UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in **Biotecnologie**

ELABORATO DI LAUREA

IL GENE EDITING COME APPROCCIO TERAPEUTICO NELLE PATOLOGIE MITOCONDRIALI: IL CASO DI OPA1

Tutor: Dr.ssa Martina Semenzato

Dipartimento di Biologia

Istituto Veneto di Medicina Molecolare

Laureanda: Angela Ros

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

SOMMARIO

Abstract..... 3

Stato dell'arte..... 5

1.1 - Introduzione alle patologie mitocondriali..... 5

1.2 - Caratteristiche molecolari delle malattie mitocondriali..... 6

1.3 - Sintomi e diagnosi delle malattie mitocondirali..... 6

1.4 - Descrizione epidemiologica delle patologie mitocondriali..... 7

Approccio sperimentale..... 8

2.1 - La prevenzione delle malattie mitocondriali..... 8

2.2 - Gli approcci terapeutici tradizionali per le malattie mitocondriali..... 10

2.3 - La nuova frontiera della terapia genica per il trattamento delle patologie mitocondriali..... 11

2.4 - Il gene editing e le patologie mitocondriali..... 12

2.5 - La terapia genica nella cura delle patologie mitocondriali..... 15

2.6 - Un esempio di malattia mitocondriale: l'Atrofia Ottica Dominante (DOA)..... 18

Risultati e conclusione..... 22

3.1 - Efficacia della terapia genica e sue limitazioni nelle malattie mitocondriali..... 22

3.2 - Efficacia terapeutica nell'Atrofia Ottica Dominante: il gene OPA1 e la terapia genica..... 24

Bibliografia..... 25

Abstract

Le malattie mitocondriali costituiscono un gruppo eterogeneo di patologie genetiche rare, caratterizzate da un'elevata complessità sia diagnostica che terapeutica. Attualmente, i trattamenti disponibili sono limitati e si basano su interventi di tipo sintomatico, senza affrontare le cause molecolari presenti alla base. In questo contesto, le recenti innovazioni nel campo della terapia genica, e in particolare del gene editing, aprono nuove prospettive per lo sviluppo di strategie più efficaci e mirate. Tuttavia, l'applicazione clinica di tali approcci è ancora ostacolata da sfide di natura sia tecnica che bioetica che richiedono approfondimenti scientifici e regolatori. Un modello particolarmente promettente per l'applicazione del gene editing è rappresentato dall'Atrofia Ottica Dominante (DOA), una delle forme più comuni di neuropatia ottica ereditaria. La DOA è principalmente associata a mutazioni del gene OPA1, che codifica una proteina essenziale per il mantenimento della dinamica mitocondriale e per la funzionalità delle cellule gangliari retiniche, i cui assoni costituiscono il nervo ottico. Le alterazioni in OPA1 compromettono la trasduzione degli impulsi luminosi al SNC, determinando una progressiva perdita della vista.

Questa tesi si propone di analizzare le principali caratteristiche delle patologie mitocondriali, con particolare attenzione alla DOA, e di esplorare le potenzialità e i limiti del gene editing come strumento terapeutico innovativo.

Stato dell'arte

1.1 - Introduzione alle patologie mitocondriali

Le malattie mitocondriali (Mitochondrial Diseases - MDs) sono un gruppo eterogeneo di patologie a carico dei mitocondri. Comprendono circa 40 diversi tipi di malattie per lo più ereditarie che colpiscono numerosi organi e distretti, determinando un'ampia varietà di sintomi associati a gravi disturbi metabolici. [1]

I mitocondri sono infatti organelli cellulari essenziali per l'organismo: oltre ad essere la fonte principale di energia per la cellula, grazie alla produzione di Adenosine TriPhosphate (ATP), sono anche la sede dell'integrazione tra catabolismo e anabolismo e risultano coinvolti in numerosi processi come l'invecchiamento, il differenziamento, il mantenimento della staminalità e l'apoptosi cellulare, oltre che nella risposta infiammatoria [1, 2].
Sono presenti in tutte le cellule nucleate [2] in un numero variabile (poliplasmia) a seconda della richiesta energetica del tessuto e sono costituiti da una doppia membrana. La membrana mitocondriale esterna è liscia e ricca di porine per il passaggio regolato di soluti, mentre quella interna si presenta ripiegata in creste, impermeabile e coinvolta nella fosforilazione ossidativa, processo fondamentale per la generazione di energia. Anche il numero di creste varia a seconda della richiesta di ATP del tessuto.
Nella matrice dell'organello è presente un numero variabile di copie di DNA mitocondriale (mtDNA) ereditabili solo dalla madre. Si tratta di un piccolo DNA circolare (16.000 pb [1]), non associato a proteine, povero di regioni introniche e costituito da soli 37 geni che, nei mammiferi, codificano per 2 rRNA, 22 tRNA e 13 proteine della catena respiratoria. Le altre proteine presenti nel mitocondrio vengono codificate da circa 1.500 diversi geni del DNA nucleare (nDNA) della cellula e importate all'interno dell'organello (simbiosi mutualistica). [1, 2, 3]

Durante i processi di replicazione, trascrizione e traduzione dei due genomi, può accadere che la cellula inserisca delle mutazioni all'interno delle sequenze. Generalmente, questi errori non impattano sulla funzionalità delle proteine poiché la cellula attua costantemente meccanismi di controllo qualità e di riparazione. Nei mitocondri questi processi comprendono la rigenerazione mitocondriale, la mitofagia ma soprattutto la cross-compensazione [1]. Si tratta di un meccanismo di sinergia che consiste nella fusione (opposta alla fissione) di due o più organelli tra loro per condividere le proteine e massimizzare la loro funzione. Questo evento sfrutta positivamente la poliplasmia di modo che il DNA wild type possa compensare quello mutato, riducendo ulteriormente l'impatto delle mutazioni.

Alcune volte, questi processi non sono sufficienti generando le malattie mitocondriali.

1.2 - Caratteristiche molecolari delle malattie mitocondriali

Le patologie mitocondriali sono caratterizzate da un'elevata variabilità a livello di cause, sintomi e caratteristiche molecolari.
Per quanto concerne le cause, è raro che esse siano attribuibili a mutazioni *de novo*; più frequentemente, tali alterazioni genetiche vengono ereditate dai genitori. In particolare, le mutazioni a carico del nDNA possono essere trasmesse con modalità autosomica, sia dominante che recessiva, oppure secondo un pattern legato al cromosoma X. Al contrario, le mutazioni del mtDNA seguono un'ereditarietà esclusivamente materna [1, 2, 3].
Una delle caratteristiche più comuni delle MDs è l'eteroplasmia ovvero la presenza di una popolazione eterogenea di mtDNA non mutato (wild type, wt) e mtDNA mutato all'interno di ogni singola cellula. La proporzione tra questi numeri risulta uno dei dati più importanti per capire quanto è pericolosa e impattante la malattia: l'eteroplasmia risulta particolarmente problematica nel momento in cui la percentuale di mtDNA mutato è superiore al 50% [1, 2, 3].

