

Samenvatting

Hoofdstuk 1. Introductie

Amyotrofische Laterale Sclerose (ALS) is een zeer ernstige aandoening waarbij de zenuwcellen die de spieren aansturen langzaam afsterven. Patiënten met ALS bemerken meestal als eerste spierzwakte. Er ontstaan bijvoorbeeld problemen met het lopen, praten en slikken of het dichtdoen van knoopjes. De ziekte is progressief en uiteindelijk kunnen alle spieren in het lichaam zwak worden. Patiënten met ALS komen te overlijden aan zwakte van de ademhalingspiëren.

Ongeveer 1 op de 1.000 mensen in Nederland overlijdt aan ALS. De ziekte komt iets vaker voor bij mannen en begint meestal rond het zestigste levensjaar. Gemiddeld komen patiënten 3,5 jaar na het begin van de klachten te overlijden, maar er zijn ook patiënten bekend die meer dan 10 jaar met de ziekte leven. Het beloop varieert dus van persoon tot persoon. De oorzaak van ziekte is onbekend en er is slecht 1 middel dat de ziekteprogressie enigzins remt.

ALS kan voorkomen als een erfelijke of sporadische ziekte. Bij ongeveer 5% van alle ALS-patiënten komt de ziekte in de familie voor. Er worden meer dan 10 verschillende soorten familiale ALS (FALS) onderscheiden. Bij meer dan 70% van deze families met ALS is de genetische afwijking die de ziekte veroorzaakt nog onbekend.

Er wordt gedacht dat sporadische ALS (SALS) een complexe ziekte is en dat wil zeggen dat de ziekte ontstaat door een combinatie van erfelijke aanleg en blootstelling aan omgevingsfactoren. Ondanks veel onderzoek is hierover nog niet veel bekend. Het doel van dit proefschrift is om genetische risicofactoren voor familiale en sporadische ALS te identificeren.

Hoofdstuk 2. Grootschalige screening naar mutaties in *SOD1* laat aanwijzingen zien voor genetische heterogeniteit in ALS

Bij ongeveer 20% van de patiënten met FALS kunnen er mutaties worden gevonden in het gen voor *SOD1*. In de praktijk lijkt het zo te zijn dat deze mutaties in Nederland zeer zeldzaam zijn. In dit hoofdstuk hebben we het DNA geanalyseerd van 55 patiënten met FALS en van 451 patiënten met SALS. Hierin werd 1 mutatie gevonden bij een familiale ALS patiënt en 2 bij sporadische ALS. We konden vervolgens aantonen dat de frequentie van *SOD1* mutaties in Nederland significant lager is dan in de meeste Westerse landen, $P = 0,0004$ voor FALS (21,9% versus 1,8%) en $P = 0,005$ voor SALS (2,5% versus 0,4%). Het feit dat er verschillende vormen van ALS zijn en dat de frequentie van het voorkomen van deze vormen verschilt tussen landen heeft gevolgen voor het opzetten van genetische associatiestudies. Dit is een mogelijke verklaring waarom resultaten van genetische associatiestudies niet altijd eenduidig zijn geweest.

Hoofdstuk 3. *FUS* mutaties in FALS in Nederland

Mutaties in het *FUS* gen kunnen ook FALS veroorzaken. In dit hoofdstuk analyseerden we 52 patiënten voor mutaties in dit gen. Bij 4 patiënten werd een mutatie gevonden, maar er werden ook enkele genetische varianten gevonden die ook bij gezonde mensen voorkwamen. Dit suggereert dat niet alle veranderingen in *FUS* tot ziekte leiden.

Patiënten met mutaties in *FUS* lijken een korte ziekteduur te hebben met relatief weinig betrokkenheid van het centraal motorisch neuron.

