

Sekvenciranje mitohondrijskega genoma

Mitochondrial genome sequencing

Jernej Kovač

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:

asist. dr. Jernej Kovač, univ. dipl. biokem.

Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana,

e-pošta: jernej.kovac@kclj.si

POVZETEK

Mitohondriji so celični organeli, vključeni v pomembne celične procese evkariontske celice. Njihova značilnost je lastni manjši genom (mtDNA), ostanek prvobitne aerobne prokariontske celice, ki je bil v procesu vključitve te celice v endosimbotski odnos z evkariontsko celico, pred okoli 1,5 milijarde let, izrazito zreduciran. Večina genov za mitohondrijske proteine se tako nahaja v celičnem jedru. Širok nabor celičnih procesov, ki jih regulirajo mitohondriji, pa se odraža tudi v velikem številu raznovrstnih bolezni, ki so povezane z motnjo delovanja tega celičnega organela. V sklopu tega strokovnega članka se bomo na kratko dotaknili kliničnih fenotipov, ki so povezani z motnjo delovanja mitohondrijev, ter laboratorijskih diagnostičnih metod in postopkov, ki so trenutno aktualni za diagnostiko mitohondrijskih bolezni.

Ključne besede: mitohondrij, mitohondrijske bolezni, diagnostika, NGS, genetika

ABSTRACT

Mitochondria are cellular organelles involved in multiple important processes of eukaryotic cell. They harbor their own, small genome (mtDNA), a residue of first prokaryotic cells incorporated into the eukaryotic cells during the endosymbiotic process of mitochondria development about 1.5 billion years ago. This genome has been significantly reduces and today, most genes of mitochondria proteins are encoded in the cellular nucleus. The broad function of mitochondria is directly associated with broad spectrum of human diseases that are result of mitochondrial dysfunction. We will briefly go through the associated clinical phenotypes and current laboratory diagnostic procedures applied in the diagnostics of mitochondrial disorders.

Keywords: mitochondria, mitochondrial disorders, diagnostics, NGS, genetics

»

UVOD

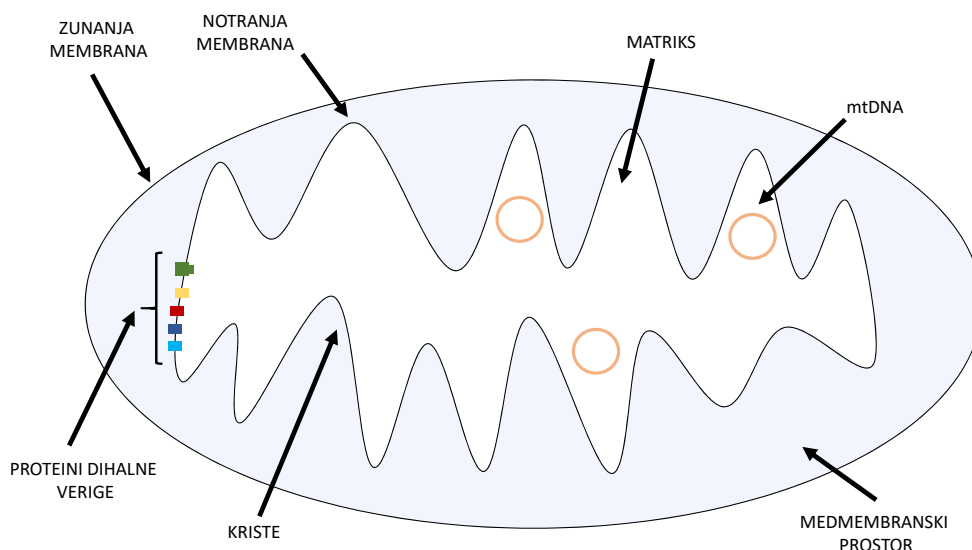
Mitochondriji so ključni organeli evkariontske celice, ki regulirajo energetske homeostazo, celično signalizacijo, izražanje genov, celični nivo kalcija in celično smrt (1). Posebnost mitohondrijev je, da imajo lasten (mitohondrijski) genom (mtDNA), v katerem je kodiranih 13 mitohondrijskih proteinov, 22 mitohondrijskih tRNA molekul in 2 mitohondrijski ribosomalni RNA molekuli. Velika večina (več kot 1000) mitohondrijskih proteinov pa je zapisanih v jedrni DNA (nDNA) in se po sintezi v endoplazmatskem retikulumu preko kompleksnih transportnih mehanizmov prenašajo v mitohondrij (2). Raznovrstnost mitohondrijskih funkcij igra vlogo tudi pri širokem spektru bolezni, ki so povezane z motnjami v delovanju mitohondrijev. Klinične fenotipe mitohondrijskih bolezni v grobem delimo na

