

New pathophysiological concepts and potential therapeutic targets for oxidative phosphorylation disorders

Citation for published version (APA):

Voets, A. M. (2012). *New pathophysiological concepts and potential therapeutic targets for oxidative phosphorylation disorders*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20120524av>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120524av](https://doi.org/10.26481/dis.20120524av)

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 disorders are often fatal multisystem disorders or syndromes, associated with abnormalities of the terminal component of mitochondrial energy metabolism, *i.e.* oxidative phosphorylation (OXPHOS). These diseases mainly manifest in tissues with high energy demands such as the heart, brain, liver and muscle and are further referred to as OXPHOS disorders. It is estimated that OXPHOS disorders affect about 1 in 5000 individuals. The OXPHOS system is responsible for cellular aerobic energy production and its subunits are encoded by over 80 genes of which 37 are located in the mitochondrial DNA (mtDNA). However, more than 1000 nuclear DNA (nDNA) genes are involved OXPHOS function, assembly and maintenance. Accordingly, mutations in the mtDNA or nDNA genes encoding structural OXPHOS elements or nDNA encoded factors involved in the maintenance or assembly often lead to OXPHOS disorders. The extreme genetic and phenotypic heterogeneity and the lack of consistent genotype-phenotype correlations complicate genetic testing of these disorders. Moreover, the underlying pathological mechanisms of these diseases are only partly understood and there is a lack of efficient therapies. The aim of this thesis is to create and evaluate models and approaches to facilitate diagnostics of mtDNA-based OXPHOS disorders, study OXPHOS pathophysiology and as a consequence identify new potential targets for therapeutic interventions. In that respect, mitochondrial DNA resequencing chips (**chapter 2**), microarray gene expression profiling (**chapter 3 and 4**) and a set of oxidative stress markers (**chapter 5**) have been applied to obtain new information on the distribution of mtDNA variation in the general population and pathological and/or adaptive processes involved in OXPHOS disease, respectively. **Chapter 6** discusses the validity and relevance of the different models for the study of OXPHOS disorders.

Evaluating pathogenicity of new unclassified variants identified in patients with symptoms related to OXPHOS disorders is not straightforward. Improved insight in the presence, tolerance, negative selection and consequences of mtDNA variation in the human population will give valuable information for the diagnostic classification of these mtDNA variants. In **chapter 2**, the mtDNA of 730 subjects was resequenced and compared with the revised reference sequence. The locations of non-pathogenic variants identified in this study and known pathogenic mtDNA mutations were evaluated in terms of functional importance and conservation. For the non-pathogenic variation, there was a preferential selection against variants in protein coding genes with high sequence conservation. Also for tRNA genes, neutral variants and pathogenic mutations showed differences in functional location (loop or stem) and sequence or base pair conservation. Thus, evaluating the conservation and functional importance of a newly identified variant remain the most important parameters. It can be expected that this approach combined with the data generated by next generation sequencing will lead to a detailed map of all variants ever detected, both for the mitochondrial and nuclear DNA.

When a genetic diagnosis for an OXPHOS disorder is established, the pathogenic process has to be unraveled in order to determine cause and mechanism of the disease symptoms for proper prognosis and to explore potential therapeutic strategies. For pathophysiological studies, affected tissues from patients would allow the most

relevant and specific disease processes to be identified. However, for diseases affecting non-dividing tissues (e.g. brain), the availability and amount of material is obviously limited. Therefore, model systems such as other patient derived tissues (e.g. muscle biopsies, fibroblasts) can be used. Even though these tissues might be less or not affected in OXPHOS patients, they can still provide clues for pathological processes in other affected tissues.

