

VU Research Portal

Spot the difference

Bossers, C.A.M.

2009

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Bossers, C. A. M. (2009). *Spot the difference: microarray analysis of gene expression changes in Alzheimer's and Parkinson's Disease*. [PhD-Thesis – Research external, 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

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

De ziekte van Alzheimer (AD) en de ziekte van Parkinson (PD) zijn de twee meest voorkomende neurodegeneratieve ziekten. Het beloop van zowel AD als PD is progressief: patiënten worden in de loop der jaren steeds zieker. Leeftijd is een belangrijke risicofactor voor deze ziekten. Dit, tezamen met de stijgende levensverwachting, zorgt ervoor dat AD en PD steeds meer mensen treft, en deze ziekten een steeds grotere belasting voor de samenleving worden. Grofweg 1 op de 100 mensen van 70 jaar en ouder heeft AD endit aantal stijgt echter dramatisch naarmate mensen ouder worden. Bij mensen van 85 jaar en ouder komt AD bij 1 op de 3 mensen voor. Op dit moment bestaan er geen effectieve behandelmethoden die de voortgang van deze slopende ziektes kunnen stoppen.

In de afgelopen 20 jaar is er veel vooruitgang geboekt in het identificeren van biologische processen die mogelijk zijn betrokken bij deze ziektes. Deze vooruitgang is voornamelijk toe te schrijven aan ontdekkingen vanuit de genetica: er is een aantal genmutaties gevonden die leiden tot zeldzame, erfelijke vormen van PD en AD. Verder zijn er toxines gevonden die PD-achtige veranderingen in de hersenen veroorzaken. De identificatie van deze genen en toxines heeft geleid tot het ontwikkelen van celkweekmodellen en diermodellen die het mogelijk maken bepaalde aspecten van PD en AD te bestuderen (zie **hoofdstuk 1**).

De nu bekende oorzakelijke genmutaties zijn echter zeer zeldzaam. Het overgrote deel (meer dan 95%) van de ziektegevallen van AD en PD zijn van ‘sporadische oorsprong’, wat betekent dat de genetische veranderingen niet op de klassieke manier overerven (‘zit in de familie’). Ze zijn waarschijnlijk veroorzaakt worden door een combinatie van onbekende biologische en omgevingsfactoren. Een valide vraag is dus of de genetische en sporadische vormen wel direct met elkaar verband houden. Ofwel, zijn de oorzakelijke veranderingen in de genetische vormen van AD en PD ook direct oorzakelijk in de sporadische variant?

Het is nu duidelijk dat dit niet het geval is. De huidige theorie is dan ook dat PD en AD waarschijnlijk niet worden veroorzaakt door één duidelijke verandering in de hersenen van de patiënt. Het is veel aannemelijker dat een combinatie van verschillende factoren ten grondslag ligt aan het ziekteproces.

Een van de manieren waarop moleculair biologen ziekteprocessen bestuderen, is door het meten van veranderingen in genactiviteit. Tot voor kort was het slechts mogelijk de activiteit van enkele tot maximaal tientallen genen tegelijk te meten. Het menselijke genoom bevat ongeveer 20.000 verschillende genen, en het is onbekend welke van deze genen meer of minder actief zijn in AD of PD. Op de ‘klassieke’ moleculair biologische manier is het dus niet mogelijk om een totaalbeeld te krijgen van de moleculaire veranderingen die zijn geassocieerd met AD of PD.

Een recent ontwikkelde techniek maakt het wel mogelijk om de veranderingen in activiteit van heel veel genen in één keer te meten. Dit gebeurt met behulp van

microarrays, microscoopglasjes waarop minuscule detectoren voor vrijwel alle 20.000 genen zitten. Dit totaalplaatje van de genactiviteit kan vervolgens inzicht geven in veranderingen in biologische processen in de hersenen van de patiënt. Daarom zijn microarrays bij uitstek geschikt voor het onderzoeken van complexe, multifactoriële ziekten zoals AD en PD.

