

Nederlandse Samenvatting proefschrift Max Koppers 'Genetic architecture and pathogenic mechanisms of ALS'

De genetische opmaak en ziektemechanismen van ALS:

Herhalingen, diermodellen en interactomics

Inleiding

Amyotrofe laterale sclerose (ALS) is een dodelijke, neurodegeneratieve aandoening waarbij zenuwcellen in zowel de hersenen als het ruggenmerg die de spieren aansturen afsterven. Dit leidt tot toenemende spierzwakte en dunnere spieren waardoor patiënten verlamd raken. ALS is een zeer progressieve ziekte en gemiddeld overlijden patiënten 3 jaar na de diagnose, meestal omdat ook de ademhalingsspieren uitvallen. Er is geen goede behandeling voor deze ziekte. Het enige bestaande medicijn, Riluzole, vertraagt het ziekteproces gemiddeld met twee tot drie maanden.

In Nederland wordt ALS jaarlijks bij enkele honderden patiënten vastgesteld. Bij ongeveer 5-10% van de patiënten komt ALS in de familie voor (familiaire ALS; fALS) en is er een genetische oorzaak. Echter bij 90% van de patiënten is er sprake van sporadische ALS (sALS) waarbij een combinatie van genetische risicofactoren en omgevingsfactoren de ziekte veroorzaakt. In de afgelopen jaren is er veel vooruitgang geboekt in het onderzoek naar de genetische oorzaken van ALS. Ondanks deze progressie is het grotendeels onbekend hoe deze genetische defecten er vervolgens toe leiden dat motorische zenuwcellen afsterven en de ziekte ontstaat.

In dit proefschrift is onderzoek gedaan naar zowel de genetische opmaak als de ziektemechanismen van ALS. Om onze kennis over de genetische achtergrond van ALS uit te breiden hebben we in het eerste deel van dit proefschrift gekeken naar de frequentie van een aantal gendefecten die ALS veroorzaken in Nederland. Vervolgens hebben we een aantal studies uitgevoerd gericht op het ontdekken van nieuwe gendefecten in ALS. Ten slotte hebben we, door middel van functioneel biologische onderzoek in cellen en diermodellen, gekeken naar mogelijke ziektemechanismen die worden veroorzaakt door deze gendefecten. De bevindingen van deze studies worden hieronder besproken.

Genetische opmaak van ALS in Nederland

De genetische achtergrond van ALS kan ons belangrijke inzichten geven over hoe de ziekte ontstaat en een belangrijk beginpunt zijn voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën. Recentelijk zijn er door vooruitgang in genetische onderzoekstechnieken veel genen ontdekt in welke mutaties ALS kunnen veroorzaken. Naast mutaties in het gen *SOD1*, die al in 1993 werden ontdekt, zijn er gendefecten gevonden in onder andere *TARDBP*, *FUS*, *OPTN*, *UBQLN2*, *VCP*, *PFN1* en *C9ORF72*. De frequentie waarin deze gendefecten voorkomen varieert tussen verschillende populaties. Ondanks de vooruitgang is de genetische oorzaak van een derde van de fALS patiënten en het merendeel van de sALS patiënten nog steeds onbekend. De openstaande vragen en ontbrekende kennis over de genetische achtergrond van ALS zijn aanleiding geweest voor de volgende hoofdstukken in dit proefschrift.

In **hoofdstuk 2** hebben we in de Nederlandse fALS en sALS patiënten gekeken naar mutaties in het *VCP* gen. In één fALS patiënt vonden we een mutatie in dit gen wat overeenkomt met de frequentie van mutaties in het *VCP* gen in andere studies. Vervolgens hebben we in de Nederlandse patiëntengroep ook gekeken naar mutaties in het *VAPB* gen (**hoofdstuk 3**). We vonden een mutatie in het *VAPB* gen in één fALS patiënt waarvan al bekend was dat deze ook een ander gendefect die ALS veroorzaakt had, namelijk een gendefect in *C9ORF72*. Het voorkomen van meerdere gendefecten in dezelfde patiënt (oligogenetica genoemd), die hiermee het beloop van de ziekte of de symptomen zouden kunnen beïnvloeden, was al eerder aangetoond en onze studie bevestigde hiermee het bestaan hiervan.

