

VU Research Portal

Biological reflections in body fluids of multiple sclerosis progression and multiple sclerosis-related fatigue

Malekzadeh, A.

2020

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Malekzadeh, A. (2020). *Biological reflections in body fluids of multiple sclerosis progression and multiple sclerosis-related fatigue*. [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

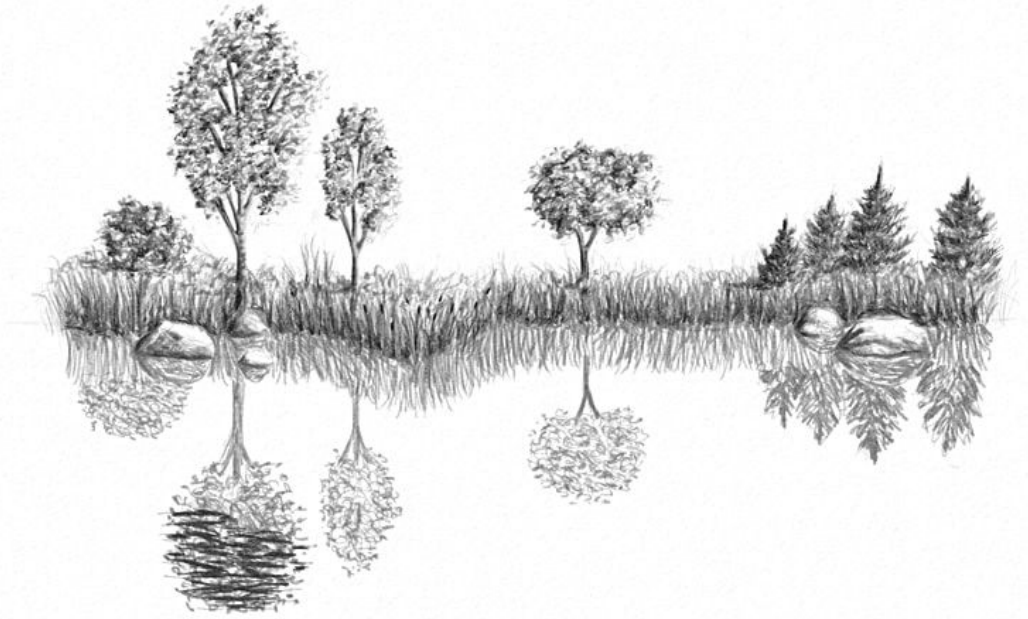
Take down policy

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

Nederlandse samenvatting



Wat is multiple sclerosis

Multiple sclerose (MS) is de meest voorkomende niet-traumatische neurologische aandoening bij jong volwassenen. De diagnose MS heeft niet alleen een groot effect op de gezondheid van de patiënten, maar heeft ook grote gevolgen voor het sociale leven, het werk, de studie en de gezinsplanning van de patiënten. Deze enorme belasting wordt vaak verergerd door de onvoorspelbare aard van de ziekteprogressie. Een van de symptomen die de sociale en economische participatie in een vroeg stadium beperkt, is MS-gerelateerde vermoeidheid. MS-gerelateerde vermoeidheid is een van de meest gerapporteerde en erkende symptomen, maar er bestaat geen consensus over de definitie van vermoeidheid bij MS [1]. De subjectieve aard en het gebrek aan pathofysiologisch inzicht in MS-gerelateerde vermoeidheid maken het moeilijk om MS-gerelateerde vermoeidheid te behandelen of te verlichten. Waarschijnlijk is MS-gerelateerde vermoeidheid multifactorieel en er zijn verschillende pathofysiologische mechanismen geformuleerd; a) een disbalans in pro- en anti-inflammatoire cascades, b) een ontregeling van de hypothalamus-hypofyse-bijnier (HPA) as, c) een verminderde zenuwgeleiding, d) een ontregeling van mitochondriaal energiebalans, e) neuro-endocrine en of neurotransmitter-dysregulatie [2],[3]. De onderliggende oorzaak en progressie mechanismen van MS zijn nog steeds niet geïdentificeerd, hoewel genetische gevoeligheid (vooral in immuunsysteem geassocieerde genen) samen met verschillende omgevingsfactoren geassocieerd zijn met MS-pathogenese [4],[5]. Daarom zijn de meeste van de huidige medicijnen gericht op de remming van de immuunrespons en hebben slechts een matige effectiviteit in het vertragen van het MS ziektebeloop.

Bovendien bestaan er geen klinisch gevalideerde biologische markers (biomarkers) die de progressie van MS of MS-gerelateerde vermoeidheidsmechanismen weerspiegelen. De ontdekking van deze biomarkers zou inzicht kunnen geven in de progressie van MS en MS gerelateerde vermoeidheidsmechanismen, en kan mogelijk leiden tot nieuwe therapeutische doelen.

