

## Nederlandse samenvatting

### De ziekte van Alzheimer

De ziekte van Alzheimer (Alzheimer) is de meest voorkomende vorm van dementie. Het wordt gekenmerkt door geheugenproblemen, algehele cognitieve achteruitgang en gedragsveranderingen wat uiteindelijk leidt tot het verlies van lichaamsfuncties en overlijden. In Nederland lijden naar schatting 200.000 mensen aan Alzheimer wat door de langere levensverwachting alleen maar zal stijgen. Er is tot op heden geen medicijn om Alzheimer te genezen of te voorkomen en daarom blijft het van belang therapeutische aangrijpingspunten voor deze ziekte te onderzoeken. De ziekte is voor het eerst beschreven in 1907 door de Duitse neuropatholoog Alois Alzheimer. Hij beschreef een patiënt met geheugenverlies en de bevinding van de typische hersenveranderingen die nu behoren bij het stellen van de diagnose Alzheimer. Deze veranderingen in de hersenen zijn onder meer atrofie van het hersenweefsel en ophoping van de eiwitten amyloid-beta ( $A\beta$ ) en tau. Het tau eiwit, wat belangrijk is voor de structuur van een cel, kan hyperfosforyleren en zich ophopen in de zenuwcel in neurofibrillaire tangles (NFT's) wat leidt tot zenuwceldood. Het  $A\beta$  eiwit hoopt zich op tussen de zenuwcellen in seniele plaques (SP's) en rondom hersenbloedvaten wat cerebrale amyloid angiopathie (CAA) wordt genoemd. De ophoping van  $A\beta$  in SP's leidt niet alleen tot zenuwceldood maar ook tot een ontstekingsreactie in de hersenen. In CAA sterven de gladde spiercellen in de hersenvaatwand af, en vindt er degeneratie van de vaatwand plaats. Dit kan leiden tot hersenbloedingen en verdere en/of snellere cognitieve achteruitgang van Alzheimer patiënten.

### *$A\beta$ productie en afvoer*

Het  $A\beta$  eiwit wordt in elk brein geproduceerd uit het amyloid precursor eiwit (APP). Er ontstaan voornamelijk twee soorten  $A\beta$ ,  $A\beta_{1-40}$  en  $A\beta_{1-42}$ .  $A\beta$  kan met zichzelf een complex vormen waardoor  $A\beta$  aggregaten ontstaan. Vooral  $A\beta_{1-42}$  kan goed met andere  $A\beta$ 's complexen vormen, en het is dan ook deze vorm die we vaker terug vinden bij mensen met Alzheimer.  $A\beta$  aggregaat dan van monomeren, dimeren en oligomeren tot fibrillen die ophopen en microscopisch zichtbaar zijn in de hersenen. Normaal gesproken wordt  $A\beta$  opgeruimd en/of afgevoerd uit de hersenen. Er zijn een aantal enzymen die  $A\beta$  direct afbreken, evenals receptoren die  $A\beta$  via de bloed-hersen barrière vanuit het brein naar het bloed transporteren. Daarnaast is er een derde mechanisme, namelijk afvoer

via de interstitiële vloeistofstroom (IVS). De IVS is een afvoerroute die stoffen, waaronder A $\beta$ , langs de bloedvatwand afvoert naar het lymfesysteem buiten de hersenen. Bij het ouder worden, falen vooral de eerst genoemde mechanismen om A $\beta$  op te ruimen, wat resulteert in aggregatie van A $\beta$  in de hersenen. Het gevolg hiervan is dat meer A $\beta$  moet worden afgevoerd via de IVS. Maar dit kan weer leiden tot een verminderd functioneren van de IVS wat CAA kan veroorzaken aangezien A $\beta$  dan in de vaatwand blijft zitten en zich daar ophoopt.