In een eerdere studie is aangetoond dat er op chromosoom 19 een locus (19p13.3) bevindt die het risico op het verkrijgen van ALS verhoogt. De precieze oorzaak of het gendefect dat

voor deze associatie met ALS zorgt is echter nog onbekend. Om deze oorzaak proberen te vinden hebben we in **hoofdstuk 4** bij 1000 sALS patiënten en 1000 controlepersonen de DNA sequentie van het coderende deel van deze locus op chromosoom 19 bepaald. Er werd echter geen verrijking gevonden van mutaties in sALS patiënten ten opzichte van controlepersonen, wat erop wijst dat er op deze locus andere genetische variaties aanwezig zijn die een rol spelen bij ALS.

Herhalingen van bepaalde stukken DNA kunnen de oorzaak zijn van ziekten. Eerdere studies hebben aangetoond dat DNA herhalingen in een aantal genen een rol spelen bij ALS. In **hoofdstuk 5** hebben we gekeken of bepaalde DNA herhalingen in het *FMR1* gen, die eerder geassocieerd zijn met ziekte, een rol spelen bij ALS. In een groep van 800 Nederlandse sALS patiënten en 800 controlepersonen bleek dit niet het geval te zijn. In **hoofdstuk 6** beschrijven we de resultaten van een studie waaruit blijkt dat DNA herhaling in een ander gen, *NIPA1*, wel een rol spelen bij ALS. We vonden dat een bepaald aantal DNA herhalingen in het *NIPA1* gen de leeftijd en het beloop van ALS beïnvloedde.

Ziektemechanismen van ALS

De kennis over de ziektemechanismen als gevolg van mutaties in ALS gerelateerde genen is nog zeer beperkt. Dit komt deels doordat het *SOD1* gen lange tijd de enige bekende oorzaak van ALS was. De enorme vooruitgang in het ontdekken van gendefecten in ALS patiënten zorgt ervoor dat er de afgelopen jaren ook op het gebied van onderzoek naar ziektemechanismen vooruitgang is geboekt. In dit proefschrift worden resultaten van een aantal studies beschreven waarin functioneel biologisch onderzoek naar de ziektemechanismen van ALS is uitgevoerd.

Naast onderzoek naar gendefecten kan ook het pathologisch onderzoek op materiaal van overleden patiënten (*post mortem* onderzoek) belangrijke inzichten over ALS opleveren. Eén van de pathologische kenmerken van ALS patiënten zijn eiwitophopingen in het cytoplasma van motorische zenuwcellen. Een zeer belangrijke ontdekking door middel van *post mortem* onderzoek was dat het eiwit TDP-43 onderdeel van deze eiwitophopingen was. Deze TDP-43 positieve eiwitophopingen worden in het merendeel van de ALS patiënten gevonden.

Vervolgstudies hebben meerdere andere eiwitten gevonden die deel uit maken van deze eiwitophopingen, waaronder OPTN, UBQLN2 en VCP. Van veel van de eiwitten die in deze ophopingen voorkomen was al bekend dat mutaties in de genen die deze eiwitten coderen ALS kunnen veroorzaken. Deze bevindingen hebben ervoor gezorgd dat er veel onderzoek naar de functie van deze eiwitten gedaan is. In **hoofdstuk 7** wordt een uitgebreid overzicht gegeven over de huidige kennis dit onderzoek naar eiwitophopingen en de functie van de eiwitten waar ze uit bestaan. Het onderzoek naar de functie van deze eiwitten heeft ertoe geleid dat een aantal processen in de cel zoals het metabolisme van RNA en de kwaliteitscontrole en opruiming van eiwitten geïmpliceerd zijn in het ontstaan van ALS.

Om meer te weten te komen over de functie van ALS gerelateerde eiwitten hebben we in **hoofdstuk 10** voor zes ALS gerelateerde eiwitten bekeken aan welke andere eiwitten ze kunnen binden. Alle eiwitverbindingen van een bepaald eiwit wordt ook wel het 'interactoom' genoemd en kan belangrijke inzichten opleveren over de normale functie een eiwit. We vonden dat de eiwitten OPTN en UBQLN2 en de eiwitten TDP-43, FUS en ATXN2 aan veel overeenkomstige eiwitten bonden, wat erop duidt dat een aantal ALS gerelateerde eiwitten een rol spelen in dezelfde celprocessen. OPTN en UBQLN2 bonden aan eiwitten die een rol spelen in de opruiming en kwaliteitscontrole van eiwitten, waaronder een aantal andere ALS gerelateerde eiwitten (VCP, TBK1 en SQSTM1). TDP-43, FUS en ATXN2 bonden aan eiwitten die een rol spelen in het afschrijven, bewerken en het vervoeren van RNA.

