



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Systems pharmacology of the amyloid cascade : unfolding oligomer modulation in Alzheimer's disease**

Maanen, E.M.T. van

### **Citation**

Maanen, E. M. T. van. (2017, November 23). *Systems pharmacology of the amyloid cascade : unfolding oligomer modulation in Alzheimer's disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/55514>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/55514>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/55514> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Maanen, E.M.T. van

**Title:** Systems pharmacology of the amyloid cascade : unfolding oligomer modulation in Alzheimer's disease

**Issue Date:** 2017-11-23

---

# Synopsis in Dutch

**Samenvatting in het Nederlands van het proefschrift:**

**”Systems pharmacology of the amyloid cascade**

**Unfolding oligomer modulation in Alzheimer’s disease”**



Veel neurodegeneratieve ziekten, zoals de ziekte van Alzheimer (ZvA), de ziekte van Parkinson (ZvP) en de ziekte van Huntington (ZvH), en motorische aandoeningen als amyotrofe laterale sclerose (ALS) zijn geassocieerd met de misvouwing van een ziekte specifiek eiwit. Deze aandoeningen laten een vergelijkbaar patroon van neuronale afsterfing, achteruitgang van het zenuwstelsel en cognitieve stoornissen zien. De cellulaire disfunctie wordt veroorzaakt door accumulatie van eiwit-aggregaten binnen of buiten neuronen. De pathologische veranderingen worden gedreven door de abnormale ophoping van het misgevouwen eiwit. Dit leidt tot de vorming van eiwit-aggregaten variërend van kleine oligomeren tot geordende vezels en grote amyloïde massa's. Vanwege de overeenkomsten tussen de verschillende eiwit-misvouwing gerelateerde neurodegeneratieve ziekten, biedt de 'amyloïde-cascade-hypothese' van de ZvA een kader voor de bestudering van eiwit-misvouwing neurodegeneratieve ziekten.

Volgens de amyloïde-cascade-hypothese initieert de accumulatie van de beta-amyloïd ( $A\beta$ ) peptiden de cascade van pathologische processen van de ZvA. Vroeg in het ziekteproces, voordat klinische symptomen optreden, is er een toename van de  $A\beta$  concentraties, wat leidt tot de vorming van giftige oplosbare  $A\beta$  oligomeren ( $A\beta_O$ ). De neurodegeneratie in de hersenen bij de ZvA wordt primair aangedreven door deze  $A\beta_O$ s. Vooralsnog is er geen farmacologische behandeling beschikbaar die de progressie van de pathologische cascade bij de ontwikkeling van de ZvA stopt of vertraagt. Een van de belangrijkste therapeutische strategieën voor de ZvA is het verlagen van de  $A\beta$  concentratie in het centrale zenuwstelsel (CZS), door ofwel de vermindering van de vorming van  $A\beta$  of het versnellen van de afbraak van  $A\beta$ . Theoretisch kan de verlaging van de  $A\beta$  concentratie in het CZS alle opvolgende pathologische processen voorkomen.

$A\beta$  is het eindproduct van de proteolytische opdeling van het 'transmembraan beta-amyloïd voorloper eiwit' (APP) door achtereenvolgens  $\beta$ -secretase (BACE1) en  $\gamma$ -secretase (GS). De effecten van geneesmiddelen op de afzonderlijke metabole routes van de afbraak van APP zijn moeilijk te voorspellen, omdat de vorming en de afbraak via een ingewikkeld biochemisch netwerk worden gereguleerd. Daarom is ook het effect van de vermindering van de vorming van  $A\beta$  of verhoging van de klaring van  $A\beta$  op de concentratie van  $A\beta_O$  en op het  $A\beta$  evenwicht moeilijk in strikt kwantitatieve zin te voorspellen.

In dit proefschrift werden wiskundige modellen ontwikkeld waarmee de afbraak en eliminatie van APP via de verschillende routes kan worden gekwantificeerd. Het onderliggende doel van dit onderzoek was om op een strikt kwantitatieve wijze het biochemische netwerk van de APP-omzetting te beschrijven, om vervolgens het effect van therapeutische interventies op de blootstelling aan  $A\beta_O$  te voorspellen en te evalueren.

