

**Nederlandse samenvatting – proefschrift drs. Anna Blokhuis  
UMC Utrecht Hersencentrum**

**The role of protein complexes in a complex disease: molecular mechanisms of ALS**

**Nederlandse titel: De rol van eiwitcomplexen bij een complexe ziekte: moleculaire mechanismen van ALS**

Amyotrofe Laterale Sclerose (ALS) is een ernstige neurodegeneratieve ziekte waarbij patiënten steeds verder verlamd raken en uiteindelijk overlijden doordat de ademhalingsspieren verzwakken. Het enige medicijn tegen de ziekte met bewezen effect, riluzole, geeft een levensverlenging van gemiddeld 3 maanden. De diagnose ALS wordt elk jaar bij ongeveer 320-480 mensen in Nederland gesteld. Over het hele leven gezien krijgt ongeveer 1 op de 500 mensen de ziekte.

#### *Genetische factoren*

In ongeveer 5% van de gevallen komt ALS in de familie voor. Meestal erft de ziekte dominant over; dat betekent dat ongeveer helft van de familieleden is aangedaan. In sommige gevallen van familiale ALS komt er ook een bepaalde vorm van dementie in de familie voor: frontotemporale dementie. Door middel van genetische analyses van families met ALS is er ontdekt dat bepaalde veranderingen in genen (mutaties) de ziekte veroorzaken. Een aantal bekende genen waar ALS-veroorzakende mutaties in voorkomen zijn *C9ORF72*, *PFN1*, *TARDBP*, *FUS*, *VCP*, *VAPB*, *TBK1*, *OPTN*, *UBQLN2* en *SOD1*. Met de huidige kennis van de genetische oorzaken van ALS kunnen we ongeveer 70% van de familiale gevallen van ALS verklaren. Omdat een gen codeert voor een eiwit kan een verandering in een gen leiden tot een defect eiwit. In het geval van ALS zorgen deze defecte (mutante) eiwitten er blijkbaar voor dat zenuwcellen afsterven.

Als ALS niet in de familie voorkomt noemen we dat sporadische ALS. We denken dat bij sporadische ALS zowel erfelijke factoren als omgevingsfactoren (bijv. eten, leefstijl, blootstelling aan giftige stoffen) een belangrijke rol spelen. Welke omgevingsfactoren een rol spelen bij ALS is nog niet goed bekend.

In **hoofdstuk 2** hebben we onderzocht of genetische veranderingen in het gen *PON* geassocieerd zijn met ALS. Het *PON* gen codeert voor het PON eiwit, een enzym dat giftige stoffen afbreekt en daarom mogelijk een beschermende werking heeft op zenuwcellen. Uit de analyse bleek dat genetische verandering in het *PON* gen niet geassocieerd zijn met ALS. De afgelopen jaren zijn er veel nieuwe genetische technieken ontwikkeld die het mogelijk maken om het complete DNA van grote groepen ALS patiënten en controles letter voor letter te ontcijferen. Het leidt geen twijfel dat dit zal leiden tot het ontdekken van nieuwe genen die een rol spelen bij het ontstaan van ALS.

#### *Neuropathologie*

ALS wordt veroorzaakt door het afsterven van de zenuwcellen in de hersenen en het ruggenmerg die de spieren aansturen (de motorneuronen). Als het

ruggenmerg van ALS patiënten na hun overlijden onder de microscoop wordt bestudeerd wordt, naast verlies van deze motorneuronen, een aantal andere opvallende en specifieke kenmerken gezien. Eén van die neuropathologische kenmerken van ALS is dat samenklonterende eiwitten zich ophopen in de afstervende motorneuronen. Een aantal van de eiwitten die zich in deze ophopingen bevinden zijn bekend. Er is een opvallende overlap tussen deze eiwitten en de defecte eiwitten die ALS veroorzaken in families. Bijvoorbeeld: het defecte eiwit TDP-43 is de veroorzaker van ALS in 1% van de ALS gevallen, maar het 'gewone' eiwit TDP-43 wordt gevonden in eiwitophopingen in de aangedane motorneuronen in bijna alle ALS patiënten. Dat geeft aan dat het eiwit TDP-43 waarschijnlijk een bredere rol speelt in de ziekte en niet alleen relevant is voor een specifieke vorm van familiale ALS. In **hoofdstuk 3** wordt een uitgebreid overzicht gegeven van wat we tot nu toe weten over de rol van defecte eiwitten en eiwitophopingen bij ALS. In **hoofdstuk 4** hebben we ruggenmergmateriaal van ALS patiënten en controlepersonen vergeleken om te kijken welke eiwitten er veranderd zijn bij de ziekte. We vonden dat 2 eiwitten, ATP5D en Calmoduline, verlaagd zijn bij ALS in vergelijking met controlepersonen. ATP5D speelt een belangrijke rol in de energievoorziening van de cel en Calmoduline in de calciumhuishouding van de cel. Onze gegevens suggereren daarom dat deze processen verstoord raken bij ALS.

#### *Functionele studies*

Om een nieuw medicijn tegen ALS te kunnen ontwikkelen is het essentieel om te begrijpen wat er precies misgaat in de motorische zenuwcellen van ALS patiënten; hoe zenuwcellen verstoord raken door ALS-veroorzakende mutante eiwitten en waarom deze eiwitten samenklonteren en zich ophopen in zenuwcellen. Het is mogelijk om inzicht te krijgen in de functie van een eiwit door te kijken met welke andere eiwitten het eiwit een verbinding (een interactie) aangaat. Daarbij vergelijken we het normale eiwit met het eiwit zoals het veranderd is bij ALS zodat we kunnen zien of bepaalde interacties verloren gaan of juist ontstaan door het mutante eiwit. Als een eiwit bijvoorbeeld verbindingen aangaat met RNA-eiwitten, dan geeft dat aan dat het eiwit belangrijk is voor de verwerking van RNA binnen een cel. Als het mutante eiwit die verbindingen niet meer aan kan gaan, dan is het waarschijnlijk dat verstoorde RNA-verwerking een rol speelt in het ontstaan van de ziekte.