Vervolgexperimenten toonden aan dat één van deze overeenkomstige eiwitten, FMRP, wellicht een rol speelt in het ontstaan van ALS. Om dit aan te tonen hebben we een zebrafismodel gebruikt, waarbij het voorkomen van ALS-gemuteerd FUS ervoor zorgt dat de overgang tussen een motorische zenuwcel en een spier (de neuromusculaire overgang) wordt aangedaan, wat leidt tot verminderde motoriek in deze zebrafissen. We vonden dat het geven van extra FMRP eiwit aan deze zebrafissen leidde tot verbeterde

neuromusculaire overgangen en motoriek, wat erop duidt dat FMRP een belangrijke rol speelt in het ontstaan van ALS.

In **hoofdstuk 8** hebben we gebruikt gemaakt van een muismodel voor ALS (het SOD1 muismodel) om te kijken wat de rol van het *UNC13A* gen in ALS is. Eerder studies hebben aangetoond dat *UNC13A* gen geassocieerd is met ALS maar de oorzaak van deze associatie is onbekend. Omdat van het eiwitproduct van het *UNC13A* gen bekend is dat het een functie heeft in vormen van neuromusculaire overgangen en het doorgeven van signalen tussen motorische zenuwcellen en spieren, hebben we onderzocht of het hebben van minder *UNC13A* invloed heeft op het ziekteproces in dit muismodel. Dit bleek echter niet het geval te zijn en dus is er meer onderzoek nodig om de rol van het *UNC13A* gen in ALS te achterhalen.

In 2010 werd ontdekt dat DNA herhalingen in het *C9ORF72* gen de tot nu toe meest voorkomende oorzaak van ALS is. Ditzelfde gendefect kan ook een vorm van dementie, frontotemporale dementie, veroorzaken. Hoe deze DNA herhalingen tot ziekte leiden is echter onbekend en sinds de ontdekking van het gendefect zijn er drie mogelijke ziektemechanismen voorgesteld. In **hoofdstuk 9** hebben we onderzocht of één van deze ziektemechanismen, het verlies van de normale functie van het *C9ORF72* eiwit, kan leiden tot ALS. We hebben hiervoor muizen gemaakt die in het zenuwstelsel geen *C9ORF72* eiwit meer heeft door het *C9ORF72* gen in deze muizen weg te halen. Om te kijken of deze muizen ALS ontwikkelden hebben we een aantal gedragstesten uitgevoerd om hun motorische functie te bepalen. Deze testen wezen echter uit dat er geen verschil in motorische functie was tussen normale muizen en muizen zonder *C9ORF72* eiwit in hun zenuwstelsel. Histologisch onderzoek op de hersenen, het ruggenmerg en spieren van deze muizen wees ook niet op het ontwikkelen van ALS in muizen zonder *C9ORF72* eiwit. De resultaten van deze studie sluiten dus uit dat het verlies van *C9ORF72* eiwit het ziektemechanisme is als gevolg van de DNA herhalingen in het *C9ORF72* gen.

Conclusies

Er is enorme vooruitgang geboekt in onze kennis over de genetische achtergrond van ALS. De genetische studies beschreven in dit proefschrift hebben een bijdrage geleverd aan onze kennis over de genetische achtergrond van ALS in Nederland en hebben geleid tot de ontdekking van nieuwe genetische variatie die ALS beïnvloedt. Een groot deel van de genetische achtergrond van ALS is echter nog onbekend. Verdere ontwikkeling in de technieken voor genetisch onderzoek, in combinatie met grootschalige genetische studies, zullen in de nabije toekomst onze kennis over de genetische achtergrond van ALS zonder twijfel verder vergroten.

Functioneel biologisch onderzoek zal moeten uitwijzen hoe gendefecten resulteren in het afsterven van motorische zenuwcellen. De resultaten in dit proefschrift geven belangrijke inzichten in de ziektemechanismen van ALS. Kennis over deze ziektemechanismen zal in de toekomst hopelijk leiden tot de ontwikkeling van nieuwe therapieën.