

Novel causes, mechanisms and therapeutic strategies in mitochondrial disease

Citation for published version (APA):

Theunissen, T. (2018). *Novel causes, mechanisms and therapeutic strategies in mitochondrial disease*. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20180418tt>

Document status and date:

Published: 01/01/2018

DOI:

[10.26481/dis.20180418tt](https://doi.org/10.26481/dis.20180418tt)

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

Summary

Mitochondrial disorders are a group of inheritable metabolic disorders that affect approximately 1 in 5,000 individuals, and result from an insufficient capacity to produce ATP due to abnormalities in the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system. As a result, a broad variety of, especially, high energy demanding organs can be affected, with often muscle, brain and liver involved. Mitochondrial disorders are clinically and genetically heterogeneous, as a specific gene defect can be pleiotropic in its clinical manifestations, or a similar disease phenotype can result from different gene defects. Besides, mitochondrial disease can be caused by both, mitochondrial DNA (mtDNA) or nuclear gene defects, where still a considerable part of the nuclear DNA defects and genes remain to be discovered. This heterogeneity complicates the identification of the genetic basis of mitochondrial disease. A complete genetic characterization is crucial, not only to establish a genetic diagnosis in the patient, or to prevent disease transmission towards offspring, but also to improve our understanding of the pathophysiological basis of mitochondrial disease, with the ultimate aim to develop effective treatment options (**chapter 1**). The development of next generation sequencing (NGS) has revolutionized the identification of genetic defects in mitochondrial patients. Our central hypothesis was that **whole exome sequencing would enable us to identify the underlying genetic cause, characterize the pathophysiological mechanisms and unravel possible targets for therapeutic intervention in patients with mitochondrial disease**, who could not be solved using conventional targeted gene analysis methods.

Our first aim was to develop and implement whole exome sequencing and novel bioinformatics approaches for the identification of gene defects in patients with a likely or possible mitochondrial disease. In **chapter 2** we described a two-step NGS-based approach in a cohort of 117 patients, mostly children, in who a genetic cause was likely. Patients either had a high likelihood of having a mitochondrial disorder, as based on the Nijmegen clinical criteria and/or involvement of OXPHOS deficiencies, or had a disease phenotype in which mitochondrial defects could be part of the differential diagnosis. Patients were screened for mtDNA defects and, if excluded, analyzed by whole exome sequencing (WES). We filtered for autosomal recessive and X-linked recessive mutations in families with multiple affected siblings and/or consanguineous parents. Non-consanguineous families with a single patient were additionally screened for autosomal and X-linked dominant mutations in a predefined gene set. We detected and quantified mtDNA point-mutations and indels in 21% of the patient-cohort, and identified disease-causing exonic mutations in 49% of the patients, implying an overall diagnostic yield of 69%. We showed that 30% of the disease-causing genes in mitochondrial WES-patients were not included in the MitoCarta database at the time of discovery, and therefore would have been missed with targeted, gene panel based sequencing approaches. WES is therefore a comprehensive and unbiased approach to establish a genetic diagnosis in mitochondrial disease. In **chapter 3** we highlight the

importance of following-up all variants identified by WES that could be related to the patient's clinical symptoms. WES of two patients, suffering from a broad variety of clinical symptoms, revealed that the consanguineous patient had three homozygous mutations, underlying a blended phenotype, and the non-consanguineous patient had a compound heterozygous mutation combined with a dominant *de novo* mutation, underlying a composite clinical manifestation. Heterogeneous clinical phenotypes may therefore not always be caused by a single gene defect, especially in consanguineous families, where homozygosity regions increase the risk of inheriting multiple recessive genetic defects. Whereas candidate gene approaches often fall short in explaining the entire clinical picture, and require multiple rounds of clinical investigations, we show that WES provides an unbiased solution for fully resolving composite or blended phenotypes that arise from multiple gene defects. When establishing a genetic diagnosis in heterogeneous disease, clinical characterization and WES can go hand-in-hand. In **chapter 4** we demonstrated that clinical data could be essential, not only to guide WES variant selection and define the clinical severity of a genetic defect, but also to identify other patients with defects in the same gene. In an infant patient with pronounced neurological features, WES resulted in identification of a novel homozygous *CLPP* mutation. Based on the gene defect and clinical symptoms, the diagnosis Perrault syndrome type 3 (PRLTS3) was established. The patient's brain-MRI showed specific abnormalities, and was used to identify similar patients in the Amsterdam brain-MRI database, containing over 3000 unclassified leukoencephalopathy cases. In two unrelated patients with similar MRI abnormalities, novel *CLPP* missense mutations were identified. Our data therefore show that similarity in brain-MRI patterns can be used to identify novel PRLTS3 patients, especially during early disease stages, when only part of the disease manifestations is present.

