

**IMPACTE DE LES TÈCNiques DE
SEQUENCIACIÓ MASSIVA EN L'ESTRATEGIA
DIAGNÒSTICA DE LES MALALTIES
METABÒLIQUES HEREDITÀRIES**

DISCURS

llegit a l'acte d'ingrés de l'Acadèmica Corresponent

Il·lustre Sra. Dra. Antònia Ribes i Rubió

Celebrat el dia 1 de març de 2021

PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmica Numerària

Excel·lentíssima Sra. Dra. Teresa Pàmols i Ros

Barcelona

2021

*L'Acadèmia no es fa solidària de
les opinions que s'exposen en les publicacions,
de les quals és responsable l'autor.*

PRESENTACIÓ

a càrrec de l'Acadèmica Numerària

Excel·lentíssima Sra. Dra. Teresa Pàmols i Ros

**Excel·lentíssim Senyor President,
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,
Estimats familiars, amics i companys,
Senyores i Senyors,**

En primer lloc voldria agrair a la Junta de Govern de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya haver-me atorgat la confiança d'encarregar-me la presentació de la Dra. Antònia Ribes i Rubió com a Acadèmica corresponent d'aquesta noble corporació.

És una gran satisfacció fer-ho, no solament pels mèrits professionals i científics de la Dra. Ribes que a continuació exposaré, sinó també per les seves qualitats humanes i perquè ens uneixen una bona amistat i molts anys de col·laboració professional i dedicació a les Malalties Metabòliques Hereditàries en el si de l'Institut de Bioquímica Clínica (IBC) i de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Antònia Ribes i Rubió va néixer a Bellcaire d'Urgell el 1953, va venir a viure de molt jove a Barcelona per a estudiar Química i es va llicenciar en aquesta matèria i posteriorment, es va doctorar en Ciències Químiques a la Universitat Autònoma de Barcelona. També va obtenir l'especialitat de Bioquímica Clínica.

L'any 1976, acabada de llicenciar, va entrar a l'Institut de Bioquímica Clínica com a becària i en aquest històric i prestigiós centre ha desenvolupat bona part de la seva brillant carrera científica. Aleshores, l'Institut Provincial de Bioquímica, Fundación Juan March, era un centre fundat per la Diputació de Barcelona el 1969 a partir d'un projecte del Dr. Joan Sabater i Tobella, amb l'objectiu de contribuir a la prevenció de la discapacitat intel·lectual de causes congènites/

genètiques. El diagnòstic d'anomalies cromosòmiques, de malalties metabòliques hereditàries, especialment les de debut pediàtric amb severa afectació neurològica i el cribratge neonatal de la fenilcetonúria en els nadons de la ciutat de Barcelona, varen ser les primeres activitats de l'IBC.

Quan va entrar la Dra. Ribes com a becària, va començar a treballar en el diagnòstic de les acidúries orgàniques mitjançant l'aplicació de l'espectrometria de masses, aviat es varen posar de manifest les seves capacitats tan assistencial com de recerca i el 1981 ja era Adjunt. La seva tesi doctoral "Acidurias orgàniques: Contribució a l'estudi dels errors congènits del metabolisme" va consolidar a l'IBC aquesta nova línia que ella havia iniciat.

L'any 1993, la Diputació de Barcelona i L'Hospital Clínic varen constituir un Consorci per a gestionar l'IBC i l'Hospital Casa de Maternitat amb el nom de Corporació Sanitària i l'IBC es va integrar al Centre de Diagnòstic Biomèdic de l'Hospital Clínic de Barcelona. Amb el pas dels anys, el que era la part de diagnòstic de MMH en pacients simptomàtics i el programa de cribratge neonatal esdevindrien la Secció d'Errors Congènits del Metabolisme-IBC del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic. La Dra. Ribes, l'any 2000 va passar a ser Especialista sènior, l'any 2001 Consultor i el 2004 Consultor Sènior i el 2006 va ser anomenada Cap de la Secció.

Ben aviat va començar a fer aportacions interessants, així el 1995 quan amb motiu de la celebració dels 25 anys de l'IBC es va editar el llibre "Del Cromosoma al Gen", i com a dibuix de la portada vàrem triar la fórmula de la lactona de l'àcid β -OH adípic, compost no descrit a la literatura, identificat en l'orina d'un pacient per la Dra. Ribes, que va donar lloc al diagnòstic d'una nova malaltia, la deficiència de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena llarga.

L'any 1996 va formar part de l'equip que va rebre el Premi Reina Sofia de Prevenció de deficiències per les "Investigacions encaminades a la prevenció de les anomalies cromosòmiques i les malalties metabòliques hereditàries".

Més endavant el seu equip va rebre el Premi SSIEM 2011 (*Interna-*

tional Society for the study of inborn errors of metabolism) pel descobriment d'una nova MMH que cursa amb encefalopatia, a vegades hipertensió pulmonar i èxits abans dels 15 mesos de vida i és deguda a mutacions en el gen *NFU1* que causa una deficiència en la biogènesi de l'àcid lipoic, un cofactor per a l'activitat de complexos multi enzimàtics del metabolisme mitocondrial; i el 2013 el Premi del ICIEM (*International Congress of Inborn Errors of metabolism*) per la identificació de mutacions en un altre gen, *LIPT1*, com a causa d'una malaltia d'inici precoç associada també a una deficiència en la biosíntesi de l'àcid lipoic. Aquests treballs van obrir la porta a un nou camp de recerca en l'àmbit de les malalties rares amb gran importància diagnòstica i una millor comprensió dels mecanismes moleculars implicats en el metabolisme de l'àcid lipoic.

Efectivament, la Dra. Ribes ha centrat la seva recerca en la medicina traslacional en el camp de les MMH, particularment en les del metabolisme energètic mitocondrial. L'objectiu estratègic del seu grup consisteix a esbrinar les bases genètiques i bioquímiques de les MMH, així com els mecanismes fisiopatològics d'aquestes malalties amb l'objectiu final de desenvolupar noves estratègies diagnòstiques i terapèutiques. En aquest sentit han identificat nous gens i han implementat metodologies basades en la tècnica CRISPR/Cas per a demostració de la patogenicitat de variants identificades mitjançant NGS.

En la línia de teràpies, utilitzen el cribratge de llibreries químiques i peptídiques basant-se en una relació de pacients prèviament identificats pel grup, cercant en particular compostos que puguin actuar com a chaperones i compostos capaços de promoure l'exocitosis lisosòmica.

Actualment la Dra. Ribes és la Cap de la Unitat 737 del Centre d'investigació Biomèdica en Xarxa de Malalties Rares (CIBERER) i Cap del Grup de recerca del IDIBAPS de Malalties Metabòliques Hereditàries.

Ha dirigit 17 tesis doctorals i treballs de màster. Ha participat en 24 projectes de recerca finançats en convocatòries competitives d'administracions o entitats públiques i privades (3 europees), en 14 d'ells com a IP o Co-IP i també en 5 projectes finançats en convocatòries no competitives, en 3 dels quals com a IP. Ha tingut així mateix un paper rellevant en les xarxes de recerca cooperativa finançades pel

FIS, REDEMETH, INERGEN i REC-GEN i actualment en URDCat (*Undiagnosed rare disease of Catalonia*).

Aquesta activitat ha produït nombroses comunicacions a congressos i publicacions. Ha realitzat al voltant de 200 publicacions indexades a Pubmed. De les contribucions en forma de capítols de llibres en vull destacar dues, la seva participació en edicions successives amb el capítol “trastorns dels aminoàcids i dels àcids orgànics” en el Farreras-Rozman de Medicina Interna i en la pròxima edició del “Physician’s guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases” (Ed. N. Blau, CH. Viannay Savant, C. Dionisi Vici) hi participa amb dos capítols, les acidúries orgàniques i les deficiències d’àcid lipoic i dels clusters de Fe-S.

Ha participat com a professora en els Màsters de Biomedicina i de Medicina translacional de la UB, i actualment coordina la assignatura de Genètica Bioquímica del màster de Genètica assistencial de la UAB.

Internacionalment hem de destacar que és membre del *Executive Committee* de la ERNDIM (*European research network for the evaluation and improvement of the screening, diagnosis and treatment of inborn disorders of metabolisms*) i del Council de la SSIEM (*Society for the study of inborn errors of metabolism*) i el 2013 juntament amb el Dr. Campistol de Sant Joan de Deu van organitzar l’International Congrés of Inborn Errors of Metabolism (ICIM) a Barcelona.

