

_Avanços no diagnóstico das doenças mitocondriais através da sequenciação de nova geração

Advances in the diagnosis of mitochondrial diseases by next-generation sequencing

Célia Nogueira^{1,2}, Cristina Pereira², Lisbeth Silva¹, Marisa Encarnação¹, Elisa Leão Teles³, Esmeralda Rodrigues³, Teresa Campos³, Patrícia Janeiro⁴, Ana Gaspar⁴, Gabriela Soares⁵, Anabela Bandeira⁵, Esmeralda Martins⁵, Marina Magalhães⁵, Helena Santos⁶, Luís Vieira⁷, Laura Vilarinho^{1,2}

celia.nogueira@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

(2) Unidade de Rastreio Neonatal Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

(3) Centro Hospitalar São João, Porto, Portugal.

(4) Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(5) Centro Hospitalar Universitário do Porto, Porto, Portugal.

(6) Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, Vila Nova de Gaia, Portugal.

(7) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

_Resumo

O recente desenvolvimento da tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) revolucionou o diagnóstico molecular das doenças genéticas raras, de difícil diagnóstico, tais como as doenças mitocondriais. O estudo destas patologias foi implementado em 1993 pelo nosso grupo e até à data foram investigados mais de 2500 doentes portugueses. Muitos destes doentes ainda não dispõem de diagnóstico molecular, pelo que foi desenvolvida uma estratégia de NGS para a identificação da mutação causal. A sequenciação de um painel de 209 genes nucleares associados a doenças mitocondriais e do DNA mitocondrial completo por NGS, foi realizada num sequenciador MiSeq (*Illumina*). O estudo de 145 doentes permitiu identificar 41 mutações causais e caracterizar 35 doentes. Esta investigação contribuiu para esclarecer a etiologia molecular destes doentes (35/145; 24%), ii) alargar o espetro mutacional destas patologias e, iii) oferecer um aconselhamento genético e um eventual diagnóstico pré-natal aos casais em risco. O desenvolvimento de um painel, específico para estas patologias, tem um caráter inovador e reforça o nosso Centro como laboratório nacional para o estudo e investigação de doenças mitocondriais.

_Abstract

Recent development of high throughput, next-generation sequencing (NGS) technology has revolutionized the research and molecular diagnosis of hard-to-diagnose genetic disorders such as mitochondrial disorders. The study of these diseases was implemented in 1993 by our group and to date more than 2,500 Portuguese patients have been investigated. As many of these patients do not yet have molecular diagnosis, an NGS strategy was developed to identify the causal mutation. NGS was performed in a MiSeq *Illumina* instrument using a custom mitochondrial gene panel with around 209 genes involved in mitochondria metabolism and the entire human mitochondrial genome. The study of 145 patients allowed the identification of 41 causal mutations and the molecular characterization of 35 patients. This investigation contributed to i) identify the pathogenic mutations in the studied patients (35/145; 24%), ii) expand the mutational spectrum in the etiology of these disorders, and iii) propose an accurate genetic counseling. Custom design panels have been widely used for molecular heterogeneous disorders however, the development of this panel will be innovative in our country strengthening our Center as a national reference for the study and research of mitochondrial disorders.

_Introdução

As doenças mitocondriais constituem um importante grupo de doenças hereditárias do metabolismo de expressão clínica e genética heterogénea. A maioria das doenças mitocondriais descritas é causada por disfunções ao nível do sistema da fosforilação oxidativa (OXPHOS), originando consequentemente uma deficiente produção de energia. O correto funcionamento do OXPHOS resulta de uma interação coordenada entre o genoma nuclear e mitocondrial. Assim, estas doenças podem ser causadas por alterações no genoma mitocondrial, no genoma nuclear ou na interação entre os dois genomas (1,2). Estas disfunções podem afetar qualquer órgão ou tecido do organismo, embora o músculo-esquelético, o músculo cardíaco e o sistema nervoso central sejam os mais afetados, devido à sua elevada dependência do metabolismo energético (3). Aproximadamente 1:5.000 indivíduos na população adulta e infantil são portadores deste grupo de doenças raras ou correm o risco de as virem a desenvolver. Estas doenças são uma causa comum de mortalidade e/ou morbidade crónica, não estando disponível, salvo raras exceções, nenhuma terapia eficaz (4). Estima-se que 30-40% dos doentes afetados, na sua maioria de idade pediátrica, não dispõem de diagnóstico molecular.