---

Hiertoe werd een ‘systeem-farmacologie’ benadering toegepast, waarmee de beschikbare kennis van de biologie en farmacologie van de systeemreacties wordt geïntegreerd (**Hoofdstuk 2**).

In een reeks onderzoeken werd een systeem-farmacologie model voor de omzettingen van APP via verschillende routes in het APP netwerk opgesteld, op basis van farmacokinetische en farmacodynamische data in rhesusapen. Deze rhesusapen waren voorzien van een katheter in de cisterna magna, waardoor herhaalde afname van cerebrospinale vloeistof (CSV) mogelijk was. Allereerst werd een systeem-farmacologie model opgesteld voor de afbraak van AAP via de routes die leiden tot de vorming van de metabolieten (sAPP $\beta$ , sAPP $\alpha$ , A $\beta$ 40, A $\beta$ 42) na een enkele toediening van de BACE1 remmer MBI-5 (**Hoofdstuk 3**;  $\beta$ -APP model). Na remming van het enzym BACE1 werd een dosis-afhankelijke daling van de concentraties van de metabolieten A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 en sAPP $\beta$  gevonden, terwijl de concentratie van sAPP $\alpha$  werd verhoogd. Op basis van het ontwikkelde model werd voorspeld dat na BACE1 remming er een daling is van de concentratie van A $\beta$ <sub>O</sub> en voorts dat deze dissociëren waardoor de afname van A $\beta$  monomeren gedeeltelijk wordt gecompenseerd. Dit werd indirect afgeleid op basis van de analyse van de verandering in de concentraties van de A $\beta$  monomeren; Er waren ten tijde van dit onderzoek geen directe metingen van A $\beta$ <sub>O</sub> beschikbaar.

Bij klinisch onderzoek naar de werking van stoffen die een effect hebben op het APP netwerk, wordt vaak gebruik gemaakt van een stabiele-isotoop-techniek, waarbij na toediening van Leucine gemerkt met het stabiele isotoop <sup>13</sup>C de <sup>13</sup>C-gemerkte fracties A $\beta$  worden bepaald, volgens het zogenaamde ‘Stabel Isotope Labeling Kinetics (SILK)’ protocol. In het onderzoek dat is beschreven in **Hoofdstuk 3** werden de gegevens verkregen met het SILK protocol (de fracties <sup>13</sup>C-gemerkte sAPP $\beta$ , sAPP $\alpha$  en A $\beta$ ) gecombineerd met de absolute eiwitconcentratie metingen (**Hoofdstuk 4**;  $\beta$ -<sup>13</sup>C-APP model). Hierdoor werd een beter inzicht verkregen van enerzijds het gebrek aan dosis-evenredigheid in het effect van de BACE1-remmer op de fractie gelabeld sAPP $\alpha$  en anderzijds de aanwezigheid van zo’n dosis-proportionele respons in absolute sAPP $\alpha$  concentratie metingen. Verder werd er een discrepantie gevonden tussen de A $\beta$  reacties die werden gemeten met ELISA en SILK. Deze discrepantie wordt mogelijk veroorzaakt door de aanwezigheid van een onbekend APP fragment met verschillende kinetiek of door de aanwezigheid van een onbekend proces dat de meting van de fractie gelabeld A $\beta$  beïnvloedt.

De volgende stap in de ontwikkeling van het model was gericht op de afzonderlijke beschrijving van de achtereenvolgende APP splitsingsstappen door BACE1 en GS. Hiertoe werd in het derde onderzoek het  $\beta$ -APP model uitgebreid met de beschrijving van de

