

Apolipoproteins E and C1 in the brain: role in Alzheimer's disease

Citation for published version (APA):

Abildayeva, K. (2006). *Apolipoproteins E and C1 in the brain: role in Alzheimer's disease*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2006

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is a devastating neurodegenerative condition affecting increasing amount of elderly worldwide. Accumulating body of evidence demonstrates an important role for cholesterol in the pathogenesis of AD. The role of cholesterol in brain and its connection to AD is thoroughly explained in the General Introduction chapter as well as the detailed background of existing hypothesis of AD. The chapter also gives an overview on the role of apolipoproteins E and C1 in brain and on the regulation of LXR-mediated genes involved in cholesterol metabolism. Furthermore, potential treatments of AD as well as critical aspects of the action of statins have been described in the Introduction part of the thesis.

Since apoE4 is a well known risk factor for the development of AD and apoE is a key lipid transporter in brain, it has been hypothesized that apoE affects AD development via isoform-specific effects on lipid trafficking between astrocytes and neurons. In this thesis we show (**Chapter 2**), for the first time, that the brain-specific metabolite of cholesterol produced by neurons, i.e. 24(S)-hydroxycholesterol induces apoE transcription, protein synthesis and secretion via LXR mediated pathway. Moreover, 24(S)-hydroxycholesterol primes astrocytoma, but not neuroblastoma cells, to mediate cholesterol efflux to apoE. Furthermore, apoE-mediated cholesterol efflux from astrocytoma cells may be controlled by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1, since their expression was also upregulated by 24(S)-hydroxycholesterol. Since we demonstrated LXRs mediated the effect of the natural brain specific 24(S)-hydroxycholesterol in brain cholesterol metabolism using *in vitro* experimental approach, we further addressed the effect of LXR activation *in vivo*. **In Chapter 3** we show that long-term treatment of C57Bl6/J mice with the synthetic LXR agonist T0901317 persistently enhances whole body cholesterol turnover and also affects brain cholesterol metabolism. T0901317 treatment significantly increased brain cholesterol precursor levels (lathosterol and desmosterol), while brain cholesterol levels were not affected. Upon treatment no significant changes were observed in brain levels of 24(S)-hydroxycholesterol suggesting additional pathway of cholesterol secretion. T0901317 upregulated the expression of ABCA1, ABCG1 and apoC1. These genes may be involved in the increased sterol flux within the brain or across the blood-brain barrier. Up to now, it is considered that plant sterols cannot reach the brain; similar to cholesterol. Nevertheless, we found that campesterol in particular accumulates in the brain. After the treatment with T0901317 the brain levels of campesterol decrease and brain levels of sitosterol remain unchanged, while the plasma levels of both types of plant sterol decrease in plasma. Our results strongly indicate that prolonged administration of the LXR-agonist T0901317 to wild-type C57BL/6 mice enhances whole body cholesterol turnover including that in the brain. Thus, pharmacological interference with the LXR system may be applicable to assess the role of cholesterol metabolism in the brain in health and in neurodegenerative disease, including Alzheimer's disease.

Summary

Our results described in **Chapter 4** suggest that an accumulation of plant sterols in the brain may exert specific effects and as a result may affect brain function. Dietary plant sterols and cholesterol have a comparable chemical structure. It is generally assumed that cholesterol and plant sterols do not cross the blood–brain barrier, but quantitative data are lacking. We demonstrate that mice deficient for ATP-binding cassette transporter G5 (ABCG5) or ABCG8, with strongly elevated serum plant sterol levels, display dramatically increased (7- to 16-fold) plant sterol levels in the brain. Although apoE-deficient mice also displayed elevated serum plant sterol levels, the brain plant sterol levels were not significantly changed. ABCG5- and ABCG8-deficient mice were found to carry circulating plant sterols predominantly in HDL-particles, whereas apoE-deficient mice accommodated most of their serum plant sterols in VLDL-particles. This suggests an important role for HDL and/or ApoE in the transfer of plant sterols into the brain. Moreover, sitosterol upregulated apoE mRNA and protein levels in astrocytoma, but not in neuroblastoma cells, to a higher extent than cholesterol. In conclusion, dietary plant sterols pass the blood–brain barrier and accumulate in the brain, where they may exert brain cell type-specific effects.