Our second aim was to characterize the functional effect of mutations in known and novel genes in patient cell lines and zebrafish. In **chapter 5** we investigated a complex I deficient patient with exercise intolerance, in whom dietary studies showed increased muscle endurance on a high-fat diet compared to a high-carbohydrate diet. We performed WES to characterize the genetic defect and identified a pathogenic mutation in the *TMEM126B* gene, encoding an early assembly factor of complex I. A complementation study in patient fibroblasts confirmed that the *TMEM126B* defect caused the complex I deficiency, which was an incomplete assembly of the peripheral arm of complex I. Based on *in vitro* analysis of the patient's fibroblasts, we showed that treatment with the saturated fatty acid palmitic acid resulted in an increase in maximal OXPHOS capacity, indicating responsiveness of the patient cells to palmitic acid and supporting the clinical improvements in the patient. **Our third aim was to identify, based on the genes and pathways involved, novel therapeutic targets.** Based on the promising results in the *TMEM126B* patient, we therefore performed the same assay on fibroblasts from patients with different complex I gene defects, including

defects in the core-subunits and assembly factors of complex I. We demonstrated that also other gene defects involved in early assembly of complex I (*NDUFS7* and *NDUFAF5*) were responsive to palmitic acid, whereas late assembly defects seemed non-responsive. Our data showed at a clinical and biochemical level that a high fat diet could be beneficial for complex I patients and that our cell line assay can be an easy tool for the selection of patients, who might potentially benefit from such a therapeutic diet (**chapter 5**).

In **chapter 6** we performed WES in a patient with Hirschprung disease (HSCR) and left-sided ptosis, and identified a novel missense mutation in the *ERBB2* gene. Our patient had striking phenotypic similarity with a previously reported conditional *erbB2* mutant mouse, in which a lack of functional *erbB2* expression mimicked the human HSCR phenotype and also resulted in ptosis. The mutation caused a likely pathogenic substitution in the Juxta-membrane domain of the ERBB2 receptor, but could also create a potential cryptic donor splice site. Yet, RNA data showed that cryptic splicing was not activated, and also no non-sense mediated decay was measured in the patient's fibroblasts. Besides, ERBB2 *in vitro* overexpression studies showed no indications that ERBB2 activity was altered due to the mutation or that membrane localization was affected. Therefore, we could not unequivocally demonstrate that the variant inactivated ERBB2 based on our *in vitro* studies. Evidence for a definite role for *ERBB2* in HSCR therefore awaits further functional validation, especially based on the effect on the enteric nerve system (ENS). The Phox-2b reporter zebrafish line will be used to analyze the ENS after CRISPR/Cas9 based knock-down/out of *ERBB2*. Although the zebrafish model has been validated as a useful model to study nuclear gene mutations, data on mtDNA, and the mechanisms involved in mtDNA segregation, are lacking. Therefore, in **chapter 7** we studied the mtDNA bottleneck in zebrafish to elucidate size, timing and variation in germline and non-germline cells. Mature zebrafish oocytes contain $\sim 19.0 \times 10^6$ mtDNA molecules with high variation between oocytes. We showed that during embryogenesis, the mtDNA copy number decreases to ~ 170 mtDNA molecules per primordial germ cell (PGC), a number similar to mammals, and to ~ 50 per non-PGC. These bottlenecks occur at the same developmental stage, implying considerable variation in mtDNA copy number in (non-)PGCs of the same female, dictated by variation in the mature oocyte. Therefore, bottleneck differences between germline and non-germline cells, due to early differentiation of PGCs, may account for different distribution patterns of familial mtDNA mutations in humans.

