

NEDERLANDSE SAMENVATTING

De moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de neurodegeneratieve ziekten Frontotemporale Dementie (FTD) en de ziekte van Parkinson zijn nog niet volledig in kaart gebracht en tot op heden is het onmogelijk om van deze ziekten te genezen. FTD wordt veroorzaakt door neurodegeneratie van het voorste gedeelte van de hersenen, de zogenoemde frontale en temporale hersenkwabben. Deze hersengedeelten spelen een rol bij gedrag, persoonlijkheid, emoties en spraak. In de meeste gevallen is de oorzaak van FTD niet bekend (sporadische vorm), terwijl bij ongeveer 40% van de patiënten een genetische oorzaak wordt vermoed (familiaire vorm). De drie belangrijkste genetische oorzaken voor FTD zijn mutaties in de volgende drie genen: *MAPT*, *Progranuline* en *C9orf72*. Bij de ziekte van Parkinson sterven dopamine-producerende zenuwcellen langzaam af, met name in de substantia nigra. Hierdoor ontstaat er een dopaminetekort en wordt de aansturing van spierbewegingen aangetast. Ook bij de ziekte van Parkinson is de oorzaak in de meeste gevallen niet bekend, bij 10-20% van de patiënten wordt een genetische oorzaak vermoed.

De laatste jaren zijn er nieuwe genetische onderzoekstechnieken ontwikkeld om het genoom beter te begrijpen, bijvoorbeeld Next Generation Sequencing (NGS), waarbij in één keer de sequentie van het hele genoom of exoom wordt vastgelegd. Mede door deze nieuwe onderzoekstechnieken is de aandacht inmiddels verschoven van het bestuderen van individuele genen naar complexe gen-netwerken. Bij FTD en de ziekte van Parkinson hebben deze onderzoeksmethoden al bijgedragen tot het identificeren van nieuwe genetische risicofactoren voor de sporadische vorm van deze ziekten. Om te begrijpen hoe de genetische risicofactoren bijdragen aan het ziekteproces, worden momenteel verschillende 'omics' benaderingen toegepast. Het omics-onderzoek stelt zichzelf tot doel een biologisch systeem vanuit een bepaalde technologische invalshoek volledig in kaart te brengen.

In dit proefschrift heb ik mij gericht op functionele genomics (kennis van genen), transcriptomics (kennis van messenger-RNA's) en cellomics (kennis van cellen) benaderingen om pathogene aspecten van FTD en de ziekte van Parkinson te bestuderen. Het algemene doel van mijn proefschrift was inzicht te krijgen in genen en moleculaire mechanismen die aan deze neurodegeneratieve ziekten ten grondslag liggen. Daartoe heb ik in **hoofdstuk 2** de genregulatie van het *C9orf72*-gen bestudeerd. In **hoofdstuk 3 en 4** heb ik gekeken naar splicing regulatoren van *MAPT* exon 10 en het potentieel van twee RNA-technologieën onderzocht om endogene 4R Tau transcripten specifiek te verlagen. Daarnaast heb ik in **hoofdstuk 5** kandidaat-genen geprioriteerd voor de ziekte van Parkinson met behulp van RNA-interferentie (RNAi) in humane cellijnen en experimentele diermodellen.

In **hoofdstuk 2** heb ik de genregulatie van het *C9orf72*-gen bestudeerd. In deze studie hebben we Cap Analysis of Gene Expression sequence (CAGEseq) data gebruikt om in detail naar de expressie van het *C9orf72*-locus te kijken in verschillende celtypen. Verder hebben we alle sense en antisense RNA-transcripten beschreven. We observeerden dat de expressie van het *C9orf72*-gen meestal laag is, met uitzondering van een deelverzameling myeloïde cellen (CD14+ monocyten) die betrokken zijn bij aangeboren en adaptieve immuniteit. Dit wijst erop dat het *C9orf72*-gen een rol kan spelen in immuun-gerelateerde processen. Verder is de transcriptie van het *C9orf72*-locus erg complex en hebben we een aantal nieuwe transcriptie-startsites ontdekt in zowel de sense als antisense richting van het *C9orf72*-locus. We observeerden dat er niet alleen weinig *C9orf72*-transcripten aanwezig zijn in hersenweefsel en monocyten van *C9orf72*-patiënten, maar ook in verschillende hersengebieden van *MAPT* en *Progranuline* mutatie dragers. Dit suggereert dat de verlaging van *C9orf72*-genexpressie niet volledig afhankelijk is van de GGGGCC-expansie in *C9orf72*-patiënten en dit een meer algemene rol zou kunnen spelen in neurodegeneratie. Verder onderzochten we de mogelijkheid van een functionele interactie tussen de genen en voerden we experimenten uit in BE(2)-M17 cellijnen met lentivirale constructen gericht op *C9orf72*, *MAPT* en *Progranuline*. We zagen een duidelijke invloed op de genexpressie van *C9orf72* na het uitzetten van de afzonderlijke genen *MAPT* en *Progranuline* in vergelijking met controle-constructen, wat impliceert dat *MAPT*, *Progranuline* en *C9orf72* mogelijk samenwerken in een nog onbekend netwerk.

