

University of Groningen

The molecular neuropathology of spinocerebellar ataxia type 23

Smeets, Cleo Josephine Lyzanne Maria

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:

2016

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

Citation for published version (APA):

Smeets, C. J. L. M. (2016). *The molecular neuropathology of spinocerebellar ataxia type 23*. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

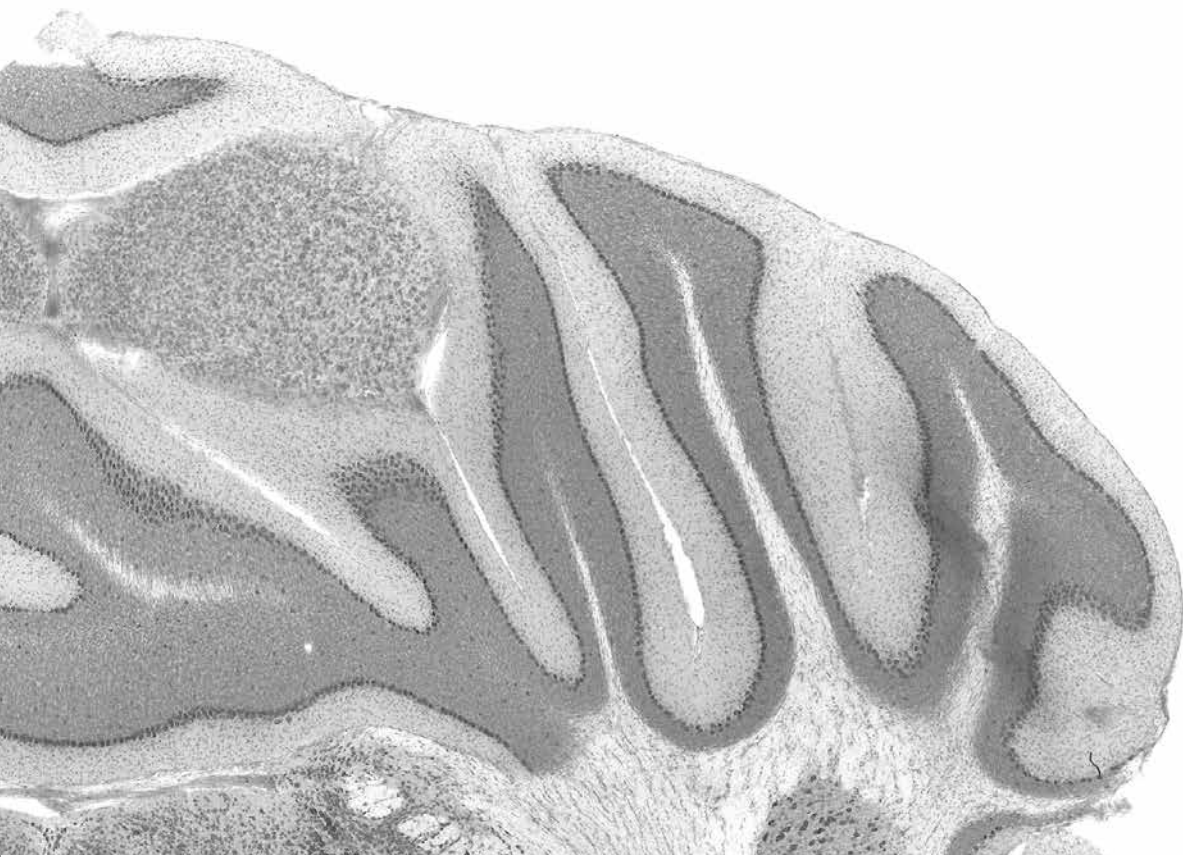
Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

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

Summary

Samenvatting

Acknowledgements

List of publications

Summary

The human brain contains approximately 86 billion (86,000,000,000) neurons, half of which are located in the cerebellum. The cerebellum regulates proprioception (which lets you know where your limbs are without looking), movement control, and some emotional processes. In order to maintain control over voluntary movement, the cerebellum, or more specifically, the sole output of the cerebellar cortex — Purkinje cells (PCs) — have to function properly. In spinocerebellar ataxia (SCA), the PCs are compromised, leading to a loss of motor function. Patients suffer from limb ataxia, trunk ataxia, and poor coordination of the hands, mouth and eyes. Currently, there are no therapies available to treat SCA, and the disorder progresses until it is no longer compatible with life. A lack of insight into the molecular mechanisms underlying PC dysfunction and cell death in SCA form a large hurdle which has to be jumped before the development of a therapy. Because there are currently 44 SCA types known, all with different genetic causes but highly similar phenotypes, researchers have been searching for a common pathology and attempting to develop therapies to delay the progression of, or even cure, the disease. Although with so many known SCA types, approximately 30% of SCA patients do not have a genetic diagnosis, and novel SCA genes still need to be identified. The pressure to identify these novel SCA genes is steadily increasing, as this information will provide more insight into common SCA mechanisms and aid in the development of therapy. Several common mechanisms have already been proposed, such as dark cell degeneration, dysregulation of gene transcription, autophagy, and RNA toxicity. However, none of the mechanisms have been confirmed in a majority of SCAs or led to the development of a therapy. Therefore, we propose climbing fibre (CF) deficits, coupled with disrupted glutamate/Ca²⁺ signalling, as a common disease mechanism in SCA.

