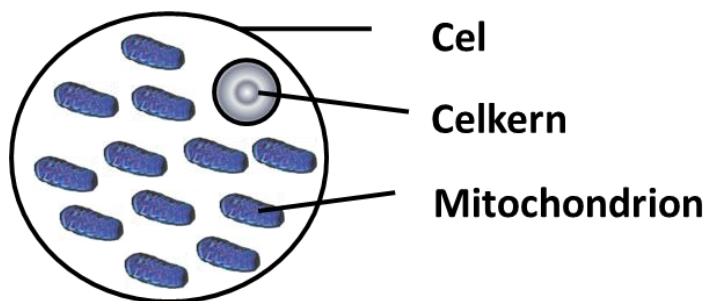


Inleiding

De titel van het proefschrift is "Preventing the transmission of mitochondrial diseases". Dat wil zeggen: het tegengaan dat mitochondriële ziekten worden doorgegeven aan het nageslacht. Mitochondriën zijn de energiefabriekjes van onze cellen. Iedere cel van ons lichaam heeft vele mitochondriën (schematisch weergegeven in figuur 1). Bij mitochondriële ziekten is er iets mis met de mitochondriën. Daardoor schiet de energie in de cellen tekort. Men zegt vaak dat mitochondriële ziekten elk symptoom, op elke leeftijd en in elk orgaan kunnen veroorzaken. De organen die de meeste energie nodig hebben, zijn het vaakst aangedaan: de spieren, ogen, hersenen, het hart, en het verteringsstelsel. Kinderen met een mitochondriële aandoening hebben over het algemeen ernstige symptomen en overlijden vaak op de baby- of kinderleeftijd. Mitochondriële ziekten komen veel voor, in Nederland worden er zo'n 1-2 kinderen per week mee geboren, en er is geen behandeling voor. Het is dan ook goed te begrijpen dat ouders die al een kind met een mitochondriële ziekte hebben gehad, willen voorkomen dat ze nog een ziek kind krijgen.

Figuur 1: schematische weergave van een cel



Onderwerp van het proefschrift

Dat is wat centraal staat in het proefschrift: hoe kan een dergelijk paar een gezond kind krijgen? Om deze vraag te beantwoorden, zijn een aantal dingen belangrijk. Ten eerste moet de oorzaak van de ziekte bekend zijn. Vervolgens gaat het erom of er goede mogelijkheden zijn om het embryo of ongeboren kind hierop te onderzoeken. Tenslotte kun je je nog afvragen of een ziek kind ook voorkomen kan worden zonder dat ouders eerst een ziek kind moeten krijgen, of de ziekte in de familie bekend moet zijn. Om te beginnen zullen de eerste twee punten besproken worden.

De genetische oorzaken van mitochondriële ziekten: fouten in het mitochondrieel DNA of in het kern-DNA

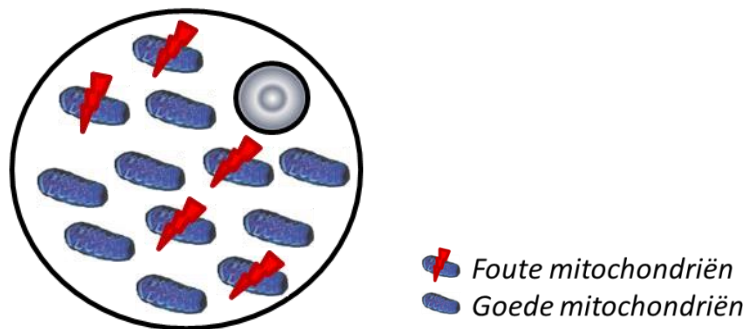
In de celkern (Figuur 1) zit het meeste van ons erfelijkheidsmateriaal, oftewel ons DNA, dit wordt het kern-DNA genoemd. Mitochondriën hebben ook een eigen stukje DNA, het mitochondrieel DNA. Ter vergelijking: het kern-DNA bestaat uit 3 miljard letters, het mitochondrieel DNA heeft er 16 duizend. Mitochondriële ziekten kunnen zowel veroorzaakt worden door een fout (ook wel mutatie) in het mitochondrieel DNA als door een fout in het kern-DNA. Er zijn veel verschillende fouten mogelijk.

