

# The impact of the mitochondrial bottleneck on mtDNA disease risk and embryogenesis

## Citation for published version (APA):

Otten, A. B. C. (2016). *The impact of the mitochondrial bottleneck on mtDNA disease risk and embryogenesis*. Ipskamp. <https://doi.org/10.26481/dis.20161115ao>

## Document status and date:

Published: 01/01/2016

## DOI:

[10.26481/dis.20161115ao](https://doi.org/10.26481/dis.20161115ao)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Summary/Samenvatting

---



## Summary

Mitochondrial disorders are a group of inheritable, often fatal diseases or syndromes, which exhibit a wide variety of clinical symptoms. Mitochondrial disorders are mostly caused by an abnormality of the ATP-generating machinery, the oxidative phosphorylation (OXPHOS), and affect about 1 in 5,000 individuals. Organs with high-energy demands are more prone to OXPHOS dysfunction and brain and skeletal muscle are therefore the most severely affected tissues. Besides being clinically heterogeneous, mitochondrial disorders are also characterized by genetic heterogeneity, as similar phenotypes can be caused by mutations in different genes. In addition, the genes encoding proteins for mitochondrial function are distributed over two genomes. Part of the genes lay in the nuclear DNA, while some are part of the genetic material of the mitochondria: the mitochondrial DNA (mtDNA). The mtDNA is markedly different from its nuclear counterpart. The mtDNA is a multicopy genome and cells maintain a high mtDNA copy number. As a result, a mixture of wild-type and variant or mutant mtDNA generally co-exists, a state referred to as heteroplasmy. A mtDNA disease only manifest if the heteroplasmy level (or mutation load) exceeds a certain threshold. Also, the mode of inheritance is different from its nuclear counterpart. While the nuclear DNA has a Mendelian inheritance pattern, the mtDNA transmits exclusively from mother to child. During its maternal transmission, the mtDNA segregates through a genetic bottleneck, which is a restriction in the number of mtDNA molecules from the oocytes being transmitted to the cells of the offspring. The mechanisms underlying this mtDNA bottleneck are still unclear.

The overall aim of this thesis is to characterize the processes that underlie mtDNA segregation through the mtDNA bottleneck and to explain the *de novo* mtDNA disease risks. Specific aims are:

- to define the size of the mtDNA bottleneck during transmission;
- to investigate the risk of acquiring *de novo* mtDNA mutations during oogenesis;
- to identify the biological processes that underlie the mtDNA bottleneck and the (mutation-specific) shifts in mtDNA heteroplasmy levels between mothers and children;
- to study the effect of a low mtDNA copy number on embryogenesis.

In **chapter 2** we reviewed the evolution of mitochondria and their genomes. The existence of two different genomes can be traced back to the origin of eukaryotes, which is thought to have originated as a result of an endosymbiosis event between two prokaryotes, both possessing their own genome. During this endosymbiosis a hydrogen-dependent anaerobic archaeobacterium engulfed a respiring eubacterium, which enabled the host to generate large amounts of intracellular hydrogen-dependent adenosine triphosphate (ATP). The eubacterium became the mitochondria with their own genome, the mtDNA. The downside was an increase of reactive oxygen species (ROS) trapped inside the eukaryotic cell, resulting in high mtDNA mutation rates. According to Muller's ratchet theory, accumulation of mutations in the asexually transmitted mtDNA would occur, ultimately leading to reduced reproductive fitness and eventually extinction. However, mitochondria have persisted over the course of evolution, initially due to a rapid, extreme decrease in the mtDNA content through the process of endosymbiotic gene transfer (EGT) from the mtDNA to its nuclear counterpart. After the phylogenetic divergence of eukaryotes into animals, fungi and

