



LEKENSAMENVATTING VAN DIT PROEFSCHRIFT

Bewegingsstoornissen vormen een onderdeel van de neurologie waarin afwijkingen aan het normale bewegingspatroon, niet verklaard door zwakte of pijn, worden bestudeerd en behandeld. Er wordt onderscheid gemaakt tussen verschillende vormen van bewegingsstoornissen, in grote lijnen tussen een te weinig aan beweging (de zogenaamde *hypokinetische* bewegingsstoornissen) en een teveel aan beweging (*hyperkinetische* bewegingsstoornissen). Binnen de groep van hyperkinetische bewegingsstoornissen bestaan verschillende patronen van overbeweeglijkheid, zoals myoclonus, dystonie, tremor en chorea (zie Tabel 1).

Hyperkinetische bewegingsstoornissen

Myoclonus	Kortdurende spierschokken
Dystonie	Verkrampingen met afwijkingen aan de stand (van bijv. arm, been of nek)
Tremor	Trillen
Chorea	Continue en vloeiende overbeweeglijkheid met een dans-achtig karakter
Tics	(Kort) te onderdrukken stereotype bewegingen

Het vaststellen van het type bewegingsstoornis geeft richting aan het zoeken naar de onderliggende (hersens)ziekte. Een deel van die hersenziekten heeft een genetische oorzaak. Dat wil zeggen dat een afwijking in het erfelijk materiaal (een *mutatie*) leidt tot de ziekte. Door het ontdekken van een genetische oorzaak kan bij nieuwe patiënten de ziekte worden gediagnosticeerd. Het biedt ook de mogelijkheid tot gericht onderzoek binnen de groep patiënten met dezelfde genetische afwijking. Met de kennis over het onderliggende defect kan worden geprobeerd een medicijn te ontwikkelen specifiek gericht op die aandoening.

Onderzoek naar genetische ziekten kan plaatsvinden onder patiënten, maar in vroege stadia wordt vaak uitgeweken naar proefdieren. De mutatie die ten grondslag ligt aan de ziekte kan worden aangebracht in een organisme dat zo een *model* voor de aandoening wordt. Organismes kunnen simpel zijn, zoals een eencellige bacterie of een gistcel, of meer complex, zoals een muis. De keuze is grotendeels afhankelijk van welk aspect van de genetische afwijking bestudeerd wordt. Voor zeer fundamentele vragen, zoals de effecten van de mutatie op de stabiliteit van een eiwit, kan soms met een eenvoudig model worden volstaan. Voor complexere vragen over gedrag of het effect van medicijnen is vaak een complexer organisme nodig. Argumenten voor een eenvoudiger organisme zijn vaak het gemak waarmee het genetisch materiaal kan worden aangepast, de hoeveelheid technieken die beschikbaar zijn om ze te bestuderen, en de kosten. Argumenten voor een complexer organisme zijn de evolutionaire verwantschap met de mens (en daarmee de mate waarin ze de fysiologie of de klachten van de mens kunnen nabootsen) en voor neurologische vraagstukken de mate van ontwikkeling van het zenuwstelsel. Elke onderzoeksvraag vereist een afweging van deze factoren om tot het beste modelorganisme te komen.

In dit proefschrift worden twee hersenziekten specifiek onderzocht: **pantothenaatkinase-geassocieerde neurodegeneratie** (*pantothenate kinase-associated neurodegeneration*, of **PKAN**) en de **Noordzeeziekte** (*North Sea Progressive Myoclonus Epilepsy*, of **NS-PME**). Beide aandoeningen leiden tot hyperkinetische bewegingsstoornissen op de kinderleeftijd, zijn op dit moment niet goed behandelbaar en hebben een progressief beloop. De oorzaak van beide aandoeningen is genetisch; PKAN ontstaat door mutaties in het **PANK2**-gen en NS-PME door mutaties in het **GOSR2**-gen. Beide aandoeningen zijn erg zeldzaam, waardoor informatie over het exacte ziekteproces en het effect van medicijnen vrijwel alleen uit modelorganismen kan worden verkregen.

