

Nederlandse samenvatting

Chorea-Acanthocytose (ChAc) is een extreem zeldzame neurodegeneratieve ziekte die veroorzaakt wordt door mutaties in het *VPS13A* gen dat codeert voor het VPS13A eiwit. Patiënten hebben daardoor nauwelijks tot geen VPS13A eiwit wat ertoe leidt dat specifieke hersencellen dood gaan, hun hersenfunctie achteruit gaat en ze verschillende bewegingsstoornissen ontwikkelen. Chorea, waarbij patiënten onwillekeurige bewegingen van armen en benen hebben, is de meest kenmerkende bewegingsstoornis. Daarnaast kunnen ook psychische problemen en epilepsie ontstaan. Veel ChAc patiënten hebben misvormde en puntige rode bloedcellen, die acanthocyten heten. Helaas bestaat er nog geen behandeling voor ChAc en overlijden patiënten vroegtijdig. Om vooruitgang in de behandeling en genezing van ChAc te bereiken is het nodig dat de onderliggende ziektemechanismen worden onderzocht.

Tot nu toe is er nog veel onbekend over de functie van VPS13A en de cellulaire processen waarin VPS13A een rol speelt. Het doel van dit onderzoek was daarom om inzicht te krijgen in de lokalisatie en functie van het VPS13A eiwit en daarmee meer duidelijkheid te creëren over de pathofysiologie van ChAc. Het gebruik van modelsystemen en -organismes is erg belangrijk voor onderzoek naar vele humane ziektes. Deze modelsystemen lopen uiteen van gekweekte cellijnen en ééncelligen zoals gist tot complexere proefdieren als de fruitvlieg en de muis. De fruitvlieg, ook *Drosophila melanogaster* genoemd, heeft een grote rol gespeeld in het bestuderen van verschillende hersenziektes. Fruitvliegen kunnen gemakkelijk en relatief goedkoop in grote hoeveelheden gekweekt en onderhouden worden. Een groot voordeel is ook dat het mogelijk is om een grote groep vliegen te creëren waarvan de genetische achtergrond identiek is. Daarnaast zijn er veel mogelijkheden om het DNA van *Drosophila* te manipuleren of aan te passen en om vliegen met verschillende farmacologische middelen te behandelen. In hoofdstuk twee geven we een overzicht van de manieren waarop de fruitvlieg heeft bijgedragen aan kennis over verschillende neurodegeneratieve ziektes. In dit proefschrift hebben we ook gebruik gemaakt van de veelzijdigheid van de fruitvlieg als diermodel voor ChAc. Allereerst hebben we een fruitvliegmodel gevalideerd en gekarakteriseerd in het derde hoofdstuk van dit proefschrift. Fruitvliegen hebben een gen dat erg veel lijkt op het humane *VPS13A* gen, namelijk *Vps13*. De vliegen die wij bestudeerden hebben een mutatie in het *Vps13* gen wat ertoe leidt dat dit gen niet goed meer functioneert en er geen volledig *Vps13* eiwit aanwezig is in de vliegen. Wij hebben laten zien dat deze *Vps13* vliegen een verkorte levensduur hebben, motorische problemen hebben en slechter kunnen klimmen. Verder vonden we gaten in het brein van de gemuteerde vliegen, wat vaak een teken is van neurodegeneratie. Ook zagen we dat er eiwit-ophopingen waren in de hersenen van *Vps13* vliegen en dit is suggestief voor defecten in de eiwit-huishouding van cellen. Een deel van de problemen van

Vps13 vliegen konden we redden door het humane *VPS13A* gen terug te plaatsen in de gemuteerde vliegen. Dit is erg belangrijk want het laat zien dat de functie van het humane *VPS13A* en het vliegen *Vps13* gen geconserveerd is, waardoor dit vliegenmodel erg relevant en nuttig is voor het bestuderen van ChAc. In hetzelfde hoofdstuk laten we zien dat *Vps13* co-fractioneert met markers van endosomen, en met name Rab7, wat suggereert dat in vliegen *Vps13* een rol speelt in transport en afbraak van eiwitten in een cel via autofagie. Autofagie is een cellulair opruimingsproces waarbij onnodige en slecht functionerende onderdelen in een cel worden afgebroken. Het is bekend dat het proces van autofagie in andere neurodegeneratieve ziektes aangedaan is, en mogelijk is dat ook het geval bij ChAc.

Een nieuwe en tegenwoordig zeer populaire techniek om genetisch materiaal te veranderen is CRISPR/Cas9. Deze techniek is namelijk makkelijk toe te passen en relatief goedkoop. CRISPR/Cas9 is ontdekt als immuun systeem in bacteriën, maar wordt nu gebruikt om mutaties te creëren of om specifieke genen te markeren met een fluorescerende marker zoals het Groene Fluoriserend Eiwit of Proteïne (GFP). In hoofdstuk vier hebben wij deze techniek ook toegepast om een nieuwe *Vps13* mutant te maken waarbij het volledige *Vps13* eiwit afwezig is. Daarnaast hebben we een *Vps13-GFP* vliegenlijn gemaakt om het *Vps13* eiwit te kunnen visualiseren en lokaliseren. Het hoofdstuk beschrijft uitgebreid hoe we deze techniek hebben toegepast. De gecreëerde vliegenlijnen hebben we vervolgens gebruikt om de functie en lokalisatie van *Vps13* in fruitvliegen verder te onderzoeken.