In dit proefschrift hadden wij twee verschillende doelen: 1) het ontdekken van biomarkers in bloed, die gebruikt kunnen worden als prognostische biomarkers en die verschillende progressietypen van MS kunnen

onderscheiden, en 2) bepalen of HPA-assen en inflammatoire cascades gerelateerd zijn aan MS-gerelateerde vermoeidheid.

Omica-tijdperk en biologische markers voor MS

In de afgelopen decennia hebben we een enorme ontwikkeling gezien in hypothese-vrije benaderingen van het onderzoek naar MS-biomarkers. Eiwitten zijn de functionele werkeenheden zowel inter- als intra-cellulair en worden waarschijnlijk het meest beïnvloed door ziektemechanismen, zoals de ontstekingsreactie en de herstelmechanismen. De meeste studies naar MS-biomarkers hebben zich gericht op MS-genomics en proteomics, terwijl transcriptomics en metabolomics nu meer belangstelling krijgen en nieuwe kandidaat-biomarkers bieden.

In **hoofdstuk 1** hebben we gepubliceerde data uit hypothese-vrije omicsstudies (genomics, transcriptomics en proteomics) beoordeeld vanuit een systeem-biologisch oogpunt. Dit om inzicht te krijgen in de pathofysiologie van MS, door het identificeren van overlappende cel- en pathofysiologische mechanismen [6]. Hierdoor hebben we ons vooral gericht op niet-HLA-gen-polymorfisme, om inzicht te krijgen in andere onderliggende pathofysiologische MS mechanismen. Enkele interessante immuunsysteem-geassocieerde loci zijn; IL-7RA, IL-2R, TNFRSF1A, CD40, CD6, CD58 en PTGER4. Interessant is dat de meeste van deze genen transmembraanreceptoren coderen die betrokken zijn bij T- en B-celactivatie en homeostase. Dit wijst erop dat genen die geassocieerd zijn met MS, hoofdzakelijk betrokken zijn met de homeostase van de T-cellen en dat T-cellen daarom betrokken kunnen zijn bij het ontstaan van de mechanismen van MS.

Een van de bekende omgevingsfactoren die geassocieerd wordt met MS is vitamine D [6],[7]. Zowel geografische als biologische gegevens suggereren dat lage vitamine D-niveaus geassocieerd zijn met een hoger risico op het ontwikkelen van MS. Een groot deel van de vitamine D-signalering vindt plaats door de binding van vitamine D aan de vitamine D-receptor (VDR). Vervolgens bindt het VDR complex aan specifieke genoomsequenties, bekend als vitamine D-response-elementen (VDRE), die zich vaak in de buurt van gen-promotor gebieden bevinden en de gentranscriptie beïnvloeden. Er is aangetoond dat een VDRE zich in de buurt van de promotorregio van het HLA-DRB-gen bevindt, maar de exacte rol van VDRE in relatie tot het HLA-DRB-gen is onbekend.

Bovendien hebben we in **hoofdstuk 1** eiwit biomarkers verdeeld in immuun- en neuro-gliaal homeostase-geassocieerde eiwitten. Interessant is dat we, in overeenstemming met anderen, een significante toename van C3 in het plasma van MS-patiënten hebben waargenomen (hoofdstuk 3), met EDSS-progressie en toename van de hersenatrofie. Complement activatie is een bekend mechanisme in laesies, waarbij laesies worden omgeven door complement receptor-positieve microglia en bijdragen aan onomkeerbare MS-progressie. Bovendien werden differentiële C3-bloedwaarden waargenomen bij presymptomatische en symptomatische MS-patiënten in vergelijking met gezonde controles [8]. Het is mogelijk dat de activatie van C3 bij laesie omgeving en systemische activatie, MS ziekteprogressie kan weerspiegelen, maar validatie in grotere en onafhankelijke cohorten is vereist.