Pantothenaatkinase-geassocieerde neurodegeneratie (PKAN)

PKAN is een *neurodegeneratieve ziekte*, een ziekte waarbij hersencellen afsterven. Dit degeneratieve proces vindt plaats in een zeer specifieke locatie in de hersenen, de *globus pallidus*. Dit gebied heeft een belangrijke rol in het onderdrukken van ongewenste bewegingen; als dat niet voldoende gebeurt ontstaat er met name dystonie. Bij PKAN patiënten is dan ook sprake van gedurende de jaren toenemende dystonie. Op de MRI scan van de hersenen is er ijzerstapeling zichtbaar in de globus pallidus, waarvan de precieze oorzaak onduidelijk is.

De ziekte-veroorzakende mutaties in het PANK2-gen leiden tot een verandering in het PANK2-eiwit, waardoor de functie van het PANK2-eiwit verstoord raakt. De functie van PANK2 is het omzetten van vitamine B5 tot een product dat uiteindelijk coenzym A (CoA) wordt. CoA is een hulpstof die nodig is voor veel stofwisselingsreacties in de cel. Er wordt gedacht dat een probleem met CoA de oorzaak is van PKAN, maar welk proces precies bedreigd raakt en hoe dat leidt tot neurodegeneratie is onbekend. Ook is onduidelijk waarom PKAN zo specifiek de globus pallidus treft en waarom er sprake is van ijzerstapeling. Recent is aangetoond dat een stof die kan worden omgezet in CoA, pantethine, de verschijnselen van PKAN in proefdieren kan onderdrukken. Pantethine heeft echter eigenschappen die het gebruik als medicijn tegen PKAN tegenwerken zoals een snelle afbraak in de bloedbaan. Een stof waarmee hersencellen ook zonder de hulp van PANK2 CoA kunnen maken zou een medicijn tegen PKAN kunnen zijn; een dergelijke stof is echter nog niet gevonden. Een alternatief zou zijn om precies dat CoA-afhankelijke proces dat tot problemen leidt in PKAN met medicijnen te behandelen, maar welk proces dat is, is nog onduidelijk.

Noordzeeziekte (North Sea Progressive Myoclonus Epilepsy, NS-PME)

De Noordzeeziekte, of NS-PME, is net als PKAN een progressieve aandoening die op de kinderleeftijd begint met bewegingsstoornissen, en die veroorzaakt wordt door een genetische afwijking. Tegelijkertijd zijn er belangrijke verschillen: zo zijn er bij NS-PME tot op heden geen aanwijzingen gevonden voor neurodegeneratie, en waar bij PKAN sprake is van dystonie is er bij NS-PME sprake van ataxie (coördinatiestoornissen), myoclonus en epilepsie. De aandoening is zeldzaam en komt met name voor in landen rond de Noordzee, vooral (het noorden van) Nederland. Vrijwel alle bekende patiënten hebben dezelfde mutatie in het GOSR2-gen. Door deze mutatie verliest het GOSR2-eiwit een deel van zijn functie: normaliter draagt het GOSR2-eiwit bij aan het transport van eiwitten door het *Golgi apparaat*. Hier worden eiwitten voorzien van zijgroepen en verpakt in door membranen omgeven blaasjes (vesikels) om naar het



juiste gedeelte van de cel te worden getransporteerd. Wat er precies gebeurt als het GOSR2-eiwit een deel van zijn functie verliest is onduidelijk. Het is ook niet bekend in welke cellen GOSR2 precies nodig is en welke eiwitten GOSR2 nodig hebben voor hun verwerking in het Golgi apparaat. Mede hierdoor is het moeilijk om een therapie te ontwikkelen voor NS-PME patiënten.

In dit proefschrift proberen we het ziekteproces achter PKAN en NS-PME beter te doorgronden en daarmee meer een stap te maken richting behandeling. Als model voor de aandoeningen gebruiken we *Drosophila melanogaster*, de fruitvlieg. In veel aspecten houdt de fruitvlieg het midden tussen eenvoudige organismen zoals gist aan de ene kant en complexe organismen als een muis aan de andere kant. Daarnaast zijn er veel technieken ontwikkeld die het bestuderen van hersenziekten in de fruitvlieg mogelijk maken. De fruitvlieg is in staat tot het vertonen van complexe neurologische functiestoornissen als epilepsie en moeite met het bewegen, wat het tot een geschikt model kan maken voor PKAN en NS-PME.

