

University of Groningen

Childhood-onset movement disorders

Lambrechts, Roald Alexander

DOI:
[10.33612/diss.101316004](https://doi.org/10.33612/diss.101316004)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Lambrechts, R. A. (2019). *Childhood-onset movement disorders: mechanistic and therapeutic insights from Drosophila melanogaster*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.101316004>

Copyright

Other than for strictly personal use, 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), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Appendices

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: **pantothenaatskinase-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.

Pantothenaatskinase-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 *Colgi 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 verergerd: 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.



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 metertijd 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 (*lipic 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 hitteschok 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.

ACKNOWLEDGEMENTS

And so it ends, to borrow a phrase from T.S. Eliot, not with a bang but with a whimper. An endeavour like this is often the combined effort of many people, and without their help and support this project would most surely have failed. Therefore, as a proper reflection of a PhD project and the journey it entails, the remainder of this text will be an amalgam of Dutch and English, acknowledging the many people that have been there in one way or another in the past years.

Professor Sibon, beste **Ody**, van begin tot eind ben je bij mij en mijn project betrokken geweest. Het bijzondere aan jouw manier van begeleiden is de vrijheid die je een promovendus geeft om een eigen project vorm te geven. Dat is in het begin natuurlijk even overweldigend, maar na die eerste koudwaterfase heb ik dat als enorm fijn ervaren. Het was een gelukkig toeval dat we elkaar tegen het lijf liepen toen ik mijn Stage Wetenschap wilde doen, een toeval dat wat mij betreft tot veel leuks heeft geleid. Dank voor de begeleiding op jouw manier, voor het tot de orde roepen als ik weer eens afdwaalde en de motivatie op de momenten dat de moed me in de schoenen zonk.

Professor de Koning-Tijssen, beste **Marina**, hoewel veel in dit boek toch taaie biochemie is heb ik ook veel gehad aan ondersteuning vanuit het klinisch perspectief. Het is bewonderenswaardig hoezeer je moeite deed om de ins en outs van het onderzoek te begrijpen hoewel het begrijpelijkerwijs vaak goeddeels een ver-van-je-bedshow was. Na de meetings die we hadden ging ik eigenlijk altijd terug naar het lab met nieuwe invalshoeken en ideeën, al dan niet door de wisselwerking met Ody en de vragen die voortkwamen uit de combinatie van kliniek en fundamentele wetenschap. Dank voor alle moeite die je stopte in het begrijpen van het onderzoek, de adviezen ten aanzien van wetenschap en kliniek, en de warme sfeer in een krachtige maar buitengewoon gezellige onderzoeksgroep.

Professor de Koning, beste **Tom**, als de stille venoot in deze trojka zou bijna vergeten worden in hoeverre jij in staat was de brug te slaan tussen mijn beide promotores. Met name ten aanzien van de lipoylering en de klinische vertaling van metabole verstoringen kon ik veel en goed met je sparren en dat is het onderzoek en het proefschrift zeker ten goede gekomen. Daarnaast heb je me besmet met de interesse voor de Noordzeeziekte, waarbij de onderzoeksresultaten die nieuwsgierigheid alleen maar verder aanwakkerden. Dank voor je hulp bij de verkenning van dit terra incognita, voor het metabole-ziekten-perspectief op de onderwerpen in dit proefschrift en de discussies die het onderzoek verder aangescherpt en verbeterd hebben.

I would like to thank to the reading committee – **prof. dr. Kremer**, **prof. dr. Billeter** and **prof. dr. Strauss** – for their critical reading of this thesis and the valuable suggestions given to improve it.

Hoewel het onderzoek voor het grootste deel plaatsvond voordat ik aan de opleiding neurologie begon, heb ik in de afgelopen tijd bevrogen opleiders gehad die zonder uitzondering geïnteresseerd waren in het onderzoek dat hierin nu eindelijk gebundeld is. Mijn dank gaat dan ook uit naar wijlen **Peter van den Berg**, naar **Gosse de Jong** en de neurologen in de Isala Klinieken, waar ik met veel plezier het eerste jaar van mijn opleiding vervulde. Nu ik de opleiding voortzet in het UMCG strekt mijn dank zich ook uit naar

prof. dr. Kremer, Bauke de Jong en de neurologen in het UMCG.

