

VU Research Portal

The role of differently activated macrophages in axonal damage during multiple sclerosis

Vereyken, E.J.F.

2010

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Vereyken, E. J. F. (2010). *The role of differently activated macrophages in axonal damage during 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

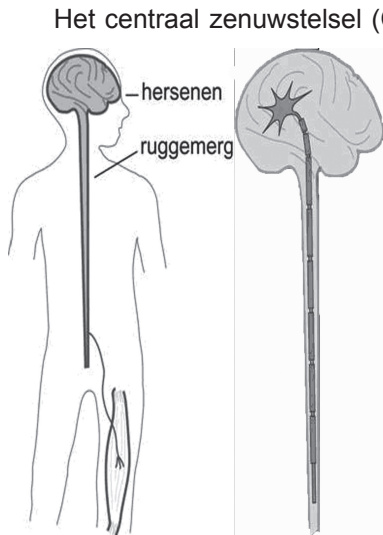
APPENDIX



**Nederlandse samenvatting voor
niet-ingewijden**

INLEIDING

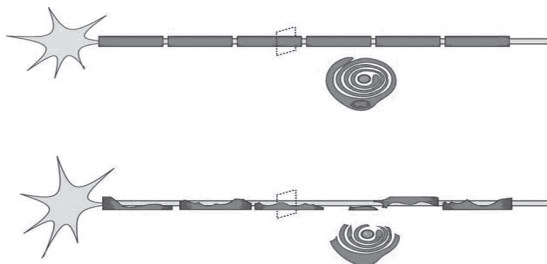
Het centraal zenuwstelsel



Het centraal zenuwstelsel (CZS) bestaat uit de hersenen en het ruggemerg. Het is opgebouwd uit miljarden cellen. Het belangrijkste cel type in het CZS zijn neuronen (ook wel zenuwcellen genoemd). De neuronen geven elektrische signalen af die door uitlopers, axonen ofwel zenuwvezels, naar de plaats van bestemming komen. Signalen van zenuwcellen gaan onder ander naar spieren, om bijvoorbeeld de spieren te doen aanspannen. Om die signalen op een efficiënte manier te laten verlopen worden neuronen ingepakt in myeline dat gemaakt wordt door een ander celtype in het CZS, de oligodendrocyt. Verder zijn er nog astrocyten, die zorgen voor het constant houden van het interne milieu in het CZS, en microglia. Microglia zijn de opruimers in het CZS. Ze maken deel uit van het immuunsysteem en verzorgen dus de afweer.

Multiple Sclerose

De ziekte multiple sclerose (MS) is een chronische ontstekingsziekte van het CZS. MS begint meestal bij jong volwassenen. Het risico op het ontwikkelen van de ziekte is ongeveer twee keer zo groot onder vrouwen als in mannen. MS wordt gekarakteriseerd door een verlies van myeline, wat demyelinisatie wordt genoemd, in meerdere ontstekingshaarden, laesies genaamd. Deze laesies kunnen ook weer verdwijnen, maar sommige veranderen na verloop van tijd in litteken weefsel.



Naast de demyelinisatie is er ook sprake van beschadiging en verlies van axonen, de zenuwvezels. Doordat de axonen beschadigd worden, wordt de prikkelgeleiding van axonen minder efficiënt, waardoor signalen uit de hersenen de spieren minder goed/niet meer bereiken. Hierdoor ontstaan de

verlamings- en uitvalsverschijnselen die MS kenmerken. De beschadiging en het verlies van axonen is de oorzaak van invaliditeit in patiënten.

Naast demyelinisatie en axonale schade worden de laesies in MS gekenmerkt door infiltratie met witte bloedcellen, waaronder macrofagen.

Macrofagen

Macrofagen zijn een soort witte bloedcellen en maken dus deel uit van ons immuunsysteem. Het immuunsysteem is erop gericht om ziekteverwekkers, zoals

virussen en bacteriën, te herkennen en op te ruimen. Ook abnormale cellen, zoals kankercellen of dode cellen, worden door macrofagen opgeruimd, maar ze zijn erop gebouwd om normale gezonde cellen met rust te laten. Macrofagen vormen de eerste verdedigingslinie tegen ziekteverwekkers. Ze bezitten op het oppervlak van de cel grippers (receptoren) die structuren herkennen die op ziekteverwekkers voorkomen. Als een macrofaag zo'n structuur herkent en bindt, wordt de ziekteverwekker opgegeten, gefagocyteerd. Macrofaag betekent dan ook letterlijk "grote eter".

In weefsels kunnen vele soorten signalen voorkomen die macrofagen activeren. Macrofagen zijn flexibele cellen die op veel signalen kunnen reageren met een specifieke uitkomst. Ze kunnen hun vorm, expressie van celoppervlakte eiwitten en productie van zuurstofradicalen en cytokinen, dat zijn kleine eiwitten die een rol spelen in de immuunafweer, veranderen.