Hoofdstuk 1 vormt de introductie van het proefschrift en beschrijft de ziektes PKAN en NS-PME in meer detail. De open vragen in het vakgebied worden verder toegelicht, en de theorieën rondom pathofysiologie worden verder besproken.

In **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift wordt besproken welke rol de fruitvlieg gespeeld heeft in het veld van neurodegeneratieve ziekten, zoals de ziekte van Parkinson, Alzheimer, Huntington, en PKAN. In de fruitvlieg kan met relatieve eenvoud worden onderzocht welke processen in de hersencellen ertoe leiden dat de cel uiteindelijk afsterft, en hoe een interventie daarop mogelijk is. Daarnaast kunnen in fruitvliegen ook zogenaamde *screens* worden verricht. Hierbij wordt onderzocht of het toedienen van bepaalde stoffen of de introductie van bepaalde genetische veranderingen een ziekteproces kan beïnvloeden. In plaats van het specifiek onderzoeken van een specifieke stof of genetische verandering, wordt in één keer “blindelings” een grote bibliotheek aan stoffen of genetische veranderingen getest. Doordat dit onderzoek kan plaatsvinden zonder precies de achtergronden van het ziekteproces te kennen, kan snel nieuwe informatie worden verkregen over ziekten, hun onderliggende ziektemechanisme en hun mogelijke behandeling. Op grond van de informatie vanuit deze modellen kan de volgende stap gemaakt worden naar complexere modellen, of zelfs naar patiënten.

Hoofdstukken 3, 4 en 5 centreren zich rond pathofysiologie en behandeling van PKAN. In **Hoofdstuk 3** proberen we pantethine op moleculair niveau zo aan te passen dat het sneller door cellen wordt opgenomen, en gedurende de tijd in de bloedbaan minder snel wordt afgebroken. Dit zou pantethine geschikter maken als medicijn tegen PKAN. In een poging dit te doen koppelden we de moleculaire groep 4-thiobutyltriphenylphosphonium (*TBTP*) aan pantethine. De stabiliteit van TBTP-pantetheine in serum was echter niet hoger dan die van het oorspronkelijke pantethine, waardoor het beoogde voordeel van de moleculaire aanpassing kwam te vervallen en de stof niet verder getest werd.

In **Hoofdstuk 4** streven we een andere strategie na. 4'-phosphopantetheine is een natuurlijk voorkomend tussenproduct in de productieroute van vitamine B5 naar CoA. In dit hoofdstuk laten we zien dat 4'-phosphopantetheine door cellen wordt opgenomen en omgezet in CoA, ook in cellen zonder PANK.

De stof is stabiel in serum en kan de negatieve gevolgen van verlies van pantothenaatkinase tegengaan in cellen, rondwormen en fruitvliegen. Dit maakt 4'-phosphopantetheine een aantrekkelijke stof om tot medicijn tegen PKAN te ontwikkelen.