nevrološke in ne-nevrološke fenotipe, predstavljajo pa zelo raznovrstne zaplete in motnje – od respiratorne odpovedi, odpovedi jeter, pankreatitisa in sladkorne bolezni ter zaostanka v rasti, pa do optične atrofije, epilepsij in ataksij, miopatije ter periferne nevropatije (2). Analiza genetskega ozadja mitohondrijskih bolezni zajema tako usmerjeno analizo mtDNA, kot tudi analizo nuklearnih genov, ki so povezani s funkcijo mitohondrija. Razvoj tehnologije naslednje generacije sekvenciranja DNA (NGS) je omogočil hkratno analizo tako mtDNA, kot tudi celotnega spektra z mitohondriji povezanih nuklearnih genov, kar je izrazito pospešilo diagnostiko mitohondrijskih bolezni in pomembno skrajšalo čas do samega molekularno-diagnostičnega rezultata (3).

OSNOVNA STRUKTURA IN FUNKCIJA

Mitohondrij je celični organel z dvojno membrano, ki omogoča vzpostavitev protonskega gradienta, ki je ključen pri sintezi molekul ATP. Energijo za vzpostavitev protonskega gradienta med medmembranskim prostorom in mito-

hondrijskim matriksom zagotavlja proces oksidativne fosforilacije, ki poteka na komponentah dihalne verige, ki se nahajajo na notranji membrani (Slika 1).



Slika 1: Osnovna struktura mitohondrija

Figure 1: Basic mitochondria structure

V osnovi gre za prenos elektronov iz molekul nikotinamid adenin dinukleotida (NADH), preko proteinskih kompleksov I–IV dihalne verige, na molekule kisika kot končnega prejemnika elektronov. Energija tega procesa omogoča, da

proteinski kompleksi I, III in IV delujejo kot protonske črpalke v medmembranski prostor. Tako nakopičeno energijo protonskega gradienta uporabi proteinski kompleks ATP sintaze za fosforilacijo molekule ADP v ATP (4).

DEDOVANJE IN HETEROPLAZMIJA

Velika večina mitohondrijskih proteinov (več kot 1000) je kodirana v jedrni DNA, na mtDNA pa se nahaja zapis za 37 genov; 13 jih zapisuje proteine dihalne verige, 22 jih zapisuje mitohondrijske prenašalne RNA molekule (tRNA), veliko podenoto ribosoma 16s in malo podenoto ribosoma 12s. V posamezni celici se lahko nahaja tudi do 10.000 kopij mtDNA, posamezen mitohondrij lahko vsebuje tudi do 10 kopij mtDNA. Človeško mtDNA sestavlja 16.569 baznih parov, pakiranih v krožno dvovezično molekulo. Geni, zapisani na mtDNA, ne vsebujejo intronov, kar je dodaten indic, da so se mitohondriji razvili iz simbioze med evkariontsko celico in prokariontom. Več kot 90 % mitohondrijskega genoma predstavlja kodirajoča regija, pomemben element nekodirajoče regije pa je D-zanka, kjer se nahaja iniciacijsko mesto začetka replikacije mtDNA (5–7). Posebnost mitohondrijev je, da se

pri sesalcih dedujejo po materi. Ker je okolje v mitohondriju nasičeno z visoko reaktivnimi spojinami in mtDNA ni zaščiten s histonskimi proteinskimi kompleksi, je delež genetskih sprememb 10- do 20-krat višji kot v jedrni DNA. V celicah posameznika imajo lahko vsi mitohondriji enako mtDNA, kar imenujemo homoplazmija, če pa je del mtDNA mutiran, to stanje imenujemo heteroplazmija. Ugotavljanje stopnje heteroplazmije pri materi je zato pomembno za zagotavljanje ustreznega genetskega svetovanja in napovedovanja verjetnosti prenosa okvarjenih mitohondrijev na plod. Klinično zdrava mati z nizko stopnjsko heteroplazmijo patološke spremembe v mtDNA lahko tako okvarjene mitohondrije prenese na plod, kjer pa se zaradi višjega deleža okvarjenih mitohondrijev (homoplazmija ali višjestopenjska heteroplazmija) razvije mitohondrijska bolezen (8).

