

CAROLINA HABERMANN MACABELLI

**Investigação dos mecanismos envolvidos na herança
mitocondrial: o papel da dinâmica mitocondrial**

São Carlos

2020

CAROLINA HABERMANN MACABELLI

**Investigação dos mecanismos envolvidos na herança
mitocondrial: o papel da dinâmica mitocondrial**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal de São Carlos para
obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Departamento:

Departamento de Genética e Evolução

Área de concentração:

Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti

São Carlos

2020

Macabelli, Carolina Habermann

Investigação dos mecanismos envolvidos na herança mitocondrial: o papel da dinâmica mitocondrial / Carolina Habermann Macabelli -- 2020. 86f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Marcos R. Chiaratti

Banca Examinadora: Dr. Anderson Ferreira da Cunha, Dr. Felipe Perecin, Dr. Flávio Vieira Meirelles, Dr.

Marcos Túlio de Oliveira

Bibliografia

1. Herança mitocondrial. 2. Dinâmica mitocondrial. I. Macabelli, Carolina Habermann. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



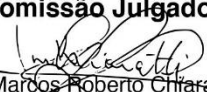
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Carolina Habermann Macabelli, realizada em 08/10/2020.

Comissão Julgadora:


Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti (UFSCar)

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)

Prof. Dr. Felipe Perecin (USP)

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles (USP)

Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Dedicatória

Aos meus pais Jucélio e Paula, por toda dedicação aos meus estudos.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti, por todo esforço e também pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Patrick Chinnery, pela confiança e oportunidade de atuar em seu laboratório.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do LaGenBio, que em muito contribuíram para realização deste trabalho: Katiane Tostes, Djaci Augusto Neto, Mateus Priolo Grejo, Fabrícia H. C. Sugiyama, Lindomar Alves, Maria Capobianco, Rachel Marascalchi, Angelica Camargo, Anand Pandey, Renan Omete Ferreira e Jaiane Santana da Paz.

Aos meus amigos e colegas no laboratório de Cambridge, principalmente Mikael Pezet, Zoe Golder, Amanda Lopez, Michele Frison, Haixin Zhang e Aurora Gomez-Duran.

Aos meus pais, Jucélio e Paula Macabelli, por toda ajuda durante a vida acadêmica.

Ao Gilberto Cordeiro Araujo, por todo incentivo, ajuda e respeito a este trabalho.

Aos meus inúmeros e queridos amigos e familiares que me apoiaram direta ou indiretamente durante todo este período.

Ao Programa de pós-graduação PPGGEV e a Universidade Federal de São Carlos.

*Este trabalho teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (2012/50231-6, 2016/07868-4; 2017/05899-2, 2018/03925-9 e 2019/07714-5).

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Doenças causadas por mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) estão entre as doenças genéticas mais comuns em humanos. Apesar disso, não há tratamento efetivo para essas doenças e os mecanismos de herança não são totalmente conhecidos. Diversos estudos em camundongos e humanos apontam que mutações deletérias (e.g., não sinônimas) no mtDNA são negativamente selecionadas na linhagem germinativa (e.g., oócitos ou embriões), tendo impacto direto nas gerações seguintes. Este mecanismo parece estar intimamente associado com a dinâmica mitocondrial (e.g., eventos de fusão e fissão mitocondrial), a qual favorece a segregação de moléculas mutantes e selvagens coexistentes numa mesma célula (e.g., heteroplasmia). No entanto, faltam evidências sobre um possível papel desses mecanismos na herança mitocondrial, especialmente na linhagem germinativa de mamíferos. Nesse contexto, este trabalho teve o objetivo de estudar o papel da dinâmica mitocondrial na herança de mtDNA durante o desenvolvimento da linhagem germinativa feminina. Para isso, as seguintes fases do desenvolvimento foram utilizadas como modelo de estudo: i) embriogênese inicial; ii) estabelecimento das células germinativas primordiais (PGCs); e, iii) oogênese. Nossos resultados indicam um mecanismo purificador atuando contra um haplótipo mitocondrial deletério, dependente de *Mfn2*, e com ação durante o desenvolvimento dos oócitos. Além disso, destacamos a derivação de PGCs em fetos nocaute para *Mfn2*, e a derivação de PGCLCs (*PGC-like cells*) a partir de células-tronco embrionárias deficientes em *Drp1*, ambos com efeito sobre o número de cópias de mtDNA. Como conclusão, nossos achados fornecem evidências do importante papel da dinâmica mitocondrial na regulação da herança mitocondrial.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, herança mitocondrial, dinâmica mitocondrial, linhagem germinativa.

Abstract

Diseases caused by mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) are the most common genetic diseases in humans. Despite this, there is no effective treatment for these diseases and the mechanisms of inheritance are not fully understood. Several studies in mice and humans have shown that deleterious mutations (e.g., non-synonymous) in mtDNA are negatively selected in the germline (e.g., oocytes or embryos) leading to a direct impact on the following generations. This mechanism seems to be closely associated with mitochondrial dynamics (e.g., mitochondrial fusion and fission events), which act on the segregation of mutant and wild-type molecules. However, there is a lack of evidence on the action of these mechanisms on mitochondrial inheritance, especially in the germline of mammals. This work aims to study the role of mitochondrial dynamics on the inheritance of mtDNA during the development of the female germline. For this, the following development phases were used as a model: i) initial embryogenesis; ii) establishment of primordial germ cells (PGCs); iii) oogenesis. Our results indicate a purifying mechanism acting on mutant mtDNA, which is dependent on Mfn2, and acts during the development of oocytes. In addition, we highlight the derivation of PGCs in Mfn2 knockout mice, and the specification of PGCLCs (PGC-like cells) from Drp1-deficient mice embryonic stem cells (mESCs), both with an effect on the mtDNA copy number. In conclusion, our results provide evidence that mitochondrial dynamics play an important role in regulating the mitochondrial inheritance.

Keywords: mitochondrial DNA, mitochondrial inheritance, mitochondrial dynamics, germline.

Lista de Abreviaturas e Siglas

- ATP-** Adenosina Trifosfato
- BSA-** Albumina sérica bovina
- cKO-** Nocaute condicional (do inglês *conditional knockout*)
- COC-** (Complexo Cumulus Oócitos)
- DNA-** Ácido desoxirribonucléico
- eCG-** Gonadotrofina coriônica equina
- FAD-** Flavinaa adenina dinucleotídeo
- FSH-** Hormônio folículo estimulante
- GV-** Vesícula germinativa
- hCG-** Gonadotrofina coriônica humana
- Kb-** Quilobase
- LH-** Hormônio luteinizante
- mRNA-** RNA mensageiro
- mtDNA-** DNA mitocondrial
- NAD(P)H-** Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato)
- Pb-** Pares de bases
- PB1-** Primeiro corpúsculo polar
- PBS-** Solução salina tamponada com fosfato
- PCR-** Reação de polimerase em cadeia
- PGC-** Célula germinativa primordial
- PK-** Proteinase K
- RNA-** Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)
- ROS-** Espécies reativas de oxigênio
- rRNA-** RNA ribossomal
- TBE-**(tampão Tris/Borato/EDTA)
- tRNA-** RNA transportador
- $\Delta\Psi_m$** - Potencial de membrana mitocndrial

Lista de Figuras

Figura 1: Organização do mtDNA	17
Figura 2: A mitocôndria e os complexos envolvidos na fosforilação oxidativa.....	19
Figura 3: Fusão mitocondrial	21
Figura 4: Fissão mitocondrial	23
Figura 5: Mecanismos moleculares da via PINK1-Parkin.....	25
Figura 6: Mitocôndria na linhagem germinativa	27
Figura 7: Herança mitocondrial	30
Figura 8: Esquema representativo do modelo experimental em PGCLCs	41
Figura 9: Construção CRISPR/Cas9	43
Figura 10: Padronização da construção CRISPR/Cas9 em células NIH3T3	44
Figura 11: Modificação de ESCs heteroplásmicas por CRISPR/Cas9	45
Figura 12: Caracterização das ESCs Controle, gMfn2 e gDrp1	46
Figura 13: Caracterização de ESCs quanto ao conteúdo de mtDNA.....	47
Figura 14: Expressão de Blimp1-mVenus e Stella-CFP ao longo da derivação de PGCLC	48
Figura 15: Expressão de Blimp1-mVenus e Stella-CFP ao longo da diferenciação de PGCLC	49
Figura 16: Morfologia mitocondrial em PGCLCs	50
Figura 17: Cópias de mtDNA em PGCLCs dos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 ao longo da derivação (D4-D7)	51
Figura 18: Cópias de mtDNA ao longo da derivação de PGCLCs.....	53
Figura 19: Cópias de mtDNA em células negativas para Blimp1-mVenus e Stella-ECFP (BVSC-)	53
Figura 20: Nível de m.3062T>A em PGCLCs dos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 ao longo da derivação (D4-D7)	54
Figura 21: Segregação de m.3062T>A ao longo da derivação de PGCLCs.....	55
Figura 22: Coeficiente de variação dos níveis de m.3062T>A ao longo da derivação de PGCLCs	55
Figura 23: Variação inter e intra-tecidual de NZB em biópsias de orelha.....	57
Figura 24: Esquema representativo do modelo experimental envolvendo fetos.	58
Figura 25: Frequência de genótipos presentes no 10,5 dia de gestação.....	59
Figura 26: Efeito do nocaute de Mfn1 e Mfn2 durante o desenvolvimento inicial sobre a segregação de mtDNA	60

Figura 27: Efeito do nocaute de Mfn2 durante o desenvolvimento inicial sobre a herança de mtDNA.....	62
Figura 28: Esquema representativo das etapas experimentais.....	64
Figura 29: Proporção de genótipos presentes em coletas utilizadas para isolamento de PGCs (E10,5)	65
Figura 30: Efeito do nocaute de Mfn2 em PGCs sobre a herança de mtDNA	65
Figura 31: Esquema representativo do modelo experimental envolvendo oócitos Mfn2 cKO..	67
Figura 32: Efeito do nocaute condicional de Mfn2 (Mfn2 cKO) em oócitos sob a herança de mtDNA.....	68
Figura 33: Efeito da idade sob a segregação de mtDNA NZB em oócitos.....	69
Figura 34: Efeito do nocaute condicional de Mfn2 (Mfn2 cKO) sob a herança de mtDNA em oócitos provenientes de folículos secundários.....	70
Figura 35: Correlação entre cópias de mtDNA e segregação de NZB em oócitos crescidos obtidos de fêmeas do grupo Controle (a) e Mfn2 cKO (b).....	71
Figura 36: Esquema representativo do modelo experimental envolvendo oócido Atg7 cKO....	72
Figura 37: Efeito do nocaute condicional de Atg7 (Atg7 cKO) sob a morfologia e diâmetro de oócitos	73
Figura 38: Efeito do nocaute condicional de Atg7 (Atg7 cKO) em oócitos sob a herança de mtDNA.....	74
Figura 39: Modelo hipotético da segregação de mtDNA na linhagem heteroplásmia B6/NZB.	76

Sumário

1.	Introdução	13
2.	Revisão Bibliográfica.....	15
2.1.	DNA mitocondrial.....	15
2.2.	A mitocôndria.....	18
2.3.	Dinâmica mitocondrial	19
2.4.	Mitocôndria na linhagem germinativa	25
2.5.	Herança mitocondrial	28
3.	Hipótese	30
4.	Objetivos	32
5.	Metodologia	33
5.1.	Obtenção e manutenção dos animais de experimento.....	33
5.2.	Cruzamentos para obtenção dos genótipos de interesse.....	33
5.3.	Genotipagem	34
5.4.	Derivação e cultivo de MEFs	36
5.5.	Coleta de PGCs	36
5.6.	Manutenção e modificação de ESCs por CRISPR.....	37
5.7.	Diferenciação in vitro e coleta de PGCLC.....	37
5.8.	Coleta de Oócitos	38
5.9.	Análise de cópias de mtDNA e heteroplasmia em PGCLC	38
5.10.	Análise de cópias de mtDNA e heteroplasmia em oócitos	39
5.11.	Análise dos dados.....	40
6.	Resultados e Discussão	41
6.1.	Papel da dinâmica mitocondrial durante a formação de PGCLCs	41
6.2.	Papel da dinâmica mitocondrial na herança de mtDNA em camundongos heteroplásmicos B6/NZB.....	56
6.2.1.	Padronização da análise da heteroplasmia nas progenitoras	56
6.2.2.	Papel da dinâmica mitocondrial durante o desenvolvimento inicial.....	57
6.2.3.	Papel da dinâmica mitocondrial durante a formação de PGCs	63
6.2.4.	Investigação dos mecanismos de herança mitocondrial no oócito.....	66
7.	Conclusões	77
8.	Referências Bibliográficas	78

1. Introdução

Além do DNA nuclear, os organismos eucariontes possuem DNA mitocondrial (mtDNA), localizado em organelas de membrana dupla, denominadas mitocôndrias. As mitocôndrias têm papel fundamental na manutenção celular, atuando principalmente na produção energética, mas também contribuindo na regulação metabólica e em diversos eventos de sinalização celular¹. Apesar de possuir seu próprio genoma, grande parte das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear, fazendo com que o correto funcionamento da organela dependa da interação dos dois genomas².

O mtDNA codifica proteínas responsáveis pela produção de ATP^{3,4} e está presente nas células em múltiplas cópias, proporcional à demanda energética. Mutações no mtDNA podem acarretar em disfunções graves, principalmente quando presentes em grande quantidade, levando a doenças mitocondriais⁵. Atualmente, mais de 260 mutações no mtDNA já foram descritas e associadas a doenças mitocondriais, cujos sintomas são clinicamente diversos e o tratamento apenas paliativo⁶.

Essas doenças, que no passado foram classificadas como raras, afetam cerca de 9,6 pessoas a cada 100.000 indivíduos⁷. No entanto, a frequência dessas mutações na população é muito maior, com ~1 a cada 200 indivíduos sendo portador de mutações patogênicas no mtDNA⁸. Mesmo presentes em baixos níveis ao nascimento, essas mutações têm potencial de acumular ao longo da vida em tecidos somáticos levando a manifestação de sintomas. Além disso, algumas mutações no mtDNA têm sido associadas ao maior risco de manifestação de doenças na fase adulta, como diabetes e câncer⁹, colocando as mutações no mtDNA como uma das principais causas de doenças em humanos. Apesar disso, os mecanismos de herança do mtDNA ainda não são totalmente conhecidos.

As mutações no mtDNA são transmitidas exclusivamente através da linhagem materna, por um processo que gera rápida segregação de variantes mitocondriais entre gerações^{10,11}. Esse fenômeno ocorre devido à transmissão de uma quantidade restrita de cópias do genoma mitocondrial¹². Na prática, uma mulher que carrega parte de suas cópias de mtDNA mutada pode gerar indivíduos com níveis bastante diferentes da mutação. No entanto, além desse efeito, outros mecanismos têm sido demonstrados, os quais atuam para evitar a transmissão de mutações deletérias (e.g., não sinônimas)^{13,14}. Nesse caso, o mtDNA mutado é seletivamente eliminado na

linhagem germinativa feminina, evitando assim sua propagação. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não foram desvendados.

Uma possibilidade envolve a seleção a nível de organela, a qual tem sido proposta em *Drosophila*¹⁴ e mamíferos^{15,16}. Nesse caso, mitocôndrias disfuncionais devido à alta proporção de mtDNA mutado poderiam ser eliminadas através de sistemas de qualidade da célula (e.g., mitofagia)^{17,18}. Alternativamente, a replicação preferencial de haplótipos de mtDNA¹⁹ poderia levar a seleção de genomas do tipo selvagem.

Uma vez que a dinâmica mitocondrial parece estar intimamente associada aos processos descritos acima, nossa hipótese se baseou na sua influência sobre a segregação de moléculas mutantes e selvagens. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o papel da dinâmica mitocondrial sobre a herança mitocondrial na linhagem germinativa feminina.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. DNA mitocondrial

O mtDNA foi descoberto na década de 60²⁰⁻²² e teve sua sequência e estrutura desvendados vinte anos mais tarde^{3,4}. Em mamíferos, o mtDNA é formado por aproximadamente 16,5 kb, tem formato circular e não apresenta íntrons. Sua sequência é responsável pela codificação de 13 polipeptídeos fundamentais para a função da mitocôndria, além de 22 RNAs transportadores (tRNAs) e 2 RNAs ribossômicos (rRNAs) envolvidos na síntese desses polipeptídeos^{3,4} (Figura 1).

Apesar de compacta, a molécula de mtDNA possui alta densidade de informação genética, é constituída por uma fita pesada (H), a qual é rica em guanina, e outra leve (L), com maior quantidade de citosina. Além disso, possui uma região não codificadora (*noncoding region*, NCR), também conhecida como região de controle, a qual é essencial para a manutenção do mtDNA. É nessa região que estão alocadas as origens de transcrição e replicação²³. Além disso, há também a frequente incorporação de uma terceira fita de DNA, formando a estrutura conhecida como D-loop (*mitochondrial displacement loop*)²⁴⁻²⁶, que apesar de não ter todas as suas funções caracterizadas, é fortemente associada a replicação do mtDNA^{23,27}.

O sistema de replicação mitocondrial difere do nuclear e ocorre constantemente, independente do ciclo celular. Envolve proteínas específicas codificadas pelo núcleo e importadas para a mitocôndria, como por exemplo, a DNA polimerase γ ²⁸, a helicase Twinkle²⁹, a proteína de ligação a fita simples mtSSB³⁰ e a RNA polimerase mitocondrial (POLRMT/mtRNAP)³¹. Embora seja semelhante a procariontes, a replicação do mtDNA é um evento bastante coordenado e influenciado pela biogênese mitocondrial, necessidade energética e replicação celular. Assim como a replicação, a transcrição também difere da nuclear e ocorre de forma policistrônica, a partir de promotores (HSP e LSP) localizados na região não codificadora de ambas as fitas³². A transcrição é realizada pela mtRNAP, a qual depende de importantes fatores³³, como TFAM³⁴, TFB2M, TEFM, MTERF1, entre outros, para a obtenção e processamento dos transcritos³⁵.

Além do papel na transcrição, o TFAM também atua na conformação do mtDNA^{36,37}, auxiliando na sua compactação em complexos nucleoproteicos denominados nucleóides³⁸ (Figura 1). Cada nucleóide possui cerca de 100 nm, provavelmente contém apenas uma cópia de

mtDNA e encontra-se ancorado à membrana interna da mitocôndria³⁹. A compactação do mtDNA em nucleóides é um processo determinante tanto na regulação dos níveis de replicação e transcrição como também na segregação do mtDNA³⁸.

As células eucarióticas contêm múltiplas cópias de mtDNA e a quantidade depende principalmente do metabolismo e do tipo celular⁴⁰. Tecidos com elevada exigência energética (e.g., células nervosas e musculares) contêm mais moléculas de mtDNA por célula do que outros tecidos (e.g., leucócitos e monócitos) com menor exigência.

Assim como o DNA nuclear, o mtDNA pode sofrer alterações e rearranjos fazendo com que moléculas mutantes e selvagens coexistam numa mesma célula, condição denominada **heteroplasmia**. Existem diversos tipos de mutações no mtDNA, algumas sendo consideradas apenas variações neutras e outras deletérias (e. g. não sinônimas), com potencial de causar doenças⁴¹. No caso das deletérias, o nível de patogenicidade depende da natureza da mutação e da quantidade presente. No geral, as células tendem a suportar baixos níveis de moléculas mutantes, ocorrendo o comprometimento da função mitocondrial somente quando um nível mínimo é ultrapassado (geralmente maior que 70-80% - Figura 1).

Cerca de 260 mutações no mtDNA humano são conhecidas por resultarem em doenças graves, geralmente multissistêmicas, afetando principalmente tecidos com alta demanda energética. Essas doenças têm diagnóstico complexo, uma vez que uma mutação pode resultar em diversos sintomas e um mesmo conjunto de sintomas pode ser causado por diferentes mutações⁴². As mutações no mtDNA geralmente são classificadas em três tipos, mutações pontuais em genes codificadores de proteínas, mutações pontuais em genes envolvidos na síntese de proteínas (genes de tRNA ou rRNA) e rearranjos de mtDNA, incluindo deleções e inserções de mtDNA⁶.

As mutações no mtDNA são herdadas através da linhagem materna, onde diversos eventos celulares, principalmente durante a formação da linhagem germinativa, influenciam na sua transmissão. Além disso, a função mitocondrial, a relação das mitocôndrias com o núcleo e a maneira com que a expressão de dois genomas distintos é coordenada tornam a herança mitocondrial um evento complexo e ainda pouco conhecido.

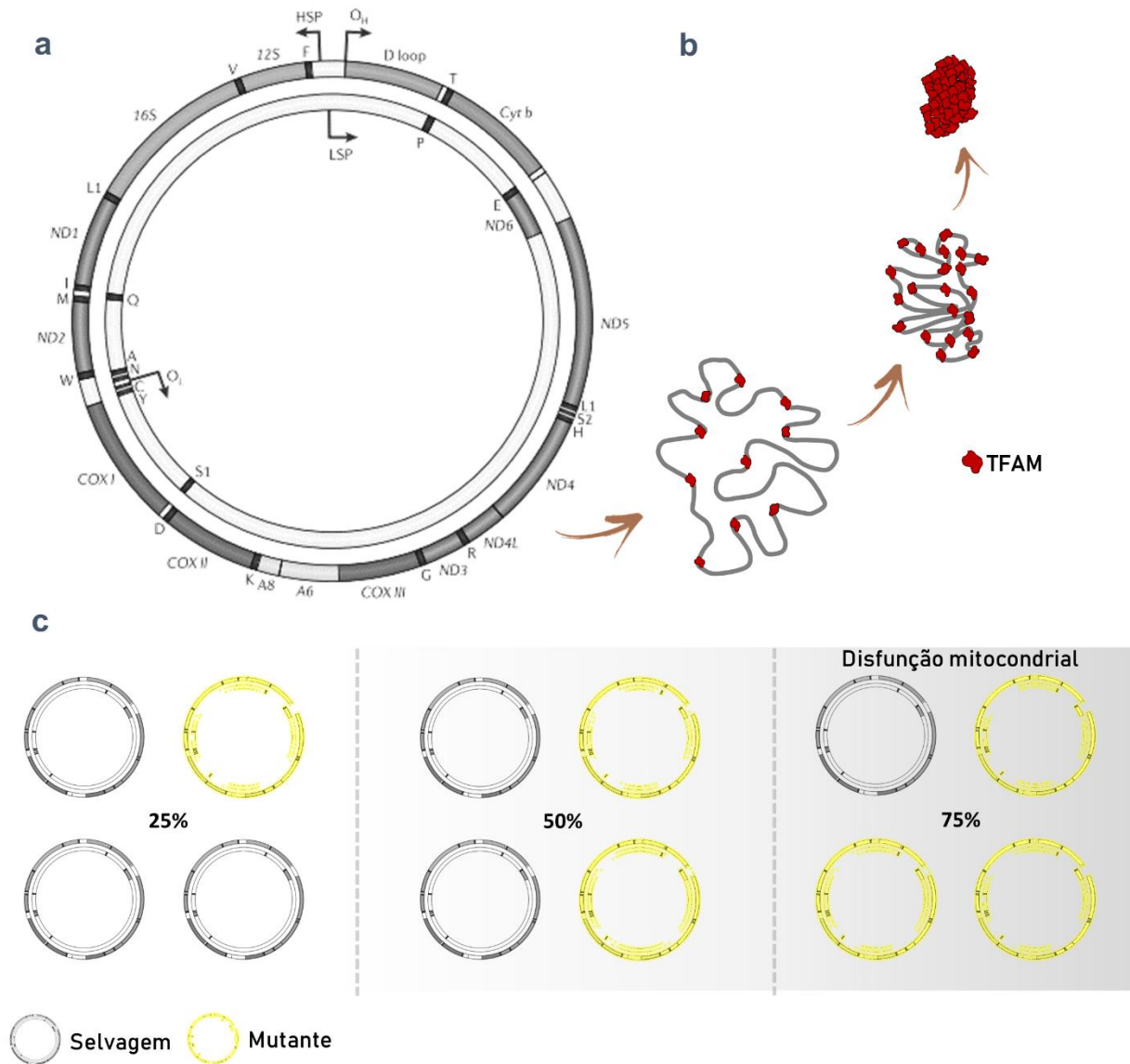


Figura 1: Organização do mtDNA. (a) Esquema representativo do mtDNA mostrando os 37 genes responsáveis pela codificação de 13 polipeptídeos: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, e ND6 - subunidades do Complexo I (NADH-Coenzima Q oxidoreductase); uma subunidade - citocromo b - do Complexo III (CoQ-citocromo c oxidoreductase), três subunidades - COX I, COX II, e COX III - do Complexo IV (citocromo c oxidase, ou COX), e duas subunidades - ATPase 6 e ATPase 8 - do Complexo V (ATP sintase). Além dos polipeptídeos, estão representados os dois rRNAs (12 e 16S), 22 tRNAs e a região de controle (NCR), contendo os promotores da fita pesada e fita leve (HSP e LSP). (b) Conformação do mtDNA mediada por TFAM. (c) Esquema representativo do acúmulo dos níveis de mutação resultando em comprometimento da função mitocondrial. Fonte: Adaptado de Schon; Dimauro; Hirano (2012).

2.2. A mitocôndria

Mitocôndrias têm papel fundamental no funcionamento de qualquer célula eucariótica. Além da síntese de ATP, essas organelas estão intimamente integradas no metabolismo e nas principais vias de sinalização das células nucleadas, como por exemplo, a síntese de aglomerados de ferro e enxofre⁴³, homeostase de cálcio⁴⁴ e regulação da apoptose⁴⁵.

São organelas formadas por duas membranas lipoproteicas, uma externa com estrutura retilínea e outra interna que apresenta dobras, denominadas cristas. A dupla membrana leva a formação de compartimentos distintos, a matriz mitocondrial, delimitada pela membrana interna, e o espaço intermembranas, localizado entre a membrana interna e a externa⁴⁶ (Figura 2).

Estima-se que a mitocôndria tenha surgido há aproximadamente dois bilhões de anos, com a associação de uma bactéria primitiva (α proteobacterium) e uma célula hospedeira⁴⁷. Com o estabelecimento da simbiose, o α proteobacterium tornou-se uma organela citoplasmática e teve parte do seu material genético transferido para o genoma nuclear. Durante milhões de anos, esse processo reduziu o tamanho do mtDNA e consolidou a relação simbiótica, resultando na formação das mitocôndrias como são conhecidas na atualidade. Esses acontecimentos fazem parte da teoria conhecida como endossimbiótica, proposta há mais de um século e que ainda passa por constantes atualizações^{48,49}. Atualmente, a maior parte do proteoma mitocondrial é codificado pelo núcleo, e como consequência, as mitocôndrias adquiriram uma maquinaria eficiente de importação de proteínas de origem nuclear⁵⁰.

A produção de ATP pelas mitocôndrias ocorre através da fosforilação oxidativa (OXPHOS), processo que depende de cinco complexos proteicos presentes na membrana mitocondrial interna (Figura 2). Os quatro primeiros complexos (I, II, III e IV) junto com carreadores de elétrons coenzima Q (CoQ) e citocromo C formam a cadeia transportadora de elétrons. O transporte dos elétrons através dos complexos gera energia que é parcialmente utilizada pelos complexos I, III, e IV para bombear prótons (H^+) para o espaço intermembranas, resultando em um potencial eletroquímico conhecido como potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$). O $\Delta\Psi_m$ gera uma força motriz, que é então utilizada pelo quinto complexo (ATP sintase) para a produção de ATP.

A formação de todos os complexos da OXPHOS é um processo que envolve enzimas com atividades catalíticas e diversas subunidades que auxiliam na sua construção, regulação e estabilidade. Em mamíferos, com exceção do complexo II, os polipeptídeos da OXPHOS são codificados tanto pelo DNA nuclear quanto pelo mitocondrial. Os complexos podem também

interagir entre si, formando estruturas denominadas supercomplexos⁵¹⁻⁵³. Associações entre os complexos I, III e IV (nos formatos CI-III-IV, I-III e III-IV) são frequentes, podem influenciar a conformação da membrana mitocondrial interna⁵⁴ e interferir na herança de mtDNA⁵⁵.