plants, additional adaptations have been selected that decrease the detrimental effect of high mtDNA mutation rates, which has resulted in different DNA characteristics. Animals have compact mitochondrial genomes, with little recombination, a stable number of genes and a high mtDNA copy number, whereas plants have larger genomes with variable gene counts, a low mtDNA copy number and many recombination events. Fungal mtDNA is somewhere in between. In plants, the mtDNA mutation rate is kept low, by effective ROS defence and efficient recombination-mediated mtDNA repair. In animal mtDNA, these mechanisms are not or less-well developed and the detrimental mutagenesis events are controlled by a high mtDNA copy number in combination with a genetic bottleneck and purifying selection during transmission. Mobile animals with a high mtDNA mutation rate can survive better due to an increased capacity to adapt to more rapidly to changing environmental conditions in terms of energy production, whereas static plants do not have this need. In animals, a high mtDNA copy number and the mitochondrial genetic bottleneck are crucial for guarding the balance between positive, negative and neutral mtDNA variants, which arise as a result of the high mtDNA mutation rate. The mtDNA genetic bottleneck is highly conserved among the animal kingdom, reflecting its importance for the maintenance of a homoplasmic wild-type mtDNA genome in animals.

The mtDNA bottleneck is a restriction in the number of mtDNA molecules being transmitted from the oocyte to the offspring, thereby creating a sampling effect. Low heteroplasmic mtDNA mutations can be filtered out in this way. Currently, size, timing, variation and possible differences between germline and non-germline cells are not precisely known. In **chapter 3** we used the zebrafish model to characterize the mtDNA bottleneck mechanism in full detail. Zebrafish allow easy collection of high numbers of (immature) oocytes, primordial germ cells (PGCs) and non-germline cells throughout embryonic development. Mature zebrafish oocytes harboured, on average,  $\sim 19.0 \times 10^6$  mtDNA molecules with high variation between oocytes. During the earliest stages of embryogenesis, the mtDNA copy number is divided over the daughter cells in the absence of mtDNA replication. As a result, the mtDNA copy number decreases to  $\sim 170$  mtDNA molecules per PGC, a number similar to mammals, and to  $\sim 50$  in the non-germline cells. As the lowest mtDNA copy number occurs at a fixed developmental stage, variation in the oocyte mtDNA copy number dictates the mtDNA amount at the bottom of the bottleneck.

To test whether a low mtDNA copy number at the bottom of the bottleneck renders a group of oocytes vulnerable for *de novo* mutations reaching significant heteroplasmy levels, we performed next-generation sequencing (NGS) of the mtDNA in 103 individual oocytes from eight different zebrafish (**chapter 4**). Statistical and biological filters were applied to reliably detect variants with heteroplasmy  $\geq 1.5\%$ . Randomly scattered *de novo* mutations were detected in  $\sim 20\%$  of the oocytes. This is in line with our observation in **chapter 3** that  $\sim 20\%$  of the germ cells have a mtDNA copy number at the bottom of the bottleneck of  $\leq 73$ . Mutations arising at this point lead to detectable mutation loads. As the frequency of *de novo* mutations is close to the reported error rate of the mitochondrial replication-enzyme polymerase gamma (*POLG*), this seems to be the predominant factor. Moreover, this could also explain the high frequency of *de novo* mutations ( $\sim 25\%$ ) observed in human patients.

We further characterized the processes underlying the bottleneck in **chapter 5**, by studying the mutation load distribution of three mtDNA mutations (m.3243A>G, m.8993T>G and m.14487T>C) in oocytes, zygotes and embryos from multiple

preimplantation genetic diagnosis (PGD) cycles. Assuming neutral genetic drift, effective bottleneck sizes were calculated to range from 49-152 (m.3243A>G) to 21 (m.14487T>C) and 10 (m.8993T>G), which is in line with our observations in **chapter 3**. However, a correlation between m.3243A>G mutation load and the estimated bottleneck size, the absence of m.3243A>G mutation loads >80%, and a consistent skewed distribution for the m.8993T>G mutation suggested that non-random, selection events also take place during mtDNA inheritance. During oogenesis and early embryonic development cells completely rely on OXPHOS and an abolished OXPHOS (e.g. when m.3243A>G loads >80%) makes cells unable to pass these stages. In contrast, the residual OXPHOS-activity of cells harbouring the m.8993T>G or m.14487T>C mutation appears sufficient, even at ~100% mutation load, probably compensated by the high mitochondrial copy number. Positive selection for well-functioning mitochondria with a high mitochondrial membrane potential (MMP), as a result of the pumping of protons across the mitochondrial inner membrane during the process of OXPHOS, also occurs during this phase. The MMP is reduced for most mutations negatively affecting OXPHOS function. However, for the m.8993T>G mutation the MMP is higher than in mitochondria with wild-type mtDNA, resulting in positive selection for mitochondria with this mutation. The absence of a clear OXPHOS or MMP defect associated with the m.14487T>C mutation causes a distribution by neutral genetic drift only. mtDNA inheritance is thus defined by the interplay of genetic drift and mutation-specific selection events. This should be taken into account, when applying prevention strategies, like PGD and nuclear genome transfer (NGT), as this affects the mutation load that is considered to be safe for transferring a healthy embryo.