In **hoofdstuk 3**, hebben we een RNAi-screen uitgevoerd voor de genen van het humane 'Spliceosome' om regulatoren van *MAPT* exon 10 splicing te identificeren. *MAPT* is het gen waaruit het Tau-eiwit ontstaat en in de hersenen komen verschillende isovormen van het eiwit voor, gegenereerd door alternatieve splicing van het mRNA. De FTD-mutaties die de alternatieve splicing van exon 10 beïnvloeden, verstoren de balans tussen Tau met '3 imperfecte repeats' (3R) en '4 imperfecte repeats' (4R), waardoor een overschot aan 4R Tau ontstaat. De 3R en 4R Tau isovormen verschillen in het microtubuli-bindende domein van het eiwit. In deze studie hebben wij getracht regulatoren te identificeren voor alternatieve splicing van *MAPT* exon 10, die in de toekomst wellicht als target voor nieuwe medicijnen gebruikt kunnen worden. We hebben kwantitatieve PCR gebruikt om specifiek endogene 4R en 3R Tau transcripten te detecteren in BE (2)-M17 neuroblastoma cellijnen. Om de analyse verder te optimaliseren, hebben we bekende regulatoren van *MAPT* exon 10 splicing uitgezet met behulp van RNAi. Het uitzetten van *STOX1* leidde tot een consistente tweevoudige toename van het 4R Tau transcript en met een gemiddelde robuuste Z' factor van 0,57 werd onze analyse als uitstekend beschouwd. De screen omvatte 324 'short hairpin RNAs' (shRNA) om de splicing factoren één voor één uit te zetten. In totaal identificeerden we 27 genen die 4R Tau transcript niveaus significant veranderden in vergelijking met controle-constructen, zonder het niveau van totaal Tau te veranderen. Verder identificeerden we verschillende

splicing factoren die ontdekt zijn in eerdere studies, waaruit de kracht van onze aanpak blijkt. Vervolgens hebben wij een splicing netwerk gereconstrueerd van in totaal 51 interacties tussen 27 genen door middel van een netwerk analyse. Validatie-experimenten zullen uitgevoerd moeten worden om de kandidaat-genen verder te valideren en te prioriteren.

In **hoofdstuk 4** hebben we twee verschillende RNA-technologieën onderzocht om 4R Tau transcripten specifiek te verlagen. We ontwierpen verschillende antisense oligonucleotiden (AON) met behulp van het software programma 'Human Splicing Finder'. De potentie van zowel AON als shRNA werd getest op endogeen niveau in BE(2)-M17 neuroblastoma cellijnen. We identificeerden in totaal zeven AON's en drie shRNA's die 4R Tau transcripten specifiek kunnen verlagen. De bevindingen werden bevestigd op eiwitniveau en primaire corticale neuronen van ghumaniseerde *MAPT* muizen werden gebruikt om twee shRNA's te selecteren voor vervolgstudies. Verder hebben we een pilot experiment uitgevoerd en het effect van één van de shRNA's gevalideerd in corticale neuronen afgeleid van humane pluripotente stamcellen.

In **hoofdstuk 5** hebben we exome sequencing data gebruikt om zeldzame genetische varianten voor de ziekte van Parkinson te onderzoeken. In dit onderzoek hebben wij alle coderende gebieden van het genoom systematisch getest voor de aanwezigheid van zogenoemde 'loss-of-function' (LoF) varianten die de functie van een gen ernstig kunnen beïnvloeden. In totaal identificeerden we 27 kandidaat-genen die een LoF variant bevatten met een hogere allel frequentie in Parkinsonpatiënten. Om mogelijke verbanden te definiëren tussen de 27 kandidaat-genen en Parkinson-gerelateerde mechanismen, hebben we functionele studies uitgevoerd in zowel humane cellen als experimentele diermodellen, waaronder *Drosophila* en *C. elegans*. We kwantificeerden mitochondriale morfologie en translocatie van Parkin na het uitzetten van de kandidaat-genen in BE (2)-M17 neuroblastoma cellijnen. Verder werd naar de ontwikkeling van *C. elegans* gekeken en hebben we α -Synuclein-gemedieerde toxiciteit getest in *Drosophila*, deze test recapituleert Parkinson-gerelateerde neurodegeneratieve pathologie. Ook hebben we zeven genen tot op zekere hoogte kunnen repliceren in onafhankelijke genetische datasets, waarvan vijf genen verder gevalideerd werden op basis van functionele experimenten in Parkinson-relevante modelsystemen. Door genetische en functionele resultaten te integreren, hebben we veelbelovende kandidaat-genen geïdentificeerd voor verder onderzoek.

In dit proefschrift hebben we laten zien dat de genregulatie van *C9orf72* erg complex is en dat het gen mogelijk een rol speelt in immuun-gerelateerde processen. Er zal een gedetailleerde analyse nodig zijn om de precieze functie van het *C9orf72*-gen te bestuderen en vervolgens de moleculaire mechanismen die aan FTD ten grondslag liggen verder in kaart te brengen. Daarnaast hebben we een RNAi-screen uitgevoerd en twee verschillende RNA-technologieën gebruikt om respectievelijk regulatoren van *MAPT* exon 10 splicing te vinden en endogene 4R Tau transcripten te verlagen. Met name de AON technologie is

potentieel veelbelovend; de eerste therapieën voor de ziekte van Duchenne en Spinale musculaire atrofie zijn onlangs goedgekeurd door de 'Food and Drug Administration' (FDA). Ook de RNAi-technologie is veelbelovend en de eerste therapie gebaseerd op deze aanpak ligt momenteel voor review bij de FDA. Verder hebben we een geïntegreerde aanpak ontwikkeld voor het identificeren en prioriteren van nieuwe kandidaat-genen voor de ziekte van Parkinson. Wij denken dat de combinatie van high-throughput sequencing en functionele experimenten een veelbelovende strategie is voor toekomstige genomische studies naar de ziekte van Parkinson en andere neurodegeneratieve ziekten. Het onderzoek in dit proefschrift draagt bij aan een beter begrip van de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ziekteproces in FTD en de ziekte van Parkinson, en kunnen ons uiteindelijk nieuwe strategieën opleveren voor de ontwikkeling van een geneesmiddel.