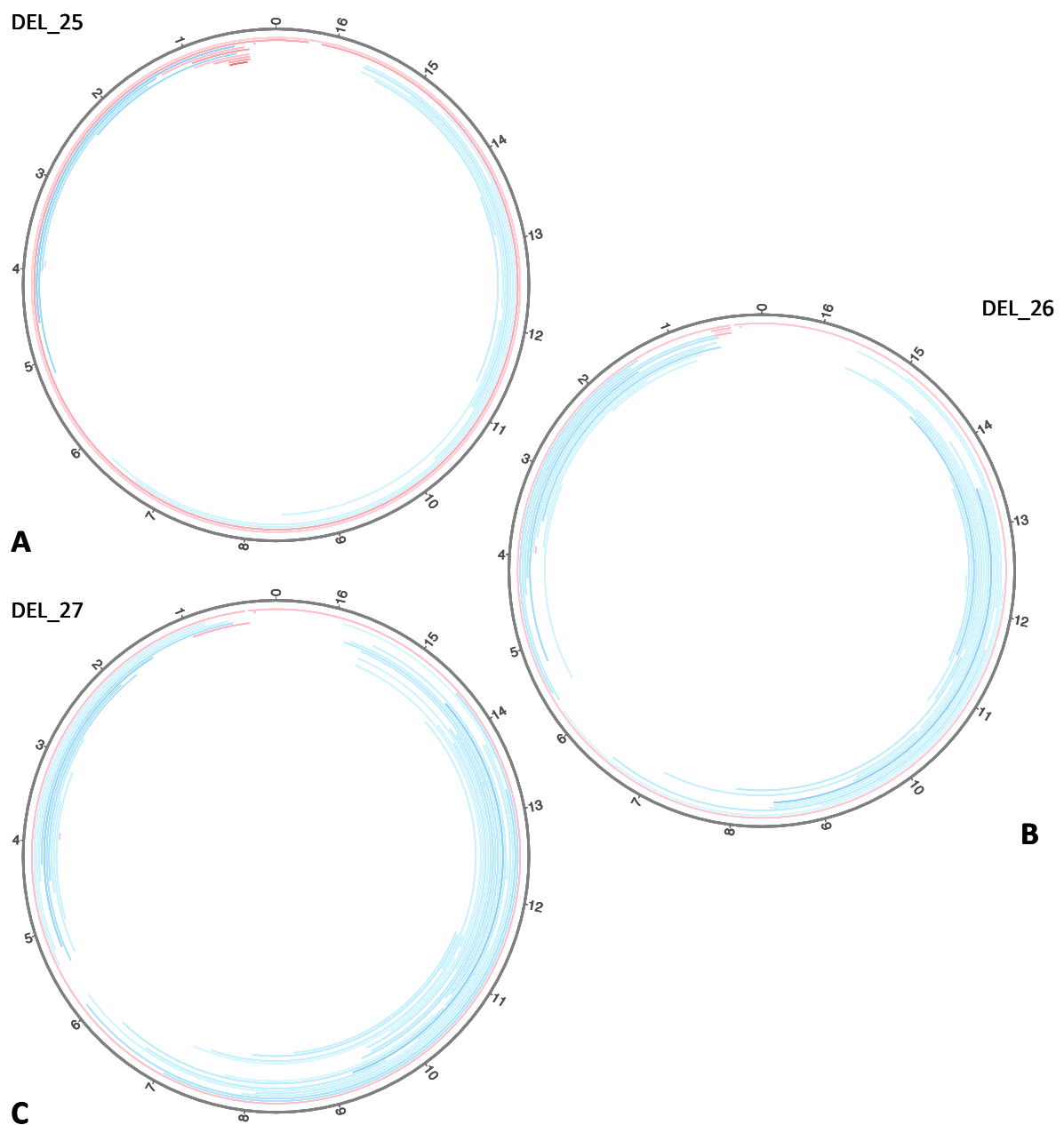


Figura 11. MitoSAlt plot: (A) DEL_25; (B) DEL_26; (C) DEL_27

In maniera simile, l'accumulo delle delezioni è piuttosto lieve anche nel paziente DEL_28, con mutazione c.[1075G>A] che provoca il cambio amminoacidico A359T e ricade all'interno della regione linker fra i due domini della proteina Twinkle. In questo caso, inoltre, le delezioni sono ripartite equamente tra arco maggiore ed arco minore, con un valore totale di eteroplasmia pari a 0.7% (**Figura 12**).

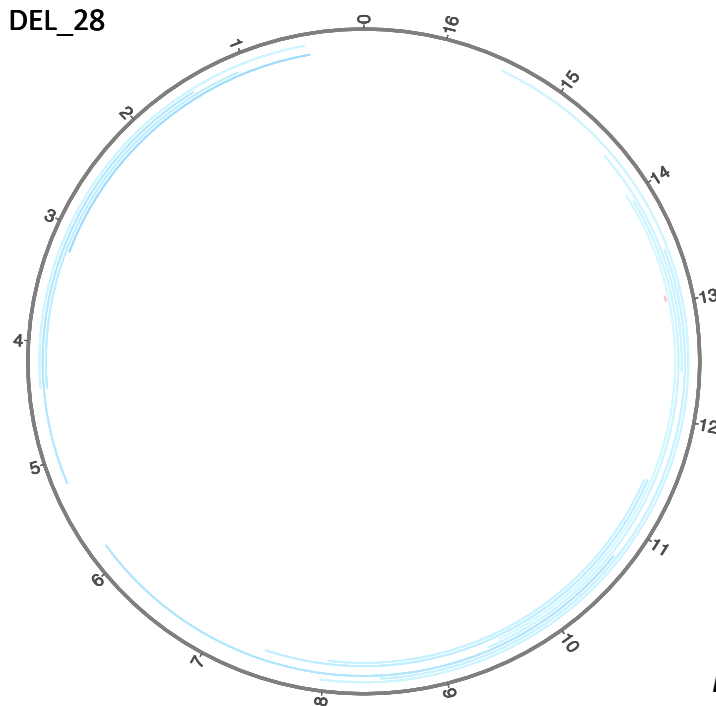


Figura 12. MitoSAIt plot: DEL_28

Sono stati analizzati $n=3$ campioni, di cui due di pazienti con fenotipo adPEO (DEL_30 e DEL_31) e un paziente (DEL_29) con fenotipo attribuibile a miopia mitocondriale, i quali riportano varianti all'interno dell'*Helicase Domain* nel gene *TWINK*, DEL_29 con c.[1172G>A] e cambio amminoacidico R391H, DEL_30 con c.[1277G>A] e cambio amminoacidico S426N, e DEL_31 con mutazione c.[1883_1885del] (**Figura 13A, 13B, 13C**). Le varianti che interessano residui nell'*Helicase Domain* sono mediamente più deleterie, tanto che risultano anche selezionate negativamente nella popolazione e piuttosto rare.

Come atteso, quindi, il difetto a carico del mtDNA è piuttosto esteso rispetto al resto della casistica *TWINK*, con eteroplasmie totali che raggiungono rispettivamente il 17,9%, 30,4% e 5,5%, più basse nel caso di delezione in-frame. Le delezioni a carico dell'arco maggiore sono preponderanti, tanto che solo lo 0,2%, 2,2% e 0,2% delle eteroplasmie sono legate a delezioni dell'arco minore.

Da notare nel plot prodotto nel caso DEL_29 che il tool riconosce una duplicazione ad elevata eteroplasmia, che tuttavia deriva da artefatto nell'interpretazione di una rara delezione di 49 bp a livello della regione di OriH (298-347del) (**Figura 13C**).