Le mutazioni al DNA mitocondriale colpiscono principalmente: le molecole di tRNA coinvolte nella traduzione proteica, le subunità che compongono i complessi della catena respiratoria (con conseguente danno a livello di fosforilazione ossidativa ed alterata omeostasi delle specie reattive dell'ossigeno) e i processi apoptotici, che coinvolgono il rilascio di citocromo c e l'attivazione delle caspasi.
Le mutazioni nei geni mitocondriali presenti nel nDNA, invece, oltre a cooperare nelle deficienze descritte per le mutazioni a carico del mtDNA, hanno un impatto maggiore sulla funzionalità generale del mitocondrio: replicazione, riparazione e mantenimento del DNA, trascrizione, sintesi dei nucleotidi, importazione e sintesi proteica, omeostasi ionica, fissione e fusione mitocondriale. [2]

1.3 - Sintomi e diagnosi delle malattie mitocondriali

Le MDs possono manifestarsi a qualsiasi età e mostrare un ampio e complesso spettro di sintomi che spesso coinvolgono diversi organi e tessuti. Questo, insieme al fatto che le manifestazioni fenotipiche derivanti da mutazioni del mtDNA e del nDNA sono essenzialmente indistinguibili, rende notevolmente complessa la diagnosi e il trattamento di tali patologie. [2]

La complessità diagnostica delle malattie mitocondriali aumenta ulteriormente se si considera che una singola mutazione può determinare quadri clinici profondamente diversi e, viceversa, una stessa patologia può essere causata da mutazioni in molti geni differenti [1]. Di conseguenza, anche con l'avvento delle moderne tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), risulta ancora difficile stabilire una corrispondenza univoca tra genotipo e fenotipo. Inoltre, molti dei sintomi associati alle MDs sono aspecifici e possono

sovrapporsi a quelli di patologie non mitocondriali, rendendo l'associazione clinica non sempre immediata. Solo in rari casi una malattia mitocondriale è identificabile con certezza sulla base del solo quadro sintomatologico.
Ulteriori difficoltà nella classificazione e nella comprensione di queste patologie sono dovute all'eteroplasmia e al diverso livello, tipo e entità della mutazione, oltre che a causa di fattori genetici, ambientali ed epigenetici che, tra l'altro, sono in grado di rendere sintomatici pazienti con MDs inizialmente privi di manifestazione clinica. [2]
I tessuti maggiormente colpiti dalle patologie mitocondriali sono i neuroni e le fibre muscolari, i più dispendiosi a livello energetico, causando sintomi di tipo neurodegenerativo e di debolezza muscolare [4]. Tutti gli organi possono essere interessati dalle MDs e i principali sintomi sono rappresentati nella Figura 1.
Non esistono test diagnostici attualmente validi ma è necessaria una valutazione integrata dei sintomi, dei risultati degli esami del sangue, dell'analisi dei metaboliti, dell'analisi genetica di nDNA e mtDNA con tecniche NGS, dell'età del paziente e della presenza di casi nella famiglia e nella regione geografica in cui vive, a permettere l'identificazione della malattia.
Una nuova tecnica per la diagnosi è l'immunofluorescenza quadrupla. Si tratta dell'utilizzo di anticorpi legati ad una molecola fluorescente in grado di riconoscere i complessi della catena respiratoria, dando un'indicazione della quantità relativa degli stessi [2].
Un'idea della deficienza a livello di respirazione mitocondriale la offre anche una biopsia muscolare o la coltura *in vitro* di fibroblasti della pelle.
Va sottolineato che la complessità diagnostica è ulteriormente accentuata dal fatto che la maggior parte dei biomarcatori analizzabili in questo contesto non sono specifici per una singola malattia mitocondriale. Tra i marcatori più promettenti figurano GDF15 (Growth/Differentiation Factor 15), FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21) e anormali livelli di acidi organici nelle urine. Anche alti livelli di ammoniaca nel sangue, uniti a cardiomiopatia ipertrofica, risultano importanti marcatori della malattia. [2]

1.4 - Descrizione epidemiologica delle patologie mitocondriali

Le malattie mitocondriali possono essere considerate patologie rare, se prese individualmente. Nel complesso però, questa catalogazione non è del tutto corretta: studi non molto recenti hanno evidenziato che il numero di individui con età inferiore a 16 anni affetti da patologie mitocondriali (spesso derivanti da mutazioni a carico del nDNA) è tra i 5 e i 15 ogni 100.000 individui. Un'altra ricerca condotta in Inghilterra nel 2015 ha evidenziato invece che tra gli adulti vi è un'incidenza di circa 10 casi su 100.000 individui per mutazioni a carico del mtDNA e di circa 3 casi su 100.000 individui per mutazioni a livello di nDNA. [2]

Ad oggi è chiaro che tali numeri non possono che essere aumentati, grazie all'incremento delle conoscenze riguardanti le patologie mitocondriali. Infatti, si è calcolato che tali malattie colpiscono 1 persona ogni 4.300 solo in Europa, con una frequenza complessiva vicina a 1 ogni 500 individui [4].

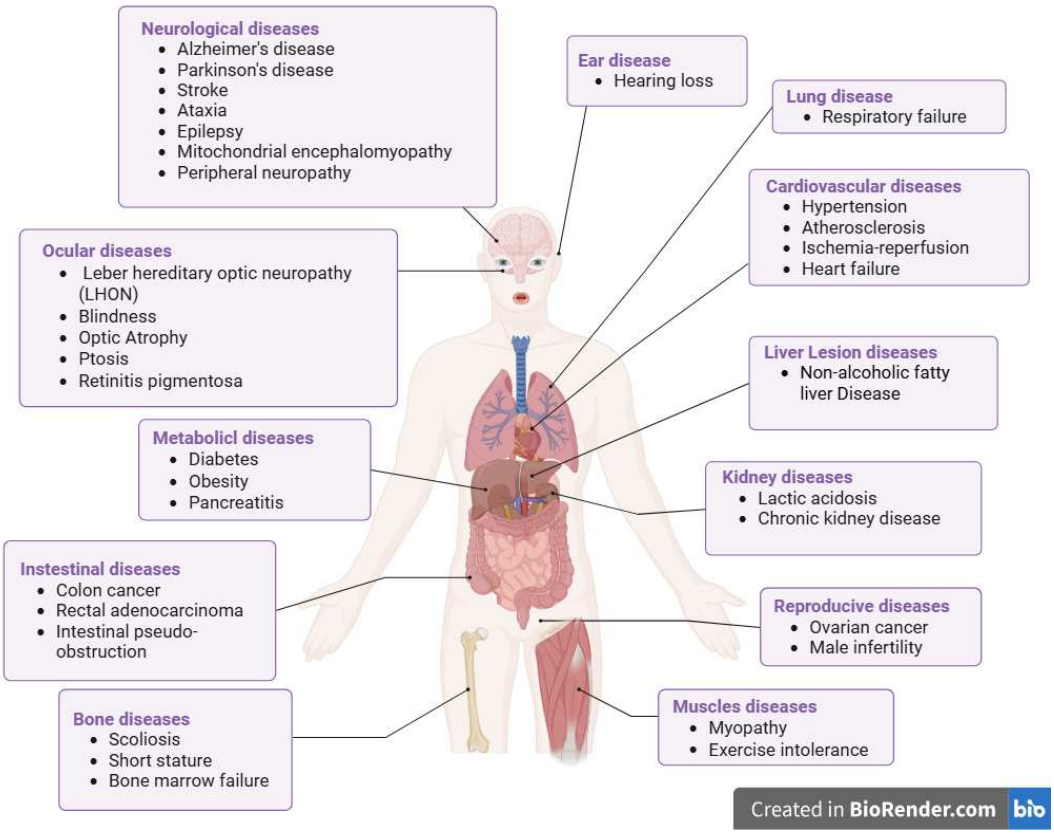

Figura 1 - Principali sintomi associati alle patologie mitocondriali [2]

Approccio sperimentale

2.1 - La prevenzione delle malattie mitocondriali

La complessità nella diagnosi delle patologie mitocondriali si riflette anche a livello di gestione terapeutica delle stesse, rendendo la prevenzione un fattore spesso determinante. Essa prevede principalmente la consulenza genetica, consigliata alle famiglie che possiedono uno storico di MDs.
In particolare, nel caso in cui le mutazioni siano nucleari, questo processo è del tutto simile a quello che viene attuato per altre malattie genetiche. Nelle mutazioni a carico del genoma mitocondriale, l'eteroplasmia materna rende invece la consulenza molto più complessa. Durante la formazione dell'ovulo maturo, infatti, il livello di mitocondri mutati può essere diverso rispetto alla cellula germinale primordiale con conseguente differente probabilità che la progenie possa essere affetta (Figura 2).