As described in **chapter 3**, the mtDNA copy number is extensively replicated during oogenesis to achieve a high mtDNA copy number. This is essential for reproduction, as the mtDNA copy number correlates with both the fertility and viability of oocytes and early embryos. In **chapter 6**, we investigated the effect of a reduced mtDNA copy number during early development by knocking down mitochondrial transcription factor A (*Tfam*), a key regulator of the mtDNA copy number, using morpholino oligonucleotides (MOs). Embryos with a *Tfam* knockdown displayed an embryonic developmental defect, especially of the heart and the brain. The effect was most predominant at 4 days post fertilization (dpf). These embryos had a 50-80% decrease in the mtDNA copy number compared to control-injected embryos. Using transcriptomics, we investigated the effect of *Tfam* knockdown on the expression of other genes and pathways at 4 dpf. Morphant zebrafish displayed downregulation of mtDNA-encoded proteins involved in the electron transport chain. Of the nuclear-encoded pathways, metabolic pathways as well as pathways important for proliferation during embryogenesis were downregulated, while we observed a significant upregulation of pathways involved in cell cycle and cell signalling pathways important for embryogenesis, and of the mitochondrial translation machinery. In line with the upregulation of the *Fas* pathway (stress induction of heat shock proteins), we also observed an upregulation of specific genes involved in the mitochondrial unfolded protein response, some mitochondrial matrix protease genes, as well as some key genes in apoptosis. Based on these data, we conclude that maintaining and increasing the mtDNA copy number is crucial for normal embryonic development. Low mtDNA copy number due to a *Tfam* knockdown lead to an energy deficit during embryogenesis and an imbalance between mtDNA replication, transcription and

translation, which can explain the (mitochondrial) stress response and pathology observed. The mitochondrial stress pathway described can have an important role in diseases associated with mitochondrial dysfunction.

In **chapter 7**, a general discussion is provided on the findings in this thesis. The mitochondria with their own genome were indispensable for the success of eukaryotic development and the existence of complex, multicellular organisms, such as human beings. This success had a price, which comprises mitochondrial and mtDNA-related disorders, infertility and (accelerated) ageing-related diseases. The studies described in this thesis contribute significantly to identification and understanding of the underlying mechanisms that define mitochondrial inheritance through the bottleneck, as well as its role in the occurrence of *de novo* mtDNA mutations. This is of key importance to identify the risk of women having children with mtDNA disease, as well as to counsel and treat these patients. Furthermore, understanding of the evolutionary mechanisms helps to increase the safety of innovative (reproductive) treatments, such as nuclear genome transfer as well as options to treat mtDNA-related female infertility.

The zebrafish provides an excellent model to increase our knowledge on mtDNA genetics, as it combines invertebrate genetic engineering advantages with vertebrate physiology in a high number of samples. As described in this thesis, the zebrafish model is useful to unravel the underlying mechanisms in the inheritance of mtDNA mutations through the bottleneck. Furthermore, the model can be well applied to study the impact of both nDNA and mtDNA mutations in the development of mitochondrial disorders. Lastly, the zebrafish is well-suited to identify and test possible therapeutic compounds to cure and ameliorate mitochondrial disorders. As “nothing in biology makes sense, except in the light of evolution”, studies, as described in this thesis, contribute to the development of better counselling and therapeutic options of mitochondrial disorders.

