

## Summary (Dutch)

## Nederlandse samenvatting

Pontocerebellar Hypoplasie (PCH) is een groep van zeven (PCH1-7) neurodegeneratieve aandoeningen die al start voor de geboorte en zich uit in hypoplasie en atrofie van de hersenen, met nadruk op het cerebellum, de pons, de olijkernen en in mindere mate ook de cerebrale cortex. Patiënten uit alle subtypes hebben centrale motorische stoornissen, progressieve microcefalie, cognitieve defecten en epilepsie. De levensverwachting varieert van sterfte in de neonatale periode tot in de volwassen periode. De meeste patiënten sterven echter tijdens de kinderjaren. Voorafgaand aan de identificatie van de genen verantwoordelijk voor PCH bestond er al een onderverdeling in vijf subtypes, namelijk PCH1-5 [1-3], gebaseerd op voor elk subtype unieke verschijnselen.

PCH1 heeft naast de gemeenschappelijke kenmerken van de PCH groep, degeneratie van de spinale motorische voorhoorncellen welke histologisch sterk lijkt op de Spinale Musculaire Atrofie groep, overigens zonder de moleculair-genetische afwijkingen van deze groep van aandoeningen. De hypotonie en spierzwakte die gezien wordt bij PCH1 berust op deze degeneratie [4].

PCH2 is het meest voorkomende PCH subtype en uit zich in motorische stoornissen, zoals chorea en extrapiramidale dyskinesieën, naast wisselende spasticiteit [5]. PCH3 is slechts beschreven in drie families en kenmerkt zich door cerebellaire atrofie, een korte gestalte, hypotonie en primaire opticus atrofie [6]. PCH4 en PCH5 worden getypeerd door een prenatale aanvang van de symptomen, zoals polyhydramnions, contracturen en een ernstige neonatale clonus. De olijkernen hebben een immature C-vorm zonder undulaties en de ventrale pons en het cerebellum zijn zwaarder getroffen dan bij de andere subtypen [7]. Sinds 2007 zijn er twee subtypen bijgekomen. In 2007 werd PCH6 voor het eerst beschreven als een encefalopathie, met ademhalingsketen defecten en een verhoogd lactaatgehalte in de liquor cerebrospinalis. [8]. PCH7 werd onlangs beschreven in een patiënt met PCH met daarnaast bestaande genitale afwijkingen, leidend tot progressieve involutie van de mannelijke genitalia [9].

Met behulp van koppelingsonderzoek hebben wij in 2008 de genetische basis in een grote familie met PCH2 kunnen vinden. Deze Nederlandse familie was onderdeel van een genetisch gesloten gemeenschap waar PCH al eerder was beschreven [1]. Alle tien getroffen familieleden waren homozygote dragers van de c.919G>T (p.A307S) mutatie in het tRNA splicing endonuclease subunit 54 gen (*TSEN54*). *TSEN54* mutaties werden ook gevonden in 37 andere PCH2 patiënten. Twee andere PCH2 patiënten (zonder *TSEN54* mutaties) bleken mutaties in twee andere tRNA splicing endonuclease subunit genen te hebben, namelijk in *TSEN2* en *TSEN34*. Na sequentie analyse van deze genen in PCH1 en PCH4 patiënten, bleek dat *TSEN54* mutaties ook werden gevonden in PCH4.

Deze PCH4 mutaties zijn ernstiger dan de mutaties die bij PCH2 patiënten waren gevonden; twee PCH4 patiënten waren compound heterozygoot voor een nonsense mutatie (een mutatie die resulteert in een stop-codon) plus een aminozuursubstitutie en bij één PCH4 patiënt werden drie aminozuursubstituties in *TSEN54* gevonden. Ook fenotypische verschillen tussen PCH2 en PCH4 zijn gradueel, met de ernstiger vormen bij PCH4. Zo blijkt bij neuropathologische vergelijking van PCH2 en PCH4 dat de cerebellaire folia nagenoeg afwezig zijn bij PCH4, terwijl bij PCH2 het cerebellum minder folia heeft dan normaal, maar meer dan bij PCH4 worden gevonden. De ernstigere mutaties bij PCH4 patiënten in combinatie met een ernstiger fenotype met perinatale complicaties, zoals polyhydramnions en contracturen, ondersteunen de hypothese dat het verlies van TSEN functie het onderliggende ziektemechanisme is in PCH2 en PCH4. *In situ* hybridisatie toonde hoge expressie van *TSEN54* mRNA in neuronen van de pons, de nucleus dentatus en de olijfkernen tijdens het tweede trimester van de zwangerschap.

