

VU Research Portal

Towards a better understanding of Vanishing White Matter disease

van Kollenburg, B.C.A.E.

2008

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

van Kollenburg, B. C. A. E. (2008). *Towards a better understanding of Vanishing White Matter disease*.

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het doel van het onderzoek voor dit proefschrift was meer inzicht te krijgen in de moleculaire achtergronden van de ziekte Vanishing White Matter (VWM). VWM is de eerste bekende menselijke ziekte die veroorzaakt wordt door mutaties in een translatie initiatie factor. Mutaties in elk van de vijf genen, die coderen voor de vijf subunits van het heteropentamere eiwitcomplex eIF2B kunnen leiden tot VWM.

De pathofysiologie van de ziekte is tot nu toe onduidelijk gebleven. Het is moeilijk te begrijpen dat de hersenen selectief zijn aangedaan, terwijl het gemuteerde eiwitcomplex in alle cellen van alle organen van het menselijk lichaam tot expressie komt. Om betrokken patiënten een zo juist mogelijke prognose te kunnen bieden en hopelijk te komen tot een betere behandelmethode is meer en beter inzicht in ziektemechanismen vereist. Ons onderzoek heeft zich in het bijzonder op de biochemie en immunohistochemie van VWM gericht. Met dit proefschrift hebben we duidelijkheid gebracht in een aantal aspecten van de pathofysiologie van VWM, maar vooralsnog zijn ook veel vragen onbeantwoord gebleven.

Gezien de mutaties die bij VWM in de eIF2B genen werden gevonden, was de eerste veronderstelling dat deze mutaties zouden leiden tot een afname in activiteit van eIF2B en dus in een verminderde eiwitsynthese in het algemeen. Het eIF2B complex komt tot expressie in alle cellen van het menselijk lichaam en het mutante eiwitcomplex dus ook. Om deze reden startten wij ons onderzoek in gekweekte witte bloedcellen. Deze zogenaamde lymfoblasten zijn makkelijk te kweken en het is voor de patiënten weinig belastend om ze te verkrijgen. Op deze manier konden we experimenten doen in cellen met een grote variatie aan mutaties in de eIF2B genen.

De resultaten van deze eerste experimenten met lymfoblasten staan beschreven in hoofdstuk 2. We onderzochten de activiteit van het eIF2B complex, het effect op de algemene eiwitsynthese en de stabiliteit en samenstelling van het

eIF2-eIF2B complex. Het meest opvallende resultaat was dat, hoewel de eIF2B activiteit significant verminderd was in VWM lymfoblasten, er met behulp van [³⁵S]-methionine-inbouw geen verschillen in de eiwitsynthese tussen controle en patiënten werden waargenomen. Ook was het effect van hitte-stress op de eiwitsynthese in VWM cellen niet anders dan in controle cellen. Op Western blot was te zien dat het expressieniveau van alle eIF2B subunits in de VWM cellen overeen kwam met dat in de controle cellen. In HPLC analyse bleken mutaties in eIF2B genen niet van invloed op de interactie tussen eIF2B en eIF2 of op onderlinge interacties van de eIF2B subunits. Celdeling en overleving van patiënt en controle lymfoblasten bleken zowel na ernstige (43°) als na matige (40°) hitte-stress niet verschillend te zijn.

Over het algemeen wordt aangenomen dat de hoeveelheid actief eIF2B een snelheidsbepalende factor is voor eiwitsynthese in cellen. In onze experimenten bleek verminderde eIF2B activiteit geen effect te hebben op de eiwitsynthese en dus bleek de eIF2B activiteit niet snelheidsbepalend te zijn in lymfoblasten. De vraag was nu hoe het mogelijk was dat mutaties die wel de eIF2B activiteit verminderen geen effect hadden op de eiwit synthese. Een mogelijkheid was dat eIF2B niet snelheidsbepalend is in lymfoblasten, hetgeen zou betekenen dit dat we naar een ander modelsysteem moeten zoeken. Een andere mogelijkheid was dat de mutaties geen effect hebben op de eiwitsynthese maar op andere, nog onbekende eIF2B gerelateerde functies.

Onder condities van cel-stress wordt de activiteit van eIF2B gereguleerd door eIF2 fosforylatie. Fosforylatie van de α -subunit van eIF2 leidt tot een stabiele binding van eIF2 met eIF2B. Hierdoor wordt eIF2B weggevangen en wordt de eiwitsynthese verminderd. Wij vonden dat hitte-stress tot lagere expressie van specifieke eIF2B subunits leidde in lymfoblasten van sommige patiënten (hoofdstuk 2). Bovendien was de toename in eIF2 α fosforylatie bij hitte-stress minder sterk in VWM lymfoblasten dan in controle cellen. Al deze bevindingen zouden een deel kunnen vertegenwoordigen van de verklaring waarom VWM patiënten een snelle en ernstige achteruitgang kunnen ondervinden bij koortsende ziektes, hoewel de

exacte rol van verminderde eIF2 α fosforylatie in VWM cellen nog niet onderzocht is.