As vias metabólicas envolvidas na comunicação mito-nuclear são complexas, e segundo a literatura, o proteoma mitocondrial possui cerca de 1500 proteínas com um número de genes

candidatos equivalente (5,6). Todos estes genes podem ser considerados potenciais candidatos para estas doenças, no entanto até à data cerca de 200 genes apresentam mutações causais descritas.

O estudo destas patologias foi implementado em 1993 pelo nosso grupo e até à data foram investigados mais de 2500 doentes clinicamente suspeitos de doença mitocondrial. Estes doentes têm sido selecionados por clínicos especializados nas áreas de neurologia, pediatria, neuropediatria, entre outras, com o objetivo de esclarecer a sua respetiva etiologia molecular. Os estudos moleculares realizados permitiram diagnosticar grande parte destes doentes, no entanto alguns continuam sem a identificação da mutação causal.

A aplicação da tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) ao diagnóstico molecular destas patologias é inovadora no nosso país e reforça o nosso Centro como laboratório nacional para o estudo e investigação de doenças mitocondriais.

_Objetivo

Desenvolver uma estratégia de NGS para a identificação das mutações causais em doentes suspeitos de doenças raras, nomeadamente doenças mitocondriais, de um modo mais rápido e a um custo acessível.

_Doentes e métodos

Foram estudados 145 doentes, provenientes de vários Centros Hospitalares do país, com suspeita clínica bioquímica e/ou histológica de doença mitocondrial. Estes doentes têm sido investigados ao nível molecular no nosso laboratório durante vários anos, pelo método clássico de Sanger, no entanto a sua etiologia molecular continua por esclarecer.

O DNA genómico foi extraído a partir de sangue periférico utilizando o *kit* QIAamp DNA Blood (QIAGEN).

O NGS foi realizado num sequenciador MiSeq (*Illumina*), através da utilização de um painel desenhado, de acordo com a metodologia *SureSelect QXT* da *Agilent*, com 209 genes nucleares associados a doenças mitocondriais, assim como

pela sequenciação do DNA mitocondrial completo (mtDNA), utilizando a metodologia *Nextera XT* da *Illumina* (figura 1). Este sequenciador foi adquirido através do projeto de investigação do NORTE 2020 (NORTE-01-0246-FEDER-000014 DESVENDAR “DESCobrir, VENcer as Doenças rARas”).

As sequências geradas pelo MiSeq (ficheiros FASTQ) foram alinhadas com o genoma humano de referência NCBI (GRCh37/hg19), utilizando o algoritmo *Burrows-Wheeler* (BWA) do *software Surecall*, e com o genoma mitocondrial de referência através do *software SeqMan* (DNASTAR), respetivamente (figura 1).