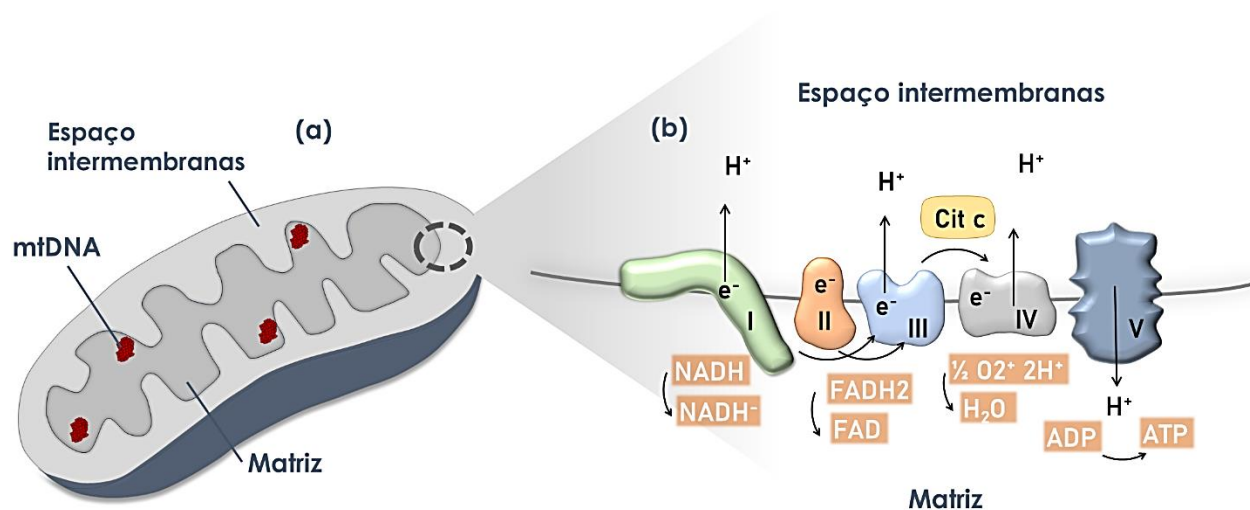


Figura 2: A mitocôndria e os complexos envolvidos na fosforilação oxidativa. (a) Esquema representativo da estrutura da mitocôndria, formada por duas membranas lipoproteicas, uma externa com estrutura retilínea e outra interna que apresenta dobras. A dupla membrana leva a formação de compartimentos distintos, a matriz mitocondrial, delimitada pela membrana interna, e o espaço intermembranar, localizado entre a membrana interna e a externa (b) A figura exhibe os complexos: I (NADH-coenzima Q oxidoredutase), II (Succinato-Q oxidoredutase), III (Q-citocromo *c* oxidoredutase), IV (Citocromo *c* oxidase) e complexo V ou ATP sintase. As subunidades são codificadas pelo DNA nuclear e mtDNA, com exceção do complexo II, que é codificado inteiramente pelo genoma nuclear. Complexos I, III e IV bombeiam prótons da matriz para o espaço intermembranar, gerando um gradiente eletroquímico através da membrana interna, que é usado para a produção de ATP pelo complexo V (ATP sintase). Fonte: Autor.

2.3. Dinâmica mitocondrial

As mitocôndrias são organelas dinâmicas capazes de modular sua morfologia e criar uma rede mitocondrial baseada na habilidade de realizar fusão e fissão. Além disso, a síntese de novas mitocôndrias e a eliminação das defeituosas ajudam a manter a população mitocondrial saudável. A consequência dessa dinâmica determina o número, o tamanho e a posição das mitocôndrias no citoplasma⁵⁶.

A arquitetura mitocondrial depende, entre outros fatores, da necessidade metabólica da célula e da disponibilidade/demanda por energia. Em um ambiente rico em nutrientes as mitocôndrias tendem a se manterem separadas uma das outras (fragmentadas), e na falta de nutrientes as mitocôndrias formam extensas conexões com organelas alongadas. No entanto, as mudanças na

rede mitocondrial irão depender do tipo celular e tecido em que as organelas estão inseridas, os quais respondem à diferentes necessidades e estímulos⁵⁷. Na linhagem germinativa, por exemplo, as mitocôndrias encontram-se fragmentadas, com formato arredondado e poucas cristas. Essas características são típicas de atividade mitocondrial reduzida, com possível diminuição dos níveis de ROS⁵⁸.

A dinâmica mitocondrial tem um papel central no controle de qualidade mitocondrial. Mitocôndrias isoladas e com baixo $\Delta\Psi_m$ podem ser marcadas para degradação. Por outro lado, a fusão mitocondrial mantém a homogeneidade genética e bioquímica, por permitir a troca de componentes (e.g. mtDNA mutante), a diluição de espécies reativas de oxigênio e o restabelecimento do potencial de membrana⁵⁹.

2.3.1. Fusão mitocondrial

O processo de fusão é um evento conservado durante a evolução, presente tanto em leveduras⁶⁰ quanto em humanos, e essencial para o correto funcionamento das células. Ocorre em duas etapas e requer primeiramente a fusão da membrana mitocondrial externa, seguido da fusão da membrana interna. As proteínas centrais da maquinaria de fusão pertencem a família das GTPases (*dynamin-related GTPase*), que têm habilidade de hidrolisar o GTP (Guanosina-5-trifosfato) e a partir daí extrair a energia necessária para o remodelamento de membranas^{61,62}.

A fusão da membrana externa é mediada pelas mitofusinas Mfn1 e Mfn2 (*mitofusin-1* e *mitofusin-2*)⁶³, as quais apresentam alta similaridade na sequência de aminoácidos. Já a fusão da membrana interna é coordenada principalmente pela OPA1 (*Optic atrophy 1*), uma proteína complexa que apresenta 8 isoformas.

O início da fusão ocorre através das mitofusinas, que coordenam o contato inicial entre duas mitocôndrias e, após mudanças estruturais devido a hidrólise de GTP, conferem aproximação e junção das membranas externas (Figura 3). A descoberta de Mfn1 e Mfn2 teve início a partir de um estudo em *Drosophila*⁶⁴, em que machos mutantes (para o homólogo *Fzo*) eram incapazes de realizar fusão e se tornavam inférteis. Mais tarde, a função das mitofusinas foi demonstrada em células humanas⁶⁵, e o seu nocaute revelou ser letal na fase embrionária de camundongos⁶³.

A ausência tanto de Mfn1 quanto de Mfn2 resulta na redução acentuada dos níveis de fusão, com mitocôndrias altamente fragmentadas⁶⁶. Apesar da alta similaridade, as mitofusinas apresentam também funções distintas. O nocaute de Mfn1 apresenta maior fragmentação mitocondrial do que o nocaute de Mfn2, provavelmente devido a maior atividade GTPásica⁶⁷,

enquanto que a Mfn2 funciona como regulador chave na interação da mitocôndria com o retículo endoplasmático⁶⁸.

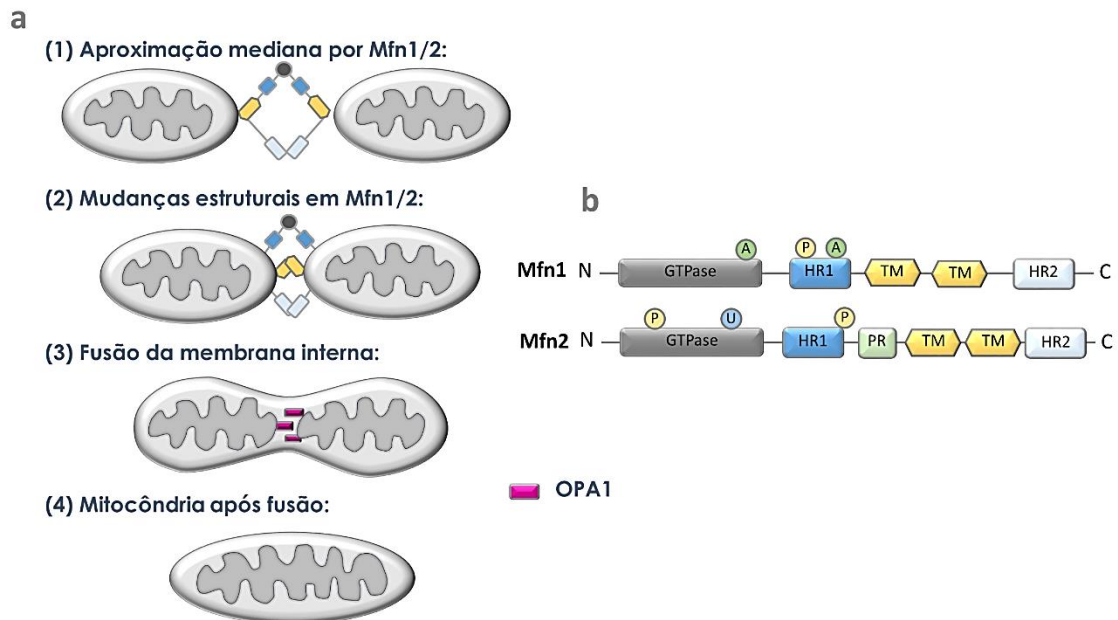


Figura 3: Fusão mitocondrial. (a) Esquema representativo das etapas da fusão mitocondrial (b) Esquema representativo dos elementos estruturais de Mfn1 e Mfn2. Os domínios estão representados por diferentes cores. (GTPase, GTPase domain; HR, heptad repeat; PR, Proline rich; TM, transmembrane) Modificações pós traducionais estão representadas por A-acetilação, P-fosforilação, U-ubiquitinação. Fonte: Autor.

2.3.2. Fissão mitocondrial

A fissão é um processo de várias etapas em que a GTPase Drp1 (*dynamin-related protein 1*) desenvolve papel fundamental⁶⁹. A Drp1, descrita inicialmente em *C. elegans*⁷⁰ e leveduras^{60,71}, é uma proteína citoplasmática com cerca de 80 kDa e quatro domínios distintos (Figura 4)⁶⁹. Durante a divisão da mitocôndria, a Drp1 é recrutada para a membrana mitocondrial externa, onde forma uma estrutura semelhante a um anel, que comprime a organela. Com a hidrólise do GTP a compressão aumenta, e as mudanças na estrutura dupla hélice da Drp1 moldam a formação de duas novas organelas⁷².

A Drp1 depende de proteínas adaptadoras para seu correto recrutamento, provavelmente devido à ausência de um domínio PH (*phospholipid-binding pleckstrin homology domain*) em sua estrutura⁷³. Mamíferos contam principalmente com MFF^{74,75} (*mitochondrial fission factor*), MiD49 e MiD51⁷⁶ (*mitochondrial dynamics proteins 49 and 51*) para montar e orquestrar o

posicionamento da Drp1 no local da fissão. Além disso, o estágio final da fissão também parece depender de outras proteínas. Nesse sentido, tem sido demonstrado que o Dnm2 (*Dynamina 2*) exerce papel fundamental no processo de separação das mitocôndrias⁷⁷.

Além de toda maquinaria de adaptadores, a divisão também irá depender da interação da mitocôndria com o ER (retículo endoplasmático)⁷⁸. Antes do recrutamento da Drp1, o ER forma uma zona de contato em volta da mitocôndria, e determina onde será o local da fissão (Figura 4). Esse local de interação auxilia no correto direcionamento da Drp1 bem como das proteínas adaptadoras⁶¹.

Recentes trabalhos apontam que o mtDNA também exerce influência na determinação dos pontos de fissão^{79,80}. Já era conhecida a existência de uma forte ligação entre fissão e manutenção do mtDNA, uma vez que o bloqueio da fissão resulta em nucleóides agregados e depleção de mtDNA⁸¹⁻⁸³. Mas essa ligação se mostrou mais específica a partir da descoberta de que a localização de fatores de fissão (MFF e Drp1) é afetada pelos nucleóides⁷⁹. Além disso, foi demonstrado recentemente que os nucleóides contendo moléculas de mtDNA em replicação estão associados à pontos de divisão guiados pelo ER⁸⁰. Essas evidências colocam a replicação de mtDNA como fator determinante para o início da fissão e abrem novas perspectivas sobre os mecanismos de regulação da dinâmica mitocondrial.

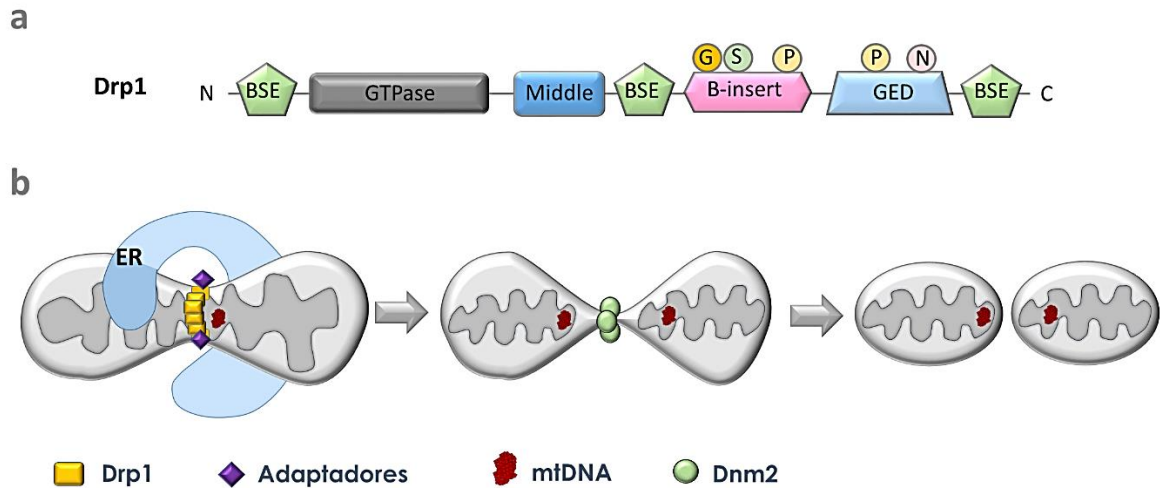


Figura 4: Fissão mitocondrial. (a) Esquema representativo dos elementos estruturais de Drp1. Os domínios estão representados por diferentes cores. (*BSE*, *bundle signalling elements*; *GTPase*, *GTPase domain*; *Middle*, *Middle domain*; *GED*, *GTPase effector domain*); Modificações pós traducionais estão representadas por G-glicosilação; S-sumoilação; P-fosforilação; N-nitrosilação. (b) Esquema representativo das etapas da fissão mitocondrial. A figura mostra o local de fissão mitocondrial determinado pelo mtDNA e retículo endoplasmático (ER). Em seguida, oligômeros de Drp1 atuam na constrição da mitocôndria. A hidrólise do GTP leva a mudanças na conformação e aumenta a constrição pré-existente. Em seguida, Dnm2 é recrutado para auxiliar na cisão e finalização da fissão em duas novas organelas. Fonte: Autor.

2.3.3. Mitofagia

Mitocôndrias disfuncionais podem ser eliminadas por uma forma seletiva de autofagia, conhecida como mitofagia. Apesar de compartilhar alguns mecanismos com a autofagia, a mitofagia ocorre através de um conjunto único de proteínas, que são ativadas por estímulos específicos⁸⁴.

Uma forma conservada de mitofagia ocorre através de PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) e PARKIN (*cytosolic E3 ubiquitin ligase*). Em mitocôndrias saudáveis, PINK1 é importada para dentro da mitocôndria através dos complexos proteicos TIM e TOM, e processada pelas enzimas MPP (*matrix processing peptidase*) e PARL (*PINK1/PGAM5-associated rhomboid-like protease*). No entanto, quando a função mitocondrial é comprometida e a importação de proteínas prejudicada, PINK1 acumula na membrana externa da mitocôndria. Isso leva a fosforilação de ubiquitinas presentes na membrana, com o consequente recrutamento de PARKIN. Em seguida, PINK1 promove a fosforilação e ativação de PARKIN, que auxilia no recrutamento do autofagossomo. A formação do autofagossomo é regulada por cerca de 40 genes relacionados a

autofagia⁸⁵ (*ATG autophagy-related genes*), caracterizados inicialmente em leveduras e posteriormente em mamíferos.

Para que ocorra mitofagia, importantes adaptadores e receptores fazem a conexão entre o autofagossomo e a mitocôndria destinada à degradação⁸⁵. Os adaptadores contêm um domínio de interação com o LC3 e podem atuar dependente ou independentemente de ubiquitinação⁸⁶. Cinco adaptadores têm sido caracterizados de forma dependente de ubiquitinação: p62 (sequestosome-1), OPTN (*optineurin*), NDP52 (*nuclear domain 10 protein 52*), TAX1BP1 (*TAX1 binding protein 1*) e NBR1 (*neighbor of BRCA1 gene 1*). Já os adaptadores CHDH (Choline dehydrogenase) e TBC1D15 (TBC1 domain family member 15) atuam independente de ubiquitinação e provavelmente não dependem de Parkin. Além de auxiliar na detecção do dano mitocondrial, eles alteram sua localização ou a proteína com a qual interagem, guiando as mitocôndrias danificadas para o autofagossomo.

Além dos adaptadores, existem receptores localizados na membrana mitocondrial que podem interagir de forma direta com o LC3 e assim recrutar mitocôndria danificadas aos autofagossomos. NIX (Nip3-like protein X), BNIP3 (BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa Interacting Protein 3) e FUNDC1 (*UN14 domain-containing protein 1*) são receptores que atuam de forma independente de Parkin em condições de hipóxia.

Dados recentes indicam que a mitofagia é de grande relevância para a herança mitocondrial. Nos modelos *in vitro* heteroplásmicos utilizados até o momento, a indução da mitofagia seja pelo tratamento com rapamicina (indutor de mitofagia através da via do mTOR – *mammalian target of rapamicyn*) ou pela super expressão de Parkin resultou em diminuição dos níveis de mtDNA mutado^{87,88}. No entanto, faltam evidências das bases moleculares desse mecanismo. Além disso, a ocorrência de mitofagia durante a linhagem germinativa e sua associação com mecanismos de seleção de mtDNA mutante ainda é alvo de discussão.

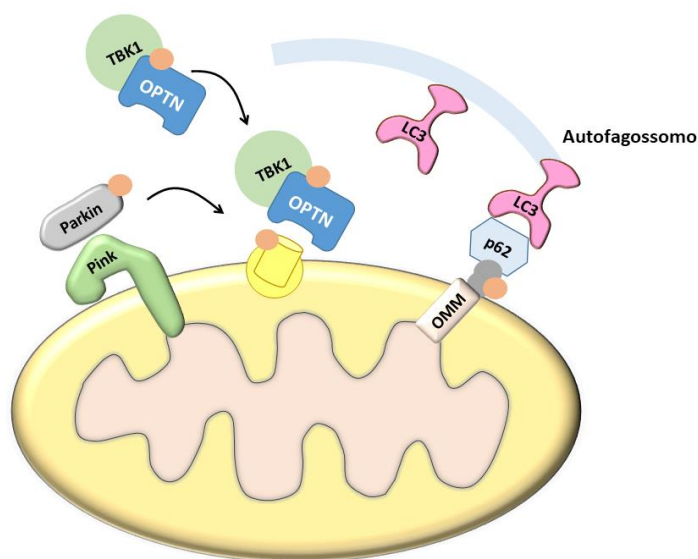


Figura 5: Mecanismos moleculares da via PINK1-Parkin. Em mitocôndrias com função comprometida, PINK1 é estabilizado na membrana mitocondrial externa (OMM), promovendo o recrutamento de Parkin. Parkin ubiquitina vários componentes da membrana externa. As cadeias Poly-Ub são subsequentemente fosforiladas por PINK1 servindo como um sinal para a maquinaria autofágica. Proteínas adaptadoras (p62, OPTN, entre outros) reconhecem cadeias poli-Ub fosforiladas e iniciam a formação de autofagossomos através da ligação com LC3. Fonte: Autor.

2.4. Mitocôndria na linhagem germinativa

A herança mitocondrial é um processo amplamente coordenado entre gerações através da linhagem germinativa feminina. A partir da fecundação, o zigoto passa por diversas divisões, denominadas clivagens, antes de implantar-se no útero. No início deste período, o embrião é sustentado pelo conteúdo citoplasmático herdado do oócito, o qual possui grande quantidade de mitocôndrias, além de um extenso estoque de RNA, proteínas e ATP⁸⁹.

Assim como ocorre com o volume citoplasmático, o número total de mitocôndrias se mantém constante no embrião desde a fecundação até o estágio de blastocisto^{90,91}. Como resultado, as mitocôndrias maternas presentes no zigoto são progressivamente distribuídas entre os blastômeros, resultando em células com baixo conteúdo relativo de mtDNA (Figura 6).

Após a implantação e durante a gastrulação inicia-se o desenvolvimento das células primordiais germinativas (PGCs - ~E.6 em camundongos), que possuem apenas cerca de 200 cópias de mtDNA^{12,92}. Esse é considerado um momento crucial na herança mitocondrial, uma vez que delimita as moléculas de mtDNA que estarão presentes na próxima geração. As PGCs se proliferam e, após migração, colonizam as cristas genitais (E10,5 em camundongos)⁹³. Em

seguida, se replicam e, por divisão meiótica, dão origem a milhares de oócitos primários que ficam estacionados em fase de diplóteno da prófase I^{94,95}.

Na fase adulta e concomitantemente a foliculogênese, parte dos oócitos bloqueados em prófase I é recrutada a crescer e produzir um gameta competente para fecundação. Durante este período o oócito tem seu desenvolvimento auxiliado por células somáticas (e.g., granulosa) que compõem o folículo ovariano. Com a proliferação e diferenciação celular, os folículos passam a serem classificados em primário, secundário, terciário (ou antral) e pré-ovulatório⁹⁶. O oócito desempenha importante papel na coordenação da proliferação celular e crescimento do folículo, e recebe das células somáticas aminoácidos (e.g. L-alanina), colesterol e moléculas energéticas.

Durante a foliculogênese há intensa replicação mitocondrial no oócito, resultando em gametas com cerca de 200.000 moléculas de mtDNA. Esse aumento é acompanhado pela intensa biogênese mitocondrial, passando de dezenas para ~100.000 mitocôndrias em oócitos totalmente crescidos. Isso faz com que cada mitocôndria atue como uma unidade segregativa de uma ou duas cópias de mtDNA^{97,98}. O crescimento resulta em oócitos com cerca de 80 µm de diâmetro (e.g., camundongos) e, mitocôndrias fragmentadas, arredondadas e com poucas cristas, os quais são fortes indícios de baixa OXPHOS⁹⁹.

Na progressão do seu desenvolvimento, o oócito entra no estágio de maturação, onde dá continuidade à meiose até a fase de metáfase II, com consequente exclusão do primeiro corpúsculo polar. Nesse momento, as mitocôndrias se redistribuem ao redor do fuso meiótico, provavelmente devido à alta demanda energética¹⁰⁰. Uma vez que o oócito se torna independente das células somáticas, o papel das mitocôndrias se torna crítico para o desenvolvimento do gameta. Na fecundação por um espermatozoide haplóide, o oócito completa a segunda divisão meiótica e extrusa o segundo corpo polar, dando origem ao zigoto e início de um novo ciclo.

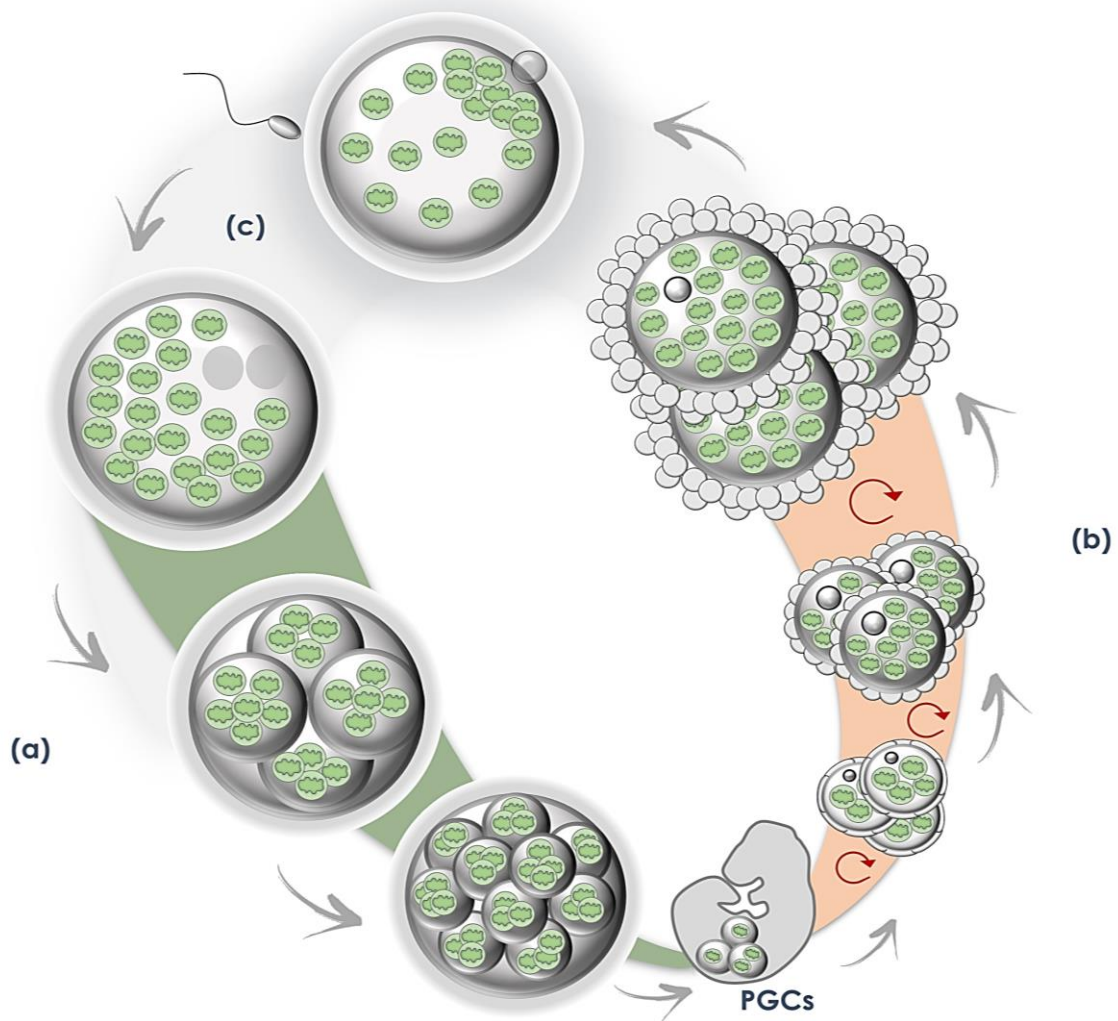


Figura 6: Mitocôndria na linhagem germinativa. (a) O conteúdo mitocondrial herdado do oócito (cerca de 100.000 cópias de mtDNA) é progressivamente dividido entre os blastômeros durante o desenvolvimento inicial, resultando em células com baixo número de mitocôndrias e conseqüentemente mtDNA. Esse efeito leva a formação de PGCs (células primordiais germinativas) contendo cerca de 200 cópias de mtDNA. (b) Durante a fase fetal, as PGCs se desenvolvem e dão origem a milhões de oócitos que ficam estacionados na fase de prófase I. Na fase adulta, os oócitos se desenvolvem num processo conhecido como foliculogênese. Essa fase é caracterizada por intensa replicação e biogênese mitocondrial (representada por setas vermelhas). Fonte: Autor.

2.5. Herança mitocondrial

O sequenciamento de mtDNA na década de 80^{3,4} possibilitou o início da identificação de mutações causadoras de doenças mitocondriais. Atualmente existem mais de 260 mutações caracterizadas em humanos e que estão ligadas a doenças de diagnóstico complexo e tratamento apenas paliativo⁵.

A cada 100.000 pessoas, cerca de 9,6 apresentam doenças causadas por mutações no mtDNA⁷. No entanto, estima-se que a presença de mutações na população seja muito maior⁸. Na verdade, a recente utilização de técnicas avançadas de sequenciamento mostrou que todos os indivíduos carregam baixos níveis de mutações no mtDNA¹⁰¹. Muitas dessas mutações têm sido associadas ao risco de desenvolver diversos distúrbios metabólicos e neurodegenerativos na fase adulta, além de doenças como câncer e diabetes⁹. Portanto, ao contrário do que se imaginava, mutações no mtDNA contribuem tanto para doenças genéticas quanto para doenças comuns, em ação conjunta com outros mecanismos. Isso realça a importância de se entender os mecanismos que controlam a herança mitocondrial, que ainda não são totalmente conhecidos.

A herança de mtDNA é exclusivamente materna, salvo raras exceções. Apesar de um recente trabalho levantar a possibilidade de herança biparental em humanos¹⁰², esse fato se mostrou pouco provável, uma vez que questões técnicas, principalmente quanto a incorporação de NUMTs (*nuclearmitochondrial DNA segments*)², auxiliaram na interpretação dos dados. Além disso, diversos trabalhos já haviam identificado mecanismos eficazes de destruição de mitocôndrias paternas após a fecundação¹⁰³.

Os primeiros estudos envolvendo os mecanismos de herança mitocondrial foram realizados em bovinos^{104,105}, os quais observaram que algumas variantes heteroplásmicas se fixavam rapidamente na população. Este resultado levou a teoria de que as diferentes proporções de mtDNA presentes nos descendentes eram resultado de uma pequena amostra de mitocôndrias maternas. Esse efeito pode ser melhor explicado com a seguinte analogia: se uma amostragem grande é realizada em um recipiente repleto de bolas azuis e vermelhas, há grande chance de se obter bolas de diferentes cores. No entanto, no caso de uma amostragem pequena, a chance de se obter bolas apenas azuis ou apenas vermelhas é maior. No caso da herança mitocondrial, as variantes se fixam em poucas gerações devido à um efeito semelhante, considerando uma pequena amostragem de mtDNA materno que é selecionada na linhagem germinativa e se prolifera nos descendentes. Esse efeito foi demonstrado em diferentes espécies^{97,106,107} e ficou conhecido como gargalo genético mitocondrial.