Fouten in het mitochondrieel DNA

Het eerste deel van het proefschrift gaat over fouten in het mitochondrieel DNA als oorzaak. Meestal heeft een deel van de mitochondriën de fout, en het andere deel niet. Er is dus een mix van goede en foute mitochondriën (figuur 2). De verhouding kan wisselen per orgaan en zelfs binnen een orgaan

van een persoon. Lastig is dat vaak niet goed bekend is vanaf hoeveel foute mitochondriën er klachten optreden. Bij heel weinig foute mitochondriën is te verwachten dat iemand gezond is, en bij heel veel dat iemand ziek is, maar daar tussen zit een groot grijs gebied van onzekerheid.

Figuur 2: mix van goede en foute mitochondriën in de cel



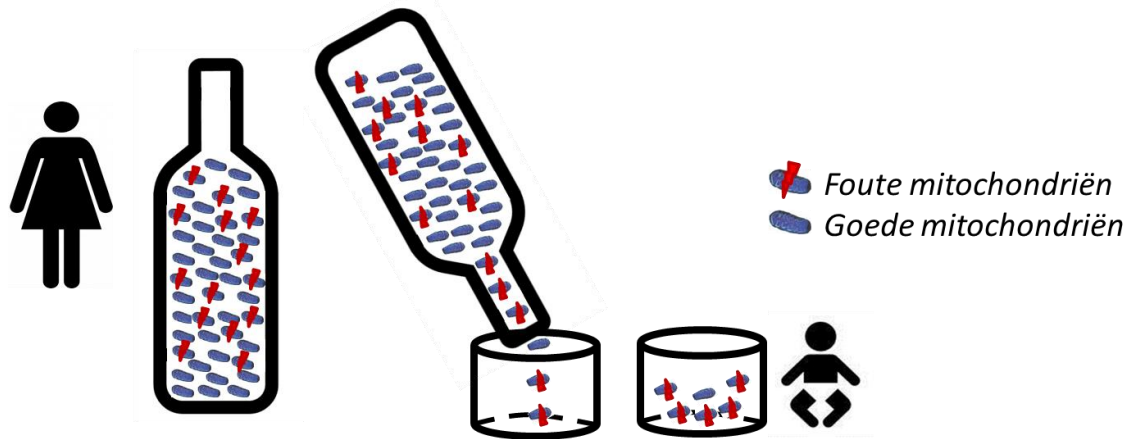
Onderzoek tijdens de zwangerschap lastig bij fouten in het mitochondrieel DNA

Dit grijze gebied maakt onderzoek tijdens de zwangerschap bij een ongeboren kind lastig. Zulk onderzoek, prenatale diagnostiek, houdt een vlokkentest of vruchtwaterpunctie in. Technisch is dit mogelijk, maar als het om fouten in het mitochondrieel DNA gaat kan de uitslag vaak niet goed voorspellen of het kind gezond of ziek zal zijn. Dit maakt beslissingen over het eventueel afbreken van de zwangerschap erg ingewikkeld.

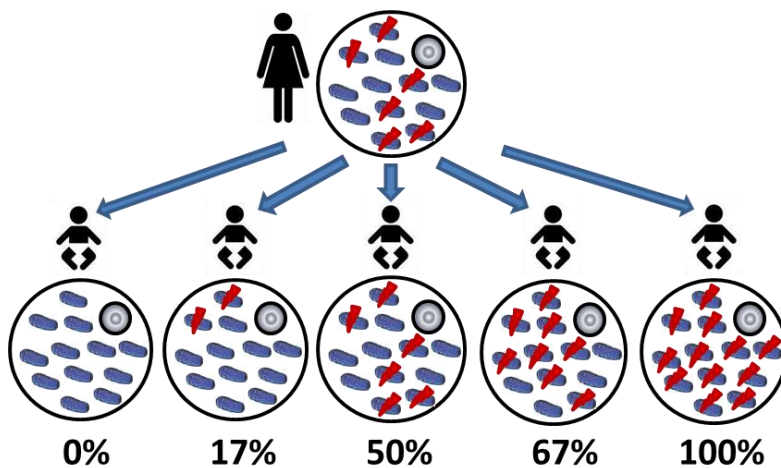
De overerving van het mitochondrieel DNA