Macrofagen zijn niet een homogene groep cellen. Op basis van de manier van activatie kunnen macrofagen worden onderverdeeld. Deze verschillende activatie subtypes vervullen verschillende rollen in afweer en herstel van weefsels. De twee meest onderzochte subtypes zijn "klassiek geactiveerde" (KA of M1) macrofagen en "alternatief geactiveerde" (AA of M2) macrofagen. KA macrofagen produceren veel ontstekingsstoffen zoals zuurstofradicalen en cytokinen. Ze zijn essentieel voor de verdediging tegen ziekteverwekkers, maar richten vaak ook schade aan het omliggende weefsel. Macrofagen worden KA als ze gestimuleerd worden met een bepaalde cytokine, interferon-gamma (IFN- γ), in combinatie met een gifstof uit de wand van bacteriën, lipopolysaccharide (LPS). AA macrofagen zijn meer gericht op wondheling en onderdrukking van de immuunreactie. In kweek (*in vitro*) worden AA macrofagen geproduceerd door stimulatie met ontstekingsremmende cytokinen zoals IL-4 en/of IL-10.

De rol van macrofagen tijdens MS

In MS spelen macrofagen een dubbele rol. Ze zijn waarschijnlijk zowel betrokken bij het induceren van schade als bij het herstel. Het is aangetoond dat als er in een rat of muis geen macrofagen meer aanwezig zijn het ziekteverloop van een diemodel voor MS, EAE, veel milder is. Macrofagen zijn dan ook in staat een heel scala aan stoffen te maken die voor neuronen schadelijk zijn.

Macrofagen kunnen echter ook betrokken zijn bij het bevorderen van herstel in MS laesies. Allereerst zijn macrofagen in staat de restjes myeline op te ruimen. Deze resten myeline, die achterblijven na demyelinisatie, zorgen ervoor dat neuronen en oligodendrocyten niet goed kunnen herstellen. Het opruimen hiervan zorgt dus voor een omgeving waarin herstel mogelijk is. Verder zijn macrofagen ook in staat om groeifactoren te maken, die noodzakelijk zijn voor herstel.

Het zou kunnen dat verschillende activatie-subtypen van macrofagen deze verschillende rollen, schade en herstel, die macrofagen spelen voor hun rekening nemen.



PROMOTIEONDERZOEK

Dit promotieonderzoek was erop gericht de rol die verschillende activatie-subtypes van macrofagen spelen in axonale schade en herstel tijdens MS te ontrafelen.

Kweekmodel voor demyelinisatie

Wij hebben een kweekmodel opgezet voor demyelinisatie (**hoofdstuk 2**). Hierin kunnen wij de rol van macrofagen op gedemyeliniseerde neuronen onderzoeken. Hiervoor werd er gebruik gemaakt van gekweekte hersenbolletjes, zogenaamde “spheroids”. In deze hersenbolletjes zijn alle cellen uit het CZS vertegenwoordigd. Ze vormen een 3-dimensionale structuur, waarin ook myeline wordt gevormd om de zenuwuitlopers. Wanneer lysolecithine wordt toegevoegd aan de kweek, raakt de myeline beschadigd maar worden andere cellen nauwelijks aangetast. Nadat het lysolecithine is weggewassen treedt er ook herstel, remyelinisatie, op.

Dit model is heel mooi om nieuwe therapieën te onderzoeken die gericht zijn op remyelinisatie. Nadat macrofagen worden toegevoegd kun je kijken naar de effecten van de macrofagen op het hersenbolletje. Het is in dit complexe model wel lastig om een onderscheid te maken tussen de effecten die macrofagen direct hebben op neuronen en effecten die via buurcellen gaan. Daarom hebben we voor dit proefschrift gekozen ook gebruik te maken van co-kweken met macrofagen en neuronen. Vervolg onderzoek kan dan gebruik maken van dit hersenbolletjes model voor demyelinisatie.

Functies van verschillend geactiveerde macrofagen in CZS

Er is erg weinig onderzoek gedaan naar de verschillende functies van macrofagen in een CZS omgeving. In MS laesies zijn er aanwijzingen gevonden dat verschillend geactiveerde macrofagen voorkomen. Markers voor KA macrofagen zijn gevonden in de rand van de laesie terwijl een marker voor AA macrofagen meer rond bloedvaten te vinden is. Verscheidend geactiveerde macrofagen lijken op specifieke plaatsen in de laesie lijken voor te komen. Daarom hebben wij gekeken naar de migratie, beweeglijkheid en adherentie (“plakkerigheid” ofwel vermogen tot hechting) van de verschillend geactiveerde macrofagen (**Hoofdstuk 3**). AA macrofagen worden specifiek aangetrokken door stoffen die worden geproduceerd door neuronen, terwijl KA macrofagen zich meer bewegen naar stoffen die door astrocyten en oligodendrocyten worden gemaakt. Verder zijn AA macrofagen beweeglijker en is hun adherentie, plak, minder groot dan die van KA macrofagen. Dit betekent dat in MS laesies AA macrofagen meer naar neuronen zullen gaan. Wanneer de AA macrofagen bij de neuronen zijn, kunnen ze groeifactoren uitscheiden (**Hoofdstuk 7**). KA macrofagen kunnen niet zo makkelijk bewegen in MS laesies, aangezien ze een minder beweeglijk zijn en sterker vasthechten aan het weefsel dan AA macrofagen, waardoor de schade aan het omliggende weefsel beperkt blijft.

