

Microarray analysis of oxidative phosphorylation disorders

Citation for published version (APA):

van Eijdsden, R. G. E. (2008). *Microarray analysis of oxidative phosphorylation disorders*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20080522re>

Document status and date:

Published: 01/01/2008

DOI:

[10.26481/dis.20080522re](https://doi.org/10.26481/dis.20080522re)

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.

Samenvatting

Een van de meest belangrijkste functies van mitochondria is de productie van energie via het proces van oxidatieve fosforylering (OXPHOS). Het eerste deel van OXPHOS wordt gevormd door de electronentransportketen die bestaat uit de OXPHOS enzymcomplexen I tot en met IV. In de laatste stap, die gekatalyseerd wordt door het vijfde OXPHOS enzymcomplex, ATP synthase of complex V, wordt energie gegenereerd in de vorm van ATP. OXPHOS is zowel onder controle van het nucleaire DNA (nDNA) als het mitochondriële DNA (mtDNA). Het mtDNA codeert voor 13 subunits van het OXPHOS enzymcomplex, 22 tRNA en twee rRNA moleculen. De meerderheid van de subunits en alle andere mitochondriële eiwitten, betrokken bij mtDNA transcriptie, translatie, replicatie, of bij mitochondrieel transport, opbouw en biogenese, worden gecodeerd door nucleaire genen. Mutaties in het mtDNA kunnen *de novo* zijn, worden overgedragen via de maternale lijn of worden somatisch verworven. MtDNA mutaties kunnen heteroplasmisch (mutante en wild-type mtDNA moleculen zijn samen aanwezig in cellen en weefsels) of homoplasmisch (alle mtDNA moleculen zijn gemuteerd) zijn. Mutaties in mtDNA genen en in nucleaire OXPHOS genen kunnen leiden tot OXPHOS deficiëntie en een energietekort. Ziektes waarbij OXPHOS deficiëntie een centrale rol speelt worden oxidatieve fosforyleringsstoornissen of OXPHOS stoornissen genoemd.

OXPHOS stoornissen zijn klinisch en genetisch heterogeen. Dit betekent respectievelijk dat dezelfde mutatie kan leiden tot verschillende symptomen, en dat verschillende mutaties kunnen leiden tot dezelfde symptomen. Dit bemoeilijkt het bepalen van het genetisch defect en het verklaren van de pathologie achter de ziekte. Klinische heterogeniteit is vooral een knelpunt in het geval van mtDNA mutaties, wat alleen gedeeltelijk verklaard kan worden door verschillen in heteroplasmieniveaus. Andere factoren zullen ook een rol spelen. Er zijn symptoomgebaseerde protocollen ontwikkeld die trachten een directe link tussen de klinische symptomen en een mtDNA mutatie te leggen, maar de bruikbaarheid hiervan blijft beperkt tot bepaalde specifieke syndromen, zoals Leber hereditary optic atrophy (LHON). Als alternatief zou het volledige mtDNA gescreend kunnen worden om het genetisch defect te identificeren of om het mtDNA als oorzakelijke factor uit te sluiten, wat belangrijk is voor de genetische counseling. MtDNA mutaties zijn bijvoorbeeld de ziekteoorzaak in 25% van de pediatrische OXPHOS stoornis gevallen, dat het nut van het screenen van het gehele mtDNA benadrukt. In **hoofdstuk 2** wordt een op microarray gebaseerde techniek gebruikt om het gehele mtDNA van patiënten met een OXPHOS stoornis te resequencen. Callrates waren hoog (gemiddeld 94%) en heteroplasmische mutaties waren detecteerbaar tot niveaus boven de 5%, hoewel de lagere limiet niet systematisch geëvalueerd is. In een kwart van de OXPHOS patiënten kon een genetische diagnose worden gesteld, maar er moet niet vergeten worden dat er vaak ongeclassificeerde varianten worden gedetecteerd, die de interpretatie kunnen bemoeilijken en die, wanneer niet goed gecounseld, angst in de betrokken families kan veroorzaken. Optimalisatie van de data analyse en software tools zal de callrates en

de heterplasmiedetectielimiet doen verbeteren tot een vergelijkbaar niveau als de huidige op heteroduplex gebaseerde methodes. Databases en functionele tests zullen het interpretatieprobleem dat voorkomt bij alle grootformaat sequencing aanpakken moeten verhelpen. De centrale opslag van alle gedetecteerd nucleotidevarianten, en de ontwikkeling van gestandaardiseerde diagnostische werkschema's waarin zo veel mogelijk aspecten van een pathogeniciteitsscoringsmechanisme worden aangehaald, zal een eerste stap vormen. De verbeteringen in de data analyse en de kosten van de chip in vergelijking met nieuwe high throughput sequencing- en mutatiedetectietechnieken zullen bepalend zijn voor de vraag of MitoChip resequencing de voorkeursmethode zal blijven voor het resequencen van het mtDNA in de komende jaren.

