

Preventing the transmission of mitochondrial diseases

Citation for published version (APA):

Sallevelt, S. C. E. H. (2017). *Preventing the transmission of mitochondrial diseases*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20170203ss>

Document status and date:

Published: 01/01/2017

DOI:

[10.26481/dis.20170203ss](https://doi.org/10.26481/dis.20170203ss)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Mitochondrial diseases represent the most common inborn errors of metabolism and are associated with serious morbidity and mortality. This, combined with the current lack of treatment, results in requests for reproductive counseling and options to prevent the birth of an affected child. The challenge lies in the complex genetics of these disorders, as the primary genetic cause can be mutations in the mitochondrial DNA (mtDNA) or in the nuclear DNA (nDNA). Recurrence risks for mitochondrial diseases are often difficult to establish due to either the biology - unpredictable segregation patterns of mtDNA mutations- or the lack of a known genetic cause of the disease -particularly an issue for nuclear gene defects-. The same issues influence the applicability of prenatal diagnosis (PND) and preimplantation genetic diagnosis (PGD) as reproductive testing options for these disorders.

The central aim of this thesis was to develop new and optimize existing strategies to prevent the transmission of mitochondrial diseases, either caused by mtDNA mutations or nuclear gene defects, and to incorporate these choices in reproductive counseling for mitochondrial disorders. This central aim was broken down in a number of concrete objectives:

- Determine the reliability and success of PND and PGD for inherited or *de novo* mtDNA mutations and establish an optimal diagnostic protocol
- Characterize the different mechanisms affecting the germline transmission of mtDNA mutations and the effect this might have for recurrence risks
- Determine the frequency and distribution of *de novo* mtDNA mutations among mtDNA patients
- Determine the value of whole exome sequencing (WES) for establishing a genetic diagnosis in mitochondrial disease patients
- Develop a protocol for preconception carrier screening (PCS) based on whole exome sequencing

Chapter 1 describes the aims and outline of the thesis, and introduces some terminology related to mtDNA mutations, such as heteroplasmy –the mixture of mutated and wild-type mtDNA- and the genetic bottleneck –an event occurring upon transmission of mtDNA from a female to her offspring-.

Chapter 2 provides a general introduction to the reproductive options available to prevent the transmission of mitochondrial diseases. The options are considered in relation to the primary genetic causes of the disease, whereby challenges, successes and limitations are reviewed.

Chapter 3 presents nine PGD cycles in four female carriers of mitochondrial diseases, three MELAS (m.3243A>G) and one Leigh (m.8993T>G) case, and shows the applicability of PGD for mtDNA mutations. All carriers produced embryos with a

mutation load below the threshold of disease expression, which were genetically eligible for transfer to the uterus. The mutation load of a single blastomere turned out to be representative for the mutation load of the entire embryo in the majority of cases. Because of incidental heteroplasmy deviations in single blastomeres and having limited data available, the biopsy of two blastomeres was advised for the most reliable diagnosis.

As the biopsy of two blastomeres from the embryo instead of one diminishes the chance of pregnancy, in **Chapter 4** the 2-blastomere diagnostic protocol was re-evaluated in our meanwhile expanded dataset. 294 single blastomeres analyzed in 73 embryos of nine female m.3243A>G mutation carriers were used to establish the error rate of a single-blastomere biopsy protocol. The risk of a false-negative diagnosis was 0.34% (1/294). This is defined as the risk that an embryo is classified as eligible for transfer based on a single blastomere below the threshold, whereas the other blastomeres of the embryo in fact harbor mutation loads above the threshold. False-positive diagnoses were not observed. The low diagnostic error rate supports a single-blastomere biopsy PGD protocol for the m.3243A>G mutation. As in the early preimplantation embryo no mtDNA replication seems to occur and the mtDNA is divided randomly among the daughter cells, we conclude this result to be independent of the specific mutation and therefore applicable to all mtDNA mutations.

Chapter 5 describes the first and successful PGD treatment for the m.14487T>C mtDNA mutation, in a 41-year old carrier, illustrating the increasing use of PGD for mtDNA mutations.