BOLEZNI, POVEZANE Z MOTNJO FUNKCIJE MITOHONDRIJA

Vzrok za razvoj mitohondrijske bolezni je lahko genetska okvara nuklearnih genov ali pa prisotnost patološke različice v mtDNA. Pomemben dejavnik pri mitohondrijski motnji, ki izvira iz okvare mtDNA, je tudi morebitna stopnja heteroplazmije oz. homoplazmija patološke različice, ki se odraža v tem, kako hudi in kateri specifični klinični znaki se razvijejo pri posamezniku. Heteroplazmija je lahko sistemska, razširjena po vseh celicah/tkivih organizma, ali pa je patološka različica prevladujoča le v enem organu, specifičnih tkivih, kar zopet vpliva na potek in izraženost mitohondrijske bolezni, prav tako pa lahko pomembno vpliva na uspešnost genetske diagnostike, saj lahko zaradi tkivno specifične heteroplazmije, značilne npr. za progresivno eksterno oftalmoplegijo, ob analizi neustreznega tkiva pride do lažno negativnega rezultata. (1, 2, 5–7, 9). Minimalna stopnja heteroplazmije okvarjene mtDNA, da

se bolezen izrazi, je odvisna od tipa genetske spremembe in posameznega tkiva, ki ga prizadene, okvirno pa se ta meja giblje med 60 in 90 %. Sama stopnja heteroplazmije lahko vpliva tudi na tip izražene mitohondrijske bolezni. Na primer sindrom MELAS se praviloma izrazi že ob nižjih stopnjah heteroplazmije, medtem ko se sindrom Leigh lahko ne izrazi niti ob stopnji heteroplazmije, višji od 60 % (10). V grobem ločimo med mitohondrijskimi boleznimi, ki se izrazijo v otroški dobi, in tistimi, ki se izrazijo v odrasli. Mitohondrijske bolezni, ki se izrazijo že v otroški dobi, imajo običajno težji potek z razmeroma splošnimi in nespecifičnimi kliničnimi znaki, ki segajo od zastoja v razvoju, encefalopatije, hipotonije in drugih (11). Bolj pomembne oz. znane mitohondrijske bolezni, ki nastopijo običajno že v otroški dobi, so sindrom Kearns-Sayre, Pearsonov sindrom ter Leighov sindrom. Pri mitohondrij- »

skih boleznih odrasle dobe pa sindrom mitohondrijske encefalopatije, laktatne acidoze in kapi podobne epizode (MELAS), kronična progresivna zunanja oftalmoplegija (CPEO), nevropatija, ataksija in retinitis pigmentosa (NARP), sindrom mioklonične epilepsije z rdečimi razcefranimi vlakni (MERRF) in Leberjeva hereditarna optična nevropatija (LHON). Ob tem je pomembno poudariti, da se lahko ta sklop mitohondrijskih boleznih izrazi v dolo-

čenih primerih tudi pri otrocih in najstnikih. Tako se npr. sindrom NARP lahko izrazi že v otroštvu, vendar ne napreduje oz. je lahko stabilen vse do odrasle dobe. Točen potek mitohondrijskih boleznih je izrazito odvisen od okvarjenega gena, obremenitve specifičnega tkiva, stopnje heteroplazmije in tipa patološke genetske spremembe, ki je vzrok za izraženo mitohondrijsko bolezen (11).

TEHNOLOGIJA ANALIZE mtDNA IN Z MITHONDRIJI POVEZANIH NUKLEARNIH GENOV

Razvoj tehnologije sekvenciranja DNA naslednje generacije (NGS) je omogočil masovni preboj v diagnostiki redkih boleznih, ki so izredno raznovrstne in zajemajo več 10.000 genetskih sprememb v več 1000 genih (12–14). Med redke bolezni spadajo tudi okvare v delovanju mitohondrijev, pri katerih pa je treba razlikovati med analizo mtDNA in genov, povezanih z mitohondrijsko funkcijo, ki se nahajajo v jedrni DNA. Trenutno najbolj ekonomična rešitev je še vedno tarčna obogatitev genomskih regij, ki so diagnostično pomembne. Pri genetiki mitohondrijskih boleznih to pomeni aplikacijo kombinacije specifičnih komplementarnih kratkoverižnih oligonukleotidnih sond, ki se hibridizirajo na specifične regije genoma, ki jih želimo analizirati. Te sonde so funkcionalizirane z molekulami biotina, kar omogoča, da jih po hibridizaciji, skupaj z vezanimi fragmenti DNA preiskovanca, izoliramo z uporabo streptavidinskih paramagnetnih nanodelcev. Tako izoliran (obogaten) nabor fragmentov DNA preiskovanca imenujemo DNA knjižnica, ki jo nato sekvenciramo na NGS sekvencatorju. Po bioinformatički obdelavi podatkov, med katero sekvencirane fragmente nalegamo na referenčna zaporedja humanega genoma in