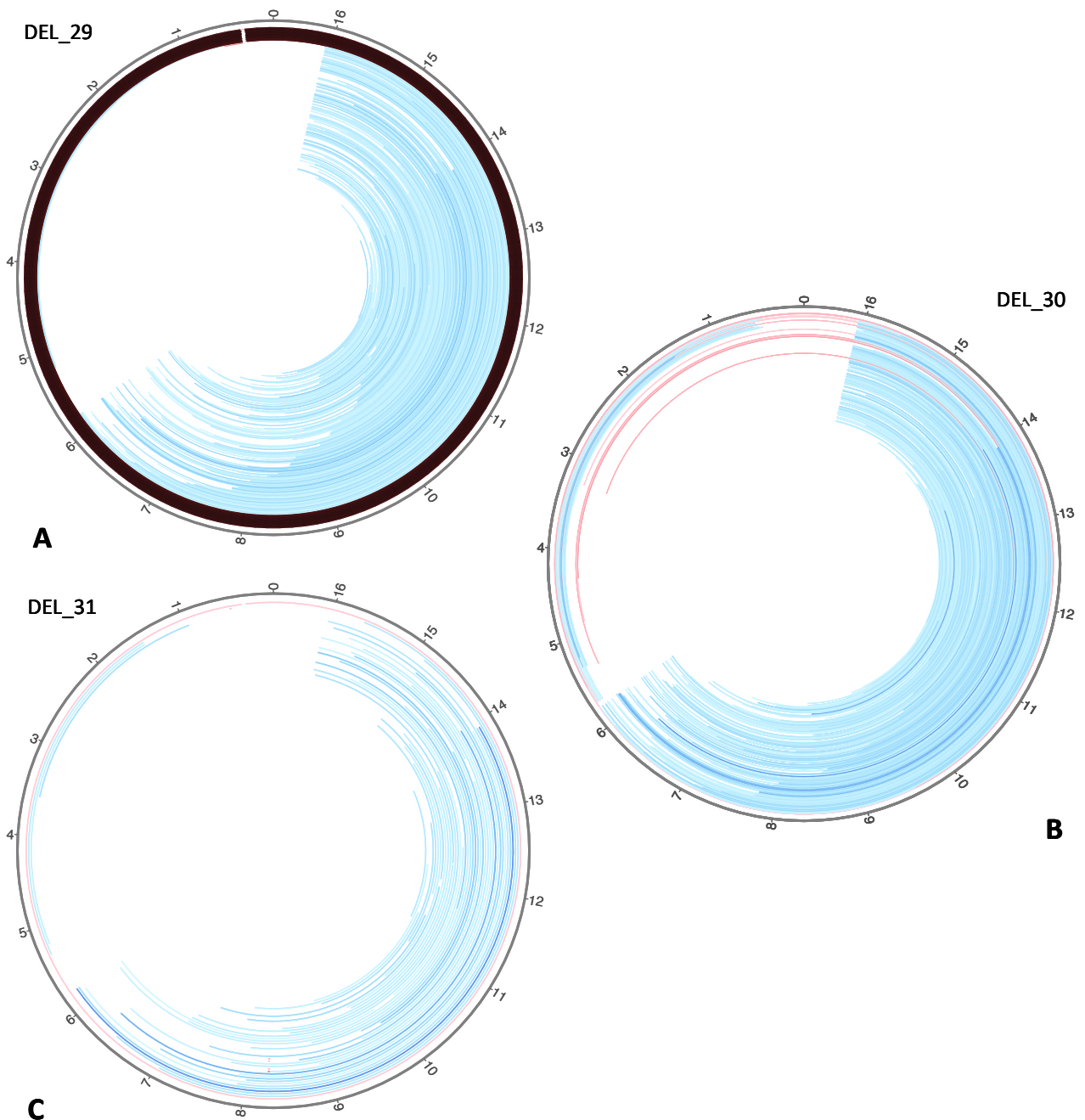


Figura 13. MitoSAlt plot: (A) DEL_29; (B) DEL_30; (C) DEL_31

- **2.8. TYMP**

Sono stati analizzati $n=3$ campioni di pazienti con fenotipo MNGIE, tutti e tre presentano varianti in omozigosi nel gene *TYMP* (NM_001953.5) che codifica per la timidina fosforilasi, di cui DEL_32 con mutazione c.[457G>A];[457G>A], DEL_33 con mutazione c.[524T>A];[524T>A] e DEL_34 con mutazione c.[1160-1G>A];[1160-1G>A]. Si osservano in tutti e tre i pazienti delezioni a livello dell'arco maggiore con bassi valori totali di eteroplasmia rispettivamente pari a 5.1%, 2.4% e 2%, mentre le delezioni a livello dell'arco maggiore risultano essere poco significative, così come per le duplicazioni ad eccezione di DEL_33 che presenta un totale di 4.6% (**Figura 14**). La MNGIE è una patologia ad insorgenza giovanile con un decorso grave e progressivo; pertanto, la scarsa presenza di delezioni potrebbe essere legata alla giovane età dei pazienti (39, 40 e 26 anni).

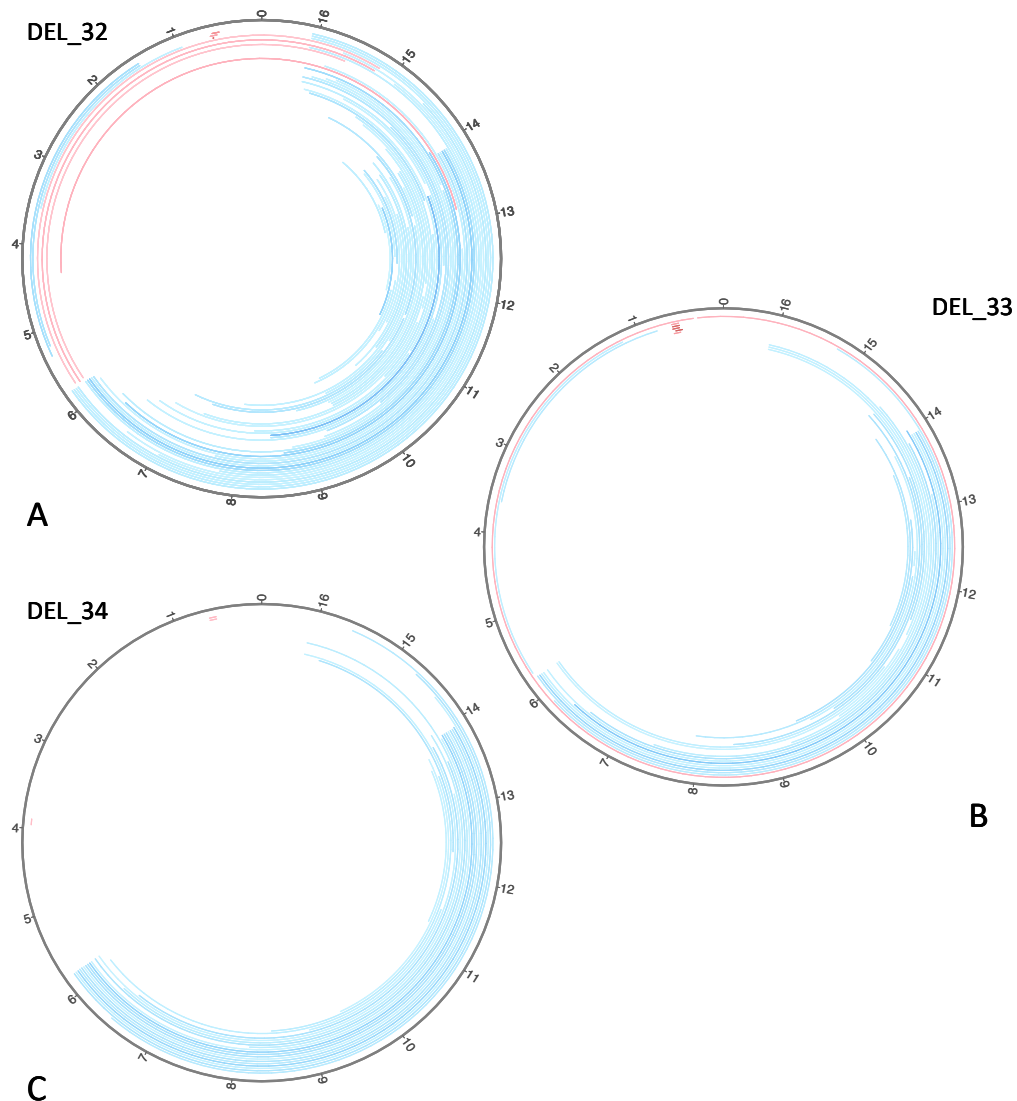


Figura 14 . MitoSAlt plot: (A) DEL_32; (B) DEL_33; (C) DEL_34

3. Comparazione generale dei pattern nei diversi geni

I risultati sulla casistica analizzata evidenziano un diverso coinvolgimento dei geni del replisoma e di quelli coinvolti nel mantenimento del pool dei nucleotidi nell'accumulo di delezioni e duplicazioni nel mtDNA. In generale, mutazioni nei geni *DGUOK* e *POLG* sembrano essere quelle più coinvolte nell'accumulo di delezioni. Nel dettaglio, si può osservare che tra i geni del replisoma, quelli maggiormente implicati sono *POLG* e *TWNK* che codificano per proteine indispensabili per la replicazione del mtDNA (**Figura 15-16**). Si può inoltre notare che per questo gruppo di geni si ha un accumulo consistente di delezioni sia a livello dell'arco maggiore che di quello minore, caratteristica invece poco apprezzabile per il gruppo dei geni del pool dei nucleotidi (**Figura 16-17**).

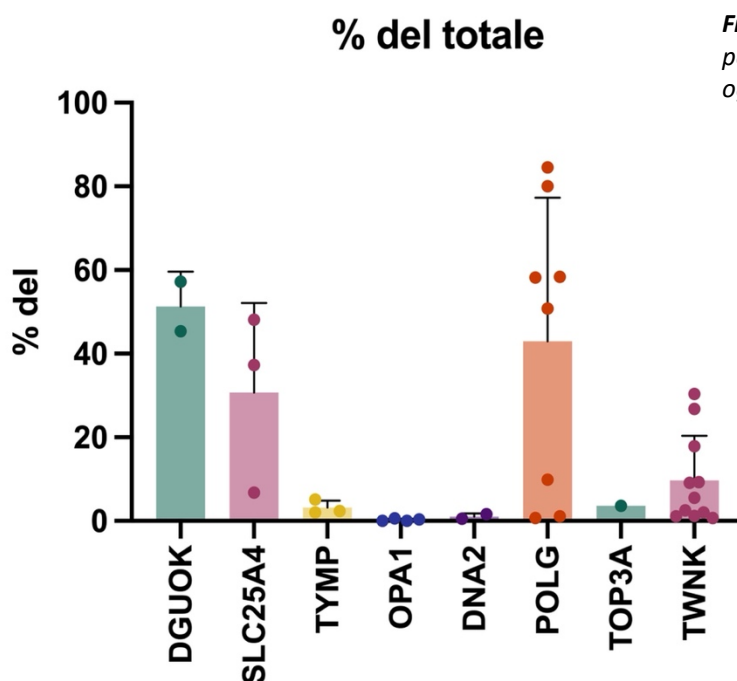


Figura 15. Istogramma rappresentativo della percentuale totale di delezioni (del) nei geni oggetto di studio

Le mutazioni a carico dei geni del replisoma sono le più caratterizzate per quanto riguarda la formazione di delezioni multiple, in questo studio confermiamo anche che questa dipenda inoltre dal dominio della proteina interessato dalla singola mutazione. Nei casi analizzati si è osservato che per *POLG* varianti che coinvolgono il dominio esonucleasico e polimerasico risultano in un maggiore accumulo di delezioni rispetto ad altre varianti in *POLG* che cadono all'interno della regione linker. Per *TWNK*, invece, varianti all'interno dell'*helicase domain* della proteina sembrerebbero essere quelle più deleterie. Inoltre, il fatto che Twinkle sia una proteina multimerica, la presenza di mutazioni dominanti negative, potrebbe in alcuni casi spiegare la gravità nell'accumulo delle delezioni.