In **hoofdstuk 2** hebben we veelbelovende biomarkers die in onafhankelijke studies en cohorten zijn gerepliceerd, beoordeeld en samengevat. Interessant is dat er een belangrijke rol van de humorale respons in hersenvocht (CSF), voor de diagnose en prognose van MS is waargenomen. Met de aanwezigheid van, immunoglobuline G (IgG) oligo-clonale banden (OCB), IgM OCB en antilichamen tegen mazelen, rodehond en varicella zoster (MRZ-reactie). Andere interessante immuun geassocieerde biomarkers zijn chitinase-3-achtige proteïne 1 (CHI3L1) en C-X-C-motief chemokine 13 (CXCL13). CHI3L1 is vermoedelijk betrokken bij T-helpercel homeostase en weefsel remodellering, en hoge niveaus van CHI3L1 in CSF en serum zijn geassocieerd met CIS-patiënten en een snellere conversie naar RRMS. CXCL13 is een chemokine die betrokken is bij het aantrekken van B-cellen en B-celactivatie. Hogere CXCL13 CSF-niveaus werden waargenomen bij CIS-, RRMS- en progressieve MS-patiënten in vergelijking met niet-inflammatoire neurologische controles. Bij zowel CXCL13 als CHI3L1 wordt de toepassing als diagnostische en/of prognostische biomarkers beperkt door gebrek aan specificiteit; deze markers zijn vaak verhoogd bij andere ontstekings- en infectieziekten.

Axonaal en neuronaal letsel zijn kenmerkend voor de progressie van MS en daarom kunnen structurele bouwstenen voor neuronale/axonale integriteit interessant zijn als diagnostische en/of prognostische biomarkers. Neurofilamenten komen tot uiting in axonen en dendrieten. De lichte neurofilament (NFL) en zware (NfH) zijn naar voren gekomen als veelbelovende biomarkers bij meervoudige proteopathische

neurodegeneratieve ziekten waaronder MS. In conclusie, een combinatie van ontstekingsmarkers met axonale biomarkers zou een MS-specifiek profiel kunnen opleveren dat kan worden gebruikt voor het monitoren van de MS pathologie en de therapeutische respons.

In **hoofdstuk 3** hebben we hypothesevrije proteomics uitgevoerd in het bloed van MS-patiënten, door het toepassen van een nieuwe aptameer technologie. Tot nu toe lag de focus van de ontdekte biomarkers voor MS-proteïnen vooral op proteomics van het CSF, vaak met behulp van chromatografie-massaspectrometrie (LC-MS). De nieuwe aptamer proteomics bindt conformationele eiwit epitopen met een hoge specificiteit en gevoeligheid. Deze array is in staat om >1000 verschillende eiwitten met een breed dynamisch bereik (>8 logs van concentratieverschil) in het bloed te detecteren. Aangezien het immuunsysteem van de periferie betrokken is bij de veronderstelde auto-immuun pathologie van MS, hebben we ons gericht op het ontdekken van eiwit biomarkers in het bloed plasma van MS-patiënten met een verschillende mate van ziekteprogressie. Bovendien hadden we toegang tot baseline en vervolg waarden van verschillende MRI-progressie parameters (T1-hypo-intensiteit volume, T2-laesie volume, percentage hersenvolumeverandering (PBVC)).

Verschillende interessante markers die significant geassocieerd zijn met EDSS-progressie waren; LGALS8 (Lectine, Galactoside-Binding, Oplosbaar 8), CCL3 (Macrophage Inflammatory Protein 1-Alpha), TNFRSF13B (TNF Receptor Superfamilielid 13B), RGMA (Repulsive Guidance Molecule Family Member A) en CDH1 (E-Cadherin). Bij toename van het T1- hypo-intensiteit volume en de T2-laesie volume werden verhoogde niveaus van het plasma PIK3CA/PIK3R1-complex waargenomen. Tot slot werden acht plasma-eiwitten significant geassocieerd met PBVC; C3 (Complement C3-fragment a en d), FGF9 (Fibroblast-groefactor 9), MATK (Megakaryocyte-geassocieerde Tyrosine Kinase), LTBR (Lymphotoxin Beta Receptor), ESR1 (Oestrogenreceptor 1), CTSE (Cathepsine E) en EHMT2 (Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2). Toenemende PIK3CA/PIK3R1-complexniveaus in het bloed werden waargenomen voor beide MRI-letselparameters. Het PIK3CA/PIK3R1-complex is betrokken bij de activering van T- en B-cel en de regulering van de zelf-antigeen herkenning. PIK3CA/PIK3R1 bloedspiegels zouden een indicatie kunnen zijn van een onevenwichtige activering van T- en B-cellen en veranderde zelf herkenningsmechanismen en een weerspiegeling kunnen zijn van de