De belangrijkste onderzoeksvraag waarop dit proefschrift een antwoord probeert te geven is dan ook: welke veranderingen in genactiviteit vinden er plaats in de hersenen van patiënten met AD of PD?

Wij zijn in het bijzonder geïnteresseerd in veranderingen die vroeg in het ziekteproces plaatsvinden, op een moment dat interventie door middel van medicatie in de toekomst nog kan voorkomen dat het ziekteproces van AD of PD zich door het gehele brein verspreidt. De toepassing van de zojuist beschreven microarray-techniek staat centraal in dit proefschrift. Het gebruik van menselijk hersenmateriaal is een uniek en essentieel aspect van het onderzoek, omdat celkweek- en diermodellen nooit een volledig beeld kunnen geven van de ziekte zoals die zich in de menselijke hersenen manifesteert.

In **hoofdstuk 3** beschrijven wij de veranderingen in genactiviteit door middel van microarray-analyse in de hersenen van PD-patiënten ten opzichte van donoren die niet lijden aan enige hersenziekte. Drie hersengebieden zijn onderzocht, te weten de substantia nigra, de nucleus caudatus en het putamen. Wij hebben gekozen voor de substantia nigra, omdat dit gebied het meest is aangedaan in PD: meer dan 80% van de zenuwcellen gaat verloren tijdens de ziekte. Deze afstervende zenuwcellen staan in contact met de nucleus caudatus en het putamen, en de huidige behandelingsmethode (het toedienen van L-dopa) is erop gericht het verlies van deze contacten te compenseren.

De resultaten van dit onderzoek laten zien dat er weinig veranderingen zijn waar te nemen in de nucleus caudatus en de putamen. Dit komt waarschijnlijk doordat de patiënten zijn behandeld met L-dopa, en doordat er geen zenuwcellen afsterven in deze hersengebieden.

In de substantia nigra daarentegen hebben wij een groep van 287 genen gevonden waarvan de activiteit significant veranderd was in PD. De meeste van deze genen zijn verminderd actief. Omdat wij specifiek gedeeltes van de substantia nigra hebben onderzocht waarbij de afname van zenuwcellen beperkt was, was de verminderde genactiviteit in de meeste gevallen niet toe te schrijven aan het verlies van zenuwcellen. Een uitgebreide analyse door middel van bio-informatica heeft aangetoond dat een gedeelte van de minder actieve genen betrokken is bij de overdracht van zenuwsignalen, de energievoorziening van de cel en het opruimen van kapotte eiwitten. Sommige van de door ons gemeten veranderingen zijn eerder beschreven in de literatuur, maar wij laten voor het eerst zien dat deze veranderingen al plaatsvinden voordat de zenuwcellen afsterven.

Ook hebben we een aantal niet eerder beschreven veranderingen in genactiviteit gevonden die wijzen op de afname van neurotrofe ondersteuning (het in stand houden van zenuwcellen door middel van groeistoffen) en veranderingen in signalen die de uitgroei van en contacten tussen zenuwcellen reguleert. Wij denken dat deze veranderingen een oorzakelijke bijdrage kunnen leveren aan het afsterven van zenuwcellen in PD. Namelijk, als zenuwcellen minder goed contact kunnen maken met elkaar en noodzakelijke groeistoffen verminderd aanwezig zijn, lopen deze cellen een verhoogd risico te sterven.

Hoofdstuk 4 beschrijft een alternatieve methode voor het analyseren van datasets die zijn gegenereerd door middel van twee-kleurenmicroarrays. Deze microarrays kenmerken zich doordat tegelijkertijd de genactiviteit wordt bepaald van twee monsters, waarvan er één groen en de ander rood fluorescerend gekleurd is. Als het groen gekleurde monster van een AD-patiënt komt, en het rood gekleurde monster van een gezonde oftewel controledonor, dan is de verhouding tussen het groene en rode signaal direct een maat voor de relatieve genactiviteit in AD ten opzichte van de controledonor. Deze twee-kleurenmicroarrays zijn dus bij uitstek geschikt voor de vergelijking van twee condities, zoals ziek en gezond. Verder zijn deze microarrays goed bestand tegen variatie die is veroorzaakt door verschillen tussen experimenten.