Het tRNA splicing endonuclease complex is betrokken bij de splicing van intron-bevattende tRNAs. Slechts een kleine minderheid (6%) van de tRNA's hebben een intron. Bij een andere studie resulteerde *in vitro* knockdown van *TSEN2* in een accumulatie van mRNA 3'uiteindes van twee verschillende transcripten; daarom wordt gedacht dat het TSEN complex tevens betrokken is bij mRNA 3'eindformatie [10]. Northern blot analyse van tRNA-Tyrosine (Tyr) in fibroblasten van PCH2 patiënten met een *TSEN54* mutatie laten geen maturatie defect zien. Dit suggereert dat *TSEN54* mutaties *in vitro* niet tot een tRNA maturatie probleem leiden, tenminste niet in fibroblasten. Een compleet maturatie defect in tRNA-Tyr werd niet verwacht, omdat een volledig niet-functionerend TSEN complex waarschijnlijk niet verenigbaar is met het leven. De vraag naar het mechanisme dat *in vivo* leidt tot de ziekteverschijnselen bij *TSEN54* mutaties is dus nog niet éénduidig beantwoord.

Mutaties in het gen dat codeert voor het mitochondriale arginine-tRNA synthetase (RARS2) liggen ten grondslag aan PCH6. RARS2, is ook betrokken bij het verwerken van tRNAs. RARS2 speelt een rol bij de aminoacylatie van Arginine (Arg) aan het mitochondriale-tRNA-Arg. In *RARS2* gemuteerde fibroblasten, werd een reductie van mt-tRNA-Arg waargenomen. Toch was deze residuele mt-tRNA-Arg bijna volledig geaminoacyleerd, wat suggereert dat het niet-geaminoacyleerde mt-tRNA-Arg instabiel is [8].

Na identificatie van de genen in PCH2, PCH4 en PCH6 werd door ons een uitgebreide studie verricht naar de correlatie tussen genotype en fenotype bij alle 169 patiënten. Dit materiaal werd in ons laboratorium onderzocht op PCH genen. In deze 169 patiënten hebben wij de *TSEN* genen (*TSEN54*, 2, 34, 15), het *RARS2* gen, en het Vaccinia Related Kinase 1 gen (*VRK1*) gescreend op mutaties [8]. Mutaties in *VRK1* zijn geassocieerd met een atypische variant van PCH1 [11]. Analyse van die patiënten waarvan ook klinische informatie en Magnetic Resonance Imaging (MRI) beschikbaar

was, bevestigde dat de c.919G>T (p.A307S) *TSEN54* mutatie sterk geassocieerd is met extrapiramidale dyskinesieën en/of spasticiteit en progressieve microcefalie, zoals eerder was beschreven bij PCH2 [1]. Bovendien is de c.919G>T (p.A307S) mutatie geassocieerd met een platte libelachtige vorm van de cerebellaire hemisferen met relatieve sparing van de vermis. Patiënten met de meer ernstige mutaties in *TSEN54* (nonsense of splice site mutaties) in combinatie met een aminozuursubstitutie hebben een PCH4 fenotype. Deze grote patiëntengroep maakte het mogelijk te concluderen dat er bij PCH4 sprake is van meer supratentoriële betrokkenheid met daarbij een ernstige vertraging in de maturatie van de neocortex, in combinatie met een relatief verhoogde hoeveelheid liquor. In een minderheid van de PCH patiënten werden mutaties gevonden in *RARS2* en *TSEN2*. In 63 patiënten werden geen mutaties gevonden; maar in deze restgroep was van slechts 13 patiënten voldoende klinische informatie beschikbaar om de klinische diagnose PCH te ondersteunen. Ergo kunnen mutaties in andere genen of in niet-coderende regio's van *TSEN* genen ten grondslag liggen aan PCH bij deze patiënten.

Identificatie van de genen voor PCH2 en PCH4 stelde ons ook in staat om PCH5 te bestuderen. In 2006 werd PCH5 beschreven in één familie als een apart subtype van PCH met intra-uteriene convulsies en degeneratie van de cerebellaire vermis als onderscheidend kenmerk. Na bestudering van onze grote groep PCH4 patiënten stelden we vast dat sommige PCH4 patiënten, net als de PCH5 patiënten, deze ernstige betrokkenheid van de vermis hebben en dat de neonatale clonus die bij PCH4 gezien werd vergelijkbaar is met de intra-uteriene convulsies die PCH5 patiënten hebben. DNA analyse van deze PCH5 familie toonde aan dat het mutatie-profiel ook vergelijkbaar is met het mutatie-profiel bij PCH4. De proband van de PCH5 familie was compound heterozygoot voor een splice site mutatie en de c.919G>T (p.A307S) mutatie in *TSEN54*. PCH5 en PCH4 zijn dus identieke aandoeningen.

