

**Istituto Virtuale Nazionale
Malattie Neurologiche Rare**

Documento condiviso Progetto 2021 - WP5, Task 3 –

**Raccomandazioni per la compilazione del referto analisi molecolare
malattie mitocondriali**

Raccomandazioni per la compilazione del referto

Le malattie mitocondriali sono un gruppo molto eterogeneo di patologie ereditarie causate da alterazioni nel funzionamento dei mitocondri. Presentano notevole variabilità clinica per quanto riguarda l'età d'insorgenza, il tipo di evoluzione e i tessuti coinvolti e notevole variabilità genetica con mutazioni nel DNA mitocondriale e DNA nucleare.

Nell'ambito dei laboratori di genetica molecolare dell'Istituto Virtuale Malattie Rare, il gruppo di lavoro ha discusso le modalità di refertazione di: (1) mutazioni puntiformi del DNA mitocondriale, (2) macro-riarrangiamenti del DNA mitocondriale, (3) pannelli NGS (a fine diagnostico) di geni associati a malattie mitocondriali.

Il gruppo propone l'istituzione di un team di lavoro stabile per l'aggiornamento delle raccomandazioni e per la consulenza.

1. Mutazioni puntiformi del DNA mitocondriale

Essendo il DNA mitocondriale presente in multipla copia, le varianti ad esso associate possono presentarsi sia in forma omoplasmica (tutte le molecole portano la mutazione) che in forma eteroplasmica (coesistenza di molecole mutate e molecole *wild type*). L'eteroplasmia può variare da tessuto a tessuto.

a. Tessuto idoneo per l'analisi

Le mutazioni omoplasmiche (tipo quelle associate a LHON) possono essere valutate nel sangue (cellule mononucleate), mentre le mutazioni eteroplasmiche (tipo MELAS) devono essere valutate su un tessuto post mitotico, come il muscolo scheletrico, che viene proposto come tessuto di elezione per le analisi del DNA mitocondriale. In alternativa si possono utilizzare le urine (cellule di sfaldamento dell'epitelio urinario; 20-50 ml urine del mattino). Sebbene alcune varianti patogeniche eteroplasmiche possano essere efficacemente rilevate anche su sangue, il DNA ricavato da linfociti, in considerazione di vari fattori (tra cui la riduzione dell'eteroplasmia con l'avanzare dell'età di campionamento) è da considerarsi meno informativo e dovrebbe essere considerato solo se altre fonti di DNA per l'analisi non sono disponibili o sono difficilmente collezionabili oppure nei casi in cui è ipotizzabile un elevato carico mutazionale associato alla presentazione clinica (es. casi pediatrici).

Nel caso di mutazioni eteroplasmiche note, sia nello screening delle mutazioni più frequenti, che nell'analisi di segregazione di mutazioni familiari, possono essere utilizzate le urine.

Nel caso del sequenziamento della intera molecola del DNA mitocondriale, si raccomanda di utilizzare il DNA estratto da biopsia muscolare.

b. Informazioni necessarie al laboratorio

- Anamnesi familiare (per es. se e quanti altri affetti, grado di parentela)
- Quadro clinico del paziente per il quale viene richiesta l'analisi e degli eventuali famigliari affetti.
- Referto istologico della biopsia muscolare, la cui esecuzione è caldamente raccomandata nel caso di richiesta di sequenza completa del DNA mitocondriale.

c. Campi obbligatori del referto di mutazione puntiforme

- Anagrafica del paziente e tracciabilità del campione
- Data della richiesta e data del referto
- Inviante e indicazione clinica al test; quesito diagnostico (~~diagnostico~~ sintomatico, presintomatico, di portatore, prenatale, ...)