Hoofdstuk 4. ALS-FTD in een grote familie met FALS en een K17I *ANG* mutatie

Mutaties in het *ANG* gen zijn beschreven bij ALS-patiënten, maar ook aangetoond bij gezonde controlepersonen. Dit wekt de suggestie dat niet alle *ANG* mutaties pathogeen zijn. In dit hoofdstuk laten we een familie zien met een K17I *ANG* mutatie die segregiert met ziekte in de stamboom. Eén van de patiënten in deze familie kreeg als eerste klacht verschijnselen die passen bij de ziekte van Parkinson, later ontstond er ook spierzwakte met hyperreflexie en frontotemporale dementie.

Hoofdstuk 5. *ITPR2* als risicogen voor SALS; een genomwijde associatiestudie

Technische en wetenschappelijke vooruitgang hebben het mogelijk gemaakt om vrijwel alle frequente genetische variatie (SNPs) in het genoom van een persoon te typeren in een experiment. Door middel van deze techniek is het mogelijk om de frequentie van deze varianten tussen patiënten en controles te vergelijken (genomwijde associatiestudie (GWAS)). In dit hoofdstuk worden de resultaten van een GWAS bij 461 SALS-patiënten en 450 controlepersonen beschreven. De 500 SNPs met de laagste *P*-waarden werden opnieuw geanalyseerd in een 2e cohort en uiteindelijk werden de meest veelbelovende SNPs in een 3e cohort getoetst. Dit leidde tot een significante associatie voor een SNP in *ITPR2* met $P = 3,28 \times 10^{-6}$ en $P = 0,01$ na Bonferroni correctie.

ITPR2 is een regulator van intracellulair Ca^{2+} en is betrokken bij glutamaat gemedieerde neurotransmissie. Hogere expressie van *ITPR2*, zoals gezien bij ALS patiënten in deze studie, leidt tot apoptose, waarvan gedacht wordt dat het een belangrijke rol speelt bij motorneuronsterfte. Gezien het feit dat *ITPR2* een rol speelt bij glutamaat, Ca^{2+} en apoptose, is het een sterk kandidaatgen voor ALS.

Hoofdstuk 6. Genetische variatie in *DPP6* is geassocieerd met een verhoogd risico voor ALS

Om additionele genetische risicofactoren voor SALS te identificeren, hebben we data van twee GWASs gecombineerd en alle SNPs met $P < 0,01$ in beide studies geanalyseerd in een onafhankelijke populatie. In deze studie werden 1.767 SALS-patiënten en 1.916 controlepersonen geïncludeerd en werd een significante associatie gevonden voor rs10260404 met $P = 5,04 \times 10^{-8}$ met een odds ratio van 1,30 (95% CI 1,18 – 1,43). Deze SNP ligt in het *DPP6* gen, dat betrokken is bij de regulatie van biologische activiteit van neuropeptiden door precursoreiwitten om te zetten naar de actieve vorm en vice versa.

Hoofdstuk 7. Lagere expressie van *KIFAP3* verlengt de overleving bij SALS

In dit hoofdstuk wordt een studie beschreven met data van 4 verschillende GWASs. Er werden analyses uitgevoerd om SNPs te identificeren die het risico op ALS verhogen en of genetische varianten het fenotype van de ziekte kunnen beïnvloeden. Er werden in totaal 288.357 SNPs getest bij 1.821 SALS-patiënten en 2.258 controlepersonen afkomstig uit de Verenigde Staten en Europa. Er werd een significante associatie gezien met SNP rs1541160 in het *KIFAP3* gen met $P = 1,84 \times 10^{-8}$). Patiënten die homozygoot waren voor het gunstige allel (CC) hadden een langere overleving (14,0 maanden).

Verdere analyse liet zien dat rs1541160 in linkage disequilibrium is met rs522444 in de promotor van het gen en dat het gunstige allel geassocieerd is met een verlaagde expressie van *KIFAP3*.