He tingut l’honor i el privilegi de ser la Directora de l’IBC i per tant la cap de la Dra. Ribes durant 21 anys, que com palesa aquesta presentació ha tingut un paper molt rellevant en les fites assistencials i científiques assolides, juntament amb altres professionals també brillants amb qui vàrem aconseguir formar un gran equip. El 2019 l’IBC ha fet 50 anys, s’han diagnosticat milers de pacients d’un ventall de més de 200 MMH, fa una sòlida recerca en les seves bases bioquímiques i moleculars, ampliant les capacitats diagnòstiques, identificant noves malalties i desenvolupant noves teràpies. El programa de cribratge neonatal de Catalunya ara inclou 24 malalties, 20 de les quals són trastorns del metabolisme dels aminoàcids i àcids orgànics i de la beta oxidació mitocondrial (precisament les malalties al coneixement

de les quals tant ha contribuït la Dra. Ribes) i més de 2 milions de nadons han estat ja analitzats pel programa. Aprofito doncs aquesta avinentesa per desitjar un gran futur a tot l'equip.

Finalment vull esmentar que el nostre hospital, *sí ens permet quedar-nos passats els 65 anys ha de ser sense tenir càrrecs de comandament*, per tant durant els darrers 5 anys de la meua vida laboral, la Dra. Ribes va passar a ser la meua Cap i li vull donar les gràcies perquè amb la seva positiva actitud va contribuir a fer que els visqués amb plenitud.

Només em resta felicitar la Dra. Antònia Ribes pel seu ingrés com a acadèmica corresponent, una felicitació que faig extensiva al seu formidable equip de treball i a la seva família perquè en una vida professional tan intensa sempre hi té el seu grau de participació, en primer lloc als seus pares. Felicito també al seu marit Antonio Parente, Dr. En Químiques, pioner del sector *biotech* català, amb una extensa cartera de patents, i a les seves filles Anna, Dra. en medicina, hematòloga, que treballa al Departament d'Immunologia de l'*Oslo University Hospital*, i Marta, Llicenciada en economia per la UPF i Màster per l'IESE executiva de la indústria farmacèutica. I finalment als nets Trym, Alba, Sofia, Max i Paulo, que tindran en la seva família un inspirador model d'amor a la ciència.

Voldria finalment deixar palès que la trajectòria de la Dra. Ribes amb les seves aportacions al diagnòstic, coneixement i tractament de les rares MMH fa honor al lema de la nostra Acadèmia "*Supplendum est per artem in quod natura non fuerit*" i que de ben segur contribuirà a incrementar encara més el nivell i prestigi d'aquesta docta corporació.

És per tot això que un cop finalitzada aquesta presentació i havent llegit el discurs reglamentari demano al Sr. President que tingui a bé imposar a la Dra. Antònia Ribes i Rubió la medalla i l'estola i lliurar-li el títol acreditatiu com a Acadèmic Corresponent de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya.

Moltes gràcies

**Excel·lentíssim Senyor President,
Excel·lentíssims i Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Distingides autoritats acadèmiques i professionals,
Estimats familiars, amics i companys,
Senyores i Senyors,**

Vull agrair en primer lloc, a la Junta de Govern de la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya la meua elecció com a acadèmica corresponent a proposta dels Excel·lentíssims Acadèmics Teresa Pàmpol, Joan Sabater i Montserrat Baiget. És per a mi un gran honor comptar amb el seu reconeixement i faré tot el possible per complir amb dignitat les responsabilitats que implica aquest nomenament.

A més, vull donar les gràcies altre cop a la Teresa Pàmpol per haver acceptat contestar el meu discurs d'ingrés i per haver-me passat el testimoni de l'IBC que espero haver complert, tal como ella va fer, amb eficàcia i dedicació. Gràcies Teresa per tot el que he après de tu.

El treball i les idees que aquí exposaré no son només meves, sinó que formen part del grup de persones que han desenvolupat o estan desenvolupant la seva vida professional a Institut de Bioquímica Clínica (IBC), avui Secció d'Errors Congènits del Metabolisme-IBC de l'Hospital Clínic de Barcelona.

En especial vull destacar la professionalitat, companyerisme i amistat de persones amb les que he estat o estic treballant colze a colze, i dia a dia, com Paz Briones, Marisa Girós, Maria Josep Coll, Laura Gort, Judit Garcia, Blai Morales i Sonia Pajares. També mereixen un reconeixement especial els investigadors que formen part del grup IDI-BAPS i CIBERER de Malalties Metabòliques Hereditàries, tant els

del passat: Gemma Martinez, Kitty Busquets, Aleix Navarro, Angela Arias, Leslie Matalonga i Xènia Ferrer, com els que actualment estan desenvolupant una tasca molt rellevant de recerca i translació al diagnòstic: Frederic Tort, Olatz Ugarteburu, Gerard Muñoz i Laia Segur.

Vull agrair també a l'equip de cribratge neonatal: José Luis Marin, Rosa Lopez, Ana Argudo i José Manuel Gonzalez de Aledo, la col·laboració i integració al grup de diagnòstic. Aquest fet ha facilitat el diagnòstic final, en benefici directe dels pacients i del programa de cribratge neonatal.

Una menció especial als tècnics del laboratori en particular a Conxita Llordés i a Lotti Ogg per haver estat tants anys al meu costat. A elles i ells els hi devem, en part, el diagnòstic i la selecció acurada dels pacients, l'estudi dels quals ens ha dut actualment a l'associació d'unes malalties concretes amb la descoberta de gens que mai s'havien associat a malaltia.

Agraeixo també el suport econòmic del Instituto de Salud Carlos III/ Fondo de investigación Sanitaria (FIS) que, amb tres projectes consecutius (PI 12/01138, PI 16/01048 i PI 19/01310) ens han facilitat, entre altres, l'accés a les tècniques de seqüenciació massiva més innovadores (WES, WGS, RNAseq) i posteriorment implementar-les al diagnòstic. També agraeixo al CIBER de Malalties Rares (CIBERER) el suport científic i de recursos humans des de l'any 2006 fins a l'actualitat.

A la Direcció del CDB, en particular a Aurea Mira i Wladimiro Jiménez, per la confiança, al incloure la seqüenciació de l'exoma en la tasca assistencial de diagnòstic de les malalties metabòliques hereditàries.

Finalment un agraïment a tota la meva família i en particular als meus pares, al meu marit, Antonio, i a les meves filles Anna i Marta. En ells sempre he trobat l'estímul i el suport necessari per seguir endavant.

Vull dedicar aquest discurs a la meva amiga Pili Hausman, que ja no està entre nosaltres. Ella ha estat una de les persones que més insistentment ha fet que elaborés aquest discurs. Para ti Pili!!

Índex

1. Introducció a les malalties metabòliques hereditàries (MMH).
2. Diagnòstic mitjançant els recursos de la genètica bioquímica clàssica.
3. Evolució del diagnòstic mitjançant la utilització de la seqüenciació massiva.
4. Integració i interpretació de les dades de seqüenciació massiva
 - 4.1. Seqüenciació, control de qualitat de les dades i inclusió d'anotacions per cada variant.
 - 4.2. Filtratge de variants
 - 4.3. Assignació de patogenicitat.
5. Estudis funcionals
6. Descobriments de la causa d'una malaltia mitocondrial
7. Conclusions

1. Introducció a les malalties metabòliques hereditàries.

El concepte “d’errors congènits del metabolisme”, avui en dia malalties metabòliques hereditàries (MMH)”, va ser introduït per Archibald Garrod, professor de Medicina a la Universitat de Oxford el 1909 en “*The Croonian Lectures*”. Descriu quatre entitats paradigmàtiques: albinisme, alcaptonúria, cistinúria i pentosúria. Va observar que els pacients presentaven anomalies químiques que es transmetien familiarment tot seguint les lleis de Mendel. A partir d’aquestes valuoses observacions, avui en dia sabem que les MMH són degudes a mutacions en gens que codifiquen per proteïnes involucrades en una gran quantitat de vies metabòliques. Les proteïnes amb funcions molt diverses: enzimàtiques, de transport, d’assemblatge, de comunicació entre orgànuls cel·lulars i un llarg etc., perdran la seva funcionalitat i al seu torn donaran lloc a defectes en la síntesi, transport o emmagatzematge de compostos que formen part del nostre metabolisme i com a conseqüència d’aquestes alteracions se’n derivarà la simptomatologia clínica.

