

VU Research Portal

The role of protein kinases in Alzheimer's disease

Rosenberger, A.F.N.

2016

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Rosenberger, A. F. N. (2016). *The role of protein kinases in Alzheimer's disease*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Concept : Nederlandse samenvatting proefschrift Andrea Rosenberger

De ziekte van Alzheimer (AD) is de meest voorkomende vorm van dementie bij ouderen en gaat gepaard met onder andere vergeetachtigheid, desoriëntatie en verandering van de persoonlijkheid. Dit alles heeft een effect op het uitvoeren van dagelijkse activiteiten en op de kwaliteit van leven. Bij de ziekte van Alzheimer zijn de hersenen beschadigd. De hersencellen die signalen doorgeven (neuronen) worden aangetast. De verbindingen tussen de neuronen en uiteindelijk de neuronen zelf gaan verloren. Hierdoor kunnen de hersenen hun functie niet meer correct uitvoeren met als gevolg het kwijtraken van het geheugen.

In de hersenen van patiënten met AD zijn drie typische verschijnselen waar te nemen. Ten eerste de vorming van eiwitkluwens van het langgerekte eiwit tau. In een gezond brein is het tau eiwit onderdeel van het interne transportsysteem in neuronen dat ervoor zorgt dat voedingsstoffen naar de uiteinden worden vervoerd. Een verstoord transportsysteem resulteert in een steeds verminderende functie van de neuronen waardoor ze uiteindelijk afsterven. De kluwens die het tau eiwit in de neuronen vormt worden aangeduid als neurofibrillaire kluwens ("tangles"). Het tweede typische verschijnsel is een samenklontering van het beta-amyloid eiwit in de zogenoemde plaques in en rond de bloedvaten (capillaire amyloid angiopathie). De beta-amyloid klontjes zijn toxisch voor de neuronen en ze zorgen ervoor dat de communicatie tussen de neuronen wordt verstoord. De ophoping van het beta-amyloid eiwit in de vaatwand geeft aan dat de afvoer van het beta-amyloid eiwit uit de hersenen wordt belemmerd, en leidt tot verdere ophoping van het beta-amyloid in het hersenweefsel (derde verschijnsel).

Kenmerkend voor AD is de lange symptoom-vrije periode die wel 20-30 jaar kan duren. Recent onderzoek wijst erop dat chronische ontsteking (inflammatie) in de hersenen een rol speelt bij het ontstaan van AD. Ook een verminderde werking van de synapsen, die de communicatie tussen de neuronen in de hersenen tot stand brengen, wordt gezien als mogelijke oorzaak. Omdat deze processen reeds verstoord zijn in een vroeg stadium van AD wordt verondersteld dat beïnvloeding van deze processen door farmacologische interventie het ziekteproces kan vertragen en misschien zelfs de ziekte zou kunnen voorkomen.

Bij de regulatie van de communicatie tussen neuronen (synaptische activiteit) zijn veel signaalroutes in de cel betrokken. Voor het goed functioneren van deze signaalroutes zijn zogenaamde eiwitkinasen noodzakelijk. Eiwitkinasen zijn enzymen die ervoor zorgen dat andere eiwitten geactiveerd of geïnactiveerd worden doordat ze een fosfaatgroep covalent aan het eiwit koppelen. Eiwitkinasen zijn ook betrokken bij het AD ziekteproces. Zo is bekend dat een verhoging van de activiteit van een bepaald eiwitkinase leidt tot een

bovenmatige fosforylering van het tau eiwit dat daardoor kluwens vormt die toxisch zijn voor de cel. Ook het amyloid eiwit kan door eiwitkinasen worden gefosforyleerd waardoor in het hersenvocht onoplosbare amyloid-aggregaten worden gevormd, die stress in de hersenen veroorzaken. Over de eiwitkinasen die bij deze processen betrokken zijn en hun specifieke rol bij de ziekte van Alzheimer is nog weinig bekend.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift begint dan ook met een literatuurstudie die inventariseert van welke eiwitkinasen beschreven is dat ze betrokken zijn bij inflammatie in de hersenen (neuroinflammatie) en synaptische activiteit tijdens AD. De NCBI PubMed databank is doorzocht met trefwoorden. De naam en de synoniemen van elk van de 523 eiwitkinasen zijn gebruikt in combinatie met de zoekterm “Alzheimer’s disease”, “neuroinflammation”, of “synaptic changes”. Dit resulteert in een lijst van 66 eiwitkinasen die actief betrokken zijn bij neuroinflammatie of bij synaptische veranderingen in AD (**Hoofdstuk 1**).

Om meer inzicht te verkrijgen in de rol van eiwitkinasen gedurende de progressie van AD, is de activiteit van de eiwitkinasen in *post mortem* hersenweefsel (hippocampus) van 100 breinen in verschillende stadia van AD (Braak stadium 0 t/m VI) gemeten. Hiervoor is gebruik gemaakt van een peptide microarray waarop 144 verschillende peptiden zijn bevestigd die elk door eiwitkinasen gefosforyleerd kunnen worden. De gefosforyleerde peptiden worden herkend door antilichamen waaraan een fluorescent molecuul is gekoppeld. Het onderzoek laat zien dat de activiteit van de eiwitkinasen afneemt met de progressie van de ziekte. De afname van kinase activiteit wordt al waargenomen in een vroeg stadium van de ziekte (Braak stadium I en II). Door koppeling van de microarray resultaten aan informatie in databanken, zoals STRING, UniProt en HPRD, zijn bekende en nog onbekende eiwitkinasen gevonden die mogelijk een rol spelen in de ziekte. Zo vinden we veranderingen in de activiteit van Ephrin-receptor A1 (EphA1) kinase, dat bekend is als een risico-gen voor AD, en het sarcoma tyrosine kinase (Src). Beide eiwitkinasen zijn belangrijk voor het functioneren van neuronen en betrokken bij de vorming van het geheugen. Ook zijn eiwitkinasen geïdentificeerd waarvan nog niet bekend was dat ze in een vroeg stadium van AD veranderd zijn, zoals het protein tyrosine kinase 6 (PTK6/BRK), feline sarcoma oncogene kinase (FES) en het fyn-associated tyrosine kinase (FRK) (**Hoofdstuk 2**).