In **Chapter 6**, PGD data (mutation loads in oocytes, zygotes and embryos) of three mtDNA mutations (m.3243A>G, m.8993T>G, m.14487T>C) were used to further unravel the mechanisms involved in the transmission of mtDNA mutations. It was shown that both random drift and selection events (negative and positive) occur and explain the observed differences in transmission patterns between the different mutations. High m.3243A>G mutation loads are selected against in the germline, because the resulting complete oxidative phosphorylation (OXPHOS) deficiency prohibits oocyte growth and maturation. In contrast, the OXPHOS deficiency of the m.8993T>G mutation is, even at high mutation loads, less severe. In fact, this mutation is positively selected for during oogenesis, because of an increased mitochondrial membrane potential (MMP), normally a hallmark of healthy mitochondria. The m.14487T>C mutation seems transmitted by random genetic drift only.

In contrast to the situation where a female carries an mtDNA mutation and the risk of affected offspring is often unpredictable and potentially high, *de novo* mtDNA mutations in an affected child are expected to have a low recurrence risk for a

subsequent child. However, this is no common knowledge among health care professionals, resulting in incorrect reproductive genetic counseling. As exact data on recurrence risks for *de novo* point mutations were lacking, we investigated (**Chapter 7**) frequency and recurrence risk of *de novo* mtDNA mutations were investigated in data from our own laboratory (105 patients, of which 17 with a *de novo* mutation) and from the literature (137 *de novo* cases), including five illustrative cases. It was shown that *de novo* mtDNA point mutations are a common cause (~25%) of mtDNA disease, and indeed have a low recurrence risk of less than 4%. Prenatal diagnosis can be offered for reassurance. When determining whether an mtDNA mutation occurred *de novo*, it is important that multiple tissues of the mother, including postmitotic (muscle), are tested.

Chapter 8 describes the results of a study on the distribution of mutations in different mtDNA gene types (tRNA genes and protein coding genes) among mitochondrial disease patients (datasets from Chapter 7). This distribution was compared between patients with *de novo* and inherited mtDNA mutations and related to the total number of possible pathogenic tRNA and protein coding mutations in the mtDNA. It is known that of all mtDNA patients, most have a mutation in a tRNA gene, even though the tRNA genes together make up only ~10% of the mtDNA. Remarkably, we found an entirely different ratio in *de novo* patients, of which the majority (~70%) harbored a mutation in a protein-coding gene. Still, the proportion of tRNA mutations in *de novo* patients (~30%) was already larger than would be expected based on their proportion in all potential mtDNA mutations (~5%). In the subgroup with inherited mtDNA mutations the proportion of tRNA mutations was largest (~86%). Besides frequency differences between tRNA and protein coding mutations as groups, also individual mutations showed varying frequencies in patients. We hypothesize that the observed patterns are explained by random occurrence of mtDNA mutations, followed by selection events, which differ for mtDNA mutations in tRNA and protein-coding genes. These selection events either occur in the germline or result from reproductive fitness related to the postnatal phenotype. Also, the heteroplasmy range where a mutation gives rise to a clinical phenotype plays a role.

Chapter 9 illustrates the value of WES in identifying nuclear gene defects as cause of mitochondrial(-like) diseases by describing two families where complex phenotypes were resolved by WES. In both families the affected patients harbored multiple genetic defects.

In **Chapter 10** the application of WES on a population-wide scale was explored by developing a strategy for WES-based PCS. The proposed strategy, selecting pathogenic variants and discarding variants of unknown significance and benign variants, was applied to 8 consanguineous and 25 non-consanguineous (fictive) couples. Our results

show for the first time that PCS based on WES is very well possible, detecting the majority of pathogenic mutations, whereas the number of variants remaining for post-hoc manual evaluation remains manageable in a clinical setting. This also means that it is not necessary to apply gene panels as additional filters. In fact, a gene panel reduced the sensitivity of PCS as relevant pathogenic mutations were missed. Our study furthermore stressed the importance of recording pathogenic variants in databases, because this will in time further increase the sensitivity of PCS.

