

# Tehnologije sekvenciranja pri diagnostiki mitohondrijskih bolezni

## *Advanced sequencing technologies for diagnosis of mitochondrial disorders*

**Barbara Slapnik<sup>1,2</sup>, Jernej Kovač<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Avtor za korespondenco:

**Doc. dr. Jernej Kovač, univ. dipl. biokem.**

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana

e-pošta: jernej.kovac@kclj.si

### POVZETEK

Mitohondrijske bolezni so skupina heterogenih bolezni, večinoma povezanih s pomanjkanjem celične energije zaradi slabše mitohondrijske funkcije. So posledica genetskih sprememb na mitohondrijski DNA ali mitohondrijskih genov na jedrni DNA. Patološke genetske spremembe na mitohondrijski DNA so običajno enonukleotidne, manjše insercije in delecije ali večje strukturne preureditve mitohondrijske DNA. Diagnostika mitohondrijskih bolezni je zaradi klinične in genetske heterogenosti ter omejenih povezav med genotipom in fenotipom pogosto težavna. Tehnologija sekvenciranja naslednje generacije je izboljšala diagnostiko mitohondrijskih bolezni, zlasti tistih, ki so povezane z okvarami genov na jedrni DNA. S prihodom tehnologije sekvenciranja dolgih odčitkov se je izboljšala natančnost identifikacije strukturnih sprememb. V okviru mitohondrijskih bolezni lahko s tehnologijo sekvenciranja dolgih odčitkov izboljšamo analizo heteroplazmatskih delecij, identifikacijo velikih kompleksnih preureditev in natančnejšo lokalizacijo jedrno-mitohondrijskih zaporedij v jedrnem genomu. Tehnologija sekvenciranja naslednje generacije trenutno predstavlja standard pri molekularni diagnostiki mitohondrijskih bolezni, kljub temu pa bi lahko

z izboljšanjem natančnosti tehnologije sekvenciranja dolgih odčitkov in razvojem novih bioinformatičnih orodij tehnologijo učinkoviteje uporabljali v diagnostične namene.

**Ključne besede:** mitohondrijski genom, diagnostika mitohondrijskih bolezni, heteroplazmija, sekvenciranje dolgih odčitkov

### ABSTRACT

Mitochondrial diseases are a group of heterogeneous disorders, mostly associated with cellular energy deficiency due to impaired mitochondrial function, resulting from genetic variants in mitochondrial DNA or mitochondrial genes on nuclear DNA. Pathogenic variants on mitochondrial DNA typically involve single nucleotide variants, small indels or larger structural rearrangements of mitochondrial DNA. The diagnosis of mitochondrial diseases is often challenging due to diverse clinical manifestations and genetic heterogeneity, as well as limited associations between genotype and phenotype. Next-generation sequencing technology has improved the diagnosis of mitochondrial diseases, particularly those related to defects in »

nuclear DNA genes. The advent of long-read sequencing brings heightened precision in the identification of structural variants. In the context of mitochondrial diseases, long-read sequencing can enhance the analysis of heteroplasmic deletions, identify large complex rearrangements, and provide more accurate localization of nuclear-mitochondrial sequence in the nuclear genome. Next generation sequencing technology currently represents the standard in molecular diagnostics of mitochondrial diseases; however, by improving the accuracy of long-read sequencing and developing new bioinformatics tools, we could introduce it for diagnostic purposes.