Het ovarium van vrouwtjes fruitvliegen wordt veel gebruikt om verschillende biologische en cellulaire processen te bestuderen omdat het makkelijk toegankelijk is en er veel genetische tools beschikbaar zijn. Tijdens de productie van eitjes zorgen 15 voedingscellen ervoor dat de eicel voorzien wordt van genoeg voedingsstoffen. Als dit voltooid is ondergaan de voedingscellen een geprogrammeerde celdood en worden vervolgens opgeruimd door omliggende follikelcellen. Dit proces wordt ook wel ontwikkelingsceldood genoemd, maar de mechanismes hiervan zijn nog erg slecht begrepen. Het goed en volledig opruimen van de voedingscellen is van belang voor het fatsoenlijk functioneren van de ovaria. Voornamelijk factoren uit omliggende follikelcellen zijn recentelijk geïdentificeerd en spelen een zogenaamde niet-autonome rol in de inductie van de ontwikkelingsceldood. In hoofdstuk vijf beschrijven we dat *Vps13* juist een cel-autonome rol speelt in dit proces en dus van belang is in de voedingscellen zelf. *Vps13* vliegen hebben namelijk een opeenhoping van voedingscellen die niet goed opgeruimd zijn. Afwezigheid van *Vps13* in alleen de voedingscellen zorgt voor eenzelfde opeenhoping van voedingscellen, terwijl afwezigheid van *Vps13* in de follikelcellen niet tot problemen leidt. Met behulp van de vliegenlijnen die we in hoofdstuk vier hebben gecreëerd met CRISPR/Cas9 vonden we dat het *Vps13* eiwit gelokaliseerd is rondom de kernen van de voedingscellen, maar pas nadat de celkernen van de voedingscellen al aangezet waren tot celdood. Dit suggereert dat *Vps13* niet nodig is voor het activeren van de celdood, maar juist voor het opruimen van de dode voedingscellen. Om in

groot detail te kunnen zien wat de functie van Vps13 is en wat er dus mis gaat in de ovaria van *Vps13* vliegen hebben we gebruik gemaakt van elektronenmicroscopie. Daarmee ontdekten we een specifieke membraan-structuur die afhankelijk is van Vps13, aangezien de structuur vrijwel geheel afwezig is in *Vps13* vliegen. Alle data bij elkaar suggereren dat Vps13 een cel-autonome rol speelt tijdens de ontwikkelingsceldood en belangrijk is voor het goed opruimen van de voedingscellen. Ook in dit proces vonden we dat Vps13 een geconserveerde functie heeft, aangezien overexpressie van humaan VPS13A in de *Vps13* mutante vliegen de opeenhoping van voedingscellen kon verminderen. Mogelijk is er ook een probleem met het opruimen van dode cellen in ChAc patiënten door de afwezigheid van VPS13A maar dit zal verder onderzocht moeten worden.

In hoofdstuk zes hebben we gefocust op de functie van het humane VPS13A eiwit en tonen we aan dat VPS13A geassocieerd is met het endoplasmatisch reticulum (ER) en mitochondriën en aanwezig is op verbindingplaatsen tussen het ER en mitochondriën. Binding aan de verschillende organellen in de cel is afhankelijk van specifieke bindingsdomeinen in VPS13A, die we in dit hoofdstuk hebben geïdentificeerd. Daarnaast hebben we laten zien dat een verhoging van vetten in de cel zorgt dat VPS13A van de mitochondriën naar zogenaamde vet of lipide druppels overgaat. Afwezigheid van VPS13A zorgde ervoor dat de lipide druppels in de cellen in aantal en grootte toenamen. Ook vonden we met behulp van elektronenmicroscopie dat lipide druppels accumuleren in speciale cellen in het brein, de glia cellen, van de *Drosophila Vps13* mutante vliegen. Deze data samen impliceren dat VPS13A een rol speelt in de huishouding van lipiden en contactplaatsen tussen membranen.

In conclusie laten de resultaten in dit proefschrift zien dat VPS13A een geconserveerd en multifunctioneel eiwit is met een dynamische lokalisatie en functie in een cel. De data dragen bij aan de kennis over de cellulaire processen waarin VPS13A een rol speelt. Verder onderzoek naar de functies van VPS13A is nodig om de exacte pathofysiologische mechanismes van Chorea-Acanthocytose te kunnen begrijpen en daarmee hopelijk de nodige behandelingen te kunnen ontwikkelen.