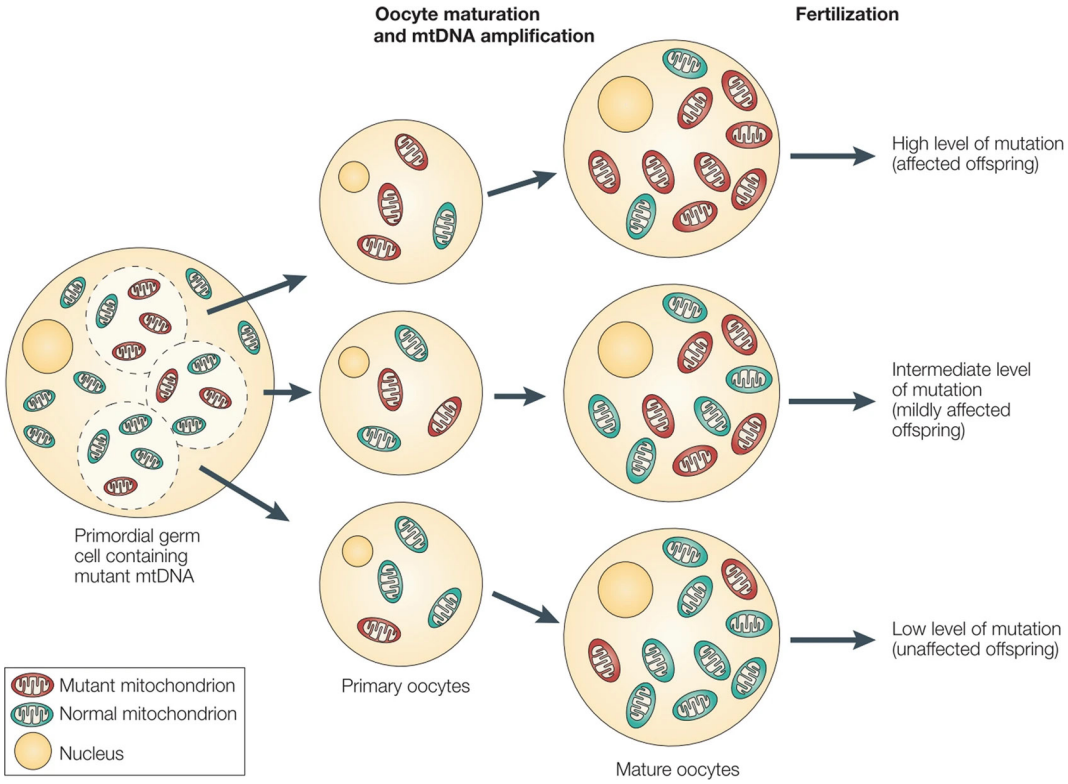

Figura 2 - Sviluppo degli oociti maturi a partire da una cellula germinale primordiale contenente un certo livello di mitocondri mutati: in base a quanti di questi vengono trasferiti all'ovocita primario, vi sarà una diversa probabilità di dare vita a uno zigote malato (adattata da **Naeem M. M., Sondheimer N.** *Heteroplasmy shifting as therapy for mitochondrial disorders*. Urbani A., Babu M. (eds), Mitochondria in Health and in Sickness. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1158. Springer, Singapore (2019). https://doi.org/10.1007/978-981-13-8367-0_14).

Le opzioni preventive per le coppie a rischio sono due:

a. diagnosi genetica pre-impianto che prevede la fecondazione *in vitro* degli ovuli a generare embrioni da cui si prelevano delle biopsie (placentari) in modo da analizzare il contenuto di mitocondri sani e mutati. Solo gli embrioni che possiedono un livello basso o nullo di eteroplasmia vengono infine scelti e impiantati nell'utero della madre;

b. donazione di mitocondri che può avvenire in due modi:

   1. inserendo il fuso meiotico della donna affetta all'interno di oociti appartenenti ad una donna sana e privati del fuso meiotico naturale per far avvenire in seguito la fecondazione *in vitro*;

   2. attuando la fecondazione *in vitro* sia di un ovocita proveniente dalla donna malata che di uno proveniente da una donna sana. Il pronucleo di quest'ultimo viene quindi trasferito nel primo oocita fecondato da cui invece viene tolto quello originale.

Queste tecniche risultano però ancora molto dibattute sia per il costo elevato che dal punto di vista etico. Infatti, non sempre chi eredita del DNA mutato sviluppa la malattia perciò questi interventi preventivi potrebbero essere inutili e si pensa possano solo ridurre il rischio di avere la malattia ma non di prevenirne la trasmissione. [2]
Spesso, poi, è necessario analizzare il rapporto rischi/benefici di tali tecniche che tendono a diminuire la percentuale di successo della gravidanza, specialmente in donne oltre i 38 anni [5].

2.2 - Gli approcci terapeutici tradizionali per le malattie mitocondriali

Una delle alternative per il trattamento delle patologie mitocondriali prevede il controllo della malattia con interventi mirati a livello del singolo organo e/o indirizzati verso specifici sintomi (come l'installazione di un pacemaker in pazienti con MDs che causano insufficienza cardiaca). Si è però osservato che ciò spesso non è sufficiente e può provocare in ogni caso la progressione della patologia in altre sedi [2]. Una strategia poco invasiva risulta essere l'applicazione di terapie basate sulla dieta ovvero sull'assunzione di integratori (creatina, carnitina, nucleotidi), vitamine (vitamina E, vitamina B2, vitamina C) e cofattori (Coenzima Q) con funzione antiossidante e con il ruolo di riattivare in parte alcune reazioni bloccate dalle MDs, di favorire la sostituzione di enzimi non funzionanti e di evitare l'accumulo di sostanze tossiche. Anche se alcuni di questi trattamenti, mirati per specifiche patologie, hanno mostrato una certa positività di risposta, le evidenze riguardo l'efficacia ma anche la sicurezza di queste cure sono limitate. La poca selettività, l'incapacità di agire sul bersaglio desiderato ed il fatto che spesso questi supplementi sono assunti come composti multipli, rendono complessa la comprensione delle interazioni delle varie sostanze con l'organismo [1, 2, 3].

Oltre all'approccio nutrizionale, anche l'allenamento aerobico ha dimostrato avere degli effetti positivi in pazienti colpiti da mutazioni al DNA mitocondriale.
Altri approcci clinici applicati sui pazienti sono invece mirati alla variazione del numero stesso di mitocondri all'interno della cellula. Da una parte si ha l'induzione della proliferazione mitocondriale in modo da consentire l'aumento del numero globale di mitocondri, nell'ottica di aumentare la performance dei mitocondri sani a compensazione di quelli patologici; dall'altra si ha l'induzione della mitofagia allo scopo di eliminare i mitocondri malati. [2]

2.3 - La nuova frontiera della terapia genica per il trattamento delle patologie mitocondriali

