



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mechanisms of mtDNA segregation and mitochondrial signalling in cells with the pathogenic A3243G mutation

Jahangir Tafrechi, R.S.

Citation

Jahangir Tafrechi, R. S. (2008, June 5). *Mechanisms of mtDNA segregation and mitochondrial signalling in cells with the pathogenic A3243G mutation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12961>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12961>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Mitochondriën zijn betrokken bij verschillende cellulaire processen waarvan energie metabolisme, met name oxidatieve fosforylering, een belangrijke is. Oxidatieve fosforylering neemt zo'n 80% van de cellulaire energieproductie in de vorm van ATP voor z'n rekening en vindt plaats in het mitochondriële binnenmembraan. De genetische code van de meerderheid van de ~90 eiwit subeenheden van de 5 complexen betrokken bij dit proces is in het kern DNA vastgelegd, maar 13 subeenheden zijn op het mitochondriële DNA (mtDNA) gecodeerd. Naast deze eiwitgenen bevat het mtDNA de codes voor 22 mitochondriële tRNAs en 2 rRNAs, die essentieel zijn voor de translatie van de 13 mitochondriële mRNAs. Mutaties in deze 37 mtDNA genen kunnen ziekten veroorzaken. Opmerkelijk daarbij is dat één specifieke mutatie verschillende ziektebeelden kan veroorzaken (klinische heterogeniteit). Een relevant voorbeeld is de A naar G transitie op locatie 3243. Deze mutatie bevindt zich in het *MTTL-1* gen, dat codeert voor het tRNA-Leu^(UUR) en associeert met een bepaalde vorm van diabetes (MIDD: Maternally Inherited Diabetes and Deafness), maar ook met aandoeningen aan het neuro-musculaire systeem (MELAS: Mitochondrial Myopathy Encephalopathy Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) en de oogzenuw (CPEO: Chronic Progressive External Ophthalmoplegia).

Een cel kan honderden tot duizenden van de moeder geërfde mtDNA moleculen bevatten en een mutatie kan in alle of in een gedeelte van de mtDNAs voorkomen. Boven een bepaalde grenswaarde van de mutatiegraad (heteroplasmie) zullen de cellen stoppen met het produceren van mitochondriële ATP. Ophoping van de A3243G mutatie kan dus leiden tot energie stress en daarmee tot disfunctie van cellen en organen. Om de klinische heterogeniteit te verklaren is er voorgesteld dat weefsel- en cel specifieke effecten, in combinatie met de werking van het kern genoom, verscheidenheid in ophoping van de A3243G mtDNA mutatie kunnen veroorzaken. Daarnaast wordt er gedacht dat signalen van niet goed functionerende mitochondriën naar de kern (de retrograde respons) aan de verscheidenheid van klinische fenotypen ten grondslag liggen. De mechanismen en relatieve bijdragen van deze elkaar niet uitsluitende processen zijn onduidelijk. Dit proefschrift probeert bij te dragen aan een beter begrip van deze processen door het bestuderen van enerzijds segregatie-mechanismen die mutatieophoping veroorzaken en anderzijds de expressie veranderingen van kerngenen en cellulaire processen die optreden ten gevolge van A3243G mtDNA mutatie. Hiervoor is er gebruik gemaakt van cybride cellen: cellen waarin het originele mtDNA is vervangen door homoplastisch dan wel heteroplastisch mtDNA van dragers van de A3243G mtDNA mutatie.

Het is de laatste jaren duidelijk geworden dat mtDNAs niet als losse moleculen in de cel voorkomen, maar dat ze georganiseerd zijn als groepjes in eiwit-DNA structuren die nucleoiden genoemd worden. Of en hoe deze nucleoiden zelf heteroplastisch zijn en hoe ze bijdragen aan mtDNA segregatie is echter onduidelijk. Enkele studies rapporteren, door analyses van het gemiddelde mutatieniveau, stabiele heteroplasmie tijdens het langdurig en niet-selectief kweken van A3243G cybride klonen, maar onder deze omstandigheden zijn er ook veranderingen in heteroplasmie niveau richting zowel wild type als mutant gevonden. Door middel van analyse van de mutatiegraad in individuele cellen op een tijdstip dat er volgens een segregatie mechanisme op basis van willekeur homoplastische cellen aanwezig zouden moeten zijn (het principe van genetische fixatie), is er in slechts één studie gevonden dat de cellen hun mtDNA niet segregeren, maar de originele mutatiegraad behouden. Dit heeft geleid tot het concept van een segregatie-eenheid met meerdere mtDNAs, het nucleoid, dat zelf heteroplastisch is en de wildtype/mutant sequentie tijdens replicatie exact behoudt. Om veranderingen in heteroplasmie te verklaren is er gespeculeerd dat het betrouwbaar replicerende nucleoid bij tijd en wijle de wild type/mutant ratio kan veranderen, mogelijk onder invloed van een genetisch programma.