Les MMH més comunes abasten des de trastorns del metabolisme dels aminoàcids, àcids orgànics, àcids grassos, colesterol, purines i pirimidines... etc. sota la denominació de malalties del metabolisme intermediari, fins a trastorns de la glicosilació, així com malalties peroxisòmiques, mitocondrials i lisosòmiques d’acord amb l’orgànu cel·lular afectat. Actualment el grup és tan nombrós que la classificació és cada vegada més difícil. Ja que abasta al voltant de 1.500 malalties diferents; en concret hi ha 1.565 entrades de MMH en la versió 2 de la base de dades www.iembase.org encara finalitzant la seva revisió. Les MMH constitueixen un conjunt extens, divers i heterogeni, que per la seva gravetat, curs clínic crònicament debilitant i baixes incidències individuals, entren en la categoria de malalties rares o malalties orfes tal com les defineix la Unió Europea. Les prevalències individuals són molt baixes però en el seu conjunt la prevalença global al naixement és de 1/2.500-1/5.000 nascuts vius, encara que en estudis recents es cita una prevalença al voltant de 1/800 nascuts vius (Pàmols T, 2010), s’ha de tenir en compte però que són extrapolacions.

Aquestes malalties s’hereten majoritàriament de forma autosòmica recessiva i també lligades al cromosoma X, d’altres són d’herència

materna degudes a mutacions en l'ADN mitocondrial i només unes quantes s'hereten en forma autosòmica dominant.

Encara que hi ha MMH de debut clínic en l'edat adulta, al voltant del 80% ho fan en la edat pediàtrica, si bé es poden presentar en qualsevol etapa de la vida i amb simptomatologia clínica molt diversa. En general presenten afectació multiorgànica, incloent sovint el sistema nerviós central. Moltes són causa de mort prematura i d'una qualitat de vida reduïda (Gonzalez-Lamuño D, 2019). No obstant això, a causa del fenomen de l'heterogeneïtat al·lèlica i a l'entorn individual, cada pacient presenta la seva pròpia subcategoria de malaltia (Scriver ChR, 2002). Garrod va intuir aquest fet quan va escriure “cadascú és un individu i no simplement un membre de la raça humana». Aquesta variació individual produeix diferents fenotips per a una mateixa malaltia i el genotip no sempre es predictiu del fenotip (Scriver ChR, 2002) la qual cosa dificulta el diagnòstic tant en el laboratori, com en base a la sospita clínica. (Blau N 2014; Saudubray 2016).

En general, una característica diferencial de les MMH respecte altres malalties genètiques hereditàries, es que les primeres tenen un fenotip metabòlic, es a dir un perfil alterat de metabòlits en fluids biològics o be alteracions funcionals a nivell cel·lular, que ens ajudaran a establir la orientació diagnòstica. Malgrat aquesta definició, cada vegada resulta més difícil fer la distinció entre MMH i altres malalties genètiques hereditàries. En aquest sentit són molt interessants les reflexions de Morava E, et al 2015. Aquests autors es pregunten: podem definir un trastorn mendelià determinat com una malaltia metabòlica hereditària si no hi ha un fenotip bioquímic clar per a detectar-lo?. D'altra banda, quin trastorn mendelià pot no estar relacionat amb algun procés cel·lular, o amb alguna proteïna i per tant no ser una malaltia metabòlica hereditària?. Aquestes reflexions sorgeixen arran de que en els últims anys la revolució genòmica ha permès identificar un nombre impressionant de malalties genètiques hereditàries, algunes sense biomarcadors coneguts inicialment. Independentment d'aquestes reflexions, l'estratègia diagnòstica actual està evolucionant cap a una major cohesió de la trilogia clínica-bioquímica-genètica, el que permetrà evolucionar cap a un tractament de precisió o medicina personalitzada de qualitat.

El desenvolupament de tècniques analítiques, com l'espectrometria de masses, entre d'altres, han permès la detecció i identificació de un nombre creixent de MMH. D'altra banda, aquesta tecnologia permet la mesura simultània de diferents metabòlits en un únic assaig a partir d'una gota de sang impregnada en paper i en conseqüència detectar alhora diferents malalties. Actualment l'espectrometria de masses en tàndem aplicada a la detecció massiva neonatal permet identificar un bon nombre de MMH en individus pre-simptomàtics. Posteriorment, el diagnòstic precís juntament amb l'aplicació precoç del tractament adequat donarà lloc a que aquests nadons tinguin un desenvolupament normal, incidint en una millora substancial de la salut i de la qualitat de vida de la població.

Es evident que aquest camp tant ampli requereix una aproximació interdisciplinària i especialitzada, un ampli i sofisticat ventall tecnològic, recursos humans i econòmics adients així com el suport específic d'activitats de I+D, sobretot si es vol no tan sols assolir un diagnòstic sinó també conèixer les bases moleculars i cel·lulars de la patologia associada.

2. Diagnòstic mitjançant els recursos de la genètica bioquímica clàssica.

Si la genètica es la branca de la biologia centrada en el fenomen de la herència i les lleis que la governen, la genètica-bioquímica estableix les relacions fonamentals entre gens, proteïnes i metabolisme.

Clàssicament, davant d'una sospita clínica de MMH, la seqüència diagnòstica sovint comença amb l'anàlisi de metabòlits a fluids biològics, seguit de l'anàlisi de la proteïna alterada (Blau N et al 2014). Quan la malaltia està suficientment acotada, es procedeix als estudis genètics a fi d'esbrinar la mutació causal de la malaltia, essent aquest el punt final del diagnòstic.

En algunes ocasions l'anàlisi de metabòlits és específic d'una malaltia concreta, de forma que es pot procedir directament a l'estudi del gen específic, però en altres, es necessari procedir a múltiples estudis enzimàtics o al de la proteïna alterada abans de concloure el diagnòstic

definitiu. En aquests casos l'accés a les tècniques de seqüenciació massiva, han modificat dràsticament l'estratègia diagnòstica.

3. Evolució del diagnòstic mitjançant la utilització de la seqüenciació massiva.

En els darrers anys la gran revolució de les tecnologies genòmiques ha permès identificar un nombre creixent de gens les mutacions dels quals són la causa de la malaltia. Degut a aquests avenços l'estratègia diagnòstica actual ha evolucionat envers una major cohesió de la trílogia "clínica - bioquímica - genètica".

El diagnòstic s'inicia com sempre a partir de la sospita clínica i dels estudis complementaris seguit d'una estratificació bioquímica en base a l'anàlisi de biomarcadors en fluids biològics. Com ja s'ha esmentat abans, en alguns casos pot succeir que els marcadors clínics i bioquímics siguin tan específics que directament es pugui anar a l'estudi d'un gen concret. En la figura 1, es mostra l'exemple de l'acidúria glutàrica tipus I. Així doncs, en aquests casos seguirem l'esquema clàssic.

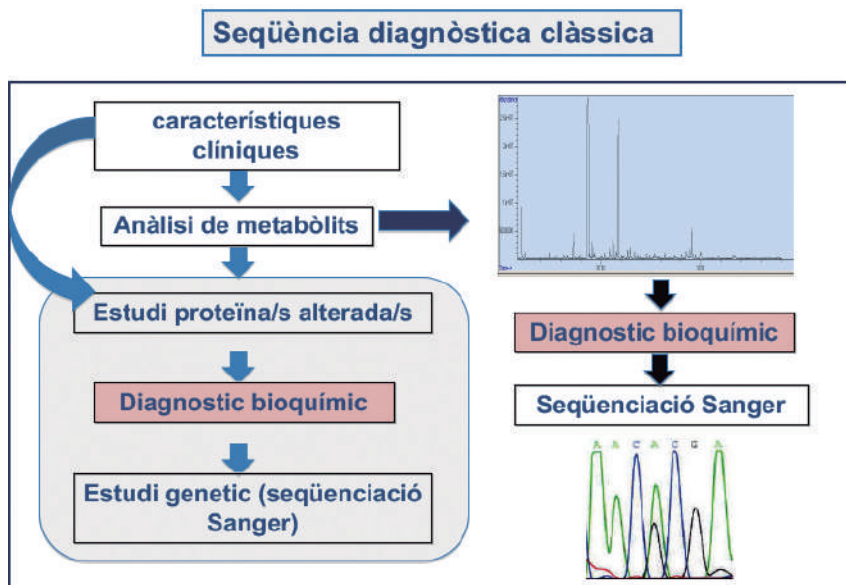


Figura 1.- Seqüència diagnòstica clàssica en malalties metabòliques hereditàries.

En altres ocasions pot succeir que els marcadors clínics i bioquímics no siguin específics de les mutacions en un gen concret, sinó que siguin comuns a un grup de gens. En aquests casos podem emprar com aproximació diagnòstica l'estudi d'un panell de gens o bé l'estudi de l'exoma cel·lular i un filtratge informàtic definit pels gens d'interès. Sovint aquests estudis ens permetran diagnosticar d'una forma ràpida i eficaç els pacients amb les característiques seleccionades. No obstant això, hem de tenir en compte que, amb la seqüenciació de l'exoma, només es capturen els exons i les zones intròniques flanquejants, per aquest motiu les mutacions intròniques profundes no les podem detectar. Serà també difícil detectar altres tipus de mutacions com alguns tipus d'insercions i delecions (indels) i altres. Per tant, en aquests casos haurem de utilitzar altres metodologies complementaries per tal arribar al diagnòstic final.