La terapia genica è un approccio innovativo e molto promettente per la cura di molte e svariate patologie. È una tecnica che può essere utilizzata sia *in vivo*, e quindi nell'organismo intero, che *ex vivo*, ovvero su organi vitali prelevati dall'individuo malato, curati e reinseriti all'interno dell'organismo di provenienza.
La terapia genica comprende diverse procedure tra cui [1, 3]:

a. l'inserimento del gene o del trascritto corretto in modo che possa sostituire quello mutato come templato per la trascrizione e traduzione nella proteina funzionante. Si tratta di una strategia promettente ma non sempre facile ed efficiente a causa delle dimensioni dei geni, della dominanza di espressione e della risposta immunitaria che può attivarsi contro il gene esogeno. Inoltre, tale sostituzione è applicabile solo a mutazioni recessive e, nel caso in cui riguardi il mtDNA, richiede ancora validazioni sperimentali;

b. la modifica dell'espressione, tramite silenziamento o attivazione, del gene mutato grazie all'utilizzo di piccoli RNA, spesso sintetici. Questa opzione ha ricevuto molto credito negli ultimi anni ma è applicabile solo in patologie gain-of-function o nel caso in cui la malattia sia dominante negativa;

c. l'espressione allotopica in mutazioni riguardanti il genoma mitocondriale: si tratta di far esprimere al nucleo della cellula la copia corretta del gene mutato, solitamente codificato dal mtDNA, in modo tale che la proteina, una volta prodotta, venga trasferita nuovamente al mitocondrio per svolgere la funzione originale (il gene sintetico espresso possiede una sequenza di localizzazione per l'organello). Tale metodo è stato validato sperimentalmente offrendo numerosi risultati positivi;

d. il trasferimento diretto dei geni mitocondriali corretti all'interno dei mitocondri mutati;

e. lo shift dell'eteroplasmia nella direzione del mtDNA wild type, generando tagli al genoma non riparabili per permettere così il blocco della replicazione o la distruzione del gene target. Per bloccare la replicazione genetica si possono utilizzare degli acidi nucleici peptidici (PNA) ovvero piccole molecole sintetiche costituite dalle normali basi azotate legate ad una struttura peptidica non carica, complementari alla regione di mtDNA mutata, targettata grazie alla grande affinità dei PNA per il DNA in singola elica.
   Per la distruzione del mtDNA mutato, invece, è possibile utilizzare la tecnica del gene editing.

2.4 - Il gene editing e le patologie mitocondriali

Il gene editing sembra essere ad oggi la frontiera più promettente per la cura delle malattie mitocondriali. Con gene editing si intende un insieme di tecniche basate sulla modifica specifica del genoma nel punto esatto in cui esso è mutato in modo tale da prevenire o curare una patologia genetica.

Come detto, può essere utile per la distruzione del genoma mutato in modo tale da spostare il livello di eteroplasmia mitocondriale verso il DNA sano.
La prima tecnica studiata per distruggere il DNA mutato è stata quella di utilizzare le nucleasi [1], enzimi di derivazione batterica in grado di riconoscere specifici siti di restrizione genomici per indurre il taglio al singolo o al doppio filamento. Le limitazioni riguardanti i tipi e le lunghezze delle sequenze di riconoscimento portarono però alla messa punto di tecnologie innovative quali: meganucleasi, Zinc Fingers Nucleases (ZFNs) e Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs). Si tratta di enzimi ingegnerizzati costituiti da una sequenza proteica, in grado di legare una specifica sequenza di DNA (zinc fingers per le prime e ripetizioni TAL per le seconde), e da una porzione nucleasica. Nel momento in cui vengono inserite nella cellula, esse riconoscono la regione di DNA target e generano un taglio al doppio filamento. Ciò può indurre sia la distruzione del gene e lo shift dell'eteroplasmia desiderato, sia la riparazione omologa del danno. Inserendo insieme all'enzima il gene corretto, esso può essere utilizzato come stampo per la modifica del genoma mutato. [1, 3]

Nonostante siano tecniche molto precise e tuttora utilizzate, la natura proteica delle sequenze di legame al target risulta di per sé uno svantaggio: le grandi dimensioni le rendono ingombranti sia da produrre che da inserire nelle cellule, oltre a creare problemi per quanto riguarda la predizione dell'interazione [1].

Queste difficoltà vengono risolte da una tecnologia innovativa, nata nel 2012 dalla mente di Jennifer Doudna e di Emmanuelle Charpentier, insignite per questo del premio Nobel per la Chimica nel 2020: la programmazione in laboratorio di CRISPR-cas9, il protagonista del sistema immunitario adattativo utilizzato dai batteri per proteggersi dalle infezioni fagiche.
La tecnica CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - corte ripetizioni palindromiche raggruppate e separate regolarmente) - cas9 (CRISPR associated protein 9) sfrutta lo stesso meccanismo di ZFNs e TALENs con la differenza che la guida per individuare il target è una sequenza di RNA, facile da sintetizzare, modificare *ad hoc* e gestire, e la nucleasi è cas9. Rispetto alle precedenti strategie necessita ancora di molta ricerca e sperimentazione pre-clinica in quanto risulta meno specifica per la presenza di numerosi off-target. La sua economicità, praticità di utilizzo e soprattutto le sue innumerevoli applicazioni, però, rendono CRISPR una tecnica promettente per il futuro. Il confronto con le altre tecnologie è descritto nella Tabella 1. [1, 3]

	Meganucleasi	ZFNs	TALENs	CRISPR-cas
Origine	Meccanismi di derivazione batterica			
Tipo di taglio	Taglio alla doppia elica di DNA			
Caratteristiche funzionali	Sequenza di localizzazione nucleare, sito di riconoscimento della specifica sequenza di DNA, nucleasi			
Scoperta	1985	1996	2010	2012
Riconoscimento	Riconoscimento di un sito molto ampio (tra i 14 e i 40 nt)	Più domini a dita di zinco, tipici di proteine nucleari che riconoscono sequenze di 2-3 nt	Proteine TAL tipiche di batteri patogeni delle piante che inducono l'attivazione della trascrizione di geni per la propria riproduzione: riconoscimento di 1 singolo nt tramite coppie di aminoacidi	Riconoscimento di un sito di lunghezza compresa tra i 20 e i 22 nt da parte di una sequenza di RNA guida generata sinteticamente a partire dalla fusione di tracrRNA e crRNA per formare un'unica struttura di riconoscimento del target e di legame alla cas9
Endonucleasi	La meganucleasi è essa stessa una nucleasi	Fok1	Fok1	Cas9
Meccanismo	Il ruolo fisiologico di queste proteine è quello di facilitare il movimento laterale dei tratti di DNA riconosciuti dall'omodimero	L'inserimento di due ZFNs all'interno della cellula consente la dimerizzazione delle due endonucleasi, il riconoscimento della stessa regione di DNA e il loro funzionamento	L'inserimento di due TALENs all'interno della cellula consente la dimerizzazione delle due endonucleasi, il riconoscimento della stessa regione di DNA e il loro funzionamento	Il sito di taglio viene riconosciuto dal gRNA, che porta con sé la cas9 in modo tale che essa possa tagliare il DNA nel punto esatto
Vantaggi	Altissima specificità, grazie alla lunga sequenza di riconoscimento, e facilità di utilizzo, grazie alle piccole dimensioni	Grande flessibilità; alta versatilità di siti di riconoscimento e maggiore specificità, grazie all'utilizzo in forma dimerica e in serie	Praticità di utilizzo e design; altissima versatilità; alta specificità grazie all'utilizzo in forma dimerica e in serie; minori effetti off-target	Economicità; semplicità di programmazione e utilizzo; capacità di riconoscimento multiplo; precision; possibilità di generare varianti anche in grado di bloccare la trascrizione genica senza indurre rotture
Limiti	Difficoltà nel design di meganucleasi per ogni target	Inesistenza in natura di ZNF per ogni tripletta del codice genetico; possibile associazione tra proteine; possibili off-target	Delivery complesso	Possibili off-target e possibile risposta immunitaria contro il sistema

Tabella 1 - Somiglianze e differenze tra i vari tipi di tecnologie per il gene editing (informazioni ricavate da **Khalil A.M.** *The genome editing revolution: review.* Journal of Genetic Engineering and Biotechnology (2020). https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y, **Tröder S.E., Zevnik B.** *History of genome editing: From meganucleases to CRISPR.* Laboratory Animals (2021). https://doi.org/10.1177/0023677221994613, [1, 3]).

2.5 - La terapia genica nella cura delle patologie mitocondriali

Nel caso delle MDs causate da mutazioni nucleari, la terapia genica può essere una soluzione molto valida, mentre per quelle causate da mutazioni nel genoma mitocondriale molti sono ancora gli ostacoli da superare [1, 3, 4]:

1. il delivery di molecole (soprattutto di acidi nucleici) all'interno del mitocondrio è complesso a causa dell'impermeabilità delle membrane, specie quella interna, dell'organello;
2. i meccanismi di replicazione del DNA mitocondriale e il suo codice genetico sono diversi da quelli del DNA nucleare;
3. il mitocondrio non è in grado di riparare rotture al doppio filamento del mtDNA;
4. il genoma mitocondriale codifica principalmente per RNA quindi il target può essere complesso;
5. ogni cellula contiene più mitocondri e ogni mitocondrio contiene più mtDNA: la regolazione genica risulta perciò molto complessa;
6. perché la terapia funzioni sarebbe necessario inviare le molecole in tutti i tessuti interessati dalla malattia.