In **Hoofdstuk 5** proberen we beter te begrijpen op welke manier verlies van pantothenaatkinase en daarmee CoA schadelijk is voor cellen. Een specifiek eiwit, genaamd *mitochondrial acyl carrier protein (mtacp)* heeft CoA nodig om te worden voorzien van een zijgroep, want zonder die zijgroep functioneert mtacp niet. De functie die mtacp heeft is het produceren van een andere zijgroep voor eiwitten die *liponzuur (lipoic acid)* wordt genoemd. Dat liponzuur is een noodzakelijke aanvulling op het eiwit *pyruvaat dehydrogenase E2 (PDH-E2)*. Afwijkingen in de productie van liponzuur en in pyruvaat dehydrogenase E2 leiden tot een aandoening die erg lijkt op PKAN, met hersenschade specifiek in de globus pallidus. In cellen waarin minder pantothenaatkinase aanwezig is, is er ook minder mtacp, minder liponzuur aan PDH-E2 en minder activiteit van het complex waarin PDH-E2 opereert (het PDH-complex). Dit geldt niet alleen voor cellen van fruitvliegen, maar ook voor menselijke cellen die van PANK2 zijn ontdaan. Om precies te kunnen weten welk deel van de schadelijke gevolgen toe te schrijven is aan het defect in PDH-E2, hebben we in fruitvliegen op allerlei manieren de functie van het PDH-complex geoptimaliseerd terwijl de hoeveelheid pantothenaatkinase verminderd was. Dit leidde tot verbetering van veel ziekteverschijnselen bij de fruitvlieg, zowel bij optimalisatie van het PDH-complex via genetische manipulatie als via een chemische stof die het PDH-complex actiever maakt (dichlooracetaat, DCA). Door het belang van deze route in de stofwisseling van fruitvliegen aan te tonen, kan in de toekomst worden onderzocht of dit ook het geval is voor ingewikkelder modelorganismen of zelfs patiënten en of middelen als DCA als medicijn zouden kunnen worden ingezet.

In **Hoofdstuk 6** verschuiven we de aandacht naar de Noordzeeziekte (NS-PME). Over deze ziekte is veel minder bekend dan over PKAN; de functie van het GOSR2-eiwit en de processen die stranden als GOSR2 er niet is, zijn nog grotendeels onbekend. De fruitvlieg bezit ook een eiwit dat sterk lijkt op GOSR2, genaamd *membrin*. Er is weliswaar een fruitvlieg gemaakt met minder membrin-eiwit, maar in hoeverre de verschijnselen bij die vlieg kunnen worden vertaald naar patiënten is nog onduidelijk. Om een goed fruitvliegenmodel te maken voor NS-PME, zijn we begonnen met inventariseren wat de klachten van patiënten verergert: dit zou dan ook kunnen worden gebruikt om het fruitvliegenmodel zodanig onder druk te zetten dat er verschijnselen ontstaan die lijken op wat patiënten ervaren. In een onderzoek onder 14 patiënten rapporteert een groot deel van hen verergering van hun symptomen bij hitte. Als we vervolgens de fruitvliegen die minder membrin maken blootstellen aan hitte, zien we dat een deel van hen verschijnselen vertoont die lijken op epilepsie, een symptoom dat patiënten ook hebben. Om verder uit te zoeken wat de functie van membrin dan precies is, en waarom er epilepsie ontstaat als er minder van aanwezig is, hebben we de hoeveelheid membrin verminderd in verschillende celtypen in het zenuwstelsel van de fruitvlieg. Door te achterhalen welk celtype membrin nodig heeft wordt het eenvoudiger om te achterhalen welke functie het precies heeft. In het centraal zenuwstelsel bevinden zich zenuwcellen (neuronen) en steuncellen (glia); de neuronen zorgen hierbij voor de aansturing en het gedrag van de fruitvlieg, waarbij de gliacellen de neuronen ondersteunen met voedingsstoffen, afweer en signaalstoffen. Verlies van membrin in neuronen leidt niet tot epilepsie, maar verlies in gliacellen wel. De



verschijnselen worden steeds erger naarmate de vlieg ouder wordt. Daarnaast blijkt dat een ouderwets anti-epileptisch middel (barbital) kan worden gebruikt om de epilepsie te onderdrukken. Dit model voor de Noordzeeziekte kan worden gebruikt om te achterhalen wat er op eiwitniveau misgaat met gliacellen die te weinig membrin bezitten, en hoe de neuronen daar uiteindelijk zodanig onder komen te lijden dat er epilepsie ontstaat.

In **Hoofdstuk 7** bespreken we de verschillende hoofdstukken apart en in samenhang met elkaar. Het biedt stof tot nadenken ten aanzien van hoe PKAN en NS-PME tot problemen leiden in de hersenen, en hoe onderzoek zou kunnen worden voortgezet om uiteindelijk deze aandoeningen beter te kunnen behandelen.