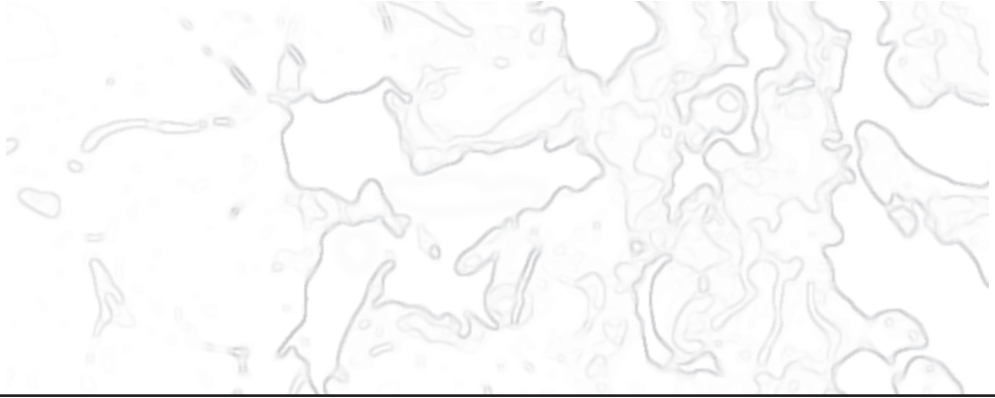




*Glia in Alzheimer's Disease and Aging. Molecular Mechanisms Underlying  
Astrocyte and Microglia Reactivity*

A.M. Orre



---

## **NEDERLANDSE SAMENVATTING**

---



De ziekte van Alzheimer is de meest voorkomende vorm van dementie in onze maatschappij en met de toenemende levensverwachting van de bevolking, is het vooruitzicht dat het aantal Alzheimer-patiënten in de komende decennia drastisch zal stijgen. De ziekte van Alzheimer wordt gekenmerkt o.a. door extracellulaire eiwit-ophopingen (amyloid-(A) $\beta$ ) en klwens van eiwitafzettingen (hyper-phosphorylated tau) in zenuwcellen, de zogenaamde plaques en tangles. De plaques worden omringd door reactieve astrocyten en geactiveerde microglia; dit is onderdeel van een ontstekingsrespons en is een belangrijke component in het ziekteproces. In het algemeen wordt aangenomen dat reactieve glia de aandoening door hun afgifte van ontstekingsbevorderende moleculen en reactieve zuurstofvormen verergeren: dit veroorzaakt namelijk neuronale schade en leidt waarschijnlijk tot een verhoogde productie van A $\beta$ . Tot nu is informatie over de rol van glia in het ziekteproces met name verkregen door middel van histologische analyse en *in vitro* experimenten. Er is echter nog veel onbekend over de moleculaire en functionele veranderingen in glia, die ten grondslag liggen aan de pathogenese en het verloop van de ziekte van Alzheimer. Maar welke functies vervullen astrocyten en microglia nu eigenlijk in gezond hersenweefsel en in hersenen van Alzheimer patiënten? Deze vraag staat centraal in dit proefschrift. We beschrijven hoe we met behulp van een genoom-brede aanpak het moleculaire fenotype van gezonde glia, en van reactieve astrocyten en geactiveerde microglia bij de ziekte van Alzheimer hebben gekarakteriseerd. Hiervoor hebben we eerst een methode opgezet om de specifieke celpopulaties te isoleren uit een muismodel voor de ziekte van Alzheimer. Vervolgens hebben we de genoom-brede expressiepatronen van de cellen gekarakteriseerd. Daarnaast hebben we de cellen histologisch bestudeerd in muizen- en mensen-hersenen, en we hebben *in vitro* experimenten uitgevoerd. Door deze aanpak hebben we een meer gedetailleerd inzicht gekregen in astrocyt- en microgliafuncties en in hun aandeel in de pathogenese van Alzheimer, niet alleen in het muismodel maar ook in Alzheimerpatiënten.

In hoofdstuk 1 geven we een korte beschrijving van de fenotypische en functionele veranderingen in Alzheimer astrocyten en microglia met betrekking tot A $\beta$  stimulatie en A $\beta$  plaques. Daarnaast introduceren en bespreken we de rol van het proteasoom, en met name het immuunproteasoom (iPS), met betrekking tot astro-