Quan la clínica i els biomarcadors, siguin inespecífics, es a dir no siguin indicatius de un grup concret de malalties, o bé ho siguin d'un grup molt ampli, es procedirà a un anàlisi genètic més exhaustiu que consistirà en l'estudi de l'exoma cel·lular o del genoma (WES i WGS respectivament). Un bon exemple en són les malalties del metabolisme energètic mitocondrial i les dels trastorns congènits de la glicosilació (CDG). En ambdós casos la contribució de les tècniques de seqüenciació massiva a l'ampliació del coneixement d'aquestes malalties, ha estat decisiva.

Si prenem com a exemple les malalties del metabolisme energètic mitocondrial, ens adonarem del gran canvi experimentat en poc temps. La clínica d'aquestes malalties es sovint inespecífica, i els biomarcadors orienten el diagnòstic però no són específics. La seqüència diagnòstica clàssica consistia en obtenir una biòpsia muscular i/o de pell per tal de determinar les activitats enzimàtiques que poguessin estar alterades, el que comporta molt de temps i proves invasives; a més, moltes vegades malgrat es trobaven alteracions, resultava molt difícil arribar a conclusions definitives. Actualment, davant d'una clínica compatible i estudis complementaris orientatius es procedeix directament a la seqüenciació massiva, en general WES, per després procedir al filtratge corresponent d'acord amb les característiques dels pacients (figura 2) (Wright CF et al, 2018). Posteriorment, i depenent del resultat obtingut es procedirà a l'estudi de la proteïna que es su-

posa estaria alterada com a conseqüència dels canvis trobats en un gen determinat. Es a dir, estariem procedint a la inversa. Aquest canvi d'algoritme diagnòstic s'entendrà fàcilment si es té en compte que, actualment el nombre de gens nuclears que podrien estar implicades en la funció mitocondrial es superior a 1.400 i el de gens que s'han descrit com a causants de malaltia mitocondrial és superior a 376 i s'espera que aquest nombre segueixi creixent de forma continua en els propers anys (Schlieben and Prokish 2020, Stenton and Prokish 2020, Frazier et al. 2019; Rahman S, 2020)

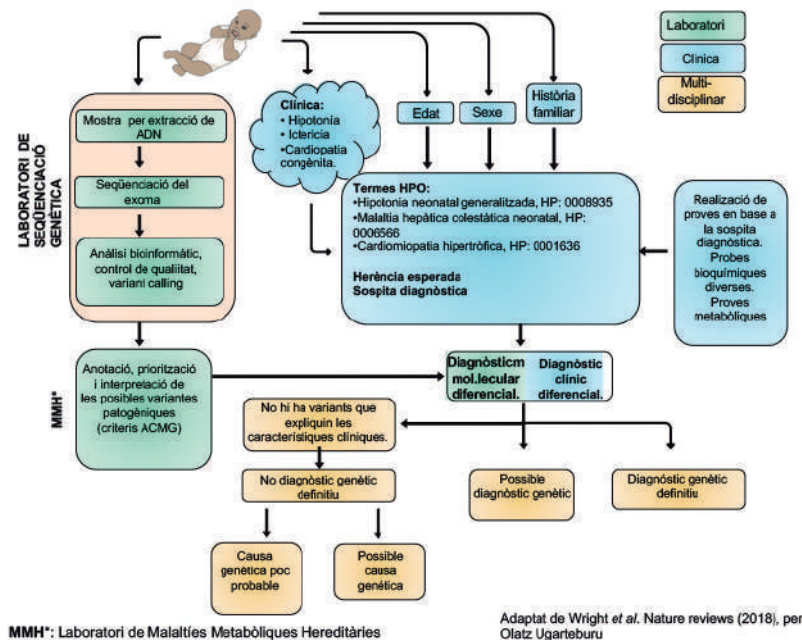
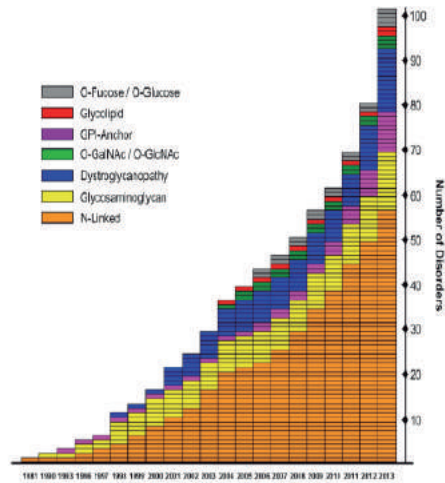
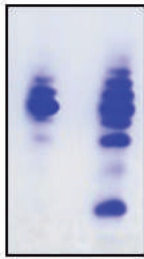


Figura 2.- Noves formes d'abordatge diagnòstic en malalties metabòliques hereditàries. Esquema adaptat de Wright CF et al 2018, per Olatz Ugarteburu, Hospital Clínic de Barcelona.* MMH, laboratori de malalties metabòliques hereditàries.

D'altra banda, si prenem com a exemple els trastorns congènits de la glicosilació (CDG) succeeix quelcom similar. Son malalties de nova descripció i actualment ja s'han descrit més de 150 gens implicats en aquest metabolisme. Per remarcar la influència de la seqüenciació massiva en la descripció de noves CDGs, autors pioners en aquest tema (Freeze HH et al 2015) mostren un gràfic en que l'any 2013 es descrivia una nova CDG cada 17 dies (figura 3).

El 2013, es describia un nou trastorn de la glicosilació cada 17 dies

Control CDG-I



AJHG 94:161-175, 2014. Freeze HH

Figura 3.- Els trastorns de la glicosilació són defectes genètics que alteren l'estructura o la biosíntesi dels glicans. En la figura es mostra el resultat de l'anàlisi de sialotransferrines en sèrum d'un control i d'un pacient (CDG-I). Aquesta és una metodologia senzilla que permet detectar la major part dels trastorns que afecten les vies metabòliques de la glicosilació. A la dreta es mostra la ràpida progressió en el coneixement d'aquests trastorns.

Recentment el nostre grup també ha descrit una nova causa de CDG (Matalonga L et al 2017). Hem de dir però, que moltes CDGs tenen biomarcadors que ajuden a persistir en la recerca genètica de la malaltia, així com a orientar el nostre interès cap als gens que puguin tenir relació amb els biomarcadors trobats. Així doncs, malgrat els avenços de la biologia molecular, els biomarcadors sovint són claus per a enfocar el diagnòstic. En altres cassos, seran necessaris per a obtenir una validació funcional, imprescindible per demostrar que les mutacions identificades són causants de la malaltia. Per això, el desenvolupament de potents biomarcadors segueix sent avui en dia un camp de gran interès, tant per les aplicacions anteriorment esmentades com pel fet de que son anàlisi no invasives, ja que sovint es realitzen en fluids biològics. A la taula I, es mostren els principals grups de biomarcadors associats a MMH.

Taula I: Grups de biomarcadors associats als principals grups de malalties metabòliques hereditàries (MMH).
 ss: sang seca impregnada en paper; LCR: líquid cefaloraquídi;
 pl: plasma

Grup de MMH	Biomarcadors	Material
Metabolisme intermediari	àcids orgànics aminoàcids acilcarnitines	orina plasma, ss plasma, ss
Malalties peroxisòmiques	àcids grassos de cadena molt llaga	plasma
Metabolisme del colesterol	esterols	plasma
Síntesi d'àcids nucleics	purines i pirimidines	orina
Galactosèmies	galactosa-1-fosfat, galactosa	Eritròcits, pl
Metabolisme dels neurotransmissors	neurotransmissors	LCR
Malalties mitocondrials	àcid làctic àcids orgànics aminoàcids	plasma, LCR orina plasma
Defectes congènits de la glicosilació	isoformes de sialotransferrina	suero
Malalties lisosòmiques	glicosaminoglicans oligosacàrids oxiesterols (Niemann Pick) lysoGB1 (Gaucher) lysoGB3 (Fabry)	orina orina plasma plasma, ss plasma, ss

Així doncs, el desenvolupament de les tècniques WES i WGS i de les eines bioinformàtiques, han estat clau per a la identificació de nous gens en molt poc temps, però degut a la gran quantitat de variants genètiques que es deriven d'aquestes anàlisi és fonamental el procesament de les dades generades per tal de filtrar les variants obtingudes i poder determinar amb major facilitat la causa genètica de la malaltia.

