



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Bewegingsstoornissen op de kinderleeftijd kunnen allerlei oorzaken hebben, waarbij een deel een genetische achtergrond heeft. In dit proefschrift wordt ingegaan op twee specifieke oorzaken van bewegingsstoornissen op de kinderleeftijd, die beide worden veroorzaakt door mutaties in een bekend gen.

Het gaat hierbij om pantothenaatkinase-geassocieerde neurodegeneratie (*pantothenate kinase-associated neurodegeneration*, PKAN), veroorzaakt door mutaties in het PANK2-gen; en de Noordzeeziekte (*North Sea progressive myoclonus epilepsy*, NS-PME), veroorzaakt door mutaties in het GOSR2-gen. Ondanks dat het genetisch defect bij beide ziekten bekend is, is bij beide aandoeningen niet duidelijk hoe de afwijking in het erfelijk materiaal uiteindelijk tot de ziekte leidt. Omdat dat tussenliggende proces onduidelijk is, is het ontwikkelen van gerichte therapieën niet mogelijk en is de behandeling van deze aandoeningen op dit moment symptoomgericht.

PKAN gaat klinisch gepaard met progressieve dystonie, waarbij er op MRI degeneratie zichtbaar is van de globus pallidus. In ditzelfde gebied is sprake van ijzerstapeling, waarvan het belang tot op heden onduidelijk is. Uiteindelijk overlijden patiënten aan complicaties van de verergerende bewegingsstoornissen. Het betrokken gen PANK2 codeert voor een pantothenaatkinase, met als taak het fosforyleren van vitamine B5 (ook wel pantothenaat) als eerste stap in de biosynthese van coenzym A (CoA). CoA is een cofactor met een belangrijke rol in veel metabole processen, waaronder vetzuuroxidatie en de citroenzuurcyclus. Hoewel een CoA-gebrek nooit is aangetoond bij PKAN-patiënten, leidt gebrek van het enzym dat nodig is in de laatste stap van de biosynthese van CoA tot een vergelijkbaar ziektebeeld; op basis hiervan lijkt er toch een cruciale rol van CoA aangetast te zijn bij deze ziekten. Welk CoA-afhankelijk proces verantwoordelijk is voor de symptomatologie bij patiënten is echter niet bekend.

NS-PME debuteert in de eerste levensjaren met ataxie, waarna zich in de periode van jaren myoclonieën (spierschokken) en later epilepsie ontwikkelen. Hoewel de myoclonieën en epilepsie in enige mate reageren op medicatie zoals antiepileptica, nemen de verschijnselen mettertijd toe. In tegenstelling tot PKAN zijn er bij deze patiënten geen duidelijke afwijkingen zichtbaar bij beeldvormend onderzoek van de hersenen. Het betrokken gen GOSR2 codeert voor een eiwit dat betrokken is bij vesiculair transport in het Golgi apparaat. Net als bij PKAN is niet bekend wat de cellulaire processen zijn die het moleculair-genetische defect verbinden met de uiteindelijke klinische gevolgen.

In dit proefschrift worden deze twee aandoeningen separaat van elkaar onderzocht met behulp van de fruitvlieg (*Drosophila melanogaster*) als modelorganisme. Hierbij is de centrale vraag wat de onderliggende processen zijn die uiteindelijk voor pathologie zorgen, met als doel deze processen te kunnen gebruiken als doelwit voor gerichte medicamenteuze behandeling.

In **Hoofdstuk 2** wordt in meer detail ingegaan op de fruitvlieg als model voor neurodegeneratieve aandoeningen. Enkele veelgebruikte technieken in *Drosophila* passeren de revue, waaronder RNAi en het GAL4-UAS-systeem; technieken die in het vervolg van de thesis veelvuldig worden gebruikt

om genetische veranderingen te bewerkstelligen met een hoge mate van controle over de tijd en de plaats daarvan. Daarnaast illustreert dit hoofdstuk de toepasbaarheid van de fruitvlieg als platform om neurodegeneratieve aandoeningen beter te begrijpen, in het bijzonder die aandoeningen die een genetische grondslag hebben.

In **Hoofdstuk 3** wordt een chemische aanpak getoetst in een poging om een behandeling voor PKAN te kunnen formuleren. Hierbij vormt pantethine het uitgangspunt: een stof die in fruitvliegen in staat is om de verschijnselen van verlies van pantothenaatkinase-ortholoog *fumble (fb)* te bestrijden. Pantethine is echter instabiel in biologische matrices en wordt snel afgebroken in serum door pantetheinases, waardoor het waarschijnlijk geen effect zal hebben bij patiënten. Om de farmacodynamische parameters van pantethine gunstiger te maken, reduceerden we de disulfidebinding in pantethine en derivatiseerden we de nu vrijgekomen thiolgroep met 4-thiobutyltriphenylphosphonium (TBTP). Deze zijgroep is sterk lipofiel en draagt een positieve lading, waardoor het biologische membranen beter kan doordringen en bovendien neigt tot stapeling in negatief geladen compartimenten zoals de mitochondria (waar PANK2 zich normaliter bevindt). Daarnaast is TBTP een dermate grote “bulky” zijgroep dat er in theorie sterische hinder zou kunnen ontstaan bij enzymatische afbraak door pantetheinases. In een *in vitro* model van de bloed-hersenbarrière bleek inderdaad veel meer retentie van TBTP-pantetheine in het kunstmatige membraan dan van pantethine, maar de stabiliteit in serum was echter lager dan van de moederstof pantethine.