In **chapter 8** we review the different genetic models that are used to study mitochondrial disease. Especially with the involvement of WES, there is demand for a genetic model that allows the testing of variant pathogenicity in a relatively quick and straightforward manner, specifically for variants of unknown significance (VUS) and variants in novel genes. Suitable read-out models to test variant pathogenicity can be based on *in silico* analysis, *in vitro* testing or *in vivo* models. We give an overview of different strategies to functionally validate mutation pathogenicity in mitochondrial disease, and discuss the advantages and disadvantages of each model. Yet, the choice for a certain genetic-model is ultimately defined by the research question, implying that there exists no single model that fits all demands. Despite the current successes in resolving the genetic causes of mitochondrial disease, the translation into effective treatment strategies is still limited, where current treatment options are mainly supportive. This is in part due to the enormous genetic and phenotypic heterogeneity in mitochondrial disease. We discuss the different generic treatment strategies, based on exercise training, diets and small molecule pharmaceuticals (stimulators of biogenesis, ETC function and ROS scavenging), that aim to improve mitochondrial capacity by increasing mitochondrial biogenesis or improving ETC function. In contrast to generic treatment, tailored treatment strategies specifically target the genetic or metabolic defect in the patient. Tailored treatment covers the supplementation of specific enzymes, substrates or nucleotides to restore the metabolic deficiency, genetic manipulation (shifting mtDNA heteroplasmy, gene editing of nDNA mutations, gene transfer therapy) and stem cell therapies. Due to the large genetic, clinical and biochemical heterogeneity, it is most likely that a 'one size fits all' therapy will not be possible and that tailored intervention therapies and specific combinations of therapeutics will be needed to effectively target each specific subgroup of mitochondrial disease, eventually going towards personalized medicine.

Conclusion

We showed that whole-exome sequencing enabled us to identify the genetic cause in 69% of the patients with mitochondrial disease, that could not be solved with conventional sequencing methods. Novel bioinformatics tools, such as WeGET helped us to select promising candidate genes based on co-expression data. WES is therefore the preferred, first strategy to characterize the genetic defect in patients with mitochondrial disease, especially in consanguineous families, where there is an increased risk of inheriting multiple gene defects. Based on complementation studies in patient cell lines, we have been able to characterize and prove the functional consequences of known and novel gene defects. Besides, we have shown that the zebrafish is a powerful model to study mitochondrial disease, not only as a model for nDNA defects, as commonly reported in literature, but also to study mtDNA transmission. The characterization of genes and pathways involved

in mitochondrial disease has in a limited number of cases led to the identification of novel therapeutic targets, as we showed that treatments based on thiamine, riboflavin or high-fat diets could be beneficial for patients with specific mitochondrial gene defects (*SLC19A3*, *SLC25A32*, *ACAD9*, *TMEM126B*). This indicates that the treatment of mitochondrial disease will become highly personalized and will require additional experimental approaches.