iz razlik identificiramo prisotne genetske spremembe, lahko preko specifičnih postopkov filtriranja teh genetskih sprememb pridemo do patoloških različic, ki so pomembne za razvoj specifične mitohondrijske bolezni, opredelimo stopnjo heteroplazmije pri preiskovancu in njegovi materi, ter tako omogočimo učinkovito genetsko svetovanje družini in morebitno klinično intervencijo za bolnika (če je le-ta na voljo) (2, 3, 15). S padanjem cen sekvenciranja postaja vse bolj dostopno tudi sekvenciranje celotnega humanega genoma, pri katerem se lahko izognemo uporabi specifičnih hibridizacijskih sond, ki lahko v pripravo vzorca vnašajo določeno stopnjo napak in omejitev, s tem pa tudi postopek priprave DNA knjižnice pomembno skrajšamo (16, 17). V sklopu sekvenciranja celotnega humanega genoma je zajeta tudi celotna mtDNA z visoko kakovostnimi podatki, kar omogoča natančno opredelitev stopnje heteroplazmije, identifikacijo različic v številu kopij in strukturnih preureditev mitohondrijskega genoma. Omenjene tehnologije in lastnosti bodo postale še bolj pomembne v luči razvoja novih kliničnih postopkov in farmakoloških učinkovin za lajšanje ter tudi zdravljenje mitohondrijskih boleznih v prihodnosti (15).

ZAKLJUČEK

Široko področje mitohondrijskih boleznih zajema več tisoč genetskih dejavnikov, ki so razporejeni med nuklearni genom celice in specifični mitohondrijski genom samega organela. Izraženi klinični fenotip je odvisen od več dejavnikov – specifičnega gena, ki je okvarjen, tipa patološke različice, ter v primeru patoloških različic v mitohondrijskem genomu, od deleža mitohondrijskih genomov, ki to

patološko različico nosijo (stopnje heteroplazmije). Z razvojem novih tehnologij analize DNA (NGS) je postala genetska diagnostika mitohondrijskih boleznih dostopnejša, prav tako pa se je povečal diagnostični izplen. Zmogljivi in ustrezni diagnostični postopki bodo v prihodnosti postali še pomembnejši zaradi razvoja specifičnih, personaliziranih in tarčnih kliničnih intervencij.

LITERATURA

1. Supinski GS, Schroder EA, Callahan LA. Mitochondria and critical illness. *Chest*. 2020;157(2):310–322.
2. Russell OM, Gorman GS, Lightowlers RN, Turnbull DM. Mitochondrial diseases: hope for the future. *Cell*. 2020;181(1):168–188.
3. Bris C, Goudenege D, Desquiere-Dumas V, Charif M, Colin E, Bonneau D, et al. Bioinformatics tools and databases to assess the pathogenicity of mitochondrial DNA variants in the field of next generation sequencing. *Front Genet*. 2018;9:632.
4. Wilson DF. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *J Physiol (Lond)*. 2017;595(23):7023–7038.
5. Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial disorders of the oxphos system. *FEBS Lett*. 2020;595(8):1062–1106.
6. Picard M, Wallace DC, Burrelle Y. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*. 2016;30:105–116.
7. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012;148(6):1145–1159.
8. Zhang H, Burr SP, Chinnery PF. The mitochondrial DNA genetic bottleneck: inheritance and beyond. *Essays Biochem*. 2018;62(3):225–234.
9. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol*. 2015;77(5):753–759.
10. Weerasinghe CAL, Bui B-HT, Vu TT, Nguyen H-LT, Phung B-K, Nguyen V-M, et al. Leigh syndrome T8993C mitochondrial DNA mutation: Heteroplasmy and the first clinical presentation in a Vietnamese family. *Mol Med Rep*. 2018;17(5):6919–6925.
11. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16080.
12. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107(1):1–8.
13. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333–351.
14. Bahassi EM, Stambrook PJ. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis*. 2014;29(5):303–310.
15. Almannai M, El-Hattab AW, Ali M, Soler-Alfonso C, Scaglia F. Clinical trials in mitochondrial disorders, an update. *Mol Genet Metab*. 2020;131(1-2):1–13.
16. Meienberg J, Bruggmann R, Oexle K, Matyas G. Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Hum Genet*. 2016;135(3):359–362.
17. Lionel AC, Costain G, Monfared N, Walker S, Reuter MS, Hosseini SM, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet Med*. 2018;20(4):435–443.