### *Risicofactoren voor Alzheimer*

In ongeveer 5% van de Alzheimer patiënten zijn mutaties gevonden in genen die betrokken zijn bij de productie van A $\beta$ . Deze patiënten leiden aan een erfelijke vorm van Alzheimer, en omdat ze een verhoogde A $\beta$  productie in het brein hebben krijgen ze Alzheimer op een jongere leeftijd. Naast ouderdom als belangrijkste risicofactor voor het ontwikkelen van niet-erfelijke Alzheimer, is de meest voorkomende genetische risicofactor voor het ontwikkelen van niet-erfelijke Alzheimer het gen voor apolipoproteïne E (ApoE). Dit gen kan in drie vormen aanwezig zijn, ApoE2, ApoE3 en ApoE4, waarbij ApoE4 een hoog risico geeft op het ontwikkelen van Alzheimer. Het ApoE eiwit is belangrijk in het vervoer van vetten en cholesterol door het lichaam en is ook in de hersenen aanwezig. ApoE bindt daar aan A $\beta$  en de gevormde ApoE-A $\beta$  complexen kunnen door cellen worden opgenomen voor afbraak of afgifte aan het bloed via de bloed-hersen barrière. De verschillende vormen van ApoE verschillen in hun capaciteit om A $\beta$  te binden en te verwijderen uit de hersenen.

Naast de ophoping van A $\beta$  in het brein, zijn ook leefstijlfactoren een belangrijke risicofactor voor Alzheimer. Verschillende hart- en vaatziektes, zoals hypertensie, en vasculaire dysfunctie leveren een belangrijke bijdrage aan het ontstaan en de verergering van Alzheimer. Het onderzoeken van vasculaire therapeutische aangrijpingspunten met betrekking tot Alzheimer is dan ook belangrijk.

### **Transglutaminases**

Transglutaminases zijn een groep calcium-afhankelijke enzymen die betrokken zijn bij verschillende post-translationele modificaties van eiwitten. Een belangrijke functie is het katalyseren van een covalente binding (cross-link) tussen eiwitten door het cross-linken van een glutamine aminozuur en een lysine aminozuur. Dit leidt tot zeer stabiele eiwit-eiwit verbindingen. Eén van de meest bestudeerde transglutaminases, ook onderzocht

in dit proefschrift, is weefsel transglutaminase (wTG) wat in het hele lichaam tot expressie komt. Het is betrokken bij verschillende processen zoals inflammatie, celmigratie en –adhesie en kan ook functioneren als een signaaltransductie eiwit. Een belangrijke rol van wTG is het cross-linken van extracellulaire matrix (ECM) eiwitten zoals fibronectine en laminine. Dit gebeurt bijvoorbeeld in bloedvaten als reactie op veranderde bloedstroom en leidt tot de benodigde herstructurering van de matrix. Onderzoek heeft aangetoond dat wTG in de vaatwand actiever wordt bij het ouder worden. Dit kan leiden tot verhoogd cross-linken van de ECM resulterend in vaatstijfheid en daardoor verminderde bloedstroom. Ook is wTG betrokken bij verschillende ziektes. In nier- en longfibrose bijvoorbeeld is er verhoogde cross-link activiteit van wTG aanwezig. De ECM wordt hierdoor meer gecross-linkt, wat resulteert in fibrose. Uit onderzoek is ook gebleken dat wTG een grote rol kan spelen in neurodegeneratieve ziektes zoals Alzheimer.

#### *wTG in Alzheimer*

In Alzheimer breinen is de hoeveelheid en activiteit van wTG verhoogd en ook zijn er verhoogde concentraties van de wTG specifieke cross-link in de cerebrospinale vloeistof van Alzheimer patiënten gevonden vergeleken met controles. Deze aanwezigheid correleerde met de cognitieve achteruitgang van deze patiënten. Eerder onderzoek, onder andere van onze groep, toonde aan dat in de breinen van Alzheimer patiënten wTG en door wTG gevormde cross-links aanwezig waren in de A $\beta$  depositie in de SP's van AD patiënten. Verder is al aangetoond dat wTG A $\beta$  *in vitro* kan cross-linken tot onafbreekbare oligomeren. Dit geeft aan dat wTG een rol kan spelen bij de formatie van SP's in het AD brein. In CAA daarentegen, waren wTG en de cross-links wel geassocieerd met de laesie maar niet met de A $\beta$  depositie zelf. Deze studies geven aan dat wTG betrokken kan zijn bij de formatie van zowel SP's als CAA, maar mogelijk een andere rol speelt in beide histopathologische laesies.

Indirect zou wTG ook de aggregatie van A $\beta$  kunnen beïnvloeden door het cross-linken van eiwitten die bij A $\beta$  ophoping betrokken zijn, zoals ApoE. Eiwitten uit de ApoE familie, zoals ApoA en ApoB zijn namelijk substraten voor wTG.

Concluderend is duidelijk dat wTG een belangrijke rol zou kunnen spelen in het ontstaan van de eiwitaggregaties in het brein, zowel direct als indirect.

