



Appendices

Summary

Samenvatting

Dankwoord

Curriculum Vitae

List of publications

Summary

Alzheimer's Disease

Alzheimer's Disease (AD) is the most common form of dementia. AD is characterised by memory deficits, cognitive decline and behavioural changes that ultimately lead to loss of body functions and death. AD affects 11% of all people above the age of 65, and 32% of all people above the age of 85. Unfortunately, drugs currently on the market for AD can only relieve symptoms but cannot cure or prevent the disease. Diagnosis of AD during life is based on clinical and neurological investigations such as neuropsychological tests, cerebrospinal fluid analysis and neuroimaging; however, the definite diagnosis can still only be made post-mortem by the histological detection of different protein aggregates, i.e. intraneuronal neurofibrillary tangles consisting of accumulation of the hyperphosphorylated tau protein as well as senile plaques and cerebral amyloid angiopathy both consisting of the accumulated amyloid- β protein in the brain parenchyma and blood vessel walls, respectively. Accumulation of A β leads to cell death and inflammation. In CAA A β deposition results in smooth muscle cells death and vessel wall degeneration. This may lead to haemorrhages and/or increased cognitive decline of patients.

A β production and clearance

A β is a 4 kDa protein cleaved from the amyloid precursor protein (APP) and is present mainly in two forms: A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂. A β can interact with itself forming A β aggregates. A β ₁₋₄₂ is more prone to aggregate and is also more prominently present in AD brains. A β self-aggregates from monomers and dimers to larger oligomers ultimately forming large mature fibrils with β -pleated sheet conformation. Of these, the dimer and oligomeric A β are thought to be the most toxic and related to AD. A β is cleared from the brain by enzymatic degradation, as well as via receptor-mediated transport across the blood-brain barrier (BBB). Thirdly, A β can be cleared via the interstitial fluid (ISF) drainage that transports A β alongside the vessel walls to the peripheral lymph nodes. Especially the first two clearance mechanisms fail with age, resulting in a higher burden of A β clearance via the ISF. This may compromise ISF function and thereby increase A β deposition in the vessel walls, leading to CAA.

Risk factors for AD

Over 90% of AD cases are sporadic, non-familial, late-onset cases, where the strongest risk factor is age. However, several genetic risk factors, accounting for ~5% of early-onset (familial) AD, are described that increase A β production in the brain. The strongest common genetic variant that is associated with sporadic, late-onset AD is the ApoE gene coding for the plasma protein apolipoprotein E (ApoE). The ApoE gene can be present in three alleles, ϵ 2, ϵ 3 and ϵ 4 with ϵ 4 strongly associated with an increased risk on the development of AD. The ApoE protein is important in transport of lipids and cholesterol in

the body and can bind A β in the brain. ApoE-A β complex formation leads to internalisation and degradation of A β by cells or isoform-dependent transport across the BBB. Apart from A β aggregation, life style factors such as cardiovascular diseases are risk factors for developing or aggravating AD, highlighting the importance of studying therapeutical targets for AD that improve vascular functioning.

Transglutaminases

Transglutaminases (TGs) are a group of Ca²⁺-dependent enzymes that catalyse post-translational modifications of proteins including amine incorporation into proteins, deamidation and the formation of stable protein complexes by cross-linking of glutamine and lysine residues. Tissue transglutaminase (tTG) is the most studied TG and is present throughout the body. It can be upregulated by specific signalling pathways involved in cellular stress or tissue damage, is involved in inflammatory processes, cell migration and adhesion, and can function as a signal transduction protein. An important role of tTG is the cross-linking of extracellular matrix (ECM) proteins such as fibronectin and laminin. This process is important in matrix stabilisation and thereby wound healing and angiogenesis. Furthermore, tTG-mediated ECM cross-linking is important in remodelling of blood vessel walls in response to changes in blood flow. With age, tTG activity is increased in the vessel wall, which may lead to increased ECM cross-linking and subsequent vessel wall stiffness and decreased blood flow. In addition, tTG is involved in fibrosis, e.g. kidney and lung fibrosis where increased tTG cross-link activity of ECM proteins results in fibrosis. Moreover, tTG has been implicated in neurodegenerative diseases, such as AD.