Per quanto riguarda il trasporto delle molecole per la terapia genica nel mitocondrio, le alternative fino ad ora studiate sono due [1, 3]. La prima riguarda il delivery non virale, che sfrutta metodi chimici e fisici di trasporto di costrutti genici, oligonucleotidi e anche grandi complessi di editing. Si tratta di un meccanismo ancora in fase sperimentale perché dimostra poca efficienza e specificità oltre a citotossicità.
La seconda, invece, è il delivery virale, molto più efficiente, che sfrutta la capacità naturale dei virus di infettare le cellule e di inserire al loro interno il proprio genoma. Si tratta di un metodo molto sicuro e funzionale in quanto consente un'espressione a lungo termine del gene di interesse con bassi livelli di integrazione nel genoma della cellula e limitato rischio di infezioni patologiche.
Tra i vettori più utilizzati, si usano Virus Adeno-Associati (AVVs) che non causano malattie nell'uomo e che vengono in ogni caso ingegnerizzati per non contenere il genoma originale bensì il gene di interesse costituito da varie componenti, descritte nello schema rappresentato nella Figura 3. L'assenza della regione che regola la replicazione del genoma virale risulta un'ulteriore sicurezza: per replicarsi, gli AVVs della terapia genica necessitano infatti di un secondo virus detto helper contenente i geni *Rep* e *Cap* (incapsidamento) regolati da un promotore tessuto-specifico.

I vantaggi di questa tecnica sono dati dal fatto che questi vettori virali possono essere veicolati sia in cellule in grado di dividersi che non, in un ampio set di organi. Si è però osservato che i vettori adeno associati tendono a diluire durante la divisione mitotica delle cellule.

Tale problema non si presenta nel caso dei vettori retrovirali derivanti da virus a RNA che necessitano di un enzima trascrittasi inversa per retrotrascrivere il proprio genoma per l'integrazione e la traduzione.
Tra i retrovirus i più utilizzati sono i lentivirus che hanno il vantaggio di poter infettare sia cellule divisibili che non divisibili. L'integrazione è resa più efficiente e sicura sempre tramite ingegnerizzazione.

[ITR] - [Promotore] - [MTS] - [gene mitocondriale corretto] - [PolyA] - [ITR]

Figura 3 - Esempio di costrutto inserito all'interno di un virus adeno associato per la terapia genica delle malattie causate da mutazioni del genoma mitocondriale. Le sequenze ITR (Inverted Tandem Repeats), che vengono poste alle estremità del costrutto, sono tipiche sequenze virali che sono coinvolte nel mantenimento della stabilità, nella replicazione e nell'incapsidamento del materiale genetico del virus.
Il promotore, a monte del gene, è necessario per l'espressione dello stesso.
La sequenza MTS di localizzazione mitocondriale è fondamentale nei casi di mutazioni al genoma mitocondriale perché gli AVV non possono essere inseriti all'interno dell'organello perciò l'espressione del gene è nucleare. MTS non è necessaria se la terapia genica è volta alla cura di mutazioni nucleari.
A valle del gene di interesse, è presente un segnale di poliadenilazione, per permettere la corretta maturazione del trascritto.

Le difficoltà inerenti le diverse caratteristiche strutturali e funzionali del genoma mitocondriale sono state risolte in parte grazie all'ideazione delle cosiddette mitoTALENs ovvero TALENs monomeriche in grado di targettare specificamente una regione del mtDNA mutato, dimerizzare con un'altra struttura identica e indurre rotture al doppio filamento che non vengono riparate, portando invece all'eliminazione del gene mutato e allo spostamento dell'eteroplasmia verso il DNA non mutato (Figura 4).
Qualcosa di simile è stato fatto anche nell'ambito delle ZFNs e delle meganucleasi e in entrambi i casi sono stati fatti esperimenti, anche *in vivo*, complementati con l'uso di vettori adeno-associati, che hanno dimostrato alta efficienza nel genoma mitocondriale senza causare effetti off-target in quello nucleare. [3]

Per quanto riguarda il gene editing basato su CRISPR-cas9, molti sono ancora i passi da fare prima di poterlo effettivamente applicare nella cura delle patologie mitocondriali. Infatti, alcuni studi hanno dimostrato che il complesso è difficilmente in grado di attraversare le membrane impermeabili

del mitocondrio, probabilmente per la carica positiva e le grandi dimensioni della nucleasi. È questo il motivo per cui sono stati generati, anche in questo contesto, dei complessi mitoCRISPR-cas, con sequenze e strutture specifiche per permettere l'ingresso nell'organello. Per evitare completamente il problema, alcuni ricercatori hanno invece sviluppato un metodo CRISPR-free (anche le endonucleasi ZFNs e TALENs lo sono) comunque in grado di modificare specificamente il DNA: si tratta di proteine chimeriche che prevedono la fusione di un enzima TALEN (con sequenza di localizzazione mitocondriale) con una Ddda, ovvero un enzima che catalizza la deaminazione della citidina in timidina. Questo base editor deriva da una tossina batterica e ha il ruolo fisiologico di indurre mutagenesi nei batteri avversari.
A partire da questi studi sono state poi generate altre chimere enzimatiche in grado di modificare tutte le basi tra loro e fuse con ZNFs invece che con TALENs. Alcuni esperimenti sono stati fatti inserendo questi complessi nelle cellule target mediante l'uso di AVVs. In tutti questi casi, l'enzima endonucleasico non ha la funzione di tagliare il genoma bensì solo di localizzare la Ddda per indurre il base editing. In questo modo non vengono introdotte rotture alla doppia elica (maggiore sicurezza) e l'importazione del sistema è facilitata grazie al fatto che la chimera enzimatica è di tipo proteico e non nucleico. Risulta ancora necessario però comprendere a fondo i possibili effetti off-target e le conseguenze a lungo termine di questa strategia. [1, 3]

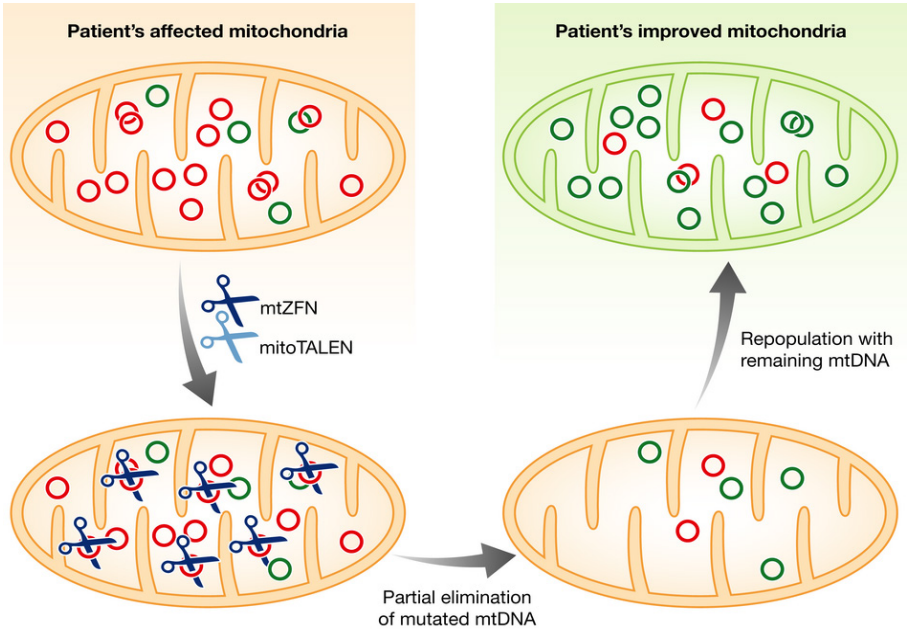

Figura 4 - Utilizzo di mitoTALENs e mitoZFNs per indurre lo shift dell'eteroplasmia grazie alla distruzione del genoma mutato e alla replicazione di quello sano che non viene intaccato perché la sequenza usata come target è proprio quella mutata (adattata da **Moraes C. T.** *A magic bullet to specifically eliminate mutated mitochondrial genomes from patients' cells*. EMBO Molecular Medicine (2014). https://doi.org/10.1002/emmm.201303769).