#### *Factor XIIIa*

Een andere transglutaminase die in dit proefschrift beschreven wordt, is Factor XIIIa (FXIIIa). FXIIIa speelt een cruciale rol in de laatste stap van de bloedstollingcascade. Bij een verwonding wordt een bloedprop gevormd die voornamelijk bestaat uit fibrine, waarbij FXIIIa de fibrine moleculen aan elkaar cross-linkt. Hierdoor ontstaat een sterke bloedprop die niet gemakkelijk af te breken is en zo een bloeding stopt. FXIIIa is voornamelijk in het bloed aanwezig, maar wordt onder meer ook in monocyt/macrofagen en osteoblasten aangetroffen. FXIIIa heeft dan ook niet alleen een functie in bloedstolling, maar is ook betrokken bij wondgenezing, botaanmaak en celmigratie en -proliferatie. Ook is er een mutatie gevonden in het gen voor FXIIIa wat geassocieerd wordt met hersenbloedingen en Alzheimer. Aangezien CAA verminderde functie van de bloed-hersen barriere kan veroorzaken, kunnen er bloedeiwitten de hersenen in lekken. Maar of dit in het geval van FXIIIa ook gebeurt en of FXIIIa een rol speelt in het ontstaan en/of de ontwikkeling van Alzheimer, was nog niet duidelijk.

### **Doelen en resultaat van het onderzoek**

In dit proefschrift zijn we dieper ingegaan op de relatie tussen transglutaminases en CAA. Gezien de klinische impact van CAA bij Alzheimer en de aanwijzingen voor de betrokkenheid van wTG in CAA, onderzochten we in **Hoofdstuk 2** de aanwezigheid van wTG en wTG activiteit in breincoupees van Alzheimer patiënten en patiënten met een erfelijke vorm van CAA. In een vroeg stadium van CAA zagen we verhoogde wTG expressie die colocaliseerde met de A $\beta$  depositie in de vaatwand. Mogelijk is wTG hier betrokken bij de aggregatie van A $\beta$ . Echter, in een eind-stadium van CAA, toonden we aan dat wTG en de cross-links niet meer in de A $\beta$  depositie aanwezig zijn, maar in twee ringen rondom de A $\beta$  depositie. In twee vergelijkbare ringen waren de belangrijke ECM eiwitten fibronectine en laminine aanwezig die colocaliseerden met wTG. Dit suggereert dat wTG deze ECM eiwitten cross-linkt, rondom het vat. Mogelijk leidt dit tot vaatverstijving en daardoor verminderde afvoer van A $\beta$  via de IVS. Echter, barriere formatie kan ook een beschermingsmechanisme zijn voor verdere schade aan het bloedvat. Deze resultaten suggereren dat wTG in begin- en eindfasen van CAA een verschillende rol heeft in CAA ontwikkeling. Ondanks de afwezigheid van wTG cross-links in de A $\beta$  depositie in de eindfase, was er wel *in situ* transglutaminase activiteit in de A $\beta$  depositie aanwezig. Dit duidt erop dat er mogelijk ook een andere TG een rol speelt in CAA. Een goede kandidaat daarvoor is de bloedtransglutaminase FXIIIa, aangezien CAA leidt tot een verminderde bloed-hersen barrière en er eiwitten uit het bloed in de

vaatwand kunnen lekken. Eerder onderzoek liet al zien dat het FXIIIa substraat fibrine, die in het bloed voorkomt, ook in CAA aanwezig is. We hebben daarom in **Hoofdstuk 3** onderzocht of FXIIIa in CAA aanwezig is. Inderdaad lieten we met (immuno)histochemische kleuringen zien dat FXIIIa en FXIIIa activiteit aanwezig zijn in CAA. *In vitro* toonden we aan dat FXIIIa bindt aan A $\beta$  en complexen vormt onafhankelijk van de cross-link activiteit van FXIIIa. Incubatie van deze complexen op gladde spiercellen (de cellen die in de vaatwand zitten en *in vivo* doodgaan door A $\beta$ ) liet zien dat het de cellen beschermt tegen A $\beta$ -geïnduceerde celdood. Uit deze studie concludeerden we dat FXIIIa unieke complexen vormt met A $\beta$  wat een belangrijke rol kan spelen in de ophoping van A $\beta$  in de vaatwand.