Een nadeel van de twee-kleurenmicroarrays is dat de vergelijking tussen meerdere condities veel moeilijker is. Er kunnen immers maar twee monsters tegelijkertijd worden gemeten. Wij hebben daarom onderzocht of de analyse van twee-kleuren microarray data kan worden gedaan op de intensiteit van de afzonderlijke signalen, in plaats van op de ratio tussen het rode en groene signaal. Op deze manier worden de signalen onafhankelijk van elkaar behandeld, en kunnen alle gemeten monsters direct met elkaar worden vergeleken.

De resultaten van dit onderzoek laten zien dat de op intensiteit gebaseerde analyse inderdaad mogelijk is. Sterker nog, de reproduceerbaarheid van de resultaten, en de gevoeligheid voor veranderingen in genactiviteit verbetert wanneer er gebruik wordt gemaakt van een intensiteits-analyse. Dit geldt vooral wanneer er meerdere groepen met elkaar vergeleken moeten worden, en er veel variatie tussen de monsters is. Deze intensiteits-gebaseerde analyse hebben we toegepast in het microarray experiment in hoofdstuk 5.

In **hoofdstuk 5** beschrijven we, gebruik makend van microarray technologie, de veranderingen in genactiviteit gedurende de ontwikkeling van de ziekte van Alzheimer. De microscopische veranderingen die gepaard gaan met AD verspreiden zich via een vast patroon door de hersenen. Hierdoor is het mogelijk na de dood van de donor vast te stellen in welk stadium van de ziekte deze overleed. Deze stagering van het ziektebeeld staat ons ook in staat donoren die nog geen cognitieve afwijkingen vertoonden, op te delen in groepen met verschillende mate van AD pathologie. De verschillende stadia van AD werden voor het eerst beschreven door prof. H. Braak, en worden daarom ook wel aangeduid als de Braak stadia.

Wij hebben hiervan in ons onderzoek gebruikgemaakt voor het verzamelen van donoren. Voor elk van de 6 Braak stadia hebben we 7 donoren geselecteerd. Ook hebben we een groep van 7 donoren onderzocht die geen AD-geassocieerde pathologie vertoonden. Het hersengebied dat we hebben onderzocht is de prefrontale cortex, een gebied dat relatief laat is aangedaan in het ziekteproces. Dankzij deze aanpak waren wij in staat de genactiviteit van alle genen te volgen terwijl de ziekte zich ontwikkelde. Hierdoor konden wij onderscheid maken tussen vroege en dus mogelijk oorzakelijke veranderingen in genactiviteit, en late veranderingen in genactiviteit die mogelijk een gevolg zijn van de ziekte. Deze kennis kan van groot belang zijn bij het ontwikkelen van medicijnen die beschermen tegen het krijgen van AD, in plaats van medicatie die alleen symptomen bestrijdt.

Het belangrijkste resultaat van deze studie is de verhoogde activiteit van een grote groep genen in de allervroegste stadia van AD, net voordat de eerste microscopische veranderingen optreden in de prefrontale cortex. Het gaat onder meer om genen die betrokken zijn bij de signaaloverdracht tussen en de energievoorziening van zenuwcellen.

Wij denken dat deze veranderingen in genactiviteit een verhoogde activiteit van zenuwcellen vertegenwoordigen, als een compensatoire reactie op de allereerste, nog onbekende veranderingen in AD. Op het moment dat de met AD gepaard gaande typische microscopische veranderingen zichtbaar worden, vermindert de activiteit van deze groep genen sterk, om uiteindelijk in de laatste stadia van de ziekte nog verder af te nemen. Verder bevindt zich in deze groep een aantal genen die direct te maken hebben met de vorming en afbraak van de voornaamste component van één van de microscopische afwijkingen bij AD, de seniele plaque. Wij denken dan ook dat activiteitsveranderingen van juist deze genen, waarschijnlijk in combinatie met andere nog onbekende factoren, een oorzakelijke rol kunnen spelen bij het ontwikkelen van de ziekte.