To identify new biomarkers or potential therapeutic targets, whole genome gene expression profiling and pathway analysis have been applied to explore the underlying molecular processes in patients with *POLG1* mutations and patients with complex I (CI) deficiency, the largest patient groups with mitochondrial disease. DNA polymerase gamma (pol γ ; *POLG1* gene) is the only DNA polymerase involved in maintenance of the mtDNA. *POLG1* mutations have been reported to cause a broad variety of phenotypes involving hepatopathy usually early in life, isolated myopathy in older individuals or brain abnormalities at any age. The correlation between genotype and phenotype in patients with *POLG1* mutations is sometimes tight but more often variable. In **chapter 3**, skeletal muscle from patients with mutations in the *POLG1* gene was used as a model for pathological changes in liver and brain. The majority of these patients exhibited subtle morphological skeletal muscle changes and gene expression analysis mainly pointed to an energy metabolism switch (decreased beta oxidation, increased coupling of electron transfer and ATP production) and hinted towards changes in oxidative stress and apoptosis. The latter increased processes were further validated in fibroblast cultures, liver and brain and were shown to be increased in part of the patients. Ultimately, this study revealed the involvement of these processes in the pathology of at least part of human *POLG1* patients for the first time and emphasizes the previously described heterogeneity in this patient group, requesting an individual-based approach. In **chapter 4**, primary fibroblast cultures of CI deficient patients with a nuclear mutation were used as a model to study pathology. CI deficiency is the most frequently encountered defect in mitochondrial energy metabolism and is associated with e.g. Leigh and LHON disease, fatal infantile acidosis, neonatal cardiomyopathy with lactic acidosis, leucodystrophy with macrocephaly and hepatopathy with renal tubulopathy. Although children usually have a normal prenatal development, symptoms start occurring during their first year of life after which the disease deteriorates rapidly and may become fatal. Because fibroblasts primarily (~70%) produce ATP by glycolysis, fibroblasts were experimentally stimulated to use OXPHOS (and express the defect) by culturing them without glucose in the presence of galactose. Whole genome expression profiling showed that patient fibroblasts responded to oxidative stress by Nrf2-mediated induction of the glutathione antioxidant system and Gadd45-mediated activation of the DNA damage response pathway. Furthermore, the observed reduced expression of selenoproteins could explain the disturbed calcium homeostasis previously described for the patient fibroblasts and might be linked to endoplasmic reticulum stress. These results indicate that both glutathione and selenium metabolism are potentially therapeutic targets in CI deficiency.

Oxidative stress was observed in both the *POLG1* and CI deficiency models (**chapter 3** and **4**) and has been implicated to play a role in OXPHOS disorders in literature. However, most studies did not report on the full spectrum of ROS levels, ROS detoxification (antioxidant status) and oxidative damage. Nevertheless, OXPHOS patients are often supplemented with antioxidants, even though their efficacy is highly anecdotic. Therefore, a pipe-line for the characterization of ROS levels, stress induced (antioxidant) gene expression and oxidative protein damage in fibroblasts was established (**chapter 5**). Using this approach, the level of oxidative stress in fibroblasts of three different patient groups (*POLG1* patients and patients with mtDNA *tRNA-Leu* or CI mutations) was compared. Whereas almost all cell lines showed increased ROS levels compared with wild type fibroblasts, only few concomitantly exhibited increased oxidative protein damage. The absence of oxidative damage in the other cell lines could partially be explained by increased stress-related (antioxidant) gene expression. Even though fibroblasts are better able to adapt to a genetic or biochemical defect than severely affected post-mitotic tissues, the current study demonstrated the ability to measure altered ROS levels and oxidative damage in these cells. Therefore, the fibroblast model provides an indication for the oxidative status of a patient and information on which adaptive processes are therapeutically relevant. The characterized fibroblasts models in **chapter 4** and **5** can also be used for high-throughput screening of potentially beneficial compounds using the same read-out parameter, as used for establishing the pathophysiological processes.

In this thesis, models and methodologies have been developed for the improvement of diagnostics, prognostics, understanding and therapy of specific OXPHOS disorders, for which the genetic defect was known. Comparable models can be established for other OXPHOS disorders as well, applying the same methodologies. However, as discussed in **chapter 6**, no single model system can cover every aspect from the identification of pathological processes to the screening of therapeutic compounds. Our *in vitro* data based on patient material should be validated and followed-up in more advanced (animal) models before eventually translating them into patient care.

Samenvatting

Mitochondriële afwijkingen zijn vaak dodelijke afwijkingen of syndromen in meerdere organen die geassocieerd zijn met abnormaliteiten van de laatste component van het mitochondriële energiemetabolisme, oxidatieve fosforylering (OXPHOS). Deze ziekten treffen voornamelijk weefsels met een hoge energiebehoefte zoals het hart, de hersenen, de lever en spier. Dezen zullen verder OXPHOS ziekten genoemd worden. Naar schatting wordt 1 op 5000 individuen getroffen door een OXPHOS ziekte. Het OXPHOS systeem is verantwoordelijk voor de cellulaire aërobe energie productie en de afzonderlijke subeenheden worden door meer dan 80 genen gecodeerd waarvan er 37 gelegen zijn in het mitochondrieel DNA (mtDNA). Er zijn echter meer dan 1000 genen in het nucleaire DNA (nDNA) betrokken bij OXPHOS functie, assemblage en onderhoud. Daarom leiden mutaties in mtDNA of nDNA genen die coderen voor structurele OXPHOS elementen of in nDNA gecodeerde factoren betrokken bij OXPHOS onderhoud en de assemblage vaak tot OXPHOS ziekten. De extreme genetische en fenotypische heterogeniteit en het gebrek aan consistente genotype-fenotype correlaties maken het genetische testen van deze ziekten complex. Verder wordt het onderliggende pathologische mechanisme slechts gedeeltelijk begrepen en is er een gebrek aan efficiënte therapieën. Het doel van deze thesis is de creatie en evaluatie van modellen en strategieën om de diagnostiek van mtDNA-gebaseerde OXPHOS ziekten makkelijker te maken, de pathofysiologie van OXPHOS ziekten te bestuderen en bijgevolg nieuwe potentiële doelen voor therapie te identificeren. Daarom werden mtDNA *resequencing* chips (**hoofdstuk 2**), *microarray* genexpressie analyse (**hoofdstuk 3 en 4**) en een set van oxidatieve stress markers (**hoofdstuk 5**) ingezet om nieuwe informatie te verkrijgen over de verdeling van mtDNA variatie in de normale populatie en over de pathologische en/of adaptieve processen betrokken bij OXPHOS ziekten. **Hoofdstuk 6** bespreekt de validiteit en de relevantie van de verschillende modellen voor het bestuderen van OXPHOS ziekten.

