



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Phenotypes and mechanisms in myoclonus-dystonia

Ritz, K.A.

Publication date
2012

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Ritz, K. A. (2012). *Phenotypes and mechanisms in myoclonus-dystonia*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

Myoclonus-dystonie (M-D) is een zeldzame hyperkinetische bewegingsstoornis. M-D patiënten kenmerken zich door myoclonieën (plotselinge kortdurende schokken) en dystonie (repetitieve draaiende bewegingen en abnormale houdingen). Vooral het bovenste deel van het lichaam is aangedaan en de klachten openbaren zich doorgaans in het eerste of tweede decennium van het leven. Alcoholgebruik kan de motorische klachten verlichten. Psychische klachten, voornamelijk depressie en angststoornissen, komen frequent voor in M-D patiënten. Mutaties in het epsilon-sarcoglycan (*SGCE*) gen spelen een belangrijke rol bij het ontstaan van M-D. M-D wordt autosomaal dominant overgeërfd met verminderde penetrantie ten gevolge van maternale imprinting. Hierdoor manifesteren de symptomen zich alleen als gemuteerd *SGCE* via de vader wordt overgeërfd. Het *SGCE* eiwit is een transmembraan glycoproteïne en komt in iedere lichaamscel tot expressie. De functie van het eiwit is nog onbekend. Het pathomechanisme achter M-D is nog grotendeels onbegrepen, wel is er bewijs voor betrokkenheid van de basale kernen en het cerebellum. Dit proefschrift bestaat uit studies met verschillende invalshoeken gericht op het begrijpen van de rol van *SGCE* in M-D, onder andere door het in kaart brengen van het fenotypische spectrum van *SGCE* mutaties, van het expressie- en het *splicing* patroon van *SGCE* mRNA in de hersenen, en van de functie van het *SGCE* eiwit.

Hoofdstuk 1 neemt de huidige kennis over M-D onder de loep, vooral de genetica en de pathofysiologie. Tevens wordt er dieper ingegaan op de belangrijkste onderzoeksvragen.

In 43% van de M-D families manifesteert dystonie zich als veranderde stand van de handen bij het schrijven, schrijfkramp. Om het fenotypische spectrum van M-D beter te onderzoeken hebben we in **hoofdstuk 2** gekeken of schrijfkramp geassocieerd is met *SGCE* mutaties. Wij konden in een groot cohort aantonen dat het alleen zinvol is om te onderzoeken of er sprake is van een *SGCE* mutatie als de schrijfkramp gepaard gaat met myoclonieën. Daarnaast konden wij in deze patiëntengroep geen aanwijzing vinden voor de betrokkenheid van andere dystonie-genen, namelijk *DYT1* (*TOR1A*) en *DYT16* (*PRKR4*). Echter, intronen en regulatoire gebieden zijn niet onderzocht. Het is momenteel nog onbekend of en welke dystonie-genen getest moeten worden wanneer een patiënt zich presenteert met geïsoleerde schrijfkramp.

In **hoofdstuk 3** bestuderen we het fenotypische spectrum van *SGCE* mutaties in een groot Nederlands M-D cohort en bevestigen met deze studie de noodzaak van het stellen van strikte klinische criteria voorafgaand aan DNA diagnostiek. Uit de literatuur blijkt dat slechts een klein deel van de M-D patiënten *SGCE* mutaties heeft (23%). Het is mogelijk dat deze lage frequentie te wijten is aan het ontbreken van goede klinische criteria; veel patiënten die niet de typische M-D symptomen hebben, worden wel getest

