

## Samenvatting

Het zogenoemde “*rough coat*”-fenotype (*rc*) van de muis is ontstaan door een spontane mutatie in de veelgebruikte laboratoriumstam C57BL/6J. De mutatie werd in 1966 ontdekt (Dickie, 1966) en in 1977 gelokaliseerd op chromosoom 9 (Eicher and Reynolds, 1977). In 2004 richtte de groep van Dr. Csiszar zich op de identificatie van het gen dat verantwoordelijk is voor het *rc*-fenotype. Aanvankelijk hadden zij de hypothese dat het gemuteerde gen een allel zou zijn van het *loxl*-gen (*Lysyl oxidase like*), dat codeert voor een component van de extracellulaire matrix (Hayashi et al., 2004). Het bleek echter dat *rc* onafhankelijk was van *loxl*. Hierna bleef de interesse in de identificatie van de *rc*-mutatie bestaan. Het belangrijkste doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was het beantwoorden van twee vragen rond the *rc*-mutatie: wat is de exacte locatie van de mutatie in het genoom van de muis en welke mechanismen liggen ten grondslag aan het complexe *rc*-fenotype? Om deze vragen te beantwoorden hebben wij verschillende genetische strategieën gebruikt om het gemuteerde gen te identificeren en de functie ervan te onderzoeken. Hierbij hebben gebruik gemaakt van twee modelorganismen, de muis en de zebra vis. Naast de “*in vivo*”-experimenten in deze modelorganismen werden tevens “*in silico*”-studies uitgevoerd om de functie van het overeenkomstige gen in de mens te voorspellen.

Om de *rc*-mutatie te identificeren hebben wij eerst in detail het fenotype van de “*rough coat*”-muizen onderzocht en de kenmerken vastgesteld op grond waarvan de positionele klonering van het gemuteerde gen kon worden uitgevoerd. Dit onderzoek is beschreven in hoofdstuk 2. Jonge muizen met de *rc*-mutatie ontwikkelden een cyclische en progressieve haaruitval en gedurende het eerste jaar ontstonden er bij 63% van de dieren zweren op de huid aan de onderzijde van de nek. Histologisch onderzoek van de huid liet zien dat er een vergroting was van de klieren die een vette substantie (sebum) uitscheiden dat dient om de huid en het haar te smeren. Tevens was het aantal cellen dat betrokken is bij de sebum-productie (sebocyten) sterk verhoogd. De zweren in de huid vertoonden typische kenmerken van chronische wonden. Eerder was beschreven dat het *rc*-locus genetisch is gekoppeld met twee microsatelliet-markers, *D9Mit162* op 49.954 Mb en *D9Mit104* op 65.953 Mb (Hayashi et al., 2004). Door gebruik te maken van twee verschillende muizenstammen en gepubliceerde zowel als nieuwe microsatelliet-polymorfismen konden we de chromosomale positie van het *rc*-locus in kaart brengen. Vervolgens werd door sequentieanalyse een puntmutatie gevonden in de coderende regio van een nieuw gen (ENSMUSG00000070305) gelegen op 44.989~45.009 Mb. De mutatie is een G→A-transitie in exon 3 van dit gen, resulterend in een Arg100→Gln-substitutie (R100Q). Uit databaseanalyses bleek dat er in de muis minstens twee verschillende transcripten bestaan van dit gen. Het langste transcript bestaat uit 6 exonen en codeert voor een polypeptide van 237 aminozuren, terwijl het kortere transcript uit 2 exonen bestaat en codeert voor een polypeptide van 96 aminozuren. De voorspelde functie van het eiwit is dat het een celadhesiemolecuul betreft, homoloog met Myelin

Protein Zero (MPZ), Myelin Protein Zero-like 1 (MPZL1) en Myelin Protein Zero-like 2 (MPZL2, ook bekend als EVA1 voor Epithelial V-like Antigen 1). Wij hebben het nieuwe gen daarom *Mpzl3* (Myelin Protein Zero-like 3) genoemd. MPZ, MPZL1, MPZL2 en MPZL3 behoren alle tot een geconserveerde eiwitfamilie, genaamd Myelin Protein Zero. Het belangrijkste kenmerk van deze eiwitfamilie is dat alle leden V-type-immunoglobulinedomeinen en myeline-Po-domeinen bevatten. Wij hebben het expressiepatroon van *Mpzl3* geanalyseerd zowel op transcriptniveau door middel van reverse-transcriptase-PCR als op eiwitniveau door middel van Western-blot-analyse. Hieruit bleek dat *Mpzl3* tot expressie komt in alle onderzochte weefsels en organen, waaronder de hersenen, de slokdarm, de darm, de nier, de lever, de milt, het hart, de longen, het spierweefsel en de huid. Coupes van huidweefsel werden nader onderzocht door middel van immunofluorescentie-analyse met een polyclonaal antilichaam specifiek voor het extracellulaire domein van het MPZL3-eiwit. Hiermee kon het MPZL3-eiwit aangetoond worden in de keratinocyten van de huidepidermis, in de haarwortels en in de sebocyten van de sebum-producerende klieren. Bij hoge vergroting was te zien dat de kleuring het sterkste was rond de plasmamembraan van de cellen. Dit is in overeenstemming met de voorspelde functie van het eiwit als een transmembraaneiwit betrokken bij celadhesie. Er was ook kleuring in het cytoplasma aantoonbaar, maar niet in de celkern.