O evento que explica esse mecanismo é a diminuição no número de cópias de mtDNA durante a transmissão^{12,97}. Conforme apresentado na sessão anterior, a partir do momento da fertilização todas as mitocôndrias provenientes do oócito são partilhadas entre as células, resultando numa drástica redução de cópias de mtDNA por célula durante a formação das PGC¹². Na presença de heteroplasmia, cada PGC passa a ter uma proporção diferente de moléculas mutantes e conseqüentemente influencia o nível de mutação da próxima geração. Dessa forma, o gargalo genético contribui para a rápida segregação de novos genótipos mitocondriais⁹⁷.

Apesar do gargalo genético explicar boa parte dos resultados de segregação de mtDNA⁹⁷, outros mecanismos parecem estar atuando, e provavelmente são dependentes do caráter da mutação. Algumas mutações em humanos variam rapidamente quanto à frequência, (e.g. m.8993T>G) e outras (e.g. m.8344A>G) apresentam níveis estáveis entre gerações¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

Um recente trabalho em humanos mostrou que variantes de mtDNA sofrem seleção durante a linhagem germinativa¹¹¹. Os autores analisaram indivíduos com níveis heteroplásmicos abaixo do que tipicamente causam doenças, e mostraram a ocorrência de seleção contra variantes não sinônimas. Esse fenômeno já foi demonstrado em outras espécies¹³ e confirma que a seleção é mais pronunciada em mutações não sinônimas em comparação com as sinônimas.

Na tentativa de identificar os mecanismos responsáveis por essa seleção, um recente trabalho envolvendo embriões humanos mostrou que o metabolismo oxidativo durante a especificação de PGCs pode dirigir a seleção de mtDNA mutantes¹⁶. Neste caso, os dados fornecem evidências de que variantes que comprometem a produção de ATP são negativamente selecionadas.

Apesar de apresentar dados de extrema relevância, o estudo em humanos ainda encontra muitas dificuldades. Por isso grande parte dos avanços nessa área provém de estudos com modelos animais. Em camundongos, dados robustos sobre a seleção contra mutações que afetam a função mitocondrial têm sido reportados^{112,113}. Esse efeito pode ser observado tanto em mutações causadoras de fenótipo mitocondrial¹³ quanto em animais contendo haplótipos mitocondriais oriundos de linhagens diferentes^{55,114,115}.

Os mecanismos responsáveis pela seleção de mtDNA podem ocorrer a nível de indivíduo, celular ou até mesmo a nível de organela. Nesse sentido, várias hipóteses têm sido consideradas. Uma possibilidade seria a replicação preferencial de moléculas durante o desenvolvimento do oócito¹². No entanto, os mecanismos que regulam a seleção de moléculas ou mesmo a intensa replicação que ocorre durante esse período ainda não são conhecidos.

Outros trabalhos sugerem que o mtDNA passa por uma seleção, de forma ativa, na linhagem germinativa, resultando na eliminação de mutações severas¹¹². Nesse sentido, as variantes de

mtDNA que levam a um defeito severo no desempenho mitocondrial seriam identificadas e eliminadas. No entanto, se esse mecanismo é específico de algumas mutações ou um efeito generalizado ainda precisa ser testado¹¹⁶.

Outro fator crítico é a determinação do momento exato da ocorrência de seleção. Nesse sentido, o estágio de formação das PGCs provavelmente é um momento decisivo, principalmente devido à redução do número de cópias de mtDNA¹⁶. Em contrapartida, vários trabalhos indicam a ocorrência de seleção em outros momentos da linhagem germinativa, como durante o desenvolvimento do oócito¹¹⁷ ou mesmo durante o desenvolvimento pós-implantação¹¹⁸ (Figura 7).

De modo geral, esses resultados sugerem a existência de seleção atuando em diferentes etapas do desenvolvimento da linhagem germinativa. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis por essa seleção ainda não foram estabelecidos.

Nesse sentido, algumas evidências surgiram recentemente envolvendo a dinâmica mitocondrial. Um trabalho em *Drosophila*¹⁴ mostrou a importância da fragmentação mitocondrial em células germinativas, a qual impede a troca de mtDNA entre as organelas. Isso faz com que cada mitocôndria atue como uma unidade segregativa, o que acaba por conduzir a seleção contra mtDNA mutado¹⁴. Esse resultado é apoiado por análises computacionais que verificaram a influência da dinâmica mitocondrial no acúmulo de mutações no mtDNA¹¹⁹. Deste modo, é plausível considerar que a dinâmica mitocondrial tenha papel fundamental nos mecanismos de herança mitocondrial durante a linhagem germinativa.

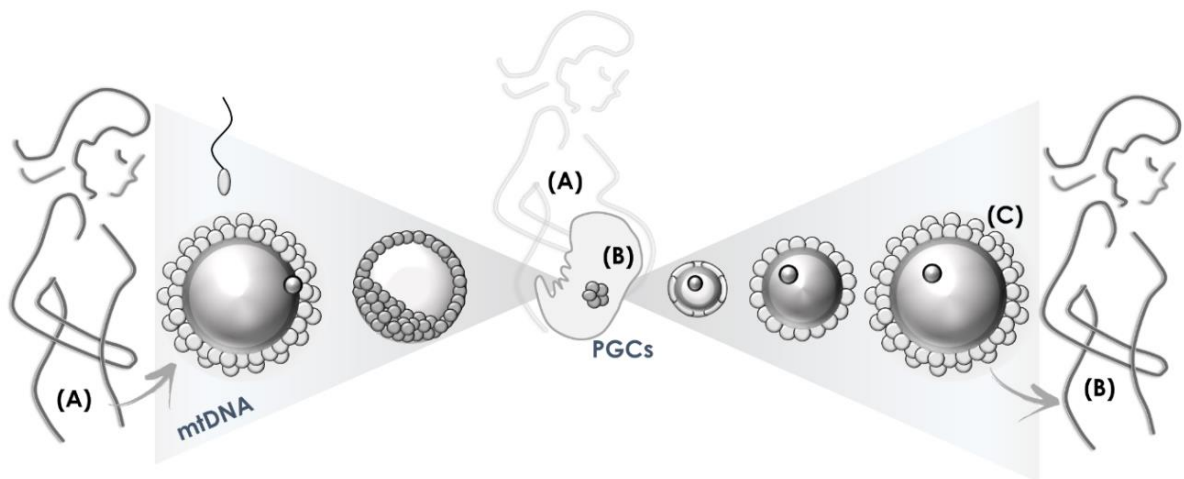


Figura 7: Herança mitocondrial. O conteúdo mitocondrial presente no oócito recém fecundado pertencente a mulher (A) é progressivamente dividido entre as células levando a diminuição da quantidade de mtDNA/célula. Durante o desenvolvimento do feto do sexo feminino (B) inicia-se a formação das células germinativas da geração seguinte (C). Na fase adulta de (B), os oócitos (C) se desenvolvem acompanhados de intensa replicação e biogênese mitocondrial. Fonte: Autor.

3. Hipótese

A dinâmica mitocondrial interfere sobre a herança mitocondrial na linhagem germinativa feminina, conseqüentemente afetando os níveis de mutação mitocondrial na geração seguinte.

4. Objetivos

Investigar o papel da dinâmica mitocondrial sobre a herança mitocondrial em camundongos heteroplásmicos;

Objetivos específicos

1. Avaliar o papel da fusão mitocondrial (Mfn1 e Mfn2) durante embriogênese inicial.
2. Avaliar o papel da dinâmica mitocondrial (Mfn2 e Drp1) durante o desenvolvimento das PGCs.
3. Avaliar o papel da dinâmica mitocondrial (Mfn2) e autofagia (Atg7) durante o desenvolvimento do oócito.

5. Metodologia

5.1. Obtenção e manutenção dos animais de experimento

As linhagens de $Mfn1/2^{loxP/loxP}$ foram originalmente obtidas do “Mutant Mouse Regional Resource Centers” Davis, CA, USA; (RRID: MMRRC Cat# 029901-UCD, RRID:MMRRC_029901-UCD and MMRRC Cat# 029902-UCD, RRID:MMRRC_029902-UCD). As linhagens ZP3-Cre e POU5F1-EGFP foram originalmente obtidas do “Jackson Laboratory” (Bar Harbor, ME, USA; RRID: IMSR Cat#JAX:003651, RRID:IMSR_JAX:003651). Já a linhagem $Atg7^{loxP/loxP}$ foi cedida pelo Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, a qual foi originalmente construída por Komatsu e colaboradores¹²⁰. A linhagem heteroplásmica foi previamente estabelecida no Laboratório de Genética e Biotecnologia – LAGENBIO a partir da transferência de citoplasma de zigotos NZB/BINJ para zigotos C57BL/6.

Todos os experimentos foram realizados conforme os regulamentos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Brasil) e foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar - 1060020616 e 7788150318). Os animais foram mantidos em 12 horas de luz e 12 horas de escuro a 24°C com acesso ilimitado à ração e água.

5.2. Cruzamentos para obtenção dos genótipos de interesse

Nocaute condicional de Mfn2 no oócito: Fêmeas contendo 50-70% de mtDNA NZB foram acasaladas com machos portadores do transgene Zp3-Cre para obtenção de fêmeas heteroplásmicas e portadoras do transgene Zp3-Cre (B6/NZB; Zp3-Cre^{+/-}). A seguir, essas fêmeas foram acasaladas com machos portadores do genótipo $Mfn2^{loxP/loxP}$. A progênie resultante foi utilizada para a composição de matrizes (fêmeas: B6/NZB; Zp3-Cre^{+/-}; $Mfn2^{loxP/+}$ e machos Zp3-Cre^{+/-}; $Mfn2^{loxP/+}$) para obtenção de fêmeas utilizadas para coleta de oócito pertencentes ao grupo selvagem (WT) ou nocaute ($Mfn2$ cKO): B6/NZB; Zp3-Cre^{+/-}; $Mfn2^{+/+}$ (WT), B6/NZB; Zp3-Cre^{+/-}; $Mfn2^{loxP/-}$ ($Mfn2$ cKO).

Nocaute de Mfn1 e Mfn2 para obtenção de fetos e MEFs: As mesmas matrizes mencionadas acima (fêmeas: B6/NZB; Zp3-Cre^{+/-}; Mfn2^{loxP/+} e machos Zp3-Cre^{+/-}; Mfn2^{loxP/+}) foram utilizadas para selecionar fêmeas e machos com os respectivos genótipos 50-70% NZB; Mfn2^{+/-} e Mfn2^{+/-}. Os animais foram acasalados e os fetos resultantes foram utilizados para análise de mtDNA e derivação de MEFs. O mesmo foi realizado para o Mfn1, cujo os animais (fêmeas: B6/ NZB; Zp3-Cre^{+/-}; Mfn1^{loxP/+} e machos: Zp3-Cre^{+/-}; Mfn1^{loxP/+}) já estavam disponíveis no laboratório.

Nocaute de Mfn2 para obtenção de PGCs: As mesmas matrizes mencionadas acima (fêmeas: B6/NZB; Zp3-Cre^{+/-}; Mfn2^{loxP/+} e machos Zp3-Cre^{+/-}; Mfn2^{loxP/+}) foram utilizadas para selecionar fêmeas e machos com os respectivos genótipos B6/NZB; Mfn2^{+/-} e Mfn2^{+/-}. Os machos foram então cruzados com fêmeas homocigotas para POU5F1-EGFP. Os descendentes machos portadores do genótipo POU5F1-EGFP^{+/-}; Mfn2^{+/-} foram novamente cruzados com fêmeas homocigotas POU5F1-EGFP para obtenção de machos POU5F1-EGFP^{+/+}; Mfn2^{+/-}. Esses, por sua vez, foram acasalados com fêmeas do genótipo B6/NZB; Mfn2^{+/-} para obtenção de fetos pertencentes ao grupo selvagens (WT) ou nocaute (Mfn2 KO): B6/NZB; Mfn2^{+/+} (WT), B6/NZB; Mfn2^{-/-} (Mfn2 KO), os quais foram utilizados para coleta de PGCs.

Nocaute condicional de Atg7 no oócito: Fêmeas contendo 50-70% de mtDNA NZB foram acasaladas com machos portadores do transgene Zp3-Cre para obtenção de fêmeas heteroplásmicas e portadoras do transgene Zp3-Cre (B6/NZB; Zp3-Cre^{+/-}). A seguir, essas fêmeas foram acasaladas com machos portadores do genótipo Atg7^{loxP/loxP}. A progênie resultante foi por fim acasalada entre si para obter fêmeas selvagens (WT) ou nocaute (Atg7 cKO): B6/NZB; Zp3-Cre; Atg7^{+/+} (WT), B6/NZB; Zp3-Cre; Atg7^{loxP/-} (Atg7 cKO).

5.3. Genotipagem

Para genotipagem dos animais foi utilizado o DNA total isolado de biópsia de orelha, como descrito previamente¹²¹. Resumidamente, as biópsias foram incubadas com 200 µl de solução de digestão [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml gelatina, 0,45% Nonidet P-40, 0,45% Tween-20 e 125 µg/ml proteinase K] por 3 h à 55°C^{121,122} seguido de inativação da proteinase K através da incubação por 10 min à 95°C. O mesmo protocolo de digestão foi utilizado para genotipagem de MEFs, membranas extra-embrionárias, PGCs e oócitos, sendo que para células individuais o volume total utilizado foi de 5 µl (vide abaixo).

Todas as reações descritas abaixo foram conduzidas em termociclador Veriti (Applied Biosystems), no volume total de 15µl contendo 7,5µl 2x Taq Pol mastermix (Cellco), 0,3µl de *primers* (20µM), 2,2µl H₂O e 5µl do lisado. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2%.

A genotipagem de Mfn1 e Mfn2 foi realizada como descrito por Chen e colaboradores⁶³. Resumidamente, a determinação dos sítios Loxp e da sequência recombinada foi realizada a partir de duas reações de PCR conduzidas separadamente. A seguinte ciclagem foi utilizada: 1 ciclo de 95°C por 1 min, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, seguido de 65°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos, e 1 ciclo de 72°C por 2 minutos. Foram utilizados os seguintes *primers* para Loxp: Mfn1-F: TGGTAATCTTTAGCGGTGCTC; Mfn1-R: AGCAGTTGGTTGTGTGACCA (Selvagem:350pb e Loxp: 450pb); Mfn2-F: GAAGTAGGCAGTCTCCATCG, Mfn2-R: AACATCGCTCAGCCTGAACC (Selvagem: 145pb e Loxp: 180 pb). Para a checagem da recombinação foram utilizados: Mfn1-F2: TGGAAGCCACCCAGTGTTAC, Mfn1-R2: AGCCCTGAGTTCTATCCCCTA (Selvagem: 828pb e excisado: 372pb); Mfn2-F2: TGTTGGCAAGAAGCAGGACA, e Mfn2-R2: AGAAGAGCATGTGTGCTCCC (Selvagem:1004pb e excisado: 412pb).

A genotipagem de ATG7 foi realizada como descrito por Komatsu e colaboradores¹²⁰. Resumidamente, a determinação dos sítios Loxp e da sequência recombinada foi realizada a partir de duas reações de PCR conduzidas separadamente de acordo com a seguinte ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 1 min, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, seguido de 60°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos, e 1 ciclo de 72°C por 2 minutos. Foram utilizados os seguintes *primers* para Loxp: HindFW: TGGCTGCTACTTCTGCAATGATGT; Atg7-ex14-F: TCTCCAAGACAAGACAGGGTGAA; Pst-Rv: CAGGACAGAGACCATCAGCTCCAC (Selvagem: 216pb e Loxp: 500pb). Para a checagem da recombinação foram utilizados: HindFW: TGGCTGCTACTTCTGCAATGATGT Atg7-ex14-R: AAGCCAAAGGAAACCAAGGGAGTG (Selvagem:1641pb e excisado: 600pb).

A presença do transgene Zp3-CRE foi verificada a partir de reação de PCR de acordo com a seguinte ciclagem: 1 ciclo de 95oC por 1 min, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, seguido de 60°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos, e 1 ciclo de 72°C por 2 minutos. Foram utilizados os seguintes *primers* para Zp3-CRE: TTGATAATGGGCTCCACCCG e GCCAACCTCATCACTCGTTG (produto de PCR de 262 pb) e Controle interno: CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT (*forward*); GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC (*reverse*).

A determinação do sexo dos fetos utilizados para coleta de PGC foi realizada a partir de uma reação de PCR para o gene SRY (*sex-determining region Y*) conduzida de acordo com a seguinte ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 1 min, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, seguido de 60°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos, e 1 ciclo de 72°C por 2 minutos. Foram utilizados os seguintes *primers*: SRY-F: AGCTGACATCACTGGTGAGC e SRY-R: ATGAGACTGCCAACACAGG (Produto de PCR de 71pb).

5.4. Derivação e cultivo de MEFs

Animais heteroplásmicos e heterozigotos (B6/NZB-Mfn1^{+/-},Mfn2^{+/+} ou B6/NZB-Mfn1^{+/+},Mfn2^{+/-}) foram acasalados e a cópula confirmada por observação da presença de tampão vaginal (plug). No E10,5, as fêmeas prenhes foram sacrificadas para recolhimento dos úteros gravídicos os quais foram alocados em placas contendo solução salina fosfatada (PBS)¹²³⁻¹²⁷. Após lavagem em PBS, os úteros foram dissecados e os fetos recuperados individualmente. Durante a dissecação, as membranas extra-embriônicas foram coletadas e utilizadas para posterior determinação do genótipo dos fetos. As MEFs heterozigotas para Mfn1 ou Mfn2 foram descartadas, sendo mantidas somente as homozigotas (selvagem e nocaute). As células dos fetos foram desagregadas por pipetagem em meio DMEM (cat. # 12800082; Thermofisher) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Thermofisher), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. A seguir, as células provenientes de cada feto foram cultivadas em placas de 6 poços e tiveram o meio trocado após 24 h para remover as células não aderentes. A partir deste momento, o meio foi trocado a cada dois dias, e ao atingirem 90% de confluência as células foram repicadas. Parte das células foi utilizada para determinação do nível de mtDNA NZB¹²¹.

5.5. Coleta de PGCs

Fêmeas heteroplásmicas e heterozigotas para Mfn2 (B6/NZB-Mfn2^{+/-}) foram acasaladas com machos também heterozigotos para Mfn2 que expressam EGFP especificamente em PGCs (POU5F1-EGFP-Mfn2^{+/-}). A coleta foi realizada no E10,5. No dia da coleta, o âmnio (anexo embrionário contendo apenas tecido de origem fetal) foi separado para confirmação do genótipo por PCR, enquanto os fetos foram utilizados para o isolamento e coleta de PGCs. Para tal, primeiramente foi realizado o isolamento das gônadas manualmente em microscópio

estereoscópio e a confirmação da fluorescência em microscópio invertido. Em seguida, as gônadas foram digeridas com colagenase tipo I (Sigma cod.CO130) durante 15 minutos a 37°C, conforme descrito por Wai. et. al 2008³². Logo após, as células positivas para EGFP foram coletadas individualmente com auxílio de micromanipulador.

5.6. Manutenção e modificação de ESCs por CRISPR

A manutenção dos ESCs foi feita conforme descrito anteriormente¹²⁸. Em resumo, as células foram cultivadas em placas de 6 poços revestidas com poli-l-ornitina (0.01%; Sigma) e laminina (10 ng/ml; Sigma), com a passagem realizada a cada dois dias, usando de 2×10^5 a 3×10^5 células por poço, em meio 2i + LIF. Para o nocaute via CRISPR, o gRNA foi desenhado usando a ferramenta “Benchling CRISPR gRNA Design” e clonado no vetor px330-mCherry seguindo o protocolo de Zhang. As células foram transfectadas utilizando Lipofectamine Stem Reagent (ThermoFisher Scientific) por 7 horas e a fluorescência (mCherry) foi analisada por citometria de fluxo (BD FACS Melody – BD Biosciences) após 24 horas. As células positivas foram separadas individualmente por FACS em placas de 96 poços para o estabelecimento de linhagens clonais. Após aproximadamente 7 dias, o repique manual foi realizado para placas de 24 poços e dois dias depois as linhagens foram repicadas em placas de 6 poços aonde foram mantidas conforme descrito acima. Após estabelecidas, as linhagens clonais foram selecionadas e avaliadas quanto a presença de proteínas alvo do nocaute por western blot. Para isso, a concentração de proteínas foi previamente determinada por Bradford e as amostras contendo 30 µg foram aquecidas a 56°C por 10 minutos e aplicados em gel midi bis-tris BT 4-12%, submetido a 180V por 40 minutos. A transferência foi realizada no equipamento iBlot (ThermoFisher Scientific) seguido de bloqueio com leite 5% por 1 hora. A incubação de anticorpos primários e secundários foram realizados conforme recomendação do fabricante e a revelação utilizando o kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

5.7. Diferenciação in vitro e coleta de PGCLC

Para diferenciação de PGCLC, as ESCs foram primeiramente diferenciadas em EpiLCs. Para isso, as células (1×10^5) foram cultivadas em placas de 12 poços revestidas com fibronectina humana (Millipore) e meio contendo activin A (Peprotech) e bFGF (Invitrogen). Após dois dias, os EpiLCs foram utilizados para a diferenciação de PGCLC conforme descrito anteriormente¹²⁸.

Em resumo, 2×10^3 células foram cultivadas por 4 dias em placa Lipidure-Coat com meio (GMEM) contendo KSR, NEAA, piruvato de sódio, l-glutamina, penicilina-estreptomicina, β -mercaptoetanol, BMP4, BMP8a, SCF, ESGRO e EGF. As concentrações finais de cada fator de crescimento foram 500 ng ml⁻¹ BMP4, 500 ng ml⁻¹ BMP8a, 100 ng ml⁻¹ SCF, 1.000 U ml⁻¹ LIF e 50 ng ml⁻¹ EGF. Após 4, 5, 6, e 7 dias do início do protocolo as amostras de cada poço foram coletadas individualmente. Para isso, o meio contendo as células foi recuperado em um tubo falcon de 15ml e centrifugado por 220g por 1 minuto. O pellet foi então incubado com 500 μ l de tripsina-EDTA 0,5% por aproximadamente 5 minutos a 36°C, misturado com 500 μ l de meio MEF e dissociado através de poucas pipetagens. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 220g por 5 minutos. O pellet foi suspenso em meio PGCLC previamente filtrado e classificadas usando FACS Aria II (BD Biosciences).

5.8. Coleta de Oócitos

Fêmeas com diferentes idades foram superovuladas utilizando 5 U.I. de eCG (gonadotrofina coriônica equina; Folligon, MSD Saúde Animal) por injeção via intraperitoneal (NAGY et al., 2003). Após 43-44 horas, os ovários foram coletados e os folículos antrais rompidos com agulha 30G para obtenção dos complexos cumulus-oócito (COCs) imaturos em meio MEM-alpha (ThermoFisher Scientific) tamponado com HEPES. A morfologia dos COCs foi analisada em microscópio invertido (Ti-S, Nikon). Em seguida os COCs foram desnudados, e os oócitos lavados, selecionados e individualmente coletados em PBS (Sigma-Aldrich) contendo 0,01% BSA e mantidos a -80°C até o uso.

5.9. Análise de cópias de mtDNA e heteroplasmia em PGCLC

A quantidade de cópias de mtDNA presente nas PGCLC foi determinada utilizando ddPCR (Bio-Rad) conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram primeiramente lisadas em 4 μ l de tampão de lise (previamente preparado com 100 μ l de Tris pH 8,5 (50mM), 5 μ l de Triton X 100, 20 μ l de Proteinase K (20mg/ml) e 795 μ L de H₂O) a 37°C por 30 minutos, seguidos por inativação a 80°C por 15 minutos. Logo após, 3 μ l de H₂O foram adicionados a cada lisado. Em paralelo, uma solução contendo 11 μ l de 2 \times ddPCR super mix, 0,66 μ l de Primer (10uM) e 0,44 μ l de Probe (10uM), 4,48 μ l de H₂O e 3 μ l de lisado foi preparada.

Foram utilizados dois conjuntos de *primers*: (ND1- F: GAGCCTCAAACCTCAAATACTCACT, ND1-R: GAACTGATAAAAAGGATAATAGCTATGGTTACTTCA, CO3-F: CCTCGTACCAACACATGATCTAGG, CO3-R: AGTGGGACTTCTAGAGGGTTAAGTG) e duas probes (FAM- CCGTAGCCCAAACAAT e HEX-ACCTCCAACAGGAATTTCA). As amostras foram alocadas em gerador de gotículas “Automated Droplet Generator” (#1864101; Bio-Rad) utilizando placas de 96 poços, as quais em seguida foram seladas com folha perfurável. Após a PCR, a leitura foi realizada utilizando QX100 Droplet Reader (186-3003; Bio-Rad).

A heteroplasmia (nível de mutação) de PGCLCs foi avaliada por Pyrosequencing – PyroMark Q48 QIAGEN. Para isso, primeiramente uma reação de PCR contendo 12,5 µl de 2x PyroMark PCR Master Mix, 2,5 µl CoralLoad, 1,5 µl de MgCl₂, 5 µl de Qsolution, 0,5 µl de cada *primer* (10 µM) e 3 µl de lisado foi preparada. A PCR foi conduzida de acordo com a seguinte ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 15 minutos; 45 ciclos de 94°C por 30 segundos seguido de 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. Os *primers* utilizados foram: Forward-5' biosg/TTCCACCCTAGCTATCATAAGC Reverse-CGTAGGTTTAATTCCTGCCAATCT. O produto de PCR foi então analisado em PyroMark Q48 (Qiagen), utilizando o *primer* de sequenciamento TGTAGGATGAAGTCTTACA conforme recomendações do fabricante.

5.10. Análise de cópias de mtDNA e heteroplasmia em oócitos

O número total de cópias de mtDNA e nível de NZB foram determinados utilizando PCR quantitativo (qPCR), como descrito anteriormente⁵⁷. Resumidamente uma reação contendo 7 µl de 2x SYBR Green Master Mix (ThermoFisher), 1 µl de (3 µM) *primer*, 1,35 µl de H₂O, 0,15 µl de ROX dye (ThermoFisher) e 5 µL do lisado foi preparada. As amplificações foram realizadas utilizando o qPCR 7500 Fast (thermoFisher) e a seguinte ciclagem: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 62°C durante 1 minuto. A fluorescência foi adquirida ao final de cada passo de extensão. Para a quantificação de mtDNA uma curva padrão foi utilizada, a qual consiste de DNA plasmidial contendo o fragmento de 736-pb que engloba nucleotídeos 3.455 a 4.190 de mtDNAs de B6 e NZB. Foram utilizadas as concentrações de 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ e 10³ cópias, preparadas a partir do estoque antes de cada reação de qPCR. A amplificação foi realizada utilizando o conjunto de *primers* MT14-CTCCGTGCTACCTAAACACCTTATC e MT15-GACCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATG.

O nível de NZB foi mensurado por amplificação paralela de mtDNA NZB e B6 em reações independentes por qPCR com base na tecnologia ARMS¹²¹. Os parâmetros foram os mesmos descritos para cópias de mtDNA com exceção aos *primers*. O conjunto de *primers* ARMS22-TTATCCACGCTTCCGTTACGtC e MT20-TGGCACTCCCGCTGTAAAAA foi utilizado para mensurar a quantidade de mtDNA NZB enquanto o conjunto de ARMS2-CCTAAGAAGATTGTGAAGTAGATGATGtC e MT14-CTCCGTGCTACCTAACACCTTATC foi utilizado para mensurar a quantidade de mtDNA B6.

5.11. Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas GraphPad Prism 8 e SAS v. 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc.) e nível máximo de significância igual a 5% (erro α). Os dados foram avaliados quanto as premissas de distribuição normal e homogeneidade de variâncias, e quando necessário transformados (e.g., raiz quadrada, inversa, exponencial ou log). Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de médias de Tukey e apresentados como médias \pm o erro padrão da média (SEM).

6. Resultados e Discussão

6.1. Papel da dinâmica mitocondrial durante a formação de PGCLCs

Conforme detalhado anteriormente, um momento crítico na herança mitocondrial é a formação de PGCs. Um dos motivos se deve ao reduzido número de cópias de mtDNA por célula, que em situação de heteroplasmia, força a segregação de variantes. A formação de PGCs pode ser realizada *in vitro*¹²⁸ a partir de células pluripotentes, tais como células tronco embrionárias (*Embryonic Stem Cells* – ESCs). A derivação de PGCs *in vitro*, denominadas PGCLCs, faz parte de um protocolo estabelecido, no qual as PGCLCs são viáveis, capazes de se desenvolverem a oócitos competentes, e de sustentarem o desenvolvimento a termo de animais saudáveis¹²⁸.