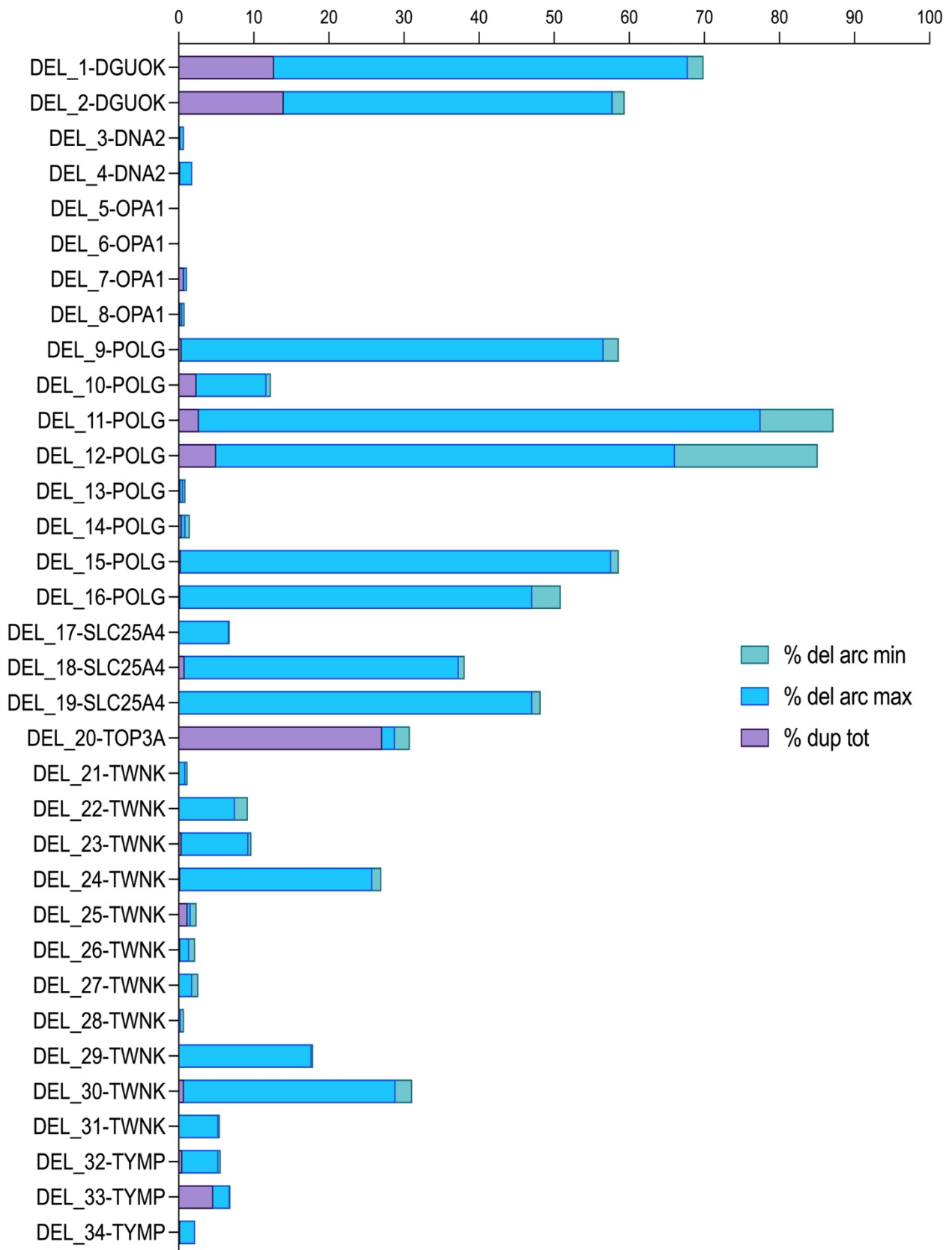


Figura 16. Rappresentazione generale di delezioni dell'arco minore, delezioni dell'arco maggiore e duplicazioni per ogni campione

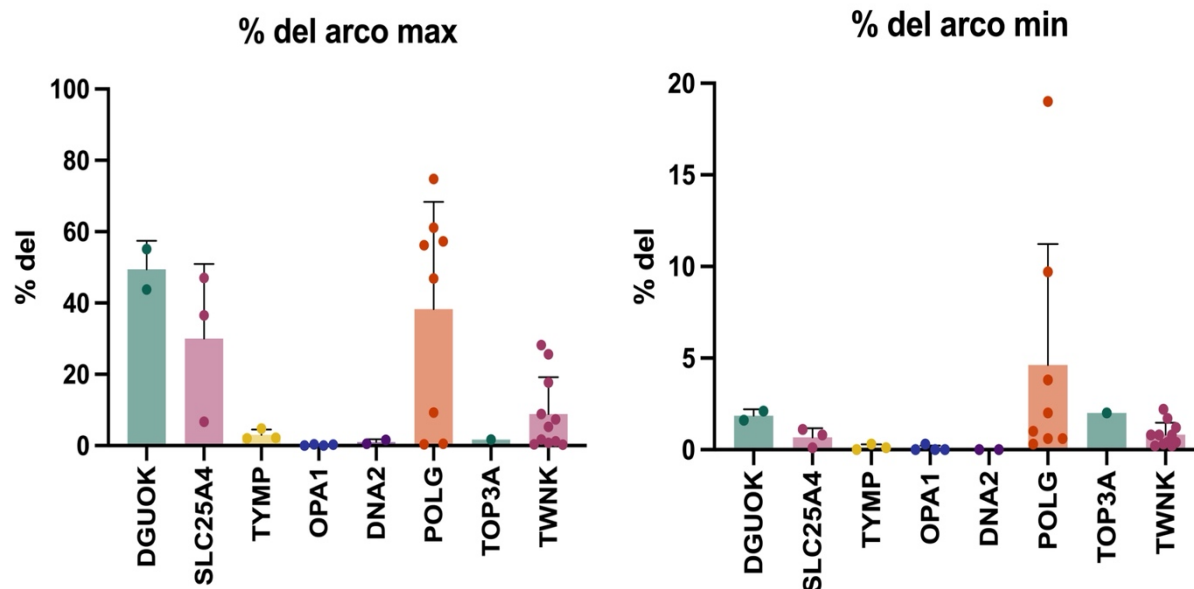


Figura 17. Percentuale di eteroplasma di delezioni (*del*) nell'arco maggiore e nell'arco minore

Un'eccezione tra i geni del replisoma è *TOP3A* in cui, sebbene si osservino delezioni, anche se con bassi valori di frazione eteroplasmica totale (**Figura 15-16-17**), si può notare un rilevante accumulo di duplicazioni (**Figura 16-18**) in particolare di piccole dimensioni e nella regione di controllo. Il pattern di distribuzione di delezioni e duplicazioni potrebbe, se confermato su una più ampia casistica, essere anche valido a fini diagnostici vista la sua unicità.

Per quanto riguarda le duplicazioni, si è osservato che oltre a *TOP3A* come già descritto, anche *DGUOK* ha mostrato un accumulo più che rilevante (**Figura 16-18**); il motivo e la causa della loro formazione non sono al momento noti. Il resto dei geni invece non mostra nessuna presenza significativa di duplicazioni.

Tra i geni del pool dei nucleotidi esaminati, quelli che hanno evidenziato un più largo accumulo di delezioni sono stati *DGUOK* e *SLC25A4* con particolare concentrazione a livello dell'arco maggiore rispetto all'arco minore (**Figura 16-17**).

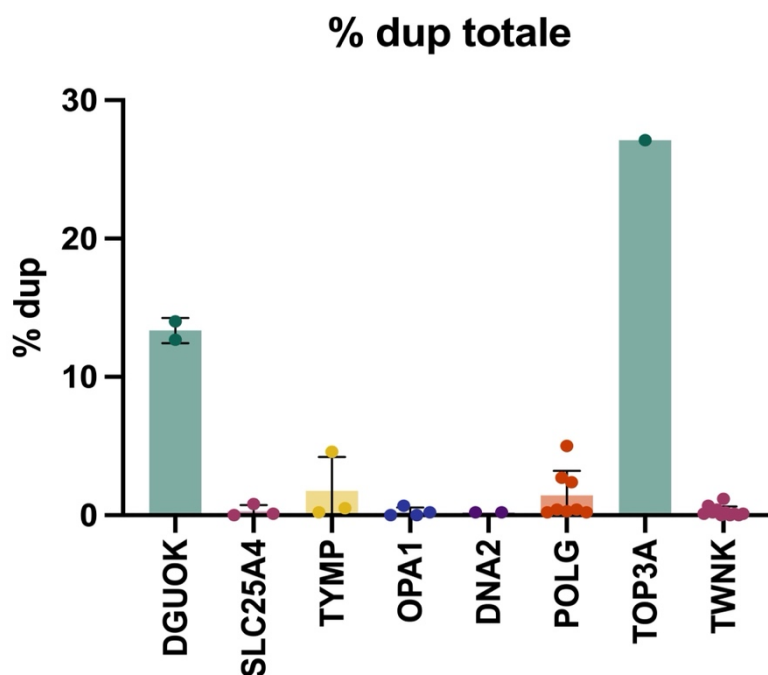


Figura 18. Percentuale di eteroplasma totale delle duplicazioni (dup) nei diversi geni

Sebbene il ruolo delle proteine del replisoma nei meccanismi di formazione delle delezioni siano abbastanza noti, non si può dire lo stesso su quello delle proteine coinvolte nel mantenimento del pool dei nucleotidi. Si ipotizza che in mancanza di un giusto bilanciamento dei nucleotidi si crei uno stallo nella replicazione, responsabile poi degli eventi che portano alla formazione delle delezioni.

