

VU Research Portal

Axonal Damage in Multiple Sclerosis

van der Star, B.J.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

van der Star, B. J. (2014). *Axonal Damage in Multiple Sclerosis: The Impact of Autoimmunity to Neurofilament Light*. [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

Axonale schade in multiple sclerose

De invloed van auto-immuniteit tegen neurofilament light

Multiple sclerose (MS) is een ziekte van het centrale zenuwstelsel (CZS). Het CZS bestaat uit onze hersenen, ruggenmerg en oogzenuwen. MS komt voornamelijk voor bij jong volwassenen. Alhoewel de oorzaak van MS onbekend is, zien we dat het myeline beschadigd wordt. Myeline vormt een isolatielaag rondom de zenuwcellen (neuronen) en hun uitlopers (axonen) in het centraal zenuwstelsel. Deze laag zorgt ervoor dat neuronenvrijen prikkelssnel en efficiënt doorgeven. Het CZS bestaat uit witte stof en grijze stof. In de witte stof bevinden zich voornamelijk de met myeline omringde axonen en in de grijze stof bevinden zich voornamelijk de neuronenvrijen. Naast schade en afbraak van het myeline is er ook verlies van axonen en vindt formatie van littekenweefsel plaats in deze beschadigde gebieden. Er wordt veel onderzoek gedaan naar hoe schade aan het myeline ontstaat. Echter, veel minder aandacht is lange tijd geschonken aan het feit dat axonen zelf eveneens beschadigd worden, en regelmatig volledig vernietigd worden. Neuronenvrijen en axonen zijn essentieel voor het functioneren van het menselijke lichaam en zijn betrokken bij processen zoals zien en bewegen.

Schade in het CZS van mensen met MS kan zich uiten in verschillende klachten, bijvoorbeeld slechter zien en (gedeeltelijke) verlammingen die uiteindelijk kunnen leiden tot het afhankelijk zijn van een rolstoel. Omdat de locatie van de beschadiging in het centraal zenuwstelsel bepalend is voor de klachten, de ernst van symptomen en de duur van de ziekte, is dit voor elke patiënt verschillend.

MS kan opgedeeld worden in verschillende subtypen: Relapsing-Remitting MS (RRMS), Secundair Progressieve MS (SPMS) en Primair Progressieve MS (PPMS). De meeste MS patiënten krijgen te maken met RRMS waarin klachten opkomen en welke na een periode ook weer verdwijnen. Echter, op een bepaald moment lijkt het lichaam niet meer te kunnen compenseren voor gebieden die schade hebben opgelopen en wordt de ziekte progressiever, aangeduid als SPMS. Tevens zijn er ook patiënten die bij het begin van de eerste symptomen nauwelijks herstel merken, maar waar de symptomen geleidelijk toenemen (PPMS). Naast het feit dat wetenschappers nog steeds naar de oorzaak van MS zoeken is het ook nog steeds onbekend waarom deze omslag van RRMS naar SPMS plaats vindt. Tevens is onbekend waardoor schade zich blijft opstapelen in de progressieve fasen.

Neuronenvrijen hebben een skelet dat onder andere bestaat uit neurofilamenten, welke de juiste vorm van de cel handhaven en helpen bij de vorming van axonen (de uitloper van de neuron). Er bestaan drie vormen neurofilamenten die van elkaar op gewicht kunnen worden onderscheiden: neurofilament heavy (NF-H), neurofilament medium (NF-M) en neurofilament light (NF-L). In MS patiënten zien we in het serum en de hersenvloeistof antilichamen gericht tegen deze neurofilamenten zoals NF-L. Antilichamen zijn een soort vlaggetjes die de meeste onderdelen die niet in het menselijk lichaam thuishoren kunnen herkennen. Elk onderdeel (bijvoorbeeld een bacterie) krijgt zijn eigen specifieke vlaggetje. Mensen met MS hebben meer antilichamen tegen NF-L in de hersenvloeistof dan gezonde personen. Voornamelijk in de progressieve vormen van MS zien onderzoekers dat de hoeveelheid van deze antilichamen zijn verhoogd ten opzichte van mensen met RRMS, hoewel deze relatie niet altijd gevonden wordt. Andere wetenschappers hebben aangetoond dat in de

gebieden waar schade is (zogenaamde laesies), antilichamen aan axonen en myeline binden. Dit zou als gevolg kunnen hebben dat axonen en myeline door de eigen afweerreactie als niet-eigen worden gezien en worden afgebroken. Door onze kennis te verbreden over de bijdrage van antilichamen en ontstekingscellen (die gericht zijn tegen neuronen en hun uitlopers) aan het ziekteverloop van MS, willen we meer inzicht krijgen hoe we de therapieën kunnen verbeteren om de neurologische aftakeling te remmen.