In **Hoofdstuk 4** wordt een meer biochemische aanpak uiteengezet om PKAN te behandelen: omdat het moleculaire defect zich in de eerste stap van de biosynthese van CoA bevindt, wordt beproefd of het aanbieden van 4'-phosphopantetheine, een van de tussenproducten downstream van PANK, de verschijnselen veroorzaakt door gebrek van *fb* tegengaat. Dit wordt getest in celmodellen, maar ook in fruitvliegen; niet alleen is de stof werkzaam, deze verbinding is ook stabiel in serum en wordt niet afgebroken door pantetheinases. 4'-phosphopantetheine lijkt door passief transport door cellen te worden opgenomen, en met behulp van radioactief gelabeld 4'-phosphopantetheine werd aangetoond dat het daadwerkelijk deze moleculen zijn die worden omgezet in CoA. Daarmee blijkt 4'-phosphopantetheine een alternatief startpunt te zijn voor de biosynthese van CoA waarvoor geen hulp van PANK nodig is, wat het een mogelijke therapie voor PKAN maakt.

In **Hoofdstuk 5** wordt dieper ingegaan op het mechanisme dat een verstoorde biosynthese van CoA verbindt met neurodegeneratie. Hiervoor integreerden we bekende biochemische kennis en klinische beschrijvingen van genetische aandoeningen om een hypothese te ontwikkelen waarin een biochemische as centraal staat: deze as begint bij CoA, wat nodig is voor de posttranslationele modificatie van mitochondrieel ACP (mtACP). In tegenstelling tot veel andere reacties waarbij CoA betrokken is en gerecycled wordt, wordt het coenzym bij deze reactie verbruikt. Deze posttranslationele modificatie wordt 4'-phosphopantetheinylering genoemd en is nodig voor het activeren van mtACP. Geactiveerd mtACP is nodig voor de productie van liponzuur (*lipoic acid*), wat weer nodig is voor de activering van een handvol enzymen waaronder de E2-subunit van pyruvaat dehydrogenase (PDH). Langs deze route, van CoA, via mtACP en liponzuurproductie naar PDH-E2, zijn enzymen nodig waarvan ook deficiënties beschreven zijn. De klinische verschijnselen van deze deficiënties lijken erg op elkaar, wat pleit voor een



gemeenschappelijke oorzaak.

Om dit te onderzoeken werd eerst bepaald of de hoeveelheid actief mtACP inderdaad verminderd is als de productie van CoA wordt onderdrukt: dit werd inderdaad gevonden in zowel *Drosophila* celmodellen als ook in humane celmodellen. Ook bleek de lipoylering van PDH-E2 verminderd zonder dat de hoeveelheid PDH-E2 was aangetast, en was er een verlaagde activiteit van het pyruvaat dehydrogenasecomplex. Als de expressie *fb1* middels RNAi in vliegen wordt onderdrukt, leidt dit tot een verminderde levensvatbaarheid van die vliegen; dit effect wordt tenietgedaan door het toedienen van dichlooracetaat (DCA) aan de ontwikkelende vliegen, waarbij DCA werkt als activator van PDH. Om deze route verder te onderzoeken werd in de vleugel van de fruitvlieg onderdelen van de voorgestelde biochemische route uitgeschakeld; de gevolgen van het onderdrukken van deze enzymen zijn erg vergelijkbaar, waarbij er vleugels ontstaan met blaren. Ook dit fenotype is te onderdrukken door pyruvaat dehydrogenase te stimuleren, zowel met DCA als met genetische middelen. Dit laat zien dat een deel van de nadelige gevolgen van CoA-gebrek *via* PDH verloopt, en biedt aanknopingspunten voor eventuele nieuwe therapieën. Daarnaast kan aantasting van mtACP ook een verklaring bieden voor de ijzerstapeling in PKAN, aangezien mtACP een rol heeft in ijzerhuishouding.

In **Hoofdstuk 6** verschuift de aandacht naar NS-PME. Om meer grip te krijgen op de verschijnselen die patiënten ervaren, werd een groep van 14 patiënten gevraagd naar factoren die hun klachten negatief beïnvloeden. Hierbij bleek hitte een belangrijke factor te zijn voor veel van hen. Met deze kennis ontwikkelden we een fruitvliegenmodel waarin de *Drosophila* ortholoog van *GOSR2*, *membrin*, verminderd tot expressie wordt gebracht middels RNAi. In reactie op hitte vertoont een deel van deze vliegen een epileptiforme reactie, waarbij ze op hun rug liggen, schokken en pas na lange tijd weer bijkomen en normaal gedrag vertonen. Om beter te begrijpen waar deze verschijnselen vandaan komen, werd *membrin* onderdrukt in afzonderlijk neuronen en afzonderlijk gliacellen. Hieruit bleek dat knockdown in neuronen geen epileptiform gedrag veroorzaakte in respons op hitte, maar knockdown in gliacellen wel: dit gedrag nam toe naarmate de vliegen ouder werden, net als bij patiënten met NS-PME. Daarnaast wordt het gedrag onderdrukt als vliegen voor de hiteschok zijn behandeld met barbital, een antiepilepticum. De bevinding dat *membrin* klaarblijkelijk in gliacellen nodig is om epilepsie op afstand te houden is belangrijk, omdat het een nieuw licht werpt op de functie van *GOSR2* en suggereert dat het effect op neuronen indirect verloopt.

In **Hoofdstuk 7** worden de voorgaande hoofdstukken besproken in samenhang met elkaar en de bredere vakliteratuur. Door gebruik te maken van een model als *Drosophila*, dat eenvoudig genoeg is om uitgebreid te kunnen manipuleren en onderzoeken, maar complex genoeg is om zinvolle inzichten te bieden in de werking van de menselijke hersenen, kan de neurologie vooruitgang boeken in termen van moleculair-klinische kennis en invalshoeken voor therapie.