SAMENVATTING

Mitochondriële aandoeningen behoren tot een groep van overerfbare metabole ziektes, en treffen ongeveer 1 op de 5000 individuen door een onvoldoende capaciteit om ATP te produceren, dit als gevolg van defecten in het oxidatieve fosforylerings systeem (OXPHOS). Vandaar dat een grote verscheidenheid aan vooral veel energie eisende organen, zoals spier, hersenen en lever, kunnen zijn aangedaan. Mitochondriële aandoeningen zijn klinisch en genetisch heterogeen, aangezien een specifiek gendefect pleiotropisch kan zijn in haar klinische manifestaties, en vergelijkbare ziektebeelden kunnen voortkomen uit verschillende genetische fouten. Daarnaast kunnen mitochondriële aandoeningen veroorzaakt worden door zowel defecten in het mitochondriële DNA (mtDNA) als het nucleaire genoom (nDNA). Deze heterogeniteit bemoeilijkt het identificeren van de genetische basis in mitochondriële aandoeningen, waardoor, met name in het nDNA, er nog een aanzienlijk aantal mitochondriële gendefecten ongeïdentificeerd zijn. Een volledige genetische karakterisatie is cruciaal, niet alleen om diagnose te kunnen stellen in de patiënt, of het voorkomen van ziekteoverdracht op volgende generaties, maar ook om de pathofysiologische basis van mitochondriële ziekten beter te begrijpen, met als uiteindelijk doel het ontwikkelen van effectieve behandelingsopties (**hoofdstuk 1**). De ontwikkeling van next generation sequencing (NGS) heeft gezorgd voor een revolutionaire doorbraak in het identificeren van genetische defecten in mitochondriële patiënten. Onze centrale hypothese was dat **whole exome sequencing ons in staat zou stellen de onderliggende genetische oorzaak te identificeren, de pathofysiologische mechanismen te karakteriseren, en tot het aanduiden van mogelijke 'target' moleculen of processen voor therapeutische interventie in mitochondriële patiënten**. Hierbij gaat het om patiënten bij wie de genetische oorzaak niet kon worden vastgesteld met behulp van conventionele gerichte gen analyse.

Ons eerste doel was het implementeren van whole exome sequencing en nieuwe bioinformatica benaderingen om de genetisch defecten te identificeren in patiënten met waarschijnlijk, of mogelijk een mitochondriële aandoening. In **hoofdstuk 2** beschrijven we een twee-staps NGS benadering in een cohort met 117 patiënten, voornamelijk kinderen, met meest waarschijnlijk een genetische component als oorzaak van de aandoening. Patiënten hadden ofwel hoge verdenking op een mitochondriële aandoening op basis van de Nijmegen klinische criteria en/of de betrokkenheid van een OXPHOS deficiëntie, of ze hadden een ziektebeeld waarbij een mitochondrieel defect onderdeel zou kunnen zijn van de differentiaal diagnostiek. Patiënten werden gescreend voor mtDNA defecten en, indien dit werd uitgesloten, geanalyseerd met behulp van whole exome sequencing (WES). In families met meerdere aangedane kinderen en/of met consanguine ouders werd WES data gefilterd voor autosomaal recessieve en X-chromosomaal gebonden recessieve mutaties. In families zonder consanguine achtergrond en met slecht een enkele aangedane patiënt, werd WES data daarnaast ook gefilterd voor autosomaal en X-chromosomaal gebonden