De evaluatie van de pathogeniciteit van nieuwe ongeclassificeerde varianten in patiënten met symptomen gerelateerd aan OXPHOS ziekten is niet eenvoudig. Een verbeterd inzicht in de aanwezigheid van, de tolerantie van, negatieve selectie tegen en de gevolgen van mtDNA variatie in de menselijke populatie zal waardevolle informatie verschaffen voor de diagnostische classificatie van deze mtDNA varianten. In **hoofdstuk 2** werd het mtDNA van 730 individuen geanalyseerd en vergeleken met de gereviseerde referentiesequentie. De locatie van niet-pathogene varianten die geïdentificeerd werden in deze studie en bekende pathogene mutaties werd geëvalueerd met betrekking tot functioneel belang en conservering. Voor de niet-pathogene variatie was er een preferentiële selectie tegen varianten in eiwitcoderende genen met een sterke conservering. Ook voor de tRNA genen toonden de neutrale varianten en pathogene mutaties verschillen in functionele locatie (loop of stam) en sequentie of basenpaar conservering. Dus, de evaluatie van de conservering en het functionele effect van een nieuw geïdentificeerde variant blijven de meest belangrijke parameters. Verwacht wordt dat deze aanpak, in combinatie met de data van *next generation sequencing*, zal leiden tot een gedetailleerde kaart van alle varianten die ooit gedetecteerd werden, zowel voor het mitochondriële als het nucleaire DNA.

Wanneer er een genetische diagnose voor een OXPHOS ziekte is, moet het pathogene proces nog ontrafeld worden om de oorzaak en het mechanisme dat leidt tot de symptomen te bepalen zodat de juiste prognose en het onderzoeken van mogelijke therapieën mogelijk is. Voor pathofysiologische studies, zouden de aangedane weefsels van patiënten toelaten de meest relevante en specifieke processen te identificeren. Echter, voor aandoeningen van niet-delende weefsels (bijvoorbeeld hersenen) is de beschikbaarheid en hoeveelheid van materiaal beperkt. Daarom kunnen modelsystemen zoals andere weefsels (bijvoorbeeld spierbiopsies, fibroblasten) van de patiënten gebruikt worden. Hoewel deze weefsels minder of niet aangedaan kunnen zijn in OXPHOS patiënten, kunnen ze nog steeds aanwijzingen voor pathologische processen in andere aangedane weefsels opleveren.

Genexpressie-analyse van het volledige genoom en process-gebaseerde analyse werden toegepast om de onderliggende moleculaire processen in patiënten met *POLG1* mutaties en patiënten met complex I (CI) deficiëntie te bestuderen en mogelijk nieuwe biomerkers of potentiële therapeutische doelwitten te identificeren. DNA polymerase gamma (pol γ ; *POLG1* gen) is het enige DNA polymerase dat betrokken is bij het onderhoud van het mtDNA. *POLG1* mutaties veroorzaken een brede waaier aan fenotypes inclusief hepatopathie op jonge leeftijd, geïsoleerde myopathie in oudere individuen en hersenafwijkingen op elke leeftijd. De correlatie tussen genotype en fenotype in patiënten met *POLG1* mutaties is soms eenduidig maar meestal variabel. In **hoofdstuk 3** werd skeletspier van patiënten met mutaties in het *POLG1* gen gebruikt als model voor pathologische veranderingen in lever en hersenen. De meerderheid van deze patiënten hadden subtiele morfologische skeletspier veranderingen. Genexpressie-analyse wees voornamelijk op een omschakeling van het energie metabolisme (vermindere beta oxidatie, versterkte koppeling van elektrontransport en ATP productie) en suggereerde veranderingen in oxidatieve stress en apoptose. Deze laatste processen werden verder gevalideerd in fibroblastkweken, lever en hersenen en bleken verhoogd te zijn in een gedeelte van de patiënten. Uiteindelijk heeft deze studie voor het eerst aangetoond dat deze processen betrokken zijn bij de pathologie van minstens een gedeelte van de humane *POLG1* patiënten. Voorts wordt de eerder beschreven heterogeniteit van deze patiëntengroep en de nood aan een individuele aanpak nogmaals benadrukt.