progressie van MS. Daarnaast zagen we een sterke associatie van C3 en EHMT2 met hersenatrofie, met hogere C3- en lagere EHMT2-plasmaspiegels gerelateerd aan toenemende hersenatrofie. Bovendien is aangetoond dat de aanwezigheid van C3 samen met andere complementaire factoren en Fibronectin-aggregaten bij laesies remyelinisatie kan voorkomen en differentieel gereguleerd zijn in serum van pre-symptomatische en symptomatische MS-patiënten [8]. EHMT2 is een methyltransferase en is betrokken bij demethylering van histon H3 bij lysine 9. Dit resulteert in de rekrutering van andere transcriptie-regulators en resulteert in onderdrukking van de transcriptie. In vitro studies tonen aan dat EHMT2 betrokken is bij maturatie van neuronale en immature oligodendrocyten en nodig is voor de maturatie van oligodendrocyten [9]. Het is waarschijnlijk dat EHMT2 bij voortdurende MS-progressie een weerspiegeling is van veranderde epigenetische mechanismen die worden veroorzaakt door een pro-inflammatoire laesieomgeving en inzicht geeft in veranderde epigenetische pathways die geassocieerd worden met MS.

Deel 2. Multiple scleroses-gerelateerde vermoeidheid

Een van de meest opvallende en invaliderende MS-verschijnselen is de ervaring van vermoeidheid. Het belang van MS-gerelateerde vermoeidheid als invaliderend symptoom is bekend, maar de onderliggende mechanismen van MS-gerelateerde vermoeidheid blijven onbekend. MS-gerelateerde vermoeidheid kan worden onderverdeeld in primaire vermoeidheid of secundaire vermoeidheid. Primaire vermoeidheid wordt beschouwd als een gevolg van specifieke MS-pathofysiologie. Terwijl secundaire vermoeidheid kan worden toegeschreven aan factoren die niet uniek zijn voor MS, maar symptomen zijn die gepaard gaan met MS, zoals slaapstoornissen als gevolg van spasmen of incontinentie, depressie en gebrek aan fysieke conditie. De exacte pathofysiologie van MS-gerelateerde vermoeidheid blijft onbekend.

In dit proefschrift veronderstellen we dat disbalans in het ontstekingsstelsel en of de hypothalamus- hypofyse- bijnier (HPA)-as mechanismen geassocieerd zijn MS- gerelateerde vermoeidheid veroorzaken. We beoordeelden of de balans binnen deze fysiologische mechanismen zou herstellen en vermoeidheidsvermindering zou optreden met behulp van verschillende niet-farmacologische therapieën: aerobische training (AT), cognitieve gedragstraining (CBT) en energiebesparing management (ECM).

MS-gerelateerde vermoeidheid

In **hoofdstuk 4** hebben we een literatuurstudie uitgevoerd om de technische kenmerken (gevoeligheid, specificiteit, reproduceerbaarheid en nauwkeurigheid) van twee veelgebruikte multiplex arrays, Luminex xMAP en Meso Scale Discovery (MSD) voor cytokine kwantificatie in lichaamsvloeistoffen te vergelijken. We wilden vooral de technische karakteristieken aanpakken die gepaard gaan met multiplex-platformen in vergelijking met de gouden standaard ELISA voor cytokine kwantificatie in verschillende lichaamsvloeistoffen. In **hoofdstuk 4** concludeerden we dat de multiplex-platformen in staat zijn om cytokines te kwantificeren die vergelijkbaar zijn met ELISA wanneer ze gebruikt worden voor celkweek supernatanten. Echter, voor bloed werden alleen de overvloedig aanwezige cytokinen betrouwbaar gekwantificeerd voor de multiplex-platformen. Deze resultaten wijzen op mogelijke gevoeligheids- en specificiteitsproblemen met de multiplex-platformen voor het kwantificeren van cytokinen in het bloed.

Bovendien is het gebruik van cytokine- en chemokine profielen voor MS een uitdaging vanwege de inconsistente data over verschillende cytokinen en chemokinen die in verband worden gebracht met MS. Tot slot bieden multiplex-platforms nieuwe manieren om meerdere cytokinen te detecteren die kunnen worden gebruikt voor de monitoring van MS. Echter de technische uitdagingen met betrekking tot de gevoeligheid voor laag geconcentreerde cytokinen in het bloed, mogelijke kruisreactiviteit in de multiplex setting, moeten worden verbeterd voordat multiplex-immunoassays toegepast kunnen worden voor cytokinen kwantificatie in het bloed.