dominante mutaties in een vooraf bepaalde groep van mitochondriële genen (genen waarin dominante mutaties eerder zijn gerapporteerd). In 21% van het patiënt cohort hebben we mtDNA puntmutaties of deleties gedetecteerd en gekwantificeerd, en in 49% van de patiënten hebben we een ziekte veroorzakende mutatie in het exoom geïdentificeerd, wat neerkomt op een totale diagnostische opbrengst van 69%. Daarbij lieten we zien dat 30% van de ziekte veroorzakende genen in mitochondriële WES-patiënten niet waren geïncorporeerd in de MitoCarta database op het moment van identificatie, en daarom zouden worden gemist met gerichte, op “gene panels” gebaseerde sequencing benaderingen. WES is daarom een volledige en accurate benadering om een genetische diagnose te stellen in mitochondriële aandoeningen. In **hoofdstuk 3** tonen we het belang aan om alle varianten welke zijn geïdentificeerd met WES op te volgen, totdat alle individuele symptomen in de patiënt kunnen worden verklaard. In twee patiënten met een brede variëteit aan klinische symptomen toonde WES aan dat meerdere gendefecten ten grondslag lagen aan het ziektebeeld. In de consanguine patiënt werden drie verschillende homozygote mutaties geïdentificeerd welke een “blended” ziektebeeld veroorzaakten, gekenmerkt door een overlap in symptomen veroorzaakt vanuit de verschillende individuele gendefecten. De patiënt van niet-consanguine ouders had een compound heterozygote mutatie gecombineerd met een dominante *de novo* mutatie welke resulteerden in “composite” klinische manifestaties. Uit deze casussen blijkt dat heterogene klinische fenotypes niet altijd worden veroorzaakt door een enkel gendefect, met name in consanguine families, aangezien de aanwezigheid van homozygote regio’s het risico verhoogd op het erven van meerdere recessieve genetische defecten. Daar waar kandidaat-gen benaderingen vaak te kort komen in het volledig verklaren van een klinische beeld, en er vaak meerdere rondes van klinische onderzoeken aan vooraf gaan, laten wij zien dat WES een volledige en accurate oplossing biedt om “blended” en “composite” manifestaties die voortkomen uit meerdere gendefecten volledig op te lossen. Bij het stellen van een genetische diagnose in heterogene aandoeningen gaan klinische bepalingen en WES data analyse soms hand in hand. In **hoofdstuk 4** laten we zien dat klinische data essentieel kunnen zijn, niet alleen om een selectie van kandidaat WES-varianten te maken, of de klinische ernst van het genetisch defect te definiëren, maar ook om andere patiënten te identificeren met een defect in het zelfde gen. In een pediatrische patiënt met uitgesproken neurologische symptomen, resulteerde WES in het identificeren van een nieuwe homozygote *CLPP* mutatie. Op basis van het gendefect en de klinische symptomen werd de diagnose Perrault syndroom type 3 (PRLTS3) gesteld. Hersen MRI bij de patiënt liet specifieke afwijkingen zien, welke we hebben gebruikt om vergelijkbare patiënten te identificeren in de Amsterdam brain-MRI database, welke meer dan 3000 ongeclassificeerde gevallen van leukoencefalopathy omvat. In twee niet-gerelateerde patiënten met identieke MRI afwijkingen werden nieuwe *CLPP* missense mutaties geïdentificeerd. Onze data laat daarom zien dat gelijkenissen in

hersenen-MRI patroon gebruikt kunnen worden bij het identificeren van nieuwe PRLTS3 patiënten, met name in een vroeg stadium van ziekte ontwikkeling, wanneer maar een deel van symptomen aanwezig zijn.

Ons tweede doel was het karakteriseren van de functionele effecten van mutaties in bekende en nieuwe genen, daarbij gebruik makend van patiënt cellijnen en het zebrais model. In **hoofdstuk 5** hebben we een complex I deficiënte patiënt met bewegingsintolerantie onderzocht, bij wie dieet-studies lieten zien dat het uithoudingsvermogen is spier toenam onder een vetrijk dieet vergeleken met een koolhydraatrijk dieet. We hebben WES uitgevoerd in deze patiënt om het genetische defect te karakteriseren en hebben een pathogene mutatie geïdentificeerd in het *TMEM126B* gen, welke een vroege assemblage factor van complex I codeert. Een complementatie studie in fibroblasten van de patiënt bevestigde dat het *TMEM126B* defect de oorzaak was van de complex I deficiëntie en dat deze voortkwam uit een onvolledige assemblage van de perifere arm van complex I. Op basis van een *in vitro* assay met patiënt fibroblasten, toonden we aan dat behandeling met het verzadigde vetzuur palmitaat resulteerde in een toename in maximale OXPHOS capaciteit, wat in lijn is met de klinische verbeteringen in de patiënt onder een vetrijk dieet. **Het derde doel was om op basis van de betrokken genen en processen, nieuwe therapeutische targets te identificeren.** Op basis van de veelbelovende resultaten in de *TMEM126B* patiënt, hebben we dezelfde assay toegepast op fibroblasten van patiënten met verschillende complex I gen defecten, en lieten zien dat ook andere vroege assemblage defecten in subunits en assemblage factoren van complex I (*NDUFS7* en *NDUF5*) reageren op palmitaat behandeling, terwijl late assemblage defecten niet lijken te reageren. Onze data laat op een klinisch en biochemisch niveau zien dat een vetrijk dieet voordelig kan zijn voor bepaalde complex I patiënten, en dat onze cellijn assay gebruikt kan worden als een middel om patiënten die mogelijk baat hebben bij een dergelijk therapeutisch dieet te selecteren (**hoofdstuk 5**).