CF wiring is a highly regulated process, and CF functioning is very important for normal cerebellar functioning. The main function of CFs is to control the plasticity of the PC's glutamatergic synapses by influencing the Ca²⁺ currents in PCs. If the CFs are not available, normal cerebellar functioning is disrupted and this leads to a loss of motor control. Additionally, aberrant Ca²⁺ signalling causes neuronal dysfunction and abnormal signal transduction, and has long been implicated in neurodegeneration. A loss of CF-PC synapses has been observed in four SCA types, and disrupted glutamate/Ca²⁺ signalling has been demonstrated in other SCAs. Ca²⁺ levels are increased in some SCA types and reduced in others; however, balanced Ca²⁺ signalling is paramount, and disruption of this balance is very likely pathogenic and represents a commonality among SCAs. A number of studies have shown improvement of the ataxic phenotype in SCA mouse models via pharmacological glutamate-mediated restoration of physiological Ca²⁺ currents. Therefore, we believe that CF pathology and disrupted glutamate/Ca²⁺ signalling present a promising common mechanism among SCAs and a possible therapeutic target, indicating that CFs should be examined closely in the various SCA types.

SCA23 is one of the SCA types likely suffering from unbalanced, or more precisely, reduced

glutamate/Ca²⁺ signalling. SCA23 is caused by mutations in prodynorphin (*PDYN*), leading to a mild, slowly progressive cerebellar ataxia in humans. The mouse model expresses *PDYN*-R212W ubiquitously, and these mice nicely recapitulate the symptoms and brain pathology of SCA23 patients. *PDYN*^{R212W} mice display slowly progressive ataxic gait from 3 months of age, and an overall loss of motor control at 12 months of age. Furthermore, we observed a loss of CF-PC synapses in *PDYN*^{R212W} mice starting from 2 weeks up to 12 months of age in several vermal lobules regulating motor coordination. As CF maturation is finalized at 3 weeks of age, seeing CF-PC synapse loss at 2 weeks indicates that developmental abnormalities contribute to this neurodegenerative disorder and suggests a not-yet-recognized neurodevelopmental role for *PDYN* in the cerebellum, and this CF-PC loss preceded PC loss, which was only detected at 12 months of age. The early loss of CFs was indicated by a reduction in vGlut2, a CF-PC marker that has been shown to play an important role in glutamatergic transmission, neurotransmitter release probability and long-term depression in the hippocampus. With this notion, we hypothesize that vGlut2 could play a similar role in the cerebellum, and loss of vGlut2 would then lead to reduced glutamatergic transmission and disrupt long-term depression of PC synapses, which is crucial for maintaining normal motor function. The symptoms and cerebellar pathology we observed were very likely caused by increased levels of mutant Dynorphin (Dyn) A, which coincided with reduced expression of the native Dyn A receptor, the kappa-opioid receptor (KOR) in the cerebellum, elevated expression of glutamate receptor subunits and reduced neuronal excitability, which was not observed in mice expressing *PDYN*-WT or control littermates.

How elevated mutant Dyn A causes all these problems *in vivo* is not yet known, and multiple effects might contribute to neuronal degeneration. We have shown that Dyn A peptides are toxic to primary cerebellar neurons, and that R6W Dyn A preferentially acted via the *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R), instead of its native KOR. In contrast, L5S mainly operated via KOR and R9C did not show any preference and acted via both receptor systems, similarly to wt Dyn A. As activation of KOR has neuroprotective effects, reduced activation of this receptor is potentially pathogenic. In addition, increased stimulation of the NMDA-R can lead to increased Ca²⁺ currents, a condition which is also potentially pathogenic. While the wild type and mutant Dyn A peptides exhibit various degrees of toxicity and either have or do not have a receptor system of preference, the SCA23 mutations located in the Dyn A domain of *PDYN* — L211S, R212W, and R215C — critically changed the secondary structure of the peptides, L5S, R6W, and R9C Dyn A, which all showed near complete loss of the N-terminal α -helix. The R6W peptide also showed β -bridge structures that were not observed in any of the other mutant peptides. These changes in secondary structure affected the peptide flexibility, increasing the flexibility of the SCA23 Dyn A peptides. Additionally, the positioning of the peptides in the membrane was also affected, as R6W and R9C Dyn A were positioned higher in the membrane than wt and L5S Dyn A. The mutant peptides all showed a reduced affinity to KOR that was very likely caused by the loss of the N-terminal α -helix previously shown to play a crucial role in receptor binding and the increased peptide flexibility and higher membrane positioning.