2.6 - Un esempio di malattia mitocondriale: l'Atrofia Ottica Dominante (DOA)

Una delle patologie mitocondriali più comuni è la cosiddetta DOA, acronimo che sta per Dominant Optic Atrophy (atrofia ottica dominante, anche chiamata ADOA - Autosomal Dominant Optic Atrophy - atrofia ottica dominante autosomica). Si tratta di una patologia neurodegenerativa ereditaria che porta alla degenerazione delle cellule gangliari della retina (RGCs). Essendo queste cellule coinvolte nella formazione del nervo ottico, sono il ponte tra la retina e il cervello (Figura 5). Una loro disfunzione causa quindi atrofia del nervo ottico e perdita progressiva della vista, fino a cecità. [4, 6]

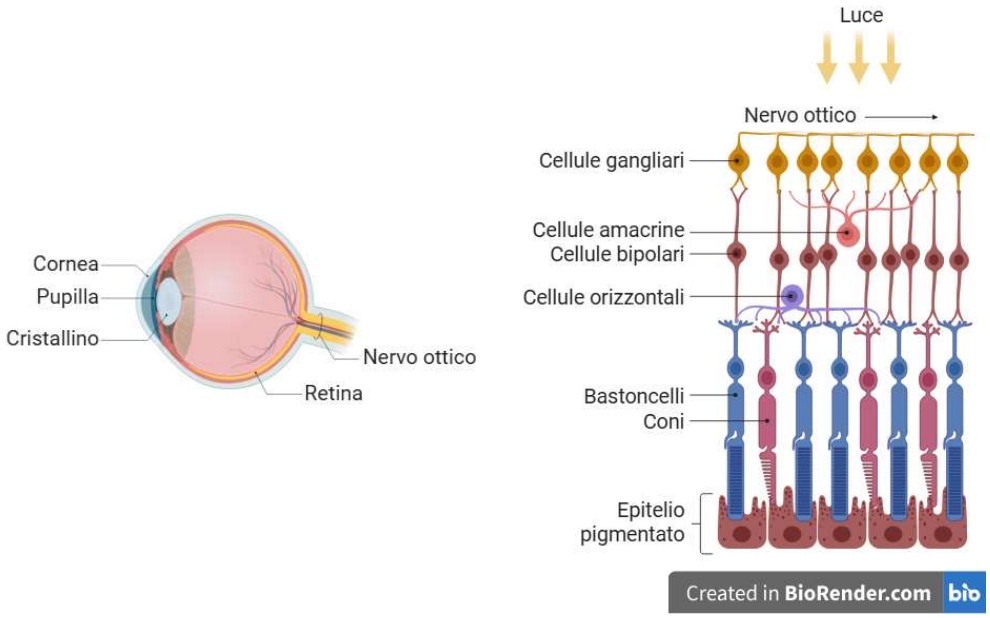

Figura 5 - Fisiologia dell'occhio (a sinistra) e della retina (a destra) [4].

La porzione esterna dell'occhio è costituita da due lenti, la cornea e il cristallino, che focalizzano la luce dalla pupilla alla retina, determinando la formazione della prima immagine rozza. Nella porzione interna è presente invece la retina, un'estensione extra-encefalica del SNC, costituita da:

- fotorecettori (coni e bastoncelli), cellule deputate all'assorbimento dei fotoni e alla generazione di un segnale molecolare. I coni sono coinvolti anche nella visione a colori mentre i bastoncelli in quella in bianco e nero;
- cellule bipolari, che inviano i segnali ricevuti dai fotorecettori alle cellule gangliari;
- cellule gangliari, i cui assoni formano il nervo ottico per veicolare l'informazione visiva al cervello e permettere l'elaborazione di un'immagine nitida;
- cellule amacrine e orizzontali, che mediano il trasferimento e l'integrazione delle informazioni tra le cellule sopra descritte.

L'epitelio pigmentato ha poi funzione protettiva contro gli UV e fagocitaria nei confronti delle cellule morte.

Come tutte le cellule, anche quelle che costituiscono la retina per funzionare necessitano dell'energia fornita dall'ATP prodotto proprio dai mitocondri. Tra tutti, però, il moto continuo, e non saltatorio, del potenziale d'azione a livello del nervo ottico, rende le cellule gangliari le più dispendiose di energia [4].
La DOA non è l'unica patologia che colpisce le RGCs. Conseguenze molto simili riguardano anche la LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy), una patologia molto diffusa (1/40.000 in Europa [4]) dovuta a una mutazione puntiforme del gene mitocondriale che codifica per il complesso I della catena respiratoria [4, 5].
Esiste anche un altro tipo di patologie mitocondriali chiamata Retinite Pigmentosa (RP). Tale malattia riguarda però la degenerazione dei coni e dei bastoncelli e causa atrofia della retina e perdita della visione centrale [4].

La causa della distrofia ottica dominante è la mutazione loss-of-function del gene nucleare OPA1 (Optic Atrophy 1), localizzato nella porzione telomerica del cromosoma 3 e costituito da 30 esoni (informazione più recente [7]). Può dare origine a 8 isoforme tessuto-specifiche grazie ad eventi di splicing che coinvolgono gli esoni 4, 4b e 5b. Il gene OPA1 codifica per proteine omonime della famiglia delle dynamin related proteins ed è una GTPasi, ovvero utilizza l'energia ricavata dall'idrolisi del GTP in GDP. Il gene, le varianti di splicing e le relative proteine (Figura 6) sono costituiti da:

- sequenza di localizzazione mitocondriale (MTS) all'N-terminale;
- dominio transmembrana (TM) per l'ancoraggio alla membrana mitocondriale interna;
- tre esoni alternativi di splicing (4, 4b e 5b) per generare le 8 isoforme;
- il dominio GTPasico;
- un dominio (middle) di funzione sconosciuta;
- un dominio C-terminale che funge da effettore GTPasico (GED).

Le due forme della proteina OPA1 derivano dal fatto che, una volta entrata nel mitocondrio, avviene un primo taglio proteolitico del dominio MTS con formazione della Long-OPA1 e ancoraggio alla membrana mitocondriale interna (MMI). Può avvenire però anche un secondo taglio che permette di generare la Short-OPA1 che rimane solubile nello spazio tra le membrane.

La proteina OPA1, svolge diverse funzioni tra cui:

1. permettere i fenomeni di fissione e fusione mitocondriale, mantenendo così il controllo della qualità dei mitocondri. OPA1 può infatti indurre sia la loro senescenza che la loro autofagia e risulta per questo indirettamente coinvolta anche nell'invecchiamento, specie nelle cellule che non si dividono e che sopravvivono proprio grazie alla fissione e alla fusione

mitocondriale;

2. mantenere la struttura della membrana mitocondriale interna nelle cosiddette creste mitocondriali. In questo modo, OPA1 può controllare e prevenire i processi apoptotici, regolando la fuoriuscita di citocromo c, e permettere un corretto assemblaggio dei supercomplessi della catena respiratoria mitocondriale, rendendo così ottimale il funzionamento della fosforilazione ossidativa ed il mantenimento del potenziale di membrana mitocondriale;

3. mantenere l'integrità del genoma mitocondriale;

4. mantenere l'omeostasi della cellula, evitando la formazione di ROS in eccesso.