Waarschijnlijk ten gevolge van gebrek aan individuele cel mutatiegraad metingen op grote schaal, is de experimentele bewijsvoering voor meta-stabiele nucleoiden als basis voor segregatie in veranderende A3243G klonen echter nog niet geleverd.

Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van twee methoden om de A3243G mutatiegraad te bepalen in individuele cellen op een relatief grote schaal. Op hybridisatie gebaseerde methoden moeten in dit geval werken met een lastige A naar G transitie. De AT binding van het wildtype/wildtype hybride is namelijk energetisch vergelijkbaar met de GT binding van het mutant/wildtype hybride, en daarnaast is de mutatie gelokaliseerd in een GC-rijke omgeving die ook nog eens makkelijk een secundaire structuur vormt. Vanwege deze beperkingen zijn op Taqman of Molecular Beacons gebaseerde PCR benaderingen niet haalbaar gebleken. Twee alternatieven zijn echter met succes ontwikkeld in hoofdstuk 2. Een methode is gebaseerd op PCR-RFLP van het mtDNA van individueel gesorteerde cellen. Hierbij wordt voor de kwantificering in plaats van de gebruikelijke gel-analyse gebruik gemaakt van de smelt-eigenschappen van de restrictie fragmenten. De andere methode is een twee-kleurige *in situ* genotypering, waarbij zogenaamde padlock probes in combinatie met rolling circle amplification worden gebruikt voor detectie van de genotypen. De genotypen worden als rode en groene stippen zichtbaar en door middel van beeldanalyse gekwantificeerd. Beide methoden voldoen goed in termen van snelheid en nauwkeurigheid.

In hoofdstuk 3 (en 6) zijn de methoden, toegepast bij A3243G cybride klonen die onder neutrale condities in continue kweek zijn gebracht. Metingen op individueel celniveau van klonen, die in gemiddelde mutatiegraad veranderden (een richting wild type en een richting mutant) laten discrete veranderingen zien in cellulaire heteroplasmie. Dit feit kan niet eenvoudig worden verklaard met een random segregatie mechanisme, zelfs niet in combinatie met mtDNA replicatie voordeel en cellulaire selectie. Zoals getoond in figuur 3 van hoofdstuk 3, kan het voorkomen van cellen met een veranderende mutatiegraad verklaard worden met het genoemde meta-stabiele nucleoid model.

Dit model voorspelt dat heteroplastische klonen gedurende langere tijd segregatie kunnen vermijden. Onderbouwing van dit stabiele element van het model is verkregen met de analyse van vier extra klonen, waarbij de experimenteel gegenereerde histogrammen voor mutatiegraad vergeleken zijn met computer gesimuleerde histogrammen uitgaande van een random segregatie model. De individuele cellen in deze vier klonen behielden de originele mutatiegraad veel langer dan verwacht op basis van random segregatie, wat duidt op significante genetische stabiliteit van het nucleoid als heteroplastische segregatie-eenheid. Deze experimentele resultaten geven voor het eerst aan hoe nucleoiden heteroplasmie accommoderen en segregatie kunnen beïnvloeden.

Het nucleaire expressie patroon is een resultaat van vele factoren, waarvan de energie-behoefte van de cel er een is. Of en hoe de A3243G mutatie, bij zo'n hoge heteroplasmie dat het energie metabolisme is aangedaan, het nucleair expressie patroon veranderd, is onderzocht in het cybride systeem waarbij de mtDNA sequentie in principe de enige variabele is. Gebruik makend van een DNA chip waarmee 22.283 gen transcripten tegelijkertijd geanalyseerd kunnen worden, is in hoofdstukken 4 en 5 het genexpressie profiel van heteroplastische en homoplastische A3243G cybriden in combinatie met twee verschillende mtDNA haplotypes vergeleken. Dus onafhankelijk van elkaar konden vergelijkingen gemaakt worden op basis van ademhalingscapaciteit (een maat voor oxidatieve fosforylering) en haplogroep. Tegen de verwachting in zijn er nauwelijks verschillen in RNA expressie gevonden van 1,5 keer of meer tussen wel en niet ademhalende cellen. Dit staat in tegenstelling tot de honderden verschillen die gevonden zijn in de vergelijking van de twee mitochondriële haplogroepen, wat een indicatie geeft dat het haplotype op zich het nucleaire gen expressie patroon zou kunnen beïnvloeden.