A especificação de PGCLCs representa um excelente modelo para o estudo da transmissão de mtDNA, uma vez que o cultivo *in vitro* facilita a interferência sobre os mecanismos moleculares subjacentes. Nesse contexto, esse trabalho utilizou o protocolo de derivação de PGCLCs para investigar o efeito da dinâmica mitocondrial sob a segregação de mtDNA mutante. Para isso, a estratégia utilizada foi a de modificar ESCs heteroplásmicas utilizando CRISPR, com a finalidade de realizar o nocaute de Mfn2 ou Drp1, e posteriormente utiliza-las na derivação de PGCLCs, conforme esquematizado na figura abaixo (Figura 8).

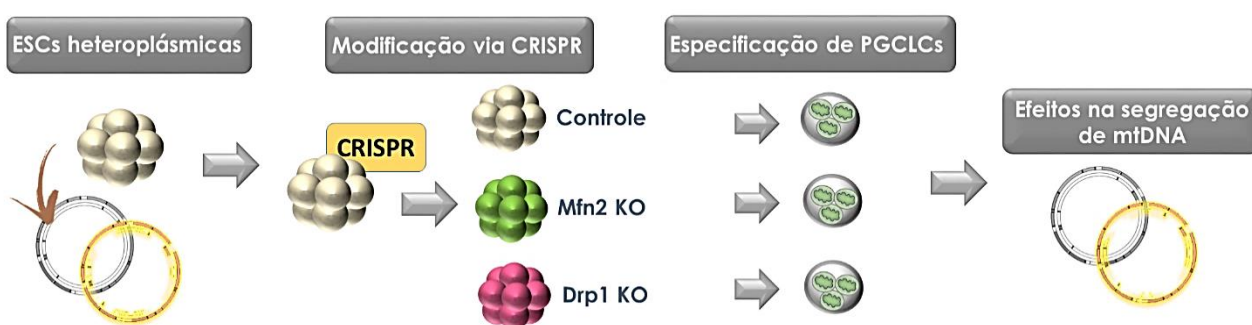


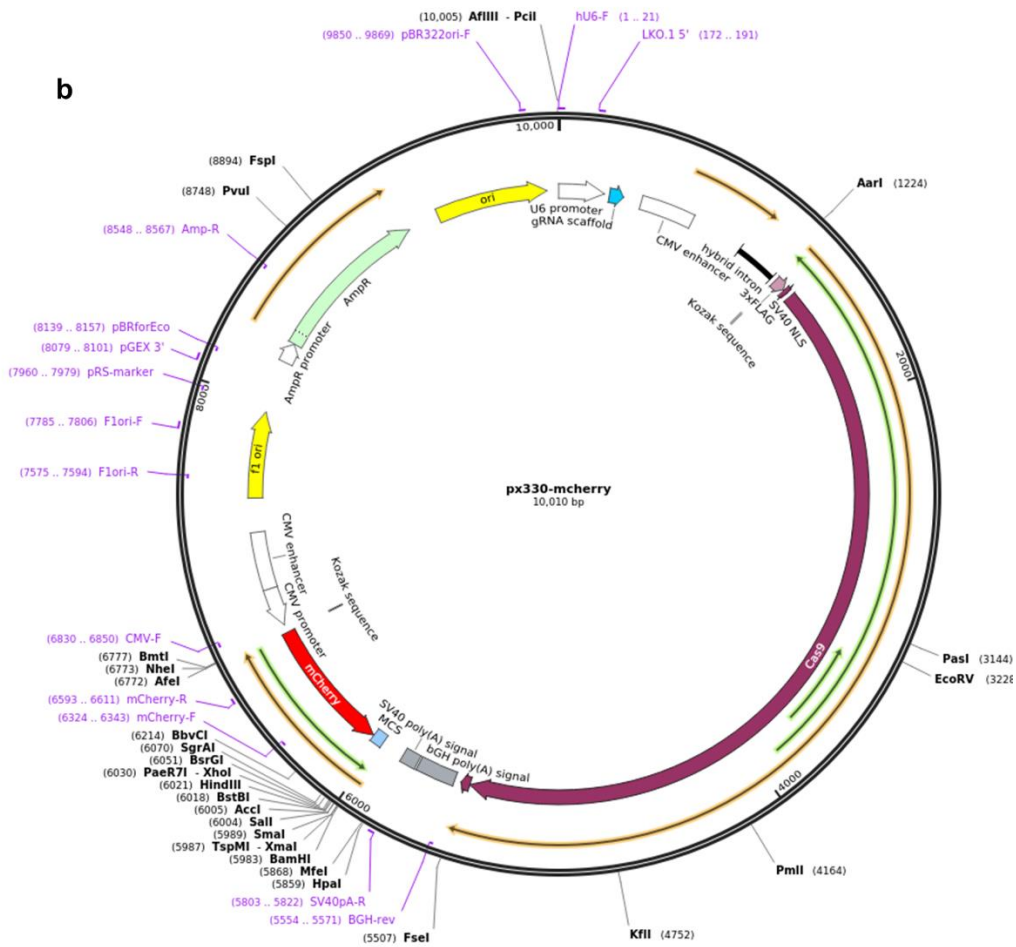
Figura 8: Esquema representativo do modelo experimental em PGCLCs. ESCs heteroplásmicas (contendo duas variantes de mtDNA) foram modificadas via CRISPR visando o nocaute de Mfn2 e Drp1. As linhagens modificadas foram posteriormente utilizadas no protocolo de especificação de PGCLCs, que por sua vez, foram analisadas individualmente quanto ao número de cópias de mtDNA e nível de mutação.

Para a construção do sistema CRISPR/Cas9, um conjunto de RNAs guias (gRNAs) foram desenhados utilizando a ferramenta Benchling CRISPR gRNA Design tool e clonados no vetor px330-mCherry (Figura 9, a e b). Em seguida, as diferentes construções foram primeiramente testadas quanto a eficiência de modificação em células somáticas NIH3T3 (Figura 10). As células foram transfectadas e avaliadas quanto a expressão de mCherry por citometria de fluxo. As construções utilizadas resultaram em cerca de 49% de células positivas (mCherry), as quais foram individualmente selecionadas por FACS para o estabelecimento de linhagens clonais. Após o cultivo, algumas linhagens clonais foram selecionadas e avaliadas quanto ao nocaute por western blotting. Os resultados (Figura 10) mostraram uma linhagem com menor expressão da proteína alvo Drp1, indicativo de modificação causada por CRISPR. Essa linhagem foi obtida através da utilização do gRNA Drp1-1. Para o grupo gMfn2, os resultados não foram conclusivos, porém a utilização do gRNA Mfn2-1 resultou em linhagens com maior variação nos níveis de proteína (Figura 10). Devido a esses motivos as construções utilizando os gRNA Mfn2-1 e Drp1-1 foram selecionadas para dar continuidade aos experimentos.

a

gRNA name	Sequence 5' 3'
MFN2-1	CACCGATCCTTCTTGACGGTGACGA
MFN2-2	CACCGTCCATCGTCACCGTCAAGA
DRP1-1	CACCGCTGCCTCAGATCGTCGTAGT
DRP1-2	CACCGCTCTTCAACACAGTGGGTG

b



Fonte: Addgene.org

Figura 9: Construção CRISPR/Cas9. a. Sequências de gRNA para Mfn2 e Drp1 utilizados. b. Representação esquemática do vetor px330-mCherry.

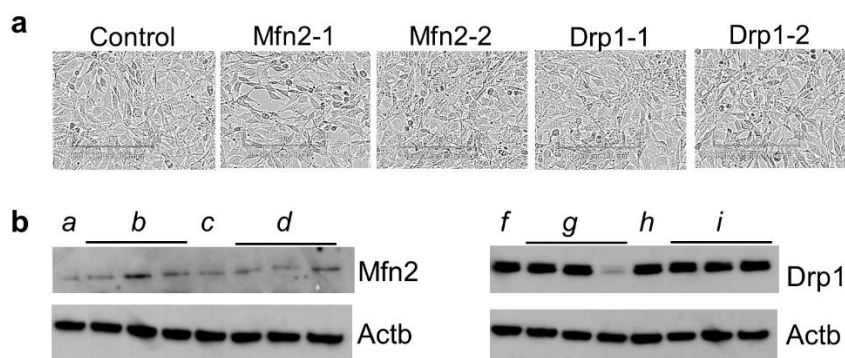


Figura 10: Padronização da construção CRISPR/Cas9 em células NIH3T3 (a) Células NIH3T3 após 24 h de transfecção utilizando construções contendo diferentes gRNAs (Mfn1-1, Mfn2-2, Drp1-1 e Drp1-2) (b) Resultado de western blot para Mfn2 (86Kda) e Drp1 (82.6Kda) – as letras a, c, f e h acima do gel representam amostras da linhagem Controle (transfectadas apenas com px330-mCherry), as letras b e d acima do gel representam linhagens clonais transfectadas utilizando construções px330-mCherry e os gRNAs Mfn1-1 e Mfn2-2, respectivamente. As letras g e i acima do gel representam linhagens clonais transfectadas utilizando construções px330-mCherry e os gRNAs Drp1-1 e Drp1-2, respectivamente.

As construções foram então utilizadas para transfecção das ESCs. Foram utilizadas neste estudo três diferentes linhagens heteroplásmicas de ESC que foram previamente desenvolvidas no laboratório do Prof. Dr. Patrick Chinnery (University of Cambridge). Duas delas portadoras da variante m.3062 T> A, uma contendo 20% de heteroplasmia, denominada ND1-low, e a outra com 40%, denominada ND1-high. E, uma terceira linhagem celular portadora de 40% da variante heteroplasmática m.5024 C> T no gene mt-tRNA^{ala}, denominada tRNA.

As ESCs foram transfectadas e se mantiveram viáveis, com poucas evidências de diferenciação após 24 h de cultivo (Figura 11). Em seguida, as células foram avaliadas quanto a fluorescência de mCherry por citometria de fluxo (Figura 11, c), o que resultou em 5-10% de eficiência de transfecção tanto para Mfn2-1 quanto Drp1-1. As células positivas foram selecionadas individualmente para o estabelecimento de linhagens clonais. Foram estabelecidas 67 linhagens, 15 pertencentes ao grupo Controle, 27 ao grupo gMfn2 e 25 ao grupo gDrp1.

Todas as linhagens foram avaliadas quanto à expressão de Mfn2 e Drp1 por western blotting, sendo parte desses resultados apresentados na Figura 11, letra d. Para a Drp1, 2 linhagens mostraram deficiência da proteína. Para Mfn2, nenhuma linhagem estabelecida apresentou deficiência da proteína, apenas redução parcial da expressão (Figura 11, d). Esse resultado provavelmente se deveu a baixa eficiência da construção CRISPR/Cas9, uma vez que a viabilidade de ESCs não é afetada pela redução da expressão de Mfn2¹²⁹.

Para dar continuidade aos experimentos, foram selecionadas três linhagens celulares, sendo uma selvagem (Controle) e duas geneticamente modificadas para Mfn2 e Drp1 (gMfn2 e gDrp1 respectivamente). As ESCs escolhidas pertenciam ao grupo heteroplásmico ND1-low, portadoras da variante m.3062 T>A em nível médio de 20%. Essa linhagem foi previamente caracterizada pelo grupo de pesquisa, apresentando cerca de 17% de redução no consumo de oxigênio sem ativação de vias glicolíticas, resultado indicativo de disfunção mitocondrial leve (dados não apresentados).

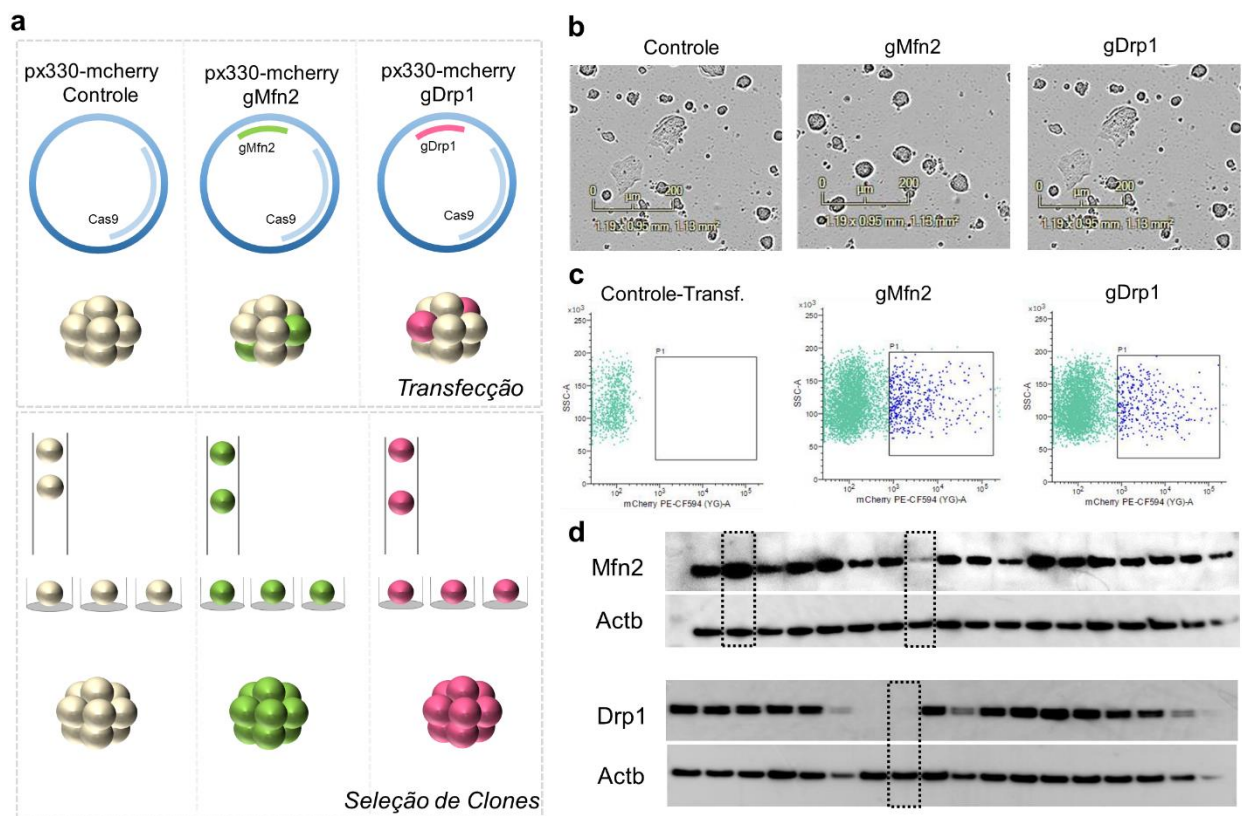


Figura 11: Modificação de ESCs heteroplásmicas por CRISPR/Cas9. (a). Representação esquemática dos processos realizados para obtenção das linhagens clonais: As ESCs foram transfectadas com as construções px330-mCherry (Controle), px330-mCherry + gRNA Mfn2-1 (gMfn2) e px330-mCherry +gRNA Drp1-1 (gDrp1); As células foram selecionadas individualmente por FACS em placas de 96 poços para o estabelecimento de linhagens clonais. Após o estabelecimento das linhagens clonais, as mesmas foram avaliadas e selecionadas baseado na expressão das proteínas alvo Mfn2 e Drp1. (b). Linhagem ND1-low após 24h de transfecção com as construções representadas em (a). (c). Resultado de citometria de fluxo para as linhagens de ESCs Controle (não transfectada), gMfn2 e gDrp1. (d). Resultado de Western blotting para Mfn2 (86Kda) e Drp1 (82.6Kda) de parte das linhagens clonais de ESCs estabelecidas. Em destaque estão as ESCs selecionadas (Controle, gMfn2 e gDrp1) pertencentes ao grupo ND1-low.

As ESCs selecionadas tiveram o nível de expressão gênica e proteica de Mfn2 e Drp1 confirmados e foram caracterizadas quanto a morfologia e proliferação celular (Figura 12). As

três linhagens apresentaram morfologias semelhantes e características típicas de ESCs (Figura 12, b), com colônias densas e bordas distintas e estreitas. Esse resultado está em acordo com estudos anteriores^{129,130}, e indicam que a ausência de Drp1 ou a redução de Mfn2 não afetam a capacidade de pluripotência de ESCs. Com relação ao crescimento celular, a linhagem gDrp1 apresentou menor taxa de proliferação comparada as linhagens Controle e gMfn2 (Figura 12, c). Apesar disso, essa linhagem pode ser mantida nas mesmas condições de cultivo que as demais.

As ESCs gDrp1 também apresentaram menor quantidade cópias de mtDNA em relação as demais (Figura 13, a). Entretanto, nenhuma diferença quanto ao nível de mutação m.3062 T>A foi encontrada entre os grupos (Figura 13, b). Em conjunto, os resultados mostram a obtenção de ESCs viáveis e modificadas quanto a expressão de Mfn2 e Drp1.

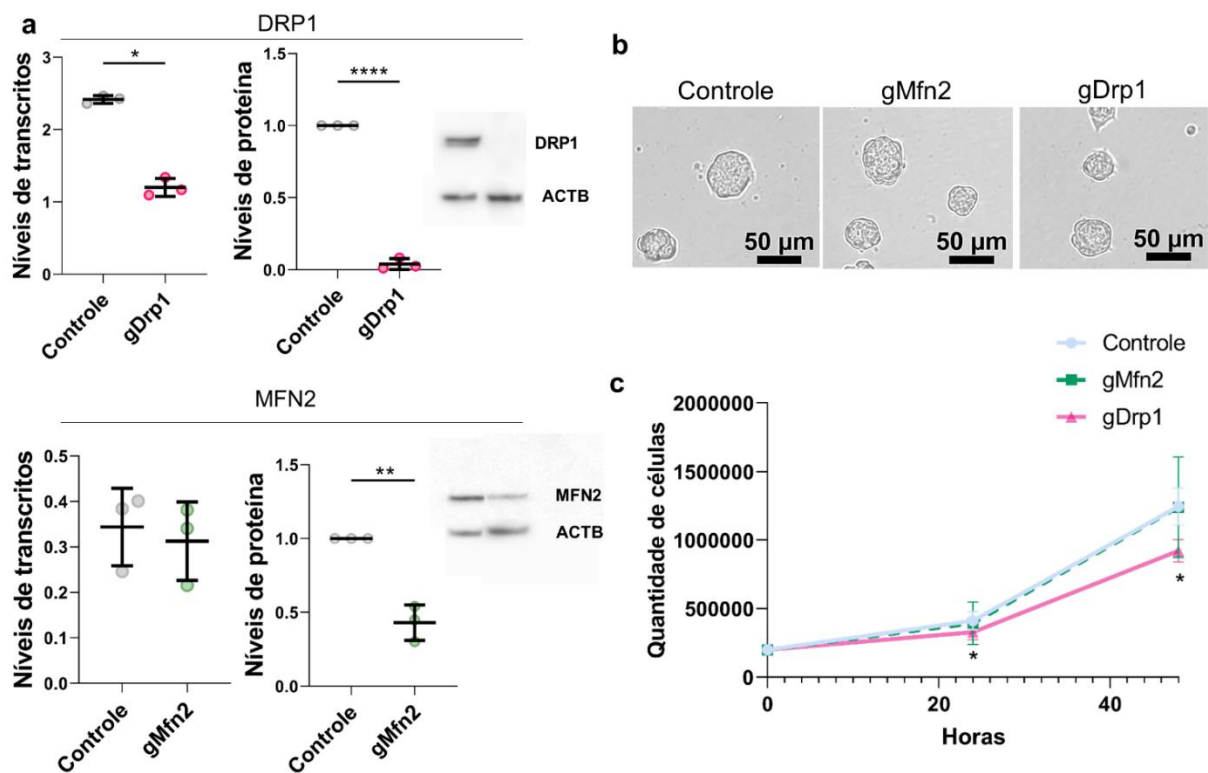


Figura 12: Caracterização das ESCs Controle, gMfn2 e gDrp1. (a) Níveis de transcritos Mfn2 e Dnm1 obtidos através de qPCR; B2M e TBP foram utilizados como controles endógenos; e Níveis de proteína de Mfn2 (86 KDa) e Drp1 (82,6 KDa) obtidos por imunoblotting. (b) Imagens das ESCs Controle, gMfn2 e gDrp1 obtidas após 24h de repique. (c) Taxa de proliferação das linhagens ESCs. A contagem de células foi realizada através do contador automático de células Countess™ II em triplicata biológica. * P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001.

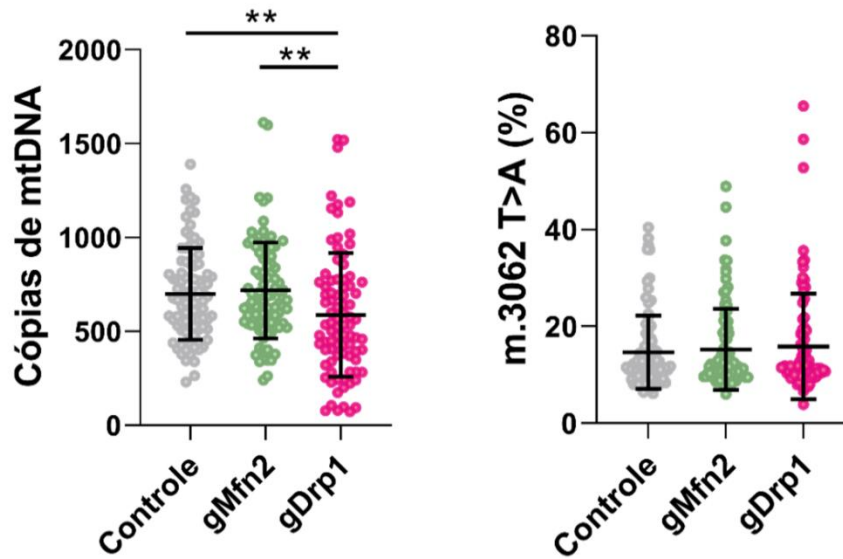


Figura 13: Caracterização de ESCs quanto ao conteúdo de mtDNA. (a) Cópias de mtDNA em ESCs Controle, gMfn2 e gDrp1 obtidas através de PCR digital (Biorad). (b) Níveis de heteroplasmia (m.3063 t>A) em ESCs Controle, gMfn2 e gDrp1 obtidas a partir de Pyrosequencing (QIAGEN). As análises foram realizadas em células previamente individualizadas por FACS em três diferentes passagens de cultivo. N= 92, 93 e 87 para Controle, gMfn2 e gDrp1 respectivamente. ** P < 0,01.

Uma vez caracterizadas, as ESCs Controle, gMfn2 e gDrp1 foram utilizadas para derivação de PGCLCs. Além das modificações descritas acima, essas ESCs continham transgenes *reporters* (Blimp1-mVenus e Stella-CFP) previamente desenvolvidos para identificação de PGCLCs durante o protocolo de diferenciação *in vitro*¹²⁸. A expressão desses transgenes foi monitorada por microscopia confocal e citometria de fluxo (Figuras 14 e 15).

Como resultado, foi possível obter com sucesso PGCLCs a partir de todas as linhagens de ESCs. Esse resultado foi inesperado e fornece evidências de que a diferenciação de PGCs pode ocorrer na ausência de Drp1. No entanto, a eficiência de derivação foi menor neste grupo quando comparado ao Controle, tanto no início do protocolo (D4), devido a menor expressão de Blimp1-mVenus, quanto ao final, evidenciado pela menor quantidade de células duplo positivas Blimp1-mVenus e Stella-ECFP no dia 7 do protocolo (D7- Figura 15).

Além disso, é possível notar um atraso na formação de PGCLCs gDrp1, uma vez que nos dias 6 e 7 há uma maior quantidade de células positivas Blimp1-mVenus neste grupo. O esperado é que no início do protocolo (D4 e 5) ocorra a obtenção de células exclusivamente positivas para Blimp1-mVenus, com conseqüente redução das mesmas nos dias 6 e 7 devido ao aumento de células duplo positivas (Blimp1-mVenus + Stella-ECFP). Esse efeito, que pode ser claramente observado no grupo Controle, é diferente na linhagem gDrp1 (Figura 15, letras “a” e “b”).

Com relação ao grupo gMfn2, houve menor quantidade de células positivas Blimp1-mVenus no dia 4, e menor quantidade de células duplo positivas (Blimp1-mVenus + Stella-ECFP) no dia 7, mas nenhuma diferença em relação ao grupo Controle nos dias 5 e 6.

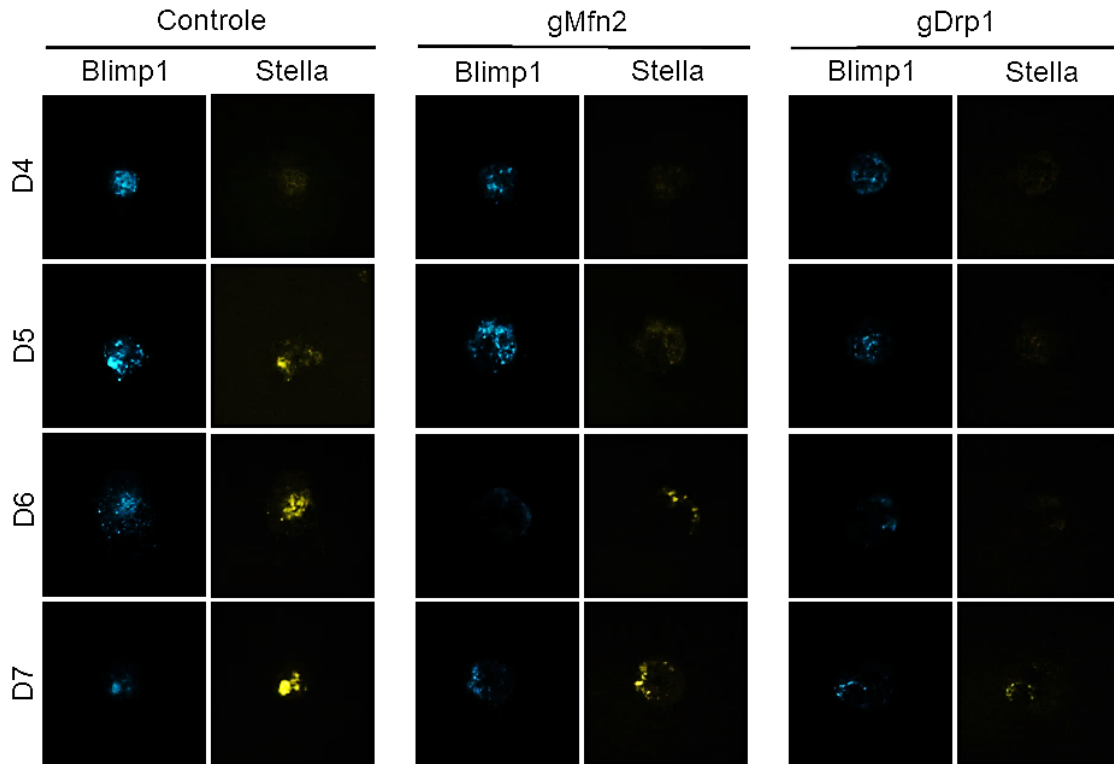


Figura 14: Expressão de Blimp1-mVenus e Stella-CFP ao longo da derivação de PGCLC. As formações embrionárias dos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 foram avaliados através de microscópio confocal nos dias (D) 4, 5, 6 e 7. Aumento de 10x.