**Key words:** mitochondrial genome, diagnostics of mitochondrial disorders, heteroplasmy, long-read sequencing

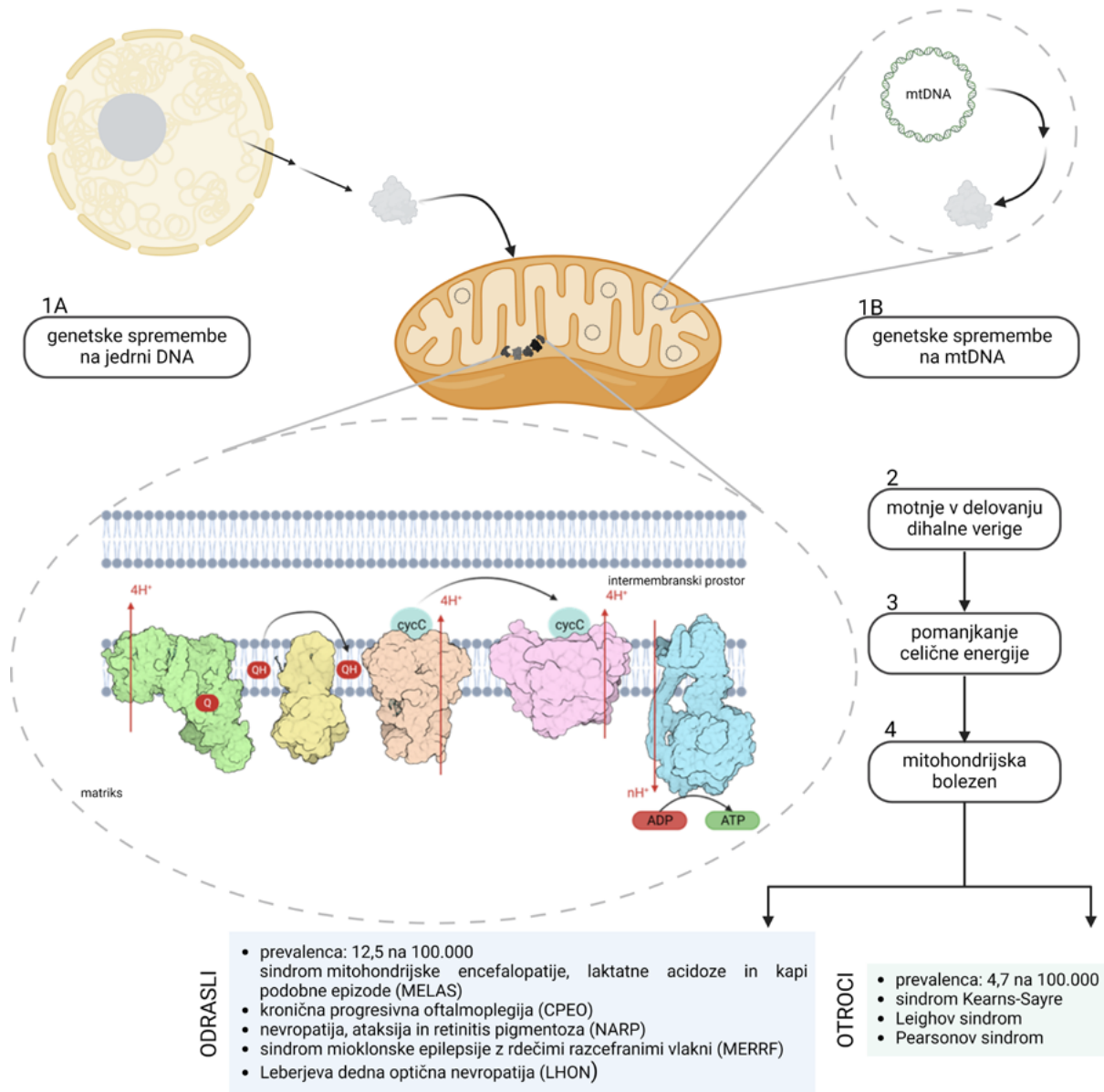
## UVOD

Mitochondriji so energijski centri evkariontskih celic, saj proizvajajo celično energijo v obliki adenozin trifosfata (ATP), ki nastaja s procesom oksidativne fosforilacije v dihalni verigi (1). Poleg tega mitochondriji sodelujejo pri presnovnih procesih in njihovi regulaciji, signaliziranju s kalcijem in programirani celični smrti (2). Za sestavljanje in delovanje mitochondrija je potrebnih približno 1200 proteinov, katerih genetski zapis se nahaja tako na jedrni kot na mitohondrijski DNA (mtDNA). Na jedrnem genomu so zapisani večina proteinov dihalne verige, proteini za replikacijo, transkripcijo in translacijo mtDNA ter proteini, ki regulirajo dinamiko mitochondrija. mtDNA je 16.569 bp dolga dvoverižna krožna molekula, ki zapisuje 13 polipeptidov dihalne verige, 22 prenašalnih RNA (tRNA) in 2 ribosomalni RNA (rRNA), ki so nujno potrebne za transkripcijo in translacijo proteinov, zapisanih na mtDNA. V matriksu mitochondrija je prisotnih več kopij mtDNA. Število kopij je odvisno od potreb po celični energiji in znaša med 100 in 1000 kopij na celico. Posameznik ima lahko identične kopije mtDNA (homoplazmija) ali več različnih kopij mtDNA (heteroplazmija) (3). Za mtDNA je značilno maternalno dedovanje, saj se mtDNA iz spermijev med spermatogenezo eliminira (4). mtDNA lahko razvrstimo v haploskupine. V posamezni haploskupini so sorodna zaporedja, ki si delijo skupne genetske spremembe in kažejo regionalno specifičnost (5). Med evolucijo evkariontske celi-

ce se lahko zaporedja mtDNA vstavljajo v jedrno DNA in nastanejo jedrno-mitohondrijska zaporedja (NUMTs) (6).

Mitohondrijske bolezni so skupina heterogenih bolezni, večinoma povezanih s pomanjkanjem celične energije zaradi slabše mitohondrijske funkcije in so posledica genetskih sprememb na mtDNA ali mitohondrijskih genov na jedrni DNA (Slika 1). Genetske spremembe na mtDNA se lahko dedujejo maternalno ali nastanejo *de novo*, medtem ko se genetske spremembe na jedrni DNA dedujejo avtosomno dominantno, avtosomno recesivno, X-vezano ali nastanejo *de novo*. Večina mitohondrijskih bolezni so multisistemski sindromi, ki vključujejo nevrološke, endokrine, kardiološke, dermatološke in gastroenterološke značilnosti. Lahko povzročajo tkivno specifična obolenja, kot so optična nevropatija, gluhost in sladkorna bolezen tipa 2. Ker je njihov klinični fenotip zelo raznolik in se lahko pojavijo pri vseh starostih ter prizadenejo različna tkiva in organe, predstavljajo precejšen klinični izziv in oteženo zdravljenje (7,8). Poleg tega je molekularna diagnostika mitohondrijskih bolezni kompleksna zaradi genetske heterogenosti, heteroplazmije in prisotnosti NUMTs. Za pojav kliničnih simptomov mora stopnja heteroplazmije presežati mejno vrednost, ki znaša med 60 % in 90 % in je odvisna od genetske spremembe ter se razlikuje med posameznimi tkivi (9,10).