Ook al zijn de resultaten van microarray experimenten tegenwoordig zeer betrouwbaar, toch is onafhankelijke bevestiging van veranderingen in genactiviteit een belangrijke stap. Dit is des te meer het geval bij experimenten met menselijk weefsel, omdat die gepaard gaan met een grote variatie tussen individuen. In **hoofdstuk 6** combineren we daarom de resultaten van onze microarray studie uit hoofdstuk 5, en vier reeds gepubliceerde microarray-studies op humaan hersenmateriaal naar veranderingen in genactiviteit in het eindstadium van AD.

Deze ‘meta’-analyse resulteerde in een lijst van 69 genen, waarvan een veranderde activiteit is gemeten in minimaal 3 van de 5 studies. Een aantal van deze genen speelt een rol in het handhaven van de calciumbalans of de energiehuishouding van zenuwcellen. Verder bevinden zich in deze lijst genen die op veranderingen duiden in het vermogen DNA-schade te repareren, de regulering van celdeling en de afbraak van cholesterol in de hersenen van AD patiënten. Deze resultaten geven aanleiding voor verder onderzoek naar de specifieke betrokkenheid van deze processen bij AD.

Het is bekend dat vrouwen een groter risico lopen op het ontwikkelen van AD, zelfs wanneer je corrigeert voor het feit dat vrouwen ouder worden dan mannen. Recent onderzoek suggereert dat geslachtshormonen ook geproduceerd kunnen worden door de hersenen, en dat geslachtshormonen zoals progesteron en estradiol betrokken zijn bij de algemene bescherming van zenuwcellen. Verder kunnen geslachtshormonen en afgeleiden daarvan de overdracht van zenuwsignalen veranderen, doordat ze de werking van receptoren (ontvangers van zenuwsignalen) beïnvloeden. Deze waarnemingen wijzen op een mogelijk verband tussen verschillen in geslachtshormonen en de vatbaarheid voor AD.

In **hoofdstuk 7** beschrijven we een systematische studie naar veranderingen in de aanmaak en afbraak van verschillende geslachtshormonen in AD, door het meten van genactiviteit en het aantonen van bijbehorende eiwitten in het hersenweefsel. De resultaten hiervan wijzen op een verhoging van de aanmaak van geslachtshormonen in vroege stadia van AD, wat waarschijnlijk een compensatoir mechanisme vertegenwoordigt dat zenuwcellen beschermt tegen AD-geassocieerde veranderingen.

In de algemene discussie van dit proefschrift (**hoofdstuk 8**) worden de experimenten, zoals beschreven in de voorgaande hoofdstukken, samengevat en bediscussieerd. We behandelen een aantal interessante observaties die verder onderzoek behoeven, zoals de interactie tussen variaties in het ApoE gen -de belangrijkste genetische risicofactor voor AD- en de veranderingen in genactiviteit in AD, de overeenkomsten en verschillen tussen normale veroudering en AD, en de rol van genetische variaties in signalen die de uitgroei van zenuwvezels uitgroei reguleren in PD.

Verder besteden wij aandacht aan de specifieke randvoorwaarden - zoals parameters die de kwaliteit van hersenweefsel beïnvloeden - die onontkoombaar gepaard gaan met onderzoek aan humaan postmortem hersenweefsel. En in het tweede gedeelte van de algemene discussie doen wij voorstellen voor vervolgonderzoek. Dit onderzoek moet zich volgens ons concentreren op de vraag wat de specifieke functionele betekenis is van de gevonden veranderingen in genactiviteit voor het ontstaan van PD en AD. Wij stellen een aantal bio-informatica, celkweek- en diermodelexperimenten voor die deze vraag verder moet beantwoorden. Momenteel zijn we zelf bezig met het uitvoeren van zulke experimenten.