Hoofdstuk 8. Copy-number variatie bij SALS, een genom-wijde studie

Copy-number variatie (CNV) vormt een belangrijke bron van variatie binnen het genoom. De techniek waarmee GWASs worden uitgevoerd maakt het ook mogelijk om deze vorm te bestuderen. CNVs beïnvloeden de expressie van genen en kunnen het risico op ziekte

beïnvloeden. In dit hoofdstuk is er een genoom-wijde studie uitgevoerd naar de invloed van CNVs op SALS.

Er werden in totaal 2.328 CNVs gevonden bij 810 individuen. Geen van de geïdentificeerde CNVs was significant geassocieerd met SALS. In totaal werden 406 duplicaties of deleties in genen gevonden die alleen bij SALS-patiënten voorkwamen.

Er werden 390 heterozygote deleties gezien bij SALS-patiënten, waarvan er 155 alleen bij patiënten werden geobserveerd (40%). Bij de controlepersonen werden er 323 heterozygote deleties gezien, waarvan er slechts 51 (16%) alleen bij controlepersonen werden geobserveerd. Dit verschil is statistisch significant met $P = 2,15 \times 10^{-12}$. De genen die exclusief bij ALS-patiënten waren gedeleteerd zijn betrokken bij oxidatieve phosphorylatie, regulatie van actine cytoskelet en cytokine-cytokine receptorinteracties.

We concluderen dat er geen frequente CNVs betrokken zijn bij SALS, maar wellicht dat meerdere zeldzame deleties een rol spelen bij de pathogenese.

Hoofdstuk 9. Genoom-wijde associatiestudie identificeert 19p13.3 (UNC13A) en 9p21.2 als risicofactoren voor amyotrofische laterale sclerose

In deze studie is er een GWAS uitgevoerd bij 2.323 patiënten met SALS en 9.013 controlepersonen. Alle SNPs met een $P < 1,0 \times 10^{-4}$ werden geanalyseerd in een tweede onafhankelijke cohort van 2.532 SALS-patiënten en 5.940 controlepersonen. Analyse van de genoom-wijde data toonde een significante associatie voor 1 SNP, rs12608932, met $P = 1,30 \times 10^{-9}$.

Deze SNP toonde robuuste replicatie in het tweede cohort met $P = 1,86 \times 10^{-6}$ en een gecombineerde analyse over beide fases gaf $P = 2,53 \times 10^{-14}$. Deze SNP, rs12608932, is gelokaliseerd op chromosoom 19p13.3 en ligt in een haplotype blok binnen de grenzen van *UNC13A*, dat de release van neurotransmitters zoals glutamaat bij de neuromusculaire overgang reguleert.

Follow-up van de overige SNPs liet een genoomwijd significant resultaat zien voor 2 andere SNPs (rs2814707 met $P = 7,45 \times 10^{-9}$, en rs3849942 met $P = 1,01 \times 10^{-8}$) in de gecombineerde analyse. Deze SNPs liggen op chromosoom 9p21.2 in een LD-blok in een regio waarvoor een verband is beschreven met familiale ALS met frontotemporale dementie in meerdere families.

Hoofdstuk 10. Analyse van FGGY als een risicofactor voor SALS

Een GWAS in een populatie van 386 SALS-patiënten en 542 controlepersonen uit de VS toonde een significante associatie aan met genetische variatie in *FGGY* (*FLJ10986*). Daarnaast werden er 66 additionele kandidaatregio's beschreven. Gezien het grote aantal hypothesen dat getoetst wordt in een GWAS, is onafhankelijke replicatie van groot belang. In dit hoofdstuk hebben we de geassocieerde SNPs in de Amerikaanse GWAS getoetst in genetische heterogene populaties uit Nederland, België, Zweden en Ierland. In totaal konden we gegevens analyseren van 1.883 patiënten en 2.063 controlepersonen.