Prevalenca mitohondrijskih bolezni je približno 12,5 na 100.000 odraslih (11) in 4,7 na 100.000 otrok (12). Vendar je frekvenca patoloških genetskih sprememb na mtDNA v splošni populaciji višja. Ocenjuje se, da je 1 na 250 zdravih posameznikov prenašalec nizkostonpenjske heteroplazmije s patološko genetsko spremembo na mtDNA (13). Med mitohondrijske bolezni, ki se večinoma pojavijo v zgodnjem otroštvu, uvrščamo sindrom Kearns-Sayre, Leighov sindrom in Pearsonov sindrom. Za te sindrome je značilen težji potek bolezni, klinični simptomi lahko obsegajo hipotonijo, splošno šibkost, počasen razvoj, utrujenost, bruhanje in encefalopatije. Med mitohondrijske bolezni, ki so pogostejše pri odraslih, vendar se lahko pojavljajo tudi pri otrocih, uvrščamo sindrom mitohondrijske encefalopatije, laktatne acidoze in kapi podobne epizode (MELAS), kronično progresivno oftalmoplegijo (CPEO), nevropatijo, ataksijo in retinitis pigmentozo (NARP), sindrom mioklonske epilepsije z rdečimi razcefranimi vlakni (MERRF) in Leberjevo dedno optično nevropatijo (LHON) (Slika 1) (7). >>



**Slika 1: Mitohondrijske bolezni.** Mitohondrijske bolezni so posledica genetskih sprememb na jedrni DNA, ki zapisujejo proteine, potrebne za delovanje mitohondrija (1A) ali genetskih sprememb na mtDNA (1B). Zaradi genetskih sprememb pride do motenj dihalne verige (2) in posledično do pomanjkanja celične energije (3). Prevalenca mitohondrijskih bolezni pri otrocih je 4,7 na 100.000 otrok, za njih je značilen težji potek bolezni, medtem ko je prevalenca mitohondrijskih bolezni pri odraslih 12,5 na 100.000 odraslih. Pripravljeno z BioRender.com.

**Figure 1: Mitochondrial diseases.** Mitochondrial diseases are caused by genetic variants in nuclear DNA, which encodes proteins essential for mitochondrial function (1A), or by genetic variants in mtDNA (1B). Due to these genetic variants, the respiratory chain is disrupted (2), leading to a deficiency in cellular energy (3). The prevalence of mitochondrial diseases is 4.7 per 100,000 children, who experience a more severe course of the disease, compared to a prevalence of 12.5 per 100,000 adults. Created with BioRender.com



Razvoj sekvenciranja naslednje generacije (NGS) je povzročil revolucijo na področju diagnostike genetskih bolezni, saj je genetska analiza postala hitrejša in cenejša. Za tehnologije NGS so značilni kratki odčitki, dolgi 300–500 bp (14). Kljub vsem prednostim, ki jih tehnologija NGS prinaša, se za analizo posameznih regij v diagnostiki uporablja tudi sekvenciranje po Sangerju. V zadnjem času se hitro razvija in izboljšuje sekvenciranje dolgih odčitkov, kamor uvrščamo tehnologiji proizvajalca Oxford Nanopore Technologies (ONT) in Pacific Biosciences (PacBio). Dolgi odčitki (>10 kbp) olajšajo opredelitev večjih insercij, delecij, translokacij in drugih strukturnih sprememb. Poleg tega bistveno izboljšajo kakovost *de novo* sestavljenih genomov in omogočajo detekcijo epigenetske informacije, brez posebne predpriprave vzorca (15). Namen preglednega članka je opisati tehnologijo ONT in prikazati prednosti, ki jih tehnologija ONT prinaša v diagnostiko mitohondrijskih bolezni.

## GENETSKA DIAGNOSTIKA MITOHONDRIJSKIH BOLEZNI

Diagnostika mitohondrijskih bolezni je zaradi klinične in genetske heterogenosti ter omejenih povezav med genotipom in fenotipom pogosto težavna, zato je za učinkovito genetsko diagnostiko ključen multidisciplinaren pristop. S prihodom tehnologije NGS se je spremenil način, kako pristopamo k diagnozi mitohondrijskih bolezni. Pri tradicionalnem pristopu so se najprej opravile biokemične in slikovne preiskave, nato pa mišična biopsija in histokemične preiskave, katerih rezultati so pripomogli k usmeritvi tarčnih molekularnih analiz. Z razširjeno uporabo tehnologije NGS se za diagnostiko mitohondrijskih bolezni najprej opravi genetsko testiranje DNA izolirane iz krvi (10,16).