Nei pazienti con varianti in *OPA1* e fenotipo DOA *plus* non è stata osservata nessuna significativa presenza di delezioni o duplicazioni. Questo risultato potrebbe essere attribuibile sia al ruolo intrinseco di *OPA1* a livello mitocondriale, in quanto non è direttamente o indirettamente coinvolto nella replicazione, e sia allo scarso coinvolgimento miopatico dei pazienti con sindrome DOA *plus* che invece mostrano una sintomatologia prettamente neurologica. Forse in questi casi a livello dei neuroni varianti in *OPA1* potrebbero provocare delezioni diversamente rispetto a quanto accade nel muscolo scheletrico.

Nel complesso, osservando l'accumulo di delezioni nei diversi geni, rispetto all'età del paziente al momento della biopsia, non si riesce a stabilire un andamento chiaro (**Figura 19**). Ciò non è inatteso data anche la grande variabilità rilevata fra pazienti con mutazioni a carico degli stessi geni. Sicuramente, un confronto in una casistica più ampia tra pazienti con stesse varianti in un gene potrebbe essere utile per definire questo aspetto. Si nota comunque per i casi *POLG* un andamento simil lineare con aumento nell'accumulo di delezioni all'aumentare dell'età.

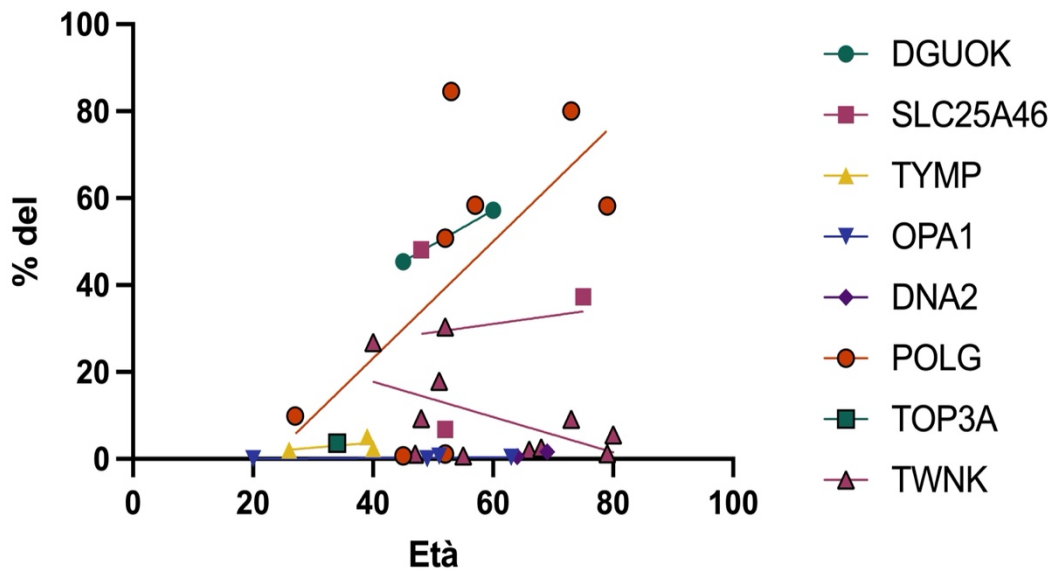


Figura 19. Percentuale di eteroplasma totale di delezioni in relazione all'età per ogni gene

La *common deletion* (nt 8470-13447), la più frequente delezione singola, risulta essere presente in circa tre quarti dei pazienti, essendo così la delezione più ricorrente nella casistica esaminata. In **Figura 19** è riportata la rappresentazione in percentuale della *common deletion* sulla percentuale di eteroplasma di delezioni a livello dell'arco maggiore per singolo campione ($n=25$). Si può notare come i livelli di eteroplasma della *common deletion* sia piuttosto correlata con la percentuale di eteroplasma delle delezioni nell'arco maggiore. Il *breakpoint* della *common deletion* sembra pertanto favorito nell'insorgenza, essendo il più comune, ma non presenta una particolare espansione clonale rimanendo paragonabile in eteroplasma alle altre delezioni per campione.

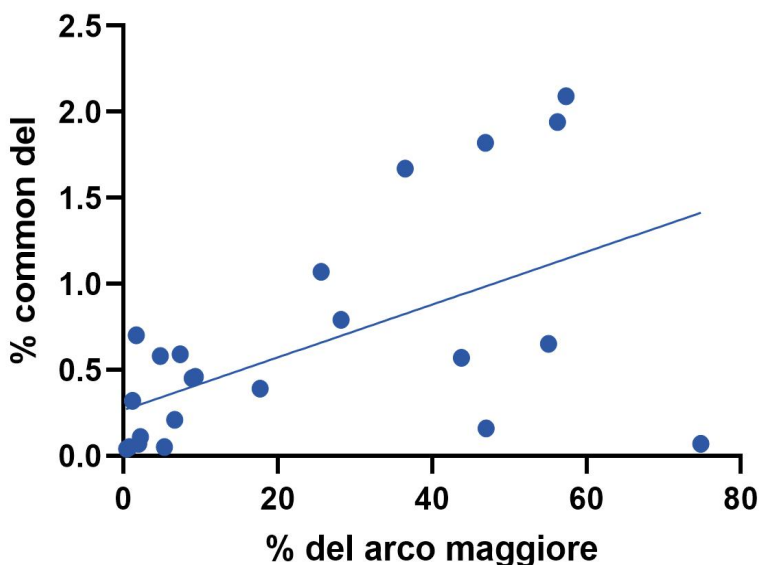


Figura 20. Rappresentazione della *common deletion* sui valori di frazione eteroplasmica relativi a delezioni dell'arco maggiore

4. Validazione delle delezioni con Long-Reads

Il caso DEL_22, con variante in *TWNK*, è stato valutato anche mediante analisi del mtDNA in *long-read sequencing* con tecnologia ONT, che consente di identificare direttamente le delezioni invece che inferirle dai *breakpoint* come ottenuto da sequenziamento NGS.

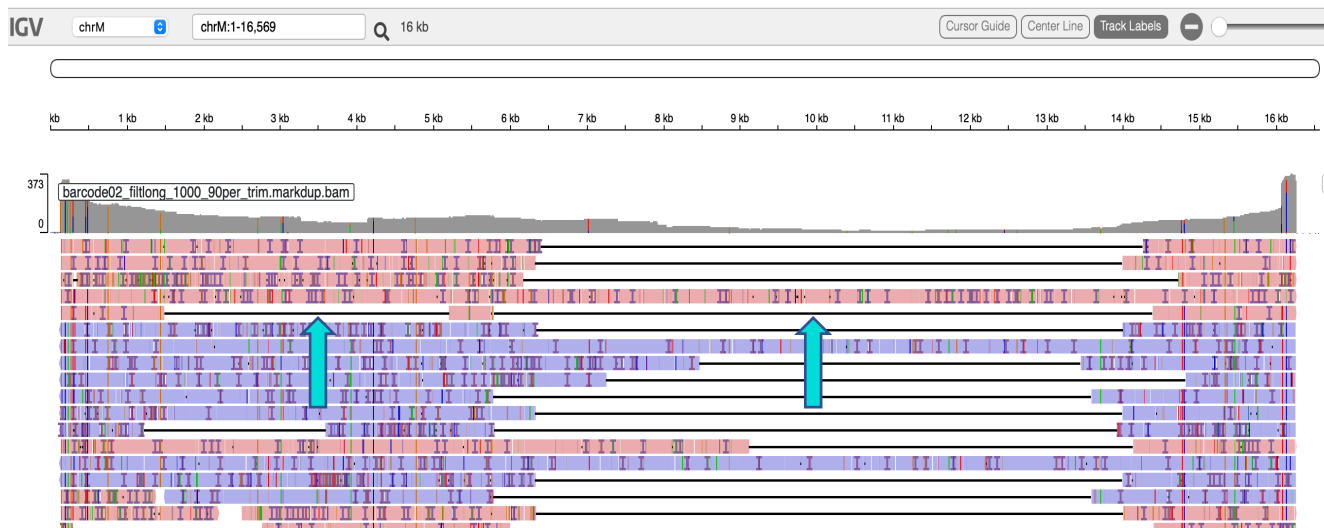


Figura 22. Overview long-reads DEL_22 con IGV: le frecce indicano due frammenti deleti in cis

Il dato ottenuto dall'analisi delle *long-reads* va a confermare quanto riscontrato mediante analisi NGS, si può notare infatti un accumulo preponderante di delezioni nella regione tra 6kb -14kb corrispondente all'arco maggiore del mtDNA. Inoltre, un dato interessante emerso solo dall'analisi con ONT è la presenza di due delezioni in cis (**Figura 22**), una nell'arco minore ed una nell'arco maggiore, andando a conservare una regione tra 5kb - 6kb corrispondente esattamente all'origine di replicazione OriL. Questo rende evidente quali sono i vantaggi dell'analisi mediante *long-reads*: permette in maniera molto più accurata la valutazione delle alterazioni strutturali come delezioni e duplicazioni rispetto alle tecniche NGS, ed in questo caso permette di mappare dei siti, risparmiati dalla delezione, che corrisponderanno sicuramente a siti utili per la replicazione. Il dato ottenuto per l'analisi è stato prodotto mediante amplificazione target del mtDNA a partire da gDNA ma per una validazione più accurata sarebbe ancora più utile partire da DNA nativo, per evitare di introdurre artefatti durante la PCR.