Furthermore, the solubility of R6W and R9C Dyn A in an aqueous solution was changed, leading to oligomerisation. R6W and R9C Dyn A formed large oligomeric structures, while wt and L5S Dyn A displayed low oligomeric potential. The increased oligomerisation was associated with reduced degradation of R6W and R9C Dyn A in human liquor and mouse cerebellar extracts compared to wt and L5S Dyn A, which were efficiently degraded. The structurally altered mutant peptides R6W and R9C Dyn A were more resistant to degradation and exhibited decreased solubility, contributing to the elevated peptides levels in the SCA23 mouse. Based on our work, we speculate that R6W and R9C are gain-of-function mutations, while L5S Dyn A likely reflects a loss-of-function mutation further complicating the underlying disease mechanism. Overall, we can conclude that decreased affinity to KOR, loss of neuroprotection, and potentiation of the NMDA receptor likely contribute to the pathological actions of SCA23-mutant Dyn A peptides.

To further explore the role of glutamate signalling in the underlying aetiology of cerebellar ataxia, we screened 96 randomly selected putative SCA cases (i.e. without mutations in the most frequent Dutch SCA genes) for mutations in 39 genes encoding glutamatergic components. We identified a novel truncating variation, c.2415C>A, p. C805*, in glutamate receptor AMPA3 (*GRIA3*) in a patient who did not exhibit clear cerebellar ataxia at two and a half years of age but suffered from intellectual disability. As mutations in *GRIA3* have previously been reported to cause X-linked intellectual disability in humans, we considered this variant pathogenic. A novel c.1466A>G, p.N489S variant in glutaminase 2 (*GLS2*) was identified in a 12-year-old male suffering from non-progressive gait and limb ataxia, dysarthria, intellectual disability, and very mild vermal hypoplasia. Because no additional affected family members were available for genetic analysis, or *GLS2* cDNA, we could not determine whether the p.N489S variant is indeed pathogenic. A missense variation, c.3007C>T, p.R1003W, in the C-terminal cytoplasmic tail of the NMDA-R subunit GluN3B (*GRIN3B*) reduced the surface expression of receptors containing this subunit but did not affect receptor channel activity. Therefore, reduced trafficking of the receptor complex may underlie the pathology. A novel heterozygous frameshift, c.2523delA, p.E841fs29X, in the ionotropic glutamate receptor, GluK1 (*GRIK1*), was detected in a patient who also carried the rare c.12232T>A, p.L411* *GRIK1* allele. The GRIK1-L411* protein was not detected, probably due to nonsense-mediated mRNA decay. In contrast, GluK1-E841fs was properly expressed and showed increased high molecular weight species, indicating altered solubility of the GluK1-E841fs receptor complexes. As the p.L411* variation is detected in healthy controls, the complete loss of one *GRIK1* allele is likely benign when there is a wild-type allele to compensate for the loss. The unfortunate combination of the p.L411* and p.E841fs29X variations may lead to critically altered GluK1 complexes, thus inducing trunk ataxia. These findings indicate that novel variations in genes encoding glutamatergic components are not a frequent cause of cerebellar ataxia but, when present, seem to link to intellectual disability, and suggest that intellectual disability and cerebellar ataxia are more closely related than previously thought.

In conclusion, this thesis closely examines the molecular mechanism of SCA23, and describes CF deficits and reduced glutamate/Ca²⁺ signalling as a crucial component of SCA23, and as a promising common pathology among the SCAs. The underlying cause of SCA23 is increased levels of mutant Dyn A, most likely due to critical changes in the secondary structure of the peptides. Additionally, while glutamatergic signalling plays an important role in SCA, genetic variations in genes encoding glutamatergic components link to intellectual disability rather than cerebellar ataxia.

If you don't read anything, read this:

- Expression of PDYN-R212W recapitulates SCA23 disease symptoms and pathology in a mouse model
- Climbing fibres are an important aspect of the pathology of spinocerebellar ataxias
- Highly increased mutant Dyn A levels underlie the SCA23 pathology
- Climbing fibre and gait deficits precede the loss of Purkinje cells in SCA23
- Climbing fibre deficits present prior to maturation of the fibres, indicating that developmental abnormalities contribute to the cerebellar neurodegeneration seen in SCA23
- Reduced Ca²⁺ currents and loss of neuronal excitability are a likely cause of Purkinje cell dysfunction in SCA23
- PDYN mutations located in Dyn A that cause SCA23 reduce the affinity of the mutant Dyn A peptides to their native opioid receptor, KOR, leading to deviation to the NMDA-R
- Mutations in glutamatergic genes mainly link to intellectual disability and less strongly to spinocerebellar ataxia
- Intellectual disability and cerebellar ataxia could be more closely related than previously thought

