

Resolving the role of genetic defects and mtDNA copy number in mitochondrial disease and development

Citation for published version (APA):

Kamps, R. (2020). *Resolving the role of genetic defects and mtDNA copy number in mitochondrial disease and development*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20201120rk>

Document status and date:

Published: 01/01/2020

DOI:

[10.26481/dis.20201120rk](https://doi.org/10.26481/dis.20201120rk)

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 diseases result from a reduced energy production capacity in the mitochondria due to deficiencies in oxidative phosphorylation (OXPHOS). They are characterized by clinically highly heterogeneous and tissue-specific manifestations, typically involving tissues and organs with high energy requirements, like brain, heart and muscle. As the OXPHOS system is under dual genetic control, mutations in both the mitochondrial DNA and nuclear DNA can lead to a mitochondrial disease (**Chapter 1**). Mainly as a consequence of the large genetic heterogeneity (possibly more than 1500 genes involved) and clinical variability, for the majority of patients a genetic cause was unknown or not feasible at the start of the project. So, the **first aim** of the work described in this thesis was to identify and functionally characterize the underlying genetic cause in either the mtDNA or in nuclear genes in patients with OXPHOS disease. Based on a genetic diagnosis, counselling can be offered to the family and prenatal or preimplantation diagnosis to prevent the transmission of the mitochondrial disorder to further offspring. In case of an mtDNA disease this is less straightforward than for nuclear gene defects, as a mitochondrial bottleneck occurs during oogenesis, defining the mutation load and disease risk in the offspring. Although crucial for understanding the role of mitochondria in oogenesis, embryogenesis and the transmission of mtDNA disease, the mitochondrial bottleneck is still poorly understood, also because of the lack of appropriate animal models. The **second aim** our work was to develop an animal model for studying and manipulating the mitochondrial bottleneck.

In **Chapter 2** we described the use of next-generation sequencing (NGS) technology and discussed the impact it has on identifying pathogenic variants causing genetic disease, or on identifying genetic risk factors. The potential and limitations of different technologies and diagnostic approaches (i.e. targeted NGS, whole-exome sequencing (WES), RNA-Seq and whole genome sequencing (WGS)) are discussed. NGS technology expanded rapidly in the last decades with significant improvements in reliability, sequencing chemistry, pipeline analyses, data interpretation and costs. Such advances made the use of NGS the preferred choice today not only in clinical genetics practice.

A number of clinical applications of NGS have been addressed, like detection of the causative mutation in inherited cancer syndromes by DNA-sequencing and of splice variants by RNA-sequencing. Applications for pre-implantation genetic diagnosis, cancer somatic mutation analysis, pharmacogenetics, using blood DNA or liquid biopsy were discussed. Clinical limitations and ethical considerations related to the use of NGS for these applications are mentioned. Although this chapter reviews more general clinical application of NGS, it is evident that the topics addressed are relevant for the neurological and mitochondrial diseases, which are the prime topic of this thesis.

NGS is successfully used to determine the primary underlying genetic defect in clinically highly heterogeneous inherited mitochondrial diseases which has facilitated a rapid introduction in diagnostics and clinical care of these and other diseases, as described in **Chapter 2**. WES as first strategy includes all variants in the coding part of the genome, allowing also the identification of risk factors, which can increase the risk for a disease by themselves or in combination with a primary genetic defect or with other risk factors. It is likely that genetic risk factors are involved in mitochondrial disease, illustrated by the highly variable manifestation of the m.3243A>G mutation or the male preponderance in LHON. Also, in a substantial part of the patients with mitochondrial diseases, no primary genetic cause has been identified, which means that it is either missed by WES or that the disease is not caused by a single primary genetic defect. A combination of multiple genetic risk factors, defined by a polygenic risk score could provide an alternative explanation, as has been demonstrated for example in the cancer field. These polygenic scores have been calculated by summing-up genetic risks associated with known SNPs in GWAS data. In **Chapter 3** we describe as a proof of concept the identification and contribution of genetic risk factors in candidate genes to the severity of clinical manifestation in Lynch syndrome. A similar approach could be applied to identify genetic factors explaining the clinical heterogeneity of in mtDNA or nuclear mitochondrial genes.