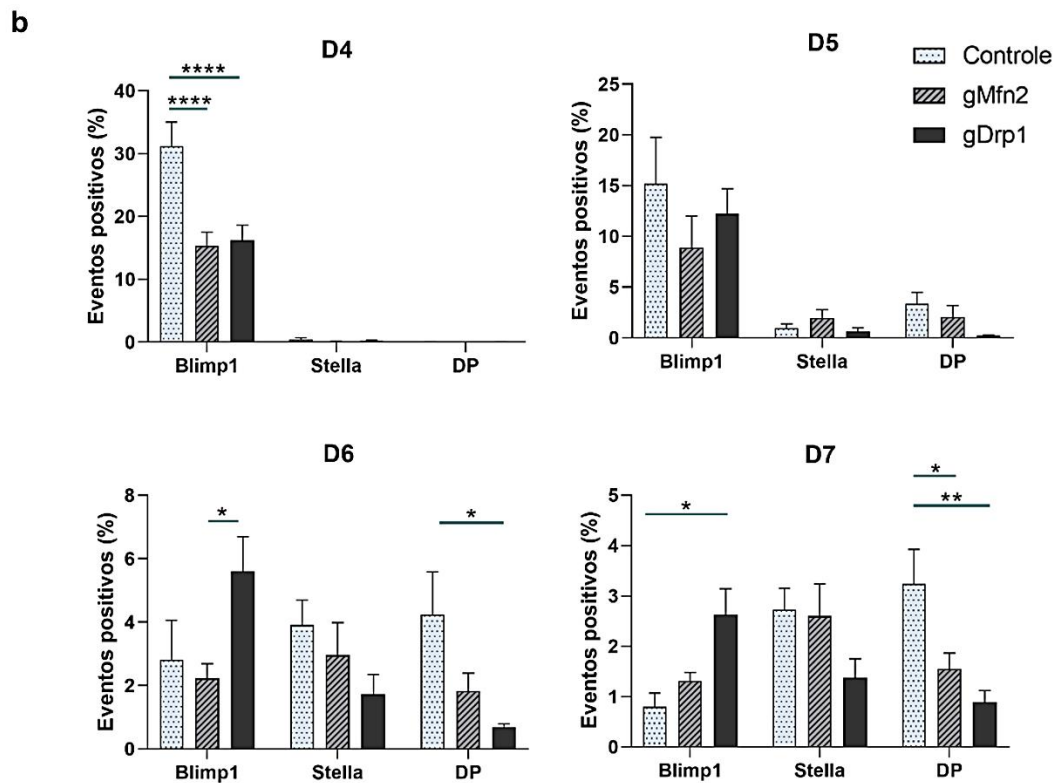
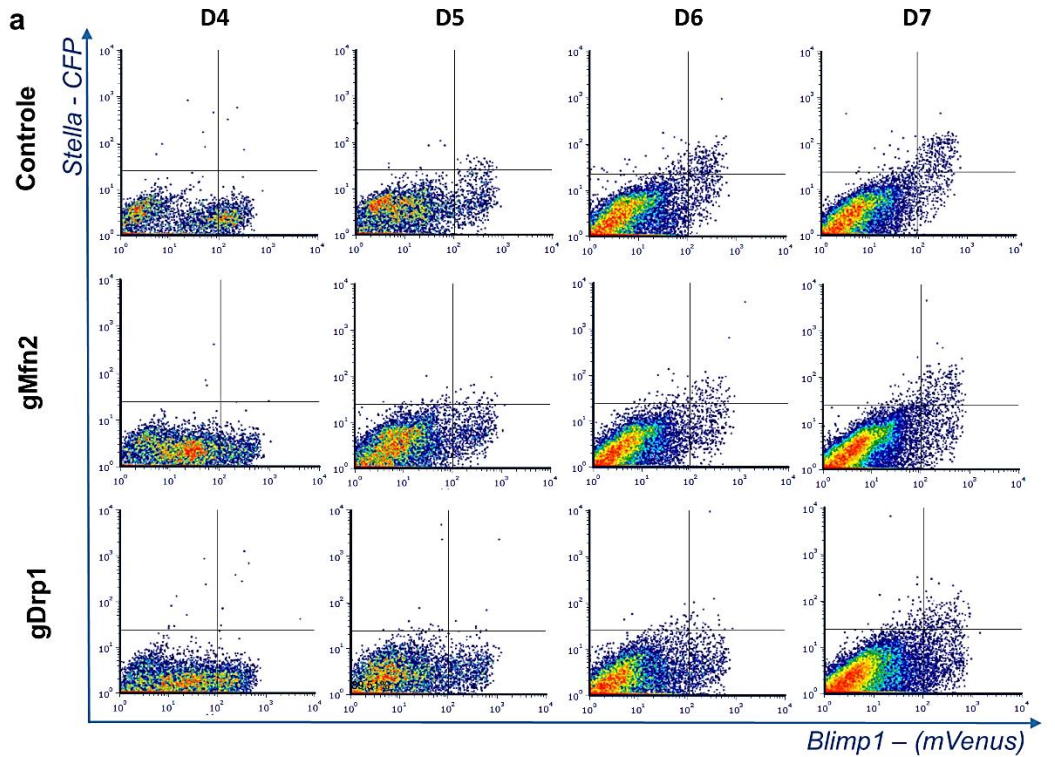


Figura 15: Expressão de Blimp1-mVenus e Stella-ECFP ao longo da diferenciação de PGCLC. (a) Resultado obtido através de citômetro de fluxo. Os gráficos mostram a quantidade de células positivas para mVenus (eixo x) e CFP (eixo y) nos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 nos dias (D) 4, 5, 6 e 7 após a indução de PGCLC. (b) Porcentagem de eventos positivos para Blimp1-mVenus, Stella-ECFP e duplo positivas (DP) nos dias (D) 4, 5, 6 e 7 da derivação de PGCLC. Os dados são representativos de quatro repetições com base na análise de citômetro de fluxo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$.

Em seguida, as PGCLCs foram avaliadas quanto a morfologia mitocondrial por imunofluorescência utilizando anti-TOM20 e microscopia confocal. As PGCLCs do grupo gDrp1 apresentaram organelas agregadas e formato alongado, típico da ausência de Drp1⁸¹ (figura 16). No entanto, nenhuma diferença foi observada no grupo gMfn2 quando comparado com o Controle.

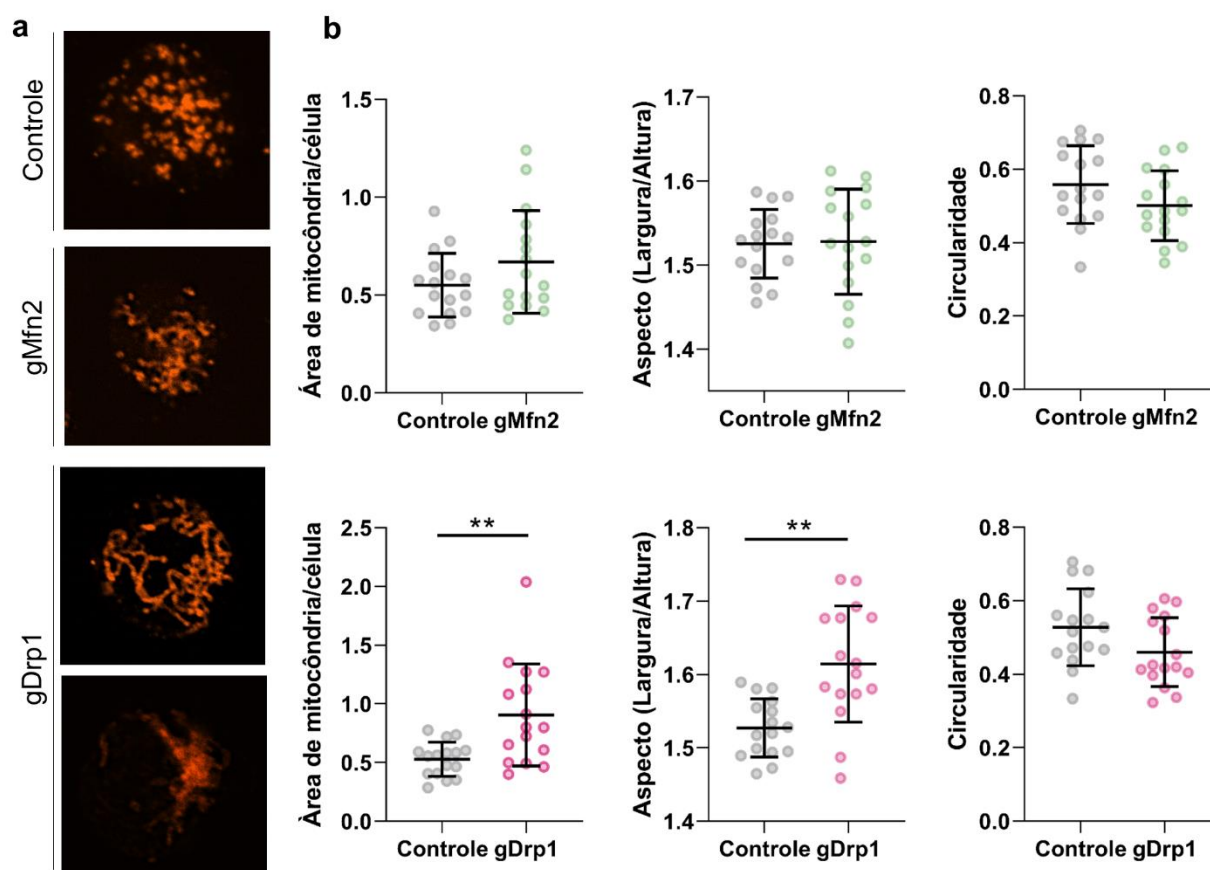


Figura 16: Morfologia mitocondrial em PGCLCs. a. Imagens de imunofluorescência (TOM20) em PGCLCs dos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 obtidas através de microscópio High Speed Spinning Disk Confocal. Aumento de 100x. b. Análise de área, aspecto (aspect ratio – largura/altura) e circularidade mitocondrial em PGCLCs do grupo Controle, gMfn2 e gDrp1. ** P < 0,01.

Para as análises moleculares, tanto as ESCs utilizadas no início de cada protocolo de derivação (D0), quanto as EpiLCs (D2), e PGCLCs obtidas nos dias (D) 4, 5, 6 e 7 foram coletadas individualmente por FACS. As células foram utilizadas para análise simultânea do número de cópias de mtDNA (por ddPCR) e determinação dos níveis de m.3062 T>A (por pirosequenciamento).

A análise do número de cópias de mtDNA nas PGCLCs (Figura 17) revelou que não houve diferença entre grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 no D4 da diferenciação (Figura 17, D4). Esse dado é inusitado, uma vez que as ESCs do grupo gDrp1 apresentaram menor quantidade de cópias de mtDNA (Figura 13, a). Já nos dias seguintes (D5, 6 e 7), as PGCLCs do grupo gDrp1 apresentaram menor quantidade cópias de mtDNA. Esses dados revelam uma regulação negativa da quantidade de cópias de mtDNA durante a formação de PGCLC na ausência de Drp1. Este efeito se assemelha ao *in vivo*, sugerindo que a deficiência de Drp1 favoreceu a ocorrência do gargalo genético mitocondrial nas PGCLCs.

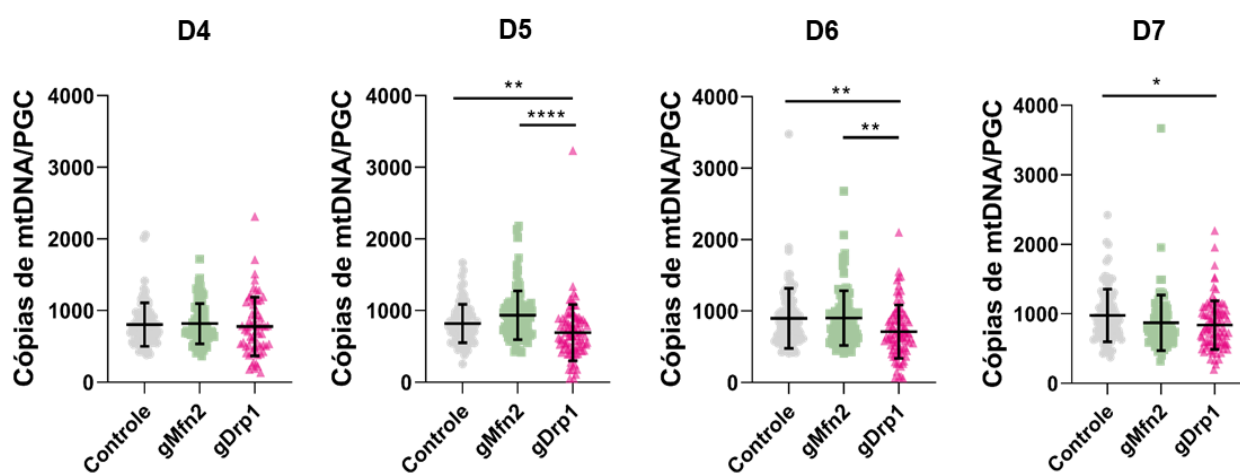


Figura 17: Cópias de mtDNA em PGCLCs dos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 ao longo da derivação (D4-D7). Quantidade de cópias de mtDNA em PGCLCs dos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 obtidas através de ddPCR. As análises foram realizadas em células previamente individualizadas por FACS nos dias (D) 4, 5, 6 e 7 após o início da derivação de PGCLC. Os dados são representativos de 4 derivações. N~96 para cada dia de diferenciação. * P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001.

O resultado acima é melhor observado quando a comparação do número de cópias de mtDNA é feita entre os dias da diferenciação dentro de um mesmo grupo (Figura 18). Nesse caso, primeiramente é possível observar que o nível semelhante de mtDNA entre os grupos no D4 (Figura 17, D4) é explicado por um aumento no grupo gDrp1 no número de cópias de mtDNA entre ESCs e D4, fenômeno este não observado nos demais grupos (Figura 18).

Em relação as comparações entre os dias de especificação de PGCLCs (D4-D7), há um aumento no conteúdo de mtDNA no grupo Controle entre D4/D5 e D7 (Figura 18, Controle). Já na ausência de Drp1, esse efeito se dá somente entre D5 e D7 (Figura 18), não havendo diferença entre D4 e D7. Este último resultado corrobora os dados apresentados na Figura 17, sugerindo que a deficiência de Drp1 levou a redução do número de cópias de mtDNA e possível ocorrência de um gargalo genético mais estreito durante o desenvolvimento das PGCLCs.

Em relação ao grupo gMfn2, nenhuma diferença na quantidade de mtDNA foi observada entre os dias de especificação de PGCLCs (D4-D7), no entanto, é possível observar que entre a quantidade de cópias no D5 é maior em relação as ESCs, o que não ocorre nos demais grupos.

Por fim, todos os grupos apresentaram um aumento no conteúdo de mtDNA entre o início (ESCs) e o final do protocolo (PGCLCs obtidas no dia 7). No entanto, essa diferença se dá entre ESCs e D6/D7 no grupo Controle, entre ESCs e D5/D6/D7 no grupo gMfn2, e entre ESCs e D4/D7 no grupo gDrp1. De modo geral, esses dados indicam que a dinâmica mitocondrial está envolvida no controle da quantidade de cópias de mtDNA durante a diferenciação em PGCLCs.

Além disso, esses achados parecem ser exclusivos das PGCLCs já que células negativas para os genes *reporters* (mVenus-Blimp1 e CFP-Stella) se comportaram de forma diferente (Figuras 19). Nessas células, ao contrário das PGCLCs, o conteúdo de mtDNA diminui ao longo da diferenciação no grupo Controle e se mantém estável no grupo gDrp1. Além disso, a quantidade de mtDNA foi maior em PGCLC do que nas BVSC- em ambos os grupos, resultado similar ao demonstrado anteriormente *in vivo*⁹⁸.

Em resumo, os resultados apresentados demonstram que a derivação de PGCLCs independe de Drp1. Esse resultado foi inesperado, uma vez que Drp1 é essencial para o desenvolvimento e maturação do oócito⁸¹. Nossos resultados também reforçam as evidências sobre interação entre fissão e replicação do mtDNA⁸⁰, e sugerem que a diminuição de cópias de mtDNA em PGCs¹¹ pode estar associado aos baixos níveis de Drp1.

Interessantemente, é possível observar que com a redução da expressão de Mfn2 (gMfn2), houve um aumento na quantidade de cópias de mtDNA no D5, sugerindo um efeito oposto ao encontrado em gDrp1. Esses resultados indicam uma fina regulação no conteúdo de mtDNA baseado na dinâmica mitocondrial.

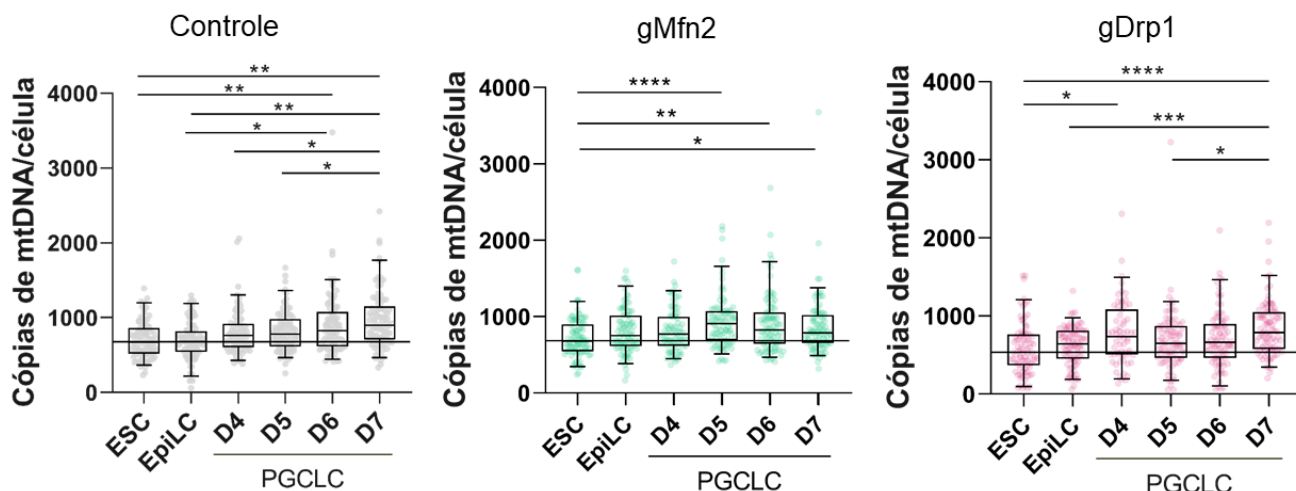


Figura 18: Cópias de mtDNA ao longo da derivação de PGCLCs. Quantidade de cópias de mtDNA em ESCs, EpiLCs e PGCLCs dos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 obtidas através de PCR digital (Biorad). As análises foram realizadas em células previamente individualizadas por FACS nos dias (D) 0 e 2 (ESCs e EpiLC respectivamente) e nos dias (D) 4, 5, 6 e 7 (PGCLCs) após o início da derivação de PGCLC. Os dados são representativos de 4 derivações. N~96 para cada dia de diferenciação. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001.

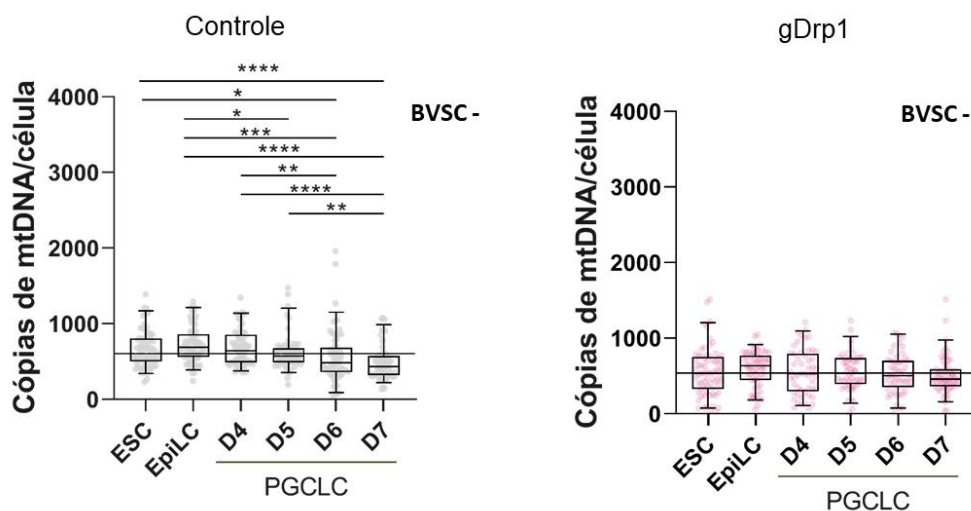


Figura 19: Cópias de mtDNA em células negativas para Blimp1-mVenus e Stella-ECFP (BVSC-). Quantidade de cópias de mtDNA em ESCs, EpiLCs e BVSC- dos grupos Controle e gDrp1 obtidas através de PCR digital (Biorad). As análises foram realizadas em células previamente individualizadas por FACS nos dias (D) 0 e 2 (ESCs e EpiLC respectivamente) e nos dias (D) 4, 5, 6 e 7 (BVSC-) após o início da derivação de PGCLC. Os dados são representativos de 3 derivações. N~96 para ESCs e EpiLC e N~72 para BVSC-. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001.

Apesar do efeito sobre a quantidade de mtDNA, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos em relação aos níveis de m.3062T>A (P > 0,05 – Figura 20). O mesmo ocorre quando a comparação é feita entre os diferentes dias da diferenciação nos grupos gMfn2 e gDrp1 (Figura 21, gMfn2 e gDrp1). Já o grupo Controle apresentou aumento nos níveis de heteroplasmia entre

D4/D5 e D6, o que nesse caso não é explicado por mudanças no conteúdo de mtDNA (Figura 21, Controle).

Embora não houvesse diferença entre os grupos em relação aos níveis de m.3062T>A, o coeficiente de variação foi maior em gDrp1 do que no Controle (Figura 22), o que corrobora os dados acima e estudos anteriores⁹⁷, em que a diminuição do número de cópias de mtDNA leva a maior segregação de variantes de mtDNA.

Em conjunto, esses dados sugerem a ausência de mecanismos de seleção atuando sobre m.3062T>A, uma vez não houve diminuição dos níveis de mutação entre ESCs e PGCLCs no final do protocolo (D7) no grupo Controle. Esse resultado pode ser consequência dos baixos níveis de m.3062T>A (média de ~15%). Nesse caso, apenas cerca de 2% das células apresentam altos níveis (>50%) da mutação, possivelmente necessário para causar defeito bioquímico. Considerando que a distribuição de moléculas mutantes seja aleatória entre as organelas, provavelmente poucas mitocôndrias apresentaram níveis da mutação a ponto de se tornarem disfuncionais e vulneráveis aos mecanismos de seleção. Portanto, os resultados apresentados acima sugerem que Mfn2 e Drp1 não interferem na herança de mtDNA em condições randômicas de segregação do mtDNA.

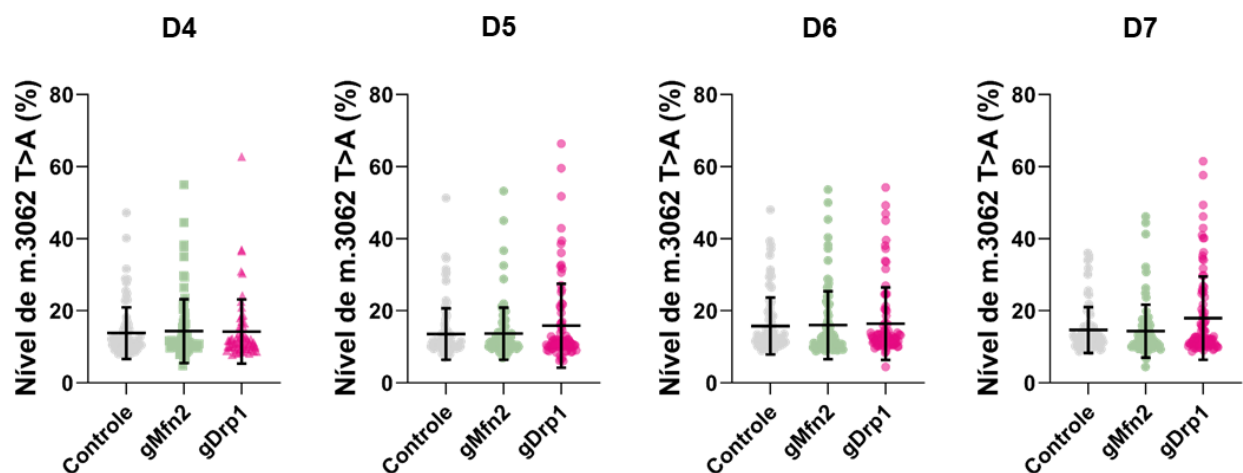


Figura 20: Nível de m.3062T>A em PGCLCs dos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 ao longo da derivação (D4-D7). As análises foram realizadas em células previamente individualizadas por FACS nos dias (D) 4, 5, 6 e 7 após o início da derivação de PGCLC. Os dados são representativos de 4 derivações. N=~96 para cada dia de diferenciação.

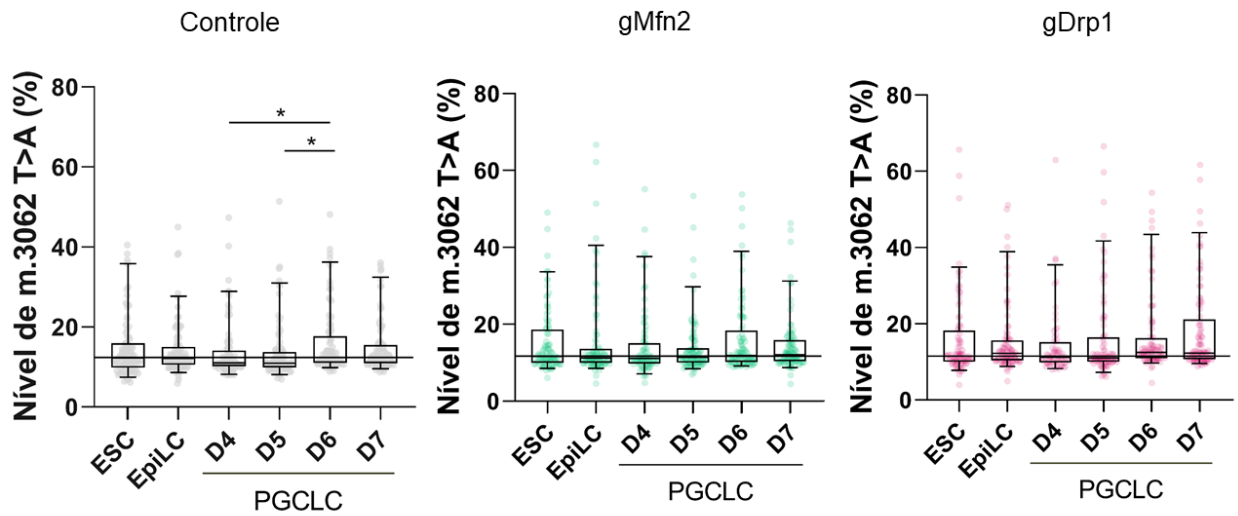


Figura 21: Segregação de m.3062T>A ao longo da derivação de PGCLCs. Níveis de m.3062T>A em ESCs, EpiLCs e PGCLCs dos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 obtidas através de Pyrosequencing (QIAGEN). As análises foram realizadas em células previamente individualizadas por FACS nos dias (D) 0 e 2 (ESCs e EpiLC respectivamente) e nos dias (D) 4, 5, 6 e 7 (PGCLCs) após o início da derivação de PGCLC. Os dados são representativos de 4 derivações. N= \sim 96 para cada dia de diferenciação. * P < 0,05.

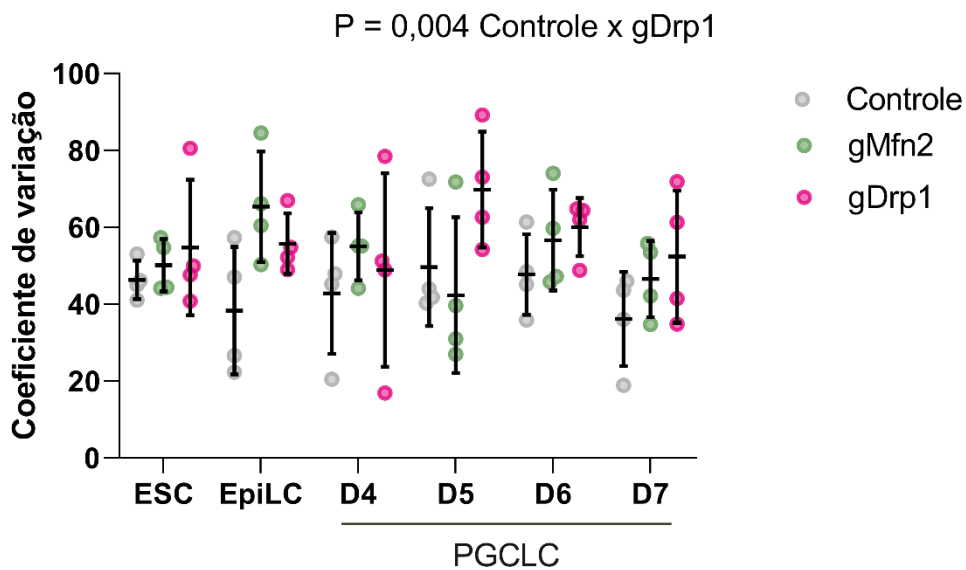


Figura 22: Coeficiente de variação dos níveis de m.3062T>A ao longo da derivação de PGCLCs. O gráfico mostra o coeficiente de variação em ESCs, EpiLCs e PGCLCs nos dias (D) 4, 5, 6 e 7 dos grupos Controle, gMfn2 e gDrp1 considerando 4 diferentes derivações. Os grupos Controle e gDrp1 diferem estatisticamente; P = 0,004.