Het is gebleken dat microarray genexpressie profilering zeer waardevol is voor het bestuderen van pathologisch moleculaire processen van ziektes. Deze aanpak werd toegepast op skeletspier van patiënten met een OXPHOS stoornis zoals Leigh syndroom patiënten met een mutatie in het nucleaire *SURF1* gen die fataal is tijdens de kinderjaren (**hoofdstuk 3**) en symptomatische en a-symptomatische dragers van de m.3243A>G mutatie in het mtDNA die kan resulteren in verschillende symptomen, waaronder mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS, **hoofdstuk 4**). Onze data illustreert dat stimulatie van OXPHOS en mitochondriële biogenese niet optreedt ter compensatie van het energietekort in symptomatische *SURF1* Leigh en MELAS patiënten. Het aantal veranderde processen was aan de lage kant, maar bevatte een onverwachte stimulatie van het complement systeem. In a-symptomatische dragers van de m.3243A>G mutatie waren veel meer processen veranderd, waaronder eiwitturnover, apoptose en ook, weliswaar minder sterk, het complement systeem. Eiwitstudies hebben aangetoond dat de mate van ROS-schade verhoogd was in *SURF1* en MELAS spierbiopten. Op basis van onze data stellen wij de hypothese dat de toename in ROS-productie, veroorzaakt door het defecte OXPHOS systeem en een defect in het translatieapparaat bij de m.3243A>G mutatie, leidt tot oxidatief beschadigde en disfunctionele eiwitten. Omdat disfunctionele eiwitten constant geproduceerd worden, kan dit mechanisme het ontstaan van de pathologie niet voorkomen, maar alleen vertragen, wat afhankelijk is van de energiecapaciteit van het weefsel. Wanneer de schade inefficiënt verwijderd wordt, ontstaat er een onomkeerbare pathologie. Compensatie- en reddingsmechanismen worden gestopt en complement componenten worden sterk geactiveerd voor de stimulatie van spierregeneratie als een laatste redmiddel. Omdat het genetisch defect in alle cellen aanwezig is, is deze laatste poging gedoemd om te mislukken.

De aanwezigheid van genexpressiestudies op OXPHOS stoornissen is beperkt door de zeldzaamheid van specifieke syndromen en de schaarsheid aan beschikbaar weefsel. Alternatieve diermodellen representeren de wild-type of de pathologische situatie in de mens niet altijd even goed, wat extrapolatie van de resultaten bemoeilijkt. Daarom zouden van de patiënt afgeleide modelsystemen betere alternatieven zijn. In **hoofdstuk 5** wordt een celkweekmodelsysteem

beschreven dat gebruik maakt van de verschillen in mutatiepercentage tussen monoklonale fibroblastenkweken. Dit omzeilt de belangrijkste problemen van andere celweekmodelsystemen, namelijk de verschillen in genetische achtergronden tussen individuen of genetische gemodificeerde en onstabiele genetische achtergronden in getransformeerde cellijnen. Fibroblastcellen van één patiënt die drager was van de m.9176T>C mutatie in het ATP6 gen werden gekloneerd door de cellen uit te zaaien in een zeer lage concentratie waardoor celkolonies konden ontstaan vanuit één enkele cel. Hierdoor ontstonden verschillende cellijnen met dezelfde genetische achtergrond, maar met verschillende m.9176T>C mutatiepercentages. Dit systeem is de voorkeursmethode voor het bestuderen van mutatiepercentage effecten van de m.9176T>C mutatie. Daarnaast zou dit celweekmodelsysteem ook toepasbaar zijn op andere mtDNA mutaties, zoals de MELAS m.3243A>G en de Neuropathy, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa (NARP) of Leigh syndrome m.8993T>G/C mutatie.