In **hoofdstuk 5** hebben we de technische kenmerken van het Luminex- en MSD-platform experimenteel vergeleken voor cytokinen kwantificatie van meerdere pro-inflammatoire cytokines (IL-1, IL-6, IL-8 en TNF-) in serum en CSF. Over het algemeen waren de validatie-eigenschappen van de MSD-assay beter voor de kwantificatie van IL-6, IL-8 en TNF- in serum en CSF. Vervolgens hebben we met de MSD-assay de niveaus van de pro-inflammatoire cytokines (IL-1, IL-6, IL-8 en TNF-) bepaald in gepaarde serum- en CSF samples van MS-patiënten en vergeleken met controles. We zagen een significante toename van IL-6, IL-8 voor alle MS-subtypes in vergelijking met gezonde controles, terwijl TNF- α serum niveaus alleen verhoogd waren in PPMS patiënten in vergelijking met gezonde controles. Bovendien, zagen we een significante negatieve associatie van IL-1 β met EDSS, wat aangeeft dat er bij EDSS progressie minder IL-1 β niveau wordt waargenomen in het serum van MS-patiënten.

In hoofdstuk 6 hebben we inzicht gekregen in de pro- en anti-inflammatoire cytokine serum expressie niveaus bij MS-patiënten met vermoeidheid. Daarom hebben we de relatie tussen pro-inflammatoire cytokinen (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17, TNF α , en IFN- γ) en anti-inflammatoire cytokinen (IL-4, IL-5, IL-10, en IL-13) in serum van MS-patiënten met en zonder vermoeidheid onderzocht. Met behulp van de vermoeidheid subschaal uit de vragenlijst Checklist Individuele kracht (CIS20r), onderscheiden we MS-patiënten met en zonder vermoeidheid.

Serum cytokines werden gekwantificeerd met behulp van het MSD multiplex platform. Vergelijkbare serum cytokine niveaus werden waargenomen tussen MS-patiënten met en zonder vermoeidheid. Interessant is dat we een significante correlatie zagen tussen IL-6 en CIS20r vermoeidheidsscores. We voerden echter geen meervoudige test correctie uit vanwege de exploratieve

aard van deze studie. Daarom moet de associatie van IL-6 met CIS20r vermoeidheidsscores in een grotere groep worden gevalideerd. Door de lage prevalentie van MS-patiënten zonder vermoeidheid is het echter zeer uitdagend om deze patiënten op te nemen in een grotere onderzoeksgroep.

De conclusie is dat de beoordeelde pro- en anti-inflammatoire cytokinen waarschijnlijk niet geassocieerd zijn met MS-gerelateerde vermoeidheid, hoewel andere cytokinen en chemokinen die geassocieerd zijn met MS, zoals CXCL13 en CCL3, moeten worden beoordeeld voor een volledig overzicht van cytokinen en MS-gerelateerde vermoeidheid.

In **hoofdstuk 7** hebben we het longitudinale effect van de HPA-as functie op MS-gerelateerde vermoeidheid onderzocht, door het meten van de dagelijkse cortisolspiegels bij patiënten die deelnamen aan het TREFAMS-onderzoeksprogramma. Deze cohort bestond uit drie gerandomiseerde gecontroleerde studies om de effecten van aërobe training (AT), energiebesparing management (ECM) en cognitieve gedragstherapie (CBT) te bestuderen. Bovendien hebben we onderzocht of specifieke behandelingen invloed hebben op de dagelijkse cortisol-speekselafscheiding.

We vonden geen verband tussen de dagelijkse cortisolparameter en MS-gerelateerde vermoeidheidsscores. Interessant is dat geen van de behandelingen de dagelijkse cortisolparameters beïnvloedde, met uitzondering van een langdurig effect in de ECM-behandelgroep op de cortisolsecretie bij het ontwaken. Dit duidt erop dat MS-gerelateerde vermoeidheid niet kan worden toegeschreven aan de dagelijkse afscheiding van cortisol en de HPA-as, en waarschijnlijk wordt MS-gerelateerde vermoeidheid veroorzaakt door andere ziektemechanismen.

References

1. **Deluca J.** Fatigue, cognition and mental effort. In: *Fatigue as a Window to the Brain.*; 2005.
2. **Gottschalk M, Kümpfel T, Flachenecker P, et al.** Fatigue and regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 2005.
3. **Krupp LB, Serain DJ.** Multiple sclerosis-associated fatigue. In: *Multiple Sclerosis Therapeutics, Fourth Edition.*; 2011.
4. **Hafler DA, Compston A, Sawcer S, et al.** Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 2007.
5. **Hauser SL, Oksenberg JR.** The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron.* 2006.
6. **Liu L, Li Y, Tollefsbol TO.** Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2008.
7. **Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A.** Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. *JAMA.* 2006.
8. **Wallin MT, Oh U, Nyalwidhe J, et al.** Serum proteomic analysis of a pre-symptomatic multiple sclerosis cohort. *Eur. J. Neurol.* 2015.
9. **Fiszbein A, Giono LE, Quaglino A, et al.** Alternative Splicing of G9a Regulates Neuronal Differentiation. *Cell Rep.* 2016.