Onze hypothese is dat de auto-immuunreactie tegen NF-L bijdraagt aan de schade aan axonen in mensen met MS. In dit proefschrift ligt de nadruk op NF-L, omdat deze vorm het meest aanwezig is en antilichamen tegen NF-L verhoogd zijn in mensen met MS. Tevens ontwikkelen muizen die het NF-L eiwit ingespoten krijgen een afweerreactie tegen NF-L en ontwikkelen symptomen zoals spasticiteit en verlammingen. Dit zijn ook symptomen die mensen met MS vaak ervaren. In de laesies waar we veel ontstekingscellen zien, is bekend dat deze ontstekingscellen (microglia in de hersenen en macrofagen in de rest van het lichaam, die de hersenen binnen dringen) de myeline eiwitten opeten. Maar, het is onduidelijk wat er met beschadigde axonen en vrije axonale eiwitten gebeurt en waar deze overblijfselen blijven. Opruimen van de overblijfselen van cellen is noodzakelijk voor het mogelijk maken van herstel. Aan de andere kant is het ook mogelijk dat het opeten van deze eiwitten kan leiden tot een afweerreactie tegen deze eiwitten. In **hoofdstuk 2** laten we zien dat eiwitten van axonen werden opgenomen, opgegeten en afgebroken door microglia en macrofagen. Het proces van opnemen en opeten zagen we voornamelijk in laesies waar axonen beschadigd waren. Het opeten van beschadigde axonen vond minder vaak plaats dan het opeten van myeline. Dit resultaat hebben we kunnen herhalen in een experiment met een bepaalde cellijn (J774.2. Dit zijn cellen die zich continue kunnen blijven vermenigvuldigen, zoals kankercellen), afkomstig uit muizen maar die vergelijkbaar zijn met macrofagen uit mensen. Ook in deze cellen zagen we dat zij minder axonale eiwitten opeten in vergelijking met myeline eiwitten. Het afbreken van het NF-L eiwit hebben we ook nog op een andere manier kunnen laten zien, namelijk dat we het zagen in bepaalde celstructuren die erom bekend staan om andere structuren (zoals eiwitten) af te breken. Naast dat we in de hersenen gekeken hebben naar het opeten van axonale eiwitten, hebben we dit ook onderzocht in cellen in de hersenvloeistof van mensen met MS. Hierin zagen we meer opname van axonale eiwitten door cellen dan in de hersenvloeistof van mensen zonder MS. Andere onderzoekers hebben gezien dat axonale eiwitten uit de hersenen uiteindelijk in de lymfeklieren in de hals terecht kunnen komen, waar ze door cellen kunnen worden opgegeten. Dit is van belang omdat de lymfeklieren belangrijke ontmoetingsplaatsen zijn tussen verschillende celtypen welke een rol spelen in het afweersysteem. De (verhoogde) aanwezigheid van cellen die axonale eiwitten hebben opgegeten in de hersenvloeistof van mensen met MS zou dus kunnen betekenen dat axonale eiwitten die na schade in de hersenen vrijkomen via deze route worden verwijderd. Dus in dit hoofdstuk hebben we laten zien dat axonale eiwitten worden opgegeten door microglia en macrofagen. Hoewel het opruimen van eiwitten na schade belangrijk is, zou dit ook een manier kunnen zijn waarop een auto-immuunreactie tegen deze eiwitten tot stand kan komen.

Naast schade in de witte stof, waar de axonen zitten, krijgen we door verbeterde technieken ook steeds meer zicht op beschadigingen in de grijze stof, waar de neuronen zich bevinden. Eén van de verschillen tussen de witte en de grijze stof is de