cyt- en microglia-activiteit en neuroinflammatie in de ziekte van Alzheimer. Het ubiquitine-proteasoom systeem is binnen een cel verantwoordelijk voor de afbraak van eiwit. Aangezien eiwitophoping een prominente rol speelt bij de ziekte van Alzheimer is het een belangrijk aandachtsgebied in het onderzoek naar Alzheimer. In de afgelopen 10 jaar zijn er verschillende studies geweest naar de rol van het ubiquitine-proteasoomsysteem in Alzheimer. Aangezien geubiquitineerde eiwitten zich ophopen in Alzheimer hersenen is het algemene idee dat dit systeem minder efficiënt werkt tijdens het ziekteproces. Echter, naast de constitutieve vorm van het proteasoom is er ook een immunoproteasoom (iPS), dit enzymcomplex heeft net een iets andere activiteit. Tot voor kort is er slechts weinig aandacht besteed aan de rol van het iPS bij neurodegeneratieve aandoeningen; wat wij weten over de functie van het iPS is vooral gebaseerd op onderzoek aan bloedcellen en perifere weefsels. In dit hoofdstuk vatten we de huidige kennis over het iPS in de hersenen en met betrekking tot de ziekte van Alzheimer samen en bespreken we hoe een behandeling gericht op de activiteit van het iPS kan bijdragen aan het reduceren van neuroinflammatie bij de ziekte van Alzheimer.

Hoofdstuk 2 beschrijft onze pogingen te ontdekken welke rol het proteasoom speelt in de context van glia-reactiviteit bij de ziekte van Alzheimer, met speciale aandacht voor A $\beta$  (plaques). Hiertoe gebruikten we nieuwe methodes, waaronder proteasoom-activiteitssondes die de cel kunnen binnendringen en gegevens verschaffen over de proteasoomactiviteit in levende cellen, alsmede nieuwe assays om proteasome subunit-specifieke activiteitsbepalingen te kunnen doen. Deze nieuwe methodes leverden meer gedetailleerde informatie op over proteasoomactiviteit, dan de methodes die voorheen werden gebruikt. Voor het eerst bleek het mogelijk om de verschillende activiteiten van beide typen proteasoom in de cel te analyseren, zowel van het overvloedig aanwezige constitutief proteasoom als van het iPS. In tegenstelling tot eerdere onderzoeken tonen wij nu een verhoogde proteasoomactiviteit aan in hersenen van Alzheimer patiënten en in hersenen van een Alzheimer muismodel. Deze verhoging werd met name veroorzaakt door een toename in de iPS activiteit. Door middel van immunohistochemie en genexpressie analyse konden we aantonen dat vooral reactieve astrocyten en microglia bij plaques een verhoogde expressie van iPS subunits lieten zien. Bovendien liet dit onderzoek zien dat een

specifieke remming van de verhoogde  $\beta$ 51 iPS activiteit leidde tot sterkere reductie van expressie van ontstekingsbevorderende moleculen, zoals Il1b, Tnf, in met LPS gestimuleerde microglia van oude Alzheimermuizen. Dit hoofdstuk biedt dus een nieuw inzicht in de functie van het iPS in plaque-geassocieerde gliacel-activiteit en in neuroinflammatie bij de ziekte van Alzheimer. We opperen tevens het idee dat remming van het iPS mogelijk een manier is om neuroinflammatie bij de ziekte van Alzheimer te beperken.

Eerdere resultaten uit ons laboratorium lieten al zien dat remming van het proteasoom leidt tot lagere expressie van GFAP in astrocyten. Hoofdstuk 3 draait daarom om het testen van de hypothese dat de activiteit van het proteasoom een belangrijke rol speelt bij de regulatie van GFAP expressie. Bovendien onderzochten we de moleculaire mechanismen, die het verband kunnen leggen tussen proteasoomactiviteit en de regulatie van GFAP. We behandelden astrocytoomcellen met moleculen waarvan we weten dat ze de proteasoomactiviteit verhogen en vonden twee moleculen (een agonist voor een opioïde receptor en een antagonist voor een purinergerische receptor) die dat in astrocyten zelfs in aanzienlijke mate deden. De verhoging van proteasoomactiviteit door middel van deze verbindingen ging gepaard met een gelijktijdige toename van GFAP, in overeenstemming met de hypothese. Bovendien zorgden beide verbindingen er voor dat de expressie van de subunits van het iPS en van de moleculen betrokken bij Notch signalering toenamen. Het gebruik van remmers specifiek gericht op iPS ( $\beta$ 5i) activiteit en op Notch signalering stelde ons in staat om aan te tonen dat beide moleculaire systemen essentieel zijn voor proteasoom-gemedieerde regulatie van de GFAP expressie, waarschijnlijk via STAT3 activatie. Ook interessant was dat we konden laten zien dat proteasoomactivering resulteerde in een fenotype van astrocyten gekenmerkt door een ontstekingsremmend profiel, in tegenstelling tot astrocyten geïsoleerd uit oude Alzheimermuizen die een ontstekingsbevorderend profiel hadden (hoofdstuk 5). Het benadrukt tevens het diverse karakter van astrocyt-activiteit, een onderwerp dat in hoofdstuk 6 nader aan de orde komt.