effecten van GS remming op  $A\beta_{40}$  en  $A\beta_{42}$  (**Hoofdstuk 5**;  $\beta$ - $\gamma$ -APP model). Deze analyse was gebaseerd op de combinatie van APP-metabolië-respons gegevens uit studies voor de BACE1-inhibitor MBI-5 (1 studie; metingen van  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ , sAPP $\beta$  en sAPP $\alpha$ ) en de GS-remmer MK-0752 (2 studies; metingen van  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ ). De analyse liet zien dat er een verschil is in  $A\beta$  dynamiek na BACE1 versus GS remming. Dit kwam tot uitdrukking in een andere waarde van de vormings-snelheidsconstante van  $A\beta_{40}$ . Bovendien werd op basis van het model een lagere  $A\beta$  oligomerisatie snelheid na remming van BACE1, in vergelijking met de remming van GS gevonden. Het was in dit onderzoek echter niet mogelijk om de waargenomen verschillen in  $A\beta$  dynamiek na remming van BACE1 en remming van GS van studieverschillen te onderscheiden. Daaropvolgend hebben we de voorspellingen van de  $A\beta_O$  respons na remming van BACE1 en remming van GS remming, zoals verkregen op basis van het  $\beta$ -APP model (**Hoofdstuk 3**) vergeleken met directe waarnemingen van de  $A\beta_O$  respons die zijn verkregen met behulp van een nieuwe analytische techniek. Hiertoe werden in een viervoudig volledig cross-over studie ontwerp de effecten van MBI-5 en MK-0752 op de CSV concentraties van vijf APP-metaboliëten (sAPP $\beta$ , sAPP $\alpha$ ,  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ ,  $A\beta_{38}$ ) en  $A\beta_O$  bepaald. Met deze studiegegevens werd het APP-systeemmodel op de volgende wijze aangevuld: (1) het  $\beta$ -APP model werd uitgebreid om de vorming van de  $A\beta$  isoform  $A\beta_{38}$  te karakteriseren en de  $A\beta_O$  respons metingen in reactie op BACE1 remming te beschrijven (**Hoofdstuk 6**;  $\beta$ -O-APP model); (2) het  $\beta$ -O-APP model werd vervolgens nog verder ontwikkeld om de respons gegevens na GS remming te beschrijven (op basis van de sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ ,  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ ,  $A\beta_{38}$ ,  $A\beta_O$  responsen) (**Hoofdstuk 7**;  $\beta$ - $\gamma$ -O-APP model).

In **Hoofdstuk 6** wordt het vierde onderzoek beschreven. Hierin werd de relatie tussen de oligomeerpoel in het  $\beta$ -APP model en de metingen van  $A\beta_O$  onderzocht en de relatie tussen de  $A\beta$  monomeren ( $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ ,  $A\beta_{38}$ ) en  $A\beta_O$  gekwantificeerd.  $A\beta_{42}$  werd geïdentificeerd als de  $A\beta$  variant die de  $A\beta$  oligomerisatie aandrijft. Dit is in overeenstemming met de algemene veronderstelling dat  $A\beta_{42}$  de  $A\beta$ -variant is die gevoelig is voor toxische aggregatie.

Vervolgens bleek dat  $A\beta$  oligomerisatie verloopt volgens een tweede-orde kinetisch proces. Dit betekent dat bij het remmen van  $A\beta$  productie, een relatief grotere verandering van  $A\beta_O$  ten opzichte van de basislijn wordt verkregen in vergelijking tot monomeren  $A\beta$  varianten. De dissociatie van  $A\beta_O$ s, om het evenwicht te herstellen met  $A\beta$  monomeren (homeostatische aanpassing), draagt ook bij aan het uiteindelijke geneesmiddeleffect.

In het vijfde onderzoek (**Hoofdstuk 7**) werd het  $\beta$ -O-APP model uitgebreid om

---

$A\beta_O$  responsmetingen na remming van respectievelijk BACE1- en remming van GS gelijktijdig te beschrijven. Hiertoe werden in het  $\beta$ - $\gamma$ -O-APP model de opeenvolgende APP splitsingsstappen door BACE1 en GS gescheiden, vergelijkbaar met de implementatie in het  $\beta$ - $\gamma$ -APP model. In deze analyse werd informatie over de  $sAPP\beta$ ,  $sAPP\alpha$ ,  $A\beta38$  en  $A\beta_O$  respons op remming van GS toegevoegd. Verrassend was dat stroomopwaarts in de APP vanaf de GS-splitsingsstap veranderingen in de concentraties van  $sAPP\beta$  en  $sAPP\alpha$  in reactie op de remming van GS werden waargenomen. Dit leidde tot de identificatie van een homeostatische terugkoppelingsmechanisme dat gereguleerd wordt via C99: de toename van C99 na GS remming stimuleerde  $\alpha$ -secretase verwerking van APP.