tTG in AD

In AD brains, the presence and activity of tTG is increased and significantly elevated tTG levels have been reported in the cerebrospinal fluid of AD patients compared to controls. Moreover, the level of the tTG cross-link was significantly elevated in the cerebrospinal fluid of AD patients and a correlation between these cross-links in grey matter and cognitive impairment in AD patients was observed. Previous studies, including by our group, demonstrated the presence of tTG and cross-links in SPs in post-mortem brains of AD patients. As other studies demonstrated the capability of tTG to induce oligomerisation of A β *in vitro*, this suggests that tTG can cross-link A β *in vivo* leading to A β aggregation in the brain. In CAA, however, tTG and cross-links were associated with the lesion but did not colocalise with the A β deposition. This indicates that tTG may be involved in the formation of both SPs and CAA, but that its role may differ in these lesions. Also indirectly, tTG may influence the A β cascade i.e. via interaction with proteins that are involved in A β deposition, such as ApoE. Interestingly, family members of the ApoE, ApoA-I, ApoA-II, ApoB and ApoC-I are known substrates for tTG-catalysed cross-linking leading to multimerisation of the apolipoproteins. In conclusion, tTG may play an important role in the formation of A β aggregates in the brain, both directly via interaction with A β or indirectly via interaction with A β chaperones.

Factor XIIIa

Another transglutaminase that has been described in this thesis, is Factor XIIIa (FXIIIa). FXIIIa is crucial in the blood coagulation cascade where it cross-links fibrin, the main constituent of the blood clot, into a tight and stable blood clot. FXIIIa is present in the blood, but has been detected in monocytes/macrophages and osteoblasts. In addition to its role in coagulation, FXIIIa is involved in wound healing, bone formation and cell migration and proliferation. Moreover, a mutation in the FXIIIa gene is associated with cerebral haemorrhages and AD. As the BBB in CAA may be compromised, blood proteins may leak into the brain. However, whether also FXIIIa may leak into the brains or whether FXIIIa is involved in the development of AD, is not known.

Goals and results of this thesis

In this thesis we investigated the role of transglutaminases in CAA. As CAA plays an important role in the disease progression of AD and previous evidence indicates a role for tTG in CAA, we studied in **Chapter 2** the distribution pattern of tTG and tTG activity in post-mortem brain tissue of AD cases and in patients with a genetic form of CAA. We found that in early stage of CAA development, tTG protein colocalised with the A β deposition in the vessel wall. Possibly, tTG is involved in A β aggregation at this stage. However, in end-stage CAA, tTG protein and its cross-linked products did not colocalise with the actual A β deposition in CAA, but was present in two halos surrounding the A β . Similarly, ECM proteins fibronectin and laminin were also present in such halos, colocalising with tTG. This suggests that tTG may cross-link these ECM proteins which could lead to vessel wall stiffness and hence decreased A β clearance via the ISF. However, barrier formation may also protect against continuing damage to the brain vessel wall. Together, these results suggest that tTG may have different roles in early and late stage CAA. Despite the absence of tTG protein in the A β deposition in end stage CAA, *in situ* activation of endogenous (t)TG demonstrated clear colocalisation with the deposited A β in CAA. These findings hint towards the presence of another TG family member in the A β part of CAA. As CAA is associated with blood-brain barrier disruption, blood-derived proteins could leak into the vessel wall. The TG family member FXIIIa is present in the blood and plays a crucial role in the blood-clotting cascade by cross-linking fibrin molecules. In fact, as association of fibrin with CAA has been reported, we hypothesised that FXIIIa leaks into the blood vessel wall in CAA. Therefore in **Chapter 3** we studied the distribution and *in situ* activity of FXIIIa in CAA. Indeed, we observed both the presence of FXIIIa protein and FXIIIa activity in the A β part of CAA. In addition, we demonstrated *in vitro* that FXIIIa and A β form complexes, independent of the cross-link activity of FXIIIa. These complexes protected smooth muscle cells against A β -induced cell death, which is an important phenomenon in CAA. We conclude from this study that FXIIIa forms unique complexes with A β , which may play an important role in A β aggregation in the vessel wall.