In **Chapter 11**, our work was incorporated into clinical practice by providing guidelines for reproductive testing strategies of mitochondrial diseases. Furthermore, overseas developments in the field of preventing the transmission of mitochondrial diseases, particularly mitochondrial replacement therapies (MRT), and the potential implications of our findings for these, were discussed in relation to the current options available. WES and PCS were more broadly discussed, in the context of counseling and reproductive options, including WES for multigenic disease, incidental findings, the potential benefits of the identified recessive mutations for carrier-screening in the population of origin, and PCS for mtDNA mutations.

PART V

Addendum

Nederlandse samenvatting

Mitochondriële ziekten vormen de meest voorkomende erfelijke stofwisselingsziekten en leiden tot ernstige morbiditeit en mortaliteit. Dit, in combinatie met het vooralsnog ontbreken van behandelingsmogelijkheden, creëert een grote behoefte aan reproductieve counseling en opties om de geboorte van een aangedaan kind te voorkomen. Dit is niet eenvoudig, aangezien de primaire genetische oorzaak zowel een mutatie in het mitochondriële DNA (mtDNA) als in het nucleaire DNA (nDNA) kan zijn. Herhalingsrisico's voor mitochondriële ziekten zijn vaak moeilijk vast te stellen omdat de erfelijke oorzaak niet altijd bekend is en omdat in geval van mtDNA mutaties de overerving vaak onvoorspelbaar is. Dit beperkt ook de toepasbaarheid van prenatale diagnostiek (PND) en preimplantatie genetische diagnostiek (PGD) als reproductieve opties voor deze aandoeningen.

Het primaire doel van dit proefschrift was het ontwikkelen van nieuwe en het optimaliseren van bestaande strategieën om de transmissie van mitochondriële ziekten te voorkomen. Dit omvat ziekten zowel veroorzaakt door mtDNA mutaties als door nucleaire gendefecten. De verschillende opties zijn geïncorporeerd in de reproductieve counseling voor mitochondriële ziekten. Concreet is erop ingezet om

- de betrouwbaarheid en succes van PND en PGD voor geërfd of *de novo* mtDNA mutaties te bepalen en een optimaal diagnostisch protocol vast te stellen
- de verschillende mechanismen die de kiembaantransmissie van mtDNA mutaties beïnvloeden te karakteriseren alsmede het effect dat dit kan hebben op herhalingsrisico's
- de frequentie en distributie van *de novo* mtDNA mutaties onder mtDNA patiënten te bepalen
- de betekenis van whole exome sequencing (WES) te bepalen voor het identificeren van het nucleaire gendefect bij patiënten met een mitochondriële ziekte
- een protocol voor preconceptie dragerschapsscreening (PCS) te ontwikkelen gebaseerd op whole exome sequencing

Hoofdstuk 1 beschrijft de doelen en opbouw van het proefschrift, en introduceert een aantal kernthema's van het proefschrift, zoals mtDNA mutaties, heteroplasmie (de mix van gemuteerd en wildtype mtDNA) en de genetische mtDNA bottleneck (een fenomeen dat optreedt tijdens de transmissie van mtDNA van een vrouw naar haar nageslacht).

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de reproductieve opties die beschikbaar zijn om de transmissie van mitochondriële ziekten te voorkomen. De opties worden besproken in relatie tot de primaire genetische oorzaken van de ziekte, waarbij mogelijkheden en beperkingen naast elkaar zijn gezet.

In **Hoofdstuk 3** worden de resultaten gepresenteerd van negen PGD cycli bij vier vrouwelijke draagsters van een mitochondriële ziekte; drie dragen de m.3243A>G-mutatie, die kan leiden tot het MELAS syndroom en een de m.8993T>G mutatie, die kan leiden tot Leigh syndroom. Alle draagsters produceerden op basis van het onderzoek van 2 blastomeren uit het 8-cellig stadium, embryo's met een mutatiepercentage, dat dermate laag was dat het onwaarschijnlijk was dat dit tot een aangedaan kind kon leiden. Deze zijn op basis van dit criterium geschikt om in de baarmoeder geplaatst te worden. Uit onderzoek van restembryo's bleek dat het mutatiepercentage van individuele blastomeren in de grote meerderheid van de gevallen representatief was voor het mutatiepercentage van het gehele embryo en het blastomeer-onderzoek dus betrouwbaar is als voorspellend onderzoek. Omdat er incidenteel een enkele blastomeer een afwijkend percentage liet zien en omdat de omvang van de beschikbare data nog beperkt is, werd de biopsie van twee blastomeren geadviseerd om de kans op een misdiagnose te minimaliseren.

