

VU Research Portal

Macrophage/Microglia Plasticity in Multiple Sclerosis

Vogel, D.Y.S.

2015

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Vogel, D. Y. S. (2015). *Macrophage/Microglia Plasticity in Multiple Sclerosis*.

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

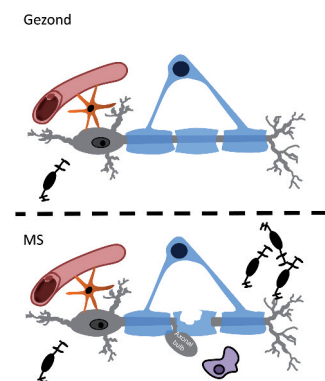
SUMMARY IN DUTCH / NEDERLANDSE SAMENVATTING

Multiple Sclerose

Multiple Sclerose (MS) is een chronische aandoening van het centraal zenuwstelsel (CZS) die gepaard gaat met ontstekingen en littekenvorming (laesies). In Nederland krijgt 1 op de 1000 jongvolwassenen MS. De ontstekingen leiden vaak tot chronische invaliditeit. De symptomen van MS kunnen erg uiteenlopen, afhankelijk van de plaats van een laesie in het CZS. Een van de eerste verschijnselen van MS is vaak neuritis optica, een ontsteking van de oogzenuw, die zich kenmerkt door een subacute pijn in het oog, uitgelokt door oogbewegingen. Andere veel voorkomende symptomen zijn gevoelsstoornissen in ledematen, vermoeidheid en tremoren. De symptomen zijn vaak van voorbijgaande aard, echter in de loop der tijd herstelt het lichaam zich niet meer volledig en ontstaat er blijvende invaliditeit. Bij MS is er een duidelijk verband tussen laesies in het ruggenmerg en permanente invaliditeit.

Centraal zenuwstelsel

Het CZS omvat de oogzenuw, het brein en het ruggenmerg. In het CZS-weefsel bevindt zich grijze en witte stof. De grijze stof bestaat vooral uit zenuwcellen. De witte stof bestaat uit de uitlopers (axonen) van het CZS. Deze axonen worden omgeven door een beschermlaag, die zorgt voor snelle geleiding van zenuwimpulsen: myeline. Bij MS is deze myelinelaag beschadigd (Figuur 1).



Figuur 1. Gezond centraal zenuwstelsel en centraal zenuwstelsel van MS-patiënten

Het CZS bestaat uit zenuwcellen (grijs) met een uitloper (axon) omwonden met de beschermlaag myeline (blauw), gemaakt door de oligodendrocyt (blauw). De astrocyten (oranje) zijn de steuncellen en de microglia (zwart) zijn de bewakers van het centraal zenuwstelsel. De bloedvaten (rood) zorgen voor zuurstoftoevoer.

Bij MS is de myeline en zijn ook de uitlopers van de zenuwcellen beschadigd. Hierdoor ontstaat een axonal bulb (grijs). De microglia worden geactiveerd (zwart) en macrofagen worden aangetrokken (paars).

A

Macrofagen en microglia

Macrofagen zijn een bepaald type witte bloedcellen. Het zijn de opruimers van ons immuunsysteem: ze ruimen bacteriën, dode cellen en debris op. In het CZS zijn vanaf de geboorte microglia aanwezig, de macrofagen van het CZS. Macrofagen en microglia spelen een prominente rol in het ontstaan van MS. Deze cellen worden geactiveerd door signalen uit de omgeving. We onderscheiden verschillende typen (fenotypes) van geactiveerde macrofagen: pro-inflammatoire M1-macrofagen/microglia en ontstekingsremmende M2-macrofagen/microglia. Eerder onderzoek in diermodellen voor MS toont aan dat M1-macrofagen/microglia bij MS vooral nadelige effecten hebben door productie van onder andere zuurstofradicalen en schadelijke stoffen. M2-macrofagen en -microglia produceren daarentegen stoffen die een ontstekingsreactie dempen en hebben bij MS vooral gunstige effecten.

De vraag is of, en zo ja hoe, deze resultaten naar de mens kunnen worden vertaald. In verschillende studies is aangetoond dat de kenmerken van de muismacrofagen afwijken van de humane macrofagen. We weten weinig over de effecten van deze M1- en M2-macrofagen bij mensen met MS. Het doel van dit proefschrift is om de humane fenotypes van M1- en M2-macrofagen in MS in kaart te brengen en hun schadelijke en gunstige (herstellende) functies op axonen te beschrijven.