Voor we verder gaan met een alternatief voor prenatale diagnostiek is het nodig eerst nog wat te bespreken over de overerving van het mitochondrieel DNA. Dit wordt alleen van moeders op kinderen overgedragen. Bij deze overdracht van moeder naar kind treedt een zogenaamd flessenhals-fenomeen op, ook wel bottleneck genoemd (figuur 3). Slechts een klein deel van moeders mitochondriën komt bij het kind terecht. Als de moeder een mix van foute en goede mitochondriën heeft en dus draagster is van een mitochondriële ziekte, is het maar net afhankelijk van welke paar mitochondriën er door komen, hoe de verhouding foute en goede mitochondriën bij het kind zal zijn. Het gevolg hiervan is dat het aantal foute mitochondriën bij het kind heel variabel kan zijn, van 0 tot 100%, en niet goed te voorspellen is (figuur 4).

Figuur 3: de overerving van het mitochondrieel DNA van moeder naar kind



Figuur 4: het aantal foute mitochondriën bij het kind is zeer variabel en onvoorspelbaar



PGD (embryoselectie) voor fouten in het mitochondrieel DNA

Terug nu naar een alternatief voor prenatale diagnostiek. In dit proefschrift hebben we PGD (preimplantatie genetische diagnostiek), oftewel embryoselectie, onderzocht als methode voor draagsters van een fout in het mitochondrieel DNA om een gezond kind te krijgen. Bij PGD vindt een IVF-procedure plaats. Dan worden de embryo's, die op dat moment uit 8 cellen bestaan (figuur 5), onderzocht op de fout in het mitochondrieel DNA. Vervolgens worden embryo's waarvan de verwachting is dat ze gezond zullen zijn, geselecteerd en teruggeplaatst in de baarmoeder van de vrouw. Dit zijn embryo's die de fout in het mitochondrieel DNA niet hebben, of slechts in een klein deel van de mitochondriën. Hierbij houden we meestal aan dat de hoeveelheid fout 18% of minder moet zijn. We hebben 24 behandelingen uitgevoerd bij 13 draagsters van 5 verschillende fouten, en 154 embryo's zijn onderzocht. In mijn onderzoek heb ik de resultaten geanalyseerd om na te gaan hoe geschikt PGD voor deze aandoeningen is.

Figuur 5: het 8-cellig stadium van het embryo wanneer embryoselectie plaatsvindt



PGD voor fouten in het mitochondrieel DNA: onderzoeksresultaten (hoofdstuk 3 t/m 5 van het proefschrift)

Om PGD goed te kunnen toepassen voor fouten in het mitochondrieel DNA, is ten eerste belangrijk dat het aantal foute mitochondriën in alle cellen van het embryo ongeveer hetzelfde is. Als de onderzochte cel of cellen namelijk een heel andere verhouding goed/fout hebben dan de rest van het embryo, dan betekent dit dat de uitslag geen goede informatie geeft over het al dan niet gezond zijn van het embryo. Gelukkig bleek uit mijn analyse dat dit wel goed overeen komt in alle cellen. Omdat het soms een beetje kan variëren in een enkele cel, adviseerden we aanvankelijk uit voorzorg nog om 2 cellen van het embryo in plaats van 1 te testen. Dit heeft echter weer als nadeel dat de kans op zwangerschap wat afneemt. Inmiddels hebben we grotere aantallen embryo's onderzocht en aangetoond dat ook het testen van 1 cel betrouwbaar genoeg is. Een tweede belangrijke voorwaarde is of een draagster wel embryo's krijgt die naar verwachting gezond zijn. Dit blijkt tot nu toe voor vrijwel alle draagsters zo te zijn. Van de 154 embryo's zijn er 20 teruggeplaatst. Er zijn 4 gezonde kinderen geboren. Tot slot: PGD kan ook succesvol toegepast worden voor zeldzame of unieke fouten in het mitochondrieel DNA.

Fouten in het mitochondrieel DNA: verschillen in overerving (hoofdstuk 6 van het proefschrift)

Omdat we ook geïnteresseerd zijn in de onderliggende mechanismen van de overerving, onderzochten we hoe het verklaard kan worden dat verschillende fouten in het mitochondrieel DNA verschillend worden overgedragen van moeder naar kind. Het blijkt dat sommige foute mitochondriën makkelijker door de flessenhals komen dan andere, en dus als het ware verrijkt kunnen worden. Dit betekent dat verschillende fouten in het mitochondrieel DNA een verschillend risico op een ziek kind kunnen geven. Omdat deze verrijking ook nog tijdens de verdere ontwikkeling kan optreden, kan dit ook betekenen dat afkapwaarden voor embryoselectie voor die fouten anders moet zijn en we nog iets veiliger moeten gaan zitten met de grens voor terugplaatsing.

