

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/25831> holds various files of this Leiden University dissertation.

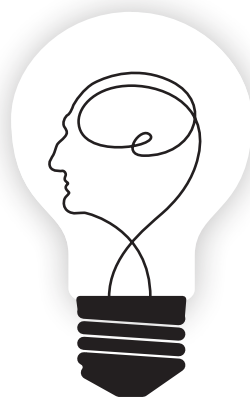
Author: Nabuurs, Rob Johannes Antonius

Title: Molecular neuroimaging of Alzheimer's disease

Issue Date: 2014-05-28

Appendices

- I Building blocks for polyfluorinated bis-styrylbenzenes
- II Samenvatting
- III Dankwoord
- IV Curriculum vitae
- V Publication list



Samenvatting

De ziekte van Alzheimer (AD) is de meest prevalentie vorm van dementie met veroudering als belangrijkste risicofactor. De toenemende vergrijzing gaat dan ook gepaard met een stijgende incidentie van AD en drukt hierbij een zware stempel op zowel sociaaleconomisch vlak als op de volksgezondheid. De precieze etiologie van deze aandoening is echter onbekend en helaas ontbreekt een adequate therapie. Histologisch kenmerkt deze ziekte zich door de ophoping van een tweetal eiwitten in de cortex van het brein, namelijk gehyperfosforyleerd τ in neurofibrillary tangles en amyloid- β (A β) peptiden in amyloid plaques. Deze eiwitophoping lijkt zich al te voltrekken tientallen jaren voordat de eerste klinische symptomen merkbaar zijn. Detectie van deze accumulatie *in vivo* in een preklinisch stadium is echter nog niet mogelijk. Het stellen van de definitieve diagnose is daarom tot op heden afhankelijk van obductie.

Een diagnostische methode die in staat is de specifieke accumulatie van amyloid plaques en de bijbehorende vroege corticale veranderingen te visualiseren of kwantificeren heeft niet alleen de potentie voor vroegdiagnostiek, maar leidt daarnaast ook tot een beter begrip van de pathofysiologie. Daarnaast kan zo'n methode uiteindelijk zelfs bijdragen tot de ontwikkeling en follow-up van een therapie. In dit proefschrift heb ik me dan ook gericht op het ontwikkelen van nieuwe diagnostische beeldvormende technieken om de specifieke histologische kenmerken van de ziekte van Alzheimer te kunnen detecteren. Daarvoor zijn enerzijds de nieuwe mogelijkheden van ultra-hoogveld MRI verkend (**Deel Eén**) en zijn anderzijds nieuwe molecular imaging strategieën ontwikkeld (**Deel Twee**).

Dat MRI in staat is om individuele amyloid plaques te detecteren is reeds aangetoond in zowel transgene AD muismodellen *in vivo* als in post-mortem humaan hersenweefsel. Recentelijk zijn de hiervoor benodigde hoge magnetische veldsterktes (≥ 7 Tesla) beschikbaar gekomen voor klinisch gebruik. Door de verhoogde gevoeligheid voor veranderingen in magnetische susceptibiliteit en toegenomen resolutie bieden deze ultra hoogveld MRI-systemen nieuwe mogelijkheden om AD neuropathologie op te sporen, en wellicht zelfs eerder dan de huidige MRI biomarker van atrofie van de hersenen.

In **Deel Eén** wordt de relatie tussen optredende veranderingen in MRI-contrast of wel natief contrast met bijbehorende neuropathologische veranderingen tot op microscopisch niveau bestudeerd. Dit begrip is van essentieel belang voor de verdere ontwikkeling van klinisch toepasbare MRI-technieken.

Na een korte uitleg over de werking van MRI (**hoofdstuk 2**), onderzochten we allereerst de toepasbaarheid en beperkingen van post-mortem formale gefixeerd hersenmateriaal voor de ontwikkeling van nieuwe MRI-technieken voor het diagnosticeren van AD. (**hoofdstuk 3**) Langdurige fixatietijden veroorzaakte destructie van het normale hersenweefsel zichtbaar als hypo-intense gebieden op verscheidene MRI-sequenties. Aangezien vaak formale gefixeerd post-mortem hersenmateriaal voor dit doel wordt gebruikt, raden wij aan alleen met hersenweefsel te werken dat minder dan twee jaar gefixeerd is met regelmatige verversing van de formale ter voorkoming van deze artefacten.