Met het oog op het ziektemechanisme dat tot PCH leidt, hebben wij een zebrawismodel voor PCH ontwikkeld. Zebrawisembryo's lieten 24 uur na de bevruchting een sterke *tsen54* expressie zien in de hersenen, voornamelijk in het telencephalon en de "mid-hindbrain boundary", vergelijkbaar met hoge expressie van *TSEN54* in het telencephalon en metencephalon in een humaan embryo van 8 weken. Downregulatie van of *tsen54* of *rars2* met antisense oligonucleotiden resulteerde in hersenhypoplasie met het verlies van de "mid-hindbrain boundary" en een verhoogde celdood. Dit fenotype kon gedeeltelijk worden gered door het co-injecteren van respectievelijk het humane *TSEN54* en *RARS2* mRNA. De expressie van ontwikkelingsmarkers zoals fibroblast growthfactor (*fgf8*) en orthodenticle homeobox 2 (*otx2*) toonde expressie in de juiste regio's in de antisense-behandelde vis. Het normale patroon van deze ontwikkelingsmarkers en de verhoogde celdood suggereren dat PCH een neurodegeneratieve ziekte is en geen migratiestoornis. Kiembaan-knockout-vissen waren geïsoleerd uit een *N*-methyl-*N*-nitrosourea (ENU) mutant zebrawis-database. Zebrawissen, homozygoot voor een *tsen54* nonsense mutatie, vertoonden vroeg in de

ontwikkeling geen duidelijke stoornissen in de ontwikkeling van de hersenen, maar stierven 9 dagen na de bevruchting, waaruit blijkt dat TSEN54 essentieel is om te overleven. We gaan ervan uit dat stabiele *tSEN54* knockout-vissen in de eerste week overleven dankzij de aanwezigheid van het maternale *TSEN54* mRNA en/of tRNA's afkomstig van de eicel.

Wij hebben ook bekeken of het TSEN complex betrokken is bij mRNA 3'eindformatie [10]. Dus ofwel een verminderde tRNA splicing, ofwel een verminderde mRNA 3'eindformatie zou verantwoordelijk kunnen zijn voor de ontwikkeling van PCH, of beide. Om onderscheid te kunnen maken tussen deze mogelijkheden analyseerden we de tRNA splicing activiteit van PCH2 fibroblasten in een *in vitro* assay. Nucleaire extracten van PCH2 en PCH4 patiënten vertoonden verminderde tRNA splicing. PCH4 extracten bleken minder activiteit dan PCH2 extracten te vertonen. Dit is in overeenstemming met de mutaties in deze aandoeningen; aminozuursubstituties en nonsense mutaties versus homozygote aminozuursubstituties. We hebben echter geen bewijs kunnen vinden voor verminderde mRNA 3'eindformatie in PCH *in vitro* en *in vivo*.

Samengevat kon door ons worden aangetoond dat mutaties in *TSEN54*, *TSEN2* en *TSEN34* kunnen resulteren in PCH2, PCH4 en PCH5. Ook toonden we aan dat het verlies van TSEN54 functie verantwoordelijk is voor een fenotype van neurodegeneratie, waarschijnlijk ten gevolge van een verminderd tRNA splicing metabolisme.

## Referenties

1. Barth PG: Pontocerebellar hypoplasias. An overview of a group of inherited neurodegenerative disorders with fetal onset. *Brain Dev* 1993, 15:411-422.
2. Barth PG: Pontocerebellar hypoplasia -- how many types? *Eur J Paediatr Neurol* 2000, 4:161-162.
3. Patel MS, Becker LE, Toi A, Armstrong DL, Chitayat D: Severe, fetal-onset form of olivopontocerebellar hypoplasia in three sibs: PCH type 5? *Am J Med Genet A* 2006, 140:594-603.
4. Norman RM: Cerebellar hypoplasia in Werdnig-Hoffmann disease. *Arch Dis Child* 1961, 36:96-101.
5. Barth PG, Vrensen GF, Uylings HB, Oorthuys JW, Stam FC: Inherited syndrome of microcephaly, dyskinesia and pontocerebellar hypoplasia: a systemic atrophy with early onset. *J Neurol Sci* 1990, 97:25-42.
6. Rajab A, Mochida GH, Hill A, Ganesh V, Bodell A, Riaz A, Grant PE, Shugart YY, Walsh CA: A novel form of pontocerebellar hypoplasia maps to chromosome 7q11-21. *Neurology* 2003, 60:1664-1667.
7. Namavar Y, Barth PG, Kasher PR, van Ruissen F., Brockmann K, Bernert G, Writzl K, Ventura K, Cheng EY, Ferriero DM et al.: Clinical, neuroradiological and genetic findings in pontocerebellar hypoplasia. *Brain* 2011, 134:143-156.

8. Edvardson S, Shaag A, Kolesnikova O, Gomori JM, Tarassov I, Einbinder T, Saada A, Elpeleg O: Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am J Hum Genet* 2007, 81:857-862.
9. Anderson C, Davies JH, Lamont L, Foulds N: Early Pontocerebellar Hypoplasia with Vanishing Testes: A New Syndrome? *Am J Med Genet Part A* 2011, 155:667-672.
10. Paushkin SV, Patel M, Furia BS, Peltz SW, Trotta CR: Identification of a human endonuclease complex reveals a link between tRNA splicing and pre-mRNA 3' end formation. *Cell* 2004, 117:311-321.
11. Renbaum P, Kellerman E, Jaron R, Geiger D, Segel R, Lee M, King MC, Levy-Lahad E: Spinal muscular atrophy with pontocerebellar hypoplasia is caused by a mutation in the VRK1 gene. *Am J Hum Genet* 2009, 85:281-289.