

Nederlandse samenvatting

Het ontrafelen van ALS: inzichten vanuit de genetica, genexpressieanalyse en functionele biologie

Inleiding

Amyotrofische laterale sclerose (ALS) is een neurologische ziekte waarbij specifiek de motorische zenuwcellen afsterven. Deze zenuwcellen (motorneuronen) sturen normaal gesproken vanuit de hersenen en het ruggenmerg de spieren aan. Het afsterven van motorneuronen leidt ertoe dat spieren niet meer worden aangestuurd en dat spiermassa afneemt, waardoor ALS patiënten verlamd raken. De ziekte is zeer progressief en de meeste patiënten overlijden gemiddeld 3 jaar na het stellen van de diagnose, meestal doordat uiteindelijk ook de ademhalingsspieren uitvallen. Helaas is er momenteel geen adequate behandeling voor ALS beschikbaar; de enige behandeling (riluzole) vertraagt het ziektebeloop met slechts enkele maanden. Ook over de precieze oorzaak van ALS is nog veel onduidelijk. Bij een deel van de patiënten (+/- 10%) komt ALS in de familie voor (familiaire ALS, FALS) met één enkele genetische oorzaak. Maar bij het overgrote deel van patiënten (+/- 90%) is sprake van een sporadische variant van de ziekte (sporadische ALS, SALS), waarbij een combinatie van genetische risicofactoren en omgevingsfactoren de ziekte veroorzaakt. De afgelopen jaren is er veel progressie geboekt wat betreft kennis over zowel de genetische oorzaken van FALS als de genetische risicofactoren die bij SALS een rol spelen. Hoe deze genetische veranderingen (mutaties) vervolgens leiden tot het afsterven van motorneuronen is nog onduidelijk (hoofdstuk 1).

Door het combineren van verschillende onderzoekstechnieken verwachten we meer over het ontstaan van ALS te weten te komen. In dit proefschrift wordt beschreven hoe mutaties in specifieke genen de kans op het krijgen van ALS vergroten (genetica). Ook onderzoeken we hoe dit leidt tot veranderingen in de expressie, en daarmee de activiteit, van genen en hoe daarmee onderscheid tussen ALS en controle modellen gemaakt kan worden (genexpressie). Tenslotte worden de resultaten van functioneel biologische studies beschreven die het effect van mutaties op de functie van het met ALS geassocieerde eiwit FUS onderzoeken.

Het ontrafelen van ALS: inzichten vanuit de genexpressieanalyse

Door middel van genexpressie microarrays is het mogelijk om op grote schaal vast te stellen hoeveel RNA in een cel tot expressie komt. Genexpressie kan geïnterpreteerd worden als een maat van activiteit van dat specifieke gen. Door veranderingen in genexpressieprofielen te bepalen is het mogelijk onderscheid te maken tussen verschillende groepen, bijvoorbeeld ALS patiënten en gezonde controlepersonen. Het eerste deel van dit proefschrift beschrijft de bevindingen van verschillende studies naar genexpressieverschillen bij ALS. Het afgelopen decennium zijn meerdere genexpressiestudies beschreven

in de literatuur. In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van deze studies en wordt overlap in de resultaten van deze studies vastgesteld. Omdat de opzet van deze studies over het algemeen ver uiteen loopt, is de overlap in de resultaten van deze studies gering. De meeste overlap lijkt te zijn toe te schrijven aan genen die een secundair effect van de ziekte weergeven, zoals uit ontstekingscascades die worden geactiveerd als gevolg van celdood. Nog niet eerder is onderzocht in hoeverre genexpressieprofielen verkregen uit bloed een betrouwbaar beeld geven van veranderingen die optreden in het ruggenmerg. Omdat motorneuronen zich bevinden in de hersenen en in het ruggenmerg, maar bij ALS patiënten dit weefsel niet toegankelijk is, zijn we genoodzaakt het ziektebeloop te volgen in eenvoudiger beschikbaar weefsel, zoals bloed. In een muismodel van ALS wordt geïllustreerd dat genexpressieprofielen verkregen uit bloed inderdaad ALS en controle muizen op een betrouwbare manier kunnen onderscheiden (**hoofdstuk 3**). Tenslotte gebruiken we genexpressie microarrays om het werkingsmechanisme van het enige beschikbare medicijn voor ALS, riluzole, te onderzoeken (**hoofdstuk 4**). Er wordt gedacht dat riluzole een beschermend heeft effect op motorneuronen doordat het het toxische effect van een te hoge blootstelling aan glutamaat vermindert. Door genexpressieprofielen van behandelde en onbehandelde muizen te vergelijken, kwamen een aantal groepen genen naar voren waarvan de expressie door riluzole wordt gereguleerd. Die wijzen erop dat riluzole naast een beschermende rol tegen glutamaat-toxiciteit, mogelijk ook genen beïnvloed die een rol spelen bij RNA metabolisme. Dit sluit aan bij de ontdekking van recent geïdentificeerde mutaties in genen als FUS en TDP-43 (zie hieronder) die een belangrijke rol spelen in RNA metabolisme. Deze resultaten bieden nieuwe aanknopingspunten voor het onderzoek naar alternatieve behandelingsmogelijkheden voor ALS.

