

NEDERLANDSE SAMENVATTING (SUMMARY IN DUTCH)

Proefschrift Frank Diekstra getiteld: 'Amyotrophic lateral sclerosis: genetic susceptibility factors and pleiotropy'

Amyotrofische laterale sclerose (ALS) is een dodelijke ziekte die zich uit in toenemende spierzwakte, dunnere spieren (atrofie), spasticiteit en uiteindelijk ademhalingspierschwakte. De verschijnselen worden veroorzaakt door het afsterven van zenuwcellen die spieren aansturen, die zich zowel in de hersenen als in het ruggenmerg bevinden. De symptomen beginnen vaak in één deel van het lichaam, denk bijvoorbeeld aan atrofie van de hand of onduidelijke spraak, en breiden zich vervolgens uit naar andere delen van het lichaam. Er is geen genezende behandeling voor ALS en patiënten overleden gemiddeld ongeveer drie jaar na het begin van de klachten. Er is één medicijn, riluzol, waarvan is aangetoond dat het het ziekteproces kan vertragen met ongeveer 3-6 maanden. Ongeveer 5-10% van de patiënten heeft familiale ALS (waarbij ALS in de familie voorkomt), terwijl de overige patiënten als sporadische ALS worden beschouwd. Bij familiale ALS is er meestal een bepaald gen defect bekend dat de ziekte veroorzaakt, terwijl bij sporadische ALS patiënten waarschijnlijk een samenspel van meerdere omgevingsfactoren en genetische factoren tot de ziekte leidt. De ziekteverschijnselen van deze twee vormen zijn daarentegen meestal volledig hetzelfde. Er is veel onderzoek gedaan naar omgevingsfactoren en ALS, maar alleen voor roken lijkt er voldoende wetenschappelijk bewijs te zijn.

Sinds de ontdekking van het eerste ALS gen (*SOD1*) in 1993 bij familiale ALS patiënten zijn er steeds meer genen ontdekt die familiale ALS kunnen veroorzaken. De belangrijkste genen die familiale ALS veroorzaken in Nederland zijn *C9orf72*, *TARDBP* en *FUS*. In tegenstelling tot familiale ALS zijn er bij sporadische ALS patiënten veel minder genetische oorzaken bekend. Een klein deel heeft genafwijkingen in de bekende familiale ALS genen (ongeveer 6-15%). Naar de overige oorzaken wordt veel genetisch onderzoek gedaan. Aanvankelijk gebeurde dat vooral door te kijken naar kandidaatgenen (genen waarvan men bijvoorbeeld op basis van de functie een rol in ALS zou kunnen verwachten). Met de komst van nieuwe genetische onderzoekstechnieken werd het mogelijk om met behulp van 'chips' honderdduizenden genetische varianten in het DNA in één experiment te onderzoeken. Dit bood de mogelijkheid om met genomwijde associatie studies (GWAS) te testen of veel voorkomende varianten in het DNA (zogenaamde single nucleotide polymorphisms of SNP's) een verhoogd risico op ALS zouden geven. In een GWAS wordt dit onderzocht door de DNA varianten in een grote groep patiënten te vergelijken met grote aantallen gezonde controlepersonen. Op deze manier hoeft men niet meer alleen naar één kandidaatgen te kijken, maar kan men in een keer variaties verspreid over alle genen onderzoeken (hypotheseloos). Er zijn meerdere internationale genomwijde associatiestudies gedaan met ALS patiënten, waarbij onder andere associaties met het gen *UNC13A* op chromosoom 19 en met een gebied op chromosoom 9 werden gevonden.

In 2010 werd de zeer belangrijke ontdekking gedaan dat een genafwijking in *C9orf72* in het gebied op chromosoom 9 de oorzaak vormt voor ongeveer 37% van familiale ALS patiënten en 6% van sporadische patiënten. Bovendien blijkt deze genafwijking een belangrijke oorzaak te zijn voor het ontstaan van frontotemporale dementie (FTD). Frontotemporale

dementie is een vorm van dementie die, in tegenstelling tot de ziekte van Alzheimer, niet zozeer gepaard gaat met geheugenverlies, maar vooral tot veranderingen in het karakter (ontremming of initiatiefverlies) of taalfuncties leidt. In ongeveer 5-15% van de gevallen komen ALS en FTD samen voor.

Dit proefschrift beschrijft verschillende onderzoeken die gericht zijn op het ontdekken van nieuwe genetische risicofactoren voor ALS. Er worden verschillende onderzoeksmethoden toegepast om dit doel te bereiken.