In **hoofdstuk 4** werden primaire fibroblast kweken van CI deficiënte patiënten met een nucleaire mutatie gebruikt als model om CI pathologie te bestuderen. CI deficiëntie is het meeste frequente defect in mitochondrieel energie metabolisme en is geassocieerd met bvb. Leigh en LHON ziekte, fatale infantiele acidose, neonatale cardiomyopathie met lactaat acidose, leukodystrofie met macrocefalie en hepatopathie met renale tubulopathie. Hoewel kinderen meestal een normale prenate ontwikkeling doormaken, beginnen de eerste symptomen te verschijnen tijdens hun eerste levensjaar waarna de ziekte snel verergert en tot overlijden kan leiden. Omdat fibroblasten voornamelijk (~70%) ATP produceren via glycolyse, werden de fibroblasten experimenteel gestimuleerd om OXPHOS te gebuiken (en het defect tot expressie te brengen) door hen te kweken zonder glucose in aanwezigheid van galactose. Genexpressie-analyse van het volledige genoom toonde aan dat patiëntfibroblasten op oxidatieve stress

reageerden door Nrf2-gemedieerde inductie van het glutathion antioxidant systeem en Gadd45-gemedieerde activatie van de DNA schade respons. Verder kan de geobserveerde verminderde expressie van seleno-eiwitten de eerder beschreven verstoorde calcium homeostase in deze patiënten fibroblasten verklaren en kan dit ook gelinkt zijn aan endoplasmatisch reticulum stress. Deze resultaten tonen aan dat zowel glutathion als selenium metabolisme potentiële therapeutische kandidaten zijn bij CI deficiëntie.

Oxidatieve stress werd in beide (*POLG1* en CI deficiëntie) modellen geobserveerd en wordt ook in de literatuur genoemd als een speler in OXPHOS ziekten. De meeste studies rapporteerden echter niet over het volledige spectrum van reactieve zuurstof soorten (ROS) niveaus, ROS detoxificatie (antioxidant status) en oxidatieve schade. Desalniettemin krijgen OXPHOS patiënten vaak antioxidant supplementen, ook al is hun efficiëntie sterk anecdotisch. Daarom werd een pijplijn opgezet voor de karakterisatie van ROS niveaus, stress geïnduceerde (antioxidant) genexpressie en oxidatieve eiwit schade in fibroblasten (**hoofdstuk 5**). Met deze aanpak werd de mate van oxidatieve stress in fibroblasten van drie verschillende patiënten groepen (*POLG1* patiënten en patiënten met mtDNA *tRNA-Leu* of CI mutaties) vergeleken. Hoewel bijna alle cellijnen verhoogde ROS niveaus vertoonden vergeleken met controle fibroblasten, waren er slechts enkele met verhoogde oxidatieve eiwitschade. De afwezigheid van oxidatieve schade in de andere cellijnen kon gedeeltelijk verklaard worden door verhoogde stress-gerelateerde (antioxidant) genexpressie. Ook al zijn fibroblasten beter in staat om zich aan te passen aan een genetisch of biochemisch defect dan ernstig aangedane post-mitotische weefsel, de huidige studie laat zien dat het mogelijk is verhoogde ROS niveaus en oxidatieve schade in de cellen te meten. Daarom geeft het fibroblast model een indicatie voor de oxidatieve status van een patiënt en tevens ook informatie over welke adaptieve processen mogelijk van therapeutisch belang kunnen zijn. De gekarakteriseerde fibroblastmodellen in **hoofdstuk 4 en 5** kunnen voorts ook gebruikt worden voor het *high throughput* screenen van potentiële therapeutische stoffen, gebruik makend van dezelfde uitleesparameters als voor de studie van de pathofysiologische processen.

In deze thesis werden modellen en methods ontwikkeld voor de verbetering van diagnose, prognose, het begrip en de therapie van specifieke OXPHOS ziekten waarvoor het genetisch defect gekend was. Vergelijkbare modellen kunnen ook opgezet worden andere OXPHOS ziekten. Echter, zoals aangehaald in **hoofdstuk 6**, zal geen enkel modelsysteem in staat zijn om elk aspect, van de identificatie van de pathologische processen tot de screening van therapeutische stoffen, te omvatten. Onze *in vitro* data, gebaseerd op patiëntenmateriaal, moet daarom ook gevalideerd en opgevolgd worden in meer geavanceerde (dier)modellen voordat ze vertaald kan worden naar patiëntenzorg.