Het ontrafelen van ALS: inzichten vanuit de genetica

Recent is er veel vooruitgang geboekt op het gebied van de genetische veranderingen die optreden bij ALS. Naast mutaties in *SOD1*, die al sinds 1993 bekend zijn als oorzaak van ALS, zijn recent mutaties in onder andere *TDP-43*, *FUS*, *OPTN*, *PFN1* en *C9ORF72* ontdekt als oorzaken van, met name, FALS. Ondanks de nodige vooruitgang in het genetisch onderzoek bij ALS, zijn er ook nog de nodige vragen die de aanleiding zijn van de volgende hoofdstukken in dit proefschrift. Eerder is aangetoond dat zich op chromosoom 19 een locus bevindt dat de kans op het krijgen van ALS verhoogt (19p13.3). De precieze oorzaak van die associatie met ALS is echter nog onbekend. In **hoofdstuk 5** worden de resultaten van een studie beschreven waarbij bij 1000 SALS patiënten en 1000 controlepersonen de DNA sequentie van de coderende delen van het chr. 19 locus zijn

bepaald. Er werd geen verrijking gevonden voor mutaties in SALS vergeleken met controles, wat erop duidt dat er zich in dat locus wellicht nog andere genetische variaties bevinden die een rol spelen bij ALS. In 2009 is voor het eerst beschreven dat mutaties in het RNA-bindende eiwit FUS een oorzaak zijn van FALS. We beschrijven hier dat dat ook voor Nederlandse ALS patiënten geldt (**hoofdstuk 6**). Bovendien bevestigen we dat eiwitophopingen voorkomen in het ruggenmerg van patiënten met mutaties in *FUS*. Tenslotte bestuderen we genetische variatie in het *FMR1* gen (**hoofdstuk 7**). In een functioneel biologische studie naar de gevolgen van mutaties in *FUS*, wordt een interessante link tussen de eiwitten FUS en FMRP geïdentificeerd (zie hieronder). Omdat genetische variatie in *FMR1* eerder met ziekte is geassocieerd, bekeken we of deze variatie ook bij ALS een rol speelt. In een groep van 800 Nederlandse SALS patiënten en 800 controlepersonen bleek dit niet het geval te zijn.

Het ontrafelen van ALS: inzichten vanuit functionele biologie

In het laatste deel van dit proefschrift worden de resultaten van verschillende studies naar de functioneel biologische gevolgen van mutaties in met ALS geassocieerde genen beschreven. De kennis op het gebied van de gevolgen van mutaties in ALS genen is beperkt. Bovendien heeft veel onderzoek naar de gevolgen van met ALS geassocieerde mutaties zich toegespitst op het *SOD1* gen, dat lange tijd de enige bekende genetische oorzaak van ALS was. De hierboven beschreven vooruitgang op het gebied van genetica van ALS zorgt ervoor dat er de afgelopen jaren ook op het gebied van de functioneel ALS onderzoek vooruitgang is geboekt.

Wanneer motorneuronen van ALS patiënten na het overlijden (*post mortem*) onderzocht worden, blijkt dat daar ophopingen van eiwitten in voorkomen, zogenaamde eiwitaggregaten. Dit is niet uniek voor ALS, bij de meeste neurodegeneratieve aandoeningen worden *post mortem* eiwitaggregaten aangetroffen in specifieke celtypes. Het aangedane celtype en de samenstelling van eiwitaggregaten is wel specifiek voor de aandoening. De laatste jaren is bekend geworden uit welke eiwitten deze aggregaten bestaan. Deze bevatten onder andere TDP-43, FUS, OPTN en UBQLN2. Van veel eiwitten die in aggregaten worden aangetroffen was al bekend dat mutaties in de genen die voor deze eiwitten coderen geassocieerd zijn met FALS. Andersom heeft de ontdekking van de aanwezigheid van bepaalde eiwitten in aggregaten tot de ontdekking van ALS geassocieerde mutaties in de corresponderende genen geleid. Dit heeft ervoor gezorgd dat er in de afgelopen jaren veel onderzoek is gedaan naar de functie van deze eiwitten. **Hoofdstuk 8** geeft een uitgebreid overzicht van de literatuur die hierover is verschenen in de afgelopen jaren. TDP-43 en FUS zijn met name betrokken bij het