In **Chapter 3** we demonstrated that upon T0901317 treatment, the expression of apoC1, which belongs to the same gene cluster as apoE, increased almost 3-fold, further sustaining an important role for apoC1 in brain. The physiological role for apoC1 in brain still remains a fascinating and enigmatic question, especially due to the fact that there were mostly epidemiological studies performed in the area. Interestingly, APOE4 is in genetic linkage disequilibrium with the *HpaI* restriction polymorphism in the promoter region of APOC1, which is localized 5 kb downstream of the APOE gene on chromosome 19. The *HpaI* polymorphism (so-called H2 allele) leads to a highly significant, 1.5-fold increase in APOC1 gene transcription and was reported to be associated with AD. Moreover, the H2 allele of APOC1 was associated with poorer memory and frontal lobe function, and with loss of hippocampal volumes. This has led to the hypothesis that the H2 allele of APOC1, rather than the APOE4 allele, provides a major risk factor for AD. Therefore, in **Chapters 5** and **6** we attempted to clarify the functions of apoC1 in brain. To investigate a possible role for apoC1 in cognitive functions we used *human APOC1*^{+/-0} transgenic mice (**Chapter 5**) and APOC1^{-/-} knockout mice (**Chapter 6**).

In **Chapter 5** we demonstrated for the first time that expression of human apoC1 impairs learning and memory functions in mice as indicated by the results obtained from the object recognition and Morris water maze tasks. These effects of apoC1 on memory may depend on its well known inhibitory properties towards apoE-dependent lipid metabolism. However, no effects of hAPOC1 on brain mRNA or protein levels of endogenous apoE were detected. Neither were there any detectable differences in the overall sterol or phospholipids profile in the brain. In addition, analysis of gene expression profiles did not indicate gross changes in brain lipid metabolism or inflammation. We found that the apoC1 protein is present mainly in astrocytes and endothelial cells within hippocampal regions of both control and AD brains. Surprisingly, it also co-localized with β -amyloid in plaques in brain specimens of AD patients. In vitro apoC1 peptide was found to inhibit A β peptide aggregation. In conclusion, apoC1 expression impairs cognitive functions in mice independent of apoE

expression, which strongly suggests that apoCI has a modulatory effect during the development of Alzheimer's disease.

Our next step was to hypothesize that apoC1-deficiency in mice might enhance cognitive functions (Chapter 6). However, surprisingly, this work shows that the absence of apoCI also impairs memory functions in mice. In comparison with their wild-type littermates, the APOC1^{-/-} mice displayed impaired hippocampal-dependent memory functions as indicated their performance in an object recognition task. Therefore it can be concluded that the APOC1^{-/-} mice are impaired in their learning and (recognition) memory processes. These results were unexpected since the transgenic mice expressing human apoC1 showed a comparable to APOC1^{-/-} mice behavioral pattern in the object recognition task.

Finally, **Chapter 7** gives an overview on vascular aspects in the development of AD. At present, cardiovascular afflictions, hypertension and diabetes constitute accepted risk factors for vascular dementia (VaD) and have gained importance for AD.

The results described in this thesis elucidate partly the mechanism(s) underlying the regulation of apoE-mediated neuronal cholesterol supply by astrocytes, providing insight into a role of the natural brain specific 24(S)-hydroxycholesterol as a key regulator. Moreover, we provide evidence that not only APOE4, but also the H2-allele of APOC1 is a risk factor for AD. We showed that apoCI is present in plaques in AD brains and that apoCi directly interacts with amyloid. Overexpression of apoCI in mice impairs learning and memory processes supporting an important role for apoCI in the brain. Together, these findings provide novel insights into the role of apoE and apoC1 in the brain and into the development of AD.

In conclusion, in **Chapter 8**, the main findings are summarized, discussed and related to current literature.

Samenvatting

Alzheimerdementie (AD) is een zeer invaliderende neurodegeneratieve aandoening die almaar meer ouderen over de hele wereld treft. Wetenschappelijk onderzoek levert steeds meer aanwijzingen dat cholesterol een belangrijke rol speelt in de pathogenese van AD. De rol van cholesterol in de hersenen en het verband met AD worden uitgebreid uitgelegd in het hoofdstuk **Algemene inleiding**, waar ook de gedetailleerde achtergrond wordt gegeven van bestaande hypothesen voor AD. Het hoofdstuk geeft ook een overzicht van de rol bij het cholesterol metabolisme betrokken eiwitten en genen zoals apolipoproteïnen E (apoE) en C1 (apoC1), eiwitten die een rol spelen in het cholesterol metabolisme, in de hersenen en de regulatie van LXR-gemedieerde genen. Verder worden mogelijke behandelingen voor AD en de specifieke aspecten van de werking van statines beschreven in de **Inleiding** van de proefschrift.