Polarisatie van humane macrofagen

Om te kunnen onderzoeken of M1- en M2-macrofagen ook bij de mens voorkomen zijn herkenningsmarkers (eiwitten die tot expressie komen op het celoppervlak) nodig. Om dit te onderzoeken hebben we op verschillende manieren macrofagen gekweekt (**hoofdstuk 2**). De markers voor humane M1- en M2-macrofagen wijken af van die voor muismacrofagen. Er zijn verschillende methoden om M1- en M2-macrofagen te kweken beschreven. Deze data zijn daarom moeilijk te vergelijken. Wij hebben de meest gebruikte kweekmethoden naast elkaar gelegd en de markers van M1 en M2 bekeken. We toonden aan dat voor M1-macrofagen de meest onderscheidende markers CD40 en CD64 zijn. Voor M2-macrofagen zijn dit CD163 en MR. Om macrofaagactivatie te onderzoeken zijn *in vitro* studies cruciaal, maar het is belangrijk te bedenken dat dit slechts een vereenvoudiging is van de complexiteit van ziekte *in vivo*. Het is moeilijk de vele factoren die *in vivo* invloed hebben op macrofagen na te bootsen *in vitro*. Desondanks kunnen de markers voor M1 en M2 die door *in vitro* studies verkregen zijn, worden gebruikt als een indicatie in de analyse van *in vivo* ontstekingen in weefsels.

De rol van M1- en M2-macrofagen en -microglia bij het ontstaan van MS-laesies

We onderscheiden vier stadia in het ontstaan van MS-laesies: pre-actief, actief, chronisch actief en chronisch inactief. Het eerste teken van de vorming van een laesie is het ontstaan van clusters van microglia (pre-actieve laesie). De volgende stap kenmerkt zich door de aanwezigheid van myeline-bevattende schuimcellen in het gemyeliniseerd gebied (actieve laesie). Vervolgens dooft de ontsteking in het midden van het gebied van de laesie uit en vormen de ontstekingscellen een ring om het gedemyeliniseerd gebied (chronisch actieve laesie). Uiteindelijk ontstaat er een litteken in het gedemyeliniseerd gebied (chronisch inactieve laesie). Wij onderzochten de activatiestatus van macrofagen/-microglia in pre-actieve, actieve, chronische actieve en remyeliniserende laesies en vergeleken de fenotypes van macrofagen/microglia met die in hersenweefsel van controlepatiënten (**hoofdstuk 3 en 4**).

In hersenweefsel van controlepatiënten worden M1-markers (CD40, CD86 en CD74) tot expressie gebracht door microglia en zijn M2-markers te vinden op macrofagen in de perivasculaire ruimte (de ruimte rondom bloedvatjes). Het eerste teken van het ontstaan van een MS-laesie is de formatie van clusters van microglia (pre-actieve laesies). Deze pre-actieve laesies zijn eerder gevonden in zogenaamde 'normaal ogende witte stof'. Het hoge aantal pre-actieve laesies suggereert dat niet alle pre-actieve laesies zich ontwikkelen tot actieve laesies. Om te onderzoeken of de activatiestatus van microglia en macrofagen de ontwikkeling van pre-actieve laesies tot actieve demyeliniserende laesies in MS zou kunnen beïnvloeden, onderzochten we de activatiestatus van microglia met behulp van een panel van geselecteerde markers. Wij tonen aan dat in pre-actieve laesies de meerderheid van de microglia zowel de M1-markers als M2-cytokine CCL22 tot expressie brengt. Dit wijst op een tussenvorm van de activatiestatus (**hoofdstuk 3**).

In actieve demyeliniserende laesies brengen de meeste macrofagen M1-markers tot expressie, hoewel 70% van deze macrofagen ook de M2-markers CD163 en MR tot expressie brengt. Ook dit wijst op een tussenvorm van de activatiestatus (**hoofdstuk 4**). In actieve laesies vonden wij M2-markers op perivasculaire macrofagen en de met myeline gevulde macrofagen. Deze bevinding suggereert dat fagocytose van myeline de activatiestatus van de macrofaag verandert. In chronisch actieve MS-laesies vonden wij M2-macrofagen in de perivasculaire ruimte, maar niet in het weefsel. In remyeliniserende laesies namen wij hetzelfde patroon van markerexpressie bij macrofagen en microglia

A

waar als in pre-actieve laesies werden waargenomen: expressie van M2-markers was beperkt tot de perivasculaire ruimte, terwijl in weefsel de expressie van M1-markers (CD40, CD86, CD74 en CCR7) samenging met expressie van het M2-cytokine CCL22. Deze resultaten tonen aan dat in nieuwe (pre-actieve) laesies en in late (remyeliniserende) laesies de activatiestatus van macrofagen/microglia vergelijkbaar is. Deze bevinding is het tegengestelde van onze hypothese: wij hadden verwacht dat M1-macrofagen overheersen in vroege en actieve laesies, terwijl M2-macrofagen een belangrijke rol spelen bij reparatie en remyelinisatie. Het is niet duidelijk of tijdens een terugval van MS de M2-macrofagen actief worden aangetrokken in de richting van het letsel, of dat M2-macrofagen vooral hun effect uitoefenen vanuit de perivasculaire ruimte.