In **Chapter 3** we used targeted NGS to detect co-occurring rare variants as possible genetic modifiers in Lynch syndrome by analysing a panel of candidate genes in 35 Lynch syndrome mutation carriers with a poor clinical phenotype. The

gene panel consisted of 154 genes involved in endometrial physiology and carcinogenesis. Data analysis was done by using a simple pipeline, in which variants were selected based on an allele frequency lower than 0.001 and on predicted non-conservative amino-acid substitutions. A total of 54 variants (categories 3 = VUS, or 4 = likely pathogenic, or 5 = pathogenic) were considered as putative risk modifiers. Risk prediction based on these variants was difficult to validate, but we proposed potential risk-variants and the predicted protein change for 6 functional known genes (*RET*; p.(Asn361Lys), *CYP1A1*; p.(Cys457*), *IGF1R*;p.(Thr758Met), *NCOR2*;p.(Ser1964Cys), *COMT*; p.(Lys159del), *mTOR*; p.(Met1313Leu). Logistic regression analysis, including two or more risk modifying variants in women carrying a primary pathogenic mutation, was associated with a poor clinical phenotype. A similar strategy could be performed to characterize genetic modifiers in mitochondrial disease. Further, *in silico* modeling, and *in vitro*, and *in vivo* studies will be needed to explore the impact of these variants on protein function and cellular OXPHOS processes. The role of genetic modifiers in mitochondrial disease patients will be relevant to explain the group without a genetic diagnosis or as a contributing factor in heterogeneous disease manifestation and could elucidate potential treatment options in future.

A search for genetic modifiers, will complement the search for primary genetic causes in families with mitochondrial diseases, as described in **Chapter 4** and **5**. The diagnosis was based on clinical symptoms, including MRI and deficiencies in OXPHOS complexes in muscle or fibroblasts of patients. Evidence for the pathogenicity of novel variants and novel genes was provided by complementation assays. Leigh syndrome (**Chapter 4**) is an early onset, often fatal progressive neurodegenerative disorder caused by mutations in the mitochondrial or nuclear DNA. Until now, mutations in more than 60 genes had been reported to cause Leigh syndrome, indicating an extreme genetic heterogeneity for this disorder, but still only explaining part of the cases. WES was combined with homozygosity mapping as an additional filtering step to identify the underlying genetic defect in a Moroccan family with fatal Leigh syndrome in early childhood and specific MRI abnormalities in the brain. We detected a homozygous nonsense mutation (c.20C>A; p.Ser7Ter) in the thiamine transporter *SLC19A3*. *In vivo* overexpression of wild-type *SLC19A3* showed an increased thiamine uptake,

whereas overexpression of mutant *SLC19A3* did not, confirming that the mutations resulted in an absent or non-functional transporter. Seventeen additional patients with LS were screened for mutations in *SLC19A3* using conventional Sanger sequencing. Two unrelated patients both Moroccan origin and one from consanguineous parents were homozygous for the same p.Ser7Ter mutation. One of these patients showed the same MRI abnormalities as the patients from the first family. Strikingly, patients who received thiamine had an improved life-expectancy. One patient in the third family deteriorated upon interruption of the thiamine treatment and recovered after reinitiating. Although unrelated, all patients came from the province Al Hoceima in Northern Morocco. Based on the recombination events the foundermutation was estimated to have occurred 1250-1750 years ago. Our data showed that the *SLC19A3* gene is a new candidate for mutation screening in patients with Leigh syndrome, who might benefit from high doses of thiamine. Especially Moroccan Leigh patients should be tested for the c.20C>A founder mutation in *SLC19A3*.

In **Chapter 5**, we describe the application of whole-exome sequencing in three patients with paediatric cardiomyopathy and early-onset brain disease with OXPHOS deficiencies. The brain pathology was studied by MRI analysis. In consanguineous patient 1 we identified a homozygous intronic variant (c.850-3A>G) in the *QRSL1* gene, which was predicted to cause abnormal splicing. The variant segregated with the disease and affected the protein function, which was confirmed by complementation studies, restoring OXPHOS function only with wild-type *QRSL1*. Patient 2 was compound heterozygous for two novel disease causing variants (c.[253G>A]; [938G>A]) in the *MTO1* gene. In patient 3 we detected one unknown disease-causing variant (c.2872C>T) and one known disease-causing variant (c.1774C>T) in the *AARS2* gene. The c.1774C>T variant was present in the paternal copy of the *AARS2* gene, the c.2872C>T in the maternal copy. All genes were involved in translation of mtDNA-encoded proteins. Defects in mtDNA-encoded protein translation lead to severe paediatric cardiomyopathy and brain disease with OXPHOS abnormalities. This suggests that the heart and brain are particularly sensitive to defects in mitochondrial protein synthesis during late embryonic or early postnatal development, probably due to the massive