An important hallmark of early stage CAA, is A β -induced smooth muscle cell (SMC) death in the vessel wall. ApoE, the major A β chaperone, not only has a role in A β binding and aggregation, but also protects smooth muscle cells against A β -induced SMC death. This raises the question whether ApoE may be structurally changed and therefore cannot offer protection against A β cytotoxicity in CAA. As tTG is present in the vessel walls in early stage CAA, and tTG is known to cross-link ApoE family members, we tested in **Chapter 4** the hypothesis that ApoE is an *in vitro* substrate for tTG-catalysed cross-linking leading to a non-functional ApoE protein. Indeed, we showed that *in vitro* tTG can cross-link ApoE, resulting in ApoE multimers. *In vitro* incubation of SMCs with A β resulted in increased secretion of both tTG and ApoE. In addition, incubation of SMCs with cross-linked ApoE did not protect the cells against A β toxicity, in contrast to non-cross-linked ApoE. Thus, in CAA the presence of both tTG and ApoE may be increased leading to tTG-catalysed cross-linking of ApoE into a non-functional protein. This could explain the SMC death in CAA.

Finally, we set out to identify a suitable animal model that mimics tTG's association with human CAA and to obtain more insight into the role of tTG in the pathogenesis of CAA. In **Chapter 5**, we investigated the distribution pattern of both tTG and its activity in two well-known AD mouse models. For this purpose, we used the APP_{swe}/PS1 $_{\Delta E9}$ (APP/PS1) mice that show early onset and fast progressing A β pathology and the APP23 mouse model that displays a later onset in age and slower progression of pathology. We observed that tTG and tTG activity were present in both mouse models in SPs and associated astrocytes as well as in CAA, already early in the development of pathology. However, the distribution of tTG in mice was different from the distribution in human AD tissue. Therefore, we conclude that although tTG seems to have a role from the start of A β pathology, these results cannot be directly translated to the human situation.

In **Chapter 6** the results of this thesis are summarised and discussed. In this thesis we demonstrated that both tTG and FXIIIa can play a role in different aspects of the development of CAA. In early stage CAA, locally elevated levels of A β can lead to increased secretion of tTG and ApoE. Subsequently, tTG may cross-link ApoE and decrease the protective activity of ApoE against A β -induced cell death. Furthermore, tTG may be involved in ECM cross-linking, which may lead to vessel wall remodelling. Future studies are required to determine the effects of vessel wall remodelling on the onset and/or development of CAA. The vessel wall degeneration in CAA may result in BBB leakage, and FXIIIa leakage from the blood into the vessel wall. FXIIIa may then form complexes with A β , contributing to A β deposition in the vessel wall. More research is necessary to unravel the exact roles of both tTG and FXIIIa activity in CAA and at what stage of CAA pathology the TGs come into play. Unfortunately, the mouse models studied in this thesis are not sufficient to study these questions. Other models, both *in vitro* and *in vivo*, are needed for future studies to evaluate the use of tTG and FXIIIa as therapeutically targets and design therapies that may prevent or delay CAA development *in vivo*.

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 afvoeroute 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 vaatziekten, 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 β depositie in de SP's van AD patiënten. Verder is al aangetoond dat wTG A β in vitro kan cross-linken tot onafbrekbare 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 β 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 β kunnen beïnvloeden door het cross-linken van eiwitten die bij A β 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 barrière 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 breincoupen van Alzheimer patiënten en patiënten met een erfelijke vorm van CAA. In een vroeg stadium van CAA zagen we verhoogde wTG expressie die colo-

caliseerde met de A β depositie in de vaatwand. Mogelijk is wTG hier betrokken bij de aggregatie van A β . Echter, in een eind-stadium van CAA, toonden we aan dat wTG en de cross-links niet meer in de A β depositie aanwezig zijn, maar in twee ringen rondom de A β 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 β 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 β depositie in de eindfase, was er wel in situ transglutaminase activiteit in de A β 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 β 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 β) liet zien dat het de cellen beschermt tegen A β -geïnduceerde celdood. Uit deze studie concludeerden we dat FXIIIa unieke complexen vormt met A β wat een belangrijke rol kan spelen in de ophoping van A β 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 β . ApoE, de belangrijkste A β chaperone, speelt niet alleen een rol in binding en aggregatie van A β , maar beschermt ook gladde spiercellen tegen A β -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 β liet een verhoogde uitscheiding van zowel wTG als ApoE zien. Ook bleek dat blootstelling van deze cellen aan een combinatie van A β en normaal ApoE bescherming gaf tegen A β -gedieerde celdood, terwijl blootstelling aan A β 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 β depositie laat zien wat snel vermeerdert en het APP23 model waarbij A β depositie pas op latere leeftijd begint en zich langzamer ontwikkelt. 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 β 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 β leiden tot verhoogde wTG uitscheiding. Dit kan leiden tot het cross-linken van ApoE en daarmee tot verminderde bescherming tegen A β -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 verregerende 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 β , 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 voor nieuwe therapieën ter voorkoming en/of bestrijding van de ziekte van Alzheimer.