In Hoofdstuk 2 wordt gekeken of genetische variatie in het paraoxonase gen het risico op ALS beïnvloed in gebieden met een hoge of juist lage bevolkingsdichtheid. Omdat een van de mogelijke omgevingsrisicofactoren voor ALS blootstelling aan pesticiden zou kunnen zijn, is onderzocht of genen die het verwerken van pesticiden in het lichaam beïnvloeden een rol zouden kunnen spelen bij het ontstaan van ALS. Paraoxonase is een stof in het lichaam dat pesticiden afbreekt en in eerdere studies werden inderdaad associaties gevonden tussen paraoxonasegenen (*PON*) en ALS. In Hoofdstuk 1 hebben we variaties in paraoxonasegenen in 98 ALS uit Zuidoost Engeland onderzocht en tegelijkertijd op basis van postcode en geografische gegevens bepaald of patiënten in een gebied met lage of hoge bevolkingsdichtheid woonden. Uit het onderzoek bleek dat ALS patiënten met een bepaalde variant van het *PON1* gen een verhoogd risico hadden op ALS in het gebied met een lage bevolkingsdichtheid, terwijl dit niet het geval bleek te zijn in gebieden met een hoge bevolkingsdichtheid. Het onderzoek toonde een gen-omgeving interactie aan tussen variatie in *PON1* en bevolkingsdichtheid.

Hoofdstuk 3 beschrijft een grote familie met familiale ALS waarin een mutatie in angiogenine (*ANG*) overerft met de ziekte. Deze zogenaamde K17I mutatie kwam voor bij alle aangedane familieleden, maar ook in enkele niet-aangedane familieleden, waarvan de meeste jonger waren dan 50 jaar en dus theoretisch nog ALS zouden kunnen ontwikkelen. Eén van de patiënten met de *ANG* K17I mutatie had een afwijkend klachtenpatroon, beginnend met parkinsonisme, maar later ALS verschijnselen gecombineerd met gedragsveranderingen passend bij FTD.

In hoofdstuk 4 hebben we genomwijde DNA variaties (SNP's) gecombineerd met data van genexpressie. Genexpressie is een maat voor de activiteit van genen. In dit onderzoek hebben we gekeken naar DNA varianten die niet alleen mogelijk het risico op ALS vergrootten, maar ook een veranderde genactiviteit (of genexpressie) teweeg brachten in het bloed van ALS patiënten. Dergelijke varianten zijn waarschijnlijk belangrijker voor het ontstaan van een ziekte omdat ze ook functionele veranderingen in een lichaamsweefsel zoals bloed veroorzaken. Voor dit onderzoek hebben we genomwijde SNP data van in totaal 3.568 sporadische ALS patiënten en 10.163 controles gebruikt en genexpressie data in bloed van 323 ALS patiënten en 413 controles verkregen. Door middel van een interne replicatiestap vonden we dat SNP's in het gen *CYP27A1* niet alleen geassocieerd zijn met ALS, maar ook zorgen voor een veranderde expressie van *CYP27A1*. *CYP27A1* is een gen dat betrokken is bij de cholesterolstofwisseling en mutaties in het gen kunnen een zeldzame neurologische ziekte cerebrotendineuze xanthomatose (CTX) veroorzaken. CTX kan zich presenteren met neurologische verschijnselen die lijken op symptomen van ALS. Er zijn ook aanwijzingen in de literatuur dat vetstofwisseling een rol speelt bij ALS. Deze bevindingen

maken *CYP27A1* een interessante kandidaat voor een risicoverhogend gen bij ALS. Idealiter wordt onze bevinding bevestigd in een ander onafhankelijk onderzoek, maar dit is tot nu toe nog niet gebeurd.