Een belangrijk kenmerk van in de vroege fase van CAA is het doodgaan van de gladde spiercellen in de vaatwand, waarschijnlijk door de toxiciteit van A $\beta$ . ApoE, de belangrijkste A $\beta$  chaperone, speelt niet alleen een rol in binding en aggregatie van A $\beta$ , maar beschermt ook gladde spiercellen tegen A $\beta$ -geïnduceerde celdood. Dit roept de vraag op of ApoE wellicht structureel veranderd is en daardoor in CAA geen beschermende functie meer heeft. Aangezien wTG aanwezig is in de vaatwand in de vroege fase van CAA en bekend is dat wTG leden uit de apolipoproteïne familie kan cross-linken, testten we in **Hoofdstuk 4** de hypothese dat wTG ApoE modificeert door te cross-linken en daarmee ApoE's beschermende functie vermindert. Inderdaad toonden we *in vitro* aan dat wTG ApoE kan cross-linken wat leidt tot multimeren van ApoE. Blootstelling van gladde spiercellen aan A $\beta$  liet een verhoogde uitscheiding van zowel wTG als ApoE zien. Ook bleek dat blootstelling van deze cellen aan een combinatie van A $\beta$  en normaal ApoE bescherming gaf tegen A $\beta$ -gedieerde celdood, terwijl blootstelling aan A $\beta$  samen met gecross-linkt ApoE geen bescherming (meer) bood. Dus, we concluderen dat in CAA wTG en ApoE verhoogd aanwezig kunnen zijn in de vaatwand, wat leidt tot wTG-gedieerd cross-linken van ApoE tot een niet functionerend ApoE eiwit. De verminderde beschermingsfunctie van ApoE zou een verklaring kunnen zijn voor de celdood in CAA.

Om de rol van wTG in CAA verder te kunnen onderzoeken, zijn diermodellen nodig. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 5** in twee muismodellen voor Alzheimer de locatie van wTG en wTG activiteit onderzocht en vergeleken met de humane situatie. We gebruikten zowel het APP/PS1 muis model, wat op jonge leeftijd A $\beta$  depositie laat zien wat snel vermeerderd en het APP23 model waarbij A $\beta$  depositie pas op latere leeftijd begint en zich langzamer ontwikkeld. We zagen dat wTG en wTG activiteit in

beide muismodellen aanwezig waren in zowel de SP's, in astrocyten om de SP's heen en in CAA al vanaf het begin van de ontwikkeling van de pathologie. Echter, de distributie van wTG in de muizen verschilde van wat we eerder in humaan Alzheimer weefsel hebben gezien. Daarom concluderen we uit deze studie dat wTG belangrijk lijkt vanaf het begin van A $\beta$  depositie, maar dat de resultaten in de muizen niet goed vertaald kunnen worden naar de humane situatie.

In **Hoofdstuk 6** worden de gevonden resultaten bediscussieerd. Uit dit proefschrift blijkt dat de transglutaminases wTG en FXIIIa beide op verschillende fronten een rol kunnen spelen in de ontwikkeling van CAA. In beginfasen van de pathologie kan blootstelling van de gladde spiercellen aan A $\beta$  leiden tot verhoogde wTG uitscheiding. Dit kan leiden tot het cross-linken van ApoE en daarmee tot verminderde bescherming tegen A $\beta$ -geïnduceerde celdood. Ook is wTG mogelijk betrokken bij het cross-linken van ECM eiwitten wat kan bijdragen aan herstructurering van de vaatwand. Verder onderzoek moet uitwijzen wat de gevolgen zijn voor het ontstaan of de ontwikkeling van CAA. De verregaande vaatwand degeneratie in CAA leidt tot lekkage van de bloed-hersen barriere, waardoor FXIIIa in de vaatwand kan lekken. Vervolgens kan FXIIIa complexen vormen met A $\beta$ , en op die manier bijdragen aan de depositie in de vaatwand. Het vergt meer onderzoek om de exacte rol en de consequenties van zowel wTG en FXIIIa activiteit in CAA uit te zoeken, evenals in welk stadium van het pathologieproces deze enzymen een rol spelen. Helaas zijn de in dit proefschrift beschreven muismodellen niet toereikend om de volledige rol van TG's in Alzheimer te bestuderen. Andere modellen, zowel *in vitro* als *in vivo*, moeten worden gezocht om de gehele rol van TG's in CAA verder te onderzoeken en te inventariseren of TG activiteit en/of substraatbinding aangrijpingspunten zijn voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën ter voorkoming en/of bestrijding van de ziekte van Alzheimer.