Een alinea als de vorige moet gevolgd worden door de tegenhanger van al dat harde werken in de kliniek. Ondanks het serieuze werk dat we doen heb ik veel plezier gehad met de collega's **arts-assistenten in Zwolle en Groningen**. Jullie hebben de afgelopen jaren voor mij kleur gegeven.

The beginning of this project was strongly rooted in chemistry, which bore the fruit of Chapter 3 of this thesis. For all their help along the way, I am much obliged to the staff of the Pharmaceutical Chemistry department of the UMCG; in particular, I would like to thank **prof. dr. Poelarends, Edzard Geertzema, Pieter Tepper** and **Marianne de Villiers** for their help and guidance in the shaping of Chapter 3.

In a project like this, there is a tremendous support from people who are in the same boat as you are. For me, those people were my lab mates: **Nicola, Liza, Yixian, Francesco, Wonde, Madina, Yu Yi** and **Balaji**. In particular, Nico, you have been invaluable to the progress and eventual publication of the projects in this thesis, and I'm much obliged to you for all the work you put into almost every figure in this thesis. Madina, I greatly enjoyed being at your wedding in Georgia, and was honoured to be your paranymp. **Hein**, you joined the lab when I was already out, but your skills took the mtACP-manuscript to a new level of rigour. Thank you all for improving my time both inside and outside the lab.

The sphere of scientific support extends beyond our two rooms on the fifth floor: this includes PhD students from other groups, who helped to shape scientific ideas and are too numerous to expound upon in this context. The help of technicians along the way of this thesis has been excellent and cannot be underestimated. Without the fly skills of **Bart** and **Ellie**, or the cloning help of **Jeanette** many an experiment would have failed before it even began. A special note of thanks goes out to **Marianne**, who has gone above and beyond to help with cell studies.

A word of thanks goes out to the students that helped me in the laboratory as part of their studies. In particular, **Lisa** and **Alejandra**, thank you for the contributions you both made to the fly model for North Sea Progressive Myoclonus Epilepsy.

Hoewel ik meestal op het laboratorium te vinden was, heb ik erg genoten van de interacties met de Bewegingsstoornisengroep en de promovendi daar. Met name de retraites op Schiermonnikoog zijn memorabel geweest. **Sjoukje**, onze samenwerking kwam pas tot stand aan het eind van mijn onderzoek, een overlap tussen een project dat eindigt en een project dat begint; het heeft hoofdstuk 6 verrijkt, waarvoor mijn dank.

Ruben, Janneke en **Claire**: hoewel een fase eerder dan dit proefschrift heb ik enorm genoten van onze tijd met z'n vieren. Veel lief en leed is in die tijd gepasseerd, en er komen nog steeds frequent *inside jokes* bij me op die mijn huidige omgeving gelukkig niet begrijpt.

Alle vrienden, huisgenoten, familieleden en kennissen die belangstelling hebben getoond in mijn proefschrift: deze marge is te smal is om alle namen te bevatten, dank voor jullie interesse!





Jan, jij hebt mij geïntroduceerd in de praktische kant van het fruitvliegenwerk. Weet je nog hoe ik met moeite kansniveau haalde in het scheiden van fruitvliegen in mannetjes en vrouwtjes? Ik hoop maar dat ik het uiteindelijk goed gedaan heb... In het laboratorium als ook daarbuiten kon ik erg met je lachen, maar tegelijkertijd waardeer ik je wetenschappelijke geest en zindelijkheid van denken zeer. Ik was vereerd om je bij te staan als paranimf^{***}, en ben blij dat je nu ook mijn secondant wil zijn. Vanzelfsprekend wens ik jou, Karin en Willemijn al het beste.

Shannon, wij kennen elkaar inmiddels al langer dan we elkaar niet kennen. Onze eerste mailwisseling – ik heb het opgezocht – stamt uit 2004! Er is veel gebeurd in de jaren die volgden en ik blijf het bijzonder vinden hoe we ondanks onze drukke levens toch bij elkaar betrokken zijn gebleven. Ik denk niet dat ik ooit zo'n alleskunner heb gekend met een empathisch vermogen als het jouwe. Ik ben blij dat ook jij mijn paranimf wilde zijn. Al het beste voor jou, Sean, je ouders, broertje en zusje.

Liesbeth en Luitzen, ik kan erg goed aarden bij jullie wereldse instelling. Dank voor jullie belangstelling voor mijn werk, en de gezelligheid als we bij elkaar zijn. **Jelle en Laura**, ook met jullie zijn het altijd leuke momenten, meestal omlijst door het heerlijke gebak van Laura. Gelukkig sluit jullie humor goed aan bij die van Anita en mijzelf, met vreselijke gevolgen bij *Cards Against Humanity*. De Sinterklaasavonden met z'n zessen en de reis naar Rome zijn zeker memorabel geworden.