Voorts werd na remming van GS een andere verhouding  $A\beta42:A\beta40:A\beta38$  gevonden dan na remming van BACE1. Dit kon worden verklaard door de stapsgewijze en opeenvolgende splitsing van C99 door GS, waarbij een deel van  $A\beta38$  wordt gevormd vanuit  $A\beta42$ . Door de studies met de remmers van respectievelijk BACE1 en GS volgens een cross-over design uit te voeren, was het mogelijk de daadwerkelijke verschillen in het systeemgedrag in reactie op BACE1 versus GS remming aan te tonen. De lagere oligomerisatie snelheid na GS remming die werd gevonden in vergelijking met de remming van BACE1 waargenomen in de analyse op basis van van het  $\beta$ - $\gamma$ -APP model, kan worden verklaard door de incorporatie van de stapsgewijze en opeenvolgende splitsing van C99 door GS. In deze analyse waren de waarden van de systeemp parameters na BACE1 en GS remming identiek, wat suggereert dat een fysiologisch correcte beschrijving van de processen in het APP biologische netwerk is verkregen.

Concluderend is er een systeem-farmacologie model van de APP verwerkings- en klaringsroutes ontwikkeld. Dit model levert belangrijke kwantitatieve informatie over de routes van de verwerking van APP: (i)  $A\beta$ -oligomerisatie is een tweede-orde proces; (ii)  $A\beta_O$  dissociëren om het evenwicht te herstellen met  $A\beta$  monomeren, wat het uiteindelijke genesmiddelen effect beïnvloedt; (iii)  $A\beta42$  is de enige belangrijke  $A\beta$  monomeren variant die bijdraagt aan de oligomeerpoel; (iv) remming van GS stimuleert de niet-amyloïdogene verwerking van APP door homeostatische terugkoppeling die door C99 wordt uitgeoefend.

Een belangrijke vraag is hoe het model van de APP-paden in rhesusapen aangepast moet worden, om de effecten van genesmiddelen op de APP-paden in de mens op een kwantitatieve manier te voorspellen. In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift (**Hoofdstuk 8**) werden enkele voorlopige resultaten van de vertaling van rhesusapen naar mensen van de effecten van de remming van BACE1 gepresenteerd. Om het  $\beta$ - $\gamma$ -O-APP model van rhesusapen te vertalen naar de mens werd verondersteld dat de



waarden van de systeemparemeters in rhesusapen en mensen identiek zijn. Verder werd de vertraging tussen de cisterna magna en de lumbale regio, waar CSV gemeten wordt in mensen, beschreven door een reeks transitcompartimenten. De respons van  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  en  $sAPP\beta$  na een enkele dosis van de BACE1 remmer verubecestat (MK8931) bij gezonde vrijwilligers werd goed door het model voorspeld. Het model voorspelde na toediening van een enkele dosis van 100 mg dosis verubecestat een afname van 84% in de  $A\beta_{40}$  concentratie in de lumbale CSV bij de mens en een afname van 94% na herhaalde toediening gedurende 7 dagen in een dosering van 40 -150 mg.

Het APP-systeem-farmacologie model in rhesusapen kan op meerdere manieren van waarde zijn bij het ontwerpen en ontwikkelen van therapeutische interventies voor de ZvA, zoals werd besproken in **Hoofdstuk 8**. Ten eerste kan het model gebruikt worden om het SILK protocol te optimaliseren, met name met het oog op de beste timing van de  $^{13}C_6$ -Leucine infusie voor een eindpunt dat het dichtst bij het doel  $A\beta_{40}$  ligt. Daarbij is vooral het tijdstip van de toediening van de  $^{13}C_6$ -Leucine infusie ten opzichte van de toediening van het te onderzoeken farmacon van belang. Simulaties lieten zien dat de  $^{13}C_6$ -Leucine infusie het beste direct na de te onderzoeken stof kan worden toegediend.