mitochondrial biogenesis occurring at that stage. If both the heart and brain are involved, the prognosis is poor with a likely fatal outcome at young age.

In the families, described in **Chapter 4** and **5**, but also in many others, as mentioned in **Chapter 2**, we demonstrated the importance of NGS and WES in genetic testing for mitochondrial disease, increasing the diagnostic yield from 25% to 69% and a turn-around time from years to months. Furthermore, we identified in 30% of the cases defects in novel genes, indicating that unbiased Whole Exome Sequencing combined with RNA-Seq is still superior to panel-based approaches in mitochondrial diseases.

Our **second aim** was to develop an animal model for studying and manipulating the mitochondrial bottleneck. We have shown before that zebrafish is an excellent model, as both timing and size of the bottleneck are highly conserved from fish to man. Zebrafish provide sufficient numbers of offspring and are easy to manipulate. Both the embryonic development and oogenesis can be studied in full detail. To understand the pathology and mechanisms associated with low mtDNA copy numbers, we manipulated the mtDNA bottleneck by knocking down *Tfam*, a key regulator of mtDNA replication, during early zebrafish development in **Chapter 6**. Reduction of *Tfam* using a splice-MO, resulted in a $42\% \pm 17\%$ decrease in the mtDNA copy number in zebrafish embryos at 4 days post fertilization (dpf). Morphant embryos displayed abnormal development of the eye, brain, heart and muscle, as well as a $50\% \pm 22\%$ decrease in ATP production. Transcriptome analysis revealed a decrease in protein-encoding transcripts from the heavy strand of the mtDNA, and down-regulation of genes involved in haem production and the metabolism of metabolites, which appear to trigger increased rRNA and tRNA synthesis in the nucleoli. However, this stress or compensatory response appears to fall short as pathology emerges and expression of genes related to eye development are severely down-regulated. Taken together, this study highlights the importance of sufficient mtDNA copies for early zebrafish development. Zebrafish is an excellent model to manipulate the mtDNA bottleneck and study its effect on embryogenesis rapidly and in large numbers of offspring.

In **Chapter 7**, we discussed the impact of NGS not only the diagnosis of mitochondrial disease, but also for personalized medicine in general. It is beyond any doubt, that WGS in combination with RNA-Seq will bring the paradigm shift started by WES to the diagnostic next level. There will be limited need to narrow down the differential clinical diagnosis to request sequencing of a specific gene or sets of genes, as all genetic information will be available at once from start. The results of this genetic analysis will directly guide the diagnostic patient evaluation, moving towards personalized patient care and treatment in mitochondrial diseases. Complete analysis of both the mtDNA and exome generated a diagnostic yield of 69%, obtained in months, which by far exceeds the 25% yield using conventional, targeted sequencing. As indicated before, this means there is still an era for improvement in unravelling the genetic cause of the undiagnosed cases using WGS, RNA-Seq or polygenic risk scores in these unsolved mitochondrial patients.

Furthermore, as we succeeded in the development of the first tuneable zebrafish model to study the mtDNA bottleneck in embryogenesis, we discuss on the impact this will have on characterizing and manipulating the mitochondrial bottleneck and the processes triggered by a reduced mtDNA copy number in zebrafish embryos in further detail. If we will be able to generate mtDNA mutations in those zebrafish, then this will become an excellent model for testing the current three different mitochondrial bottleneck theories, for identifying possible selection mechanisms and for risk assessment of mtDNA disease transmission.