Tehnologija NGS je izboljšala diagnostiko mitohondrijskih bolezni, zlasti tistih, ki so povezane z okvarami genov na jedrni DNA (17,18). NGS omogoča sočasno sekvenciranje in analizo mtDNA in jedrnih genov, povezanih z mitohondrijskimi boleznimi. Za sekvenciranje se uporablja oba pristopa, sekvenciranje celotnega eksoma (WES) in

sekvenciranje celotnega genoma (WGS). Pri WES so za obogatitev mtDNA potrebne dodatne sonde, ki se specifično hibridizirajo na mtDNA. Tako lahko dosežemo globoko pokritost mtDNA, kar bistveno izboljša odkrivanje nizkostonenjskih mitohondrijskih heteroplazmij. Z NGS sekvenciranjem in sistematično analizo celotnega mitohondrijskega genoma lahko dosežemo boljšo občutljivost v primerjavi z usmerjenim testiranjem patoloških genetskih sprememb posameznih genov, vendar pa obsežnejše testiranje poveča verjetnost odkritja genetskih sprememb z nejasnim kliničnim pomenom (VUS). Genetska sprememba je klasificirana kot VUS, ker v času njenega odkritja ni dovolj dokazov, ki bi jo lahko zanesljivo povezali kot vzročno za določen fenotip. Z novimi odkritji se lahko VUS spremeni v patološko, verjetno patološko, benigno ali verjetno benigno spremembo (16).

Patološke genetske spremembe na mtDNA so običajno enonukleotidne (SNV) ali manjše insercije in delecije, ki zapisujejo proteine ali mitohondrijske tRNA. Točkovne genetske spremembe v protein kodirajočih genih okvarijo funkcijo dihalne verige. Medtem ko točkovne genetske spremembe v tRNA zmanjšajo dostopnost mitohondrijskih prenašalnih RNA (mt-tRNA), kar okvari mitohondrijsko translacijo. V tRNA genih je več kot polovica vseh patoloških točkovnih genetskih sprememb na mtDNA (19). Patološke genetske spremembe so lahko tudi večje preureditve na mtDNA, kot je pogostejša 4,9 kbp mtDNA delecija (20,21). Posamezne delecije v mtDNA se običajno pojavijo v začetku razvoja zarodka in so prisotne v vseh celicah prizadetih tkiv (19). Do zdaj so znane patološke genetske spremembe v več kot 400 genih na jedrni DNA in v več kot 30 genih na mtDNA, ki so vzrok mitohondrijskih bolezni (22). Pri genetskih spremembah na mtDNA je verjetnost detekcije odvisna od same genetske spremembe, vrste vzorca in starosti bolnika.

Ker je stopnja heteroplazmije in količina mtDNA tkivno specifična, je tudi za genetsko analizo zelo pomemben izbor vzorca. Pri mitohondrijskih boleznih je mišica pogosto klinično prizadeto tkivo, zato je optimalna za analizo mtDNA in je hkrati izjemno pomembna za histološke in histokemične preiskave ter študije encimov dihalne verige. Izbira ustrezne mišice za biopsijo je ključnega pomena za natančno diagnozo, pri čemer moramo upoštevati vpletenost mišice v bolezen in njeno dostopnost. Za biopsijo je stegenska mišica pogosto mišica izbora, saj omogoči »

odvzem večjega vzorca, ki se uporabi za več diagnostičnih testov. Za določitev najboljšega mesta biopsije se prej izvede slikanje z magnetno resonanco (MRI), na podlagi katerega lahko ocenimo morfologijo in patologijo mišice (23). Mišična biopsija je invazivna metoda, zato se običajno najprej odvzame periferna kri, ki ni optimalen vzorec. V krvi se lahko stopnja heteroplazmije čez čas zmanjšuje. Delež MT-TL1 m.3243A>G naj bi se vsako leto zmanjšal za 1 %, zato je ta genetska sprememba pri starejših bolnikih z blažjimi oblikami velikokrat spregledana (24). Poleg tega se v hitro delečih celicah, kot so limfociti, zmanjšuje tudi delež posameznih preureditev na mtDNA (25). V nekaterih primerih je lahko urin vzorec izbora, saj je stopnja heteroplazmije v tem vzorcu stabilna in v nekaterih primerih (npr. MT-TL1 m.3243A>G) tesneje povezana s stopnjo heteroplazmije v mišici. Urin se je izkazal primerne tudi za detekcijo posameznih delecij (26). Kljub temu je v primerih, ko je rezultat negativen in obstaja klinični sum, potrebna mišična biopsija (16).