## Samenvatting

Mitochondriële ziekten omvatten een groep van erfelijke aandoeningen of syndromen, met vaak een dodelijke afloop. Patiënten kunnen een breed scala aan klinische symptomen ontwikkelen. Meestal ontstaan mitochondriële ziekten door een defect in de oxidatieve fosforylering (OXPHOS), de voornaamste bron van cellulaire energie (in de vorm van ATP). In totaal ontwikkelen ongeveer 1 op 5.000 mensen een mitochondriële ziekte. Organen met een hoge energiebehoefte zijn het meest vatbaar voor een defect in de OXPHOS, waardoor mitochondriële aandoeningen zich voornamelijk manifesteren in de hersenen en de skeletspieren. Naast deze klinische heterogeniteit, is ook het genetische spectrum van mitochondriële aandoeningen erg heterogeen, omdat mutaties in verschillende genen kunnen lijden tot vergelijkbare fenotypes. Bovendien liggen de genen die coderen voor eiwitten met een mitochondriële functie verspreid over twee verschillende genomen. Een deel van de genen liggen op het nucleaire DNA, terwijl de rest het erfelijk materiaal van de mitochondriën zelf grotendeels omvat: het mitochondrieel DNA (mtDNA). Het mtDNA verschilt in allerlei opzichten van zijn nucleaire tegenhanger. Het mitochondriële genoom komt voor in meerdere kopieën en cellen handhaven een hoog mtDNA kopie-aantal. Hierdoor kan een mix ontstaan van mtDNA dat wildtype is of dat varianten of mutaties bevat, een verschijnsel dat bekendstaat als heteroplasmie. Een ziekte veroorzaakt door een mtDNA mutatie manifesteert zich alleen wanneer het heteroplasmie-niveau (of mutatiepercentage) boven een bepaalde drempelwaarde uitkomt. Ook de manier van overerving verschilt van de nucleaire tegenhanger. Waar de overerving van het nucleaire DNA plaatsvindt volgens de wetten van Mendel, erft het mtDNA exclusief over van moeder op kind. Tijdens deze overerving treedt een 'bottleneckeffect' op: de lichaams- en geslachtscellen van de nakomelingen ontvangen slechts een beperkt aantal mtDNA moleculen van de moederlijke eicel. Hoe de bottleneck precies werkt, is op dit moment nog onbekend.

De algehele doelstelling van deze thesis is om de processen te karakteriseren die ten grondslag liggen aan het bottleneckeffect, alsmede om het ontstaan van nieuwe mtDNA ziektes te verklaren. Specifieke doelen zijn:

- om de grootte van het mtDNA bottleneckeffect tijdens de overerving te bepalen;
- om het risico in te schatten waarmee nieuwe mtDNA tijdens de eicelontwikkeling ontstaan;
- om de biologische processen te identificeren die ten grondslag liggen aan de (mutatie-specifieke) veranderingen in de mtDNA mutatiepercentages tussen moeders en kinderen;
- om het effect te bestuderen van een laag aantal mtDNA kopieën op de embryogenese.

**Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de evolutie van mitochondriën en het mitochondriële genoom. De verspreiding van mitochondriële genen over twee verschillende genomen is het resultaat van de manier waarop eukaryoten zijn ontstaan. De huidige hypothese is dat eukaryoten zijn ontstaan door een endosymbiose van twee prokaryoten, beide met een eigen genoom. De ene prokaryoot, een waterstofafhankelijke anaerobe archaebacterie, fungeerde hierbij als gastheer voor een ademende eubacterie, waardoor de gastheer grote hoeveelheden intracellulair