Samenvatting

Het menselijk brein bevat ongeveer 86 biljoen (86.000.000.000) neuronen, waarvan de helft zich in het cerebellum bevindt. Het cerebellum reguleert proprioceptie, waardoor je weet waar je ledematen zijn zonder te kijken, beweging, en enige emotionele processen. Om de controle over vrijwillige beweging te behouden, moet het cerebellum, of meer specifiek, de enige output van de cerebellaire cortex, de Purkinje cellen (PCs), goed functioneren. In spinocerebellaire ataxie (SCA) zijn de PCs aangetast, wat leidt tot verminderde bewegingscontrole. Patiënten lijden aan ataxie van de ledematen, rompataxie, en verminderde coördinatie van de handen, mond en ogen. Er is op dit moment geen therapie beschikbaar, en de aandoening vererft tot dat deze niet langer verenigbaar is met het leven. Een gebrek aan voldoende inzicht in de onderliggende moleculaire mechanismen van PC disfunctie en celdood vormt een grote horde voor het ontwikkelen van een therapie. Omdat er op dit moment 44 verschillende SCA types, met 44 verschillende genetische oorzaken bekend zijn, zijn onderzoekers op zoek naar een gemeenschappelijk mechanisme onder de vele SCAs, met het oog op therapeutische mogelijkheden om de ziekteontwikkeling te vertragen, of zelfs te voorkomen. Hoewel er 44 SCA types bekend zijn, heeft nog ongeveer 30% van de SCA patiënten geen genetische diagnose, en moeten er dus nog steeds nieuwe SCA genen geïdentificeerd worden. Dit is ook nodig om meer inzicht te krijgen in gemeenschappelijke SCA mechanismen, en zal de ontwikkeling van therapieën ondersteunen. Er zijn al een aantal gemeenschappelijke mechanismen voorgesteld, waaronder dark cell degeneration, ontregeling van gen transcriptie, autophagy, en RNA toxiciteit. Echter, geen van deze mechanismen zijn vastgesteld in een meerderheid van de SCAs, of heeft tot een therapie geleid. Daarom stellen wij klimvezeldefecten, gekoppeld aan ontregelde glutamaat/Ca²⁺-signaaltransductie, voor als een gemeenschappelijk mechanisme onder de SCAs.

Klimvezelontwikkeling is een zeer strak gereguleerd proces, en klimvezel functioneren is erg belangrijk voor het normaal functioneren van het cerebellum. De belangrijkste functie van klimvezels is de controle over de plasticiteit van de PC's glutamatoire synapsen, door middel van het beïnvloeden van Ca²⁺-golven in de PCs. Afwezigheid van klimvezels verstoort het functioneren van het cerebellum, en leidt tot verminderde bewegingscontrole. Bovendien is het bekend dat afwijkende Ca²⁺-signalen leiden tot neuronale disfunctie en abnormale signaaltransductie, en bijdragen aan neurodegeneratie. In vier verschillende SCA types is verlies van klimvezel-PC synapsen geobserveerd, en ontregelde glutamaat/Ca²⁺-signaaltransductie is waargenomen in diverse andere SCAs. In bepaalde SCA types zijn de Ca²⁺-niveaus verhoogd, maar verminderd in anderen. Dit laat zien dat een gebalanceerde Ca²⁺-signalering van het grootste belang is, dat enige verstoring daarvan pathogeen kan zijn, en dat dit een mogelijk gemeenschappelijk mechanisme onder de SCAs kan zijn. Daarbij hebben een aantal studies aangetoond dat het herstellen van fysiologische Ca²⁺-golven door middel van farmaceutische glutamaatregulering, de ataxie van SCA muis modellen verminderd. Daarom geloven wij dat klimvezelpathologie en verstoorde glutamaat/Ca²⁺-signaaltransductie een veelbelovend gemeenschappelijk SCA mechanisme, en een mogelijk

therapeutisch aanknopingspunt is, en als zodanig nader onderzocht zou moeten worden in de vele SCA types.