Aangezien apoE4 is een bekende risicofactor is voor de ontwikkeling van AD en apoE een belangrijke lipidetransporter is in de hersenen, werd de hypothese gesteld dat apoE de ontwikkeling van AD beïnvloedt doordat de isovormen een verschillend effect zouden hebben op het verkeer van lipiden tussen astrocyten en neuronen. In deze thesis (**Hoofdstuk 2**) tonen we voor het eerst aan dat de metabool van cholesterol die specifiek in de hersenen wordt geproduceerd door neuronen (namelijk 24(S)-hydroxycholesterol) de transcriptie, eiwitsynthese en de uitscheiding van apoE induceert via de reacties gemedieerd door LXR route. Bovendien activeert 24(S)-hydroxycholesterol in astrocyten, maar niet neuronen, de uitscheiding van cholesterol en apoE. De apoE-gemedieerde efflux van cholesterol uit astrocyten gereguleerd te worden door de ABC-transporteiwitten (ATP-bindende cassette) ABCA1 en ABCG1, aangezien hun expressie ook opgereguleerd werd door 24(S)-hydroxycholesterol.

Sinds we *in vitro* hebben aangetoond dat LXR het effect van de natuurlijke hersenspecifieke 24(S)-hydroxycholesterol op het cholesterolmetabolisme in de hersenen medieert, hebben we het effect van de activering door LXR *in vivo* verder bestudeerd. In **hoofdstuk 3** tonen we aan dat langdurige behandeling van C57Bl6/J-muizen met de synthetische LXR-agonist T0901317 de turnover van cholesterol niet alleen in de periferie maar ook in de hersenen versnelt. Behandeling met T0901317 verhoogt significant de concentraties van cholesterolprecursors in de hersenen (lathosterol en desmosterol), waarbij de hersencholesterolspiegel onveranderd blijft. Na de behandeling werden er geen significante veranderingen waargenomen in de hersenconcentraties van 24(S)-hydroxycholesterol, wat erop wijst dat cholesterol via een andere weg wordt uitgescheiden. T0901317 versterkte de expressie van ABCA1, ABCG1 en apoC1. Deze genen zouden betrokken kunnen zijn bij de sterolfluxen in de hersenen of over de bloed-hersenbarrière.

Tot nu toe werd verondersteld dat plantensterolen evenmin als cholesterol doordringen in de hersenen. Wij hebben echter vastgesteld dat van de plantsterolen vooral campesterol in de hersenen accumuleert. Na de behandeling met T0901317 daalde de hersenspiegel van campesterol. De hersenspiegel van sitosterol verandert niet, terwijl de

plasma'spiegel van beide types plantensterolen wel daalt in het plasma. Onze resultaten wijzen er sterk op dat langdurige toediening van de LXR-agonist T0901317 aan wild-type C57BL/6 muizen de turnover van cholesterol in het hele lichaam, en dus ook in de hersenen, versnelt. Farmacologische interferentie met het LXR-systeem kan worden toegepast om de rol te evalueren van het cholesterolmetabolisme in gezonde hersenen en bij neurodegeneratieve aandoeningen, waaronder ook de ziekte van Alzheimer.

In de resultaten beschreven in **Hoofdstuk 4** vinden we aanwijzingen dat een stapeling van plantensterolen in de hersenen specifieke effecten kan hebben op hersenfuncties. Plantensterolen in de voeding en cholesterol hebben een vergelijkbare chemische structuur. Zoals gezegd wordt algemeen aangenomen dat cholesterol en plantensterolen niet door de bloed-hersenenbarrière dringen, maar kwantitatieve gegevens ontbreken nog. We tonen aan dat bij muizen met een deficiëntie voor de ABC-transporteiwitten (ATP-bindende cassette) G5 (ABCG5) of ABCG8 bij zeer hoge serumplantensterolspiegels de concentratie van deze sterolen in de hersenen zeer sterk stijgt (7 tot 16 keer). Hoewel apoE-deficiënte muizen ook een verhoogde serumplantensterolspiegel vertonen, veranderde de plantensterolconcentratie in de hersenen niet. ABCG5- en ABCG8-deficiënte muizen bleken de circulerende plantensterolen overwegend te transporteren in high density lipoprotein (HDL)-partikels, terwijl apo-E-deficiënte muizen de meeste van hun serumplantensterolen meedroegen in very low density lipoprotein (VLDL)-partikels. Dit wijst op een belangrijke rol voor HDL en/of apoE in het transport van plantensterolen in de hersenen. Bovendien werden de spiegels van apoE mRNA en -eiwit door sitosterol opgereguleerd in astrocyten-, maar niet in neuronen, en dit in hogere mate dan door cholesterol. De conclusie is dus dat plantensterolen door de bloed-hersenenbarrière dringen en zich opstapelen in de hersenen, waar ze celtypespecifieke effecten kunnen uitoefenen.