Het feit dat in het ademhalingsvergelijk nauwelijks verschillen zijn gevonden geeft aan dat, in het cybride systeem, aanpassingen aan het nucleaire expressie profiel ten gevolge van het verlies aan mitochondriële ATP productie te klein waren om door onze analyse te worden geïdentificeerd of dat deze cellen zich post-transcriptioneel hebben aangepast. Algemene translatie remming blijkt inderdaad een belangrijke energie-besparende pathway. Deze remming wordt beïnvloed door fosforylering van Elongation factor 2 (eEF-2) en initiation factor 2 α (eIF-2 α). Upstream van eEF2 bevindt zich eEF2-kinase welke geactiveerd wordt door het AMPK-geactiveerd kinase (AMPK), de energie-sensor van de cel. Fosforylering van eIF-2 α duidt op betrokkenheid van het endoplasmatisch reticulum kinase PERK en identificeert interactie tussen het ER en mitochondriën onafhankelijk van AMPK als energie stress sensor.

Concluderend, waarschijnlijk door kleine veranderingen in gen expressie niveau's zijn er geen moleculaire processen gevonden die betrokken zijn bij de reactie op verlies van mitochondriële ATP productie door de A3243G mtDNA mutatie. Wel is een duidelijke post-transcriptionele aanpassing in de vorm van algemene translatie remming vastgesteld. Vergelijking van twee mtDNA haplogroepen wijst er verder op dat neutraal veronderstelde mtDNA sequentie varianten een effect op het nucleaire expressie profiel hebben, wat gevolg zou kunnen hebben op expressie van fenotype. Tenslotte, gebruik makend van zelf ontwikkelde individuele mutatiegraad bepalingen is er een nieuw mechanisme voor mtDNA segregatie gepostuleerd, waarbij het meerdere mtDNAs bevattende nucleoid een centrale rol inneemt.

Samenvatting voor de leek

Dat elke menselijke cel een kern heeft met daarin erfelijke informatie van de vader en de moeder opgeslagen in het DNA, weet tegenwoordig bijna iedereen. Dat er daarnaast nog een aantal andere organellen of onderdelen in de cel aanwezig zijn, waaronder de mitochondriën, is ook iets wat op de middelbare school geleerd wordt. Mitochondriën zijn de energiecentrales van de cel. Dat deze hun eigen DNA hebben is minder bekend en hoe dat DNA georganiseerd is en aan dochtercellen wordt overgedragen, is iets waar wetenschappers nog onderzoek naar doen.

Elke cel bevat meerdere kopieën mitochondriëel DNA (mtDNA) wat alleen geërfd wordt van moederskant. Omdat er meerdere kopieën in de cellen aanwezig zijn kan het gebeuren dat sommige mtDNA moleculen een mutatie bevatten en andere niet. Dit is een situatie die wordt aangeduid als heteroplasmie, in tegenstelling tot de uniforme homoplastische situatie. Mutaties op mtDNA kunnen tot een breed scala aan ziekten leiden en het meest opmerkelijke is wel dat bijvoorbeeld de mutatie op locatie 3243 voornamelijk tot diabetes leidt maar ook tot ziekten van de zenuwen en de spieren, van de nieren en van het oog. Er zijn meerdere hypothesen over hoe een enkele mutatie tot verschillende ziektebeelden kan leiden en twee worden toegelicht in dit proefschrift. De ene variant gaat ervan uit dat door verschillen die ontstaan tijdens de celdeling, bij het verdelen van het mtDNA over de dochtercellen, het algemene energiedefect tot uiting komt in een specifiek orgaan. De andere variant gaat uit van specifieke signaalroutes die ervoor zorgen dat in de ene cel, bijvoorbeeld een insulineproducerende cel in de alvleesklier, effect optreedt en in andere cellen niet.

Voor de eerste variant is het van belang om te weten hoe de verdeling van het mtDNA over de dochtercellen is georganiseerd. Voor alsnog werd ervan uitgegaan dat de mtDNA moleculen los in de cel liggen en dat de verdeling een willekeurige kansverdeling volgt. In hoofdstuk 2 en 3 wordt beschreven dat dit een erg onwaarschijnlijk model is en dat de mtDNA moleculen voornamelijk voorkomen in clusters die ook tijdens de celdeling blijven bestaan. In hoofdstuk 4 en 5 wordt de tweede variant bekeken door middel van een techniek die de invloed van mitochondriëel DNA op de werking van het kern DNA aan het licht brengt. Het lijkt erop dat als er op dit niveau een effect is dit te ingewikkeld is om een signaalroute te definiëren. Wel blijkt er op een ander niveau duidelijk effect te zijn, namelijk in de route voor het maken van eiwitten. Aangezien heel veel taken van de cel door eiwitten worden uitgevoerd is hiermee een aangrijpingspunt bloot gelegd voor het verklaren van ziekten veroorzaakt door mtDNA mutatie.