Over de rol van het eiwitkinase 2 (CK2, ook bekend onder de oudere naam casein kinase II) tijdens de ziekte van Alzheimer is nog weinig bekend. Wij vinden dat de hoeveelheid van dit kinase verhoogd is in de hippocampus en de temporale cortex van AD patiënten in vergelijking met gezond hersenweefsel. Door gebruik te maken van antilichamen die

specifiek aan het CK2 eiwit binden is het mogelijk te bepalen waar in de hersenen het eiwit zich bevindt. Het onderzoek toont aan dat de hoeveelheid CK2 kinase is verhoogd met name in de astrocyten en op de plaatsen waar de amyloid-ophopingen voorkomen. De functie van het CK2 eiwit in relatie tot AD is verder bestudeerd in een cellijn van humane astrocyten (U373) en in gekweekte primaire astrocyten afkomstig uit menselijk hersenmateriaal. Wanneer deze cellen worden gestimuleerd met de cytokines IL-1 β of TNF- α resulteert dat in de productie en uitscheiding van pro-inflammatoire cytokines zoals MCP-1 en IL-6. In de aanwezigheid van een CK2 remmer zien we dat de hoeveelheid uitgescheiden MCP-1 en IL-6 meer afneemt naarmate de concentratie remmer hoger is (dosis-effect relatie). Deze resultaten tonen aan dat CK2 gezien kan worden als een mogelijk therapeutisch aangrijpingspunt voor het beïnvloeden van neuroinflammatie in AD (**Hoofdstuk 3**).

Het EphA4 eiwitkinase (**Hoofdstuk 1+2**) behoort tot de familie van Ephrin receptoren. Onderzoek in transgene muizen laat zien dat het een rol speelt bij geheugenverlies. Met behulp van immunohistochemische technieken hebben we de hoeveelheid EphA4 eiwit in weefsel van de hippocampus van patiënten met AD en gezonde controles vergeleken. Ons onderzoek laat zien dat de totale hoeveelheid EphA4 hetzelfde blijft maar dat de lokalisatie van het kinase in het hersenweefsel van AD patiënten anders is dan in gezond hersenweefsel. In AD bevindt het EphA4 kinase zich op dezelfde plaats als de amyloid ophopingen en de tau kluwens, de twee typisch kenmerken van AD. Deze veranderde lokalisatie is al te zien in vroege stadia van AD (Braak stadium II) (**Hoofdstuk 4**).

Een interessante vraag is of deze herschikking van het EphA4 eiwit ook een effect heeft op de kinaseactiviteit. Om specifiek de activiteit van EphA4 te kunnen bepalen in een extract van hippocampus weefsel waarin een groot aantal verschillende eiwitkinasen aanwezig is, is een kinase immunodepletie assay (KID) ontwikkeld. In deze assay wordt het EphA4 met behulp van een antilichaam verwijderd uit het hersenextract (depletie). Vergelijking van de eiwitkinase activiteit voor en na depletie geeft informatie over de activiteit van het verwijderde kinase. Door gebruik te maken van KID laten we zien dat de activiteit van het EphA4 kinase niet verandert tijdens de ziekte, terwijl de lokalisatie wel veranderd is (**Hoofdstuk 5**).

Het is duidelijk dat er een grote behoefte is aan specifieke biomarkers die in de kliniek gebruikt kunnen worden om de ziekte van Alzheimer in een vroeg stadium, voordat er symptomen zijn, te herkennen. In Hoofdstuk 6 van dit proefschrift wordt “proof of principle” beschreven en tonen we aan dat serine/threonine eiwitkinase activiteiten in ruggenmergvloeistof (CSF) te meten zijn met behulp van de microarray (zie beschrijving

hierboven). Tevens tonen we aan dat het fosforyleringspatroon van CSF van AD patiënten verschilt van dat van gezonde personen. De kinase activiteit in CSF van AD patiënten is lager (p-value < 0.05). Met name de activiteiten van eiwitkinasen die behoren tot de CaMK familie en de AGC kinase groep zijn veranderd (**Hoofdstuk 6**).

Alhoewel er verschillende klinische onderzoeken gaande zijn die het effect van nieuwe medicijnen op de ziekte van Alzheimer testen zijn de resultaten tot op heden nogal teleurstellend. Het is daarom belangrijk nieuwe aangrijpingspunten voor medicijnen te vinden waarvan is aangetoond dat ze niet alleen in muizen maar ook in mensen bij de ziekte zijn betrokken. Dat is helaas voor de medicijnen die momenteel getest worden niet altijd het geval. In dit proefschrift wordt een rol voor verschillende (zowel bekende als nieuwe) eiwitkinasen in een vroeg stadium van ziekte aangetoond, voordat er symptomen zijn. We laten zien dat EphA4 en CK2 een essentiële rol hebben bij de ziekte in de mens door gebruik te maken van humane hersencellen en hersenweefsel afkomstig van mensen. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift laat zien dat eiwitkinase activiteit metingen in *post mortem* humaan hersenweefsel een veelbelovende benadering is voor het vinden van nieuwe kinasen en tevens voor het testen van (nieuwe) kinase remmers (**Hoofdstuk 7**).