Nederlandse samenvatting

Mitochondriële ziekten zijn het gevolg van een verminderde energiecapaciteit in de mitochondriën als gevolg van deficiënties in oxidatieve fosforylering (OXPHOS). Ze worden gekenmerkt door klinisch zeer heterogene en weefselspecifieke symptomen, die meestal weefsels en organen met hoge energiebehoeften, zoals hersenen, hart en spieren, raken. Aangezien het OXPHOS-systeem onder dubbele genetische controle staat, kunnen mutaties in zowel het mitochondriële DNA als het nucleaire DNA leiden tot een mitochondriële ziekte (**hoofdstuk 1**). Voornamelijk door de grote genetische heterogeniteit (mogelijk meer dan 1500 betrokken genen) en klinische variabiliteit, was bij de meerderheid van de patiënten een genetische oorzaak onbekend bij het begin van mijn onderzoek. Het **eerste doel** van het in dit proefschrift beschreven werk was dan ook het identificeren en functioneel karakteriseren van de onderliggende genetische oorzaak in het mtDNA of in nucleaire genen bij patiënten met OXPHOS-aandoeningen. Op basis van een genetische diagnose kan counseling worden aangeboden aan de familie en prenatale of pre-implantatie-diagnostiek om de overdracht van de mitochondriële aandoening naar nakomelingen te voorkomen. In het geval van een mtDNA ziekte is dit minder eenvoudig dan bij nucleaire gendefecten, aangezien er tijdens de oögenese een mitochondriële bottleneck optreedt, die het mutatiepercentage en het ziekterisico bij de nakomelingen vaak onvoorspelbaar maakt. Hoewel cruciaal voor het begrijpen van de rol van mitochondriën bij oögenese, embryogenese en de overdracht van mtDNA ziektes, is het mechanisme van de mitochondriële bottleneck grotendeels onbekend, ook omdat geschikte diermodellen ontbreken. Het **tweede doel** van ons werk was dan ook het ontwikkelen van een diermodel voor het bestuderen en manipuleren van de mitochondriële bottleneck.

In **hoofdstuk 2** wordt next generatie sequencing (NGS) technologie beschreven en de impact, die NGS heeft op het identificeren van pathogene varianten die genetische ziekten veroorzaken of van genetische risicofactoren. De mogelijkheden en beperkingen van verschillende technologieën en diagnostische benaderingen (d.w.z. gerichte NGS, sequentiebepaling van het gehele exoom (Whole Exome Sequencing - WES), RNA-Seq en sequentiebepaling van het gehele genoom (WGS)) worden besproken. Het gebruik van NGS-technologie in de genetische diagnostiek is de afgelopen decennia enorm toegenomen, mede

dankzij aanzienlijke verbeteringen in betrouwbaarheid, sequencing-chemie, analyse-pijplijnen, data-interpretatie en kosten. Dit maakt NGS de methode, die bij voorkeur wordt gebruikt niet alleen binnen de klinische genetica, maar ook daarbuiten.

Een aantal klinische toepassingen van NGS wordt besproken, zoals de detectie van de oorzakelijke mutaties in erfelijke kankersyndromen door DNA sequencing en van splice-varianten door RNA sequencing. Toepassingen in het kader van pre-implantatie genetische diagnostiek, somatische mutatieanalyse bij kanker, farmacogenetica, op basis van DNA uit bloed of liquid biopsies worden beschreven. Klinische beperkingen en ethische overwegingen met betrekking tot het gebruik van NGS voor deze toepassingen worden bediscussieerd. Hoewel dit hoofdstuk een meer algemene klinische toepassing van NGS behandelt, is het duidelijk dat NGS zeer relevant is voor de neurologische en mitochondriële ziekten, die het belangrijkste onderwerp van dit proefschrift zijn.