mate van aanwezige actieve ontstekingscellen. In de grijze stof zien we veel minder actieve ontstekingscellen dan in de witte stof. Deze verschillen zijn goed zichtbaar in zogenaamde leukocorticale laesies. Leukocorticale laesies beslaan zowel de grijze als de witte stof. Hierdoor zijn verschillen tussen beide gebieden (wit versus grijs) goed zichtbaar. In de gezonde situatie, zijn microglia (de ontstekingscellen in de hersenen) ook aanwezig. Deze zijn continue op zoek zijn naar mogelijke indringers die bestreden moeten worden, of dat zij andere cellen moeten assisteren. Alleen zijn deze zoekende en voelende microglia niet “geactiveerd” en hebben zij een andere vorm (uitgestrekt in plaats van rond). In **hoofdstuk 3** hebben we de grijze en witte stof van leukocorticale laesies onderzocht en hebben we specifiek gekeken naar microglia/macrofagen, schade aan axonen en fagocytose (het opeten) van een bepaalde marker (APP, amyloid precursor protein) welke axonale schade weergeeft. APP is een eiwit wat normaliter op een snelle manier door het axon wordt getransporteerd. Maar als er bijvoorbeeld een stagnatie is in het axon, bijvoorbeeld door schade aan het desbetreffende axon, hoopt het APP op. Dit kan zichtbaar gemaakt worden door het weefsel te “kleuren” met een specifiek antilichaam (vlaggetje) tegen dit APP. Zoals we verwacht hadden, zagen we minder ontstekingscellen (microglia/macrofagen) in de grijze stof van deze typische laesies. Wat ons opviel was dat er geen verschil was tussen de hoeveelheid schade in de witte en grijze stof van deze leukocorticale laesies. Dit vonden wij opmerkelijk, omdat vaak gesuggereerd wordt dat de geactiveerde ontstekingscellen voor de schade verantwoordelijk zijn. Om de verschillen tussen de microglia in de witte en grijze stof nauwkeuriger te onderzoeken, hebben we plakjes gemaakt van muizen hersenen. Na het zichtbaar maken van deze cellen in de muizen hersenen, zagen we dat microglia uit de grijze stof van muizen hersenen er heel anders uit zien dan microglia uit de witte stof van muizen hersenen. Maar als we deze cellen uit beide gebieden bepaalde structuren lieten opeten zagen we geen verschil in hoeveelheid opgegeten structuren. Dus ook al zagen de microglia uit de witte en grijze stof er verschillende uit, functioneel waren ze juist erg gelijk. Om te onderzoeken of de muis microglia uit witte en grijze stof anders reageerden als ze uit een gestreste omgeving komen, zorgden we dat de muizen ontstekingen kregen in het hele lichaam inclusief de hersenen. Microglia uit de witte stof van deze muizen bleken genen betrokken bij het afweersysteem meer verhoogd tot expressie te brengen dan microglia uit de grijze stof van deze muizen. Deze verschillen in activatie zouden de hoeveelheid schade aan axonen in aanwezigheid van minder ontstekingscellen in de grijze stof van mensen met MS kunnen verklaren.

De immuunreactie tegen eiwitten uit neuronen is aanwezig in verschillende aandoening waar het centraal zenuwstelsel is aangetast. Zowel de ontstekingscellen als de antilichamen zijn gericht tegen eiwitten aanwezig op de buitenkant van neuronen en axonen en eiwitten die zich in de cel bevinden, zoals de neurofilamenten. In **hoofdstuk 4** hebben we de afweerreactie tegen één van deze neurofilamenten, namelijk NF-L, onderzocht in muizen. Door de muizen met het NF-L eiwit in te spuiten (immuniseren) en daarbij andere middelen toe te voegen om de ontstekingscellen te activeren, kunnen we een immuunreactie tegen het NF-L eiwit simuleren. Het afweersysteem (in mens en dier) bestaat naast de microglia (in de hersenen) en macrofagen (in de rest van het lichaam) onder andere ook uit T cellen en B cellen. De B cellen zijn de cellen die (na een aantal complexe stappen) antilichamen maken. Omdat de techniek die we gebruiken in dit muis model naast B cellen voornamelijk de T cellen activeren, kunnen we in deze muizen de interactie tussen

T cellen die gericht zijn tegen NF-L (NF-L-specifieke T cellen) en de axonen (waar het NF-L zich bevindt) onderzoeken. In dit hoofdstuk hebben laten we zien dat T cellen die positief zijn voor het eiwit CD4 (en daardoor geactiveerd kunnen worden door microglia en macrofagen, die bijvoorbeeld NF-L hebben opgegeten en aan hun oppervlakte presenteren) geassocieerd zijn met spasticiteit, schade aan axonen en de afbraak van neuronen in deze muizen. Deze CD4⁺ T cellen zien we voornamelijk in het gebied aan de rugzijde van het ruggenmerg waar de gevoelszenuwen door heen lopen. De locatie van deze CD4⁺ T cellen in deze muizen verschilt met de locatie van CD4⁺ T cellen in muizen die met een myeline eiwit zijn ingespoten. Dit betekent dat T cellen die gericht zijn tegen axonale eiwitten op andere locaties schade kunnen veroorzaken. Naast dat we T cellen zien die CD4⁺ zijn, zien we ook T cellen die het eiwit CD8 op hun membraan hebben (en dus niet CD4). Deze CD8⁺ T cellen kunnen bij de juiste omstandigheden en interacties elke cel in het lichaam doden, bijvoorbeeld als een cel een virus in zich heeft. Beide T cellen (CD4⁺ en CD8⁺) en moleculen die cellen en celstructuren kunnen beschadigen zien we naast axonen in de beschadigde gebieden van deze NF-L-geïmmuniseerde muizen. Tevens hebben we aangetoond dat sommige stukken van het NF-L eiwit belangrijker zijn dan andere regio's bij een afweerreactie tegen NF-L. Uit dit hoofdstuk kunnen we concluderen dat als je T cellen die specifiek gericht zijn tegen eiwitten uit neuronen en axonen, zoals NF-L, kunt remmen, je wellicht de schade die zij aanrichten kunt stoppen in mensen die deze specifieke T cellen bezitten.