Dankwoord

Eind 2010: ik weet nog goed hoe ik voor het eerst de groene gangen van de medische faculteit opkwam en dan is het toch vreemd om nu echt afscheid te nemen. Een afscheid met een aantal woorden van dank voor de mensen die mij de afgelopen jaren hebben geholpen met dit boekje.

Allereerst wil ik mijn co-promotoren dr. Micha Wilhelmus en dr. Benjamine Drukarch en promotor prof. Jeroen Geurts bedanken, zonder wie dit boekje niet tot stand was gekomen. **Micha**, dank je wel voor je goede begeleiding de afgelopen jaren. Als dagelijks begeleider heb ik veel van je geleerd. Je liet me erg zelfstandig werken wat ik prettig vond. Waar ik nog wel eens kon verzanden in de details, leerde jij me de rode draad vast te houden, en het grotere geheel te zien. Daar blijf ik wat aan hebben! In ons kantoor installeerde jij ook de cosy corner waar we met de hele kamer met enige regelmaat een koffie-momentje hadden.

Benjamin, jouw inzicht in de opbouw van artikelen hebben me veel geleerd over het publiceerbaar maken van een reeks experimenten en het duidelijk opschrijven hiervan. Je zorgde voor een duidelijke lijn in het onderzoek, dat was prettig.

Jeroen, ook al hebben we niet heel veel met elkaar te maken gehad gedurende de jaren, heb je in de laatste fase een belangrijke rol gespeeld. Ik wil je bedanken dat je mijn promotor wilt zijn en voor het soepel laten verlopen van de laatste fase van het tot stand komen van mijn proefschrift.

De **leescommissie**, dr. Marcel Verbeek, prof dr. Philip Scheltens, dr. Erik Bakker, prof.dr. Guus Smit, dr. Sjoerd van Duinen en prof. dr. Erik Boddeke, wil ik ook hartelijk bedanken voor het lezen en beoordelen van mijn proefschrift. Dank u wel voor uw tijd en interesse in mijn werk. Daarnaast wil ik ook de overige leden van de **corona**, dr. Rob Veerhuis, prof. dr. Jack van Horssen en dr. Louise van der Weerd bedanken voor hun interesse en inspanning.

Op het lab zijn er ook velen om te bedanken, voor expertise en gezelligheid.

Kees, we konden er allebei van genieten om in het celkweeklab onze cellen te verzorgen. Beetje medium hier, wat coating daar, een prima dagbesteding! En het was erg gezellig om dat al pratend over van alles en nog wat naast elkaar gezeten te doen. Van advies over cellen en experimenten, tot onderwerpen als (klassieke) muziek en concerten, het kwam allemaal voorbij. Helemaal geweldig dat je mijn promotie met een stuk op orgel muzikaal omlijst! Dank je wel voor al je hulp met de cellen en activity assays, de leuke koffiemomenten, en de geweldige Rusty Balls toernooien. Ik ben trots op mijn erelidmaatschap (ook met dank aan **Taco**, **Tommy** en **Dustin** voor de toekenning, uiteraard), en ik kom graag nog eens een balletje rollen.

We waren met een aardige groep aio's over de jaren heen. **Nathaly**, tegelijk begonnen, we kwamen elkaar al tegen op onze eerste ochtend tijdens de introductie van het VUmc en het waren heel gezellige jaren daarna. Op het lab zaten we naast elkaar (sorry voor het steeds in beslag nemen van jouw ruimte), en al pipetterend konden we (PhD) lief en leed delen. De drie dagen New York voorafgaand aan het congres in de VS, staan nog heel helder in m'n geheugen, een geweldige reis!