Echter, de biopsie van twee blastomeren in plaats van één verkleint de kans op zwangerschap en daarom is in **Hoofdstuk 4** het diagnostische 2-blastomeren protocol geherevalueerd op basis van een inmiddels uitgebreidere dataset. 294 individuele blastomeren, geanalyseerd uit 73 embryo's van negen vrouwelijke m.3243A>G mutatiedraagsters, zijn gebruikt. Bij het single-blastomeer biopsie protocol was het risico op een fout-negatieve diagnose, waarbij de geteste blastomeer onder de drempelwaarde van ziekte-expressie zit en de rest van het embryo erboven, 0.34% (1/294). Fout-positieve diagnoses werden niet waargenomen. Deze zeer lage kans op een foute diagnose ondersteunt een PGD-protocol met single-blastomeer biopsie voor de m.3243A>G mutatie. Aangezien in het vroege preïmplantatie embryo geen mtDNA replicatie lijkt plaats te vinden en het mtDNA willekeurig verdeeld wordt over de dochtercellen, concludeerden we dat deze resultaten onafhankelijk zijn van de specifieke mutatie en derhalve toepasbaar zijn op alle mtDNA mutaties.

Hoofdstuk 5 beschrijft de eerste en succesvolle PGD behandeling voor de m.14487T>C mtDNA mutatie, in een 41-jarige draagster, en illustreert de steeds bredere toepassing van PGD voor mtDNA mutaties.

In **Hoofdstuk 6** zijn PGD data (mutatiepercentages in oocyten, zygoten en embryo's) van drie mtDNA mutaties (m.3243A>G, m.8993T>G, m.14487T>C) gebruikt om mechanismen, die een rol spelen bij de transmissie van mtDNA mutaties, verder te ontfaan. De verschillen in transmissiepatronen tussen verschillende mutaties wijzen op een per mutatie verschillende rol van zowel willekeurige genetische drift als (negatieve en positieve) selectie. Hoge mutatiepercentages van de m.3243A>G overleven de kiembaan niet, doordat de resterende oxidatieve fosforylering (OXPHOS) capaciteit onvoldoende is voor groei en rijping van oocyten. De OXPHOS deficiëntie van

de m.8993T>C mutatie daarentegen is, zelfs bij hogere mutatiepercentages, minder ernstig, waardoor groei en rijping van oocyten normaal plaats kan vinden. Het is zelfs zo dat er positieve selectie op deze mutatie plaatsvindt tijdens de oogenese, als gevolg van een door deze mutatie hogere mitochondriale membraanpotentiaal (MMP) hetgeen normaliter een kenmerk van gezonde mitochondria is. De m.14487T>C mutatie lijkt uitsluitend door genetische drift te worden doorgegeven.

In tegenstelling tot de situatie waarbij een vrouw een mtDNA mutatie draagt en het risico op aangedaan nageslacht onvoorspelbaar en potentieel hoog is, verwachtten wij dat *de novo* mtDNA mutaties die zijn ontstaan in een aangedaan kind een laag herhalingsrisico hebben. Echter, in deze situatie worden deze draagsters vaak gecounseld met hoge herhalingsrisico's gebaseerd op het hoge mutatiepercentage in het kind en niet op het *de novo* karakter. Aangezien exacte gegevens over deze herhalingsrisico's van *de novo* puntmutaties ontbraken, onderzochten we (**Hoofdstuk 7**) de frequentie en de herhalingsrisico's van *de novo* mtDNA mutaties in data uit ons eigen laboratorium (105 patiënten, waarvan 17 met een *de novo* mutatie) en uit de literatuur (137 *de novo* cases). Aangetoond werd dat *de novo* mtDNA puntmutaties een veelvoorkomende oorzaak (~25%) van mtDNA-ziekten zijn, en dat deze inderdaad een laag herhalingsrisico hebben, van minder dan 4%. Prenatale diagnostiek kan aangeboden worden ter geruststelling. Bij het vaststellen of een mtDNA mutatie *de novo* is opgetreden, is het belangrijk om meerdere weefsels van de moeder, inclusief postmitotisch (spier), te onderzoeken.