Naast T cellen vinden we ook antilichamen tegen NF-L in het bloed en de hersenvloeistof van mensen met MS. Onderzoekers hebben gevonden dat de hoeveelheid antilichamen tegen NF-L gerelateerd zijn aan de hoeveelheid atrofie (afsterven van hersencellen). Daarom hebben we ons in de hoofdstukken 5 en 6 gericht op antilichamen tegen NF-L. In **hoofdstuk 5** hebben we geëvalueerd of de hoeveelheid antilichamen tegen NF-L in het bloed van mensen met MS iets kunnen voorspellen over de verschillende typen MS (RRMS en SPMS) en reactie na behandeling met een veelgebruikt medicijn. Net zoals eerdere onderzoeken, zagen wij ook een significante verhoging van de hoeveelheid antilichamen tegen NF-L in het bloed van mensen met MS in vergelijking met gezonde personen. In MS patiënten die twee jaar lang behandeld zijn met natalizumab, een medicijn dat voorkomt dat witte bloedcellen de hersenen binnen komen, zagen we een afname in de hoeveelheid antilichamen tegen NF-L in vergelijking met de bloedwaarden vóór de behandeling. Deze patiënten hadden ook minder vaak een terugval. Onzeker is of de daling van het aantal antilichamen tegen NF-L de oorzaak van een verbetering in gezondheid is of een gevolg van verminderde B cel activatie.

Om te onderzoeken of antilichamen tegen NF-L ook schadelijk kunnen zijn en bijdragen aan de schade aan axonen in personen met MS, hebben we in **hoofdstuk 6** gekeken naar het effect van een specifiek NF-L antilichaam afkomstig uit een muis. We zien dat dit specifieke NF-L antilichaam het aantal axonen verminderd in zogenaamde ruggenmerg co-kweken van ratten. Door een speciale techniek kunnen de ruggenmergcellen van deze ratten in een kunstmatige omgeving groeien en verbindingen maken zoals die in de hersenen van mensen ook tot stand komen. Ook in een muis model waarin de cellen in het oog een groene kleur hebben (en daardoor zichtbaar zijn met speciale apparatuur, zoals bij de opticien) zien we dat deze cellen, die behoren tot het zenuwstelsel, aangetast worden.

Omdat we natuurlijk heel graag willen weten of mensen met MS ook antilichamen

tegen NF-L hebben die schadelijk zijn voor de hersencellen, hebben we antilichamen geïsoleerd uit het bloed van MS patiënten die veel antilichamen tegen NF-L hebben. De kritische lezer zal wellicht hebben opgemerkt dat deze antilichamen niet alleen tegen NF-L gericht zijn, maar dat er ook antilichamen bij kunnen zitten die tegen andere componenten zijn gericht. Daarom moeten we voorzichtig zijn met het interpreteren van deze resultaten. Dat er antilichamen aanwezig zijn die schadelijk zijn na het toedienen in muizen, blijkt uit onze grafiek in hoofdstuk 6 waar we een verhoging in de ernst van symptomen zien. Concluderend kunnen we zeggen dat het mogelijk is dat antilichamen tegen NF-L wel degelijk kunnen bijdragen aan de schade in de hersenen van MS patiënten. En dit zou ook het geval kunnen zijn in personen met andere ziekten waar antilichamen tegen NF-L in grote mate aanwezig zijn zoals patiënten met amyotrofische laterale sclerose (ALS).

Al met al kunnen we de volgende conclusies trekken uit de resultaten in dit proefschrift:

- 1) Het opeten en presenteren van eiwitten van neuronen door specifieke ontstekingscellen zou een eerste stap kunnen zijn in het ontstaan van een immuunreactie tegen NF-L in MS.
- 2) Functionele verschillen tussen microglia in de grijze en witte stof zouden verantwoordelijk kunnen zijn voor de axonale schade in de grijze stof in leukocorticale MS laesies, ondanks de verminderde hoeveelheid ontstekingscellen in dit gebied.
- 3) Specifieke regio's in het NF-L eiwit kunnen, net zoals het complete eiwit, ziekte veroorzaken in een experimentele set-up.
- 4) Verminderde schade in het CZS van mensen met MS na behandeling met natalizumab gaat gepaard met een afname in de hoeveelheid antilichamen gericht tegen NF-L in het serum.
- 5) Specifieke monoklonale antilichamen tegen NF-L zijn schadelijk *in vitro* en *in vivo*.

Dit betekent dat de aanwezigheid van antilichamen gericht tegen NF-L in het CZS een negatief effect kunnen hebben in een (subgroep) van mensen met MS.