- Test eseguito: elenco delle varianti analizzate, sequenza di riferimento (utilizzare Cambridge Reference Sequence, GenBank NC_012920.1), metodiche utilizzate
- Indicazione di trasmissione matrilineare e penetranza incompleta
- Suggestire lo studio dei familiari sulla stessa linea materna
- Nel caso di mutazioni eteroplasmiche, suggestire lo studio della variante in diversi tessuti,
- Raccomandare la consulenza di un genetista e/o di uno specialista di area.

d. Campi obbligatori del referto della sequenza completa

- Anagrafica del paziente e tracciabilità del campione
- Data della richiesta e data del referto
- Inviante e indicazione clinica al test; quesito diagnostico (sintomatico, presintomatico, di portatore, prenatale, ...)
- Test eseguito: indicazione della regione analizzata, sequenza di riferimento (utilizzare Cambridge Reference Sequence, GeneBank NC_012920.1), metodiche utilizzate, inclusa l'analisi dei dati (pipeline, database di riferimento e software usati)
- Nel caso di sequenziamento NGS, indicare la copertura media, che deve essere almeno superiore a 500x, e la percentuale delle regioni coperte almeno 100X. Il gruppo suggestisce l'utilizzo di tecniche di sequenziamento NGS per ampliconi o ibridazione dirette all'analisi del DNA mitocondriale (e non il recupero di reads dall'analisi di librerie di sequenziamento di esomi che non prevedono sonde specifiche per il DNA mitocondriale). Non si consiglia la refertazione di varianti identificate mediante tecniche NGS aventi una eteroplasmia inferiore al 5%.
- Le varianti con frequenza $\geq 1/1000$ riportate nel database Mitomap e gnomAD v.3.1 e senza associazione a patologia, sono considerate polimorfismi di popolazione e non vengono riportate nel referto.
- Indicazione delle varianti escluse
- Aplogruppo mitocondriale
- Conferma di varianti patogenetiche con altra metodica
- Indicazione dei limiti del sequenziamento (riarrangiamenti)
- Indicazione di trasmissione matrilineare e penetranza incompleta
- Suggestire lo studio dei familiari sulla stessa linea materna
- Suggestire lo studio della variante in diversi tessuti, in particolare nel caso di VUS
- Consigliare lo studio dei complessi della catena respiratoria su muscolo e/o fibroblasti per correlare le varianti identificate (e la loro percentuale) al deficit biochimico
- Raccomandare la consulenza di un genetista e/o di uno specialista di area.

Per la classificazione e validazione delle varianti rare identificate nel mtDNA mitocondriale si consiglia l'uso dei seguenti strumenti di ricerca e annotazione:

Ricerca della singola variante o di un piccolo gruppo di varianti

- Mitomap, <https://www.mitomap.org/MITOMAP>
-

Annotazione di sequenze complete del DNA mitocondriale

- Mitomap/Mitomaster <https://www.mitomap.org/MITOMAP>
-

Elenco varianti indicati di specifici aplogruppi o calcolo dell'aplogruppo

- Mitomap, <https://www.mitomap.org/MITOMAP>
- HAPLOGREP, <https://haplogrep.i-med.ac.at/>

- PhyloTree, <http://www.phylotree.org/>

Predizione di varianti missenso

- MitImpact, 3D <https://mitimpact.css-mendel.it/>

Predizione di varianti in geni che codificano per tRNA mitocondriali

- MitoTIP <https://www.mitomap.org/MITOMAP>

Relativamente alla frequenza, si consiglia di specificare se la variante di incerto significato è specifica di una popolazione, indicando la frequenza della variante in uno specifico aplogruppo.

Per la validazione delle VUS, si può suggerire un approfondimento diagnostico presso uno dei centri specializzati della Rete, per l'esecuzione di analisi funzionali, quali l'attività biochimica della catena respiratoria sulla biopsia muscolare o linee cellulari derivanti dal paziente (fibroblasti, mioblasti), lo studio delle varianti nel modello cellulare dei "cibridi", la quantificazione delle varianti eteroplasmiche nelle fibre muscolari che presentano un difetto istologico (es. COX negative, Ragged Red Fibers) isolate mediante microdissezione laser.