Pa en ma, dat ik hier zonder jullie niet zou zijn geweest gaat verder dan een biologische waarheid alleen. Jullie bijdrage aan dit werk begon al decennia voordat ik er zelf aan begon en strekt zich tot de laatste dag uit. Dank voor jullie steun gedurende het schrijven van dit boek, maar ook daarvoor en erna. En Pa, dank voor de "indokterinatie" die me uiteindelijk heeft geleid naar de geneeskunde, al was het via een waardevolle omweg. **Freya**, terwijl ik probeerde het onderwerp in dit boek te verkennen was jij bezig de wereld te verkennen. We zijn twee radicaal verschillende richtingen op gegaan, letterlijk in de wereld en figuurlijk qua vakgebied, en dat weerspiegelt dat we ook twee radicaal verschillende personen zijn. Ik waardeer hoe je doet waar je hart naar uitgaat, en hoop dat je vindt wat je zoekt.

Anita, iedereen hoopt dat onderzoek mooie dingen voortbrengt, maar wat het mij heeft gebracht slaat daadwerkelijk alles. Dank dat je al mijn gemopper hebt willen aanhoren en met raad en daad klaargestaan hebt waar het nodig was. Ik heb je lief en had het zonder jou niet gekund. *Dass du mich liebst, macht mich mir wert / Dein Blick hat mich vor mir verklärt / Du hebst mich liebend über mich / Mein guter Geist, mein bess'eres Ich!*

*** De gelijkenis met een welvoorziene sint-bernard dringt zich op.



LIST OF PUBLICATIONS

Published manuscripts

Lambrechts RA, Srinivasan B, Geertsema EM, Poelarends GJ, Sibon OC, De Villiers M.
Synthesis and characterization of 4-thiobutyl-triphenylphosphonium-pantetheine, a pantetheine derivative.
Chemical Science International Journal. 2014 May 7:676-86.

Srinivasan B, Baratashvili M, Van Der Zwaag M, Kanon B, Colombelli C, Lambrechts RA, Schaap O, Nollen EA, Podgoršek A, Kosec G, Petković H.
Extracellular 4'-phosphopantetheine is a source for intracellular coenzyme A synthesis.
Nature Chemical biology. 2015 Oct;11(10):784.

van Egmond ME, Weijenberg A, van Rijn ME, Elting JW, Gelauff JM, Zutt R, Sival DA, Lambrechts RA, Tijssen MA, Brouwer OF, de Koning TJ.
The efficacy of the modified Atkins diet in North Sea Progressive Myoclonus Epilepsy: an observational prospective open-label study.
Orphanet journal of rare diseases. 2017 Dec;12(1):45.

Lambrechts RA, Faber AIE, Sibon OCM.
Modelling in miniature: Using *Drosophila melanogaster* to study human neurodegeneration.
Drug Discovery Today: Disease Models. 2018 Oct 15.

van den Berg TQ, Lambrechts RA, Zwartbol RT.
Het thalamusinfarct; een herseninfarct met bijzondere klinische verschijnselen (*Thalamic infarction: a stroke with atypical symptoms*)
Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde. 2019 May: 163

Manuscripts not yet published at the moment of writing the thesis

van der Weijden MCM, van Laar PJ, Lambrechts RA, Verbeek DS, Tijssen MAJ.
Cortical pencil lining on SWI MRI in NBIA and healthy aging.
Accepted in BMC Neurology, awaiting publication.

Lambrechts RA, Polet SS, Hernandez-Pichardo A, van Ninhuys L, Gorter JA, Grzeschik NA, de Koning-Tijssen MAJ, de Koning TJ, Sibon OCM.
North Sea progressive myoclonus epilepsy is exacerbated by heat, a phenotype primarily associated with affected glia.
Accepted in Neuroscience.

Lambrechts RA, Schepers H, Yu Y, van der Zwaag M, Autio KJ, Vieira-Lara MA, Bakker BM, Tijssen MA, Hayflick SJ, Grzeschik NA, Sibon OCM. CoA-dependent activation of mitochondrial acyl carrier protein links four neurodegenerative diseases
Accepted in EMBO Molecular Medicine