Moltes vegades l'anàlisi bioinformàtica és la que ens marca la dife-

rència entre uns estudis i altres. Així, es pot donar el cas d'una mateixa seqüenciació en la que depenent de les eines bioinformàtiques s'identifiquin les mutacions en un cas i en un altre no. Per això, és molt important conservar sempre les dades primàries de la seqüenciació per a procedir al re-anàlisi bioinformàtic en cas necessari (Wright CF et al, 2018; Tarailo-Graovac M et al 2016). En cas de no trobar mutacions que puguin explicar la clínica del pacient s'aconsella un re-anàlisi bioinformàtic anual. Així doncs, el desenvolupament de les eines bioinformàtiques i també la connexió amb bases de dades de mutacions, de freqüències de variants i de dades fenotípiques (Human Phenotype Ontology, HPO) són de gran importància per a arribar a un diagnòstic final.

4. Integració i interpretació de les dades de seqüenciació massiva.

En general, la seqüenciació de l'exoma d'un individu dona lloc a unes 60.000 – 70.000 variants, així doncs un genoma individual no es pot interpretar de forma aïllada. Es necessita el coneixement de les variacions o “background” (fons genètic) d'una població per a filtrar o descartar variants comunes o polimorfismes. Per altre banda, la classificació de les variants que s'obtinguin també dependrà d'una descripció detallada de la informació clínica del cas índex. El procediment és el següent (Wright CF et al, 2018).

4.1. Seqüenciació, control de qualitat de les dades i inclusió d'anotacions per cada variant.

Les dades obtingudes del seqüenciador es filtren segons paràmetres de qualitat i es comparen amb cadascuna de les posicions al·lèliques equivalents d'un exoma o genoma de referència. La sensibilitat d'aquest procés depèn tant de la qualitat de les dades de referència com dels algorismes emprats. És important conèixer que les dades de baixa qualitat o baixa cobertura poden donar lloc a que es perdin variants importants, la qual cosa pot conduir a la pèrdua del diagnòstic encara que la variant hi sigui present en les dades sense processar.

Posteriorment s'inclouen anotacions per cada variant. Entre les anotacions més crucials per a la interpretació clínica cal destacar les freqüències al·lèliques i les prediccions de les conseqüències de cada variant. S'ha de tenir en compte que les anotacions poden variar depenent del software emprat.

4.2. Filtratge de variants.

En general s'exclouen aquelles variants sense conseqüències funcionals previsibles (variants benignes). S'exclouen també les variants considerades massa freqüents en la població general (MAF) i les que es considera no encaixen amb la malaltia o el patró d'herència. D'altra banda la interpretació de variants sense funció coneguda requereix una predicció precisa del seu possible efecte mitjançant softwares com Ensembl VEP 71 o SNPeff 72. No obstant això, aquestes prediccions poden no reflectir la conseqüència biològica real de la variant. A més, la mateixa variant genòmica pot tenir prediccions de conseqüències diferents segons la base de dades emprada. Aquest darrer fet es deu a la presència de transcrits alternatius, i a la manca d'un mètode simple de selecció per determinar la rellevància clínica de les variants

Les MMH tenen l'avantatge, respecte altres malalties genètiques hereditàries, que en molts casos, existeixen marcadors bioquímics fàcilment identificables en fluids biològics o en teixits. Aquest fet es rellevant ja que ens facilitarà el filtratge dels gens d'interès pel fet d'estar relacionats amb la via metabòlica o amb l'òrganul cel·lular al que s'associa una determinada MMH (Tarailo-Graovac M et al 2016). A la figura 4 es mostra un exemple de filtratge de variants en un pacient amb la síndrome de Leigh.

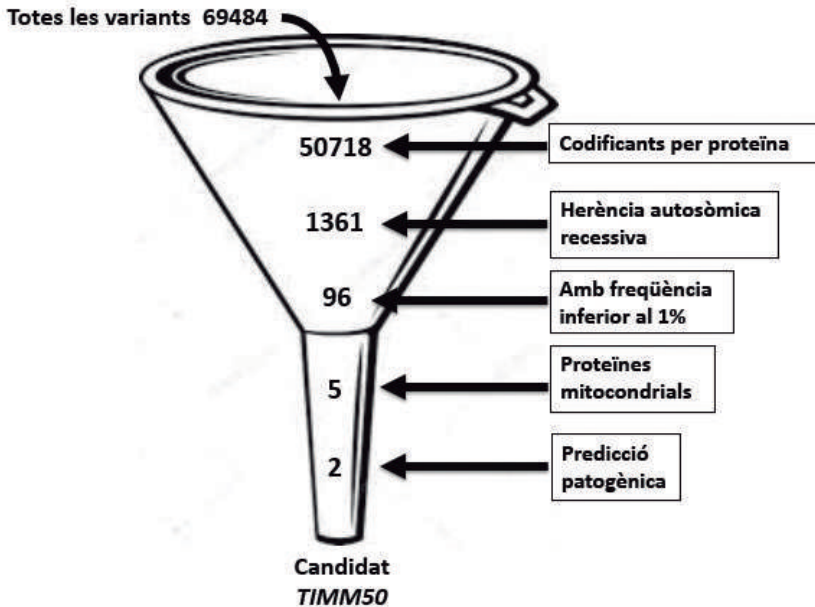


Figura 4.- Exemple de filtratge de variants obtingudes mitjançant seqüenciació de l'exoma en un pacient amb cardiomiopatia i síndrome de Leigh.

4.3. Assignació de patogenicitat.

El principal coll de botella de qualsevol tipus de seqüenciació és la troballa de variants de significat incert (VUS). L'assignació de patogenicitat depèn en gran mesura de la possibilitat d'accedir a grans bases de dades com la "Human Gene Mutation Database", base de dades de mutacions patològiques, encara que malauradament conté errors, tot i que es va depurant i millorant constantment. D'altra banda la utilització d'aproximacions categòriques com les del "Human Phenotype Ontology, HPO" permeten a plataformes com DECIPHER estandarditzar la captura del fenotip i la seva integració amb el genotip com un sol recurs, facilitant d'aquesta forma l'exploració holística de dades que es complementen amb les guies i directrius establertes per l'*American College of Medical Genetics (ACMG)* resultant doncs unes eines útils per facilitar les decisions basades en la integració dels resultats genètics i clínics, amb la finalitat d'aconseguir una millor aproximació al diagnòstic (figura 4).

L'ACMG classifica les variants en 5 diferents categories utilitzant 28 criteris diferents : patogèniques, probablement patogèniques, de significat incert, probablement benignes i benignes (Richards S et al 2015). A continuació donem alguns exemples d'aquestes categories:

Patogènica: variant descrita causant de malaltia, en un gen associat a un fenotip clínic que és el mateix que el del nostre pacient.

Probablement patogènica: variant no descrita, en un gen que es coneix que està associat a malaltia i la clínica és perfectament compatible amb la del nostre pacient.

De significat incert:

- variant descrita en un gen conegut associat a malaltia, però la clínica no es correspon amb la del nostre pacient.
- variant no descrita en un gen conegut associat a malaltia, però la clínica no es correspon amb la del nostre pacient.
- variant no descrita en un gen no associat prèviament a malaltia.

Probablement benigna: variant en la que les bases de dades preduen un baix impacte sobre la proteïna.

Benigna: variant amb elevada freqüència en població general.

5. Estudis funcionals.

Malgrat tots els recursos anteriorment esmentats, actualment el nombre de variants de significat incert (VUS) amb les que ens trobem acostuma a ser elevat. Per això, amb excepció dels cassos en els que s'hagi trobat mutacions prèviament descrites en gens associats a la malaltia concreta que estem estudiant, moltes vegades s'haurà de recórrer a la realització dels corresponents estudis funcionals a fi de demostrar que les variants trobades son patogèniques.

Els estudis funcionals es duren a terme en cèl·lules o en teixits del pacient, o en línies cel·lulars en les que s'hagi generat la mutació corresponent. També es generen models en llevats o altres organismes. Els tipus d'assajos emprats dependrà de cada cas, però poden

ser: biomarcadors, metabòlits, expressió de la proteïna / mRNA, demostració de splicing aberrant, estudis de complementació... Estudis recents demostren que la seqüenciació del RNA (RNAseq) així com estudis proteòmics paral·lels són molt prometedors, ja que permeten no només prioritzar gens candidats, si no també establir evidències funcionals (Stenton SL, Prokish H 2020; Lee H et al. 2020).