6.2. Papel da dinâmica mitocondrial na herança de mtDNA em camundongos heteroplásmicos B6/NZB

Conforme detalhado na revisão bibliográfica, um dos modelos mais utilizados em estudos de herança mitocondrial é a linhagem de camundongos B6/NZB^{55,114,131}. Esta linhagem, também utilizada no presente trabalho, foi previamente desenvolvida no Laboratório de Genética e Biotecnologia (LaGenBio) por transferência de citoplasma entre embriões contendo mtDNA NZB e embriões contendo mtDNA B6. Esta linhagem heteroplásmica B6/NZB bem como a metodologia de qPCR utilizada na determinação dos níveis de cada haplótipo mitocondrial foram previamente descritos pelo nosso grupo¹²¹.

Nessa linhagem, o mtDNA NZB se comporta como deletério¹³¹, sendo progressivamente eliminado nos descendentes⁵⁵, o que a torna um interessante modelo para o estudo de mutações no mtDNA. Dados preliminares do nosso grupo de pesquisa indicaram redução de $\sim 9,4\% \pm 1\%$ na quantidade de mtDNA NZB entre uma geração e outra. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo testar se o nocaute das mitofusinas (Mfn1 ou Mfn2), e a conseqüentemente interrupção da fusão mitocondrial, poderia alterar a eliminação de mtDNA NZB na linhagem germinativa. Para isso, as diferentes fases do desenvolvimento foram utilizadas: i) embriogênese inicial; ii) estabelecimento das células germinativas primordiais (PGCs); iii) oogênese.

6.2.1. Padronização da análise da heteroplasmia nas progenitoras

Para dar início aos experimentos *in vivo*, primeiramente foi necessário validar o método de determinação do nível de mtDNA mutante em biópsias de orelha, uma vez que estas são utilizadas como indicativo do nível de NZB na progenitora. Nesse sentido, diferentes biópsias de orelha e cauda de animais heteroplásmicos foram utilizadas para investigar a variação inter e intra-tecidual nos níveis de mtDNA NZB. Conforme apresentado na Figura 23, os níveis de NZB se mantiveram estáveis em função da posição da biópsia (Figura 23, b) e se correlacionaram aos níveis de NZB encontrados na cauda (Figura 23, c). Além disso, a variação intra-tecidual foi pequena (<5%) em função da idade do animal (Figura 23, b e d). Esses resultados estão em acordo com trabalhos anteriores¹³² em camundongos e demonstram variações insignificantes em diferentes biópsias de orelha em função da idade, considerando o método de digestão seguido de quantificação por qPCR¹³³. Sendo assim, a biópsia de orelha se mostrou eficaz em representar o nível de NZB da progenitora e foi utilizada em todos os experimentos seguintes.

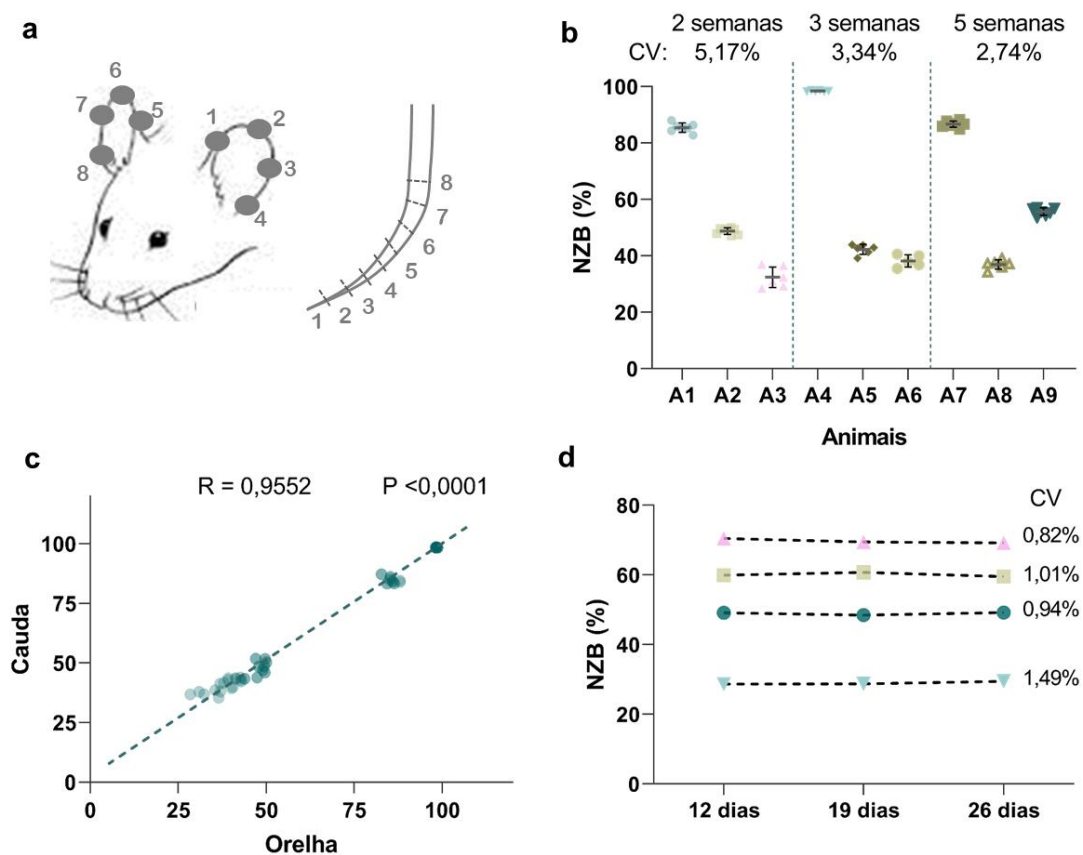


Figura 23: Variação inter e intra-tecidual de NZB em biópsias de orelha. (a) Esquema ilustrativo das posições de biópsia de orelha e cauda utilizadas para análise do nível de NZB. (b) Nível de NZB e coeficiente de variação (CV) em diferentes biópsias de orelha. Foram considerados animais com 2, 3 e 5 semanas. (c) Correlação do nível de NZB entre biópsias de cauda e orelha. Foram considerados animais com 2, 3 e 5 semanas. (d) Nível de NZB e coeficiente de variação (CV) em biópsias realizadas em um mesmo animal com 12, 19 e 26 dias.

6.2.2. Papel da dinâmica mitocondrial durante o desenvolvimento inicial

Inicialmente focamos nossos esforços em investigar os níveis de mtDNA NZB e um possível papel das mitofusinas durante o desenvolvimento embrionário inicial. Diferentemente das células germinativas, essa fase é caracterizada por uma maior dependência energética da OXPHOS, o que poderia conduzir a eliminação de mtDNA NZB observada entre gerações.

Para testar essa hipótese, a estratégia utilizada foi acasalar fêmeas heteroplásmicas e heterozigotas para *Mfn1* (B6/NZB-*Mfn1*^{+/-}) ou *Mfn2* (B6/NZB-*Mfn2*^{+/-}) com machos heterozigotos (*Mfn1*^{+/-} e *Mfn2*^{+/-}, respectivamente) e utilizar os descendentes de genótipo selvagem (Controle – *Mfn1*^{+/+}; *Mfn2*^{+/+}) e nocaute (*Mfn1*^{-/-} ou *Mfn2*^{-/-}) para avaliação dos níveis de mtDNA NZB, conforme esquematizado abaixo (Figura 24).

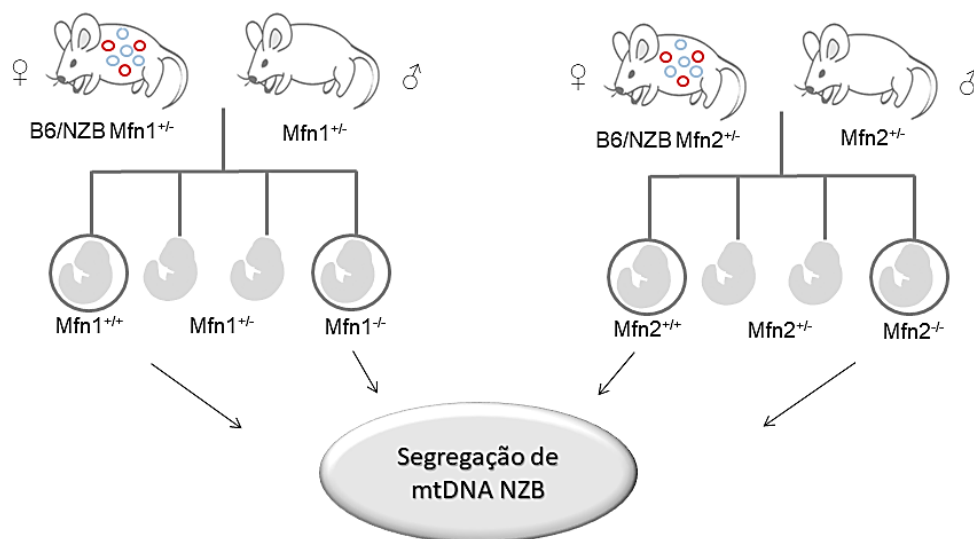


Figura 24: Esquema representativo do modelo experimental envolvendo fetos Mfn1 e Mfn2 KO. Camundongos heteroplásmicos e heterozigotos (fêmea B6/NZB, Mfn1^{+/-} e macho Mfn1^{+/-} ou fêmea B6/NZB, Mfn2^{+/-} e macho Mfn2^{+/-}) foram acasalados para obtenção de fetos controle (B6/NZB-Mfn1^{+/+}, Mfn2^{+/+}) ou nocaute (B6/NZB-Mfn1^{-/-} ou B6/NZB-Mfn2^{-/-}) para Mfn1 ou Mfn2. O nível de NZB e a quantidade de cópias de mtDNA foram analisados em fetos/MEFs e comparados com a progênie materna para investigação da segregação de mtDNA NZB.

As coletas foram realizadas no dia 10,5 pós-coito (E10,5), uma vez que animais com genótipo Mfn1^{-/-} ou Mfn2^{-/-} apresentam bloqueio do desenvolvimento por volta do dia 11 pós-coito (E11,0)¹²⁷. Os primeiros resultados indicaram uma menor frequência de fetos nocaute (Mfn1^{-/-} ou Mfn2^{-/-}) do que o esperado. De um total de 37 coletas realizadas, 35-39% não continham fetos com genótipo homocigoto nocaute (Figura 25, a e b).

Esse resultado revela uma possível reabsorção dos fetos antes do dia 10,5, provavelmente devido ao impacto dos nocautes sobre o desenvolvimento inicial. Apesar disso, nas coletas em que fetos nocautes estavam presentes, a frequência observada correspondeu a esperada: ~27,6% dos fetos apresentaram genótipo selvagem – WT (Mfn1^{+/+} ou Mfn2^{+/+}); ~20,6% apresentaram genótipo nocaute (Mfn1^{-/-} ou Mfn2^{-/-}); e ~51,7% apresentaram genótipo heterocigoto (Mfn1^{+/-} ou Mfn2^{+/-} - Figura 25 a e b). Em concordância com relatos anteriores¹²⁷, os fetos Mfn1^{-/-} ou Mfn2^{-/-} apresentaram menor tamanho e algumas deformações em comparação com os fetos selvagens da mesma ninhada (Figura 25, c).

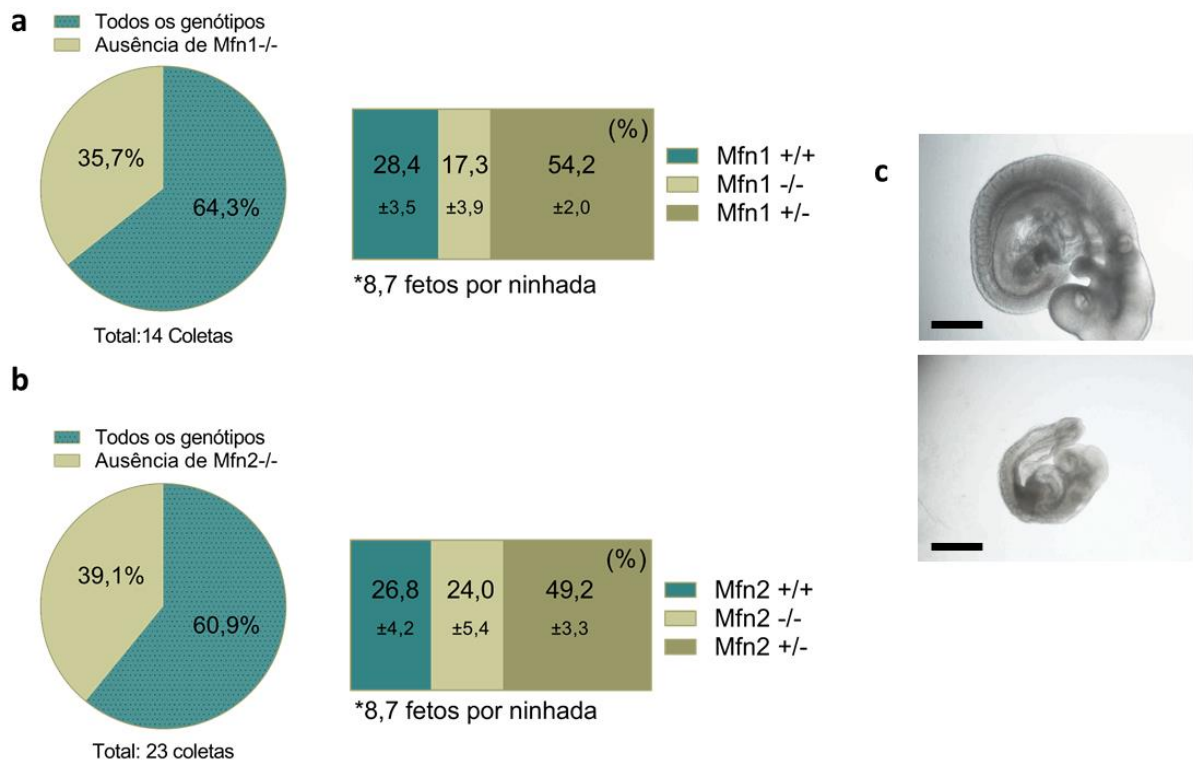


Figura 25: Frequência de genótipos presentes no 10,5 dia de gestação. (a) Porcentagem de coletas com ausência de genótipo nocaute (gráfico circular) e freqüência de fetos (gráfico retangular) Selvagem (+/+), nocaute (-/-) e heterozigotos (+/-) em coletas do grupo Mfn1. (b) Porcentagem de coletas com ausência de genótipo nocaute (gráfico circular) e freqüência de fetos (gráfico retangular) Selvagem (+/+), nocaute (-/-) e heterozigotos (+/-) em coletas do grupo Mfn2. (c) Imagem obtida através de estereoscópio (aumento de 2x) de feto Selvagem (superior) e Mfn2^{-/-} (inferior).

No momento da coleta, as células foram submetidas ao cultivo celular de fibroblastos fetais murinos (MEF) visando estabelecer um modelo celular para o estudo dos mecanismos moleculares da segregação do mtDNA NZB. No entanto, ao contrário de outros trabalhos¹²⁷, grandes dificuldades foram encontradas na derivação de MEFs nocaute para Mfn1 e Mfn2. Cerca de 60% dos fetos nocautes não geraram linhagens celulares, reduzindo consideravelmente o número de amostras e dificultando análises posteriores utilizando o cultivo *in vitro*.

Apesar do número reduzido de amostras, as análises envolvendo mtDNA foram realizadas. A segregação do nível de mtDNA NZB (Segregação de NZB – Figura 26) entre gerações foi calculada conforme proposto por Johnston e Jones¹³⁴, utilizando uma transformação (equação abaixo) que leva em consideração os níveis iniciais (h_0 - presente na progenitora) e finais (h - presente no feto, calculado utilizando MEF) para o cálculo da diferença no nível de mtDNA NZB. Resultado de segregação de NZB negativo indicam valores mais baixos de NZB no feto em relação a progenitora.

$$\text{Segregação de NZB} = \frac{\ln(h(h_0-1))}{\ln(h_0(h-1))}$$

Os resultados deram indícios de que as mitofusinas não interferem na segregação do mtDNA NZB durante o desenvolvimento inicial (Figura 26). A análise das MEFs quanto ao número de cópias de mtDNA também revelou não haver diferença entre os grupos selvagem e *Mfn1*^{-/-} ou *Mfn2*^{-/-} (Figura 26, letras “b” e “d”), confirmando os resultados de outros autores¹⁻⁴ de que o nocaute individual das mitofusinas não afeta o número de cópias de mtDNA em MEFs.

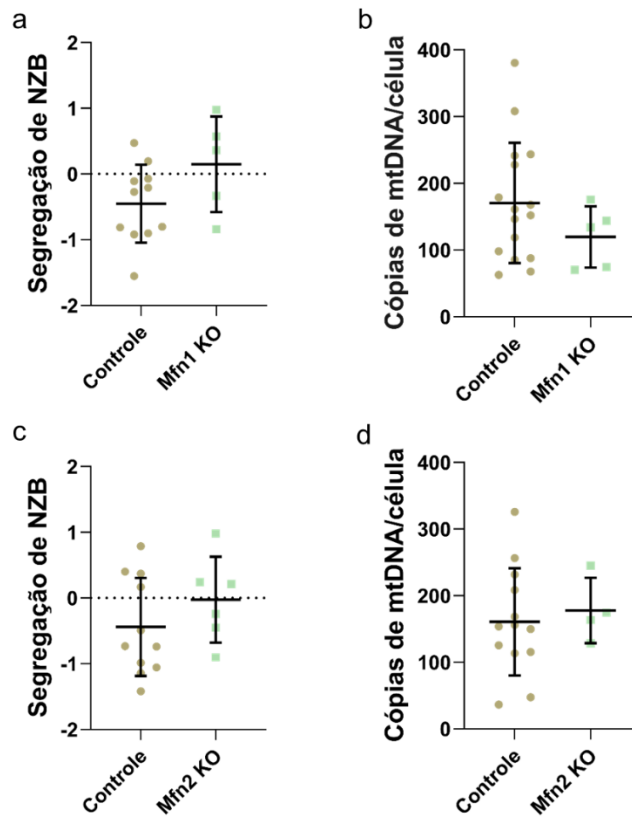


Figura 26: Efeito do nocaute de *Mfn1* e *Mfn2* durante o desenvolvimento inicial sobre a segregação de mtDNA. (a) Segregação de mtDNA NZB em MEFs (P1) derivadas de fetos do grupo Controle e *Mfn1* KO. (N=11 para Controle e N=5 para *Mfn1* KO). (b) Cópias de mtDNA por célula em MEFs do grupo Controle e *Mfn1* KO (N=15 amostras para Controle; N=5 para *Mfn1* KO). (c) Segregação de mtDNA NZB em MEFs (P1) derivadas de fetos do grupo Controle e *Mfn2* KO. (N=10 para Controle e N=6 para *Mfn2* KO). (d) Quantidade de cópias de mtDNA em MEFs do grupo Controle e *Mfn2* KO (N=13 para controle e N=4 para *Mfn2* KO).

Com a finalidade de confirmar os dados apresentados acima, a segregação de NZB foi investigada utilizando células fetais obtidas no E10,5, sem que essas fossem submetidas ao cultivo celular. Levando em consideração a baixa frequência de fetos *Mfn1* KO, esse experimento foi realizado apenas com o grupo *Mfn2* KO.

Os resultados revelaram seleção negativa de mtDNA NZB (Figura 27, a) nos fetos do grupo controle, resultado similar do encontrado em MEFs (Figura 26, c). No entanto, este mecanismo parece ser independente de Mfn2, uma vez que fetos Mfn2 KO não diferiram do grupo Controle (Figura 27, a). Esse resultado também foi confirmado ao utilizar células do âmnio (anexo embrionário contendo apenas tecido de origem fetal). A utilização do âmnio foi baseada na forte correlação com os níveis de mtDNA NZB presente nos fetos ou nas MEFs ($P < 0,0001$ – Figura 27, c), sugerindo que esse tecido também pode ser utilizado na predição do nível de mtDNA NZB no feto.

Em conjunto, esses resultados indicam que o nocaute de Mfn2 durante o desenvolvimento inicial não interfere sobre a herança de mtDNA NZB. Esse resultado sugere que nenhum mecanismo a nível de organela esteja ocorrendo durante esse período. Além disso, é possível que a segregação de NZB observada nos fetos seja resultado de seleção num momento anterior do desenvolvimento (e.g. PGCs ou oócitos).

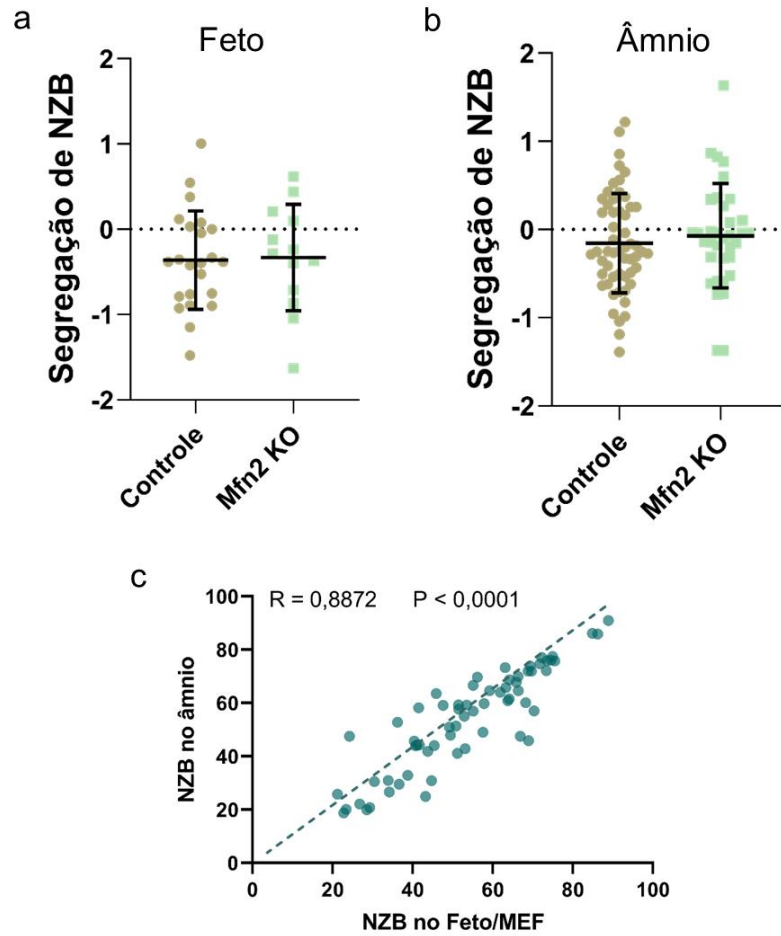


Figura 27: Efeito do nocaute de Mfn2 durante o desenvolvimento inicial sobre a herança de mtDNA. (a) Segregação de mtDNA NZB de fetos (E.10,5) do grupo Controle e Mfn2 KO. (N=23 para Controle e N=13 para Mfn2 KO). (b) Segregação de mtDNA NZB no âmnio de fetos do grupo Controle e Mfn2 KO. (N=55 para Controle e N=35 para Mfn2 KO). (c) Correlação entre nível de NZB presente no âmnio e nível de NZB presente nos fetos ou MEFs (N=65).

6.2.3. Papel da dinâmica mitocondrial durante a formação de PGCs

A partir dos resultados anteriores de que o Mfn2 não interfere na herança de mtDNA NZB durante o desenvolvimento inicial, tornou-se interessante investigar o seu papel em um momento anterior no desenvolvimento da linhagem germinativa feminina. Nesse sentido, a estratégia utilizada foi investigar a segregação de mtDNA NZB em PGCs isoladas de fetos selvagens e nocaute para Mfn2 (Mfn2 KO). Para isso, fêmeas heteroplásmicas e heterozigotas para Mfn2 (B6/NZB-Mfn2^{+/-}) foram acasaladas com machos com mesmo genótipo que continham um transgene para expressão de EGFP em PGCs (POU5F1-eGFP-Mfn2^{+/-}), conforme detalhado na figura 28.

A coleta dos fetos foi realizada no E10,5, os quais tiveram suas células dissociadas para análise em microscópio epifluorescente (Figura 28 e Figura 29). As células positivas para EGFP foram coletadas para posterior análise do mtDNA enquanto que o âmnio foi utilizado para seleção dos fetos quanto ao genótipo de Mfn2 (para identificação dos selvagens, heterozigotos e nocautes), seguido de seleção quanto a ausência do gene SRY (*sex-determining region Y* – para identificação das fêmeas) e finalmente seleção de fetos com níveis intermediários de NZB (50-80% - Figura 28).

Para esse experimento, 15 coletas foram realizadas, totalizando 46 fetos e 703 PGCs coletadas individualmente. No entanto, devido as várias etapas de seleção apresentadas nas figuras 28 e 29, poucos fetos (1 feto de genótipo Selvagem (Mfn2 ^{+/+}), 4 fetos de genótipo heterozigoto (Mfn2^{+/-}) e 3 fetos de genótipo Mfn2 KO (Mfn2^{-/-}) puderam ser utilizados. Devido isso e também ao fato de que o nocaute em heterozigose não resulta em mudanças fenotípicas¹²⁷, fetos selvagens e heterozigotos (Mfn2^{+/+} e Mfn2^{+/-}) foram utilizados como Controle.

As análises do mtDNA nas PGCs provenientes de fetos do sexo feminino pertencentes aos grupos experimentais revelou efeito do nocaute de Mfn2 ($P < 0,05$) na quantidade de cópias de mtDNA (Figura 30, a). Apesar disso, os grupos não apresentaram diferenças quanto a segregação de mtDNA NZB (Figura 30, b), havendo evidência de diminuição nos níveis de mtDNA NZB em ambos. Apesar disso, a dispersão dos dados (*range*) foi maior no grupo Mfn2 KO (Mfn2 KO = 4,9; Controle = 2,7), provavelmente devido a menor quantidade de mtDNA por célula. Esses resultados indicam seleção contra o NZB em PGCs independente de Mfn2.

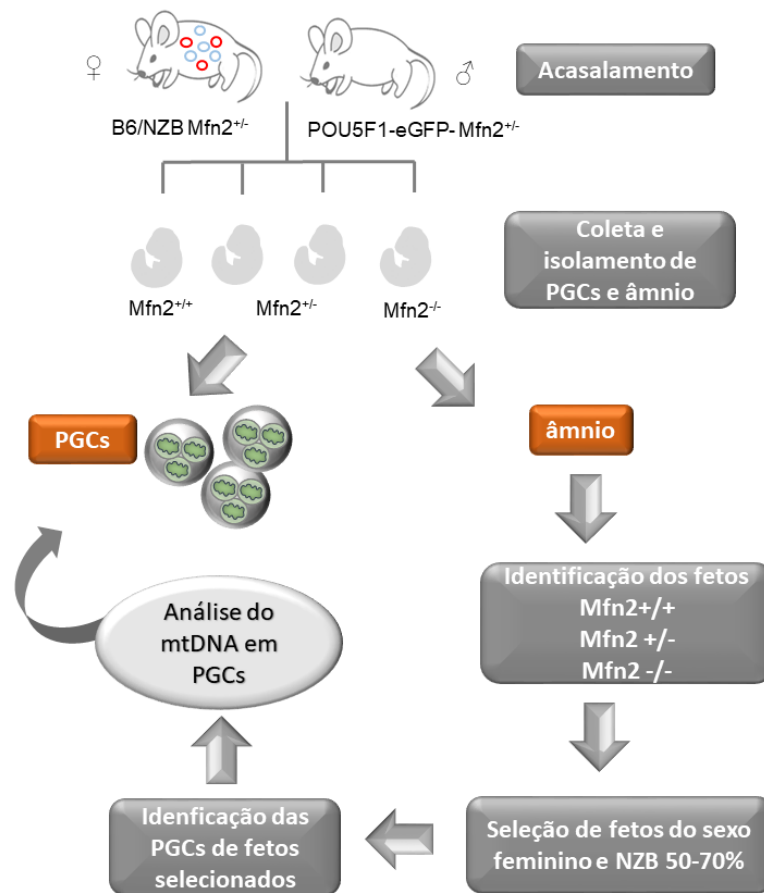


Figura 28: Esquema representativo das etapas experimentais. Fêmeas heteroplásmicas e heterozigotas para *Mfn2* (B6/NZB- $Mfn2^{+/-}$) foram acasaladas com machos heterozigotas para *Mfn2* que continham um transgene para expressão de EGFP em PGCs (POU5F1-eGFP- $Mfn2^{+/-}$). Em seguida, as células positivas para EGFP foram coletadas para posterior análise do mtDNA. Paralelamente o âmnio foi utilizado para seleção dos fetos quanto ao genótipo de *Mfn2* (para identificação dos selvagens, heterozigotos e nocautes), seguido de seleção quanto a ausência do gene *SRY* (*sex-determining region Y* – para identificação das fêmeas) e finalmente seguido da seleção de fetos com níveis intermediários de NZB (50-70%). As PGCs provenientes dos fetos selecionados tiveram o conteúdo de mtDNA avaliado por ddPCR e nested-PCR/qPCR.