op *SGCE* mutaties. Een andere verklaring voor dit lage percentage is dat er in een groot aantal studies niet gekeken is naar grote deleties. In onze studie hebben we recent geïntroduceerde klinische criteria toegepast op ons grote M-D cohort: de patiënten werden ingedeeld in de drie categorieën: “zeker”, “waarschijnlijk” en “mogelijk” M-D. Wij konden laten zien dat er alleen bij de “zekere” M-D patiënten ((1) begin van myoclonieën en dystonie of geïsoleerde myoclonieën op jonge leeftijd, (2) voornamelijk in het bovenlichaam, (3) een positieve familieanamnese voor myoclonieën en/of dystonie) een indicatie is voor DNA diagnostiek. Uitzonderingen dienen gemaakt te worden voor patiënten met een vroeg begin van klachten en typische M-D symptomen, maar een negatieve familieanamnese en voor patiënten met het typische M-D fenotype, een positieve familieanamnese maar een laat begin van de ziekte. In ons “zekere” M-D cohort hebben wij verschillende soorten mutaties gevonden, zoals nonsense, missense, splice-site mutaties en een grote deletie. De patiënten hadden allemaal een soortgelijk fenotype. Het ontbreken van een genotype-fenotype correlatie kan verklaard worden doordat al deze mutaties tot hetzelfde type horen en hoogstwaarschijnlijk leiden tot verlies van eiwitfunctie. In ons cohort spelen grote deleties een ondergeschikte rol. Het positieve effect van alcohol op de symptomen, de psychiatrische afwijkingen en een paternale transmissie waren gemeenschappelijke kenmerken in onze patiënten met *SGCE* mutaties. Patiënten met louter dystoniesymptomen behoorden niet tot het *SGCE*-mutatiespectrum. Ondanks de implementatie van strikte inclusiecriteria konden wij *SGCE* mutaties in 50% van de “zekere” M-D patiënten identificeren. Dit suggereert dat genetische heterogeniteit een rol speelt of dat andere onbekende factoren of mutaties van invloed zijn op *SGCE* expressie.

In **hoofdstuk 4** behandelen we een belangrijke vraag aangaande het pathomechanisme van M-D: waarom leiden *loss of function* mutaties in *SGCE* uitsluitend tot een neurologische ziekte, terwijl *SGCE* in iedere lichaamscel voorkomt? Wij veronderstelden dat een hersenspecifiek *SGCE*-transcript een rol speelt bij het ziektemechanisme en dat er sprake is van redundantie voor het alom aanwezige (niet-hersenspecifieke) *SGCE*-transcript. Deze hypothese hebben wij in een *ultra-deep amplicon sequencing* studie verder uitgewerkt door te kijken naar weefselspecifieke expressiepatronen van de verschillende *SGCE* transcripten. Op deze manier konden we laten zien dat het alternatief gespliced exon 11b het belangrijkste hersenspecifieke *SGCE* exon is. De aanwezigheid van exon 11b in alternatief gespliced mRNA resulteert in een alternatieve intracellulaire C-terminus van het *SGCE* eiwit met potentiële bindingsplekken voor andere eiwitten. We konden ook laten zien dat exon 11b in de hersenen differentieel tot expressie komt met een matige tot lage expressie in de basale kernen en een hoge expressie in het cerebellum. Met behulp van isoform-specifieke *in situ* hybridisaties op cerebellair weefsel werd bevestigd dat het hersenspecifieke *SGCE* voornamelijk tot expressie komt in de Purkinje-cellen en in de neuronen van de nucleus dentatus. Hieruit concluderen wij dat verlies van dit hersenspecifieke *SGCE* kan leiden tot de M-D symptomen, waarbij het cerebellum