Di conseguenza, il mancato funzionamento di OPA1 ha importanti ricadute sulla funzionalità mitocondriale e sul metabolismo della cellula. In particolare, come nel caso di LHON, anche la DOA può presentare una versione "plus" ovvero di tipo multisistemico per cui i sintomi non sono riconducibili solo agli occhi, ovvero l'organo maggiormente interessato, ma anche ad altri tessuti. [6, 8]

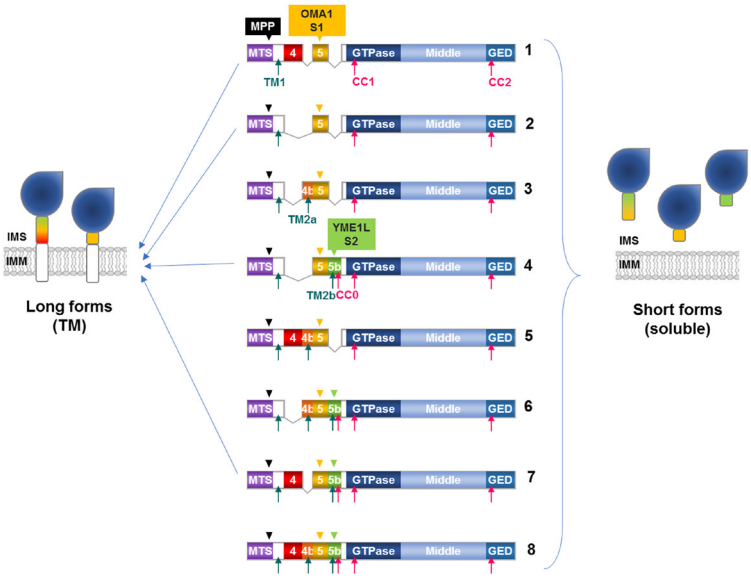

Figura 6 - Struttura molecolare del gene OPA1 e varianti di splicing che danno origine alla forma lunga o corta della proteina (adattata da **Del Dotto V., Fogazza M., Carelli V., Rugolo M., Zanna C.** *Eight human OPA1 isoforms, long and short: What are they for?*. Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics (2018). https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2018.01.005)

La prevenzione di questa malattia mitocondriale può risultare importante [5]. Anche nella DOA, l'uso di sostanze antiossidanti, di coenzimi che fungono da donatori e accettori di elettroni o di fattori in grado di attivare la trascrizione di geni coinvolti nella fosforilazione ossidativa hanno avuto un beneficio

parziale [5, 6, 8]. Ad oggi, qualche risultato è stato ottenuto trattando i pazienti affetti da DOA con l'idebenone, farmaco antiossidante già in uso per il trattamento della LHON.
L'idebenone funge da trasportatore di elettroni e permette di bypassare il complesso I, favorendo il trasferimento di elettroni direttamente al complesso III per permettere la produzione di ATP [8].
Uno studio ha anche testato l'utilizzo della fotobiomodulazione che sfrutta la luce rossa o infrarossa (λ = 600-1.100 nm). Questo intervallo di lunghezze d'onda viene efficacemente assorbito dal complesso IV della catena respiratoria con attivazione di una cascata di segnale che permette l'iperproduzione di ROS riparatori (invece di provocare stress ossidativo), l'espressione di geni anti-apoptotici e l'aumento della produzione di ATP nella retina. Di conseguenza viene ridotta la degenerazione delle cellule gangliari [5].

L'utilizzo della terapia genica risulta qui la soluzione più adeguata anche se va considerata la complessità dovuta alla presenza di diverse isoforme di OPA1 in diversi tessuti. D'altra parte, la DOA è particolarmente adatta per il trattamento genetico. È infatti una patologia monogenica che colpisce la retina, quindi un organo, l'occhio, facilmente targettabile e monitorabile (grazie al fatto che uno dei due può fungere da controllo). In più, non esistono alternative terapeutiche efficaci e alcuni studi per la cura della LHON hanno dimostrato i primi risultati positivi, che incoraggiano l'uso della terapia genica anche per la DOA [4, 5].
Uno studio condotto nel 2018 ha dimostrato l'efficacia di una terapia genica per la prevenzione della morte delle cellule gangliari in modelli murini affetti da DOA [9]. L'esperimento consisteva nella veicolazione nell'occhio dell'individuo di un AVV contenente il cDNA di OPA1 sotto il controllo di un promotore di citomegalovirus. Tale cDNA è stato correttamente trascritto e tradotto nelle due forme di OPA1 portando ad un rallentamento della progressione della malattia. Sono comunque necessarie ulteriori prove per quanto riguarda il mantenimento della conduzione dell'informazione elettrica dall'occhio al cervello.
Un'alternativa valida può essere anche quella di veicolare, sempre con AVV, il sistema CRISPR-cas in modo tale da rimuovere gli alleli mutati e ripristinare la funzionalità delle cellule malate.
Anche il targeting di specifici miRNA, che agiscono come regolatori dell'espressione genica nei mitocondri delle cellule gangliari, potrebbe rappresentare un approccio terapeutico altamente promettente. Un recente studio condotto su un modello di miopatia mitocondriale a carico del muscolo scheletrico ha evidenziato che l'impiego di antagomir (brevi sequenze di RNA sintetico capaci di inibire l'azione dei miRNA) ha determinato un effetto benefico. In particolare, il blocco di miRNA che impediscono la degradazione della proteina OPA1 ha portato a un incremento dei livelli della stessa, migliorando il quadro patologico in una forma di miopatia mitocondriale associata alla carenza di una subunità del complesso IV della

catena respiratoria mitocondriale [10].

Uno studio altrettanto recente ha testato l'applicabilità della tecnica CRISPRa (CRISPR activation) per il trattamento della aploinsufficienza di OPA1 in una linea cellulare di tipo HEK in cui, tramite un CRISPR-knockout, è stata introdotta la delezione al gene OPA1 coinvolta nell'induzione della DOA.
Con aploinsufficienza si intende una situazione, comune per la distrofia del nervo ottico, in cui in un genotipo eterozigote, la presenza di un solo allele mutato è sufficiente per avere un fenotipo patologico.
Dopo aver confermato la presenza della mutazione in omozigosi o eterozigosi tramite la verifica della diminuzione dei livelli di mRNA e proteine OPA1 presenti nelle cellule mutagenizzate, i ricercatori hanno studiato il trascrittoma e il proteoma delle stesse cellule dopo l'utilizzo di CRISPRa.
La strategia terapeutica prevedeva l'utilizzo di una cas9 inattivata fusa con un attivatore trascrizionale e di una serie di guide a RNA in grado di legare sequenze diverse e di varia lunghezza della regione a monte del sito di inizio della trascrizione in modo tale che l'attivatore trascrizionale inducesse l'espressione di tutte le isoforme di OPA1 (e non il taglio della doppia elica).
I risultati hanno evidenziato un significativo aumento dei livelli di mRNA di OPA1, variabile in funzione della guida utilizzata e delle diverse combinazioni delle stesse, fino a valori comparabili a quelli osservati nelle cellule wild type. Inoltre, l'attivazione trascrizionale ha permesso il corretto svolgimento dello splicing, con conseguente produzione di tutte le isoforme della proteina OPA1. In tale contesto, è stato osservato che l'isoforma 5 è quella maggiormente espressa a livello cerebrale, suggerendo un suo probabile ruolo patogenetico nella distrofia del nervo ottico. [7]

Risultati e conclusione

3.1 - Efficacia della terapia genica e sue limitazioni nelle malattie mitocondriali

È evidente come le malattie mitocondriali pongano importanti sfide sia per la loro identificazione che per il loro trattamento terapeutico. La loro gestione è infatti complicata da numerosi fattori: l'eteroplasmia (ovvero la presenza simultanea di genomi mutati e wild type all'interno della stessa cellula), la doppia origine genetica delle proteine mitocondriali (ovvero la presenza di geni mitocondriali sia a livello di mtDNA che di nDNA), l'esistenza di numerosi tipi diversi di MDs, la difficoltà nell'associazione tra genotipo e fenotipo, il coinvolgimento di più organi e le difficoltà nell'analisi di biomarker specifici.