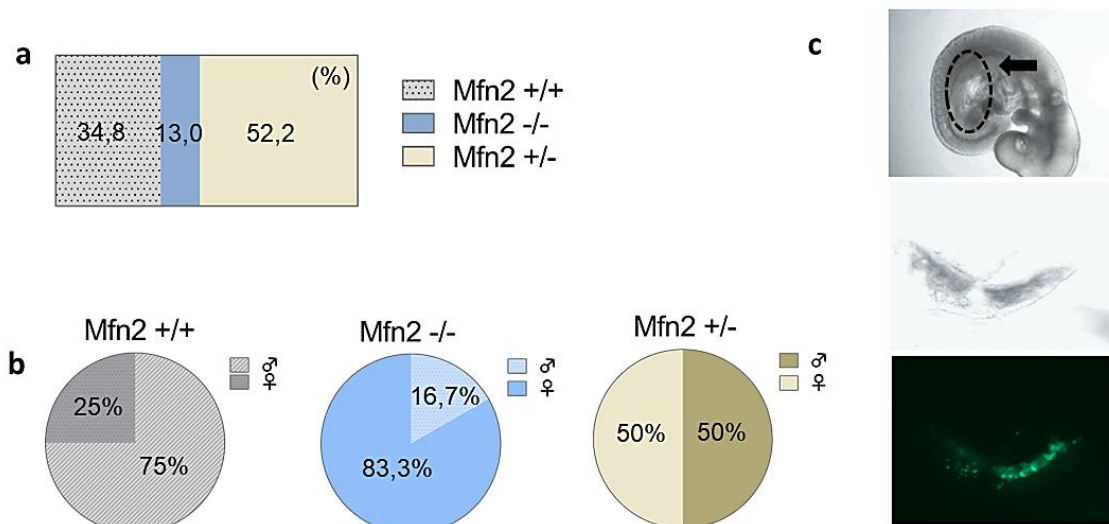


Figura 29: Proporção de genótipos presentes em coletas utilizadas para isolamento de PGCs (E10,5). (a) Frequência de fetos Selvagem (+/+), Mfn2 nocaute (-/-) e heterozigotos (+/-). (b) Frequência de fetos do sexo masculino (♂) e feminino (♀) presente em cada genótipo (Selvagem (+/+), Mfn2 nocaute (-/-) e heterozigotos (+/-)). (c) Imagens ilustrando o isolamento das gônadas e posterior identificação de PGCs (imagem inferior) através de fluorescência de GFP sob excitação de luz UV em microscópio invertido.

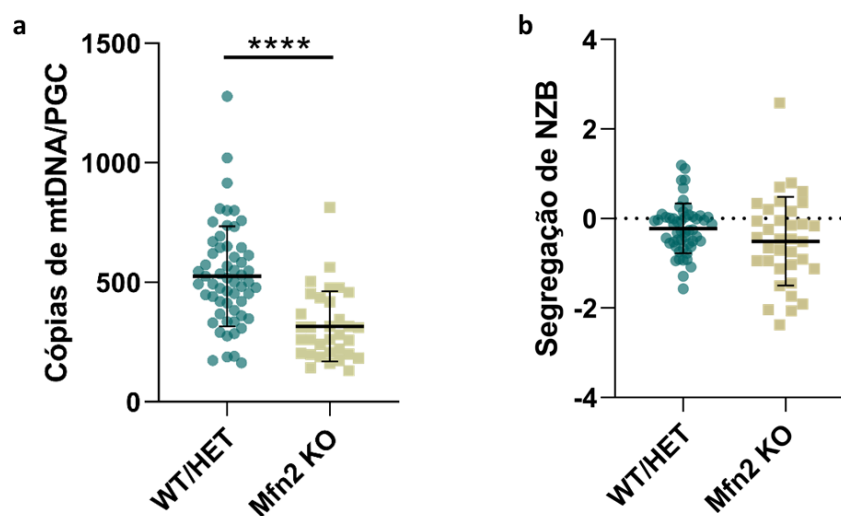


Figura 30: Efeito do nocaute de Mfn2 em PGCs sobre a herança de mtDNA. (a) Quantidade de cópias de mtDNA em PGCs do grupo Selvagem/Heterozitogo (WT/HET) e Mfn2 KO obtidas através de PCR ditigal (Biorad). (b) Segregação de mtDNA NZB em PGCs do grupo Selvagem/Heterozitogo (WT/HET) e Mfn2 KO obtidas através de Nested-PCR seguido de qPCR. N=53 para WT/HET; N=35 para Mfn2 KO. A segregação de NZB foi calculada segundo a seguinte equação: “Segregação de NZB = $\ln(h(h_0-1)/h_0(h-1))$ ”, onde h_0 representa a proporção de NZB da progenitora e h a proporção de NZB nas PGCs. Os dados são representativos de 1 feto de genótipo Selvagem (Mfn2 ^{+/+}), 4 fetos de genótipo heterozigoto (Mfn2 ^{+/-}) e 3 fetos de genótipo Mfn2 KO (Mfn2 ^{-/-}).

6.2.4. Investigação dos mecanismos de herança mitocondrial no oócito

Acompanhando a sequência cronológica do desenvolvimento da linhagem germinativa na fêmea, a última etapa deste trabalho teve como objetivo investigar a herança mitocondrial durante o desenvolvimento do oócito. Para isso, o nocaute condicional do *Mfn2* (cKO) foi realizado de modo dirigido no oócito em crescimento por uso do sistema Cre-Lox. Conforme demonstrado na figura abaixo (Figura 31), fêmeas heteroplásmicas, contendo o transgene de expressão da Cre recombinase sob o comando do promotor do gene *Zp3* (*Zp3-Cre*) e heterozigotas para sítios loxP flanqueando um éxon essencial do gene *Mfn2* (*B6/NZB;Zp3-Cre;Mfn2^{loxP/+}*) foram acasaladas com machos do mesmo genótipo (*Zp3-Cre;Mfn2^{loxP/+}*). Como resultado desse acasalamento, fêmeas com os seguintes genótipos foram utilizadas nos experimentos: Selvagem (Controle - *B6/NZB;Zp3-Cre;Mfn2^{+/+}*) e nocaute condicional de *Mfn2* (*Mfn2* cKO; *B6/NZB;Zp3-Cre;Mfn2^{loxP/-}*). Os oócitos dessas fêmeas foram então utilizados para investigação da segregação de mtDNA (Figura 31).

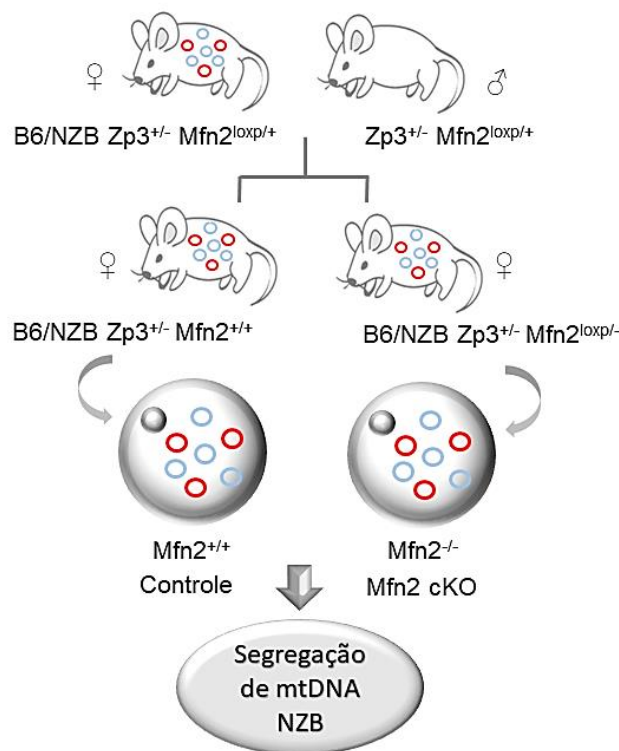


Figura 31: Esquema representativo do modelo experimental envolvendo oócitos Mfn2 cKO. Fêmeas heteroplásmicas, contendo o transgene Zp3-Cre e heterozigotas para a presença de sequências loxP (B6/NZB;Zp3-Cre;Mfn2^{loxP/+}) foram acasaladas com machos do mesmo genótipo (Zp3-Cre;Mfn2^{loxP/+}). Como resultado desse acasalamento, fêmeas com os seguintes genótipos B6/NZB;Zp3-Cre;Mfn2^{+/+} e B6/NZB;Zp3-Cre;Mfn2^{loxP/-} foram selecionadas e tiveram seus oócitos avaliados quanto a segregação de mtDNA.

Além das etapas mencionadas acima, os experimentos foram realizados levando em consideração a idade das fêmeas (Controle e Mfn2 cKO). Isso porque, existem fortes evidências de que a seleção contra mutações no mtDNA acentue-se nos oócitos com a progressão da idade materna^{55,117}. Sendo assim, fêmeas Controle e Mfn2 cKO com 3, 5 e 8 semanas tiveram os oócitos analisados quanto a quantidade de cópias de mtDNA e segregação de mtDNA NZB (Figura 32).

Primeiramente, foi possível observar que com 3 semanas não há diferença entre os grupos em relação a segregação de NZB, embora os oócitos do grupo Mfn2 cKO apresentem menor quantidade de cópias de mtDNA (Figura 32).

Com 5 e 8 semanas, a diferença entre os grupos quanto ao número de cópias de mtDNA é acentuada em relação aos oócitos de fêmeas com 3 semanas (Figura 32 d, e, f). Além disso, nessas idades os grupos diferem quanto a segregação de mtDNA NZB. No grupo Controle, os oócitos apresentaram seleção negativa de NZB, o que não ocorreu em oócitos do grupo Mfn2 cKO. Esse resultado sugere que a eliminação de NZB em oócitos ocorre em função da idade

materna e é dependente de Mfn2. Esse efeito é confirmado ao verificar que a segregação de NZB foi maior em oócitos de animais com 8 semanas do que naqueles com 3 semanas para o grupo Controle (Figura 33, a), diferentemente do que ocorre com Mfn2 cKO (Figura 33, b).

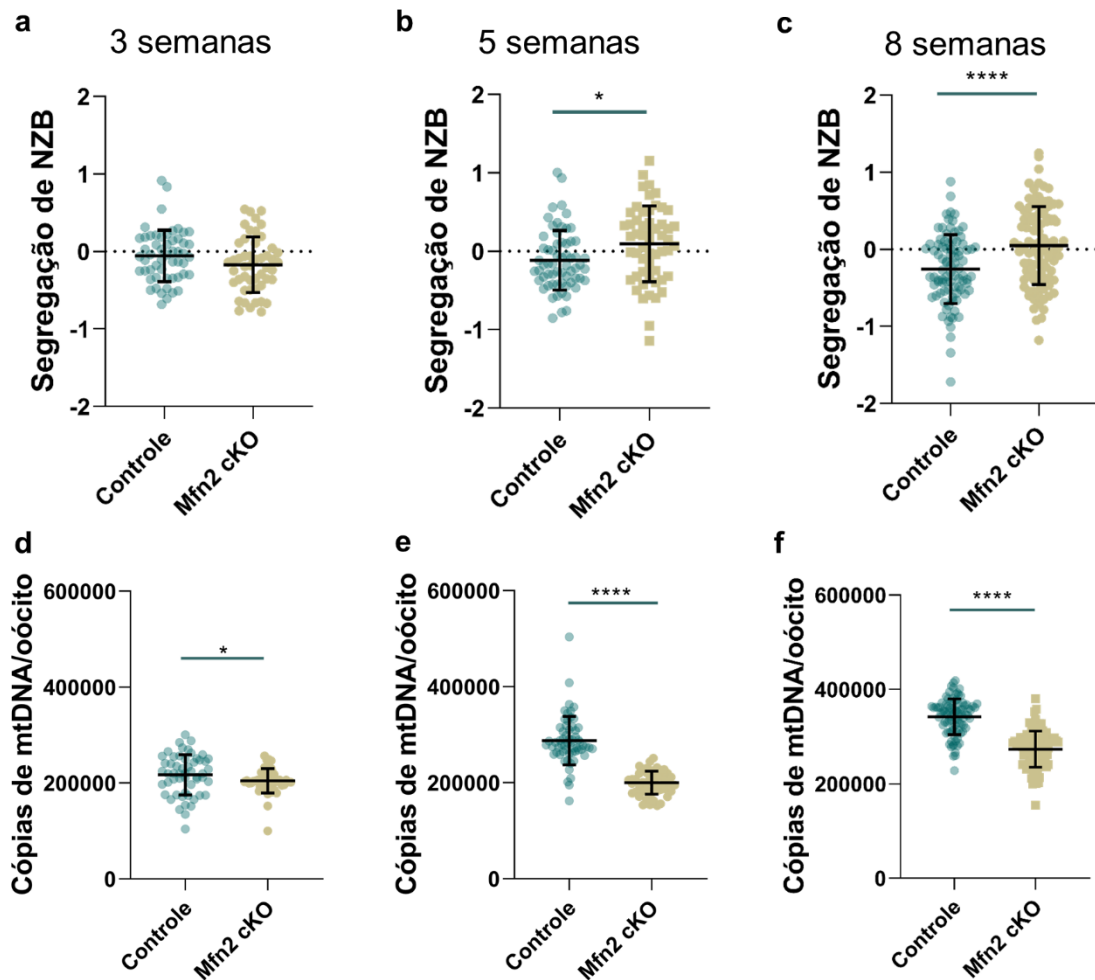


Figura 32: Efeito do nocaute condicional de Mfn2 (Mfn2 cKO) em oócitos sob a herança de mtDNA. Os gráficos mostram a segregação de NZB (gráficos superiores) e a quantidade de cópias de mtDNA (gráficos inferiores) em oócitos de fêmeas do grupo Controle e Mfn2 cKO com 3, 5 e 8 semanas. A segregação de NZB foi calculada segundo a seguinte equação: “Segregação de NZB = $\ln(h(h_0-1)/h_0(h-1))$ ”, onde h_0 representa a proporção de NZB da progenitora e h a proporção de NZB nos oócitos. Os oócitos foram coletados individualmente e tiveram o conteúdo de mtDNA determinado por qPCR. *P < 0,05; ****P < 0,0001.

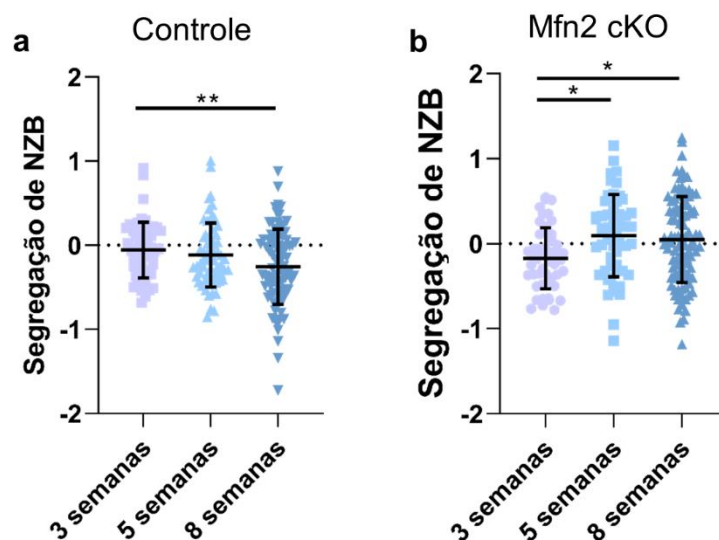


Figura 33: Efeito da idade sob a segregação de mtDNA NZB em oócitos. O gráfico mostra a segregação de NZB em oócitos de fêmeas com 3, 5 e 8 semanas. Os oócitos foram coletados individualmente e tiveram o nível de NZB determinado por qPCR. Grupo Controle: N = 54, 63 e 90 para 3, 5 e 8 semanas. Grupo Mfn2 cKO: N = 49, 54 e 98 para 3, 5 e 8 semanas. *P < 0,05; **P < 0,01.

Com intuito de comprovar esses resultados, as mesmas análises foram realizadas em oócitos isolados de folículos secundários (Figura 34) obtidos das mesmas fêmeas apresentados na figura 32, c e f (8 semanas). Os resultados mostraram que a segregação de NZB se manteve neutra nos oócitos de folículos secundários, em ambos os grupos (Controle = $0,038 \pm 0,07$; Mfn2 cKO = $0,017 \pm 0,06$), diferente dos oócitos crescidos (Figura 34, d). Esses resultados sugerem que a eliminação de NZB é específica de oócitos totalmente crescidos, provenientes de folículos antrais. Esse resultado era esperado, uma vez que a ativação da expressão de Cre-recombinase, e consequente nocaute do Mfn2, deveriam ocorrer no nosso modelo entre os estágios de folículo primário e secundário. Apesar disso, oócitos provenientes de fêmeas Mfn2 cKO apresentaram menor quantidade de cópias de mtDNA, evidenciando uma forte relação entre Mfn2 e a estabilidade do mtDNA no oócito.

Os resultados descritos acima revelam um mecanismo purificador de mtDNA NZB durante a fase final de crescimento do oócito. Uma vez que esta fase é marcada por intensa replicação mitocondrial, investigamos se a quantidade de cópias de mtDNA estaria correlacionada com a segregação de mtDNA NZB. Em acordo com a nossa hipótese, tanto no grupo Controle como no grupo Mfn2 cKO houve correlação entre cópias de mtDNA e segregação de NZB (P < 0,05). No entanto, a correlação é negativa (R = -0,19) no grupo Controle e no

positiva ($R = 0,14$) no grupo Mfn2 cKO (Figura 35). Esse resultado revela que oócitos com maior quantidade de cópias de mtDNA apresentam menor conteúdo de NZB (grupo Controle). No entanto, na ausência de Mfn2 os oócitos com maior quantidade de cópias de mtDNA apresentam maior proporção de mtDNA NZB. Esses resultados ainda necessitam de confirmação, mas colocam a replicação de mtDNA como um mecanismo candidato para explicar a eliminação de NZB em oócitos.

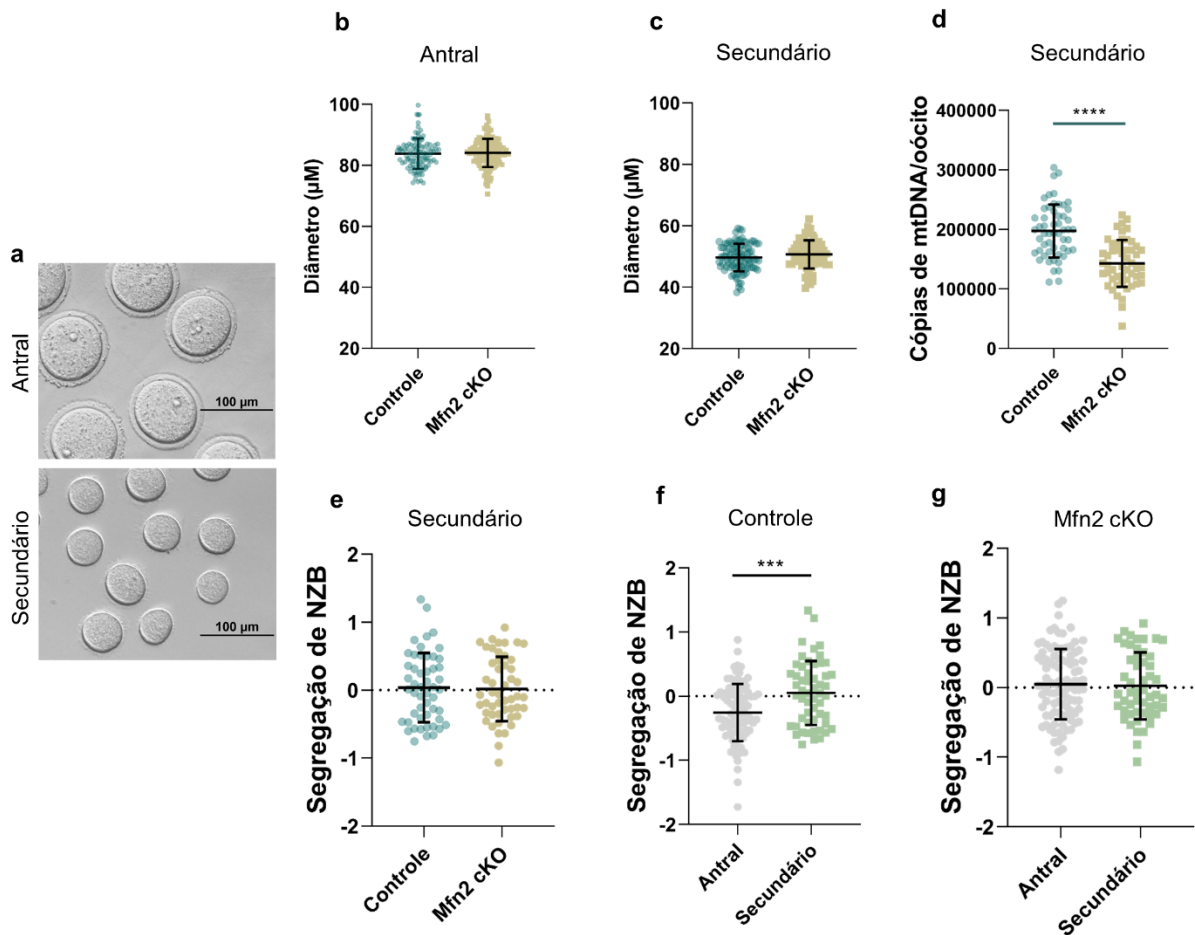


Figura 34: Efeito do nocaute condicional de Mfn2 (Mfn2 cKO) sob a herança de mtDNA em oócitos provenientes de folículos secundários. (a) Imagens de oócitos obtidos de folículos antrais (Antral) e oócitos obtidos através de folículos secundários (Secundário). (b) Diâmetro de oócitos obtidos de folículos antrais e (c) oócitos obtidos através de folículos secundários. (d) Quantidade de cópias de mtDNA em oócitos de fêmeas do grupo Controle e Mfn2 cKO obtidos de folículos secundários. (e) Segregação de mtDNA NZB em oócitos de fêmeas do grupo Controle e Mfn2 cKO obtidos de folículos secundários. (f) Segregação de mtDNA NZB em oócitos obtidos de folículos antrais e secundários de fêmeas do grupo Controle. (g) Segregação de mtDNA NZB em oócitos obtidos de folículos antrais e secundários de fêmeas do grupo Mfn2 cKO. Os oócitos foram coletados individualmente e tiveram o conteúdo de mtDNA determinado por qPCR. **** $P < 0,0001$.

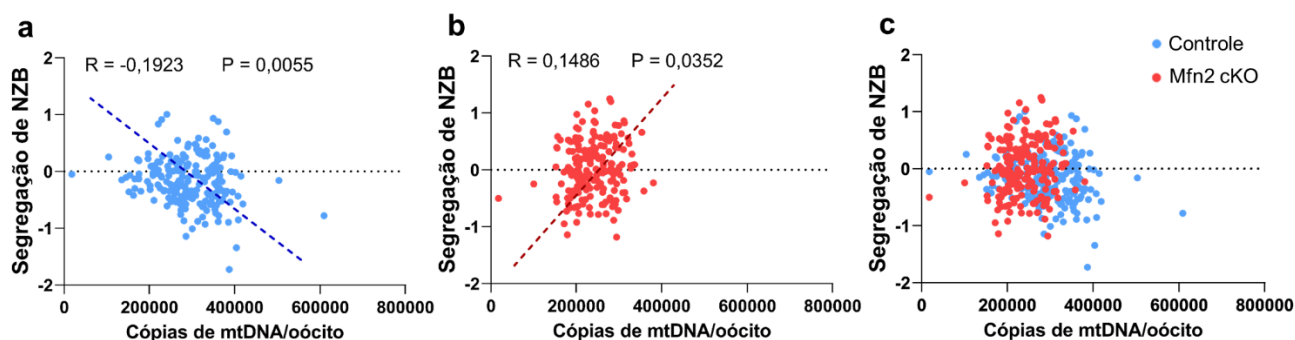


Figura 35: Correlação entre cópias de mtDNA e segregação de NZB em oócitos crescidos obtidos de fêmeas do grupo Controle (a) e Mfn2 cKO (b). (c) Correlação entre cópias de mtDNA e segregação de NZB em oócitos Controle (azul) e Mfn2 cKO (vermelho). N = 207 para Controle e N = 201 para Mfn2 cKO.

Embora a replicação parece estar atuando sobre a segregação de mtDNA NZB, a existência de outros mecanismos não foi descartada. Nesse sentido, nossa hipótese se baseou na ocorrência de mitofagia, que poderia estar dirigindo ativamente a eliminação de mitocôndrias contendo maior quantidade de mtDNA NZB. Essa teoria está fundamentada em trabalhos que mostram que o mtDNA deletério pode ser eliminado por mitofagia devido ao seu efeito sobre a função mitocondrial. Além disso, o fato do Mfn2 desempenhar um importante papel na ocorrência de mitofagia vai de encontro com os dados apresentados anteriormente, onde a ausência de Mfn2 impediu a eliminação de mtDNA NZB. Para testar essa hipótese, o nocaute condicional do gene *Atg7* (gene essencial na formação do autofagossomo) foi realizado no oócito por uso do sistema Cre-Lox. Seguindo a mesma estrutura do experimento anterior, os acasalamentos foram realizados (Figura 36) para obtenção de fêmeas com os seguintes genótipos: Selvagem (Controle - B6/NZB;Zp3-Cre;Atg7^{+/+}) e nocaute condicional de *Atg7* (Atg7 cKO; B6/NZB;Zp3-Cre;Atg7^{loxP/-}). Os oócitos dessas fêmeas foram então utilizados para investigação da segregação do mtDNA NZB.

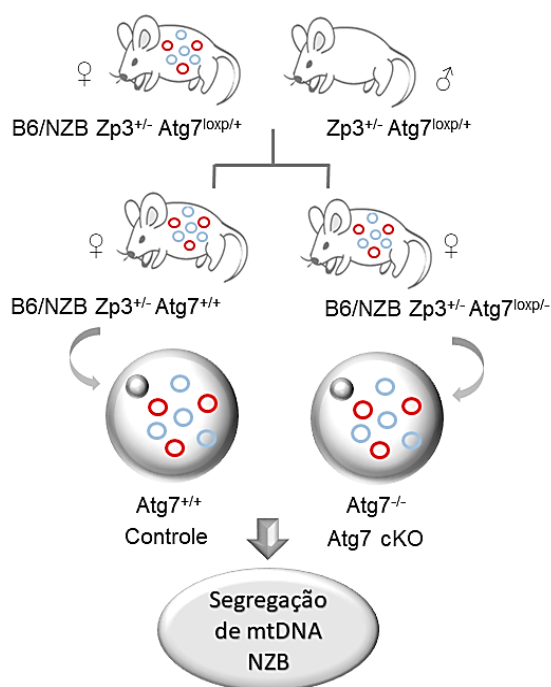


Figura 36: Esquema representativo do modelo experimental envolvendo oócido Atg7 cKO. Fêmeas heteroplásmicas, contendo o transgene Zp3-Cre e heterozigotas para a presença de sequências loxP flanqueando parte do gene Atg7 (B6/NZB;Zp3-Cre;Atg7^{loxP/+}) foram acasaladas com machos do mesmo genótipo (Zp3-Cre;Atg7^{loxP/+}). Como resultado desse acasalamento, fêmeas com os seguintes genótipos B6/NZB;Zp3-Cre;Atg7^{+/+} e B6/NZB;Zp3-Cre;Atg7^{loxP/-} foram selecionadas e tiveram seus oócitos avaliados quanto a segregação de mtDNA.

Diferentemente do experimento anterior, os oócitos Atg7 cKO não haviam sido previamente caracterizados. No entanto, conforme esperado e apresentado na figura 37, os oócitos Atg7 cKO não diferem quanto a morfologia de COC e apresentam redução significativa de transcritos Atg7. Entretanto, os oócitos Atg7 cKO coletados com 8 semanas de idade apresentaram maior diâmetro, diferença não observada quando a coleta foi realizada com 3 semanas.

Apesar do maior diâmetro, não foram observadas diferenças entre oócitos WT e Atg7 KO quanto ao número de cópias de mtDNA, independente da idade (Figura 38). Além disso, ao contrário do esperado os grupos não diferiram quanto a segregação de mtDNA NZB. No entanto, muito estranhamente o grupo Controle com 8 semanas não apresentou evidência de eliminação de NZB ($0,004 \pm 0,06$). Esse resultado leva a suposição de que fatores específicos da linhagem de camundongos estejam atuando na seleção negativa de NZB. Neste sentido, já era previsto por nosso grupo a influência do gene nuclear NNT (*nicotinamide nucleotide transhydrogenase*) sob a segregação de mtDNA. Como algumas linhagens comerciais de camundongo apresentam

mutações nesse gene, esse trabalho utilizou apenas animais com NNT selvagem. No entanto, um trabalho recente mostrou que além do NNT, o gene nuclear Scaf1 (*supercomplex assembly factor 1*) pode interferir na segregação mitocondrial⁵⁵. Nossos próximos experimentos terão como objetivo checar se a linhagem utilizada para obtenção de oócitos Atg7 cKO apresentava a versão mutada do gene Scaf1.