NGS is met succes gebruikt om het primaire onderliggende genetische defect bij de klinisch en genetisch zeer heterogene erfelijke mitochondriële ziekten te bepalen, wat een snelle introductie in de diagnostiek en klinische zorg voor deze ziekten heeft vergemakkelijkt (**hoofdstuk 2**). WES als eerste onderzoek, identificeert alle varianten in het coderende deel van het genoom, waardoor ook risicofactoren kunnen worden geïdentificeerd, die het risico op een ziekte alleen of in combinatie met een primair genetisch defect of andere risicofactoren kunnen verhogen. Het is waarschijnlijk dat genetische risicofactoren betrokken zijn bij mitochondriële ziektes, wat blijkt uit de zeer variabele manifestatie van bijv. de m.3243A>G-mutatie of het grotere percentage mannelijke patiënten met Leber erfelijke optische neuropathie (LHON). Nog steeds wordt bij een substantieel deel van de patiënten met mitochondriële ziekten geen primaire genetische oorzaak geïdentificeerd, wat betekent dat het ofwel wordt gemist door WES of dat de ziekte niet wordt veroorzaakt door een enkel primair genetisch defect. Een combinatie van meerdere genetische risicofactoren, gedefinieerd door een polygene risicoscore, zou een alternatieve verklaring kunnen zijn, zoals bijvoorbeeld is aangetoond op het gebied van kanker. Deze polygene scores worden berekend op basis van de genetische risico's van bekende met de ziekte gebaseerde SNP's uit GWAS-gegevens. In **hoofdstuk 3** beschrijven we als proof-of-concept de

identificatie en bijdrage van genetische risicofactoren in kandidaatgenen aan de ernst van klinische manifestatie bij het Lynch syndroom. Een vergelijkbare benadering zou kunnen worden toegepast om genetische factoren te identificeren die de heterogene klinische manifestatie van defecten in het mtDNA of nucleaire mitochondriële genen kunnen verklaren.

In **hoofdstuk 3** gebruikten we gerichte NGS om zeldzame varianten te detecteren als mogelijke genetische modifiers in het Lynch syndroom door een panel van kandidaat-genen te analyseren in 35 Lynch syndroom mutatie dragers met een slecht klinisch beeld. Het genenpaneel bestond uit 154 genen die betrokken zijn bij de endometrium-fysiologie en carcinogenese. Data-analyse werd uitgevoerd met behulp van een pipeline, waarin varianten werden geselecteerd met een allelfrequentie lager dan 0,001 die tot niet-conservatieve aminozuursubstituties leiden. In totaal werden 54 varianten (categorieën 3 = VUS of 4 = waarschijnlijk pathogeen of 5 = pathogeen) beschouwd als risico-modifiers. Risicovoorspelling op basis van deze varianten is moeilijk te valideren, maar we voorspelden potentiële risicovarianten en functionele eiwitveranderingen voor 6 bekende genen (*RET*; p.(Asn361Lys), *CYP11A1*; p.(Cys457 *), *IGF1R*; p.(Thr758Met), *NCOR2*; p.(Ser1964Cys), *COMT*; p.(Lys159del), *mTOR*; p.(Met1313Leu). Logistische regressie-analyse op basis van twee of meer risico-modificerende varianten bij vrouwen met een primaire pathogene mutatie was geassocieerd met een slecht klinisch fenotype. Een vergelijkbare benadering zou kunnen worden toegepast om genetische modifiers in mitochondriële ziekten te karakteriseren. Verder zullen in silico-modellering en in-vitro en in-vivo studies nodig zijn om de impact van deze varianten op de eiwitfunctie en cellulaire OXPHOS-processen te onderzoeken. De rol van genetische modifiers bij patiënten met mitochondriële ziekten zal relevant zijn binnen de groep zonder een genetische diagnose of als een risicofactor in de ernst van de ziektemanifestatie en zou tot mogelijk nieuwe behandelingsopties in de toekomst kunnen leiden.

Een zoektocht naar genetische modifiers zal de zoektocht naar primaire genetische oorzaken in families met mitochondriële ziekten aanvullen, zoals beschreven in **hoofdstuk 4** en **5**. De diagnose in deze families was gebaseerd op klinische symptomen, waaronder MRI en deficiënties in de OXPHOS-complexen in spieren of fibroblasten van patiënten. Bewijs voor de pathogeniciteit van nieuwe