5. Comparazione della quantificazione delle delezioni

Una ulteriore validazione dei livelli cumulativi di eteroplasmia delle delezioni è stata effettuata mediante ddPCR, andando a quantificare in particolare il rapporto fra probe specifici per i geni MT-ND1 e MT-ND4 (**Figura 23**). Dai dati NGS sono quindi state estrapolate le sole delezioni che interessano l'arco maggiore, meno la percentuale di delezioni presenti sull'arco minore, in modo che siano comparabili al rapporto fra arco minore e maggiore visto in ddPCR.

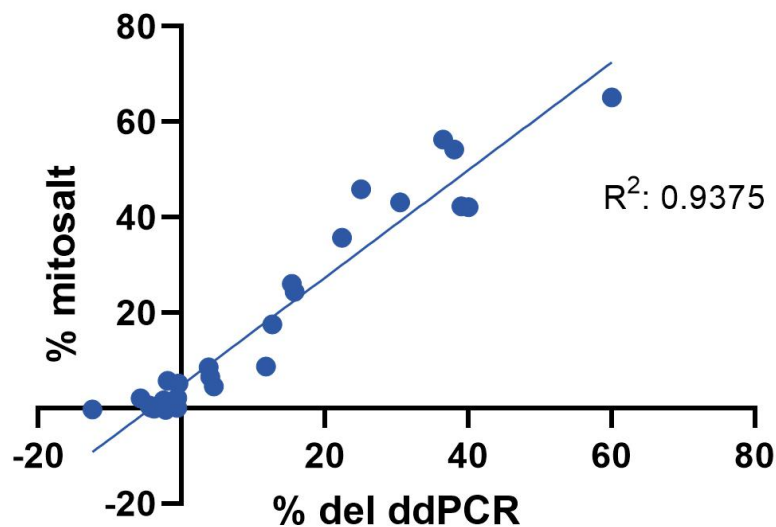


Figura 23. Confronto delle percentuali di delezioni totali ottenute con MitoSAlt e con ddPCR

Si osserva una buona correlazione fra le due tecniche, con un certo grado di incertezza in particolare per i campioni con bassi livelli totali di delezioni per i quali aumenta l'errore di quantificazione in entrambe le metodiche. Grazie a questa validazione si può affermare che il dato sulle delezioni multiple ottenuto da NGS è riproducibile e affidabile, oltre che sensibile in maniera simile alla ddPCR che rappresenta il gold standard per i saggi quantitativi del DNA.

CONCLUSIONI

L'uso congiunto del sequenziamento NGS con arricchimento target del genoma mitocondriale e dell'analisi bioinformatica con il *tool* MitoSAlt si è rivelato efficace nell'identificare e quantificare i macroriarrangiamenti del mtDNA. In particolare, la quantificazione si è dimostrata paragonabile con metodi quantitativi alternativi, con il vantaggio di avere un'unica preparazione per i macroriarrangiamenti e la sequenza nucleotidica.

Questa analisi ha permesso di identificare delezioni sull'arco minore, che sono maggiormente identificate nei pazienti con mutazione in *POLG* e *TWNK*, se rapportate alla quantità identificata nell'arco maggiore. Negli altri geni la quantità di delezioni nell'arco minore è proporzionale alla quantità di delezioni totale. Altro vantaggio di questo metodo è l'identificazione di possibili duplicazioni, la cui reale presenza dovrebbe essere validata con sequenziamento *long-reads* su DNA nativo. In particolare, la quantità di duplicazioni sembra essere associata a mutazioni nel gene *TOP3A*, come atteso essendo questo gene coinvolto nella separazione dei concatenametri di mtDNA, e nel gene *DGUOK*, il cui meccanismo resta da indagare visto il coinvolgimento nel mantenimento del *pool* dei nucleotidi.

È stato inoltre possibile valutare la presenza della *common deletion*, la più frequente delezione singola, tra le delezioni multiple. È emerso che è la più frequente anche tra le delezioni multiple, essendo presente nei $\frac{3}{4}$ dei casi analizzati, ma la quantità è paragonabile alla quantità delle altre delezioni.

La validazione, seppur di un solo campione con mutazione nel gene *TWNK*, con metodica *long-reads* ha premesso di identificare delezioni sia nell'arco maggiore che nell'arco minore della stessa molecola di mtDNA. Seppur rare, le reads contenenti la doppia delezione in *cis* mostrano anche diversi *breakpoint*, indicando una possibile origine in più eventi mutazionali disgiunti. Anche in questo caso si richiede la replica del dato su più campioni e su DNA totale nativo, in modo da evitare la presenza di possibili artefatti.

I risultati di questo studio dovranno essere confermati su altri campioni, ma l'osservazione di pattern di delezioni specifici a seconda della mutazione e del gene sono piuttosto rilevanti per poter migliorare in futuro i modelli molecolari di formazione delle delezioni, ancora in gran parte non supportati sperimentalmente.

BIBLIOGRAFIA

1. Al-Behadili, A., Uhler, J. P., Berglund, A. K., Peter, B., Doimo, M., Reyes, A., Wanrooij, S., Zeviani, M., & Falkenberg, M. (2018). A two-nuclease pathway involving RNase H1 is required for primer removal at human mitochondrial OriL. *Nucleic Acids Research*, *46*(18), 9471–9483. <https://doi.org/10.1093/nar/gky708>
2. Albertini, A. M., Hofer, M., Calos, M. P., & Miller, J. H. (1982). On the Formation of Spontaneous Deletions: The Importance of Short Sequence Homologies in the Generation of Large Deletions. In *Cell* (Vol. 29).
3. Almannai, M., El-Hattab, A. W., & Scaglia, F. (2018). Mitochondrial DNA replication: Clinical syndromes. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 62, Issue 3, pp. 297–308). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/EBC20170101>
4. Barritt, J. A., Brenner, C. A., Cohen, J., & Matt, D. W. (1999). Mitochondrial DNA rearrangements in human oocytes and embryos. In *Molecular Human Reproduction* (Vol. 5, Issue 10).
5. Basu, S., Xie, X., Uhler, J. P., Hedberg-Oldfors, C., Milenkovic, D., Baris, O. R., Kimoloi, S., Matic, S., Stewart, J. B., Larsson, N. G., Wiesner, R. J., Oldfors, A., Gustafsson, C. M., Falkenberg, M., & Larsson, E. (2020). Accurate mapping of mitochondrial DNA deletions and duplications using deep sequencing. *PLoS Genetics*, *16*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009242>
6. Berkanddavid, A. J., & Clayton, A. (1974). Mechanism of Mitochondrial DNA Replication in Mouse L-cells: Asynchronous Replication of Strands, Segregation of Circular Daughter Molecules, Aspects of Topology and Turnover of an Initiation Sequence. In *J. Mol. Biol* (Vol. 86).
7. Bharti, S. K., Sommers, J. A., Zhou, J., Kaplan, D. L., Spelbrink, J. N., Mergny, J. L., & Brosh, R. M. (2014). DNA sequences proximal to human mitochondrial DNA deletion breakpoints prevalent in human disease form G-quadruplexes, a class of DNA structures inefficiently unwound by the mitochondrial replicative twinkle helicase. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(43), 29975–29993. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567073>
8. Bugiardini, E., Poole, O. V., Manole, A., Pittman, A. M., Horga, A., Hargreaves, I., Woodward, C. E., Sweeney, M. G., Holton, J. L., Taanman, J. W., Plant, G. T., Poulton, J., Zeviani, M., Ghezzi, D., Taylor, J., Smith, C., Fratter, C., Kanikannan, M. A., Paramasivam, A., ... Pitceathly, R. D. S. (2017). Clinicopathologic and molecular spectrum of RNASEH1-related mitochondrial disease. *Neurology: Genetics*, *3*(3). <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000149>
9. Caporali, L., Bello, L., Tagliavini, F., La Morgia, C., Maresca, A., Di Vito, L., Liguori, R., Valentino, M. L., Cecchin, D., Pegoraro, E., & Carelli, V. (2018). DGUOK recessive mutations in patients with CPEO, mitochondrial myopathy, parkinsonism and mtDNA deletions. In *Brain* (Vol. 141, Issue 1, p. e3). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/brain/awx301>
10. Cerritelli, S. M., & Crouch, R. J. (2009). Ribonuclease H: The enzymes in eukaryotes. In *FEBS Journal* (Vol. 276, Issue 6, pp. 1494–1505). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06908.x>
11. Chan, S. S. L., & Copeland, W. C. (2009). DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: Understanding the consequence of POLG mutations. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1787, Issue 5, pp. 312–319). <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2008.10.007>