PGD voor fouten in het mitochondrieel DNA: meestal de beste methode voor een gezond kind

We concluderen dat PGD voor draagsters van een fout in het mitochondrieel DNA meestal de beste optie is om een gezond kind te krijgen.

Fouten in het mitochondrieel DNA die nieuw bij een kind ontstaan: veelvoorkomend en laag risico op een tweede ziek kind (hoofdstuk 7 van het proefschrift)

Tot nu toe hebben we het steeds gehad over de situatie waarbij de moeder draagster is van de fout in het mitochondrieel DNA. Een fout in het mitochondrieel DNA kan echter ook bij een kind nieuw

ontstaan, oftewel *de novo* optreden. De moeder is dan geen draagster. Ik heb onderzocht hoe vaak dit voorkomt en wat in dat geval het risico voor de ouders is op opnieuw een ziek kind. Dit heb ik gebaseerd op 105 mitochondriële patiënten uit ons lab en 137 patiënten met een nieuw ontstane fout uit de literatuur. Het blijkt dat ongeveer 25% van alle patiënten een nieuw ontstane fout heeft. Voordat je kunt zeggen dat een fout nieuw ontstaan is bij een kind moeten bij de moeder meerdere weefsels onderzocht worden op de fout. Het risico op weer een ziek kind is in deze situatie laag, maximaal 4%, en als bij de moeder ook spierweefsel is onderzocht is tot nu toe zelfs geen herhaling beschreven. Ter geruststelling kan prenatale diagnostiek tijdens de zwangerschap worden aangeboden aan de ouders.

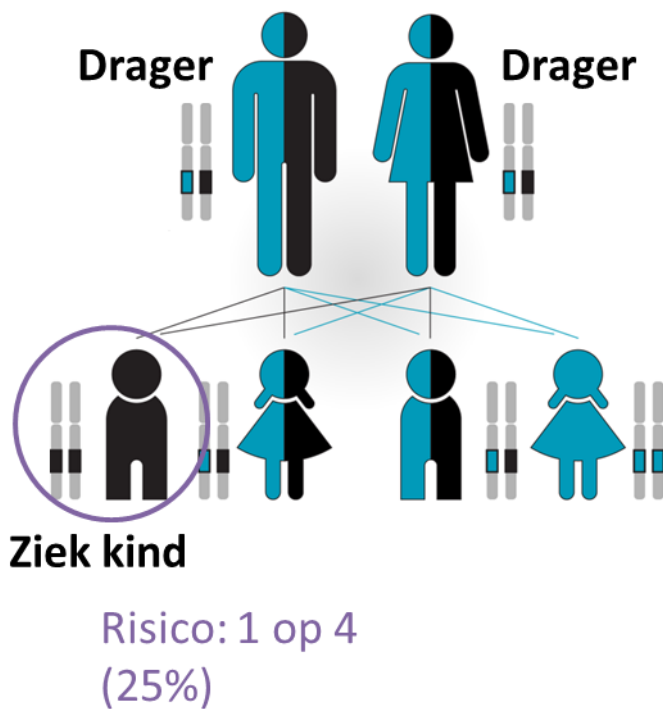
Niet alle fouten in het mitochondrieel DNA komen even vaak voor bij patiënten (hoofdstuk 8 van het proefschrift)