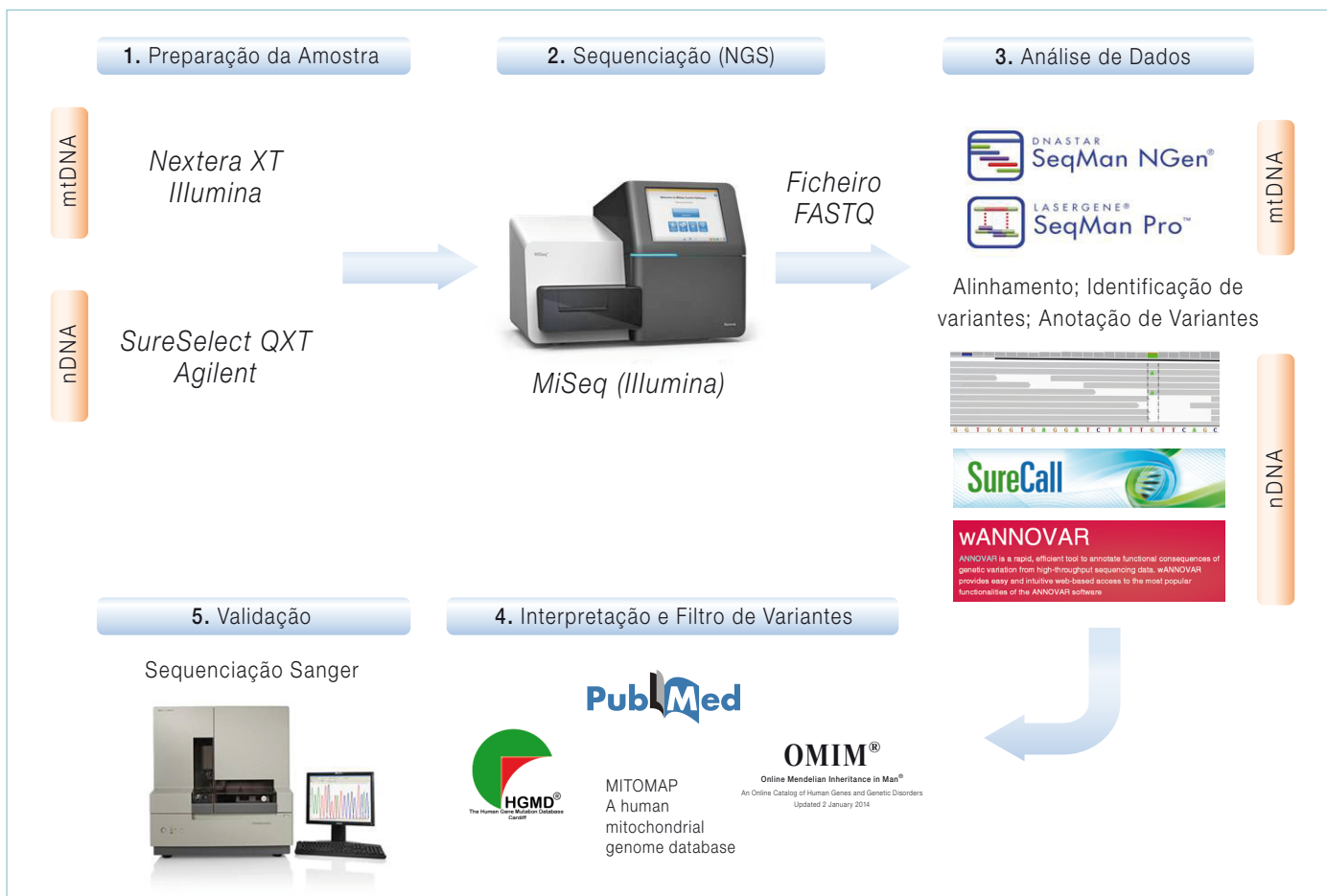
Em relação ao painel de genes nucleares, a deteção e anotação das variantes de nucleotídeo único (SNVs) e das pequenas inserções/deleções (INDELS) foram realizadas utilizando programas comerciais disponíveis (*Surecall* e *AnnoVar*). As variantes foram filtradas tendo em conta o tipo de mutação, a frequência populacional, a presença em bases de dados (dbSNP, HGMD, ClinVar, etc.), preditores *in-silico*, etc. Para o mtDNA a deteção de variantes foi realizada com o *software SeqMan* (DNASTAR) e cada variante identificada foi pesquisada na base de dados *Mitomap* (7) (figura 1).

As variantes já classificadas como mutações patogénicas ou com previsões *in-silico* sugestivas de patogenicidade, foram confirmadas pela sequenciação tradicional de Sanger. Quando disponíveis amostras de outros membros da família realizaram-se estudos de co-segregação.

_Resultados

Através da sequenciação do painel de genes nucleares nos 145 doentes obteve-se uma média de 4.193.476 leituras/amostra e uma profundidade de leitura média de 213X por amostra. A média de variantes identificadas para cada amostra foi de 438 e após a análise destas, filtrando através de vários parâmetros, identificamos a mutação ou mutações patogénicas em genes nucleares em 29 casos. Em oito casos encontraram-se mutações em homozigotia e nos restantes 21 identificaram-se mutações em heterozigotia, em genes com hereditariedade autossómica dominante ou recessiva. A maioria das mutações identificadas não se

Figura 1: Fluxo de trabalho utilizado na sequenciação de nova geração do DNA mitocondrial e do painel de genes nucleares.



(1) As regiões de interesse são preparadas utilizando o *kit* Nextera XT (mtDNA) e o *kit* Sureselect QXT (painel de genes nucleares). (2) A *pool* equimolar das amostras preparadas é sequenciada no MiSeq. (3) As seqüências obtidas (ficheiros FASTQ) são alinhadas contra os respetivos genomas de referência e as variantes são detetadas utilizando algoritmos disponíveis em programas como o Surecall (painel de genes nucleares) e o SeqMan (mtDNA). As variantes são anotadas utilizando o programa SeqMan (mtDNA) e wANNOVAR (painel de genes nucleares). (4) A interpretação e filtro das variantes são efetuados através da pesquisa em bases de dados. (5) As variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas são confirmadas pelo método de Sanger.

encontra descrita na literatura (n=21), no entanto localizam-se em genes recentemente associados a estas doenças com um número ainda reduzido de mutações descritas.