Het ontbreken van een deugdelijke methode om deze gliaceltypen te isoleren uit de hersenen van oude muizen was tot voor kort een belemmering voor onderzoek naar moleculaire en functionele veranderingen, die zich voordoen in astrocyten en

microglia in leeftijd-gerelateerde neurodegeneratieve aandoeningen. In hoofdstuk 4 beschrijven we de set-up en optimalisatie van een cel-isolatie protocol waarmee levensvatbare en pure astrocyten en microglia populaties kunnen worden verkregen uit de cortex van oude muizen, door middel van een selectie gebaseerd op eiwitmoleculen op het celoppervlak. Met deze geoptimaliseerde methode slaagden we erin corticale astrocyten en microglia te isoleren uit jong-volwassen (2,5 maanden) en oude (15-18 maanden) muizen die, later in het traject, een genoom-brede microarray analyse ondergingen waarmee we expressieprofielen verkregen. Deze expressieprofielen verschaften ons waardevolle informatie over de functie van astrocyten en microglia. Astrocyten blijken een groot aantal genen betrokken bij neuronale signalering tot expressie te brengen hetgeen een verder bewijs is dat astrocyten een belangrijk onderdeel vormen van de zogeheten tri-partite synaps. Het bevestigde ook dat microglia de belangrijkste spelers in de hersenen zijn als het om de immunreactie gaat. Daarnaast bood de vergelijking tussen jong-volwassen en oude populaties inzicht in de moleculaire veranderingen die zich voordoen in microglia en astrocyten tijdens veroudering. Het toonde onder meer aan dat oude astrocyten een meer uitgesproken ontstekingsfenotype hebben dan jonge astrocyten.

Qua ontstekingsverschillen was de microglia-vergelijking minder eenduidig; de groep tumor-necrosefactoren liet een hogere genexpressie zien in de oudere microglia, terwijl de CC-chemokine transcriptieniveaus juist in jongere microglia hoger bleken.

Hoofdstuk 5 beschrijft onze experimenten met het isoleren van astrocyten en microglia uit wild-type (WT) controles en uit Alzheimer muizen tussen de 15 en 18 maanden oud – een leeftijd waarop de hoeveelheid plaques en de glia-activiteit in Alzheimer muizen aanzienlijk is. Voor analyse van de moleculaire veranderingen, die gepaard gaan met deze door A $\beta$  plaques in astrocyten en microglia opgewekte activiteit, deden we een genoom-brede expressie-analyse van de geïsoleerde WT en Alzheimer-glia populaties. Beide celtypen lieten een verhoogde expressie zien van ontstekingsbevorderende genen, terwijl tegelijkertijd een afname te zien was in de celtype-verrijkte genen. Deze laatste zijn essentieel voor de normale astrocyt- en microglia-functies - zoals genen betrokken bij de opname en recycling van glutamaat door astrocyten, en genen betrokken bij endocytose/fagocytose in microglia. De data laten zien dat reactieve glia zich meer gaan toeleggen op hun

afweer- en reparatiewerkzaamheden, en dat dit ten koste gaat van hun reguliere neuron ondersteunende taken. De consequentie hiervan is een verdere neuronale dysfunctie en een mogelijk verminderde cognitie in Alzheimer patiënten. Om de muizendata te kunnen bevestigen aan de hand van de verschillen in genexpressie die optreden bij mensen met de ziekte van Alzheimer gebruikten we een clustering analyse methode. Hiermee hebben we de gereguleerde genclusters uit muizen-astrocyten en microglia vergeleken met een set genexpressie-data uit de prefrontale cortex van Alzheimerpatiënten en controle-donoren. De door plaques veroorzaakte ontstekingscascade in de muizenastrocyten bleek verrassend veel te lijken op de moleculaire veranderingen bij Alzheimer patiënten. Deze expressedata ondersteunden onze eerder data dat er inderdaad sprake is van neuroinflammatie en gliale dysfunctie. Deze processen dragen naar alle waarschijnlijkheid bij aan de neuronale haperingen en aan de aftakeling van het geheugen bij zowel de Alzheimer-muis als bij Alzheimer patiënten. We gaan hier in hoofdstuk 6 dieper op in.

In hoofdstuk 6 bespreken we de voordelen van celtype-specifieke analyse van neuropathologische veranderingen bij de ziekte van Alzheimer in relatie tot het neurologische en glia fenotype van het Alzheimer muismodel APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9</sup>, dat we gebruiken in onze studies. Tenslotte bespreken we de rol van neuroinflammatie en de gevolgen hiervan voor het begin en de voortgang van de ziekte van Alzheimer, alsmede in hoeverre het aanpakken van neuroinflammatie zou kunnen helpen bij de behandeling van de ziekte van Alzheimer.