Een van de belangrijkste kenmerken van macrofagen in MS laesies is de fagocytose (opeten) van restjes myeline. Naast demyelinisatie treedt axonale schade op in MS laesies. Dit zou in de laesies dus kunnen leiden tot de aanwezigheid

van restjes neuronen. KA macrofagen zijn beter in staat deze restjes van neuronen en beschadigde neuronen te fagocyteren dan AA macrofagen (**Hoofdstuk 6**). In MS laesies is het opruimen van resten van dode cellen erg belangrijk voor het creëren van een groeibevorderende omgeving. Dit is dus een positief effect van KA macrofagen omdat zij dit beter kunnen dan AA macrofagen.

In de rest van het lichaam is het goed gedocumenteerd dat KA macrofagen schade induceren, terwijl AA macrofagen betrokken zijn bij herstel. Wanneer neuronen blootgesteld worden aan KA macrofagen gaan ze dood, terwijl blootstelling aan AA macrofagen dit effect niet heeft (**Hoofdstuk 7**). KA macrofagen zijn dus toxisch voor neuronen. Ook medium waarin KA macrofagen gekweekt zijn (en stoffen in hebben uitgescheiden) is toxisch, terwijl medium waarin AA macrofagen gekweekt zijn (en stoffen in hebben uitgescheiden) dit niet is. Dus scheiden KA macrofagen toxische stoffen uit, terwijl AA macrofagen dat niet doen. AA macrofagen zijn in staat groeifactoren specifiek voor neuronen te maken, terwijl KA macrofagen dit niet doen. Het zou voor het herstel van neuronen in MS laesies dus goed zijn als de macrofagen in MS laesies van het AA subtype zijn.

Macrofaag subtypes in MS laesies

Macrofagen zijn in staat te switchen tussen de verschillende subtypes, door signalen uit de omgeving. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat macrofagen in MS laesies die myeline hebben gefagocyteerd (zogenaamde schuimcellen) cytokinen produceren die ontsteking tegen gaan. *In vitro*, vertoonden macrofagen die myeline hadden gegeten een verlaging van de ontstekingsreactie. Onze hypothese was dat de inductie van het AA phenotype in deze macrofagen zou kunnen komen door de activatie van een bepaalde receptor, de liver X receptor (LXR) (**Hoofdstuk 4**). Deze receptor is betrokken bij zowel de vetbalans in cellen als bij immunosuppressie. Myeline bestaat voornamelijk uit vet, waardoor het deze receptor zou kunnen activeren. Myeline fagocytose leidde niet tot verhoging van LXR expressie, maar wel tot een verhoging van LXR activiteit. Door LXR uit te schakelen was er geen verlaging meer te zien van de immunoreactie na myeline fagocytose. Dit zou echter ook kunnen komen doordat de rem die door de expressie van LXR altijd op de activatie van macrofagen zit niet meer aanwezig is.

Wij ontdekten dat niet elk myeline preparaat dezelfde werking had (**Hoofdstuk 5**). De myeline die leidde tot een verlaagde ontstekingsreactie en cytokine productie, bleek LPS, wat een onderdeel is van een bacteriewand en zorgt voor een ontstekingsreactie, te bevatten. De effecten op de immunoreactie zouden dus ook door LPS veroorzaakt kunnen zijn, aangezien een tweede blootstelling aan LPS de ontstekingsreactie verlaagd. De myeline preparaten die geen LPS bevatte hadden geen onderdrukkend effect op de ontstekingsreactie.

In **hoofdstuk 8** hebben we gekeken welk type, KA of AA, macrofagen aanwezig zijn in MS laesies hebben. Wij hebben, gebaseerd op literatuur, een panel van markers geselecteerd die verschillend tot expressie komen op KA en AA macrofagen. In de laesies van MS patiënten zagen wij dat vooral markers voor KA macrofagen hoog tot expressie komen, terwijl markers voor AA macrofagen minder sterk aanwezig waren. Dit duidt erop dat macrofagen in MS laesies vooral een CA



fenotype hebben.

Conclusie

Wij hebben de rol die verschillende soorten macrofagen, afhankelijk van hun staat van activatie, zouden kunnen spelen bij schade en herstel aan zenuwcellen in kaart gebracht. Zowel KA als AA macrofagen kunnen in MS laesies positieve effecten hebben. De KA macrofagen zijn zeer efficiënt in het verwijderen van celresten, maar ze zijn toxisch voor neuronen. De AA macrofagen scheiden meer groeifactoren uit en zijn niet toxisch voor neuronen, maar ze zijn minder efficiënt in het verwijderen van celresten. Het is dus van groot belang om de activatie status van macrofagen zo te beïnvloeden dat ze een hoge fagocytose capaciteit hebben, gekoppeld aan een lage productie van toxische stoffen en een hoge productie van groeifactoren. Door de grootte plasticiteit van macrofagen is dit goed mogelijk.