Robin jij was al even bezig toen ik kwam, maar we zaten nog 1,5 jaar op dezelfde kamer, dat was gezellig, een kort koffiepraatje kon zo uitlopen op een wat lang(er) praatje. Je wist ook veel over transglutaminase, wat natuurlijk voor mij, zeker in het begin, erg handig was.

Marloes, jij kwam na Robin op de kamer terecht wat resulteerde in leuke koffiemomenten met de hele kamer in de cosy corner. Ik vond het altijd gezellig, en je nuchtere peptalks en relativiseringsvermogen hebben me erg geholpen, zowel in promotie als niet-promotie gerelateerde zaken. Na lang zwoegen zijn we nu dan eindelijk vrij!

De groep aio's was niet compleet zonder **Karlijn**, je vrolijke aanwezigheid lichtte saaie dagen op. De groep werd na anderhalf jaar internationaal uitgebreid met **Claudia** en **Navina**. Thank you guys, for the fun and chats, and also Navina, you were a roommate for a while, joining in the coffee moments and our well-filled dropbox tradition.

John Bol, de kleuringen-expert. Dank je voor al je hulp met kleuringen, microscopen en het bestellen van al mijn benodigdheden. Ik heb veel aan je hulp en adviezen gehad, het was fijn bij jou terecht te kunnen met mijn vragen.

John Brevé, ik stond niet heel vaak bij je in de rij, maar als ik je nodig had, nam je altijd uitgebreid de tijd om me te helpen. Dat waardeer ik erg, dank je wel daarvoor.

Alle andere collega's van ANW, **Anne-Marie** (je wist wel hoe je borrels en partijen op gang kon krijgen), de eerste verdieping, de verslavingsgroep en psychiatrie, dank jullie wel voor de leuke tijd. **Rolinka**, **Roeland**, **Chris**, **Niels** en **Berend**, jullie waren er ook bij met de aio retraites en Onwar cursussen, dat waren leuke momenten die ik niet snel vergeet! **Secretariaat**, dank jullie voor het rondsturen van mijn proefschrift naar de leescommissie en daarmee met de afronding van mijn promotie.

Ik heb ook hulp gehad van een tweetal studenten, **Max** en **Emmy**. Dank jullie wel voor alle hulp! Of het nu wel of niet in een artikel is terecht gekomen, ik heb er veel aan gehad. Het nam mij veel werk uit handen, jullie werkten erg zelfstandig en experimenten waren soms al uitgevoerd voor ik het had gevraagd!

Buiten het VUmc zijn er ook mensen te bedanken. Een tijdlang deed ik een aantal experimenten op de afdeling Biomedical Engineering and Physics op het AMC. **Prof. Van Bavel**, beste Ed, dank je wel dat ik bij jullie de draadmyograaf proeven kon doen waardoor ik veel nieuwe dingen heb geleerd, praktisch en theoretisch. **Erik**, je leerde me veel over de experimenten, jullie werk, en je was ook erg geïnteresseerd in transglutaminase en CAA. Het was voor mij leerzaam met je te discussieren over deze onderwerpen en tijdens de verdediging kunnen we daarmee verder gaan. **Judith** en **Angela**, jullie hebben me veel

geholpen met alle draadmyograaf experimenten, wat was dat, zeker in het begin, moeilijk! Gelukkig waren jullie er om me er in wegwijs te maken en me thuis te laten voelen op de afdeling.

Rianne en **Mireille**, mijn paranimfen. Met z'n drieën verlieten we Nijmegen en startten een nieuwe leven in Osdorp. Alle hoogte- en dieptepunten van promoveren en leven in het algemeen konden we 's avonds tijdens het eten bespreken. Ik ben blij dat ik met jullie deze start in Amsterdam heb gemaakt, dank jullie wel! Ik ben daarom trots dat jullie mijn paranimfen willen zijn en naast me staan op deze dag.

Al mijn **vrienden** uit mijn middelbare schooltijd, uit m'n Nijmeegse studententijd, uit het orkest in Amsterdam, mensen die ik via-via leerde kennen, jullie weten wie jullie zijn. Zoveel die geïnteresseerd waren en zijn in mijn werk en in mij persoonlijk, dank jullie wel! Ik ben jullie dankbaar!