waterstof-afhankelijke adenosine trifosfaat (ATP) kon gaan produceren. De eubacterie werd uiteindelijk een mitochondrium met zijn eigen genoom, het mtDNA. Het nadeel was een toename in de productie van intracellulaire reactieve zuurstofverbindingen (ROS – *reactive oxygen species*) met een hoge mutagene activiteit, waardoor een hoge mutatiefrequentie in het mtDNA ontstaat. Volgens de *ratchet* theorie van Müller, zorgt een opeenhoping van mutaties in een asexueel overgedragen genoom, zoals het mtDNA, voor een achteruitgang in de reproductiviteit en uiteindelijk uitsterving. Dit is met het mitochondriële genoom niet gebeurd, omdat er verschillende mechanismen bestaan die de accumulatie van mutaties in het mtDNA voorkomen. Vroeg in de evolutie is een groot gedeelte van de genetische informatie vanuit het mtDNA overgebracht naar de kern (dit proces staat bekend als *EGT – endosymbiotic gene transfer*). Na de fylogenetische afsplitsing van dieren, schimmels en planten, zijn binnen deze rijken verschillende, aanvullende adaptaties geselecteerd die het schadelijke effect van de hoge mutatiefrequentie verminderden, waardoor het mtDNA van dieren, schimmels en planten andere kenmerken hebben. Het mtDNA genoom van dieren is compact, telt een vast aantal genen, komt voor in een groot aantal kopieën en ondergaat nauwelijks recombinitie, terwijl het mtDNA van planten veel groter is, met een variabel genenaantal, een laag kopie-aantal en veel recombineert. Het mtDNA van schimmels lijkt op beide. Planten houden de mutatiefrequentie laag door middel van een effectieve bescherming tegen ROS enerzijds en een goed herstel van mtDNA fouten door recombinitie anderzijds. Deze mechanismen zijn veel minder ontwikkeld in dieren, die de hoge mutatiebelasting opvangen door middel van een hoog aantal mtDNA kopieën in combinatie met het wegfilteren van mutaties door de bottleneck tijdens de overerving. Dieren hebben evolutionair gezien een hogere mutatiefrequentie van het mtDNA, wat als voordeel heeft dat zij zich beter kunnen aanpassen aan veranderingen in hun omgeving ten aanzien van mitochondriële energieproductie en daardoor kunnen migreren. Voor planten geldt dit niet. Bij dieren is het hoge aantal mtDNA kopieën en de bottleneck van cruciaal belang om de balans te bewaken tussen positieve, negatieve en neutrale mtDNA varianten. Het bottleneckeffect is sterk geconserveerd in het rijk der dieren, wat het belang van het proces voor het behoud van een gezond mtDNA genoom onderstreept.

De bottleneck kenmerkt zich door een beperking in het aantal mtDNA moleculen dat overerft vanuit de eicel naar de nakomelingen, waardoor een *sampling-effect* ontstaat. Dit filtert mtDNA mutaties met een laag mutatiepercentage uit. De grootte, timing, variatie en mogelijke verschillen tussen kiembaan -en niet-kiembaancellen zijn niet bekend. Om hier meer inzicht in te krijgen hebben we in **hoofdstuk 3** de zebravis als model gebruikt om de mtDNA bottleneck gedetailleerd in kaart te brengen. Door de zebravis te gebruiken kunnen we grote aantallen (onrijpe) eicellen, kiemcellen (PGCs – *primordial germ cells*) en niet-kiemcellen verzamelen tijdens verschillende fases van de embryonale ontwikkeling. Rijpe zebravis-eicellen bevatten gemiddeld  $\sim 19.0 \times 10^6$  kopieën van het mtDNA, met grote variatie tussen eicellen. Tijdens de vroegste stadia van de embryogenese, verdelen de mtDNA kopieën zich over de dochtercellen en repliceert het mtDNA niet. Hierdoor neemt het aantal kopieën af tot  $\sim 170$  mtDNA moleculen in een PGC, overeenkomen met wat in muizen is gevonden, en tot  $\sim 50$  mtDNA moleculen in de niet-kiemcellen. Op een vast moment in de ontwikkeling bevatten de cellen het laagste aantal mtDNA kopieën, waardoor de variatie in de eicel bepalend is voor de hoeveel mtDNA moleculen die er dat punt in de cellen aanwezig zijn.

Om uit te zoeken of het lage mtDNA kopie-aantal, dat ontstaat door de bottleneck, ervoor zorgt dat sommige eicellen meer gevoelig zijn voor het ontstaan van nieuwe (*de novo*) mutaties die een functioneel relevant heteroplasmieniveau bereiken, hebben we door middel van *next-generation sequencing* (NGS) de mtDNA sequentie bepaald in 103 eicellen afkomstig van acht verschillende zebrevissen (**hoofdstuk 4**). Door gebruik te maken van statistische en biologische filters kunnen we varianten met een heteroplasmie-niveau  $\geq 1.5\%$  betrouwbaar detecteren. Ongeveer  $\sim 20\%$  van de eicellen hadden een *de novo* mutatie, die willekeurig verspreid over het mtDNA lagen. Dit kwam overeen met onze bevindingen in **hoofdstuk 3**, waar bleek dat  $\sim 20\%$  van de kiembaancellen als laagste aantal 73 of minder mtDNA kopieën bezitten. Mutaties die op dit punt ontstaan leiden tot detecteerbare mutatieniveaus. De frequentie waarmee *de novo* mutaties ontstaan, komt overeen met de foutfrequentie van het mitochondriële replicatie-enzym *polymerase gamma* (POLG). Dit maakt het aannemelijk dat replicatiefouten de voornaamste bron van mutaties is. Bovendien geeft het ook een mogelijke verklaring voor de hoge mutatiefrequentie ( $\sim 25\%$ ) waarmee *de novo* mtDNA mutaties in de mens worden gevonden.