waarschijnlijk de belangrijkste speler is. Op basis van deze bevindingen hebben wij gekeken naar eiwitinteracties van SGCE in het cerebellum, waarbij wij ons hebben gericht op de interactie met de hersenspecifieke intracellulaire SGCE C-terminus (**hoofdstuk 5**). Gebruikmakend van immuunprecipitatie en isoform-specifieke *pull-down* experimenten hebben we verschillen in eiwitinteractie van de alomtegenwoordige SGCE C-terminus en de hersenspecifieke SGCE C-terminus onderzocht. Omdat SGCE in relatief hoge concentraties voorkomt in de synaptosomale fractie hebben wij deze fracties uit cerebellair weefsel van zowel muizen als mens gebruikt. Hieruit konden we met behulp van massaspectrometrie geprecipiteerde eiwitten identificeren. Uit zowel de immuunprecipitaties als de isoform-specifieke SGCE peptide *pull-down* experimenten kwamen twee kandidaat-eiwitten die mogelijk aan het hersenspecifieke SGCE binden; synapsin I en synapsin II. Beide eiwitten werden in onafhankelijke experimenten gevonden, met beide methoden, in beide species. Tevens werd de interactie alleen gevonden met de hersenspecifieke en niet met de alomtegenwoordige SGCE C-terminus peptide. Om deze twee kandidaten te valideren zijn er (1) co-immuunprecipitaties uitgevoerd in HEK293 cellen en in een motor-neuronachtige cellijn (NSC-34) en (2) immuunfluorescentie en confocale microscopie om de (co)lokalisatie van beide kandidaten in gedifferentieerde NSC-34 cellen te bekijken. In de gedifferentieerde NSC-34 cellen konden wij met behulp van synapsin-immuunprecipitatie de binding van synapsin I en II met het hersenspecifieke SGCE bevestigen; bovendien zagen we geen binding tussen synapsin I en II en het alomtegenwoordige SGCE. Immuunprecipitaties van synapsin in HEK293 cellen gaven wisselende resultaten. Dit kan komen doordat de eiwitten geen directe binding aangaan met SGCE, maar wel deel uitmaken van hetzelfde complex en/of er zijn aanvullende neuronale factoren nodig voor deze interactie die ontbreken in HEK293 cellen. Confocale microscopie liet co-lokalisatie van synapsins met SGCE zien aan het plasmamembraan en aan de uiteinden van de dendrieten van gedifferentieerde NSC-34 cellen. Synapsins zijn betrokken bij de regulatie van de vrijlating van neurotransmitters en spelen een rol in synaptische functie en plasticiteit. Synapsins verankeren synaptische blaasjes aan de extracellulaire matrix en reguleren de vrijlating op het moment van een actiepotentialiaal. Mogelijk speelt SGCE een modulerende rol in dit mechanisme en leidt verlies ervan tot de abnormale, hyperkinetische bewegingen in M-D door het ontbreken van *fine tuning* van neurotransmitters in het cerebellum.

Deel 2 van dit proefschrift kwam tot stand naar aanleiding van de data-analyse die gedaan werd naar de verschillende kwantitatieve en kwalitatieve *SGCE* transcripten. Tegenwoordig is het door de opkomst van *next generation sequencing* technologieën makkelijker om het transcriptoom in kaart te brengen. De mogelijkheid om onbekende en zeldzame transcripten te detecteren is een van de voordelen van deze nieuwe technologie. In **hoofdstuk 4** presenteerden wij een unieke methode van *ultra-deep sequencing* waarbij wij weefsel-specifieke alternatieve splicing van het *SGCE* gen onderzochten. In **hoofdstuk**

7 hebben wij de verschillende nieuwe lage frequentie-varianten die tijdens deze studie werden gevonden verder gekarakteriseerd. De meeste van deze varianten werden toegeschreven aan conventionele alternatieve splicing, behalve twee van die varianten. In deze twee gevallen waren meerdere exonen tegelijkertijd aangedaan of was er sprake van intra-exone deleties. Bij beide typen varianten ontbrak een *canonical splice site*, maar werden wel korte identieke sequenties (*short identical sequences*) van 1 tot 8 nucleotiden gevonden op de grens van de splice. Deze typen lage frequentie-varianten werden in verschillende genen, weefsels en diersoorten gevonden. Uitgesloten werd dat deze lage frequentie-varianten zouden zijn ontstaan als een artefact van de PCR, de reverse transcriptie of door de sequentiereactie. Ook werd er een weefsel-specifieke trend voor deze twee nieuwe varianten gevonden: zij kwamen vooral tot expressie in hersen- en spierweefsel en in mindere mate, of voor sommige genen zelfs afwezig, in het bloed. Intramoleculaire transcriptionele *slippage* is de meest waarschijnlijke verklaring voor deze lage frequentie-varianten. Tijdens dit proces dissocieert het pre-mRNA-molecuul zich van het DNA tijdens de mRNA synthese, waarna *reannealing* van het pre-mRNA met het DNA plaatsvindt. Dit kan op hetzelfde gen template (intramoleculaire *slippage*) of op een andere template (intermoleculaire *slippage*) gebeuren. Bij *reannealing* op dezelfde plek zal een normaal mRNA gesynthetiseerd worden, maar als er op een andere plek *gereannealed* wordt ontstaat een nieuwe mRNA sequence. De positie waarop deze *reannealing* gebeurt is waarschijnlijk afhankelijk van de aanwezigheid van korte identieke sequenties. Voor zover wij weten is het onderzoek zoals beschreven in **hoofdstuk 7** de eerste studie die rapporteert over intramoleculaire transcriptionele *slippage*. In de discussie in **hoofdstuk 8** speculeren wij over de implicaties van transcriptionele *slippage*.