Hoofdstuk 8 beschrijft de resultaten van een studie naar de distributie van mutaties in het mtDNA bij patiënten met mitochondriële ziekten (datasets van Hoofdstuk 7). Deze distributie is vergeleken tussen patiënten met *de novo* mtDNA mutaties en met mtDNA mutaties, die van de moeder geërfd zijn. Het was bekend dat van alle mtDNA patiënten, de meeste een mutatie in een tRNA gen hebben, ondanks dat de tRNA genen samen slechts ~10% van het mtDNA uitmaken. Opvallend was dat we een volledig andere ratio vonden in *de novo* patiënten, van wie de meerderheid (~70%) een mutatie in een eiwitcoderend gen had. Toch was ook daar al de proportie tRNA mutaties (~30%) hoger dan verwacht zou worden op basis van het aandeel in alle potentiële mtDNA mutaties (~5%). Bij de geërfd mtDNA mutaties was het aandeel tRNA mutaties het grootst (~86%). Afgezien van verschillen in frequentie tussen tRNA- en eiwitcoderende mutaties als groepen, waren er ook verschillen tussen individuele mutaties in patiënten. De distributiepatronen kunnen verklaard worden uit een proces, waarbij mtDNA mutaties willekeurig ontstaan, gevolgd door selectieprocessen die verschillen voor mutaties in de tRNA- en eiwitcoderende genen. Deze selectieprocessen treden ofwel in de kiembaan op, ofwel volgen uit de reproductieve fitness welke is gerelateerd aan de ernst van de ziekte. Ook de heteroplasmie-range waarbinnen een mutatie een klinisch fenotype geeft, speelt hierbij een rol.

Hoofdstuk 9 illustreert de betekenis van WES om nucleaire gendefecten te identificeren als oorzaak van mitochondriële, en hierop lijkende, ziekten. Twee families worden beschreven waarbij complexe klinische beelden zijn opgelost met WES. In beide families hadden de aangedane patiënten meerdere gendefecten.

In **Hoofdstuk 10** is een strategie ontwikkeld om op basis van WES preconceptie-screening aan te bieden op populatieniveau. In deze strategie worden zoveel mogelijk zekere pathogene varianten geselecteerd en worden varianten van onbekende significantie en benigne varianten weggefilterd. Deze benadering is uitgetest bij 8 consanguine en 25 niet-consanguine (fictieve) paren. Onze resultaten lieten voor het eerst zien dat PCS gebaseerd op WES de meerderheid van pathogene mutaties detecteert terwijl het aantal varianten dat overblijft voor post-hoc manuele evaluatie hanteerbaar is voor de klinische setting. Dit betekent ook dat het niet nodig is om genpanels toe te voegen als additionele filters. Sterker nog, een genpanel verminderde de sensitiviteit van PCS aangezien relevante pathogene varianten werden gemist. Onze studie benadrukte verder het belang om pathogene varianten in databases te registreren, omdat dit op termijn de sensitiviteit van PCS verder zal doen toenemen.

In **Hoofdstuk 11** zijn onze bevindingen geïncorporeerd in de richtlijnen voor reproductief testen van mitochondriële ziekten in de klinische praktijk. Verder zijn nieuwe technieken om de transmissie van van mtDNA ziekten te voorkomen, zoals mitochondriële vervanging (MRT), besproken in relatie tot de huidige beschikbare opties. WES en PCS zijn verder bediscussieerd, in de context van counseling en reproductieve opties, inclusief WES voor multigene aandoeningen, het probleem van bijbevindingen, de bredere betekenis van geïdentificeerde recessieve mutaties voor carrier-screening in de oorspronkelijke populatie, en PCS voor mtDNA mutaties.