varianten en nieuwe genen werd geleverd door complementatie-testen. Leigh syndroom (**hoofdstuk 4**) is een vroege, maar vaak een fatale, progressieve neurodegeneratieve aandoening, die wordt veroorzaakt door mutaties in het mitochondriële of nucleaire DNA. Tot nu toe zijn er mutaties in meer dan 60 genen gerapporteerd, die Leigh syndroom veroorzaken, wat wijst op een extreme genetische heterogeniteit voor deze aandoening, maar die nog steeds slechts een deel van de gevallen verklaren. WES is gecombineerd met homozygositeitsbepaling als een extra filterstap om het onderliggende genetische defect te identificeren bij een Marokkaanse familie met fataal Leigh syndroom op vroege kinderleeftijd en specifieke MRI-afwijkingen in de hersenen. We ontdekten een homozygote nonsense mutatie (c.20C>A; p.Ser7Ter) in de thiamine-transporter SLC19A3. *In vivo* over-expressie van wild-type SLC19A3 toonde een verhoogde thiamine-opname, terwijl over-expressie van mutant SLC19A3 dat niet deed, wat bevestigt dat de mutaties resulteerden in een afwezig of niet-functioneel eiwit. Zeventien andere patiënten met Leigh syndroom werden gescreend op mutaties in SLC19A3 gen met behulp van conventionele Sanger sequencing. Twee niet-verwante patiënten, beide van Marokkaanse afkomst en één ook van bloedverwante ouders, waren homozygoot voor dezelfde p.Ser7Ter mutatie. Een van deze patiënten vertoonde dezelfde MRI-afwijkingen als de patiënten uit de eerste familie. Opvallend was dat de patiënten die thiamine kregen een verbeterde levensverwachting hadden. Eén patiënt uit de derde familie verslechterde na onderbreking van de thiamine behandeling en herstelde na herstart. Hoewel niet verwant, kwamen alle patiënten uit de provincie Al Hoceima in Noord-Marokko. Op basis van genetisch markeronderzoek werd geschat dat de mutatie 1250-1750 jaar geleden is ontstaan. Onze resultaten toonden aan dat het SLC19A3 gen een nieuw kandidaatgen is voor mutatie-screening bij patiënten met Leigh syndroom, die baat zouden kunnen hebben bij hoge doses thiamine. Vooral Marokkaanse Leigh patiënten moeten worden getest op de c.20C>A foundermutatie in SLC19A3.

In **hoofdstuk 5** beschrijven we de toepassing van WES bij drie kinderen met cardiomyopathie en een hersenziekte met OXPHOS-deficiëntie op jonge leeftijd. De hersenpathologie werd bestudeerd door MRI-analyse. Bij consanguïne patiënt 1 identificeerden we een homozygote intron-variant (c.850-3A>G) in het QRSL1

gen, waarvan werd voorspeld dat het abnormale splicing zou veroorzaken. De variant segregeerde met de ziekte in de familie en had een negatief effect op de eiwitfunctie, wat werd bevestigd door complementatie-onderzoeken. De OXPHOS functie werd alleen hersteld met wild-type QRSL1 en niet met de mutant. Patiënt 2 was compound heterozygoot voor twee nieuwe ziekteverwekkende varianten (c. [253G>A]; [938G>A]) in het *MTO1* gen. Bij patiënt 3 ontdekten we een onbekende ziekteverwekkende variant (c.2872C>T) en een bekende ziekteverwekkende variant (c.1774C>T) in het *AARS2* gen. De c.1774C>T variant was aanwezig in de paternale kopie van het *AARS2* gen, de c.2872C>T in de maternale kopie. Alle genen spelen een rol bij de vertaling van mtDNA gecodeerde eiwitten. Defecten in mtDNA gecodeerde eiwitvertaling leiden tot ernstige pediatrische cardiomyopathie en hersenziekte met OXPHOS-afwijkingen. Dit suggereert dat het hart en de hersenen bijzonder gevoelig zijn voor defecten in de mitochondriële eiwitsynthese tijdens de late embryonale of vroege postnatale ontwikkeling, waarschijnlijk als gevolg van de sterke mitochondriële biogenese die in dat stadium optreedt. Als zowel het hart als de hersenen betrokken zijn, is de prognose slecht met een waarschijnlijk dodelijke afloop op jonge leeftijd.

In de families, beschreven in **hoofdstuk 4** en **5**, maar ook in vele andere, zoals vermeld in **hoofdstuk 2**, hebben we het belang aangetoond van NGS en WES bij genetische onderzoek bij mitochondriële ziekten, waardoor de diagnostische opbrengst van 25% naar 69% is gestegen en de doorlooptijd van jaren tot maanden is gereduceerd. Bovendien identificeerden we in 30% van de gevallen defecten in nieuwe genen, wat aangeeft dat WES in combinatie met RNA-Seq nog steeds superieur is aan op genpanels gebaseerde benaderingen bij mitochondriële ziekten.