Om meer kennis te vergaren over MPZL3 hebben wij in hoofdstuk 3 de vraag onderzocht of het eiwit alleen in zoogdieren bestaat of dat het een ouder, evolutionair geconserveerd eiwit betreft. Ook waren wij geïnteresseerd in de domeinstructuur van het eiwit en de mogelijke functie in de mens. Daarom hebben wij de beschikbare publieke databasen doorzocht om homologe eiwitten te identificeren en hebben webgebaseerde bioinformaticasoftware toegepast om de domeinstructuur te analyseren. In andere zoogdieren vonden wij eiwitten die op aminozuurniveau 89-96% identiek waren aan MPZL3 van de muis. Ook vonden wij het eiwit in andere gewervelde diersoorten, waaronder de zebra en de kip, met 30 % identiteit op aminozuurniveau. Alle voorspelde orthologe eiwitten van MPZL3 bevatten de myeline-Po-signatuur en de V-type-immunoglobulinedomeinen. Gebaseerd op transcriptsequenties in de UniGene-database van het NCBI komt het humane *MPZL3*-gen tot expressie in diverse organen van de mens. In overeenstemming met onze expressedata van de muis, zijn humane *MPZL3*-transcripten aantoonbaar in hersenen, slokdarm, hart, nier, lever, long, spier en milt. Tevens is er expressie gedetecteerd in bloed en vaatweefsel, in oog, mond en keelholte en het maagdarmkanaal, in lymfeklieren, melkklieren, bijnier, bijschildklier en hypofyse, en in prostaat en testis, alsmede uterus en ovarium. Uit analyse van de microarray-databank van het EMBL-EBI bleek tevens dat *MPZL3* tot expressie komt in dendritische cellen van het humane immuunsysteem, evenals in CD4- en CD8-positieve geheugen- en effector-T-cellen. De R100Q-mutatie die wij geïdentificeerd hadden in de “*rough coat*”-muizen is gelokaliseerd in een regio (“recognition loop”) van het immunoglobulinedomein met bekende functies in T-cell receptoren en bij celadhesie. De homologe MPZ- en MPZL2/EVA1-eiwitten

spelen ook een rol in celadhesie en in de immuunrespons. Bij analyse van de NCBI-database werden verschillende nucleotide-polymorfismen en mutaties in het humane *MPZL3*-gen gevonden, wat erop zou kunnen wijzen dat mensen met homozygote of samengestelde heterozygote mutaties symptomen zouden kunnen ontwikkelen die lijken op de afwijkingen in muizen met de *rc*-mutatie. Om te onderzoeken of het humane *MPZL3*-gen een vergelijkbaar expressiepatroon vertoont in de huid als het overeenkomstige gen in de muis hebben wij een Western-blot-analyse uitgevoerd. In extracten van gekweekte humane huidcellen (een cultuur van primaire fibroblasten) kon een eiwitband met een grootte van 54 kDa aangetoond worden en een zwakkere band van 56 kDa. Deze banden kunnen het resultaat zijn van dimeervorming en/of van post-translationele modificatie van *MPZL3*, dat een molecuulgewicht heeft van 25,98 kDa. Met behulp van indirecte immunofluorescentie konden wij het *MPZL3*-eiwit lokaliseren in vergelijkbare regionen van de humane huid als in de huid van de muis (Cao et al., 2007). Op grond van onze *in silico*-studie kan de hypothese gemaakt worden dat *MPZL3* betrokken zou kunnen zijn bij immuun-gemedieerde erfelijke afwijkingen die gepaard gaan met haaruitval, zoals de ziekten alopecia area of alopecia universalis.