Mam, bedankt voor alle interesse en waarom/hoe-dan vragen. Het is me wel duidelijk waar mijn eigen nieuwsgierigheid vandaan komt, we zijn behoorlijk uit hetzelfde hout gesneden. En nu zijn we allebei Doctor!

Ati en **Jan-Peter**, werk is niet wat ons bindt, we doen allemaal iets totaal anders. Maar onze broer-zussen band bindt ons heel sterk en daar ben ik blij om! Niet alleen tijdens het promoveren, maar net zo goed nu en in de toekomst.

Max, het komt niet vaak voor dat iemand twee keer in één dankwoord voorkomt. Waar (wetenschappelijke) nieuwsgierigheid en muziek ons samenbracht, is er inmiddels zoveel meer wat ons samenhoudt. Dank je wel dat je me door die laatste loodjes hebt geholpen, toen het schrijven me soms teveel werd. Je kunt wel zeggen dat jij het beste 'resultaat' van mijn promotie-onderzoek bent. Een resultaat wat ik hier met trots publiceer.

Curriculum Vitae

Mieke was born on the 2nd of February 1987 in Zwolle. She completed her secondary school at Greijdanus College in Zwolle in 2005, and started studying Biomedical Sciences at the Radboud University in Nijmegen. As she was interested in neurodegeneration, she did her master internship at the department of Neurology and Laboratory Medicine, Radboud University Nijmegen Medical Centre (supervisors Dr. N. Timmer, Dr. I. Bruinsma en Dr. M. Verbeek). For nine months, she studied the role of small heat shock proteins on the production of inflammatory factors in Alzheimer's disease. In 2010, she continued her career in Alzheimer research with her PhD research on the role of transglutaminases in Alzheimer's disease, at the Department of Anatomy and Neurosciences at the VUmc in Amsterdam (supervisors Dr. MMM Wilhelmus and Dr. B. Drukarch). The results of this study are described in this thesis. During her PhD study, she supervised several students and gave lectures to students. She presented her research on different national and international conferences. After her PhD study, she started in 2015 as a scientist at BioFocus, Charles River Laboratories in Leiden.

List of publications

De Jager M, Drukarch B, Hofstee M Brevé J, Jongenelen CA, Bol JG, Wilhelmus MM (2015) Tissue transglutaminase-catalysed cross-linking induces Apolipoprotein E multimers inhibiting Apolipoprotein E's protective effects towards amyloid-beta-induced toxicity. *J Neurochem.* 134(6):1116-28

De Jager M, Boot MV, Bol JG, Brevé J, Jongenelen CA, Wilhelmus MM (2015) The blood clotting Factor XIIIa forms unique complexes with amyloid-beta (A β) and colocalizes with deposited A β in cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* doi: 10.1111/nan.12244

De Jager M, van der Wildt B, Schul E, Bol JG, van Duinen SG, Drukarch B, Wilhelmus MM (2013) Tissue transglutaminase colocalises with extracellular matrix proteins in cerebral amyloid angiopathy *Neurobiol Aging.* 34(4):1159-69

Wilhelmus MM, **de Jager M**, Bakker ENTP, Drukarch B (2014) Tissue transglutaminase in Alzheimer's disease: involvement in pathogenesis and its potential as a therapeutic target. *J Alzheimers Dis.* 42 Suppl 3:S289-303

Wilhelmus MM, **de Jager M**, Drukarch B (2012) Tissue transglutaminase: a novel therapeutic target in cerebral amyloid angiopathy. *Neurodegener Dis.* 10(1-4):317-9

Wilhelmus MM, **de Jager M**, Rozemuller AJ, Brevé J, Bol JG, Eckert RL, Drukarch B (2012) Transglutaminase 1 and its regulator tazarotene-induced gene 3 localize to neuronal tau inclusions in tauopathies *J Pathol.* 226(1):132-42

Bruinsma IB, **de Jager M**, Carrano A, Versleijen AA, Veerhuis R, Boelens W, Rozemuller AJ, de Waal RM, Verbeek MM (2011) Small heat shock proteins induce a cerebral inflammatory reaction. *J Neurosci.* 31(33):11992-2000