A livello di efficacia terapeutica è possibile affermare che le terapie tradizionali, essendo basate essenzialmente sulla gestione dei sintomi, non

sono in grado di risolvere il problema alla radice. Sono quindi le terapie geniche ad essere le più promettenti.

La validità di queste terapie risulta molto alta per quanto riguarda le mutazioni riguardanti il DNA nucleare, con svariate alternative già testate anche clinicamente, mentre sono ancora tanti i passi da fare per quanto riguarda le mutazioni al genoma mitocondriale.
Questa differenza è evidente anche per l'utilizzo di CRISPR-cas: se nel nDNA può avere dei risultati molto positivi, a livello di mtDNA il suo utilizzo risulta al momento ancora poco applicabile. Ecco allora che una delle alternative più promettenti e su cui lavorare con maggiore attenzione è sicuramente il base editing CRISPR-free.

In ogni caso, l'approccio genico alla cura delle patologie mitocondriali richiede ancora molti sforzi specialmente per quanto riguarda:

1. il raggiungimento di tutti gli organi interessati dalla patologia;
2. il dosaggio adatto al funzionamento della terapia senza generare effetti indesiderati;
3. l'assottigliamento delle differenze presenti attualmente tra il fenotipo malato umano e dei modelli animali utilizzati che rende complicata la traslazione, anche solo teorica, delle conclusioni terapeutiche;
4. l'attuazione dei test clinici, in particolare per quanto riguarda il controllo: essendo malattie rare, è difficile avere un gruppo di controllo e, essendo terapia genica, è difficile generarlo a partire da pazienti sani, per questioni di sicurezza;
5. la sicurezza di tutte le tecniche fino ad ora descritte e la probabilità che si verifichino eventi off-target;
6. i vari tipi di misure, standardizzate, riproducibili e comuni ma allo stesso tempo specifiche per ciascuna patologia mitocondriale, da valutare pre e post trattamento che possano fungere da biomarkers;
7. l'identificazione di tutti i pazienti nel mondo che possono beneficiare di una specifica terapia genica;
8. l'approvazione di ogni specifica terapia genica da parte degli enti regolatori internazionali;
9. l'individuazione di aziende farmaceutiche interessate allo sviluppo di terapie geniche mirate: essendo le MDs patologie rare e specifiche, è probabilmente necessaria una terapia mirata per ciascuna mutazione;
10. il rendere tali terapie accessibili a livello economico alle persone che ne hanno necessità.

3.2 - Efficacia terapeutica nell'Atrofia Ottica Dominante: il gene OPA1 e la terapia genica

OPA1 rappresenta una proteina chiave per la sopravvivenza e la funzionalità delle cellule gangliari retiniche (RGCs) e, di conseguenza, per l'integrità visiva. Le patologie associate a mutazioni in questo gene, come l'atrofia ottica dominante (ADOA), rimangono ad oggi prive di terapie risolutive, ma la terapia genica e le tecniche di gene editing offrono prospettive particolarmente promettenti. Lo studio condotto nel 2025 su cellule HEK ha fornito un importante punto di partenza per lo sviluppo di strategie basate su CRISPRa. Tuttavia, ha anche evidenziato numerose criticità: le cellule utilizzate differiscono significativamente dalle RGCs e il sistema CRISPRa impiegato risulta di difficile veicolazione tramite vettori virali adeno-associati a causa delle sue dimensioni. Inoltre, nei modelli cellulari mutati è stata osservata la perdita del normale network mitocondriale. Solo alcune specifiche combinazioni di gRNA hanno ripristinato la corretta rete di interazione mitocondriale, nonostante la maggior parte avesse indotto un aumento soddisfacente dell'espressione di OPA1. [7]

Nel complesso, la terapia genica appare una delle strategie più promettenti per il trattamento della DOA poiché consente di correggere direttamente il difetto molecolare alla base della malattia. Approcci innovativi, come il trasferimento mediato da vettori virali di copie funzionali di OPA1 o l'attivazione trascrizionale con CRISPRa, hanno già mostrato risultati preclinici incoraggianti sul recupero dell'espressione genica e della funzionalità mitocondriale. Persistono tuttavia sfide significative, legate alla complessità della regolazione delle isoforme di OPA1, all'eterogeneità genetica e alla necessità di un targeting specifico verso le cellule gangliari retiniche.

Sebbene molti aspetti debbano ancora essere chiariti, i progressi nel campo dell'editing genomico rendono sempre più concreta la possibilità di applicare strategie di terapia genica anche al trattamento delle patologie mitocondriali.

Bibliografia

[1] **Soldatov V.O., Kubekina M.V., Skorkina M.Y., Belykh A. E., Egorova T. V., Korokin M. V., Pokrovskiy M. V., Deykin A. V., Angelova P. R.** *Current advances in gene therapy of mitochondrial diseases.* Journal of Translational Medicine (2022). https://doi.org/10.1186/s12967-022-03685-0

[2] **Gorman G. S., Chinnery P. F., DiMauro S., Hirano M., Koga Y., McFarland R., Suomalainen A., Thorburn D.R., Zeviani M., Turnbull D.M.** *Mitochondrial diseases.* Nature Reviews Disease Primers (2016). https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80

[3] **Keshavan N., Minczuk M., Viscomi C., Rahman S.** *Gene therapy for mitochondrial disorders.* Journal of Inherited Metabolic Disease (2024). https://doi.org/10.1002/jimd.12699

[4] **Zeviani M., Carelli V.** *Mitochondrial Retinopathies.* International Journal of Molecular Sciences (2022). https://doi.org/10.3390/ijms23010210

[5] **Ng W.S.V., Trigano M., Freeman T., Varrichio C., Kandaswamy D. K., Newland B., Brancale A., Rozanowska M., Voltruba M.** *New avenues for therapy in mitochondrial optic neuropathies*. Therapeutic Advances in Rare Disease (2021). https://doi.org/10.1177/26330040211029037

[6] **Lenaers G., Reynier P., ElAchouri G., Soukkarieh C., Olichon A., Belenguer P., Baricault L., Ducommun B., Hamel C., Delettre C.** *OPA1 functions in mitochondria and dysfunctions in optic nerve.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2009). https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.04.013

[7] **Becchi G., Whitehead M., Harvey J.P., Sladen P.E., Dushti M., Chapple J.P., Yu-Wai-Man P., Cheetham M.E.** *CRISPRa-Mediated Increase of OPA1 Expression in Dominant Optic Atrophy.* International Journal of Molecular Sciences (2025). https://doi.org/10.3390/ijms26136364

[8] **Del Dotto V., Fogazza M., Lenaers G., Rugolo M., Carelli V., Zanna C.** *OPA1: How much do we know to approach therapy?*. Pharmacological Research (2018). https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.018

[9] **Sarzi E., Seveno M., Piro-Mégy C., Elzière L., Quilès M., Péquignot M., Müller A., Hamel C. P., Lenaers G., Delettre C.** *OPA1 gene therapy prevents retinal ganglion cell loss in a Dominant Optic Atrophy mouse model.* Scientific Reports (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-20838-8

[10] **Djalalvandi A., Takeda K., Grespi F., Fan H., Fonseca T.B., Nogara L., Sharifi S., Barison C., Semenzato M., Omori A., Cerutti R., Steffan D., Tsansizi L., Balmaceda V., Alan L., Bean C., Blaauw B., Viscomi C., Scorrano L.** *Opantimirs: A class of antagonizing microRNAs that upregulate Opa1 and improve mitochondrial and disuse myopathies.* Cell Reports Medicine (2025). https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2025.102248