afschrijven, bewerken en transporteren van RNA. UBQLN2 en OPTN, daarentegen, zijn voornamelijk betrokken bij de kwaliteitscontrole en recycling van eiwitten. ALS geassocieerde mutaties in deze eiwitten zorgen ervoor dat ze ofwel hun normale functie minder goed kunnen uitoefenen ofwel op de verkeerde plek in de cel terecht komen en daarmee de normale functie van andere eiwitten schaden (of een combinatie van deze twee mogelijkheden).

Mutaties in het RNA-bindend eiwit FUS leiden ertoe dat het eiwit in plaats van voornamelijk in de celkern, in het cytoplasma van de cel terecht komt en daar eiwitaggregaten vormt. Om meer over de functie van FUS te weten te komen, hebben we door middel van massaspectrometrie bepaald aan welke eiwitten FUS kan binden. Naast veel andere, al bekende RNA-bindende eiwitten die de bekende functie van FUS bevestigen, vonden we ook de eiwitten SMN en FMRP. Een homozygote deletie van het SMN gen veroorzaakt spinale musculaire atrofie (SMA), een aandoening waarbij, net als bij ALS, specifiek motorische neuronen afsterven. Een mutatie in het *FMR1* gen, waardoor het FMRP eiwit niet meer wordt gemaakt, veroorzaakt het fragiele X syndroom (FXS). Het effect dat gemuteerd FUS op de normale functies van SMN en FMRP wordt gedetailleerd beschreven in **hoofdstuk 9** (SMN) en **hoofdstuk 10** (FMRP). Zowel SMN als FMRP hebben een belangrijke functie in de uitlopers (axonen) van neuronen. SMN transporteert specifieke RNA moleculen die er onder andere voor zorgen dat de verbinding tussen motorneuronen en spiercellen (de neuromusculaire overgang) tot stand kan komen. FMRP heeft een soortgelijke functie bij de ontwikkeling van de neuromusculaire overgang en zorgt ervoor dat RNA op het juiste moment en op de juiste plaats in eiwit wordt omgezet. Omdat FUS-eiwitaggregaten in het cytoplasma van de cel SMN en FMRP binden, vermindert de hoeveelheid SMN en FMRP in het axon van de cel. Hierdoor kunnen, in het geval van FUS en SMN, axonen minder goed groeien en treden er defecten op aan het einde van het axon, waardoor ze slechter contact kunnen maken met andere cellen. In het geval van FUS en FMRP hebben we de integriteit van de neuromusculaire overgang in zebrafissen bestudeerd. Zebrafissembryo's ontwikkelen zich zeer snel en zijn tijdens die ontwikkeling transparant, wat ze zeer geschikt maar voor het bestuderen van kleine structuren zoals de neuromusculaire overgang. Het voorkomen van ALS-gemuteerd FUS in zebrafissen, leidt ertoe dat de neuromusculaire overgang minder goed wordt aangelegd, wat zich uit in een aantasting van de motoriek. Voor zowel SMN en FMRP geldt dat het toevoegen van exogeen eiwit aan motorneuronen het fenotype dat door FUS-eiwitaggregaten wordt veroorzaakt normaliseert. Dit suggereert dat methoden om de hoeveelheid SMN en FMRP eiwit te verhogen, die momenteel worden onderzocht in het onderzoek naar SMA en FXS, mogelijk ook interessante behandelopties voor ALS zouden kunnen worden.

Conclusies

Genexpressie microarrays kunnen een interessante methode zijn om onderscheid te maken tussen ALS en controle groepen in een muismodel en leveren bovendien interessante aanknopingspunten op bij het bestuderen van de effecten van medicatie. Verschillende genetische studies hebben ons inzicht in de genetische achtergrond van ALS verder uitgebreid en zullen, in combinatie met grootschalige studies, in de komende jaren het grootste deel van de genetische achtergrond van ALS kunnen verklaren. Functioneel biologische studies zijn daarbij onontbeerlijk om te begrijpen hoe gendefecten specifieke celdood van motorneuronen en daarbij ALS veroorzaken. Samengevat laten de resultaten in dit proefschrift zien hoe, door gebruik te maken van uiteenlopende onderzoekstechnieken, het vinden van de oorzaak en het ontwikkelen van nieuwe behandelstrategieën voor ALS steeds dichterbij komt.