12. Chen, T., He, J., Huang, Y., & Zhao, W. (2011). The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells. In *Journal of Human Genetics* (Vol. 56, Issue 10, pp. 689–694). <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.97>
13. Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S., Sadlock, J., Jagiello, G., & Schon, E. A. (1995). Rearranged Mitochondrial Genomes Are Present in Human Oocytes. In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 57).
14. Chinnery, P. F., DiMauro, S., Shanske, S., Schon, E. A., Zeviani, M., Mariotti, C., Carrara, F., Lombes, A., Laforet, P., Ogier, H., Jaksch, M., Lochmüller, H., Horvath, R., Deschauer, M., Thorburn, D. R., Bindoff, L. A., Poulton, J., Taylor, R. W., Matthews, J. N., & Turnbull, D. M. (2004). Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *The Lancet*, 364(9434), 592–596. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16851-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16851-7)
15. Chinnery, P. F., Johnson, M. A., Wardell, T. M., Singh-Kler, R., Hayes, C., Brown, D. T., Taylor, R. W., Bindoff, L. A., & Turnbull, D. M. (2000). The Epidemiology of Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations. In *Ann Neurol* (Vol. 48).
16. Copeland, W. C. (n.d.). *Inherited Mitochondrial Diseases of DNA Replication*. <http://www.mitomap.org>
17. Copeland, W. C. (2014). Defects of mitochondrial DNA replication. *Journal of Child Neurology*, 29(9), 1216–1224. <https://doi.org/10.1177/0883073814537380>
18. Duxin, J. P., Dao, B., Martinsson, P., Rajala, N., Guittat, L., Campbell, J. L., Spelbrink, J. N., & Stewart, S. A. (2009). Human Dna2 Is a Nuclear and Mitochondrial DNA Maintenance Protein. *Molecular and Cellular Biology*, 29(15), 4274–4282. <https://doi.org/10.1128/mcb.01834-08>
19. El-Hattab, A. W., Craigen, W. J., & Scaglia, F. (2017). Mitochondrial DNA maintenance defects. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1863, Issue 6, pp. 1539–1555). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.017>
20. El-Hattab, A. W., & Scaglia, F. (2013). Mitochondrial DNA Depletion Syndromes: Review and Updates of Genetic Basis, Manifestations, and Therapeutic Options. In *Neurotherapeutics* (Vol. 10, Issue 2, pp. 186–198). Springer Science and Business Media, LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0177-6>
21. El-Hattab, A. W., & Scaglia, F. (2016). Mitochondrial cytopathies. In *Cell Calcium* (Vol. 60, Issue 3, pp. 199–206). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.03.003>
22. Elliott, H. R., Samuels, D. C., Eden, J. A., Relton, C. L., & Chinnery, P. F. (2008). Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. *American Journal of Human Genetics*, 83(2), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.07.004>
23. Falkenberg, M., & Gustafsson, C. M. (2020). Mammalian mitochondrial DNA replication and mechanisms of deletion formation. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 55, Issue 6, pp. 509–524). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1818684>
24. Falkenberg, M., Larsson, N. G., & Gustafsson, C. M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 76, pp. 679–699). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.152028>
25. Fan, L., Kim, S., Farr, C. L., Schaefer, K. T., Randolph, K. M., Tainer, J. A., & Kaguni, L. S. (2006). A Novel Processive Mechanism for DNA Synthesis Revealed by Structure, Modeling and

- Mutagenesis of the Accessory Subunit of Human Mitochondrial DNA Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 358(5), 1229–1243. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.073>
26. Farruggia, P., Di Cataldo, A., Pinto, R. M., Palmisani, E., Macaluso, A., Valvo, L. Lo, Cantarini, M. E., Tornesello, A., Corti, P., Fioredda, F., Varotto, S., Martire, B., Moroni, I., Puccio, G., Russo, G., Dufour, C., & Pillon, M. (2016). Pearson syndrome: A retrospective cohort study from the marrow failure study group of A.I.E.O.P. (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). In *JIMD Reports* (Vol. 26, pp. 37–43). Springer. https://doi.org/10.1007/8904_2015_470
 27. Fontana, G. A., & Gahlon, H. L. (2020). Mechanisms of replication and repair in mitochondrial DNA deletion formation. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 48, Issue 20, pp. 11244–11258). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa804>
 28. Fox, S. B., Moghaddam, A., Westwood, M., Turley, H., Bicknell, R., Gatter, K. C., & Harris, A. L. (1995). Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in normal tissues: An immunohistochemical study. *The Journal of Pathology*, 176(2), 183–190. <https://doi.org/10.1002/path.1711760212>
 29. Fratter, C., Gorman, G. S., Stewart, J. D., Buddles, M., Smith, C., Evans, J., Seller, A., Poulton, J., Roberts, F. M., Hanna, M. G., Rahman, F. S., Omer, S. E., Klopstock, F. T., Schoser, B., Kornblum, C., Czermin, B., Lecky, B., Blakely, E. L., Craig, K., ... Taylor, R. W. (2010). *The clinical, histochemical, and molecular spectrum of PEO1 (Twinkle)-linked adPEO*. www.neurology.org
 30. Fukui, H., & Moraes, C. T. (2009). Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. *Human Molecular Genetics*, 18(6), 1028–1036. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn437>
 31. Fusté, J. M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C. E., Cluett, T. J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I. J., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2010). Mitochondrial RNA Polymerase Is Needed for Activation of the Origin of Light-Strand DNA Replication. *Molecular Cell*, 37(1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.021>
 32. Graziewicz, M. A., Longley, M. J., Bienstock, R. J., Zeviani, M., & Copeland, W. C. (2004). Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(8), 770–776. <https://doi.org/10.1038/nsmb805>
 33. Guo, L., Wang, X., & Ji, H. (2020). Clinical phenotype and genetic features of a pair of chinese twins with kearns-sayre syndrome. *DNA and Cell Biology*, 39(8), 1449–1457. <https://doi.org/10.1089/dna.2019.5010>
 34. Guo, X., Popadin, K. Y., Markuzon, N., Orlov, Y. L., Kraytsberg, Y., Krishnan, K. J., Zsurka, G., Turnbull, D. M., Kunz, W. S., & Khrapko, K. (2010). Repeats, longevity and the sources of mtDNA deletions: Evidence from ‘deletional spectra’. In *Trends in Genetics* (Vol. 26, Issue 8, pp. 340–343). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.05.006>
 35. Gustafsson, C. M., Falkenberg, M., & Larsson, N. G. (2016). Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 133–160. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014402>
 36. Haber, J. E. (2000). Partners and pathways. *Trends in Genetics*, 16(6), 259–264. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02022-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02022-9)

37. Hakonen, A. H., Isohanni, P., Paetau, A., Herva, R., Suomalainen, A., & Lönnqvist, T. (2007). Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain*, *130*(11), 3032–3040. <https://doi.org/10.1093/brain/awm242>
38. Hanisch, F., Kornhuber, M., Alston, C. L., Taylor, R. W., Deschauer, M., & Zierz, S. (2015). SANDO syndrome in a cohort of 107 patients with CPEO and mitochondrial DNA deletions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *86*(6), 630–634. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-306748>
39. Holmlund, T., Farge, G., Pande, V., Korhonen, J., Nilsson, L., & Falkenberg, M. (2009). Structure-function defects of the twinkle amino-terminal region in progressive external ophthalmoplegia. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1792*(2), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.11.009>
40. Holt IJ, Harding AE, & Morgan-Hughes JA. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, *331*, 717–719.
41. Jiang, T., Liu, Y., Jiang, Y., Li, J., Gao, Y., Cui, Z., Liu, Y., Liu, B., & Wang, Y. (2020). Long-read-based human genomic structural variation detection with cuteSV. *Genome Biology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02107-y>
42. Kaguni, L. S. (2004). DNA polymerase γ , the mitochondrial replicase. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 73, pp. 293–320). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161455>
43. Kaukonen, J., Juselius, J. K., Tiranti, V., Kyttälä, A., Zeviani, M., Comi, G. P., Keränen, S., Peltonen, L., & Suomalainen, A. (2000). Role of Adenine Nucleotide Translocator 1 in mtDNA Maintenance. *Science*, *289*(5480), 782–785. <https://doi.org/10.1126/science.289.5480.782>
44. Kiełbasa, S. M., Wan, R., Sato, K., Horton, P., & Frith, M. C. (2011). Adaptive seeds tame genomic sequence comparison. *Genome Research*, *21*(3), 487–493. <https://doi.org/10.1101/gr.113985.110>
45. Kisilevsky, E., Freund, P., & Margolin, E. (2020). Mitochondrial disorders and the eye. In *Survey of Ophthalmology* (Vol. 65, Issue 3, pp. 294–311). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2019.11.001>
46. Korhonen, J. A., Gaspari, M., & Falkenberg, M. (2003). TWINKLE has 5' → 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(49), 48627–48632. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306981200>
47. Kornblum, C., Nicholls, T. J., Haack, T. B., Schöler, S., Peeva, V., Danhauser, K., Hallmann, K., Zsurka, G., Rorbach, J., Iuso, A., Wieland, T., Sciacco, M., Ronchi, D., Comi, G. P., Moggio, M., Quinzii, C. M., Dimauro, S., Calvo, S. E., Mootha, V. K., ... Prokisch, H. (2013). Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nature Genetics*, *45*(2), 214–219. <https://doi.org/10.1038/ng.2501>
48. Krishnan, K. J., Reeve, A. K., Samuels, D. C., Chinnery, P. F., Blackwood, J. K., Taylor, R. W., Wanrooij, S., Spelbrink, J. N., Lightowlers, R. N., & Turnbull, D. M. (2008). What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? In *Nature Genetics* (Vol. 40, Issue 3, pp. 275–279). <https://doi.org/10.1038/ng.f.94>