Er werden geen significante resultaten gevonden voor de 6 geassocieerde SNPs in *FGGY*: rs6700125 ($P = 0,56$), rs6690993 ($P = 0,30$), rs10493256 ($P = 0,68$), rs6587852 ($P = 0,64$), rs1470407 ($P = 0,28$) en rs333662 ($P = 0,44$). Analyse van de overige 66 kandidaatloci toonde ook geen associatie met de laagste P -waarde voor rs7772593 ($P = 0,14$). We concluderen dat genetische variatie in *FGGY* geen risicofactor is voor SALS in Europese populaties.

Hoofdstuk 11. Zeldzame mutaties in *ANG* predisponeren voor ALS en de ziekte van Parkinson

In dit hoofdstuk hebben we het *ANG* gen gesequenced bij 15.152 personen en laten zien dat zeldzame mutaties in dit gen een risicofactor zijn voor ALS en PD. Een significante clustering van mutaties in *ANG* werd geobserveerd in vergelijking met controlepersonen voor FALS met $P = 8,07 \times 10^{-11}$, SALS met $P = 5,28 \times 10^{-4}$ en PD met $P = 3,91 \times 10^{-4}$. Na verwijderen van zogenaamde low-frequency polymorphisms toonde analyse dat de zeldzame mutaties een zeer significant risico met zich mee dragen (odds ratio > 25).

Functionele studies lieten zien dat mutaties in het signaal peptide leiden tot aggregaten in het cytoplasma, waarbij er colocalisatie is met TDP-43.

Hoofdstuk 12. Verhoogde serumwaarde van angiogenine bij ALS, maar niet bij de ziekte van Parkinson

Genetische associatiestudies hebben aangetoond dat mutaties in *ANG* een risicofactor zijn voor zowel ALS als de ziekte van Parkinson. Er zijn hogere serumwaarden van angiogenine beschreven bij SALS-patiënten. In dit hoofdstuk hebben we serum angiogenine niveaus bepaald bij 265 SALS-patiënten, 163 PD-patiënten en 462 controlepersonen. Statistische analyse toonde significant hogere angiogenine waarden aan bij patiënten met SALS ($P = 1,74 \times 10^{-3}$), maar niet bij patiënten met PD ($P = 0.72$). De hogere expressie van angiogenine zou een compensatoir mechanisme van het perifeer zenuwstelsel kunnen zijn.

Hoofdstuk 13. *DPP6* is geassocieerd met een verhoogd risico op progressieve spinale spieratrofie (PSMA)

Een GWAS liet zien dat genetische variatie in *DPP6* is geassocieerd met een verhoogd risico op SALS. PSMA is een ziektebeeld dat klinisch en pathologisch overeenkomsten vertoont met ALS. In dit hoofdstuk laten we zien dat variatie in *DPP6* ook een risicofactor is voor PSMA.

Hoofdstuk 14. Discussie

De belangrijkste conclusies van dit proefschrift zijn:

1. *SOD1* mutaties zijn zeldzaam in Nederland in vergelijking met andere landen. (Hoofdstuk 1).
2. Mutaties in *FUS* kunnen late-onset, autosomaal dominante SMA veroorzaken (Hoofdstuk 2).
3. We laten segregatie van een K17I *ANG* mutatie zien in een grote familie met familiale ALS (Hoofdstuk 3).
4. We beschrijven een patiënt met ALS en frontotemporale dementie en tekenen van parkinsonisme met een K17I *ANG* mutatie (Hoofdstuk 3).
5. Polymorphismen in *KIFAP3* zijn geassocieerd met een langere overleving bij SALS (Hoofdstuk 7).
6. Zeldzame CNVs zijn mogelijk betrokken bij SALS (Hoofdstuk 8).
7. Polymorphismen in *UNC13A* en op chromosoom 9p21 zijn een risicofactor voor SALS (Hoofdstuk 9).
8. Zeldzame mutaties in *ANG* geven een groot risico op ALS en PD (Hoofdstuk 11).
9. Mutaties in het signaalpeptide van *ANG* leiden tot eiwitaggregaten met TDP-43 (Hoofdstuk 11).
10. Serum angiogenine niveaus zijn verhoogd bij SALS (Hoofdstuk 12).