In **hoofdstuk 6**, hebben we WES uitgevoerd op een patiënt met Hirschprung disease (HSCR) en linkszijdige ptosis, waarbij we een nieuwe missense mutatie hebben geïdentificeerd in het *ERBB2* gen. Het patiënt fenotype toonde opvallende gelijkens met een eerder gerapporteerde conditionele mutante *erbB2* muis, in welke een gebrek aan functioneel *erbB2* expressie tot een, vergelijkbaar met het humane, HSCR fenotype leidde, tevens gecombineerd met ptosis. De mutatie veroorzaakt een waarschijnlijk pathogene aminozuursubstitutie in het Juxta-membraan domein van de ERBB2 receptor, maar zou mogelijk ook een cryptische donor splice-site kunnen veroorzaken. Desondanks, bevestigden onze testen op RNA niveau dat er geen cryptische splicing plaatsvond, en tevens dat er geen sprake was non-sense mediated decay (NMD) in de patiënt fibroblasten. Daarnaast waren er op basis van *in*

in vitro ERBB2 overexpressie studies geen indicaties dat de ERBB2 activiteit was veranderd als gevolg van de mutatie of dat de membraan lokalisatie was beïnvloed. Vandaar dat we op basis van deze *in vitro* studies niet onomstotelijk kunnen bewijzen dat de variant leidt tot inactivatie van ERBB2. Bewijs voor een rol voor *ERBB2* in HSCR vereist daarom nadere functionele testen, bij voorkeur om het effect te onderzoeken van dit gen op het enterische zenuwstelsel. We zullen daarom het Phox-2b reporter-zebravismodel gaan gebruiken om het enterische zenuwstelsel te bestuderen na knock-out/knock-down van *ERBB2* met behulp van CRISPR/Cas9. Alhoewel het zebravis model is gevalideerd als een bruikbaar model om nucleaire gendefecten te bestuderen, is er nauwelijks data bekend omtrent het mtDNA en de mechanismen betrokken bij segregatie van het mtDNA. Vandaar dat we in **hoofdstuk 7** de mtDNA “bottleneck” in zebravissen bestuderen, om de grootte, timing, en variatie van deze bottleneck in geslachtscellen en somatische cellen op te helderen. Een volwassen zebravis oocyt bevat gemiddeld $\sim 19.0 \times 10^6$ mtDNA moleculen met grote variatie onder de verschillende oocyten. Wij tonen aan dat tijdens de embryogenese het aantal mtDNA kopieën afneemt tot ~ 170 mtDNA moleculen per primordial germ cell (PGC), een aantal dat vergelijkbaar is in zoogdieren, en afneemt tot ~ 50 moleculen per niet-PGC (somatische cellen). Deze bottleneck vindt plaats tijdens eenzelfde fase in de ontwikkeling, implicerende dat er een aanzienlijke variatie is in mtDNA kopieën in (niet-)PGCs van het zelfde vrouwtje, bepaald door de variatie in de mature oocyt. Vandaar dat verschillen tussen de bottleneck in geslachtscellen en somatische cellen als gevolg van vroege PGC differentiatie, verantwoordelijk kunnen zijn voor de verschillende verdelingspatronen van familiale mtDNA mutaties in de mens.