49. Lakshmanan, L. N., Gruber, J., Halliwell, B., & Gunawan, R. (2012). Role of direct repeat and stem-loop motifs in mtDNA deletions: Cause or coincidence? *PLoS ONE*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035271>
50. Li, H. (2018). Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, *34*(18), 3094–3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>
51. Lim, S. E., Longley, M. J., & Copeland, W. C. (1999). The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase γ enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(53), 38197–38203. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.38197>
52. Lima, W. F., Rose, J. B., Nichols, J. G., Wu, H., Migawa, M. T., Wyrzykiewicz, T. K., Siwkowski, A. M., & Crooke, S. T. (2007). Human RNase H1 discriminates between subtle variations in the structure of the heteroduplex substrate. *Molecular Pharmacology*, *71*(1), 83–91. <https://doi.org/10.1124/mol.106.025015>
53. Longley, M. J., Clark, S., Yu, C., Man, W., Hudson, G., Durham, S. E., Taylor, R. W., Nightingale, S., Turnbull, D. M., Copeland, W. C., & Chinnery, P. F. (2006). Mutant POLG2 Disrupts DNA Polymerase γ Subunits and Causes Progressive External Ophthalmoplegia. In *The American Journal of Human Genetics* (Vol. 78). www.ajhg.org
54. Longley, M. J., Nguyen, D., Kunkel, T. A., & Copeland, W. C. (2001). The Fidelity of Human DNA Polymerase γ with and without Exonucleolytic Proofreading and the p55 Accessory Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(42), 38555–38562. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105230200>
55. López-Gallardo, E., López-Pérez, M. J., Montoya, J., & Ruiz-Pesini, E. (2009). CPEO and KSS differ in the percentage and location of the mtDNA deletion. *Mitochondrion*, *9*(5), 314–317. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.04.005>
56. Luoma, P., Melberg, A., Rinne, J. O., Kaukonen, J. A., Nupponen, N. N., Chalmers, R. M., Oldfors, A., Rautakorpi, I., Peltonen, L., Majamaa, K., Somer, H., & Suomalainen, A. (2004). Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase γ mutations: clinical and molecular genetic study. *The Lancet*, *364*(9437), 875–882. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16983-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16983-3)
57. Macao, B., Uhler, J. P., Siibak, T., Zhu, X., Shi, Y., Sheng, W., Olsson, M., Stewart, J. B., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2015). The exonuclease activity of DNA polymerase γ is required for ligation during mitochondrial DNA replication. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms8303>
58. Mandel, H., Szargel, R., Labay, V., Elpeleg, O., Saada, A., Shalata, A., Anbinder, Y., Berkowitz, D., Hartman, C., Barak, M., Eriksson, S., & Cohen, N. (2001). The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, *29*(3), 337–341. <https://doi.org/10.1038/ng746>
59. Manini, A., Caporali, L., Meneri, M., Zanotti, S., Piga, D., Arena, I. G., Corti, S., Toscano, A., Comi, G. Pietro, Musumeci, O., Carelli, V., & Ronchi, D. (2022). Case Report: Rare Homozygous RNASEH1 Mutations Associated With Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy and Multiple Mitochondrial DNA Deletions. *Frontiers in Genetics*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.906667>

60. Maria Manea, E., Leverger, G., Bellmann, F., Alina Stanescu, P., Mircea, A., Ro, A., & Munnich, A. (2009). *Pearson Syndrome in the Neonatal Period Two Case Reports and Review of the Literature*. www.jpho-online.com
61. McClelland, C., Manousakis, G., & Lee, M. S. (2016). Progressive External Ophthalmoplegia. In *Current Neurology and Neuroscience Reports* (Vol. 16, Issue 6). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11910-016-0652-7>
62. Mcshane, M. A., Hammansaj, S. R., Sweeney, M., Holt, J., Beattiet, T. J., Brett, E. M., & Hardingt, A. E. (1991). Pearson Syndrome and Mitochondrial Encephalomyopathy in a Patient with a Deletion of mtDNA. In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 48).
63. Milenkovic, D., Matic, S., kühl, I., Ruzzenente, B., Freyer, C., Jemt, E., Park, C. B., Falkenberg, M., & Larsson, N. G. (2013). Twinkle is an essential mitochondrial helicase required for synthesis of nascent D-loop strands and complete mtDNA replication. *Human Molecular Genetics*, 22(10), 1983–1993. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt051>
64. Miralles Fusté, J., Shi, Y., Wanrooij, S., Zhu, X., Jemt, E., Persson, Ö., Sabouri, N., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2014). In Vivo Occupancy of Mitochondrial Single-Stranded DNA Binding Protein Supports the Strand Displacement Mode of DNA Replication. *PLoS Genetics*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004832>
65. Montano, V., Simoncini, C., Cali, C. L., Legati, A., Siciliano, G., & Mancuso, M. (2019). CPEO and Mitochondrial Myopathy in a Patient with DGUOK Compound Heterozygous Pathogenetic Variant and mtDNA Multiple Deletions . *Case Reports in Neurological Medicine*, 2019, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2019/5918632>
66. Moraes, C. T., Sciacco, M., Ricci, E., Tengan, C. H., Hao, H., Bonilla, E., Schon, E. A., & Dimauro, S. (n.d.). *PHENOTYPE-GENOTYPE CORRELATIONS IN SKELETAL MUSCLE OF PATIENTS WITH mtDNA DELETIONS*.
67. Mullie, M. A., Harding, A. E., H Petty, R. K., Ikeda, H., Morgan-Hughes, J. A., & Sanders, M. D. (1985). *The Retinal Manifestations of Mitochondrial Myopathy A Study of 22 Cases*. <http://archopht.jamanetwork.com/>
68. Nicholls, T. J., Zsurka, G., Peeva, V., Schöler, S., Szczesny, R. J., Cysewski, D., Reyes, A., Kornblum, C., Sciacco, M., Moggio, M., Dziembowski, A., Kunz, W. S., & Minczuk, M. (2014). Linear mtDNA fragments and unusual mtDNA rearrangements associated with pathological deficiency of MGME1 exonuclease. *Human Molecular Genetics*, 23(23), 6147–6162. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu336>
69. Nido, G. S., Dölle, C., Flønes, I., Tuppen, H. A., Alves, G., Tysnes, O. B., Haugarvoll, K., & Tzoulis, C. (2018). Ultradeep mapping of neuronal mitochondrial deletions in Parkinson’s disease. *Neurobiology of Aging*, 63, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.024>
70. Nishino, I., Spinazzola, A., & Hirano, M. (1999). Thymidine Phosphorylase Gene Mutations in MNGIE, a Human Mitochondrial Disorder. *Science*, 283(5402), 689–692. <https://doi.org/10.1126/science.283.5402.689>
71. Nissanka, N., & Moraes, C. T. (2018). Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. In *FEBS Letters* (Vol. 592, Issue 5, pp. 728–742). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12956>

72. Nlm Citation: Goldstein, A., Falk, M. ; J., Adam, M. P., Mirzaa, G. M., & Pagon, R. A. (2003). *Mitochondrial DNA Deletion Syndromes*.
73. Oliveira, M. T., Pontes, C. de B., & Ciesielski, G. L. (2020). Roles of the mitochondrial replisome in mitochondrial DNA deletion formation. In *Genetics and Molecular Biology* (Vol. 43, Issue 1). Brazilian Journal of Genetics. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0069>
74. Pacitti, D., Levene, M., Garone, C., Nirmalanathan, N., & Bax, B. E. (2018). Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy: Into the Fourth Decade, What We Have Learned So Far. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00669>
75. Palmieri, L., Alberio, S., Pisano, I., Lodi, T., Meznaric-Petrusa, M., Zidar, J., Santoro, A., Scarcia, P., Fontanesi, F., Lamantea, E., Ferrero, I., & Zeviani, M. (2005). Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*, 14(20), 3079–3088. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi341>
76. Pearson, H. A., Lobel, J. S., Kocoshis, S. A., Naiman, J. L., Windmiller, J., Lammi, A. T., Hoffman, R., & Marsh, J. C. (1979). A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *The Journal of Pediatrics*, 95(6), 976–984. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(79\)80286-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(79)80286-3)
77. Persson, Ö., Muthukumar, Y., Basu, S., Jenninger, L., Uhler, J. P., Berglund, A. K., McFarland, R., Taylor, R. W., Gustafsson, C. M., Larsson, E., & Falkenberg, M. (2019). Copy-choice recombination during mitochondrial L-strand synthesis causes DNA deletions. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08673-5>
78. Peter, B., & Falkenberg, M. (2020). TWINKLE and other human mitochondrial DNA helicases: Structure, function and disease. In *Genes* (Vol. 11, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes11040408>
79. Petty, R. K. H., Harding, A. E., & Morgan-Hughes, J. A. (1986). THE CLINICAL FEATURES OF MITOCHONDRIAL MYOPATHY. In *Brain* (Vol. 109). <http://brain.oxfordjournals.org/>
80. Pitceathly, R. D. S., Rahman, S., & Hanna, M. G. (2012). Single deletions in mitochondrial DNA - Molecular mechanisms and disease phenotypes in clinical practice. In *Neuromuscular Disorders* (Vol. 22, Issue 7, pp. 577–586). <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.03.009>
81. Rahman, S., & Copeland, W. C. (2019). POLG-related disorders and their neurological manifestations. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 15, Issue 1, pp. 40–52). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0101-0>
82. Reeve, A. K., Krishnan, K. J., Elson, J. L., Morris, C. M., Bender, A., Lightowers, R. N., & Turnbull, D. M. (2008). Nature of Mitochondrial DNA Deletions in Substantia Nigra Neurons. *American Journal of Human Genetics*, 82(1), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.018>
83. Reyes, A., Melchionda, L., Nasca, A., Carrara, F., Lamantea, E., Zanolini, A., Lamperti, C., Fang, M., Zhang, J., Ronchi, D., Bonato, S., Fagiolari, G., Moggio, M., Ghezzi, D., & Zeviani, M. (2015a). RNASEH1 Mutations Impair mtDNA Replication and Cause Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy. *American Journal of Human Genetics*, 97(1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.05.013>