In **hoofdstuk 5** hebben we gekeken naar de eiwitten die binden aan het ALS-eiwit FUS. Eén van de eiwitten die aan FUS bleek te binden was SMN. Het is bekend dat verlaagde hoeveelheden SMN eiwit de oorzaak zijn van spinale musculaire atrofie (SMA), een ziekte die, net als ALS, veroorzaakt wordt door het selectief afsterven van motorneuronen. Het SMN eiwit heeft een belangrijke rol in de uitlopers (axonen) van neuron en transporteert RNA moleculen naar de zenuw-spirovergang. In hoofdstuk 5 laten we zien dat SMN aanwezig is in FUS-eiwitophopingen, dat er daarom minder SMN beschikbaar is in de axonen en dat axonen waardoor minder goed groeien.

Het is onbekend of de eiwitten die geassocieerd zijn met ALS een rol spelen in verschillende celprocessen of in één celproces. Als het laatste het geval is zou dat

betekenen dat ondanks de vele verschillende eiwitten die een rol spelen in ALS, er een beperkt aantal onderliggend mechanismen voor de ziekte is.

In **hoofdstuk 6** hebben we zes eiwitten uitgekozen die een belangrijke rol spelen bij ALS namelijk TDP-43, FUS, ATXN2, UBQLN2, OPTN en C9ORF72 en geanalyseerd welke eiwitten binden aan deze 6 ALS-eiwitten. Een belangrijke bevinding van dit proefschrift is dat er een grote overlap is tussen de eiwitten die binden aan FUS, TDP-43 en ATXN2 en tussen de eiwitten die binden aan OPTN en UBQLN2; die eiwitten werken blijkbaar samen in de cel en zijn betrokken bij eenzelfde celproces. Een aantal van de eiwitten die bleken te binden aan FUS, TDP-43, ATXN2, OPTN of UBQLN2 zijn zelf ook geassocieerd met ALS. Dat versterkt de conclusie dat meerdere ALS eiwitten de ziekte veroorzaken door eenzelfde mechanisme. Dat betekent ook dat het ontwikkelen van een medicijn dat aangrijpt op deze celprocessen effectief zou zijn voor een grote groep patiënten.

Er werd in deze studie geen verschil gevonden tussen de eiwitten die binden aan het gewone eiwit en het ALS-veroorzakende mutante eiwit, behalve voor OPTN. In het geval van OPTN zagen we dat een heel aantal eiwitten wel aan de gewone vorm van OPTN kunnen binden, maar niet aan mutant OPTN. Het onvermogen om deze interactoren te binden speelt hoogstwaarschijnlijk een oorzakelijk rol in het ontstaan van ALS bij patiënten met een *OPTN* mutatie.

De eiwitten die binden aan TDP-43, FUS en ATXN2 blijken allemaal een rol te spelen bij het verwerken van RNA. We hebben een aantal eiwitten die binden aan deze drie eiwitten geselecteerd en bestudeerd in **hoofdstuk 7**. We vonden dat deze eiwitten ook aanwezig zijn in FUS-eiwitophopingen. Een van die eiwitten is FMRP. Mutaties in het gen dat codeert voor FMRP, *FMR1*, veroorzaken een vorm van mentale retardatie, het fragiele X syndroom. We weten dat FMRP een belangrijke rol speelt in het vertalen van RNA in eiwit op specifieke plekken in de cel, waaronder ook de zenuw-spierovergang. In een zebrafish model zagen we dat mutant FUS leidde tot een verstoring van de zenuw-spierovergang, een verstoord motoriek en een verhoogde eiwitaanmaak van een bekend FMRP-target MAP1B. Toevoegen van het FMRP eiwit herstelde deze defecten. Een therapie die erop gericht is om de hoeveelheden FMRP eiwit te verhogen zou daarom ook een gunstig effect kunnen hebben in ALS patiënten.

In **hoofdstuk 8** hebben we een muismodel gebruikt om te bestuderen hoe de meest voorkomende genetische oorzaak van ALS, een repeat-expansie in het gen *C9ORF72*, ALS veroorzaakt. Een repeat-expansie is een klein stukje in het DNA dat zich herhaalt. De repeat in *C9ORF72* herhaalt zich in controle personen tientallen keren, maar in het geval van ALS en frontotemporale dementie honderden tot duizenden keren. Er zijn drie mogelijke verklaringen voor het ziekte-mechanisme van de *C9ORF72* repeat-expansie: de repeat zou andere RNA-bindende eiwitten kunnen onttrekken uit de cel en daardoor hun normale functie verstoren, de repeat wordt omgezet in eiwitten die toxisch zouden kunnen zijn of de repeat zou ervoor kunnen zorgen dat er minder *C9ORF72* eiwit wordt aangemaakt en dat zou de normale functie van zenuwcellen kunnen verstoren. Naar die laatste mogelijkheid hebben we onderzoek gedaan door een

muismodel te maken waarbij het gen *C9ORF72* was uitgeschakeld in zenuwcellen. We zagen dat muizen die geen *C9ORF72* eiwit aanmaakten in zenuwcellen net zou oud worden, net zo veel motorneuronen hadden en net goed konden bewegen als controle muizen. Verlies van de functie van het *C9ORF72* eiwit is daarom hoogstwaarschijnlijk niet de belangrijkste oorzaak voor de toxische effecten van de *C9ORF72* repeat-expansie.