De verschillen in resolutie tussen microscopie en MRI evenals de vervormingen die optreden tijdens de histologische bewerking bemoeilijken het precies correleren van het MRI contrast met het bijbehorende verantwoordelijke pathologische substraat. Om deze

registratieproblemen te minimaliseren hebben we een inductie-gekoppelde microcoil ontworpen die het mogelijk maakt om rechtstreeks MRI-beelden te vervaardigen van een histologische coupe van 60 μm . (**hoofdstuk 4**) Achtereenvolgens kan deze coupe zonder verdere bewerking direct aan de gewenste histologische kleuring worden onderworpen. Aangezien zowel de MRI als de histologie op precies dezelfde coupe plaatsvinden is directe vergelijking mogelijk. Het ontwerp kan eenvoudig worden geïntegreerd in elke MRI-systeem met behulp van bestaande commerciële hardware waarbij een evidente verbetering van de signaal-ruisverhouding kan worden bereikt. Initiële toepassing op humaan AD hersenweefsel bevestigde voornoemde studies waarbij de accumulatie van A β in het brein gepaard gaat met een focale hypointensiteit op T $_2^*$ -gewogen MRI.

Eerder onderzoek suggereerde dat louter de neerslag van A β -peptiden in het hersenparenchym in plaques al zou kunnen leiden tot een signaalreductie op MRI onafhankelijk van de mogelijk gepaard gaande ijzeraccumulatie. Middels de bovenstaande MR-microscopie setup hebben wij getracht de MRI-karakteristieken van de verschillende vormen A β -deposities in het brein in kaart te brengen. (**hoofdstuk 5**) Alleen de fibrillaire aggregatie in amyloid en niet de diffuse plaques leidde tot een signaalverandering in T $_2^*$ en T $_2$ -gewogen MRI. Tevens bleek ook cerebrale amyloid angiopathie (CAA) een negatief effect op het MRI signaal te hebben, alhoewel niet voor alle soorten CAA een zelfde signaalreductie werd waargenomen. De consequentie van deze resultaten is dat MRI in principe in staat is om niet zo zeer de totale cerebrale A β -load te bepalen, maar het A β -gerelateerde signaalverandering alleen samen hangt met aanwezigheid van amyloid plaques, één van de belangrijkste markers van AD.

In **hoofdstuk 6** hebben we veranderingen in corticale patronen van gezonde ouderen en AD-patiënten *in vivo* onderzocht middels susceptibiliteit gewogen 7T MRI. Tegelijkertijd werden soortgelijke corticale patronen eveneens waargenomen bij MRI verricht op post-mortem AD hersenmateriaal. Dit materiaal bood tevens de mogelijkheid tot correlatie met de onderliggende corticale pathologie verantwoordelijk voor deze signaal veranderingen. De frontale cortex van AD-patiënten presenteerde zich *in vivo* met een diffuse hypointense corticale band (57%), terwijl deze niet werden geobserveerd bij gezonde controles van dezelfde leeftijd. Uit de histologische studie bleek dat het corticale patroon op MRI niet primair overeenkwam met de distributie van amyloid plaques of neurofibrillaire tangles, maar het liet een duidelijk correlatie zien met microglia- en myeline-geassocieerde ijzer ophoping alsmede een veranderde corticale myeline cytoarchitectuur. Deze resultaten zijn veelbelovend voor de *in vivo* detectie van de onderliggende pathologische veranderingen in AD middels MRI. Toekomstig onderzoek dient uit te wijzen of dit corticaal patroon specifiek is voor AD.

Deel Twee beschrijft de ontwikkeling van doelgerichte contrastmiddelen voor de specifieke *in vivo* detectie en visualisatie van verschillende A β -aggregaten, zoals CAA en amyloid plaques. *In vivo* implementatie van zulke moleculaire imaging strategieën voor het bestuderen of diagnosticeren van neurodegeneratieve ziekten is in sterkte mate afhankelijk van de karakteristieken van de gekozen imaging ligand, zoals de detectielimiet en het vermogen om de bloed-hersen barrière (BBB) te passeren. In dit kader bespreekt **Hoofdstuk 7** de mogelijkheden met betrekking tot moleculaire neuro-imaging middels MRI.