Ten tweede kan het model worden gebruikt om een diagnostische test te ontwikkelen, vergelijkbaar met de glucosetolerantietest bij type 2 diabetes mellitus, met als doel in een vroeg stadium de ziekte van Alzheimer vast te stellen. Ten aanzien van de APP-paden kan het systeem dan worden geprikkeld door toediening van een secretase-remmer. Het model kan gebruikt worden om een dergelijke test te optimaliseren en systeemparemeters te onderzoeken die kunnen dienen als nieuwe biomarkers, indicatief voor de ernst van de ziekte en eventueel voorspellend voor de behandelingsrespons op APP-modulerende geneesmiddelen.

Ten derde kan het model worden gebruikt in de ontwikkeling van op de individuele patiënt toegesneden behandeling. De genetische heterogeniteit van de ZvA is hoog. Afhankelijk van het genotype kan de reactie op potentieel ziekte modifierende therapeutica, zoals secretase-remmers verschillend zijn. De genetische informatie geeft mogelijk aanwijzingen welke systeemparemeters aangepast moeten worden om de staat van de ziekte en op de individuele patient toegesneden interventies gericht op de APP-paden te beschrijven.

Ten vierde vormt het APP-systeem model de basis voor een ziekte-systeem analyse model van de ZvA, om ziekteprogressie en lange termijn behandelingseffecten te voorspellen. Hiertoe kan het model uitgebreid worden om ook de effecten op latere stroomafwaartse biomarkers te includeren, zoals amyloïd-PET, CSF-tau en biomarkers

---

voor neurodegeneratie als FDG-PET en MRI, alsmede gedrags-eindpunten (d.w.z. schaalwaarden zoals de ADAS-Cog score). Hierbij moet rekening gehouden worden met de correlaties tussen deze biomarkers, waarvoor longitudinale data in dezelfde individuen nodig zijn. Dergelijke data is momenteel zeldzaam.

Ten slotte, kan het  $\beta$ - $\gamma$ -O-APP model gebruikt worden om simulaties uit te voeren om interventies te onderzoeken die gericht zijn op de APP-paden. Tot nog toe konden klinische studies van  $A\beta$  productie-remmers (d.w.z. BACE1 en GS remmers) geen klinische werkzaamheid aantonen bij getolereerde doses in patiënten. Er zijn verschillende mogelijke verklaringen voor het gebrek aan werkzaamheid. Hierbij is een belangrijke vraag of de doelstelling zoals weerspiegeld in de blootstelling aan  $A\beta_O$  is bereikt.

Het  $\beta$ - $\gamma$ -O-APP model zou gebruikt kunnen worden om dit te voorspellen. Ook biedt het  $\beta$ - $\gamma$ -O-APP model de mogelijkheid om de netto reacties van het systeem op gecombineerde interventies gericht op verschillende doelen in de APP-paden te onderzoeken. Een veelbelovende strategie lijkt de preventie van toxische effecten, door het voorkomen van de interacties van giftige  $A\beta_O$ s met doelreceptoren. Voor een effectieve onderdrukking van de  $A\beta_O$  concentraties en de toxische effecten is het waarschijnlijk noodzakelijk is om rationele combinaties van geneesmiddelen te gebruiken die zich op meerdere doelen in het systeem richten. Zodra het  $\beta$ - $\gamma$ -O-APP model wordt uitgebreid met een receptor-interactie modelcomponent voor  $A\beta_O$ -receptor interacties, kan de gecombineerde interventie van een  $A\beta$  productie-remmer en preventie van de interactie van  $A\beta_O$ s met het receptor doelwit worden onderzocht, zodat therapie kan worden geoptimaliseerd.

Het APP-systeem-farmacologie model kan het optimaliseren van de therapeutische interventie om de oligomeer-last in de ZvA te verlagen dichterbij brengen. Dit proefschrift illustreerde dat systeem-farmacologie modelering een krachtige aanpak is in de geïntegreerde analyse van biologie en farmacologie om systeem-geneesmiddel interacties te beoordelen. Vanwege een algemeen pathologisch principe kan deze benadering ook worden gebruikt voor andere eiwit-misvouwingen gerelateerde neurodegeneratieve ziekten zoals ZvP, ZvH en ALS.