Za ustrezno interpretacijo genetskih sprememb na jedrni DNA in določanje patološkosti je ključno slediti najnovejšim smernicam, ki jih določa Ameriški zdravniški kolegij za medicinsko genetiko in genomiko (ACMG) (27). Razvrstitev genetskih sprememb na mtDNA glede na patološkost je pogosto bolj zahtevna. Za njihovo interpretacijo se uporabljajo nedavno objavljene ACMG smernice za mtDNA (28) ter podatkovna zbirka MITOMAP (29), ki velja za najboljšežnejši vir podatkov genetskih sprememb na mtDNA in se redno posodablja. Pri interpretaciji je treba upoštevati še pogostost v populaciji, haploskupine, heteroplazmijo in evolucijsko ohranjenost in funkcionalnost. Genetske spremembe, ki se v splošni populaciji pojavljajo s pogostostjo več kot 1/1000 kuriranih zaporedij GenBank v podatkovni zbirki MITOMAP (29) ali več kot 1/1000 homoplazmatskih zaporedij v gnomAD (30) in niso povezane z boleznijo, verjetno niso patološke. Haploskupine mtDNA opredeljujejo geografski izvor sprememb na mtDNA, ki so se nakopičile med evolucijo človeka. MITOMASER je dostopen na spletni strani MITOMAP (29) in zagotavlja napoved porazdelitve genetskih sprememb v različnih haploskupinah, ki se lahko upošteva pri ocenjevanju pogostosti genetske spremembe. Večina patoloških genetskih sprememb na mtDNA je heteroplazmatskih (31). Natančna določitev stopnje heteroplazmije je pomembna in se mora interpretirati ob upoštevanju testiranega tkiva. Stopnja heteroplazmatske genetske spremembe v klinič-

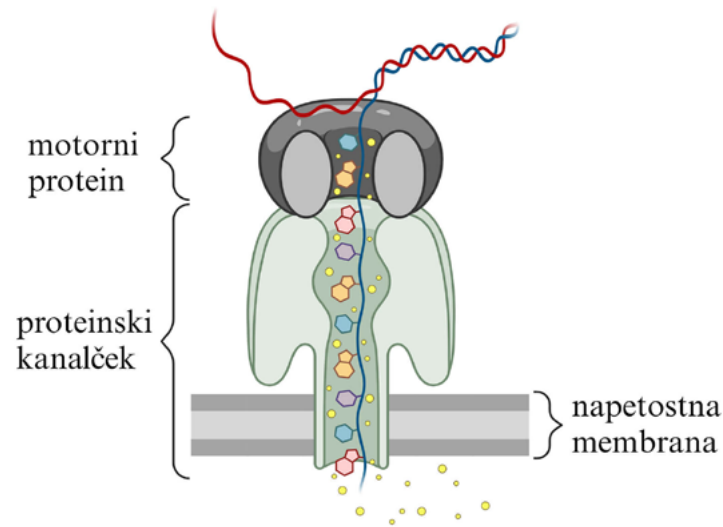
no prizadetem tkivu se mora ujemati s klinično sliko in z vsemi dodatnimi rezultati histokemičnih in biokemijskih preiskav. Za evolucijsko ohranjenost aminokislin in nukleotidov med različnimi vrstami se uporabljajo in silico orodja za napovedovanje, ki ocenjujejo variabilnost protein-kodirajočih regij. Posebno pozornost je potrebno nameniti genetskim spremembam mt-tDNA, pri katerih je še posebej pomembno oceniti vpliv spremembe na strukturo in funkcijo. Pri interpretaciji genetskih sprememb na mt-tRNA se uporabljajo podatkovne baze, kot je MitoTIP (32).

## SEKVENCIANJE DOLGIH ODČITKOV PRI MITOHONDRIJSKIH BOLEZNIH

Sekvenciranje dolgih odčitkov s tehnologijo ONT temelji na zaznavanju sprememb v električnem toku, ki nastanejo pri potovanju molekule DNA skozi proteinski kanalček – nanoporo. Sistem je sestavljen iz dveh komor, med katerima je napetostna razlika in sta ločeni z napetostno membrano. Napetostna razlika povzroči ionski tok skozi nanoporo in omogoči prehod enoverižne DNA. Pri prehodu DNA sodeluje motorni protein, ki odvija dvoverižno DNA in skupaj z električnim tokom omogoči kontroliran prehod enoverižne DNA skozi nanoporo (Slika 2). Med sekvenciranjem se generirajo dolgi odčitki s povprečno dolžino več kot 10 kb, kar ima mnoge prednosti pred NGS tehnologijami, za katere so značilni kratki odčitki (150–300 bp) (33). Tehnologija ONT omogoča, da lahko celoten mitohondrijski genom v velikosti ~16,6 kb sekvenciramo z enim samim odčitkom (34). V okviru mitohondrijskih bolezni lahko s sekvenciranjem z dolgimi odčitki izboljšamo analizo heteroplazmatskih delecij, identifikacijo velikih kompleksnih preureditev, ki jih je težko zaznati s kratkimi odčitki, in natančnejšo lokalizacijo NUMTs v jedrnem genomu, saj dolgi odčitki zajamejo tako NUMTs kot sosednja jedrna zaporedja. Kljub mnogim prednostim, ki jih prinašajo dolgi odčitki, je ONT manj natančna pri identifikaciji SNV in majhnih insercij in delecij v primerjavi s tehnologijo NGS (35).

»





**Slika 2: Sekvenciranje dolgih odčitkov s tehnologijo ONT.** Sistem je sestavljen iz proteinskega kanalčka – nanopore, motornega proteina in napetostne membrane. Motorni protein odvija dvovertično DNA in skupaj z električnim tokom omogoči kontroliran prehod DNA skozi nanoporo. Pripravljeno z BioRender.com.