Op basis van de verdeling van het mutatiepercentage van drie mtDNA mutaties (m.3243A>G, m.8993T>G en m.14487T>C) in restmateriaal (oocyten, zygoten en embryo's) verkregen van verschillende humane draagsters die pre-implantatie genetische diagnostiek hebben ondergaan, hebben we in **hoofdstuk 5** de processen die ten grondslag liggen aan de bottleneck verder ontrafeld. Als we ervan uitgaan dat *random* genetische drift het effect van de bottleneck bepaalt, dan hebben de verschillende draagsters een bottleneck-grootte die varieert van 49-159 (voor de m.3243A>G mutaties) tot 21 (voor de m.14487T>C mutatie) en 10 (voor de m.8993T>G mutatie). Deze waardes komen overeen met onze waarnemingen in de zebrevissen in **hoofdstuk 3**. Drie observaties suggereren echter dat ook niet-toevalsprocessen of selectie een rol spelen tijdens de overerving van het mtDNA: een correlatie tussen de hoogte van de m.3243A>G mutatie en de grootte van de bottleneck, de afwezigheid van mutatieniveaus boven de 80% bij de m.3243A>G mutatie en de consequent scheve mutatieverdeling bij de overerving van de m.8993T>G mutatie. Tijdens de eicelvorming en de vroegste embryonale ontwikkeling zijn cellen voornamelijk afhankelijk van OXPHOS voor hun energievoorziening en een verstoorde OXPHOS (bijvoorbeeld wanneer het mutatieniveau van de m.3243A>G mutatie boven de 80% uitkomt) maakt het onmogelijk voor cellen om te overleven. De restactiviteit van de OXPHOS in cellen die de m.8993T>G of m.14487T>C mutatie dragen blijkt echter voldoende om, zelfs bij een mutatieniveau van 100%, genoeg energie te produceren, waarschijnlijk door het hoge mtDNA kopie-aantal. Tevens vindt er tijdens deze fase positieve selectie plaats voor mitochondriën met een hoog mitochondrieel membraanpotentiaal (MMP). Deze is het resultaat van het pompen van protonen over het binnenste mitochondriële membraan. De MMP is verlaagd in de aanwezigheid van de meeste mutaties die het OXPHOS-proces negatief beïnvloeden. De m.8993T>G mutatie zorgt er echter voor dat de MMP juist hoger is in vergelijking met wild-type, mutatie-vrije, mitochondriën, waardoor een positieve selectie ontstaat voor mitochondriën met deze mutatie. De m.14487T>C mutatie heeft geen duidelijk effect op zowel de OXPHOS als de MMP, waardoor alleen genetische drift de verdeling van deze mutatie bepaalt. Het samenspel van genetische drift en mutatie-specifieke selectieprocessen bepalen dus de overerving van het mtDNA. Het is van belang dit mee te nemen bij kiezen van de juiste preventiestrategie. Bij PGD

en nucleaire genoom transfer (NGT) bijvoorbeeld, is inzicht in deze processen voor de mutaties van belang om te kunnen bepalen bij welk mutatieniveau embryo's veilig kunnen worden teruggeplaatst.