SCA23 is een van de SCA types die waarschijnlijk lijden onder ontregelde, of preciezer, verminderde glutamaat/ Ca^{2+} -signaaltransductie. SCA23 wordt veroorzaakt door mutaties in prodynorphin (*PDYN*), wat leidt tot milde, traag progressieve ataxie in mensen. Het muis model brengt *PDYN*-R212W in het gehele lichaam tot expressie, en deze muizen imiteren de symptomen en hersenpathologie van SCA23 patiënten. *PDYN*^{R212W} muizen laten een traag progressieve atactische gang zien vanaf 3 maanden, en een globaal verlies van motorcontrole op een leeftijd van 12 maanden. Verder observeerden wij een verlies van klimvezel-PC synapsen in 2 weken tot 12 maanden oude muizen in verschillende lobules van de cerebellaire vermis, welke motorcoördinatie reguleren. Omdat klimvezelontwikkeling 3 weken na de geboorte wordt afgerond, duidt het verlies van deze synapsen in 2 weken oude muizen erop dat verstoringen in de ontwikkeling bijdragen aan deze neurodegeneratieve aandoening. Ook suggereert het een nog niet erkende rol voor *PDYN* in de ontwikkeling van het cerebellum. Het verlies van klimvezel-PC synapsen ging vooraf aan PC dood, wat pas in 12 maanden oude muizen geobserveerd werd. Het vroege verlies van klimvezels werd aangeduid door een reductie van vGlut2, een marker voor klimvezel-PC synapsen die een belangrijke rol speelt in glutamatoire signaaltransductie, de kans op neurotransmitterafgifte, en langetermijnpotentiëring in de hippocampus. Hiermee veronderstellen wij dat vGlut2 een soortgelijke functie heeft in het cerebellum, en dat verlies van vGlut2 dus leidt tot verminderde glutamatoire signaaltransductie en verstoorde langetermijnpotentiëring, een kritiek proces voor normale motorfunctie. De symptomen en cerebellaire pathologie van SCA23 worden zeer waarschijnlijk veroorzaakt door een verhoogd niveau van mutant Dynorphin (Dyn) A, wat samenviel met verlaagde expressie van de naïve Dyn A receptor, de kappa-opioid receptor (KOR) in het cerebellum, verhoogde expressie van glutamaat receptor subunits, en verminderde exciteerbaarheid van de neuronen, welke niet werden waargenomen in muizen die *PDYN*-WT tot expressie brachten of controle muizen.

Hoe verhoogd mutant Dyn A deze problemen *in vivo* veroorzaakt is nog niet bekend, en verschillende aspecten kunnen bijdragen aan neurodegeneratie. We hebben aangetoond dat Dyn A peptiden toxisch zijn voor primaire cerebellaire neuronen, en dat R6W Dyn A bij voorkeur met de *N*-methyl-D-aspartaat receptor (NMDA-R) interacteerde, in plaats van met de naïeve KOR, terwijl L5S Dyn A vooral met KOR bond, en R9C Dyn A, net als wt Dyn A geen voorkeur had voor een van de twee receptorsystemen. Activatie van KOR heeft een beschermend effect op neuronen, en verminderde activatie van deze receptor is daardoor potentieel pathogeen. Daarbij kan verhoogde activatie van de NDMA-R tot meer Ca^{2+} -golven leiden, wat ook pathogeen kan zijn. Hoewel de wild type en mutante Dyn A peptiden verschillende mate van toxiciteit laten zien, en wel of niet een voorkeur voor een receptorsysteem hebben, veroorzaken alle SCA23 mutaties in het Dyn A domein van *PDYN* –L211S, R212W, en R215C– kritieke veranderingen in de secundaire structuur van de peptiden L5S, R6W, en R9C Dyn A. Alle mutanten lieten namelijk een bijna compleet verlies van de

N-terminale α -helix zien, die wel aanwezig is in wt Dyn A. R6W Dyn A liet ook β -brug structuren zien, welke niet zijn waargenomen in de overige mutante peptiden. De veranderingen in de secundaire structuren beïnvloedden de flexibiliteit van de peptiden, met verhoogde flexibiliteit in de SCA23 Dyn A peptiden. Daarbij was ook de positionering van R6W en R9C Dyn A aangetast, en zaten deze peptiden hoger in het membraan dan wt en L5S Dyn A. De mutante peptiden hadden allemaal een verminderde affiniteit voor KOR. Dit wordt zeer waarschijnlijk veroorzaakt door het verlies van de N-terminale α -helix die een belangrijke rol speelt in de receptorbinding, de verhoogde flexibiliteit van de peptiden, en de verhoogde positionering in de membraan. Verder was ook de oplosbaarheid van R6W en R9C Dyn A verminderd, waardoor oligomerisatie plaatsvond. De oplosbaarheid van wt en L5S Dyn A was niet of nauwelijks aangetast. De verhoogde oligomerisatie viel samen met verminderde degradatie van R6W en R9C Dyn A in cerebrospinale vloeistof en lysaten van muizencerebellum in vergelijking met wt en L5S Dyn A, welke efficiënt werden afgebroken. De structureel veranderde mutante peptiden R6W en R9C Dyn A zijn meer resistent tegen afbraak en vertonen verminderde oplosbaarheid, wat bijdraagt aan het verhoogde peptideniveau in de SCA23 muis. Gebaseerd op ons werk, speculeren wij dat R6W en R9C gain-of-function mutaties zijn, terwijl L5S Dyn A verminderde functionaliteit laat zien, wat het onderliggende pathologische mechanisme verder compliceert. We kunnen concluderen dat de verminderde affiniteit voor KOR, het verlies van neuronale bescherming, en meer activatie van de NMDA-R bijdragen aan de pathologische acties van SCA23-mutante Dyn A peptiden.