MS-gerelateerde chemokines trekken vooral M2-, en geen M1-macrofagen aan

Er is weinig bekend over de functionele eigenschappen, zoals migratiecapaciteit, van M1- of M2-macrofagen in het CZS (**hoofdstuk 5**). In diermodellen voor MS is aangetoond dat M1-macrofagen worden gerekruteerd naar de laesie, waarna de M2-macrofagen verschijnen. Recent is gesuggereerd dat M2-macrofagen het CZS binnentreden via de plexus choroïdus – de plaats waar het hersenvocht wordt gemaakt – terwijl M1-macrofagen direct uit het CZS bij de laesie terechtkomen. Dit verschil tussen M1- en M2-macrofagen in intreden van het CZS suggereert dat M1- en M2-macrofagen verschillende migratie-eigenschappen bezitten. Aangezien de verschillen in migratiecapaciteit tussen M1- en M2-macrofagen niet eerder is bestudeerd, onderzochten wij deze zoals beschreven in **hoofdstuk 5**. Wij tonen aan dat meer M2- dan M1-macrofagen migreren naar CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL12 en C1q. Dit effect is mogelijk afhankelijk van hun vermogen om filopodia (de poten van een cel) te vormen. Wij laten zien dat humane macrofagen met een M2-fenotype de capaciteit hebben om te migreren over lange afstanden. Daarentegen blijven M1-macrofagen, met potentieel schadelijke eigenschappen, op de plaats van de laesie en migreren niet.

A

GM-CSF induceert passage van monocyten over de bloed-hersenbarrière

Infiltratie van monocyten (de voorlopers van macrofagen) in het CZS is cruciaal voor het ontstaan en de progressie van MS in diermodellen. Granulocyt-macrofaag-koloniestimulerende factor (GM-CSF) wordt gezien als een essentiële factor voor monocytenmigratie over de bloed-hersenbarrière (**hoofdstuk 6**). Bij MS-patiënten zijn de waarden van GM-CSF hoger in serum en liquor dan bij controlepatiënten. We tonen aan dat GM-CSF de monocytenmigratie over de menselijke bloed-hersenbarrière *in vitro* versterkt. We tonen ook aan dat GM-CSF sterk tot expressie wordt gebracht door microglia, zenuwcellen, astrocyten en perivasculaire macrofagen in MS-hersenen, en niet door T-cellen (zoals in het diermodel). Cellen die gevoelig zijn voor GM-CSF zijn onder andere neuronen, astrocyten, microglia en endotheelcellen. Tot onze verbazing brachten macrofagen geen GM-CSF-receptor tot expressie. Toch induceerde GM-CSF-stimulatie *in vitro* macrofagen met een gemengde activatiestatus die lijkt op het fenotype dat wij *in vivo* hebben waargenomen in actieve MS-laesies (**hoofdstuk 4**). Deze resultaten tonen aan dat macrofagen wel degelijk kunnen reageren op GM-CSF. Daarom is onze hypothese dat GM-CSF een fysiologische activator is van macrofagen in het CZS. Het is nog onduidelijk of GM-CSF geproduceerd door microglia, neuronen, astrocyten of perivasculaire macrofagen pathogeen is, en of deze GM-CSF noodzakelijk is voor het behoud van ontstekingen bij MS-patiënten.

Ruggenmerg en nervus opticus

De anatomische structuur van het ruggenmerg en de oogzenuw is minder complex dan die van de hersenen. Door deze structuren bij MS-patiënten te bestuderen kunnen wij mogelijk leren over de mechanismen van neurodegeneratie en neuronaal herstel. Zowel de oogzenuw als het ruggenmerg bieden de mogelijkheid om grote aantallen axonen te bestuderen, zodat (subtiële) axonale veranderingen kunnen worden gerelateerd aan veranderingen in de myelineschede en aan de aanwezigheid van geactiveerde macrofagen en microglia. Vooral bestudering van longitudinale coupes van de oogzenuw biedt de mogelijkheid om verstoord axonaal transport in detail te analyseren (**hoofdstuk 7 en 8**). Studies van de ultrastructuur zouden een interessante volgende stap zijn in deze lijn van onderzoek. Bij de start van ons onderzoek was er één onderzoeksgroep die de pathologie van MS-laesies in de oogzenuw en in het ruggenmerg heeft beschreven. In dit

A

proefschrift hebben wij de verdeling van MS-laesies en de stadia van laesies meer in detail bestudeerd.