Per la **consulenza genetica ai fini riproduttivi** il gruppo discute dei limiti relativi alle mutazioni puntiformi e delle opzioni attualmente disponibili. Per le mutazioni puntiformi, le madri trasmetteranno sicuramente la variante alla prole nel caso di mutazioni omoplasmiche. Mentre per le mutazioni eteroplasmiche la possibilità di trasmettere è variabile ed incerta, non sapendo la quantità di DNA mitocondriale mutato nell'ovocita e di come questo si distribuirà durante l'embriogenesi ("bottle neck"). Quindi, la quantità di DNA mitocondriale mutato necessaria alla manifestazione di un fenotipo biochimico ("soglia") o clinico è difficile da prevedere. L'effetto soglia è studiato per alcune varianti più frequenti (es. m.3243 A>G/MT-TL1 che causa la Sindrome MELAS), ma non per altre più rare.

In generale:

- il padre di un probando con una mutazione del DNA mitocondriale non è a rischio di avere (e quindi trasmettere) il difetto identificato nel probando.
- La possibilità che fratelli e sorelle del probando possano avere e, per le sole femmine, trasmettere la variante è dipendente dallo stato materno.
- Se la madre è positiva i fratelli e le sorelle del probando possono risultare positivi per la presenza della variante e le sorelle sono a rischio di trasmissione della malattia (si applicano le considerazioni sulla incertezza della manifestazione del fenotipo indicate sopra). Se la madre risulta negativa, la possibilità che i fratelli e le sorelle abbiano la mutazione è estremamente bassa (e limitata al caso del mosaicismo gonadico materno) così come, per lo stesso motivo, è bassa la probabilità che le sorelle la trasmettano alla prole. La prole di un probando (maschio) positivo per una mutazione del DNA mitocondriale non erediterà mai la variante.
- La prole di una probanda (femmina) positiva per una mutazione del DNA mitocondriale presenta un rischio di ereditare la variante e di manifestarne il fenotipo che dipende dalla percentuale di mutazione ereditata, tuttavia questo rischio è difficilmente quantificabile (vedi sopra).
- Gli ascendenti per linea materna di un probando/a positivo/a per una mutazione del DNA mitocondriale dovrebbero essere informati della possibilità di testarne la presenza, partendo

dai rami del pedigree più prossimi al probando/a e della conseguente possibilità di trasmissione della variante

2. Macro-riarrangiamenti del DNA mitocondriale

I macro-riarrangiamenti sono delezioni o duplicazioni nel DNA mitocondriale che si accumulano nei tessuti, in particolare quelli post-mitotici (muscolo scheletrico). I macro-riarrangiamenti possono essere singoli o multipli.

Le delezioni singole (o macrodelezioni) del DNA mitocondriale sono in genere dei difetti *de novo* e quindi in grado di produrre patologia solo nel probando. Nei rari casi di trasmissione descritti, la trasmissione è esclusivamente materna. In ogni caso il rischio di ricorrenza è da considerarsi basso.

Le delezioni multiple del DNA mitocondriale sono la conseguenza di un difetto nucleare in grado di alterare l'omeostasi del DNA mitocondriale in tessuti post-mitotici. In quanto nucleari, questi difetti possono essere trasmessi come tratti mendeliani dominanti o recessivi.

a. Tessuto idoneo per l'analisi

La ricerca dei macro-riarrangiamenti deve essere eseguita esclusivamente su un tessuto post mitotico, come il muscolo scheletrico.

L'analisi può essere eseguita su DNA da sangue (unicamente nel caso di sospetta Sindrome di Pearson) o su DNA da sedimento urinario (solo nel caso di pazienti giovani con sospetto di Sindrome Kearns-Sayre). Entrambe queste sindromi sono caratterizzate da delezione singola. In generale è sconsigliabile la ricerca di macro-riarrangiamenti nel sangue in adulti di età superiore ai 20 anni.

b. Informazioni necessarie al laboratorio

- Anamnesi familiare (per es. se e quanti altri affetti, grado di parentela)
- Quadro clinico del paziente per il quale viene richiesta l'analisi
- Referto istologico della biopsia muscolare, se eseguita.