Om de rol van glutamatoire signaaltransductie in de onderliggende etiologie van cerebellaire ataxie te onderzoeken, hebben wij 96 willekeurig geselecteerde, vermeende ataxie patiënten (zonder mutaties in de meest voorkomende Nederlandse SCA genen) gescreend op mutaties in 39 genen die coderen voor glutamatoire componenten. We hebben een nieuwe truncerende variatie in glutamaat receptor AMPA3 (*GRIA3*), c.2415C>A, p. C805*, geïdentificeerd in een patiënt van twee en een half jaar oud welke geen duidelijke cerebellaire ataxie liet zien, maar wel verstandelijk gehandicapt was. Omdat mutaties in *GRIA3* voorheen gelinkt zijn aan X-gebonden verstandelijke handicaps, beschouwen wij deze variant als zijnde pathogeen. Een nieuwe c.1466A>G, p.N489S variant in glutaminase 2 (*GLS2*) werd geïdentificeerd in een jongen van 12 jaar oud, lijdende aan niet-progressieve gang en ledemaataxatie, dysarthrie, een verstandelijke handicap, en zeer milde hypoplasie van de vermis. Omdat er geen andere familieleden beschikbaar waren voor genetische analyse, en ook *GLS2* cDNA niet beschikbaar is, waren wij niet in staat te bepalen of de p.N489S variant inderdaad pathogeen is. Een missense variatie, c.3007C>T, p.R1003W, in de C-terminale cytoplasmatische staart van de NMDA-R subunit GluN3B (*GRIN3B*) verlaagde de oppervlakte-expressie van receptoren met deze subunit, maar veranderde de activiteit van het receptorkanaal niet. Zodoende lijkt verminderd transport van het receptorcomplex de onderliggende oorzaak van deze pathologie. Een nieuwe heterozygote frameshift c.2523delA, p.E841fs29X, in de ionotrope glutamaat receptor, GluK1 (*GRIK1*) is geïdentificeerd in een patiënt die ook het zeldzame c.12232T>A, p.L411* *GRIK1* allel draagt. GRIK1-L411* eiwit werd niet gedetecteerd, waarschijnlijk door nonsens-

gemedieerde mRNA afbraak. GluK1-E841fs werd wel normaal tot expressie gebracht, en liet meer eiwit met een hoger molecuulgewicht zien, wat wijst op een veranderde oplosbaarheid van GluK1-E841fs receptorcomplexen. Omdat de p.411* variant ook in gezonde controle-individuen voorkomt, lijkt het verlies van een *GRIK1* allel niet pathogeen omdat het wild type allel het verlies kan compenseren. De ongelukkige combinatie van de p.L411* en p.E841fs29X varianten kan tot ernstig veranderde GluK1 complexen leiden, en rompataxie induceren. Deze bevindingen duiden erop dat nieuwe varianten in genen die glutamatoire componenten coderen niet zo zeer cerebellaire ataxie induceren, maar juist verstandelijke handicaps veroorzaken, en dat deze twee aandoeningen biologisch gezien wellicht dichter bij elkaar liggen dan voorheen gedacht werd.

In conclusie, dit proefschrift geeft de moleculaire mechanismen van SCA23 weer, en beschrijft klimvezelpathologie en verminderde glutamaat/Ca²⁺-signaaltransductie als een cruciale component van SCA23, en als een veelbelovend gemeenschappelijk mechanisme onder de SCAs. De onderliggende oorzaak van SCA23 is het verhoogde niveau van mutant Dyn A, zeer waarschijnlijk door de kritieke veranderingen in de secundaire structuur van de peptiden. Daarnaast linken genetische variaties in genen die glutamatoire componenten coderen meer naar verstandelijke handicaps dan cerebellaire ataxie.

Geen zin om te lezen? Geen probleem.