Zoals gezegd kunnen in het mitochondrieel DNA verschillende fouten voorkomen. We zien ze niet allemaal even vaak; sommige veelvuldig, andere zelden of nooit. We vroegen ons af of deze verdeling bij patiënten met een nieuw ontstane fout hetzelfde is als bij patiënten met een geërfd fout. Dit bleek niet het geval. Hoe komt dit dan? Onze conclusie is dat fouten in het mitochondrieel DNA wel overal optreden, maar dat sommige fouten niet met het leven verenigbaar zijn en al in een vroeg stadium worden weg geselecteerd; er treedt niet eens een bevruchting op. Deze fouten zullen we dus niet tegenkomen bij patiënten. Andere fouten kunnen wel tot de geboorte van een kind leiden, maar vervolgens is het kind zo ernstig ziek dat het zelf nooit kinderen zal krijgen en de fout dus niet door zal geven. Deze fouten zullen we wel bij patiënten zien, maar niet zo vaak. Weer andere fouten leiden tot de geboorte van relatief mild aangedane patiënten of gezonde draagsters die wel kinderen zullen krijgen en de fout kunnen doorgeven. Dit zijn de frequenter voorkomende fouten. Dit alles verklaart waarom we sommige fouten vaker zien dan andere en het bevestigt ook weer dat voor sommige fouten het risico op een ziek kind groter is dan voor andere.

Fouten in het kern-DNA

Tot zover hebben we het gehad over mitochondriële ziekten door een fout in het mitochondrieel DNA. Nu komen we bij de andere oorzaak: een fout in het kern-DNA. Hierbij is de overerving niet zo ingewikkeld als bij het mitochondrieel DNA. Meestal zijn beide ouders drager, en hebben zij bij elke zwangerschap een risico van 1 op 4, dus 25%, op een kind met de ziekte (figuur 6). De uitdaging in deze groep is het vinden van de fout. Ons kern-DNA is te vergelijken met een heel dik kookboek, waar zo'n 20.000 recepten in staan, de genen. Dat zijn er veel meer dan de 37 van het mitochondrieel DNA, nog maar eens ter vergelijking.

Figuur 6: de wijze waarop de meeste mitochondriële ziekten door een fout in het kern-DNA overerven



Nieuwe technieken om fouten in het kern-DNA op te sporen (hoofdstuk 9 van het proefschrift)

We hebben gekeken naar de toepassing van nieuwe DNA-technieken, met name exoom sequencing, waarbij alle kerngenen tegelijkertijd worden onderzocht. De meeste fouten in het kern-DNA die een mitochondriële ziekte veroorzaken kunnen nu gevonden worden. Ook wanneer er meerdere aandoeningen bij dezelfde patiënt aanwezig zijn, veroorzaakt door verschillende genen, kan dit met 1 test worden ontrafeld. Met exoom sequencing wordt dus bij meer patiënten de oorzaak gevonden, zo'n 70% ten opzichte van 25% met de oude methoden, en ook completer.

Onderzoek tijdens de zwangerschap en embryoselectie voor fouten in het kern-DNA

Als de oorzaak op het kern-DNA eenmaal bekend is, zijn zowel prenatale diagnostiek als embryoselectie goed mogelijk. Dit is dan gericht op de aandoening of aandoeningen die het eerdere kind had.

Kan een ziek kind ook voorkomen worden zonder dat ouders eerst een ziek kind moeten krijgen of de ziekte in de familie bekend moet zijn?

Nu komen we bij het derde punt, namelijk kunnen we ook iets betekenen voor paren die een verhoogd risico op een ernstig ziek kind hebben maar hier niet van op de hoogte zijn? Mensen kunnen drager zijn van een ziekte zonder dat ze dit weten. Sterker nog, we zijn allemaal wel drager van iets. Als onze partner toevallig van hetzelfde drager is, is het risico op een kind met die ziekte 25%. De kans om beide drager van dezelfde ziekte te zijn is groter als je familie van elkaar bent, maar het kan iedereen overkomen.

Nieuwe test om dragerschap voor erfelijke ziekten vast te stellen bij gezonde paren (hoofdstuk 10 van het proefschrift)

We hebben een methode ontwikkeld om de nieuwe DNA-techniek hierboven beschreven is (hoofdstuk 9) toe te passen bij paren met kindwens die nog geen ziek kind hebben. Dit blijkt mogelijk, en hiermee kunnen paren die zonder dat ze dit wisten een verhoogd risico op een ernstig ziek kind hebben, worden geïdentificeerd. De test is geschikt voor alle paren, en voor alle erfelijke ziekten waarvoor dit gewenst is.

Wat u moet onthouden

Het doel van het onderzoek was om paren met een verhoogd risico op een kind met een mitochondriële ziekte opties te kunnen bieden om een gezond kind te krijgen, en in het proefschrift zijn een aantal van deze opties ontwikkeld en getoetst waardoor we dit nu voor de meeste paren kunnen bieden.