84. Reyes, A., Melchionda, L., Nasca, A., Carrara, F., Lamantea, E., Zanolini, A., Lamperti, C., Fang, M., Zhang, J., Ronchi, D., Bonato, S., Fagiolari, G., Moggio, M., Ghezzi, D., & Zeviani, M. (2015b). RNASEH1 Mutations Impair mtDNA Replication and Cause Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy. *American Journal of Human Genetics*, *97*(1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.05.013>
85. Robberson, D. L., Kasamatsu, H., & Vinogradt, J. (1972). *Replication of Mitochondrial DNA. Circular Replicative Intermediates in Mouse L Cells (electron microscopy/separated strands/duplex synthesis/displacement synthesis)* (Vol. 69, Issue 3).
86. Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. In *Nature Biotechnology* (Vol. 29, Issue 1, pp. 24–26). <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
87. Rocha, M. C., Rosa, H. S., Grady, J. P., Blakely, E. L., He, L., Romain, N., Haller, R. G., Newman, J., McFarland, R., Ng, Y. S., Gorman, G. S., Schaefer, A. M., Tuppen, H. A., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2018). Pathological mechanisms underlying single large-scale mitochondrial DNA deletions. *Annals of Neurology*, *83*(1), 115–130. <https://doi.org/10.1002/ana.25127>
88. Ronchi, D., Di Fonzo, A., Lin, W., Bordoni, A., Liu, C., Fassone, E., Pagliarini, S., Rizzuti, M., Zheng, L., Filosto, M., Ferrò, M. T., Ranieri, M., Magri, F., Peverelli, L., Li, H., Yuan, Y. C., Corti, S., Sciacco, M., Moggio, M., ... Comi, G. Pietro. (2013). Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. *American Journal of Human Genetics*, *92*(2), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.12.014>
89. Ronchi, D., Garone, C., Bordoni, A., Gutierrez Rios, P., Calvo, S. E., Ripolone, M., Ranieri, M., Rizzuti, M., Villa, L., Magri, F., Corti, S., Bresolin, N., Mootha, V. K., Moggio, M., Dimauro, S., Comi, G. P., & Sciacco, M. (2012). Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions. *Brain*, *135*(11), 3404–3415. <https://doi.org/10.1093/brain/aws258>
90. Ronchi, D., Liu, C., Caporali, L., Piga, D., Li, H., Tagliavini, F., Valentino, M. L., Ferrò, M. T., Bini, P., Zheng, L., Carelli, V., Shen, B., & Comi, G. Pietro. (2019). Novel mutations in DNA2 associated with myopathy and mtDNA instability. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *6*(9), 1893–1899. <https://doi.org/10.1002/acn3.50888>
91. Rotig, A., Bourgeron, T., Chretien, D., Rustin, P., & Munnich, A. (1995a). Spectrum of mitochondrial DNA rearrangements in the Pearson marrow-pancreas syndrome. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 4, Issue 8). <http://hmg.oxfordjournals.org/>
92. Rotig, A., Bourgeron, T., Chretien, D., Rustin, P., & Munnich, A. (1995b). Spectrum of mitochondrial DNA rearrangements in the Pearson marrow-pancreas syndrome. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 4, Issue 8). <http://hmg.oxfordjournals.org/>
93. Rötig, A., Colonna, M., Blanche, S., Fischer, A., Le Deist, F., Frezal, J., Saudubray, J.-M., & Munnich, A. (1988). DELETION OF BLOOD MITOCHONDRIAL DNA IN PANCYTOPENIA. *The Lancet*, *332*(8610), 567–568. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)92687-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)92687-6)
94. Samuels, D. C., Schon, E. A., & Chinnery, P. F. (2004). Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends in Genetics*, *20*(9), 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.07.003>

95. Schon, E. A., Dimauro, S., & Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 12, pp. 878–890). <https://doi.org/10.1038/nrg3275>
96. Sedlazeck, F. J., Rescheneder, P., Smolka, M., Fang, H., Nattestad, M., Von Haeseler, A., & Schatz, M. C. (2018). Accurate detection of complex structural variations using single-molecule sequencing. *Nature Methods*, 15(6), 461–468. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0001-7>
97. Shoffner, J. M., Lorrt, M. T., Voljavect, A. S., Soueidan, S. A., Costigan, D. A., & Wallace, D. C. (1989). Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: A slip-replication model and metabolic therapy (oxidative phosphorylation/polymerase chain reaction/coenzyme Q10/succinate). In *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (Vol. 86).
98. Simoncini, C., Siciliano, G., Tognoni, G., & Mancuso, M. (2017). Mitochondrial ANT-1 related adPEO leading to cognitive impairment: is there a link? In *Acta Myologica •: Vol. XXXVI*.
99. Spelbrink, J. N., Li, F.-Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q.-P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., Santoro, L., Toscano, A., Fabrizi, G.-M., Somer, H., Croxen, R., Beeson, D., Poulton, J., Suomalainen, A., Jacobs, H. T., ... Larsson, C. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature Genetics*, 28(3), 223–231. <https://doi.org/10.1038/90058>
100. Spinazzola, A. (2011). Mitochondrial DNA mutations and depletion in pediatric medicine. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 16, Issue 4, pp. 190–196). <https://doi.org/10.1016/j.siny.2011.04.011>
101. Stepien, G., Torroni, A., Chung, A. B., Hodge, J. A., & Wallaces, D. C. (1992). Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14592–14597. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42082-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42082-0)
102. Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2015). The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: Implications for human health and disease. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 16, Issue 9, pp. 530–542). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3966>
103. Tang, S., Wang, J., Lee, N. C., Milone, M., Halberg, M. C., Schmitt, E. S., Craigen, W. J., Zhang, W., & Wong, L. J. C. (2011). Mitochondrial DNA polymerase γ mutations: An ever expanding molecular and clinical spectrum. *Journal of Medical Genetics*, 48(10), 669–681. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100222>
104. Tne, J., Berkovicb, S., SaifuddinNoer, A., Kapsa RenateM Kalninsc, R. M., & Sasmonoa, T. (1997). Developmentalgenetics of deletedmtDNA in mitochondrial oculomyopathy. In *Journal of the Neurological Sciences* (Vol. 145).
105. Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1797, Issue 2, pp. 113–128). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.09.005>
106. Uhler, J. P., Thörn, C., Nicholls, T. J., Matic, S., Milenkovic, D., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2016). MGME1 processes flaps into ligatable nicks in concert with DNA polymerase γ during

- mtDNA replication. *Nucleic Acids Research*, 44(12), 5861–5871. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw468>
107. Van Goethem, G., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J.-J., & Van Broeckhoven, C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature Genetics*, 28(3), 211–212. <https://doi.org/10.1038/90034>
 108. Vilarinho, S., Sari, S., Yilmaz, G., Stiegler, A. L., Boggon, T. J., Jain, D., Akyol, G., Dalgic, B., Günel, M., & Lifton, R. P. (2016). Recurrent recessive mutation in deoxyguanosine kinase causes idiopathic noncirrhotic portal hypertension. *Hepatology*, 63(6), 1977–1986. <https://doi.org/10.1002/hep.28499>
 109. Wanrooij, P. H., Uhler, J. P., Shi, Y., Westerlund, F., Falkenberg, M., & Gustafsson, C. M. (2012). A hybrid G-quadruplex structure formed between RNA and DNA explains the extraordinary stability of the mitochondrial R-loop. *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10334–10344. <https://doi.org/10.1093/nar/gks802>
 110. Wanrooij, S., & Falkenberg, M. (2010). The human mitochondrial replication fork in health and disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1797, Issue 8, pp. 1378–1388). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.015>
 111. Xuan, H. P., Farge, G., Shi, Y., Gaspari, M., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2006a). Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24647–24652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602429200>
 112. Xuan, H. P., Farge, G., Shi, Y., Gaspari, M., Gustafsson, C. M., & Falkenberg, M. (2006b). Conserved sequence box II directs transcription termination and primer formation in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24647–24652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602429200>
 113. Yoshimi, A., Ishikawa, K., Niemeyer, C., & Grünert, S. C. (2022). Pearson syndrome: a multisystem mitochondrial disease with bone marrow failure. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02538-9>
 114. Young, M. J., & Copeland, W. C. (2016). Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 38, pp. 52–62). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.005>
 115. Young, M. J., Longley, M. J., Li, F. Y., Kasiviswanathan, R., Wong, L. J., & Copeland, W. C. (2011). Biochemical analysis of human POLG2 variants associated with mitochondrial disease. *Human Molecular Genetics*, 20(15), 3052–3066. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr209>
 116. Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P. G., Gorman, G. S., Lourenco, C. M., Wright, A. F., Auer-Grumbach, M., Toscano, A., Musumeci, O., Valentino, M. L., Caporali, L., Lamperti, C., Tallaksen, C. M., Duffey, P., Miller, J., Whittaker, R. G., Baker, M. R., Jackson, M. J., Clarke, M. P., Dhillon, B., ... Chinnery, P. F. (2010). Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain*, 133(3), 771–786. <https://doi.org/10.1093/brain/awq007>
 117. Zheng, L., Zhou, M., Guo, Z., Lu, H., Qian, L., Dai, H., Qiu, J., Yakubovskaya, E., Bogenhagen, D. F., Demple, B., & Shen, B. (2008). Human DNA2 Is a Mitochondrial Nuclease/Helicase for Efficient Processing of DNA Replication and Repair Intermediates. *Molecular Cell*, 32(3), 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.024>