- Expressie van PDYN-R212W recreëert de SCA23 symptomen en pathologie in de muis
- Klimvezels vormen een belangrijk aspect in de pathologie van cerebellaire ataxiën
- Zeer verhoogd niveau van mutant Dyn A ligt ten grondslag aan de SCA23 pathologie
- Klimvezelaantasting en een atactische gang gaan vooraf aan Purkinje cel dood in SCA23
- Klimvezelaantasting is aanwezig voordat de vezels volledig ontwikkeld zijn, wat erop duidt dat ontwikkelingsstoornissen bijdragen aan de cerebellaire neurodegeneratie in SCA23
- Verlaagde Ca²⁺-golven en verminderde exciteerbaarheid van neuronen zijn een waarschijnlijke oorzaak van de Purkinje cel disfunctie in SCA23
- De SCA23 mutaties in het Dyn A domein van *PDYN* verminderen de affiniteit van mutant Dyn A voor hun naïve opioïd receptor KOR, wat leidt tot uitwijking naar de NMDA-R
- Mutaties in glutamatoire genen linken vooral naar verstandelijke handicaps, en minder sterk naar cerebellaire ataxie
- Verstandelijke handicaps en cerebellaire ataxie zouden biologisch gezien meer gerelateerd kunnen zijn dan voorheen gedacht

Acknowledgements

Dear Dineke, thank you for your support and supervision these last four years. I remember I was very excited when you invited me for an interview, mostly because you were the first one to do so. We mainly discussed my time in London and how you had a more interesting project for me than the one I had applied for. When you hired me – after 1.5 interviews – I thought you were a little insane. And as it turns out, I was right. You are annoyingly optimistic, which, as you know, I am not. But it was your optimism and enthusiasm that hired me, and so I do appreciate it. You trusted me and gave me the freedom to explore science and try new things. While not everything panned out the way we had hoped, I learned something from every project we embarked upon. We didn't always agree on everything, but I think that's a good thing. I really enjoyed working with you, and I owe you a huge thank you for getting me through all the PhD craziness.

To Richard, my promotor. The thing I will remember most about you is that you said so many nice things to me at one annual review that it was just too much. Thanks for all your advice and inspiring words; they worked.

To my Paranimfs, Zuzanna, Joyce, and Maud, thank you for helping me prepare for today, even from far away. But the most important thing you did was tell me I was going to make it. And you were right. Thanks, girls. I'm happy to have such awesome ladies at my side today.

Zuzanna, we've only been friends a short time, but I hope we'll be friends for a long time to come. Don't sweat the small stuff, you're gonna do great.

Maud and Joyce, and Sjors. My Team. I've known you all for such a long time, and you have no idea how glad I am about that. You were there for me when I needed you most, and I'll never forget that. We are Team Destruction.

I'd like to thank all my collaborators for the fruitful collaborations. In particular, Georgy and Tanja, for welcoming me into your lab to learn your specialized Western blotting technique. Michel, for keeping calm when we were freaking out about our electrophysiological experiments, and performing them (almost) without a hitch. And Manel, for opening me up to the world of wiggling peptides and our many work discussions, at work and elsewhere.

Of course I have to thank the technicians in the lab, Matthieu, Rutger, Astrid, Soesma, Jan, and Ludolf, for helping out whenever possible. You make the lab run smoothly. Michiel, we've had our differences, but we've also had fun in the lab. We both had to give in a little, but we figured out how to work together. Thanks for all your hard work, genotyping my mice and making sure I could

perform transfections with the best possible plasmids. I'd also like to thank technicians working in Molecular Genetics, specifically Daphne and Niels, for helping me out many a time when our Genetics lab just wasn't good enough for my functional work. Niels, I still can't believe you endured a month-long early-morning experiment with me, and we still had a good time. I also still can't believe I only over-slept once. Even though the experiment didn't work the way we hoped it would, I know I felt better having you there with me, doing all the hard work like anchoring cannulas, suturing, and connecting the pump. You always helped me out when I needed something and always let me complain a little when I needed to. Thanks for everything!

A thank you to Klaas at the UMIC. Without your help, I would still be sitting behind the TissueFaxes trying to scan my sections. Thanks for all your help! And a thank you to the Centrale Proefdieren Voorziening, for taking care of my mice, in particular to Liana and Angela. You were always willing to help me out and keep a close eye on my mice. Planning and performing my experiments would have been a lot harder without you.

During your PhD, you need people with whom to have scientific discussions, and people to distract you from those discussions. Way back when we had actual offices, our office was a good place for a little distraction on occasion thanks to Susanne, Barbara, Agata, Asia, Ania and Jackie. Other distractions came via frequent coffee breaks, trips to the Neighbour, the Chairs, Irish pubs, park barbecues, parties and many mid-week and not-so-mid-week drinks with the infamous Spanish crowd (also open to non-Spanish persons). Without all of you, my time in Groningen would not have been the same. The people I want to thank here are too many to mention, but I'll give it a go. Olga, we accidentally met in London before I came to Groningen. Thanks for inviting me out to drinks with your friends, it really got me settled in Groningen! Anna, you've had me flipping in colours many times. Your imagination knows no bounds. Use it wisely. And a huge thank you to both of you and Ale for taking care of me when my leg was in a cast for 2 months. It's still amazing to me that you did that for someone you only knew for 2 months! You're the best. Rodgy, we had a lot of fun enjoying concerts and festivals, usually together with Ale. You were always there with a quick joke and your harmonica. Thanks sweetie. Isis, you are always there for anyone who needs you. Keep being you; you'll find what you're looking for. Genaro, you're fabulous. But you knew that. Mamen, you're stronger than you think. And your cooking is amazing. Luz, thanks for all the good times. We should have danced more. Urmo, my new concert buddy, you should have come back to Groningen sooner! Just one thing: finish your bloody thesis. Juha, thanks for the many interesting discussions we've had. And for trying to teach me Spanish. Sorry that I wasn't patient enough. Arnau & Mireia, thanks for the delicious food, football matches, and good company. And to everyone that I'm forgetting; thanks for the good times!