Wij vonden dat de actieve laesies in het ruggenmerg en de oogzenuw minder schuimcellen bevatten dan de laesies in de hersenen. In de hersenen en in het ruggenmerg van één individu troffen wij verschillende stadia van laesies aan. Daarnaast vonden we dat de aanwezigheid van actieve laesies in de hersenen niet altijd gerelateerd is aan de aanwezigheid van actieve laesies in het ruggenmerg (en vice versa). MS-laesies in het ruggenmerg beperken zich niet tot de anatomische grenzen van grijze en witte stof of de septa tussen de bundels in de oogzenuw. In wittestoflaesies in de hersenen en in de witte stof van gemengde grijze/wittestoflaesies was de ontsteking meer uitgesproken dan in de grijze stof. Deze verschillen vonden wij ook in het ruggenmerg, maar aldaar waren de verschillen minder uitgesproken. In de oogzenuw, die alleen bestaat uit witte stof, is de ontsteking ook minder prominent aanwezig dan in de witte stof van de hersenen.

Deze resultaten tonen aan dat op verschillende plaatsen in het CZS (oogzenuw, hersenen, ruggenmerg) laesies in verschillende stadia voorkomen. De stagering zoals eerder voorgesteld door De Groot et al. kan op onderdelen verder worden uitgewerkt. Het is belangrijk te bedenken dat stageren van laesies een interpretatie is van neuropathologische bevindingen op post-mortem-materiaal. Verder in kaart brengen van laesies op verschillende plaatsen kan de basis vormen voor vervolgonderzoek.

De relatie tussen de activeringsstatus van macrofagen en neuronale schade en herstel

In het diermodel voor MS worden M1-macrofagen gerelateerd aan neuronale schade, terwijl M2-macrofagen bijdragen aan neuronaal herstel. Bij de mens is deze relatie minder goed bestudeerd, hoewel macrofagen wel gerelateerd zijn aan axonale schade in MS-laesies. Om de rol van M1- en M2-macrofagen in relatie tot neuronale schade en reparatie te onderzoeken hebben we gebruik gemaakt van cellen met kenmerken van menselijke volwassen neuronen: de SH-SY5Y neuroblastoom cellijn. Als deze neuronen worden gekweekt samen met macrofagen die op verschillende manieren zijn geactiveerd, bleek dat alle drie de subtypen (M1-, M2- en niet-geactiveerde M0-macrofagen) actief zijn in de vernietiging van het neurale netwerk. De belangrijkste beperking van deze *in vitro* studie is dat deze is uitgevoerd met een neuroblastoom cellijn die niet geheel met MS overeenkomt.

A

Om te onderzoeken of M2-macrofagen correleren met axonale schade of met herstel axonaal, hebben we in actieve ruggenmerglaesies M2-macrofagen gevisualiseerd met de marker MR en axonale schade met de marker SMI 32. Deze studie toonde geen verband aan tussen M2-macrofagen en beschadigde of gezonde neuronnen (SMI 31).

Uit deze vroege onderzoeksresultaten concluderen we dat alle macrofagen *in vitro* kunnen fagocyteren, onafhankelijk van hun activeringsstatus. Daarnaast vonden we in ons model geen neuroprotectieve rol voor M2-macrofagen.

Conclusies en vervolgonderzoek

In dit proefschrift hebben wij laten zien dat het fenotype van *in vitro* gekweekte macrofagen sterk afhankelijk is van de gebruikte kweekmethode. De verkregen fenotypes zijn hierdoor niet volledig representatief voor de situatie *in vivo*. De werkelijkheid blijkt complexer, omdat in het brein van MS-patiënten gemengde fenotypes bestaan met kenmerken van zowel M1- als M2-macrofagen. Vervolgonderzoek zou zich daarom vooral moeten richten op de functionele kenmerken van macrofagen, zoals fagocytose, endocytose, chemotaxis, adhesie en secretie van cytokines en groeifactoren. Als we de anti-inflammatoire eigenschappen van M2-macrofagen in het CZS willen inzetten, zullen we ons moeten richten op het creëren van stabiele neuroprotectieve M2- macrofagen. Mogelijkheden hiervoor zijn stimulatie van de M2-macrofagen in de perivasculaire ruimte tot proliferatie en migratie naar de laesie, of het bevorderen van de ontwikkeling van monocytten tot volwassen M2-macrofagen.