Zoals beschreven in **hoofdstuk 3**, vindt er sterke mtDNA replicatie plaats tijdens de ontwikkeling van de eicel, waardoor een hoog mtDNA kopie-aantal ontstaat. Dit is van groot belang voor de reproductie, gelet op de correlatie tussen het aantal mtDNA kopieën en de fertiliteit en de levensvatbaarheid van eicellen en vroege embryo's. In **hoofdstuk 6** hebben we het effect van een verlaging van het mtDNA kopie-aantal tijdens de vroege ontwikkeling bestudeerd door het verlagen (een zogenaamde *knock down*) van de mitochondriële transcriptiefactor A (*Tfam*), één van de eiwitten die de hoogte van het mtDNA kopie-aantal bepaalt, met behulp van morpholino oligonucleotiden (MOs). Zebravis embryo's, waar *Tfam* was gereduceerd, vertoonden een defect in de embryonale ontwikkeling, voornamelijk zichtbaar in het hart en de hersenen. Dit effect was het zichtbaar 4 dagen na de bevruchting (4 dpf – *days post fertilization*). Deze embryo's hadden 50-80% minder kopieën van het mtDNA in vergelijking met controle-embryo's. Met behulp van *microarrays* onderzochten we het effect van de *Tfam* knockdown op de expressie van alle bekende genen op 4 dpf. Zebravissen met een *Tfam* knockdown hebben een verlaging in de expressie van genen die op het mtDNA liggen en coderen voor eiwitten van de OXPHOS. Van de genen die voor nucleaire eiwitten coderen, hadden zowel metabole genen, als genen belangrijk voor proliferatie tijdens embryogenese een verlaagd expressieniveau, terwijl genen met een functie in de celcyclus, in de cellulaire signaalprocessen die belangrijk zijn voor de embryonale ontwikkeling en de mitochondriële translatie juist een significante verhoogd expressieniveau hadden. In overeenstemming met de expressieverhoging van genen uit de *Fas pathway* (stress inductoren van *heat shock proteins*), vonden we ook een verhoging van specifieke genen betrokken bij de mitochondriële *unfolded protein response*, enkele mitochondriële matrix protease genen en verschillende kerngenen betrokken bij apoptose. Hieruit concluderen we dat behoud of toename van het mtDNA kopie-aantal cruciaal is voor een normale embryonale ontwikkeling. Een verlaagd mtDNA kopie-aantal door een *Tfam* knockdown leidt tot een energietekort tijdens embryogenese en een disbalans tussen mtDNA replicatie, transcriptie en translatie, die de (mitochondriële) stressreactie en geobserveerde pathologie verklaren. De beschreven mitochondriële stress respons kan een belangrijke rol hebben in ziekten die gepaard gaan met een dysfunctie van de mitochondriën.

**Hoofdstuk 7** omvat een algemene discussie over de resultaten van dit proefschrift. De mitochondriën met hun eigen genoom waren onmisbaar voor eukaryoten om zich succesvol te ontwikkelen tot complexe, meercellige organismen, zoals de mens. Dit succes had een prijs, die bestaat uit mitochondriële en aan het mtDNA-gerelateerde ziekten, infertiliteit en ouderdomsziekten. De studies zoals beschreven in dit proefschrift leveren een belangrijke bijdrage aan het begrijpen van de mechanismen die de overerving van mitochondriën via de bottleneck bepalen, evenals hun rol in het ontstaan van *de novo* mtDNA mutaties. Dit is van groot belang voor het inschatten van het risico dat vrouwen een kind met een mtDNA ziekte krijgen en het counselen en behandelen van deze patiënten. Verder zorgt een beter begrip van de evolutionaire mechanismen voor een verbetering van verschillende innovatieve therapieën, zoals NGT.

De zebravis is als model uiterst geschikt om onze kennis van het mtDNA

te vergroten, omdat het eenvoudige genetische manipulatie mogelijk maakt in een gewerveld dier. Zoals te lezen in deze thesis, is de zebravis nuttig gebleken om meer inzicht te krijgen in het bottleneckproces en kan het bovendien worden gebruikt om zowel nucleaire als mtDNA mutaties te bestuderen. Tenslotte is de zebravis ook nog geschikt om nieuwe therapeutische stoffen die mitochondriële ziektes kunnen verlichten of genezen, te identificeren en te testen. Ook de zebravisstudies beschreven in dit proefschrift dragen daarom bij aan de ontwikkeling van betere opties tot counseling en therapie van mitochondriële aandoeningen.