Concluderend kunnen we stellen dat de op chip-gebaseerde aanpakken waardevol zijn gebleken voor de bestudering van OXPHOS stoornissen. Classificatie op basis van genexpressieprofielering of andere klinische of biochemische criteria blijft lastig vanwege de extreme genetische en klinische heterogeniteit van deze stoornissen, en alleen toepasbaar op een kleine subgroep patiënten. Daarom zijn alternatieve high-throughput screeningsmethodes ontwikkeld, zoals de mtDNA resequencing chip, als een alternatief om snel een grote hoeveelheid genen te screenen wanneer geen weloverwogen gerichte keuze op voorhand gemaakt kan worden. Genexpressieprofielering is vooral geschikt voor het identificeren van de pathologische moleculaire genetische pathways die betrokken zijn bij OXPHOS stoornissen. Blijkbaar is er maar een beperkte reactie van het OXPHOS systeem zelf op het transcriptionele niveau, en bij de m.3243A>G mutatie alleen vóóordat symptomen optreden. Andere processen die een rol spelen zijn ROS schade, eiwit turnover en weefselregeneratie, welke nieuwe ingangen kunnen vormen voor de ontwikkeling van therapieën voor OXPHOS stoornissen. Het doen toenemen van de energiec capaciteit zou het optreden van pathologische verschijnselen kunnen vertragen. Het voorkomen van ROS-schade aan eiwitten, DNA en weefsel, door het voorkomen van buitensporige ROS-productie, maar ook door het verbeteren van de ROS-bescherming, zal een positieve invloed hebben. Als laatste zou het stimuleren van de eiwitturnover en het aanreiken van de benodigde energie hiervoor helpen bij de compensatie van het defect, waardoor het optreden van ziektesymptomen uitgesteld wordt. Er zal aanvullend onderzoek uitgevoerd moeten worden om de doeltreffendheid van deze aanpakken vast te stellen.

Summary

One of the most important functions of mitochondria is the production of energy through the process of oxidative phosphorylation (OXPHOS). The first part of OXPHOS is carried out by the electron transport chain, consisting of OXPHOS enzyme complexes I to IV. In the final step, which is catalysed by the fifth OXPHOS enzyme complex, ATP synthase or complex V, energy is generated in the form of ATP. OXPHOS is under dual genetic control of the nuclear DNA (nDNA) and the mitochondrial DNA (mtDNA). The mtDNA encodes 13 subunits of the OXPHOS enzyme complexes, 22 tRNA and two rRNA molecules. The vast majority of the subunits and all other mitochondrial proteins, involved in mtDNA transcription, translation, replication, or in mitochondrial transport, assembly and biogenesis, are encoded by nuclear genes. Mutations in the mtDNA are either *de novo*, segregate in the maternal lineage or are somatically acquired. MtDNA mutations can be either heteroplasmic (mutant and wild-type mtDNA molecules co-segregate within cells and tissues) or homoplasmic (all mtDNA molecules are mutated). Mutations in mtDNA genes and in nuclear OXPHOS genes can lead to OXPHOS deficiency and energy deficit. Disorders in which OXPHOS deficiency is a central characteristic, are referred to as oxidative phosphorylation or OXPHOS disorders.

OXPHOS disorders are clinically and genetically heterogeneous. This means that the same mutation can lead to different symptoms and that different mutations can lead to the same symptoms respectively. This makes it difficult to determine the genetic defect and to explain the disease pathology. Clinical heterogeneity is particularly an issue for mtDNA mutations, which can only partly be explained by different levels of heteroplasmy. Other factors must play a role as well. Symptom-based protocols have been explored to link clinical symptoms directly to a specific mtDNA mutation, but the suitability is limited to certain specific syndromes, as for example with Leber hereditary optic atrophy (LHON). Alternatively the entire mtDNA could be screened to identify a genetic defect or to exclude the mtDNA as a causative factor, which is important for genetic counseling. For example, mtDNA mutations are causative in 25% of the pediatric OXPHOS disorder cases, making it reasonable to screen the complete mtDNA. In **chapter 2** a microarray based method is applied to resequence the complete mtDNA in OXPHOS patients. Call rates were high (94% on average) and heteroplasmic mutations were detectable at levels above 5%, although the lower limits were not systematically evaluated. In a quarter of the OXPHOS patients a genetic diagnosis could be made, but one has to be aware that unclassified variants are frequently detected, which cause interpretation problems and, if not properly counseled, anxiety in the families involved. Optimisation of data analysis and software tools will improve call rates and heteroplasmy level detection limits comparable to the currently used heteroduplex based methods. Databases and functional assays will need to solve the interpretation problems, which is common to all large-scale sequencing approaches. A first step will be central storage of all detected nucleotide variants and the development of standardised diagnostic flow charts in

which as many aspects as possible of a pathogenicity scoring mechanisms are taken into account. The improvements in data analysis and the costs of the chip compared with new high throughput sequencing and mutation detection techniques will determine whether MitoChip resequencing remains the preferred method for mtDNA resequencing for the next couple of years.