Idealment, el marc de l'anàlisi genòmic hauria de ser complementat per una estructura col·laborativa, per tal de donar recolzament a estudis funcionals en models cel·lulars que aportarien un coneixement més ampli per aconseguir un diagnòstic sòlid.

5.1. Transcriptòmica.

L'anàlisi del transcriptoma facilita la interpretació de variants genòmiques tant si són codificants com no codificants. Les variants no codificants estan sovint ubicades en zones intròniques profundes o en regions reguladores que condicionen l'*splicing* o l'expressió del ARNm.

Pel diagnòstic de malalties mendelianes les condicions en que la seqüenciació del ARN proporciona informació valuosa són tres: *splicing* aberrant, expressió extremadament baixa y desequilibri en la expressió alélica (Stenton SL i Prokish H 2020; Lee H et al. 2020). D'aquesta forma la seqüenciació del RNA pot proporcionar validació de les troballes WES o WGS, així com evidència d'una segona variant en aquells casos en que només se'n ha pogut identificar una. No obstant això, degut a que els patrons d'expressió son moltes vegades teixit específics, una de les condicions del RNAseq es que el teixit seleccionat per fer l'anàlisi sigui el més representatiu de la patologia de la malaltia.

5.2.-Proteòmica.

La metodologia proteòmica permet quantificar en un sol assaig les proteïnes detectades, eliminant d'aquesta forma la necessitat de dur a terme les anàlisi de western blot individuals de les proteïnes, que a més s'han hagut de definir prèviament.

En línies cel·lulars de fibroblasts s'identifiquen aproximadament entre 5.000 i 8.000 proteïnes que comprenen més del 65% de les proteïnes relacionades amb la mitocòndria. Per tant, els estudis proteòmics en aquestes malalties serien molt adequats (Stenton SL i Prokish H 2020) sobre tot per anàlisi de variants “missense” que són, amb diferència, les més freqüents. Les variants “missense” poden no tenir cap conseqüència funcional o poden exercir la seva patogenicitat al interrompre interaccions o desestabilitzar l'estructura de la proteïna. La desestabilització es produeix en aproximadament el 40% de les mutacions “missense” i poden ser detectades per proteòmica com a proteïnes amb una extremada baixa expressió.

6. Descobriment de la causa d'una malaltia mitocondrial.

Exposaré un exemple en el que l'anàlisi genòmic ens va permetre esbrinar la causa d'una malaltia mitocondrial en 10 pacients. Tots ells presentaven mutacions en el gen *NFU1*, el qual no havia estat associat prèviament a malaltia (Navarro-Sastre et al. 2011).

Partirem de les característiques clíniques i anatomopatològiques, de l'observació dels arbres familiars i del fenotip bioquímic. D'aquesta forma, posant en conjunt totes les dades cercarem quin o quins gens hi poden estar implicats. Posteriorment demostrarem amb estudis funcionals quin és el gen causal de la malaltia i també es proposarà un model per explicar el funcionament de la proteïna NFU1.

Quin era el fenotip clínic?

Es tracta de deu pacients de nou famílies espanyoles no relacionades, nascuts a terme, amb desenvolupen normal fins els 1-9 mesos de vida. Tots ells van morir sense diagnòstic abans dels 15 mesos de vida. A grans trets, les característiques clíniques eren retard de creixement, regressió neurològica i hipertensió pulmonar, en la major part dels pacients. No obstant això, observant amb detall la presentació clínica i l'evolució es va poder fer una classificació en tres grups:

1er grup. Tres nenes amb retard de creixement i afectació neurològica que consistia en hipotonia i irritabilitat, sense hipertensió pulmonar. En l'autòpsia van presentar degeneració espongiforme, astrogliosi i

necrosi de la substància blanca amb preservació de fibres U. Dues de les pacients eren germanes i tenien una altra germana no afectada; la tercera pacient tenia un germà gran que havia mort als dos mesos d'edat amb acidosi metabòlica refractària al tractament.

2on grup. Format per un nen i una nena que es varen diagnosticar d'hipertensió pulmonar, i després d'un episodi febril van iniciar una regressió neurològica. El nen era fill de pares consanguinis i tenia un germà gran amb el mateix fenotip. No es van fer autòpsies.

3er grup. Tres nenes i dos nens amb hipertensió pulmonar com a principal característica. En tres dels pacients la hipertensió pulmonar anava acompanyada d'estancament de creixement. Una de les nenes tenia retard psicomotor lleu i hipoglucèmies recurrents. Malgrat l'absència de signes neurològics aparents, en tots els pacients que es va poder fer l'autòpsia, es va trobar àrees de desmielinització, vacuolitzacions i astrogliosi. Les mostres pulmonars de tres pacients mostraven vasculopatia obstructiva.

Quin era fenotip bioquímic?

El fenotip bioquímic dels 10 pacients era el mateix en tots ells i incloïa acidosi metabòlica amb acidèmia làctica i hiperglicinèmia. Tots ells presentaven una excreció elevada dels àcids làctic, 2-cetoglutaric, 2-cetoadípic, 2-hidroxiadípic i glutàric. En els casos en que es va disposar de teixits, l'activitat hepàtica del sistema d'escissió de la glicina (GCS) era baixa o indetectable. L'activitat del complex piruvat deshidrogenasa (PDHC) a fibroblasts també era baixa. En cap dels casos estudiats es van trobar mutacions en les proteïnes del complex enzimàtic PDH o del complex enzimàtic GCS. Malgrat hi ha havia una sospita fundada de malaltia genètica hereditària era molt difícil atribuir una única causa a alteracions metabòliques tant diverses, des de acidosi làctica a hiperglicinèmia. Així doncs, les alteracions bioquímiques observades havien de ser secundàries a una alteració primària i probablement comuna a ambdós complexos enzimàtics.

Resultats dels estudis de seqüenciació.

Els antecedents familiars suggerien una herència autosòmica recessiva. Es donava la circumstància que quatre de les famílies eren d'origen Basc; hi ha nombrosos estudis genètics, històrics i lingüístics que

recolzen la homogeneïtat del poble Basc, clarament diferent d'altres poblacions europees (Rodríguez Ezpeleta et al. 2010), per tant vam considerar adient cercar la causa genètica en zones d'homozigositat utilitzant els "chips genètics d'Affymetrix. Efectivament, el mapatge per homozigositat amb ADN de dos pacients va revelar una regió d'homozigosi de 1,24 Mb en tots dos individus; aquesta regió incloïa 97 polimorfismes i 22 marcs oberts de lectura. Sobre la base del fenotip bioquímic dels individus, ens vam centrar en un gen que codificava una proteïna mitocondrial NFU1. Es va identificar una mutació en homozigosis a l'exó 7 (c.622G>T) del gen *NFU1*. Aquesta mutació canvia una glicina, altament conservada en totes les espècies, per una cisteïna en la posició 208 de la proteïna (p.Gly208Cys). Aquesta mutació era comuna a tots 10 pacients, 9 dels quals eren homozigots i un d'ells heterozigot compost per a la mutació comuna (c.622G>T) i per una nova substitució a l'exó 6 c.545+5G>A.

Estudis funcionals.

En l'estudi bibliogràfic es va trobar que la proteïna NFU1 contenia un segment curt de 60 aminoàcids homòleg al Nifu bacterià, que està implicat en l'assemblatge dels clústers de Fe-S. Es coneixia que els clústers de Fe-S eren cofactors essencials del metabolisme energètic mitocondrial, no obstant això la funció fisiològica precisa de la proteïna NFU1 era desconeguda, en part degut a que la deleció de *NFU1* en el llevat només causava un defecte lleu en algunes proteïnes mitocondrials que necessitaven Fe-S, però sense cap altre fenotip bioquímic. Fonts bibliogràfiques apuntaven que la proteïna NFU1 podia estar involucrada en la síntesis d'àcid lipoic i, aquest àcid es un cofactor essencial per l'activitat de 4 complexos multienzimàtics mitocondrials: piruvat deshidrogenasa (PDHC), 2-cetoglutarat deshidrogenasa (2-KGDHC), deshidrogenasa dels alfa-cetoàcids ramificats (2BCKDHC) i complex enzimàtic GCS.

Així doncs vam treballar amb la hipòtesi de que la proteïna NFU1 estava implicada en la biosíntesis de l'àcid lipoic, ja que d'aquesta forma podríem explicar el fenotip bioquímic dels pacients amb alteracions en vies metabòliques aparentment no relacionades (figura 5).