Voorafgaand aan deze thesis hebben we heavy chain antilichaamfragmenten (V_HH) geselecteerd die zich uitsluitend binden aan CAA versus verscheidene V_HH s die zowel CAA als alle parenchymateuze humane A β -deposities herkennen. Afkomstig uit het antilichaamrepertoire van de *Camelidae* ontbreekt bij deze klasse antilichamen de licht ketens, maar desondanks heeft het N-terminale domein ofwel het V_HH -fragment een vergelijkbare hoge en specifieke affiniteit als die van conventionele antilichamen. De potentie van V_HH om als *in vivo* contrastmiddel CAA en/of cerebraal A β te detecteren hangt af van hun vermogen om in het brein te geraken. In **Hoofdstuk 8** is de mogelijke BBB passage getest met een middels een *in vitro* BBB systeem. De CAA-specifieke V_HH ni3A transmigreerde het meest efficiënt over deze barrière via een actief transport mechanisme. Het verschil in migratie ten opzichte van andere V_HH lijkt grotendeels te berusten op aanwezigheid van een drietal specifieke aminozuren in het N-terminale domein.

Als volgende stap, zijn in **hoofdstuk 9** de *in vivo* eigenschappen onderzocht van een tweetal radioactief of fluorescent gelabelde V_HH , ni3A en pa2H, na toediening in transgene AD muismodel. Na een initiële snelle renale klaring liet ^{99m}Tc -pa2H een dag na de injectie een significant hogere opname zien in het brein van de transgene AD muizen. Na het omzeilen van de BBB werd voor beide fluorescent gelabelde V_HH de *in vivo* specificiteit voor A β bevestigd, waarbij pa2H zelfs 24 uur na toediening goed zichtbaar bleef. Opvallend echter was dat beide V_HH affiniteit vertoonden voor zowel het parenchymale als het vasculaire A β in het muizenbrein, dit in tegenstelling tot eerdere toepassing op humaan hersenweefsel, waarbij ni3A uitsluitend CAA detecteerde. Ondanks dat de cerebrale accumulatie zich nog ver beneden de detectielimiet bevindt nodig voor *in vivo* beeldvorming, laat deze studie zien dat V_HH s in staat zijn om cerebraal A β te detecteren en vormt hiermee een basis voor verdere ontwikkeling en verbetering.

Hiernaast is een geheel andere strategie gekozen voor de detectie van amyloid plaques, namelijk door het ontwikkelen van kleine organische amyloid bindende moleculen. **Hoofdstuk 10** beschrijft de synthese van gefluorineerde bis-styrylbenzenes als mogelijke ^{19}F -MRI contrastmiddelen alsmede hun fluorescente en A β bindingskarakteristieken. Idealiter passeren deze kleine organische moleculen de BBB en binden daar aan amyloid waarbij het geïncorporeerde fluor direct detecteerbaar is middels MRI zonder enig endogeen achtergrondsignaal. De meeste verbindingen vertoonden een hoge affiniteit voor A β plaques van zowel muizen als mensen. Ze bleken echter een andere bindingsplaats te hebben dan chrysamine G, één van de oorspronkelijke verbindingen waarvan onze bis-styrylbenzenes zijn afgeleid. Ondanks een hoge logP waarde waren bijna alle gefluorineerde bis-styrylbenzenes in staat om *in vivo* de BBB te passeren en aan amyloid te binden in de transgene AD muizen. Initiële post-mortem ^{19}F nuclear spin resonantie (NMR) verricht voor de meest veelbelovende verbinding toonde echter aan dat verder MRI studies nog niet te rechtvaardigen zijn gezien de significante reductie van de ^{19}F -signaal, welke voornamelijk een direct gevolg lijkt te zijn van samenstelling van het hersenweefsel.

Om de farmacokinetiek mogelijk te verbeteren wordt in **Hoofdstuk 11** de synthese en karakteristieken van zes bis-pyridylethenylbenzenes beschreven met het idee dat het incorporeren van een stikstofatoom dergelijke structuren meer hydrofiel zou kunnen. Ook deze verbindingen delen geen bindingsplaats met chrysamine G. Met een logP waarde tussen 3 en 5 waren alle verbindingen in staat om *in vivo* de BBB te passeren en het amyloid in het brein

te labelen. Op basis van de in en *ex vivo* eigenschappen en de oplosbaarheid toonde bis-(4-pyridylethenyl)benzene de meeste potentie om als backbone te dienen voor verdere ontwikkeling tot een amyloid imaging biomarker, bijvoorbeeld als mogelijke PET-tracer.