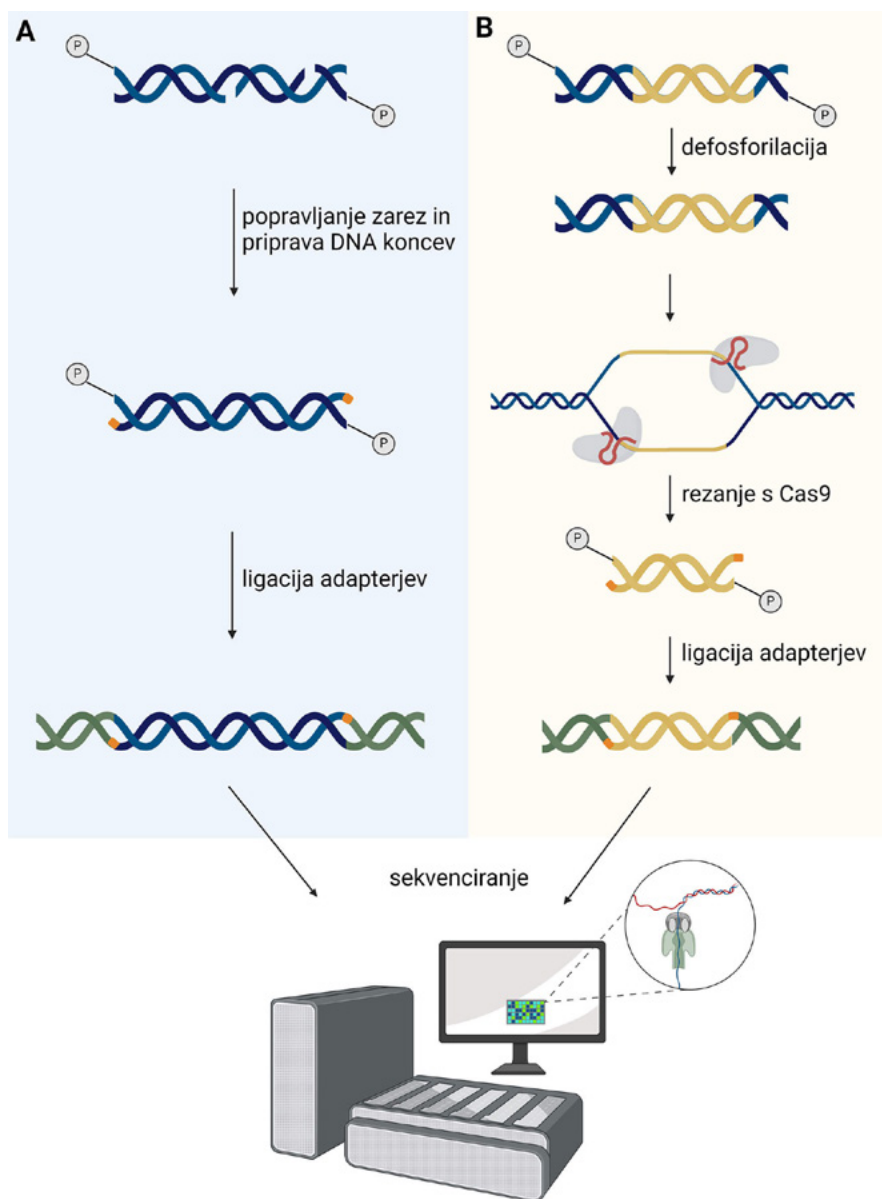
**Figure 2: Long-read sequencing using ONT technology.** The system comprises a protein nanopore, a motor protein, and a voltage membrane. The motor protein unwinds double-stranded DNA and, with the aid of an electric current, guides the controlled passage of the DNA strand through the nanopore. Created with BioRender.com

Za sekvenciranje s tehnologijo ONT moramo najprej pripraviti knjižnico. Za WGS popravimo zarezne na DNA (angl. *DNA nicks*), ki nastanejo ob izolaciji in tekom hranjenja vzorca, ter popravimo konce DNA tako, da postanejo primerni za ligacijo adapterjev. Sledi dodajanje adapterjev z motornim proteinom, ki med samim sekvenciranjem odvija DNA. Tako pripravljeno knjižnico nanese na prečno celico, kjer poteka sekvenciranje (Slika 3A).

ONT poleg WGS omogoča usmerjeno sekvenciranje mtDNA. mtDNA lahko obogatimo z uporabo encima Cas9, s čimer se izognemo PCR pomnoževanju mtDNA.

Pri usmerjenem sekvenciranju mtDNA se najprej načrtuje usmerjevalno RNA (sgRNA), ki določa mesto reza z encimom Cas9 na mtDNA. Celokupno DNA je potrebno s fosfatazo defosforilirati in ji dodati Cas9 z vstavljenjo sgRNA. Cas9 na mestu reza ustvari fosforilirane konce, kar omogoči ligacijo adapterskih zaporedij le na tarčno regijo. S takšnim usmerjenim sekvenciranjem mtDNA dobimo dobro pokritost mtDNA za uporabo v diagnostične namene (36) (Slika 3B).