L'àcid lipoic s'uneix covalentment a les Subunitats E2 i a la proteïna H

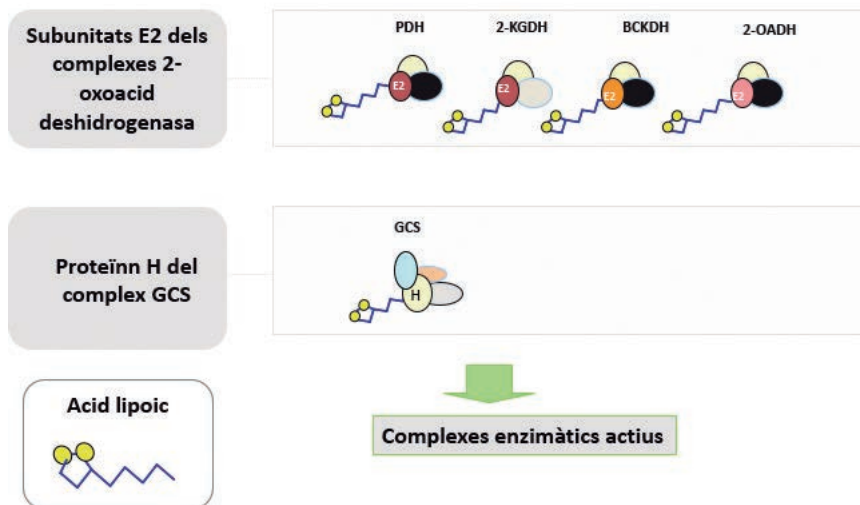


Figura 5.- Proteïnes en les que es necessari la unió a l'àcid lipoic per una correcta activitat enzimàtica. Subunitats E2 dels complexos 2-oxoacid deshidrogenasa i subunitat E2 de la proteïna H del complex d'escissió de la glicina (GCS)

El següent i decisiu pas va ser analitzar teixits de necròpsia de tres pacients mitjançant anticossos específics per l'àcid lipoic, assaig que mesura directament el producte de l'àcid lipoic sintasa (LIAS), és a dir, els components E2 de les tres deshidrogenases i de la proteïna H del GCS unides a àcid lipoic. En controls es van detectar dues proteïnes predominants de 65 i 50 KDa corresponents a PDH-E2 i α -KGDH-E2 unides a l'àcid lipoic. En canvi, en pacients els nivells de proteïnes PDH-E2 i α -KGDH-E2 unides a l'àcid lipoic gairebé no eren detectables, però la quantitat de proteïna PDH-E2 i α -KGDH-E2 no estava alterada, és a dir era igual en pacients que en controls. El mateix succeïa quan es valorava la proteïna H del GCS en teixit hepàtic dels pacients. Aquests estudis suggerien que els nivells disminuïts de proteïnes lligades a l'àcid lipoic eren deguts a una lipoil·lació deficient. Les observacions bioquímiques posades en conjunt demostren una alteració de la biosíntesi de l'àcid lipoic, suggerint que

la proteïna NFU1 era necessària per a l'activitat de la lipoic sintasa (LIAS). A més a més ambdues proteïnes LIAS i NFU1 estan predominantment, sinó exclusivament, localitzades al mitocondri.

Per a entendre millor el paper de NFU1 i tenir una idea de les conseqüències funcionals del canvi p.Gly208Cys vàrem traslladar el que passava en *saccharomyces cerevisiae* a humans. Analitzant diferents activitats enzimàtiques en cèl·lules de llevat a les quals se'ls hi havia deletat Nfu1 es va trobar un descens lleuger de les activitats aconitasa i COX, i una disminució substancial de les activitats SDH i PDH de manera semblant al que s'observava en pacients. Per tal de veure la funcionalitat de la proteïna NFU1 mutada, es van utilitzar les cèl·lules de llevat Nfu1 "knock in" contenint la mutació p.Gly194Cys que és l'equivalent a la mutació humana p.Gly208Cys. Aquestes cèl·lules es van fer créixer en un medi de cultiu, es van aïllar els mitocondris i es van mesurar les activitats enzimàtiques SDH i PDH que van resultar deficientes. Les cèl·lules Nfu1 salvatge van ser capaces de restaurar els seus defectes enzimàtics fins a nivells normals, en canvi Nfu1Gly194Cys no aconseguia rescatar les activitats, la qual cosa demostrava l'alteració funcional de la proteïna.

Mancaria ara veure quina era exactament funció de NFU1. Estava descrit que Nfu1 purificada es podia unir als clústers Fe-S, així doncs es va comprovar que la unió del clúster Fe-S a la Nfu1Gly194Cys mutada retenia el Fe, es a dir no alliberava el clúster de Fe-S i no permetia que aquest pogués anar a la seva proteïna diana. Aquesta retenció de Fe-S seria molt perjudicial tant per la funció mitocondrial com per la síntesis d'àcid lipoic. A la figura 6 es mostra la biosíntesis de l'àcid lipoic tal com nosaltres la vam concebre després de trobar l'alteració d'un altre gen, *LIPT1*, en aquesta via metabòlica (Tort F et al 2014)

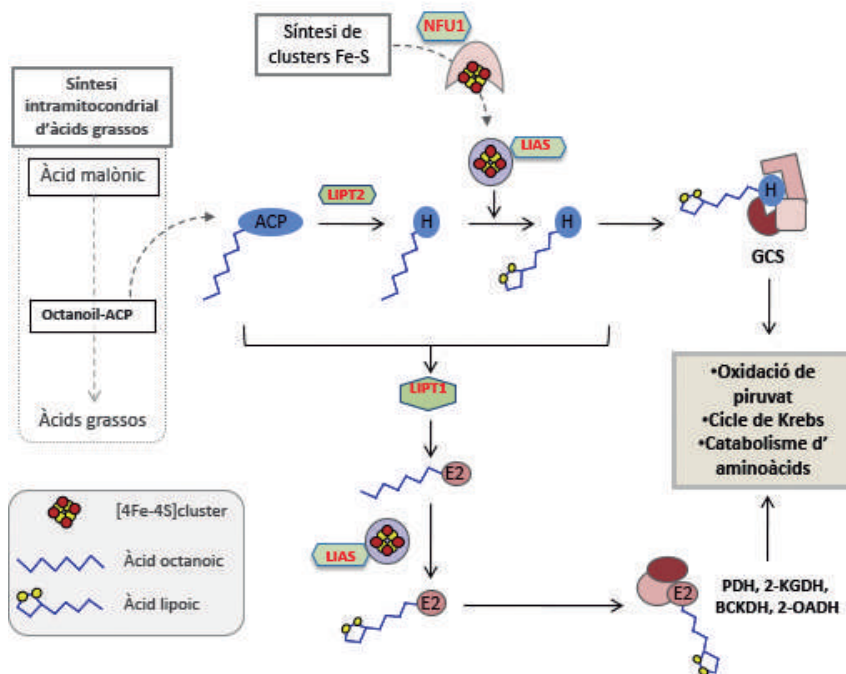


Figura 6.- Biosíntesi de l'acid lipòic. L'acid lipòic es sintetitza a partir de l'acid octanoic, una molècula precursora generada a la via mitocondrial de síntesi d'àcids grassos (mtFASII). Aquesta ruta metabòlica és molt complexa i sintetitza àcids grassos saturats a partir de malonat. D'altra banda, la síntesi d'acid lipòic requereix, a més de la biogènesi dels clústers Fe-S i per tant de la proteïna NFU1 que entrega els clústers Fe-S a LIAS. L'acid octanoic generat en la via mtFASII es troba unit a la proteïna transportadora ACP i és transferit mitjançant LIPT2 a la proteïna H del complex GCS. La proteïna H octanoilada és el substrat per a la inserció de dos àtoms de sofre per part de LIAS, transformant l'acid octanoic en acid lipòic. La proteïna LIPT1 és la transferasa responsable de la octanoilació i lipoil·lació dels complexos 2 oxoàcid deshidrogenasa (PDH, 2-KGDH, BCKDH i 2-OADH).

Traslació d'aquests resultats a humans

Els resultats d'aquest treball, que aquí s'han tractat de forma resumida, suggereixen que la funció NFU1 seria necessària preferentment per l'assemblatge dels clústers Fe-S amb la succinat deshidrogenasa i l'acid lipòic sintasa (LIAS).

El defecte en NFU1 tindria com a conseqüència una deficiència de SDH i de LIAS, i per tant, una disminució de la síntesi d'acid lipòic i deficiència de lipoil·lació de les subunitats E2 de la PDH, 2-KGDH, BCKDH, 2-OADH i de la proteïna H del sistema GCS. Explicant d'aquesta for-

ma les alteracions bioquímiques observades en els pacients.