Através da sequenciação do genoma mitocondrial completo foram identificadas mutações patogénicas em seis casos, tendo sido descritas pela primeira vez neste estudo.

Dos 145 doentes sequenciados, identificaram-se mutações patogénicas associadas a doença mitocondrial em 35 (24%). Todas as mutações foram confirmadas e efetuaram-se estudos familiares de co-segregação.

_Discussão

A tecnologia de NGS tem revolucionado o diagnóstico molecular destas doenças, uma vez que tem capacidade de gerar uma enorme quantidade de dados num curto espaço de tempo a um custo acessível. Esta abordagem é ideal para uma vasta gama de aplicações, tais como: a sequenciação de um conjunto de genes previamente selecionados (painéis de NGS) ou a sequenciação do exoma humano completo (WES) ou do genoma humano completo (WGS) (8,9). O NGS está a ser aplicado a várias áreas, principalmente na investigação de doenças raras e do cancro e permite a multianálise de genes

artigos breves_ n. 1

diferentes na mesma corrida proporcionando efetuar uma medicina personalizada com base na epidemiologia molecular.

O presente estudo possibilitou esclarecer a etiologia molecular de 24% dos doentes estudados, contribuindo para o seu diagnóstico definitivo. Se compararmos a percentagem de casos positivos com a obtida noutros estudos, verificamos que os resultados são sobreponíveis (10,11). Os doentes que após esta primeira abordagem permaneçam sem diagnóstico molecular irão ser selecionados para WES, na tentativa de se identificarem novos genes associados a estas doenças raras de difícil diagnóstico.

A aplicabilidade de plataformas de NGS provou ser uma ferramenta essencial para atingirmos um diagnóstico final para estes doentes, uma vez que é muito difícil obter estes resultados pelo método tradicional, por ser um método bastante moroso e dispendioso.

Conclusão

A tecnologia de NGS é extremamente versátil e permite assim num único teste sequenciar um elevado número de genes de um modo mais rápido e económico, sendo considerada no atual estado da arte o novo *gold-standard* em diagnóstico genético. A transferência desta tecnologia da investigação para a rotina laboratorial vai melhorar o diagnóstico das doenças mitocondriais e permitir oferecer um aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal às famílias afetadas.

Financiamento:

Estudo financiado por: Fundação da Ciência e Tecnologia (PTDC/DTP-PIC/2220/2014, *Genetic Defects of Mitochondrial Diseases: a Next Generation Sequencing Approach*) - implementação da tecnologia de NGS e o desenho de um painel de genes nucleares aplicado ao diagnóstico das doenças mitocondriais; Programa NORTE 2020 (NORTE-01-0246-FEDER-000014, DESVENDAR "DESCobrir, VENcer as Doenças rARas") - aquisição de equipamentos para a realização da sequenciação de nova geração.

Referências bibliográficas:

- (1) DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*. 2003 Jun 26;348(26):2656-68.
- (2) Ghezzi D, Zeviani M. Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology. *Adv Exp Med Biol*. 2012;748:65-106.
- (3) Goldstein AC, Bhatia P, Vento JM. Mitochondrial disease in childhood: nuclear encoded. *Neurotherapeutics*. 2013;10(2):212-26.
- (4) Chinnery PF. Mitochondrial Disorders Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (eds). *SourceGeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. 2000 Jun 8 [updated 2014 Aug 14]. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1224/
- (5) Herrmann JM, Longen S, Weckbecker D, et al. Biogenesis of mitochondrial proteins. *Adv Exp Med Biol*. 2012;748:41-64.
- (6) Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D1251-7. Epub 2015 Oct 7. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4702768/
- (7) MITOMAP - A human mitochondrial genome database [Internet]. [consult. 3/4/2018] <http://www.mitomap.org>
- (8) Carroll CJ, Brilhante V, Suomalainen A. Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *Br J Pharmacol*. 2014;171(8):1837-53. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3976608/
- (9) Wong LJ. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion*. 2013;13(4):379-87.
- (10) Legati A, Reyes A, Nasca A, et al. New genes and pathomechanisms in mitochondrial disorders unraveled by NGS technologies. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1857(8):1326-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.022>
- (11) Fernandez-Marmiesse A, Gouveia S, Couce ML. NGS Technologies as a Turning Point in Rare Disease Research, Diagnosis and Treatment. *Curr Med Chem*. 2018;25(3):404-32. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5815091/