Then there are friends abroad, getting me out of Groningen at the right times. Christine, you've gotten pretty good at absorbing all my – let's call it venting. Thanks for the support. And everything else.

Certainly, I have to thank our editors, Jackie and Kate. Without your hard work this thesis would not have been the same. Surely not without Kate, who is the Queen of making crazy deadlines (sorry!). You're amazing.

I also want to thank my family. You may not always have understood what I was working on, but you've always supported me, even when I moved far away (5 hours!). I always have many places to come home to. Thank you all.

Ik wil ook mijn familie bedanken. Jullie begrepen misschien niet altijd waar ik mee bezig was, maar jullie hebben me altijd gesteund, zelfs toen ik ontzettend ver weg ging wonen (5 uur!). Ik heb veel huizen die ik thuis kan noemen. Dankjewel.

Dad and Tom, I'm glad you're here today. Of course we're missing someone, but I'm sure she's here somewhere, enjoying this moment.

Pap en Tom, ik ben blij dat jullie er zijn vandaag. Natuurlijk missen we iemand, maar ik weet zeker dat ze dichtbij is, en van dit moment geniet.

And of course, to everyone I've mentioned, and everyone I forgot: Thank you all so much.

List of Publications

- Smeets, C.J.L.M., Jezierska, J., Watanabe, H., Duarri, A., Fokkens, M.R., Meijer, M., Zhou, Q., Yakovleva, T., Boddeke, E., den Dunnen, W., et al. (2015). Elevated mutant dynorphin A causes Purkinje cell loss and motor dysfunction in spinocerebellar ataxia type 23. **Brain** 138, 2537–2552. DOI:<http://dx.doi.org/10.1093/brain/awv195>
- Duarri, A., Lin, M.-C.A., Fokkens, M.R., Meijer, M., Smeets, C.J.L.M., Nibbeling, E.A.R., Boddeke, E., Sinke, R.J., Kampinga, H.H., Papazian, D.M., et al. (2015). Spinocerebellar ataxia type 19/22 mutations alter heterocomplex Kv4.3 channel function and gating in a dominant manner. **Cell. Mol. Life Sci.** 72, 3387–3399. DOI:[10.1007/s00018-015-1894-2](https://doi.org/10.1007/s00018-015-1894-2)
- Mielcarek, M., Toczek, M., Smeets, C.J.L.M., Franklin, S.A., Bondulich, M.K., Jolinon, N., Muller, T., Ahmed, M., Dick, J.R.T., Piotrowska, I., et al. (2015). HDAC4-myogenin axis as an important marker of HD-related skeletal muscle atrophy. **PLoS Genet.** 11, e1005021. DOI:<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1005021>
- Smeets, C.J.L.M., and Verbeek, D.S. (2014). Cerebellar ataxia and functional genomics: Identifying the routes to cerebellar neurodegeneration. **Biochim. Biophys. Acta** 1842, 2030–2038. DOI:[doi:10.1016/j.bbadis.2014.04.004](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.004)
- Smeets, C.J.L.M., and Verbeek, D.S. Climbing fibres in spinocerebellar ataxia: A mechanism for the loss of motor control. **Neurobiol. Dis.** 2015 doi:10.1016/j.nbd.2016.01.009.
- Smeets, C.J.L.M., Jezierska, J., Melo, M.N., Raspe, M., Bakalkin, G., Sinke, R.J., Marrink, S., Reits, E., and Verbeek, D.S. Altered secondary structure of Dynorphin A associates with loss of opioid signalling and NMDA-mediated excitotoxicity in SCA23. *Manuscript under revision, Hum. Mol. Genet.*
- Smeets, C.J.L.M., Nibbeling, E.A.R., Fokkens, M.R., Brandenburg-Weening, D., Yi, F., Dorsett, K. N., Bullard, G.C., van der Vries, G., Verschuuren-Bemelmans, C.C., Hansen, K.B., Sinke, R.J., and Verbeek, D.S. Genetic screening of cerebellar ataxia cases reveals a link between the glutamatergic system and intellectual disability. *Manuscript under review, Hum Genet.*
- Smeets, C.J.L.M., Sinke, R.J., and Verbeek, D.S. Developmental abnormalities in a mouse model of the neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 23. *Manuscript in preparation*