c. Campi obbligatori del referto di macro-riarrangiamenti singoli

- Anagrafica del paziente e tracciabilità del campione
- Data della richiesta e del referto
- Inviante e quesito diagnostico
- Test eseguito: metodiche utilizzate
- Indicazione delle dimensioni e/o "junction point", classificati mediante MitoBreak http://mitobreak.portugene.com/cgi-bin/Mitobreak_home.cgi
- Indicazione della quantità di macro-riarrangiamenti rispetto al DNA mitocondriale wild-type
- Riportare che sono mutazioni somatiche non ereditate, ma che possono essere trasmesse, anche se altamente poco probabile, in quanto sono stati descritti rarissimi casi in cui il macro-riarrangiamento è stato trasmesso.
- Raccomandare la consulenza di un genetista e/o di uno specialista di area.

d. Campi obbligatori del referto di macro-riarrangiamenti multipli

- Anagrafica del paziente e tracciabilità del campione
- Data della richiesta e del referto
- Inviante e quesito diagnostico
- Test eseguito: metodiche utilizzate
- Indicazione della quantità di macro-riarrangiamenti rispetto al DNA mitocondriale wild-type

- Suggestire l'analisi di un pannello di geni associati a difetti della replicazione o al mantenimento del DNA mitocondriale.
- Indicare la correlazione con l'età del paziente, in quanto le delezioni multiple si accumulano con l'età.
- Consigliare la consulenza di un genetista e/o di uno specialista di area.

3. Pannelli NGS

Alla luce dell'incremento del numero di geni associati a malattia mitocondriale, l'approccio NGS per tali malattie è eterogeneo tra i laboratori e si basa su diversi pannelli. Per i dettagli della refertazione è stato deciso di adottare tutte le indicazioni condivise con gli altri gruppi, sottolineando alcune peculiarità.

a. Minimal gene sets

Considerando la variabilità delle malattie mitocondriali, ogni laboratorio utilizza pannelli diversi e non possono essere identificati "minimal gene sets". Si suggerisce di indagare i geni associati al fenotipo clinico specifico o riferire il paziente al centro specifico specializzato.

b. Informazioni necessarie al laboratorio per procedere a test NGS

- Quadro clinico del paziente per il quale viene richiesta l'analisi con il dettaglio di tutti i sintomi con termini HPO
- Anamnesi familiare (per es. se e quanti altri affetti, grado di parentela)
- Test clinici, biochimici e strumentali, specifici per la patologia, i cui risultati siano utili all'interpretazione del risultato del test NGS.

c. Campi obbligatori del referto

- Patologia per cui è richiesta l'analisi
- Anagrafica del paziente e tracciabilità del campione
- Data della richiesta e del referto
- Inviante e quesito diagnostico
- Test eseguito: elenco dei geni analizzati (pannello di geni o pannello in silico) e relative coperture*, metodiche utilizzate, inclusa l'analisi dei dati (pipeline, db di riferimento e software usati, limiti, studio delle regioni non coperte, conferma di varianti patogenetiche).

* È auspicabile che il 95% di ogni gene incluso nel pannello sia coperto da almeno 20 letture. È inoltre opportuno indicare il coverage medio del pannello. Si può sottolineare se le regioni con copertura $\leq 20X$ sono state coperte in Sanger.

d. Refertazione e interpretazione delle varianti

In base alle linee guida internazionali (ACMG, ACMG Technical Standard, ACGS Best Practice) il gruppo di lavoro raccomanda di indicare che nel referto non vengano riportati i polimorfismi presenti nei principali database di riferimento con una frequenza superiore all'1% nella popolazione (privi di significato patologico), le varianti benigne o probabilmente benigne e le varianti in eterozigosi, a significato sconosciuto, associate a patologia con trasmissione autosomica recessiva (il cui elenco può essere disponibile su richiesta).

Il gruppo di lavoro raccomanda di refertare le varianti NGS in due sezioni distinte:

Sezione 1 – varianti causative o verosimilmente causative del fenotipo per cui è stato richiesto il test

Questa sezione riporta la variante o le varianti che verosimilmente sono causative del fenotipo per cui è stato richiesto il test genetico.