Omdat de *rc*-puntmutatie in *Mpzl3* al ernstige effecten heeft, is het waarschijnlijk dat een volledig verlies van de functie van dit gen (knock-out) zou kunnen leiden tot nog ernstiger afwijkingen en tot een letaal fenotype in de muis. Gezien de tijdsinvestering en de mogelijke uitkomst van een knock-out-experiment in de muis, hebben wij in hoofdstuk 4 besloten om eerst de functie van het *mpzl3*-gen te bestuderen in het zebrafisembryomodel, waarin snelle knock-down-studies mogelijk zijn. Eerst hebben wij de sequentie van het *mpzl3*-gen van de zebrafis onderzocht in de publieke databases en de domeinstructuur van het gecodeerde eiwit geanalyseerd met het webgebaseerde programma EBI-InterProScan. Door middel van fylogenetische analyse met de “neighbor joining”-methode hebben wij de evolutionaire verwantschappen van *mpzl3* met andere genen in het zebrafisgenoom bepaald, waaruit bleek dat *mpz*, *mpzl1*, *eval1* en *scn4b* het meest nauw verwant zijn aan *mpzl3*. Met behulp van kwantitatieve reverse-transcriptase-PCR (qRT-PCR) kon een hoge expressie van *mpzl3* in embryo's worden aangetoond binnen de eerste 5 uur na fertilisatie (waarschijnlijk afkomstig van maternaal RNA), maar tijdens latere ontwikkelingsstadia nam het expressieniveau van *mpzl3* geleidelijk af. Vervolgens hebben wij het expressiepatroon van *mpzl3* verder geanalyseerd door middel van *in situ*-hybridisatie van zebrafisembryo's en -larven. Hierbij werd specifieke expressie waargenomen in de kop en in de neuromastcellen van het zijlijnorgaan van zebrafislarven op de leeftijd van 5 dagen. Om de rol van *mpzl3* tijdens de zebrafisontwikkeling te onderzoeken hebben wij *mpzl3*-mRNA gesynthetiseerd en dit geïnjecteerd in embryo's van het 1- tot 2-celstadium. Wij observeerden een algemene vertraging van de ontwikkeling en een gebogen en verkorte staart of hartoedeem in sommige embryo's. Echter, het meest opvallende en consistente fenotype was de afwezigheid van ogen (anophthalmia). Sommige embryo's vertoonden een afwijkende ontwikkeling van beide ogen en

bij andere ondergingen de ogen een asymmetrische ontwikkeling, waarbij één oog zich normaal ontwikkelde terwijl het andere sterk misvormd of volledig onderontwikkeld was. Vanwege dit onverwachte fenotype besloten wij om het fenotype van de ogen van de muizen met de *rc*-mutatie te inspecteren en vonden hier ook duidelijke oogafwijkingen. Homozygote *rc*-muizen ontwikkelen vaak een oogfenotype dat in lekentermen omschreven zou kunnen worden als troebel of als een witachtige waas over het oog. Soms is één oog aangedaan en soms beide. Het is nog niet onderzocht of de muizen zicht hebben in deze ogen. De aandoening treedt niet eerder op dan na vier maanden.

Om het effect van uitschakeling van de *mpzl3*-genfunctie op de ontwikkeling van zebravisembryo's te onderzoeken hebben wij gebruikt gemaakt van morfolino's, waarmee specifiek de translatie van het *mpzl3*-mRNA geblokkeerd kan worden (knock-down-techniek). De knock-down-embryo's verkregen met twee verschillende morfolino's vertoonden een verminderde overleving, waren immobiel in reactie op een aanrakingsstimulus en vertoonden afwijkingen in het hart- en vaatstelsel. Tevens vertoonden deze embryo's een deficiëntie in de expressie van het *rag1*-gen (recombination activating gene 1, een essentieel gen voor het immuunsysteem) in de thymus. Als controle-experiment kon het knock-down-fenotype opgeheven worden door *mpzl3*-mRNA te injecteren samen met de morfolino. Om inzicht te krijgen in de moleculaire processen die ten grondslag liggen aan het knock-down-fenotype van *mpzl3* hebben wij een preliminaire microarrayanalyse uitgevoerd om de veranderingen in het genexpressiepatroon te onderzoeken op 8 uur na fertilisatie, een tijdstip vóór de zichtbaarheid van de fenotypische afwijkingen. De set van genen die veranderde expressie vertoonde bij beide morfolino's bevatte verschillende genen die een rol spelen bij ontwikkelingsprocessen, waaronder componenten van de Wnt- en Notch-signaalroutes. Deze microarraydata hebben bruikbare aanknopingspunten opgeleverd voor verder onderzoek naar de functie van *mpzl3* in de zebravis- en muis-modelsystemen.

Samenvattend heeft deze studie geleid tot de identificatie van het gen dat verantwoordelijk is voor het "*rough coat*"-fenotype in de muis en heeft aangetoond dat dit gen codeert voor een eiwit van de Myelin Protein Zero-familie, dat wij MPZL3 genoemd hebben. De hypomorfe mutatie in de "*rough coat*"-muizen bleek veroorzaakt te zijn door een aminozuursubstitutie in het geconserveerde immunoglobulinedomein van MPZL3 en resulteerde in verschillende huidafwijkingen. Wij betogen dat mutaties in de humane ortholoog van MPZL3 betrokken kunnen zijn bij immunogemedieerde erfelijke ziekten die gepaard gaan met haaruitval. Daarnaast hebben wij het *mpzl3*-gen in zebravis aangetoond en beschrijven hier de eerste functionele studie van dit gen. Onze overexpressie- en knock-down-experimenten wijzen op een rol voor *mpzl3* bij ontwikkelingsprocessen tijdens de zebravisembryogenese, waarbij, gebaseerd op microarrayanalyse, de Wnt- en Notch signaalroutes mogelijk betrokken zijn. In toekomstige studies zal het zeer interessant zijn om het verband tussen *mpzl3* en deze signaalroutes verder te onderzoeken en om de rol van het gen

bij huidontwikkeling, bij de vorming van myelinscheden en bij het immuunsysteem verder te ontrafelen met gebruik van zebra-vis- en muis-modellen.