>>



**Slika 3: Sekvenciranje s tehnologijo ONT.** (A) Priprava knjižnice za sekvenciranje celotnega genoma. (B) Priprava knjižnice za usmerjeno sekvenciranje izbrane regije. Pripravljeno z BioRender.com.

**Figure 3: Sequencing with ONT.** (A) Library preparation for whole genome sequencing. (B) Library preparation for targeted sequencing of a specific region. Created with BioRender.com.

Tehnologija ONT zaradi dolgih odčitkov izboljša identifikacijo, opredelitev in kvantifikacijo večjih strukturnih preureditev na mtDNA. Zaradi enakomerne pokritosti je identifikacija delecij in duplikacij lažja, saj jih opredelimo glede na globino pokritosti čez celoten mitohondrij-

ski genom. Hkrati bo zaradi dolžine odčitkov, ki jih pridobimo s sekvenciranjem, posamezna delecija razvidna že v posameznem odčitku (37). Z ONT lahko dosežemo tudi boljšo resolucijo točk preloma, saj je pri dolgih odčitkih večja verjetnost, da bo posamezna sprememba znotraj

posameznega odčitka. To izboljša bioinformatično identifikacijo strukturnih sprememb in sprememb v številu kopij (CNV) (38). Med pripravo knjižnice za sekvenciranje z ONT DNA ne pomnožimo s PCR, kar nam omogoči natančnejšo oceno deleža DNA molekul z delecijo v primerjavi z molekulami divjega tipa (34,36). S tehnologijo ONT lahko prepoznavamo kompleksne preureditve z velikimi podvojitvami, saj dolgi odčitki vključujejo tudi podvojeno regijo (39,40) in tako omogočajo identifikacijo zapletenih preureditev, ki bi jih druge tehnologije zaradi fragmentacije med pripravo lahko zgrešile (35).

Tehnologija ONT prinaša inovacije v diagnostiko mitohondrijskih bolezni, predvsem zaradi sposobnosti natančnejše identifikacije obsežnih strukturnih preureditev. Poleg tega s tehnologijo sekvenciramo nativno DNA, kar dodatno omogoči še zaznavanje epigenetskih modifikacij, ki bodo verjetno v prihodnosti pomemben element tudi pri diagnostiki mitohondrijskih bolezni. Zaradi vseh prednosti, ki jih tehnologija prinaša, in z razvojem zanesljivih bioinformatičnih orodij bo verjetno v prihodnosti tehnologija ONT postala pomemben diagnostični element, saj bo omogočila še bolj natančno in celostno razumevanje genetskih mehanizmov.

## ZAKLJUČEK

Mitohondrijske bolezni obsegajo širok nabor kliničnih znakov, ker so posledica genetskih sprememb tako na jedrnem kot tudi na mitohondrijskem genomu. Genetska diagnostika bolezni je kompleksna zaradi njihove genetske heterogenosti, prisotnosti jedrno-mitohondrijskih zaporedij ter učinka stopnje heteroplazmije pri izražanju kliničnih simptomov. Diagnostika teh bolezni je ključna za opredelitev bolezenskega stanja in dodatne informacije o prognozi ter zdravljenju. Tehnologija sekvenciranja dolgih odčitkov prinaša inovacije z natančnejšo identifikacijo strukturnih sprememb, vendar bodo za njeno uporabo v diagnostične namene potrebni dodatne raziskave in validacija metode za detektiranje genetskih sprememb.

## LITERATURA

- Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(6):711–23.
- McBride HM, Neuspiel M, Wasiaik S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol.* 2006;16(14):R551–60.
- Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull.* 2013;106(1):135–59.
- Lee W, Zamudio-Ochoa A, Buchel G, Podlesniy P, Marti Gutierrez N, Puigròs M, et al. Molecular basis for maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 2023;55(10):1632–9.
- Mitchell SL, Goodloe R, Brown-Gentry K, Pendergrass SA, Murdock DG, Crawford DC. Characterization of mitochondrial haplogroups in a large population-based sample from the United States. *Hum Genet.* 2014;133(7):861–8.
- Wei W, Pagnamenta AT, Gleadall N, Sanchis-Juan A, Stephens J, Broxholme J, et al. Nuclear-mitochondrial DNA segments resemble paternally inherited mitochondrial DNA in humans. *Nat Commun.* 2020;11(1):1740.
- Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16080.
- Aldossary AM, Tawfik EA, Alomary MN, Alsudir SA, Alfahad AJ, Alshehri AA, et al. Recent advances in mitochondrial diseases: From molecular insights to therapeutic perspectives. *Saudi Pharm J.* 2022;30(8):1065–78.
- Rosignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J.* 2003;370(Pt 3):751–62.
- Schon KR, Ratnaike T, van den Aemeele J, Horvath R, Chinnery PF. Mitochondrial diseases: A diagnostic revolution. *Trends Genet.* 2020;36(9):702–17.
- 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):753–9.
- Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain.* 2003;126(Pt 8):1905–12.
- Wei W, Tuna S, Keogh MJ, Smith KR, Aitman TJ, Beales PL, et al. Germline selection shapes human mitochondrial DNA diversity. *Science.* 2019;364(6442):eaau6520.
- Vrijenhoek T, Kraaijeveld K, Elferink M, De Ligt J, Kranendonk E, Santen G, et al. Next-generation sequencing-based genome diagnostics across clinical genetics centers: implementation choices and their effects. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(9):1142–50.
- Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet.* 2020;21(10):597–614.
- Mavraki E, Labrum R, Sergeant K, Alston CL, Woodward C, Smith C, et al. Genetic testing for mitochondrial disease: the United Kingdom best practice guidelines. *Eur J Hum Genet.* 2023;31(2):148–63.



17. Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, van den Heuvel L, Rodenburg RJ. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *J Inher Metab Dis*. 2015;38(3):437–43.
18. Taylor RW, Pyle A, Griffin H, Blakely EL, Duff J, He L, et al. Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *JAMA*. 2014;312(1):68–77.
19. Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(2):113–28.
20. Rocha MC, Rosa HS, Grady JP, Blakely EL, He L, Romain N, et al. Pathological mechanisms underlying single large-scale mitochondrial DNA deletions. *Ann Neurol*. 2018;83(1):115–30.
21. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med*. 1989;320(20):1293–9.
22. Schlieben LD, Prokisch H. The dimensions of primary mitochondrial disorders. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:600079.
23. Joyce NC, Oskarsson B, Jin LW. Muscle biopsy evaluation in neuromuscular disorders. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2012;23(3):609–31.
24. Rahman S, Poulton J, Marchington D, Suomalainen A. Decrease of 3243 A>G mtDNA mutation from blood in MELAS syndrome: A longitudinal study. *Am J Hum Genet*. 2001;68(1):238–40.
25. Poulton J, Deadman ME, Turnbull DM, Lake B, Gardiner RM. Detection of mitochondrial DNA deletions in blood using the polymerase chain reaction: non-invasive diagnosis of mitochondrial myopathy. *Clin Genet*. 1991;39(1):33–8.
26. McDonnell MT, Schaefer AM, Blakely EL, McFarland R, Chinnery PF, Turnbull DM, et al. Noninvasive diagnosis of the 3243A > G mitochondrial DNA mutation using urinary epithelial cells. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(9):778–81.
27. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–24.
28. McCormick EM, Lott MT, Dulik MC, Shen L, Attimonelli M, Vitale O, et al. Specifications of the ACMG/AMP standards and guidelines for mitochondrial DNA variant interpretation. *Hum Mutat*. 2020;41(12):2028–57.
29. MITOMAP [Internet]. [cited 2024 Mar 20]. Available from: <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/WebHome>
30. Gudmundsson S, Singer-Berk M, Watts NA, Phu W, Goodrich JK, Solomonson M, et al. Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. *Hum Mutat*. 2022;43(8):1012–30.
31. Ye K, Lu J, Ma F, Keinan A, Gu Z. Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(29):10654–9.
32. Sonney S, Leipzig J, Lott MT, Zhang S, Procaccio V, Wallace DC, et al. Predicting the pathogenicity of novel variants in mitochondrial tRNA with MitoTIP. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(12):e1005867.
33. Mantere T, Kersten S, Hoischen A. Long-read sequencing emerging in medical genetics. *Front Genet*. 2019;10:426.
34. Keraite I, Becker P, Canevazzi D, Frias-López C, Dabad M, Tonda-Hernandez R, et al. A method for multiplexed full-length single-molecule sequencing of the human mitochondrial genome. *Nat Commun*. 2022, 13(1):5902.
35. Macken WL, Falabella M, Pizzamiglio C, Woodward CE, Scotchman E, Chitty LS, et al. Enhanced mitochondrial genome analysis: bioinformatic and long-read sequencing advances and their diagnostic implications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2023;23(9):797–814.
36. Vandiver AR, Pielstick B, Gilpatrick T, Hoang AN, Vernon HJ, Wanagat J, et al. Long read mitochondrial genome sequencing using Cas9-guided adaptor ligation. *Mitochondrion*. 2022;65:176–83.
37. Frascarelli C, Zanetti N, Nasca A, Izzo R, Lamperti C, Lamantea E, et al. Nanopore long-read next-generation sequencing for detection of mitochondrial DNA large-scale deletions. *Front Genet*. 2023;14:1089956.
38. Wood E, Parker MD, Dunning MJ, Hesketh S, Wang D, Pink R, et al. Clinical long-read sequencing of the human mitochondrial genome for mitochondrial disease diagnostics. *bioRxiv*. 2019;597187.
39. Nicholls TJ, Zsurka G, Peeva V, Schöler S, Szczesny RJ, Cysewski D, et al. Linear mtDNA fragments and unusual mtDNA rearrangements associated with pathological deficiency of MGME1 exonuclease. *Hum Mol Genet*. 2014;23(23):6147–62.
40. Odoardi F, Rana M, Broccolini A, Mirabella M, Modoni A, D'Amico A, et al. Pathogenic role of mtDNA duplications in mitochondrial diseases associated with mtDNA deletions. *Am J Med Genet A*. 2003;118A(3):247–54.