Per queste varianti è opportuno indicare:

- gene e relativo trascritto (NM o ENST) o LGR; OMIM
- genotipo identificato per i geni patologia-correlati (gene, zigosità, frequenza nella popolazione, HGVS, annotazione a livello di cDNA e proteina, ove possibile)
- classificazione ACMG (patogenetica, verosimilmente patogenetica) e percorso che porta a tale classificazione. A seconda del laboratorio tale dato viene inserito nel referto o incluso in una scheda conservata nel laboratorio che ha eseguito l'analisi
- voce bibliografica relativa alla/alle variante/varianti identificata/e
- interpretazione della variante nel contesto della patologia (e della sua modalità di trasmissione) per la quale è stata richiesta l'analisi (non solo elenco)
- eventuale segregazione (ove necessario/utile a completamento dell'analisi)

Queste varianti devono essere validate mediante sequenziamento Sanger e il commento al referto deve illustrare il nesso causale tra la variante identificata ed il fenotipo.

Sezione 2 – Variant of unknown significance (VUS) nei geni compresi nel pannello

Questa categoria comprende:

1) le varianti classificate come VUS con criteri predittivi “positivi”, ma che non raggiungono “la soglia” ACMG di “verosimile patogenicità”, per le quali sia possibile effettuare ulteriori indagini (analisi segregazione genitori/famigliari, studi funzionali e/o biochimici). È opportuno indicare quali azioni devono essere intraprese per poter riclassificare la variante come probabilmente patogenetica/patogenetica

2) le varianti classificate come VUS con criteri predittivi “ampiamente positivi”, ma che non raggiungono “la soglia” ACMG di “verosimile patogenicità” e per le quali NON sia possibile effettuare ulteriori indagini.

Per tali varianti, l'interpretazione rimane più incerta e si può eventualmente aggiungere: *“La variante identificata non è stata precedentemente descritta in pazienti con malattia mitocondriale né in soggetti sani. Secondo le linee guida ACMG la variante è classificata come variante di significato incerto. Alla luce delle conoscenze attuali non è possibile attribuire alla variante identificata un chiaro ruolo patogenetico, né escludere un suo coinvolgimento nella patogenesi della malattia. Questa variante può essere suscettibile di rivalutazione nel tempo a seguito di nuove evidenze scientifiche”.*

Relativamente alla possibile riclassificazione nel tempo di tali varianti, nell'impossibilità realistica di garantire una revisione con cadenza regolare, si propone una revisione delle varianti in seguito a richiesta del clinico, qualora vi sia un aggiornamento del quadro clinico del paziente, oppure quando la stessa variante venga identificata più volte dal laboratorio.

3) le singole varianti identificate in eterozigosi in geni recessivi classificate come patogenetiche o verosimilmente patogenetiche secondo i criteri ACMG.

Per tali varianti, se non già effettuato o in corso, è opportuno indicare la necessità di un approfondimento diagnostico con altra metodica (es. MLPA, studio del trascritto in caso di disponibilità di tessuto per l'indagine).

e. Validazione funzionale delle varianti

In alcuni casi (es. CNVs identificate dai dati NGS, varianti predette come alteranti lo splicing ecc.), è opportuno riportare nel referto che la variante riportata o il suo impatto funzionale devono essere confermati o validati con metodiche alternative (es. MLPA se disponibile, real-time PCR su DNA genomico, studio del trascritto in caso di disponibilità di tessuto per l'indagine). Se tale indagine non

è disponibile presso il laboratorio stesso, il laboratorio potrà contattare gli altri centri partecipanti al gruppo di lavoro per indirizzare il paziente per la prosecuzione delle indagini.

f. Consulenza genetica

Il gruppo di lavoro raccomanda di includere in tutti i referti in cui vengono riportate varianti incluse nella Sezione 1 e nella Sezione 2 l'indicazione alla consulenza genetica e/o specialistica. Ad esempio, nel referto si può aggiungere la seguente frase:

“Si raccomanda consulenza genetica e/o specialistica. In particolare, per una corretta interpretazione, il risultato riportato nel presente referto deve essere discusso con il genetista medico e con lo specialista esperto”

È inoltre opportuno sottolineare che un eventuale esito negativo dell'analisi molecolare tramite pannelli di geni non esclude che il quadro clinico presentato dal paziente abbia comunque una causa genetica.