In **hoofdstuk 8** geven we een overzicht van de genetische modellen welke gebruikt worden om mitochondriële aandoeningen te bestuderen. Vooral met de komst van WES, is er vraag naar een genetisch model dat het testen van variant schadelijkheid in een relatief snelle en eenvoudige manier mogelijk maakt, in het bijzonder voor varianten met een onbekende significantie (VUS) en varianten in nieuwe genen. Geschikte uitleesmodellen om de schadelijkheid van varianten te testen kunnen worden gebaseerd op *in silico* analyse, *in vitro* studies of *in vivo* modellen. We geven een overzicht van de verschillende strategieën om de schadelijkheid van mutaties in mitochondriële aandoeningen functioneel te valideren, en bediscussiëren de voor- en nadelen van elk model. Echter, uiteindelijk zal de keuze voor een specifiek genetisch model volledig afhangen van de onderzoeksvraag, implicerende dat er geen opzichzelfstaand model is dat voldoet aan alle vraagstellingen. Ondanks de huidige successen in het identificeren van de genetische oorzaken van mitochondriële aandoeningen, is de vertaalslag naar effectieve behandelingsstrategieën nog beperkt, dit gezien de meeste behandelingsopties slechts ondersteunend zijn. Voor een gedeelte is dit vanwege de enorme genetische en fenotypische heterogeniteit binnen de mitochondriële

aandoeningen. Ook bediscussiëren we de verschillende generieke behandelingsstrategieën welke momenteel worden gebruikt of getest, gebaseerd op fysieke training, diëten, en farmaceutische moleculen (stimulatie van biogenesis, ETC functie en anti-oxidant capaciteit), en welke als doel hebben het verbeteren van de mitochondriële capaciteit door een toename in mitochondriële biogenesis of het verbeteren van de ETC functie. In tegenstelling tot generieke behandelingsstrategieën richten de doelgerichte, gepersonaliseerde behandelingsstrategieën zich op het specifieke genetische of metabole defect in de patiënt. Gerichte behandeling kan omvatten het toedienen van specifiek enzymen, substraten of nucleotiden om zodoende de metabole deficiëntie te herstellen, ofwel, in de vorm van genetische manipulatie (verschuiven van mtDNA heteroplasmie, genetisch modificeren van nDNA mutaties, of “gene transfer” therapie) of stamcel therapie. Vanwege de grote genetische, biochemische en klinische heterogeniteit, is het onwaarschijnlijk dat een “one size fits all” benadering de oplossing zal zijn, maar dat juist de gerichte therapieën en specifieke combinaties van behandelen (mogelijk ook in combinatie met generieke therapieën) nodig zijn om effectief een specifieke subgroep van mitochondriële ziekte aan te pakken, uiteindelijk resulterende in een meer gepersonaliseerde behandelingsvorm.

Conclusie

We hebben aangetoond dat whole exome sequencing ons in staat stelt om de genetische oorzaak te identificeren in 69% van de patiënten met een mitochondriële aandoening, in wie geen oorzaak kon worden vastgesteld met behulp van conventionele, gerichte sequencing methoden. Nieuwe bioinformatica middelen, zoals WeGET, hebben bijgedragen aan het selecteren van veelbelovende kandidaat genen gebaseerd op co-expressie data. WES is daarom de geprefereerde, en meest geschikte benadering om het genetisch defect te karakteriseren in patiënten met een mitochondriële aandoening, met name in consanguine families, aangezien zij een verhoogd risico hebben op het overerven van meerdere genetische defecten. Op basis van complementatie studies in patiënt cellijnen, hebben we zowel bekende als nieuwe genetische defecten kunnen karakteriseren en de functionele consequenties van het defect kunnen bewijzen. Daarnaast, hebben we aangetoond dat de zebra vis een geschikt model is om mitochondriële ziekte te bestuderen, niet alleen als model voor nucleaire defecten, zoals vaak gerapporteerd in literatuur, maar ook om mtDNA transmissie te bestuderen. In een beperkt aantal gevallen heeft het karakteriseren van de genen en processen welke betrokken zijn bij mitochondriële aandoeningen geleid tot het identificeren van nieuwe therapeutische targets. We hebben aangetoond dat behandeling op basis thiamine, riboflavine en een vetrijk dieet voordelen kan hebben voor patiënten met specifieke mitochondriële gendefecten (SLC19A3, SLC25A32, ACAD9, TMEM126B). Dit laat zien dat de behandeling van mitochondriële aandoeningen uiteindelijk in grote mate

gepersonaliseerd zal gaan worden, en zal vragen om nieuwe, additionele experimentele benaderingen.