In Hoofdstuk 5 en 6 wordt gekeken naar genetische overlap tussen ALS en twee andere neurologische ziektebeelden: multipele sclerose (MS) en frontotemporale dementie (FTD). Eventuele genetische overlap kan meer inzicht bieden in ziektemechanismen die in beide ziektebeelden een rol kan spelen. We hebben hiervoor ten eerste genomwijde associatiestudies van ALS (3.762 patiënten en 4.886 controles) gecombineerd met die van 4.088 MS patiënten en 7.144 gezonde controles (Hoofdstuk 5). Na meta-analyse van de gegevens vonden we geen aanwijzingen voor gedeelde genetische risicofactoren tussen ALS en MS. De genetische risicofactoren voor MS werden niet gedragen door ALS en vice versa. In hoofdstuk 6 hebben we genomwijde SNP data van in totaal 4.377 ALS patiënten en 13.017 controles gecombineerd met een GWAS van 435 FTD-patiënten (allen met na obductie bewezen FTD kenmerken in de hersenen) en 1.414 controles. In een meta-analyse zagen we dat door toevoeging van de FTD patiënten aan de ALS data, niet alleen het eerdere associatiesignaal op chromosoom 9 sterk toenam, maar ook het signaal van *UNC13A* op chromosoom 19 nam sterk toe. Vanwege het grote verschil in aantallen ALS patiënten en FTD patiënten in de studie, hebben we nog twee methoden toegepast, waarmee we hebben laten zien dat de toegenomen associatiesignalen niet alleen door ALS, maar ook door FTD gedreven werden. Het onderzoek beschrijft voor het eerst een verband tussen genetische variatie in *UNC13A* en frontotemporale dementie. *UNC13A* is betrokken bij de regulatie van afgifte van signaalstoffen (neurotransmitters) tussen zenuwcellen en een verstoorde werking van *UNC13A* kan, door verandering van zenuwnetwerken in de hersenen, leiden tot schade aan zenuwcellen. Een van deze veranderingen kan zijn dat de neurotransmitter glutamaat verhoogd wordt afgegeven en door 'overprikkeling' schade kan aanrichten aan zenuwcellen in de hersenschors (excitotoxiciteit). Deze overprikkeling door glutamaat is een mechanisme waarvoor reeds aanwijzingen bestaan in eerdere literatuur. Verder is hier vermeldenswaardig dat riluzol, het enige medicijn met bewezen effect bij ALS, een glutamaatremmer is. Het is echter niet bekend hoe riluzol het beloop van ALS vertraagt.

In hoofdstuk 7 wordt de rol van *UNC13A* in ALS verder onderzocht door te kijken naar een mogelijke relatie met debuutleeftijd van ALS symptomen of een effect op overleving. Hiervoor hebben we 450 ALS patiënten en 524 controlepersonen geselecteerd uit een prospectief cohortonderzoek naar ALS en een genetische variant in *UNC13A* onderzocht. Een SNP in *UNC13A* bleek geassocieerd met ALS in dit nieuwe cohort. Bovendien hebben we aangetoond dat genetische variatie in *UNC13A* geassocieerd is met de overlevingsduur van ALS patiënten. Deze laatste bevinding bleek ook te gelden voor in totaal 1.767 ALS patiënten en 1.817 controles uit Nederland, België en Zweden die aan een eerder gepubliceerd GWAS hadden meegedaan. We vonden geen relatie tussen *UNC13A* en de debuutleeftijd van ALS symptomen. De bevinding dat *UNC13A* is geassocieerd met overleving bij ALS patiënten is bevestigd in een Italiaans onderzoek en kan ook een goed aangrijpingspunt vormen voor een eventuele behandeling. Hiervoor zal er echter eerst meer inzicht moeten worden verkregen in de rol die *UNC13A* speelt in het ziektemechanisme van ALS.

Een genetische afwijking in het gen *C9orf72* kan zowel ALS als FTD veroorzaken en is een veelvoorkomende oorzaak bij beide ziektebeelden. De functie van *C9orf72* in het

zenuwstelsel is vooralsnog onbekend. In Hoofdstuk 8 is onderzocht of er bij dragers van de genafwijking in *C9orf72* andere genetische varianten zijn die bepalen of iemand vooral ALS symptomen of juist verschijnselen van FTD krijgt. We hebben hiervoor zoveel mogelijk ALS en FTD patiënten met een genafwijking in *C9orf72* verzameld van wie ook GWAS data beschikbaar was. Door een wereldwijde samenwerking hebben we 402 ALS patiënten en 253 FTD patiënten met een *C9orf72* genafwijking en genomwijde SNP data kunnen verzamelen. We hebben hierbij geen nieuwe varianten gevonden die bepalen of een persoon ALS of juist FTD verschijnselen ontwikkelt. Eerdere onderzoeken bij dragers van de *C9orf72* genafwijking hebben door kandidaatgenen te bekijken gevonden dat het gen *TMEM106B* en een variant in ataxine-2 (*ATXN2*) het ontstaan van ALS of FTD kan beïnvloeden. Hiervoor vonden wij ook aanwijzingen in onze data, alhoewel deze effecten minder sterk lijken. In de toekomst kan, door verdere internationale samenwerking, een grotere groep ALS en FTD patiënten met een *C9orf72* genafwijking worden verzameld en wordt de kans vergroot dat er genetische varianten gevonden kunnen worden die het optreden van ALS of FTD kunnen beïnvloeden.

In Hoofdstuk 9 worden de bevindingen van de onderzoeken in dit proefschrift samengevat en in een bredere context geplaatst.