In **hoofdstuk 3** hebben we aangetoond dat na behandeling met T0901317 de uitdrukking van apoC1, dat tot dezelfde gencluster behoort als apoE, bijna verdrievoudigde, wat een verdere aanwijzing is voor de belangrijke rol van apoC1 in hersenen. De fysiologische rol van apoC1 in de hersenen blijft nog steeds een intrigerend mysterie, want er zijn alleen nog maar epidemiologische studies uitgevoerd op dit gebied. Interessant is dat het genetische evenwicht tussen apo-E4 en het polymorfisme in de *HpaI*-restrictie in het promotorgebied van apoC1, 5 kb stroomafwaarts van het apo-E-gen op chromosoom 19, verstoord is. Het *HpaI*-polymorfisme (in het H2-allel) leidt tot een zeer significante stijging met een factor 1,5 in de transcriptie van het apoC1 gen. Dit werd ook geranden bij AD. Bovendien ging het H2-allel van apo-C1 gepaard met een slechter geheugen en functioneren van de frontale kwab, en met een volumeverlies van de hippocampus. Dit heeft geleid tot de hypothese dat het H2-allel van apoC1, en niet het apoE4-allel, een belangrijke risicofactor voor AD zou zijn. Daarom hebben we in **hoofdstukken 5 en 6** geprobeerd om de functies van apoC1 in de hersenen op te helderen. Om de mogelijke rol voor apoC1 te onderzoeken voor de cognitieve functies, hebben we *humaan apoC1⁺⁰* transgene muizen (**hoofdstuk 5**) en apo-C1^{-/-} knockout-muizen (**hoofdstuk 6**) gebruikt. In **hoofdstuk 5** hebben we voor het eerst aangetoond dat de expressie van *humaan apoC1* bij muizen de leer- en geheugenfuncties verstoort, wat bleek uit de resultaten voor objectherkenning staak "Morris water maze". Deze effecten van apoC1 op het

geheugen kunnen afhangen van de bekende inhiberende eigenschappen op het apoE-afhankelijke lipidemetabolisme. Er werden echter geen effecten van apoC1 op de mRNA- of eiwitconcentraties van endogeen apoE in de hersenen gedetecteerd. Ook viel er geen verschil te onderscheiden in het algemene sterol- of fosfolipidenprofiel in de hersenen. Bovendien wees de analyse van genexpressieprofielen niet op globale veranderingen in het lipidemetabolisme of op ontstekingsprocessen in de hersenen. We hebben ontdekt dat het apoC1 eiwit hoofdzakelijk voorkomt in astrocyten en endotheelcellen in de hippocampus van hersenen met en zonder AD. Vreemd genoeg viel dit ook samen met de β -amyloïdplaques in hersenen van AD patienten. *In vitro* bleek dat het apoC1 eiwit de aggregatie van het A β -peptide remde. We concludeerden dat de overexpressie van humaan apoC1 de cognitieve functies bij muizen verstoort en dat dit onafhankelijk is van effecten van apoE, wat er sterk op wijst dat apo-C1 een modulerende invloed heeft tijdens de ontwikkeling van AD.

Onze volgende stap was het testen van de hypothesen dat apo-C1-deficiëntie bij muizen de cognitieve functies zou verbeteren (**hoofdstuk 6**). Tot onze verbazing bleek dat de afwezigheid van apo-C1 evenzeer de geheugenfuncties verstoort bij muizen. In vergelijking met hun wild-type broertjes vertoonden de apo-C1^{-/-} muizen verstoorte hippocampusafhankelijke geheugenfuncties zoals bleek uit hun prestaties in objectherkenningstaken. Dit duidt wederom op een belangrijke rol voor apoC1 bij leer- en geheugen functies.

Hoofdstuk 7 geeft een overzicht van de vasculaire aspecten in de ontwikkeling van AD. Sinds enige tijd zijn cardiovasculaire aandoeningen, hypertensie en suikerziekte algemeen aanvaarde risicofactoren voor vasculaire dementie (VaD) en de kennis over hun rol in AD neemt ook toe.

De resultaten beschreven in dit proefschrift bieden nieuwe inzichten in de mechanismen die ten-grondslag liggen aan de regulatie van de apoE-gemedieerde cholesterolvoorziening van neuronen door astrocyten. De data duiden erop dat 24(S)-hydroxycholesterol, de hersenspecifieke metabooliet van cholesterol, hierbij een sleutelrol speelt. Verder zijn er aanwijzingen dat niet alleen APOE4, maar ook het H2-allel van APOC1 een risicofactor is voor AD. We laten zien dat apoC1 aanwezig is in plaques in AD hersenen en dat apoC1 direct een interactie kan aangaan met amyloid. Overexpressie van apoC1 in muizen leidt tot verstoorte leer- en geheugenfuncties. Samengevat, leiden deze bevindingen tot meer inzicht in de rol van zowel apoE als apoC1 in gezonde hersenen en bij de ontwikkeling van AD.

Tot slot worden in **hoofdstuk 8** de voornaamste bevindingen samengevat, besproken en in verband gebracht met de bestaande literatuur.