En resum s'han identificat mutacions en *NFU1* causants de una malaltia mitocondrial caracteritzada per defectes bioquímics en l'activitat de proteïnes que s'uneixen a àcid lipoic. És interessant posar de relleu que les cèl·lules de llevat en les que es va delectonar *Nfu1* mostraven una taxa de creixement semblant a les salvatges i que els pacients amb la mutació a *NFU1* no presentaven símptomes durant el primer mes de vida. Semblaria doncs, que les cèl·lules del llevat i les cèl·lules humanes embrionàries i neonatals podrien superar els requeriments de la funció de *NFU1* durant un temps. Una hipòtesi podria ser que altres proteïnes (*IBA57* i *SCA1* que són proteïnes del grup *ISCU*) poguessin assumir les funcions de *NFU1* en aquestes etapes de la vida. També podria ser que els individus al néixer i haver d'afrontar noves condicions com per exemple l'augment a l'exposició d'oxigen, que requereix el funcionament de *NFU1*, anessin desenvolupant progressivament la clínica.

En qualsevol cas aquestes explicacions bioquímiques del fenotip associat a *NFU1* i la identificació del paper de la funció de *NFU1* en la biogènesi de les proteïnes Fe-S podrien ser molt rellevants pel diagnòstic i tractament potencial dels pacients amb defectes en la biosíntesis de l'àcid lipoic.

Actualment, el nostre grup ha fet ja el diagnòstic de més de 40 pacients amb mutacions en el gen *NFU1* i és segueix mantenint una elevada prevalença de la mutació comuna trobada inicialment.

Poc temps després de trobar el gen *NFU1* en la via de biosíntesis de l'àcid lipoic vam tenir la oportunitat d'esbrinar les bases moleculars d'un altre gen, *LIPT1*, en aquesta mateixa via metabòlica, i que tampoc havia estat descrit prèviament com a causa de malaltia (Tort F et al, 2014), vam demostrar que aquest gen transferia l'àcid lipoic a les 2-cetoàcid deshidrogenases, però no al complex GCS (Figura 6). Així doncs, el coneixement en humans d'aquestes vies metabòliques, que es va iniciar amb la descripció dels pacients *NFU1*, és avui en dia gairebé coneguda en la seva totalitat, havent-se descrit més de 19 gens associats a la biosíntesis de l'àcid lipoic i a la dels clústers de Fe-S (Ribes A i Tort F, 2021)

8. Conclusions

Les malalties metabòliques hereditàries constitueixen un extens i divers grup de malalties genètiques, les freqüències individuals són sovint molt baixes, però considerades en el seu conjunt poden afectar al voltant de 1/800 nascuts vius, prevalença possiblement subestimada perquè no tenim cap garantia de que es diagnostiquin tots els cassos.

Són causa de morts prematures i representen una càrrega de morbiditat i mortalitat important. Diagnosticar-les, prevenir-les i tractar-les és un repte per la biomedicina.

Tradicionalment el diagnòstic de les MMH es recolzava en els recursos de la genètica bioquímica però les noves tècniques genòmiques, ens han aportat una nova i potent oportunitat per a abordar-les.

L'estratègia que hem descrit en els anteriors apartats ens ha permès augmentar notablement el rendiment diagnòstic, identificar noves malalties i obtenir noves informacions sobre vies metabòliques importants.

Per a fer-ho cal partir del fenotip clínic, obtenir el fenotip bioquímic amb les tècniques de la genètica bioquímica, i a continuació recórrer a la tecnologia genòmica. Amb aquest conjunt de dades podem formular hipòtesis sobre el gen candidat i la mutació causant de la malaltia. Però en molts casos ens caldrà recórrer a estudis funcionals per tal de demostrar la hipòtesi.

L'evidència de la patogenicitat de les variants és crucial per tal d'obtenir un diagnòstic precís, predir el curs de la malaltia i proporcionar al pacient el tractament adequat, així com un consell genètic.

Les dades individuals resultants de la seqüenciació massiva no es poden interpretar de forma aïllada. La centralització de la seqüenciació i de la bioinformàtica és fonamental, el que unit a la interpretació dels resultats per àrees de coneixement clínic proporciona un rendiment diagnòstic òptim.

Una de les principals preocupacions de les associacions de pacients

amb malalties rares es el retard en el diagnòstic. Cal que es posin els mitjans perquè el sistema de salut garanteixi el diagnòstic sense dilacions i que només estigui justificat el retard quan encara no es conegui la malaltia i se'n hagi de descobrir les causes.

Ens cal una aproximació interdisciplinària i especialitzada, un ampli i sofisticat ventall tecnològic, recursos humans i econòmics adients així com el suport específic de I+D. El nostre objectiu és no tan sols assolir un diagnòstic, sinó també conèixer les bases moleculars i cel·lulars de la patogènia per a evolucionar cap a una medicina personalitzada i de precisió en benefici del pacient.

Moltes gràcies

Referències

- Blau N, Duran M, Gibson KM, Dionisi-Vici C (Eds.). Physician's guide to the diagnosis, treatment, and follow-up of inherited metabolic disease 2014, Springer. Berlin.
- Frazier A E, Thorburn D R, and Compton A G. Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *J Biol Chem.* 2019; 294:5386–5395.
- Freeze HH, Eklund EA, Ng BG, Patterson MC. Neurological aspects of human glycosylation disorders. *Annu Rev Neurosci.* 2015; 38:105-125.
- Gonzalez-Lamuño D. Grupos clínicos principales en los errores innatos del metabolismo. En *Manual de Pediatría*, M.Cruz, JJ Garcia, O Cruz, S Mintegi i JM Moreno (Eds), 4^a edició, 2019; pp 663-669.
- Lee H, Huang AY, Wang L et al. Diagnostic utility of transcriptome sequencing for rare Mendelian diseases. *Genet Med.* 2020 March; 22: 490–499.
- Morava E, Rahman S, Peters V, Baumgartner MR, Patterson M and Zschocke J. Quo vadis: the re-definition of “inborn metabolic diseases”. *J Inherit Metab Dis.* 2015; 38: 1003-1006.
- Matalonga L; Bravo M; Serra-Peinado C; Garcia-Pelegrí E; Ugar-teburu O; Vidal S et al; Mutations in TRAPPC11 are associated with a congenital disorder of glycosylation. *Hum Mutat* 2017; 38:148 - 151.
- Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O, Uzarska MA, Arranz JA, del Toro M et al. A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am J of Hum Genet.* 2011; 89: 656-667.
- Pampols T. Inherited metabolic rare diseases. A: Rare disease epidemiology. pp.397-431. *Advances in Experimental medicine and*

Biology; 2010, Vol 686. Springer.

- Parikh S, Karaa A, Goldstein A et al. Diagnosis of possible mitochondrial disease: an existential crisis. *J Med Genet.* 2019; 56:123-130.
- Rahman S. Mitochondrial disease in children. *J Intern Med.* 2020; 287: 609–633.
- Ribes A, Tort F. Disorders of lipoic acid and iron-sulfur protein metabolism. En *Physician’s Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Inherited Metabolic Diseases.* Blau N, Dionisi-Vici C, Ferreira C, Vianey-Saban C, van Karnebeek C (Eds), 2021, 2^a edició. Springer, Heidelberg “en premsa”.
- Richards S, Aziz N, Bale S. 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: 405-424
- Rodriguez-Ezpeleta N, Alvarez-Busto J, Imaz L, et al. High-density SNP genotyping detects homogeneity of Spanish and french Basques, and confirm their genomic distinctiveness from other European populations. *Hum Genet.* 2010; 128: 113-117.
- Saudubray J. M., Van den Berghe G., Walter J. (Eds) *Inborn Metabolic Diseases, Diagnosis and Treatment.* 2016, 5th ed. Springer-Verlag. Berlín.
- Scriver ChR. Why mutation analysis does not always predict clinical consequences: Explanation in the era of genomics. *J. Pediatr;* 2002; 140: 502-506.
- Schlieben LD, Prokisch H. The Dimensions of Primary Mitochondrial Disorders. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020, 26 Nov., <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.600079>.
- Stenton SL, Prokisch H. Genetics of mitochondrial diseases:

Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*. 2020 Jun; 56:102784. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102784. Epub 2020 May 23.

- Tarailo-Graovac M, Shyr C, Ross CJ, et al. Exome sequencing and the management of neurometabolic disorders. *N Engl J Med* 2016; 374: 2246-55.
- Tort F, Ferrer-Cortés X, Thió M, et al. Mutations in the lipoyltransferase LIPT1 gene cause a fatal disease associated with a specific lipoylation defect of the 2-Ketoacid dehydrogenase complexes. *Hum Mol Genet* 2014; 23; 7: 1907-1915
- Wright CF, Fitz Oatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics. Diagnosing rare diseases in children. *Nat Rev Genet* 2018; 19: 253-268.