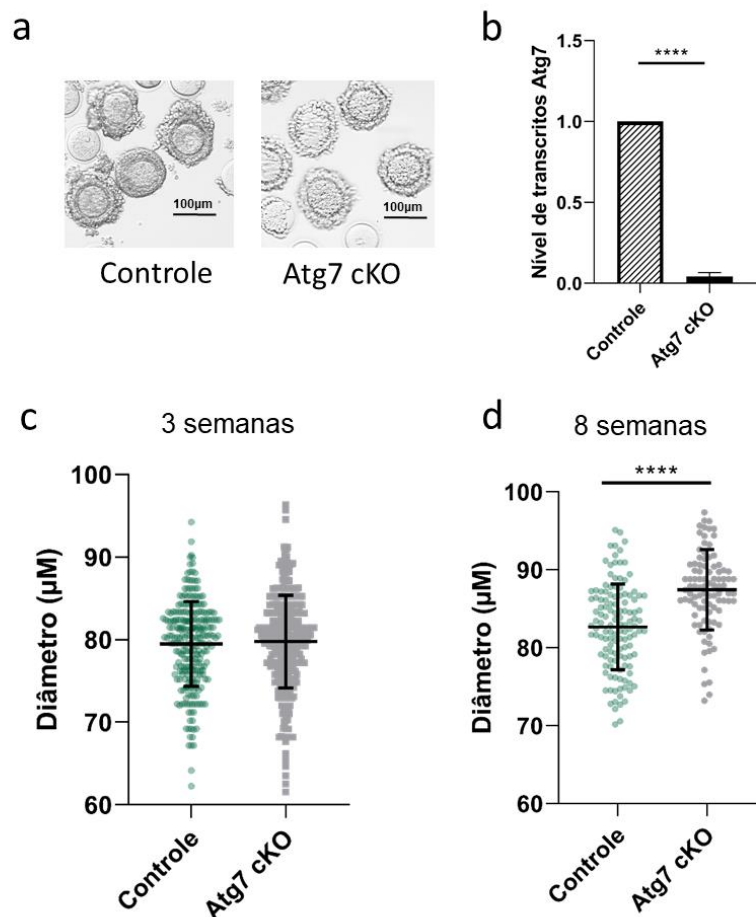


Figura 37: Efeito do nocaute condicional de Atg7 (Atg7 cKO) sob a morfologia e diâmetro de oócitos. (a) Imagens de complexos cumulus-oócitos (COCs) obtidos de fêmeas com 3 semanas. (b) Níveis de transcritos Atg7 obtidos a partir de qPCR; Ppia e Rps18 foram utilizados como endógenos. (c) Diâmetro de oócitos do grupo Controle e Atg7 cKO obtidos de fêmeas com 3 semanas. (d) Diâmetro de oócitos do grupo Controle e Atg7 cKO obtidos de fêmeas com 8 semanas. ****P < 0,0001.

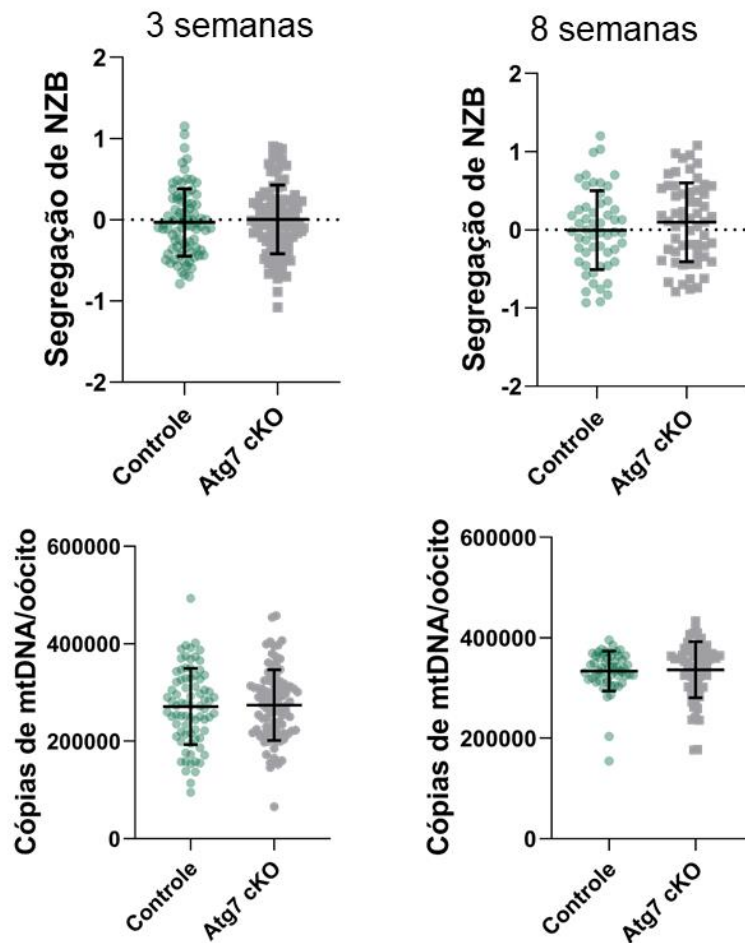


Figura 38: Efeito do nocaute condicional de *Atg7* (*Atg7* cKO) em oócitos sob a herança de mtDNA. Os gráficos mostram a segregação de NZB (gráficos superiores) e a quantidade de cópias de mtDNA (gráficos inferiores) em oócitos de fêmeas do grupo Controle e *Atg7* cKO com 3 e 8 semanas. Os oócitos foram coletados individualmente e tiveram o conteúdo de mtDNA determinado por qPCR. $P > 0,05$.

De modo geral, nossos dados envolvendo a linhagem heteroplásmica B6/NZB indicam a presença de um mecanismo seletivo de eliminação de mtDNA NZB em oócitos no estágio de folículo antral (Figura 39). Esse mecanismo parece ocorrer a nível de organela, uma vez que é dependente de *Mfn2*. Além disso, nossos dados fornecem evidências de que os menores níveis de NZB nos oócitos podem ser resultado de uma amplificação preferencial de haplótipos B6.

Em concordância com esse resultado, tem sido demonstrado que a replicação do mtDNA é prejudicada em organelas deficientes em *ATP19*, o que pode conduzir a renovação preferencial de mitocôndrias contendo genomas do tipo selvagem. Uma vez que o NZB apresenta menor desempenho da OXPHOS^{115,131}, mitocôndrias contendo maior quantidade de mtDNA B6 podem ter sido favorecidas durante a replicação nos estágios finais da oogênese.

Esse mecanismo de seleção talvez tenha sido alterado na ausência de Mfn2, uma vez que oócitos Mfn2 cKO não apresentaram eliminação de mtDNA NZB. Esse efeito provavelmente está relacionado com o papel do Mfn2 na estabilidade do mtDNA. Vários trabalhos já mostraram que mutações no Mfn2 podem causar distúrbios na manutenção do mtDNA com associação a defeitos na cadeia respiratória¹³⁵. Nossos dados confirmam esses resultados uma vez que o nocaute do Mfn2 resultou em oócitos com menor quantidade de cópias de mtDNA.

Apesar das evidências apresentadas acima, nossos dados não excluem outros mecanismos de seleção. Isso porque o Mfn2 está diretamente ligado a ocorrência de mitofagia por diversas formas, como por exemplo, por interferir no recrutamento de Parkin¹³⁶, pela ação mediadora com o ER¹³⁷, ou por afetar a formação de autofagossomos¹³⁸. O efeito do Mfn2 sob o mecanismo de seleção de NZB em oócitos pode ser um indicativo da ocorrência de mitofagia. No entanto, outros experimentos, além dos apresentados aqui, são necessários para responder essa hipótese.

Nossos resultados também não excluem outras formas de seleção durante o período de desenvolvimento inicial. Em concordância com os resultados apresentados neste trabalho, Latorre-Pellicer e colaboradores⁵⁵ mostraram seleção de NZB durante os primeiros dias do desenvolvimento (5,5 dias de gestação) ao utilizarem a mesma linhagem heteroplásmica. No entanto, nós fornecemos evidências de que os mecanismos de seleção durante esse período diferem daqueles apresentados em oócitos, uma vez que independem de Mfn2. Resultados similares foram encontrados em PGCs, onde o Mfn2 não parece interferir na segregação de NZB.

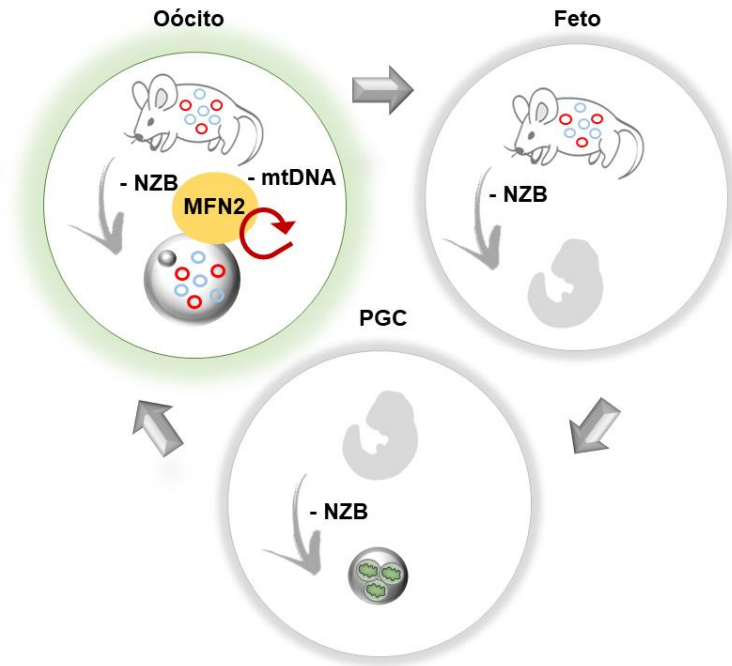


Figura 39: Modelo hipotético da segregação de mtDNA na linhagem heteroplásmia B6/NZB. A figura resume os resultados encontrados: presença de um mecanismo de eliminação de mtDNA NZB, dependente de Mfn2, com ação durante o desenvolvimento de oócitos. Os menores níveis de NZB provavelmente são resultado de uma amplificação preferencial de haplótipos B6. A figura também mostra eliminação de mtDNA NZB em fetos e PGCs, no entanto, este resultado mostrou ser independente de Mfn2. Fonte: Autor.

7. Conclusões

Nossos resultados indicam um mecanismo purificador de mtDNA mutante, dependente de Mfn2, e com ação durante o desenvolvimento oocitário. Além disso, destacamos a derivação de PGCs em fetos nocaute para Mfn2, e a derivação de PGCLCs (PGC-like cells) a partir de células-tronco embrionárias deficientes em Drp1, ambos com efeito sobre o número de cópias de mtDNA. Como conclusão, nossos achados revelam que a dinâmica mitocondrial desempenha importante função na regulação da herança mitocondrial em oócitos.

8. Referências Bibliográficas

1. Youle, R. J. Mitochondria—Striking a balance between host and endosymbiont. *Science* (80-.). **365**, (2019).
2. Wei, W. *et al.* Nuclear-mitochondrial DNA segments resemble paternally inherited mitochondrial DNA in humans. *Nat. Commun.* **11**, 1–11 (2020).
3. S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. S. & I. G. Y. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).
4. Bibb, M. J., Van Etten, R. A., Wright, C. T., Walberg, M. W. & Clayton, D. A. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* **26**, 167–180 (1981).
5. Chinnery, P. F., Ph, D. & Sc, D. Clinical Implications of Basic Research Mitochondrial Replacement in the Clinic. *N. Engl. J. Med.* 1855–1857 (2020).
6. Craven, L., Alston, C. L., Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **18**, 257–275 (2017).
7. Gorman, G. S. *et al.* Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann. Neurol.* **77**, 753–759 (2015).
8. Elliott, H. R., Samuels, D. C., Eden, J. A., Relton, C. L. & Chinnery, P. F. Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 254–260 (2008).
9. Kang, D. & Hamasaki, N. Alterations of Mitochondrial DNA in Common Diseases and Disease States: Aging, Neurodegeneration, Heart Failure, Diabetes and Cancer. *Curr. Med. Chem.* **12**, 429–441 (2012).
10. Cree, L. M. *et al.* A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat. Genet.* **40**, 249–54 (2008).
11. Wai, T. *et al.* The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol. Reprod.* **83**, 52–62 (2010).
12. Wai, T., Teoli, D. & Shoubridge, E. A. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat. Genet.* **40**, 1484–1488 (2008).
13. Stewart, J. B., Freyer, C., Elson, J. L. & Larsson, N.-G. Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. *Nat Rev Genet* **9**, 657–62 (2008).
14. Lieber, T., Jeedigunta, S. P., Palozzi, J. M., Lehmann, R. & Hurd, T. R. Mitochondrial fragmentation drives selective removal of deleterious mtDNA in the germline. *Nature* **570**, 380–384 (2019).
15. Stewart, J. B. *et al.* Strong purifying selection in transmission of mammalian

- mitochondrial DNA. *PLoS Biol.* **6**, e10 (2008).
16. Floros, V. I. *et al.* Segregation of mitochondrial DNA heteroplasmy through a developmental genetic bottleneck in human embryos. *Nat. Cell Biol.* (2018). doi:10.1038/s41556-017-0017-8
 17. Dai, Y. *et al.* Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 637–647 (2014).
 18. Twig, G. *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 433–446 (2008). doi:10.1038/sj.emboj.7601963
 19. Fukuoh, A. *et al.* Screen for mitochondrial DNA copy number maintenance genes reveals essential role for ATP synthase. *Mol. Syst. Biol.* **10**, 734 (2014).
 20. NASS, M. M. K. & NASS, S. Intramitochondrial Fibers With DNA Characteristics I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J. Cell Biol.* **19**, 593–611 (1963).
 21. NASS, S. & NASS, M. M. K. Intramitochondrial Fibers With DNA Characteristics. II Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. *J. Cell Biol.* **19**, 613–629 (1963).
 22. Schatz, G., Haslbrunner, E. & Tuppy, H. Deoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 127–132 (1964).
 23. Nicholls, T. J. & Minczuk, M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp. Gerontol.* **56**, 175–181 (2014).
 24. Kasamatsu, H., Robberson, D. L. & Vinograd, J. A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 2252–2257 (1971).
 25. Robberson, D. L. & Clayton, D. A. Replication of mitochondrial DNA in mouse L cells and their thymidine kinase - derivatives: displacement replication on a covalently-closed circular template. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 3810–3814 (1972).
 26. Arnberg, A., Van Bruggen, E. F. J., Ter Schegget, J. & Borst, P. The presence of DNA molecules with a displacement loop in standard mitochondrial DNA preparations. *BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth.* **246**, 353–357 (1971).
 27. Holt, I. J. & Reyes, A. Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–15 (2012).
 28. Bolden, A., Noy, G. P. & Weissbach, A. DNA Polymearese of Mitochondria Is a γ -Polymerase. *J. Biol. Chem.* **252**, 3351–3356 (1977).
 29. Tynismaa, H. *et al.* Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 3219–3227 (2004).
 30. Tiranti, V., Rocchi, M., DiDonato, S. & Zeviani, M. Cloning of human and rat cDNAs encoding the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (SSB). *Gene* **126**, 219–225 (1993).
 31. Ringel, R. *et al.* Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature* **478**, 269–273 (2011).

32. Aloni, Y. & Attardi, G. Symmetrical in vivo transcription of mitochondrial DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 1757–1761 (1971).
33. Hillen, H. S., Temiakov, D. & Cramer, P. Structural basis of mitochondrial transcription. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 754–765 (2018).
34. Fisher, R. P., Topper, J. N. & Clayton, D. A. Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements. *Cell* **50**, 247–258 (1987).
35. D’Souza, A. R. & Minczuk, M. Mitochondrial transcription and translation: Overview. *Essays Biochem.* **62**, 309–320 (2018).
36. Rubio-Cosials, A. *et al.* Human mitochondrial transcription factor A induces a U-turn structure in the light strand promoter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1281–1289 (2011).
37. Ngo, H. B., Lovely, G. A., Phillips, R. & Chan, D. C. Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation. *Nat. Commun.* **5**, 1–12 (2014).
38. Kaufman, B. A. *et al.* The Mitochondrial Transcription Factor TFAM Coordinates the Assembly of Multiple DNA Molecules into Nucleoid-like Structures. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3225–3236 (2007).
39. Kukut, C. *et al.* Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13534–13539 (2011).
40. Bonekamp, N. A. & Larsson, N. G. SnapShot: Mitochondrial Nucleoid. *Cell* **172**, 388–388.e1 (2018).
41. van den Ameele, J., Li, A. Y. Z., Ma, H. & Chinnery, P. F. Mitochondrial heteroplasmy beyond the oocyte bottleneck. *Semin. Cell Dev. Biol.* **97**, 156–166 (2020).
42. Thompson, K. *et al.* Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **43**, 36–50 (2020).
43. Stehling, O. & Lill, R. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: Mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, 1–17 (2013).
44. De Brito, O. M. & Scorrano, L. An intimate liaison: Spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO J.* **29**, 2715–2723 (2010).
45. Wang, C. & Youle, R. J. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 95–118 (2009).
46. Liesa, M., Palacín, M. & Zorzano, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol. Rev.* **89**, 799–845 (2009).
47. Gray, M. W., Burger, G. & Lang, B. F. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **283**, 1476–1481 (1999).
48. Martin, W. F., Garg, S. & Zimorski, V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc.* **370**, (2015).

49. Pittis, A. A. & Gabaldón, T. Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nature* **531**, 101–104 (2016).
50. Abe, Y. *et al.* Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* **100**, 551–560 (2000).
51. Schagger, H. & Pfeiffer, K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**, 1777–1783 (2000).
52. Dudkina, N. V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E. J. & Braun, H. P. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3225–3229 (2005).
53. Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A. & Enriquez, J. A. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol. Cell* **32**, 529–539 (2008).
54. Milenkovic, D., Blaza, J. N., Larsson, N. G. & Hirst, J. The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. *Cell Metab.* **25**, 765–776 (2017).
55. Latorre-Pellicer, A. *et al.* Regulation of Mother-to-Offspring Transmission of mtDNA Heteroplasmy. *Cell Metab.* **30**, 1120-1130.e5 (2019).
56. Nunnari, J. *et al.* Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1233–1242 (1997).
57. Liesa, M. & Shirihai, O. S. Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metab.* **176**, 491–506 (2018).
58. Kogo, N. *et al.* Germ-line mitochondria exhibit suppressed respiratory activity to support their accurate transmission to the next generation. *Dev. Biol.* **349**, 462–469 (2011).
59. Pernas, L. & Scorrano, L. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu. Rev. Physiol.* **78**, 505–531 (2016).
60. Hermann, G. J. *et al.* Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* **143**, 359–373 (1998).
61. Labbé, K., Murley, A. & Nunnari, J. Determinants and Functions of Mitochondrial Behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 357–391 (2014).
62. Van Der Blik, A. M. Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol.* **9**, 96–102 (1999).
63. Chen, H. *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* **160**, 189–200 (2003).
64. Hales, K. G. & Fuller, M. T. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* **90**, 121–129 (1997).
65. Santel, A. & Fuller, M. T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* **114**, 867–874 (2001).
66. Chen, H., Chomyn, A. & Chan, D. C. Disruption of fusion results in

- mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* **280**, 26185–92 (2005).
67. Ishihara, N., Eura, Y. & Mihara, K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci.* **117**, 6535–6546 (2004).
 68. De Brito, O. M. & Scorrano, L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605–610 (2008).
 69. Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. & Van der Bliek, A. M. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2245–2256 (2001).
 70. Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A. & Van der Bliek, A. M. C. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell* **4**, 815–826 (1999).
 71. Bleazard, W. *et al.* The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* **1**, 298–304 (1999).
 72. Mears, J. A. *et al.* Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 20–27 (2011).
 73. Kraus, F. & Ryan, M. T. The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *J. Cell Sci.* **130**, 2953–2960 (2017).
 74. Gandre-Babbe, S. & Bliek, A. M. van der. The Novel Tail-anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2402–2412 (2008).
 75. Otera, H. *et al.* Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **191**, 1141–1158 (2010).
 76. Palmer, C. S. *et al.* MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep.* **12**, 565–573 (2011).
 77. Lee, J. E., Westrate, L. M., Wu, H., Page, C. & Voeltz, G. K. Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* **540**, 139–143 (2016).
 78. Friedman, J. R. *et al.* ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science (80-.)*. **334**, 358–362 (2011).
 79. Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Sasaki, N., Mihara, K. & Ishihara, N. Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11863–11868 (2013).
 80. Lewis, S. C., Uchiyama, L. F. & Nunnari, J. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with Mitochondrial division in human cells. *Science (80-.)*. **353**, (2016).
 81. Udagawa, O. *et al.* Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. *Curr. Biol.* **24**, 2451–2458 (2014).
 82. Ishihara, N. *et al.* Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic

- development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* **11**, 958–966 (2009).
83. Parone, P. A. *et al.* Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* **3**, 1–9 (2008).
 84. Pickles, S., Vigié, P. & Youle, R. J. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr. Biol.* **28**, R170–R185 (2018).
 85. Kirkin, V. & Rogov, V. V. A Diversity of Selective Autophagy Receptors Determines the Specificity of the Autophagy Pathway. *Mol. Cell* **76**, 268–285 (2019).
 86. Yoo, S. M. & Jung, Y. K. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. *Mol. Cells* **41**, 18–26 (2018).
 87. Suen, D.-F., Narendra, D. P., Tanaka, A., Manfredi, G. & Youle, R. J. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11835–11840 (2010).
 88. Dai, Y. *et al.* Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 637–647 (2014).
 89. Chiaratti, M. R. *et al.* The role of mitochondria in the female germline: implications to fertility and inheritance of mitochondrial diseases. 1–39 (2018).
 90. Pikó, L. & Taylor, K. D. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev. Biol.* **123**, 364–374 (1987).
 91. Aiken, C. E. M., Cindrova-Davies, T. & Johnson, M. H. Variations in mouse mitochondrial DNA copy number from fertilization to birth are associated with oxidative stress. *Reprod. Biomed. Online* **17**, 806–813 (2008).
 92. Cree, L. M., Samuels, D. C. & Chinnery, P. F. The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1097–102 (2009).
 93. Saitou, M. & Yamaji, M. Primordial germ cells in mice. *Bibl. Anat.* **24**, 59–66 (1983).
 94. Tang, W. W. C., Kobayashi, T., Irie, N., Dietmann, S. & Surani, M. A. Specification and epigenetic programming of the human germ line. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 585–600 (2016).
 95. Chiaratti, M. R. *et al.* The role of mitochondria in the female germline: Implications to fertility and inheritance of mitochondrial diseases. *Cell Biol. Int.* **42**, (2018).
 96. Pepling M. From Primordial Germ Cell to Primordial Follicle: Mammalian Female Germ Cell Development. *Genesis* **45**, 76–82 (2007).
 97. Cree, L. M. *et al.* A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat. Genet.* **40**, 249–254 (2008).
 98. Cao, L. *et al.* The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Online* **39**, 386–390 (2007).
 99. Motta, P. M., Nottola, S. A., Makabe, S., Heyn, R. & Jansen, R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum. Reprod.* **15**, 129–

- 147 (2000).
100. Dalton, C. M. & Carroll, J. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J. Cell Sci.* **126**, 2955–2964 (2013).
 101. Payne, B. A. I. *et al.* Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 384–390 (2013).
 102. Luo, S. *et al.* Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 13039–13044 (2018).
 103. Zhou, Q. *et al.* Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science (80-.)*. **353**, 394–399 (2016).
 104. Hauswirth, W. W. & Laipis, P. J. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 4686–90 (1982).
 105. Olivo, P. D., Van De Walle, M. J., Laipis, P. J. & Hauswirth, W. W. Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. *Nature* **306**, 400–402 (1983).
 106. Solignac, M., Génormont, J., Monnerot, M. & Mounolou, J. C. Genetics of mitochondria in *Drosophila*: mtDNA inheritance in heteroplasmic strains of *D. mauritiana*. *MGG Mol. Gen. Genet.* **197**, 183–188 (1984).
 107. Jenuth, J. P., Peterson, A., Fu, K. & Shoubridge, E. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Group* (1996).
 108. Wei, W. & Chinnery, P. F. Inheritance of mitochondrial DNA in humans: implications for rare and common diseases. *J. Intern. Med.* **287**, 634–644 (2020).
 109. Larsson, N. G. *et al.* Segregation and manifestations of the mtDNA tRNA(Lys) A→G((8344)) mutation of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 1201–1212 (1992).
 110. White, S. L. *et al.* Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 474–482 (1999).
 111. Wei, W. *et al.* Germline selection shapes human mitochondrial DNA diversity. *Science (80-.)*. **364**, (2019).
 112. Fan, W. *et al.* A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science (80-.)*. **319**, 958–962 (2008).
 113. Kauppila, J. H. K. *et al.* A Phenotype-Driven Approach to Generate Mouse Models with Pathogenic mtDNA Mutations Causing Mitochondrial Disease. *Cell Rep.* **16**, 2980–2990 (2016).
 114. Sharpley, M. S. *et al.* Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. *Cell* **151**, 333–43 (2012).
 115. Latorre-Pellicer, A. *et al.* Mitochondrial and nuclear DNA matching shapes metabolism and healthy ageing. *Nature* **535**, 561–565 (2016).
 116. Zhang, H., Burr, S. P. & Chinnery, P. F. The mitochondrial DNA genetic

- bottleneck: Inheritance and beyond. *Essays Biochem.* **62**, 225–234 (2018).
117. Sato, A. *et al.* Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germ cells with age. *Genetics* **177**, 2031–2037 (2007).
 118. Ma, H. *et al.* Deleterious mtDNA mutations are common in mature oocytes. *Biol. Reprod.* **102**, 607–619 (2020).
 119. Tam, Z. Y., Gruber, J., Halliwell, B. & Gunawan, R. Context-Dependent Role of Mitochondrial Fusion-Fission in Clonal Expansion of mtDNA Mutations. *PLoS Comput. Biol.* **11**, 1–22 (2015).
 120. Komatsu, M. *et al.* Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* **169**, 425–434 (2005).
 121. Machado, T. S. *et al.* Real-Time PCR Quantification of Heteroplasmy in a Mouse Model with Mitochondrial DNA of C57BL/6 and NZB/BINJ Strains. *PLoS One* **10**, e0133650 (2015).
 122. Shitara, H. *et al.* Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics* **156**, 1277–84 (2000).
 123. Folmes, C. D. L. *et al.* Disease-causing Mitochondrial Heteroplasmy Segregated within Induced Pluripotent Stem Cell Clones Derived from A MELAS Patient. *Stem Cells* (2013). doi:10.1002/stem.1389
 124. Cherry, A. B. C. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cells with a Pathological Mitochondrial DNA Deletion. *Stem Cells* (2013). doi:10.1002/stem.1354
 125. Fujikura, J. *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia* **55**, 1689–98 (2012).
 126. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–76 (2006).
 127. Chen, H. *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *Cell* 189–200 (2003). doi:10.1083/jcb.200211046
 128. Hayashi, K. & Saitou, M. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **8**, 1513–1524 (2013).
 129. Kasahara, A., Cipolat, S., Chen, Y., Dorn, G. W. & Scorrano, L. Mitochondrial fusion directs cardiomyocyte differentiation via calcineurin and notch signaling. *Science (80-.)*. **342**, 734–737 (2013).
 130. Wang, L. *et al.* Drp1 is dispensable for mitochondria biogenesis in induction to pluripotency but required for differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **23**, 2422–2434 (2014).
 131. Moreno-Loshuertos *et al.* Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat. Genet.* **38**, 1261–8 (2006).
 132. Jenuth, J., Peterson, A. & Shoubridge, E. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat. Genet.* **16**, 93–95 (1997).

133. Machado, T. S. *et al.* Real-time PCR quantification of heteroplasmy in a mouse model with mitochondrial DNA of C57BL/6 and NZB/BINJ strains. *PLoS One* **10**, (2015).
134. Johnston, I. G. & Jones, N. S. Evolution of Cell-to-Cell Variability in Stochastic, Controlled, Heteroplasmic mtDNA Populations. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 1150–1162 (2016).
135. Rouzier, C. *et al.* The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy ‘plus’ phenotype. *Brain* **135**, 23–34 (2012).
136. Chen, Y. & II, G. W. D. PINK1- Phosphorylated Mitofusin 2 is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria. *Science (80-.)*. **340**, 471–475 (2013).
137. McLelland, G. L. *et al.* Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy. *Elife* **7**, 1–35 (2018).
138. Hailey, D. W. *et al.* Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell* **141**, 656–667 (2010).