Microarray gene expression profiling has been shown to be extremely powerful to study pathological molecular processes of diseases. This approach was applied to OXPHOS disorders on skeletal muscle from Leigh syndrome patients with a mutation in the nuclear *SURF1* gene, which is fatal at infancy (**chapter 3**) and from symptomatic and a-symptomatic carriers of the m.3243A>G mutation in the mtDNA, which can cause a variety of symptoms, including mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS, **chapter 4**). Our data show that stimulation of OXPHOS and mitochondrial biogenesis does not occur to compensate the energy deficiency in symptomatic *SURF1* Leigh and MELAS patients. The number of altered processes was fairly limited, but included an unexpected elevation of the complement system. In a-symptomatic carriers of the m.3243A>G mutation many more processes were altered, including protein turn-over, apoptosis and also, at a lower level, the complement system. Protein studies showed that ROS-damage was elevated in *SURF1*- and MELAS-muscle biopsies. Based on our data, we hypothesise that increased ROS production, resulting from a defective OXPHOS system and a defect in the translation machinery in case of the m.3243A>G mutation, results in oxidative damaged and dysfunctional proteins. In an effort to replace the damaged and dysfunctional proteins, protein turnover and apoptosis is increased. However, as dysfunctional proteins are constantly produced, this can not prevent, but only delay pathology from occurring, probably depending on the energy capacity of the tissue. When damage is insufficiently removed, irreparable pathology arises. Compensation and rescue mechanisms are shut-down and, as a final rescue process, complement components are strongly activated as stimulators of muscle regeneration. As the genetic defect is present in all cells this final effort is doomed to fail.

Gene expression studies on OXPHOS disorders are limited by the rareness of specific syndromes and the scarcity of available tissue. Alternative animal models not always represent the wild-type or pathological situation in human to the best extent, making extrapolation of the results difficult. Therefore, patient-derived model systems should be better alternatives. In **chapter 5**, a cell culture model system is presented which exploits the mutation load differences between monoclonal fibroblast cultures. This circumvents the main problems of other cell culture model systems, i.e. differences in genetic backgrounds between individuals or genetically modified and unstable genetic backgrounds in transformed cell lines. Fibroblast cells from one single patient carrying the m.9176T>C mutation in the *ATP6* gene were cloned by seeding the cells in a very low concentration, allowing cell colonies to arise from only one single cell. This gave rise to various cell lines with the same genetic background, but with different m.9176T>C mutation loads. This system is the preferred method to study mutation load effects of the m.9176T>C mutation. Moreover, this cell culture model system may be applicable to other mtDNA mutations as well,

SUMMARY

like the MELAS m.3243A>G and the Neuropathy, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa (NARP) or Leigh syndrome m.8993T>G/C mutation.

In conclusion, chip-based approaches have been shown to be valuable tools for studying OXPHOS diseases. Classification based on gene expression profiling or other clinical or biochemical criteria remains difficult and only applicable to a small subgroup of patients, due to the extreme genetic and clinical heterogeneity of these disorders. Therefore, high-throughput screening methods, like the mtDNA resequencing chips, have been developed as an alternative to rapidly screen large amounts of genes, if no educated choice can be made in advance. Gene expression profiling is particularly suited to identify the pathological molecular genetic pathways, involved in OXPHOS disease. Apparently, the OXPHOS system itself reacts only limitedly at the transcriptional level and for the m.3243A>G mutation only before symptoms occur. Other processes involved are ROS damage, protein turnover and tissue regeneration, which may provide new clues for the development of therapies for OXPHOS disorders. Increasing energy capacity may delay pathology. Preventing ROS damage to proteins, DNA and tissue, by preventing excessive ROS production, but also by improving ROS protection, seems to be beneficial. Finally, stimulating protein turnover and supplying the required energy capacity might be helpful in order to compensate for the defects and postpone disease manifestation. Further studies will have to be performed to demonstrate the efficacy of these approaches.