Ons **tweede doel** was het ontwikkelen van een diermodel voor het bestuderen en manipuleren van de mitochondriële bottleneck. We hebben al eerder laten zien dat zebravis een uitstekend model is, omdat zowel de timing als de grootte van de bottleneck van vis tot mens zeer goed geconserveerd is. Zebravissen hebben grote aantallen nakomelingen en zijn gemakkelijk genetisch te manipuleren. Zowel de embryonale ontwikkeling als de oögenese kunnen tot in detail worden bestudeerd. Om de pathologie en mechanismen bij lage mtDNA kopie-aantallen te begrijpen, hebben we in **hoofdstuk 6** de mtDNA bottleneck gemanipuleerd

door de expressie van *Tfam*, een belangrijke regulator van mtDNA replicatie, tijdens de vroege ontwikkeling van zebrovissen te verlagen. Reductie van *Tfam* expressie met behulp van een splice-morpholino resulteerde in een afname van $42\% \pm 17\%$ van het mtDNA kopie-aantal in zebroviseembryo's op 4 dagen na bevruchting (4 dpf). Aangedane embryo's vertoonden een abnormale ontwikkeling van het oog, de hersenen, het hart en de spieren, evenals een afname van de ATP-productie met $50\% \pm 22\%$. Transcriptoom-analyse toonde een afname van eiwit-coderende transcripten van de heavy strand van het mtDNA, en een lagere expressie van genen die betrokken zijn bij de haem-productie en bij het metabolisme van metabolieten, gericht op het verhogen van rRNA- en tRNA-synthese in de nucleoli. Deze stress of compenserende respons lijkt echter tekort te schieten als pathologie zich manifesteert. De expressie van genen die van belang zijn bij de oogontwikkeling is ook sterk verlaagd. Deze studie toont het belang aan van voldoende mtDNA-kopieën voor de vroege ontwikkeling van zebrovissen. Zebroviss is blijkt een uitstekend model om de mtDNA bottleneck te manipuleren en het effect ervan op de embryogenese snel en bij grote aantallen nakomelingen te bestuderen.

In **hoofdstuk 7** bespreken wij de impact van NGS, niet alleen in de diagnose van mitochondriële ziekten, maar ook voor personalised medicine in het algemeen. Het staat buiten kijf dat WGS in combinatie met RNA-Seq de door WES gestarte paradigmaverschuiving naar het volgende diagnostische niveau zal brengen. De noodzaak om via uitgebreid klinisch onderzoek het genetisch onderzoek richting te geven naar een specifiek gen of sets van genen zal sterk verminderen, immers alle genetische informatie zal vanaf het begin in één keer beschikbaar zijn. De resultaten van deze genetische analyse zullen direct de diagnostische patiënt-evaluatie sturen en gepersonaliseerde patiëntenzorg en behandeling bij mitochondriële ziekten mogelijk maken. Volledige analyse van zowel het mtDNA als het exoom genereerde een diagnostische opbrengst van 69%, verkregen in maanden, wat de 25% opbrengst, die met behulp van conventionele, gerichte sequencing wordt bereikt, verre overschrijdt. Zoals eerder aangegeven, is er nog steeds verbetering mogelijk voor het ontrafelen van de genetische oorzaak van de niet-gediagnosticeerde gevallen middels WGS, RNA-Seq of polygene risicoscores bij deze onopgeloste mitochondriële patiënten.

Appendix

Aangezien we erin zijn geslaagd het eerste tuneable zebravismodel te ontwikkelen om de mtDNA bottleneck in de embryogenese te bestuderen, hebben we de impact die dit model zal hebben op het karakteriseren en manipuleren van het mitochondriële bottleneck en de processen die worden veroorzaakt door een verminderd mtDNA kopie-aantal in embryo's van zebravissen, verder bediscussieerd. Als we mtDNA mutaties in die zebravissen kunnen genereren, dan wordt dit een uitstekend model voor het testen van de huidige drie verschillende mitochondriële bottleneck-theorieën, voor het identificeren van mogelijke selectie-mechanismen en voor een betere risicobeoordeling van transmissie voor mtDNA ziekte.