Het is belangrijk te bedenken dat verminderde eIF2B activiteit leidt tot daling van de eiwitsynthese, maar dat de productie van een aantal specifieke eiwitten juist toeneemt. Deze toename wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van meerdere open reading frames (uORFs) in de 5'-onvertaalde regio van deze specifieke mRNAs. Het ribosoom begint de translatie van een mRNA bij het meest stroomopwaartse startcodon (AUG), maar blijft na het tegenkomen van het stopcodon van het uORF geassocieerd met het mRNA, op zoek naar een meer stroomafwaarts gelegen AUG codon. Om een volgend AUG te herkennen moet het ribosoom herladen worden met actief eIF2-GTP-Met-tRNA_i complex. Als dit complex in hoge concentratie aanwezig is, is de kans groot dat het ribosoom op tijd herladen is en initiatie plaats vindt op een AUG van één van de volgende uORFs. Als het eIF2-GTP-Met-tRNA_i complex echter in lage concentratie aanwezig is, bijvoorbeeld door lage eIF2B activiteit, is de kans groter dat het ribosoom niet op tijd herladen wordt voor de translatie van deze uORFs. Het ribosoom zal deze upstream AUGs dan overslaan en doorgaan met scannen, waardoor er meer tijd is voor het herladen met eIF2-GTP-Met-tRNA_i. Herkenning van het "echte" stroomafwaartse startcodon leidt dan tot de synthese van een functioneel eiwit. ATF4 is een voorbeeld van een eiwit dat op deze manier gereguleerd wordt [1]. Dit is de verklaring dat ATF4 altijd enigszins verhoogd tot expressie komt in VWM cellen. Bij stress zal dan verdere verhoging van de expressie plaats vinden [2]. Het is aangetoond dat in cellen, die gemuteerd eIF2B tot overexpressie brengen, de ATF4 expressie ook verhoogd is [3]. Toedienen van tunicamycine, een stof die stress induceert in het endoplasmatisch reticulum (ER), leidt ook voor een hogere toename van ATF4 in VWM fibroblasten dan in controle fibroblasten [2]. ATF4 speelt een belangrijke rol in de zogenaamde "unfolded protein response" (UPR), wat voor ons een eerste aanwijzing was dat de UPR betrokken zou kunnen zijn bij de pathofysiologie van VWM.

Omdat geïmortaliseerde lymfoblasten geen goed modelsysteem bleek te zijn voor VWM (hoofdstuk 2), moest er een ander celsysteem of weefsel gevonden worden om de effecten van VWM mutaties te bestuderen. Het ideaal zou een experimenteel systeem zijn waarbij hersencellen van verschillende VWM patiënten in kweek gebracht kunnen worden. In zo'n systeem zouden de effecten van verschillende VWM mutaties op cellen van het meeste getroffen orgaan onderzocht kunnen worden. Het spreekt voor zich dat het verkrijgen van hersencellen van patiënten moeilijk te realiseren is. Er was voor dit onderzoek ook geen VWM muismodel beschikbaar om de effecten van eIF2B mutaties in gekweekte hersencellen te kunnen bekijken. We besloten daarom het onderzoek te richten op de pathologie van post-mortem hersenweefsel van VWM patiënten om zo toch informatie te verkrijgen over afwijkende processen in VWM hersenen.

Kenmerkende pathologische bevindingen in VWM hersenen omvatten cysteuze degeneratie van de witte stof, aanwezigheid van oligodendrocyten met een schuimig cytoplasma, dysmorfe astrocyten en oligodendrocyten, een toename van de aantallen oligodendrocyten, en apoptose van oligodendrocyten. Het zou zo kunnen zijn, dat gemuteerd eIF2B de cel belemmert in de regulatie van de eiwitsynthese bij stress en misschien ook onder normale condities. Het zou derhalve mogelijk zijn, dat de UPR geactiveerd is bij VWM. De UPR is een verdedigingsmechanisme van de cel, dat geactiveerd wordt bij overbelasting van het ER door ongevouwen of verkeerd gevouwen eiwitten. De UPR leidt tot remming van de synthese van nieuwe eiwitten en induceert daarnaast zowel pro-overleving als pro-apoptose mediators. Een tweede reden om aan te nemen dat de UPR geactiveerd zou kunnen zijn bij VWM wordt gevonden in de verhoogde ATF4 expressie, zoals eerder genoemd. De resultaten van de experimenten op het gebied van activatie van de UPR bij VWM worden beschreven in hoofdstukken 3 en 4.

In hoofdstuk 3 wordt beschreven hoe met behulp van immunohistochemie en Western blotting de betrokkenheid van één van de drie paden van de UPR werd aangetoond in glia van VWM patiënten. In hoofdstuk 4 wordt beschreven hoe met real time kwantitatieve PCR en immunohistochemie werd aangetoond dat alle drie

de paden van de UPR geactiveerd zijn bij VWM. We lieten zien dat de UPR alleen geactiveerd is in de witte stof en dan voornamelijk in glia. Dat deze cellen zo selectief getroffen zijn bij VWM, suggereert dat de abnormale activatie van de UPR mogelijk een sleutelrol vervult in de pathofysiologie van VWM. Het is een mogelijke verklaring voor het dysmorphe uiterlijk van de glia, alsmede voor de proliferatie en apoptose van glia in VWM.

Verminderde eIF2B activiteit leidt tot verminderde eiwit synthese. Het is daarom niet erg aannemelijk dat de aanwezigheid van verkeerd gevouwen eiwitten de oorzaak is voor de activatie van de UPR in cellen van de witte stof. De meest waarschijnlijke verklaring is te vinden in de constante verhoogde ATF4 expressie. Verhoogde ATF4 expressie leidt tot verhoogde CHOP expressie. Van CHOP is bekend dat het de cellen extra gevoelig maakt voor ER stress. Een logisch gevolg is dan dat zelfs minimale stress al kan leiden tot verdere verlaging van de eIF2B activiteit en dus hyperexpressie van ATF4 en CHOP. Cellen met een defect eIF2B hebben daarom een aangeboren hyperreactiviteit op stress. Deze abnormale activatie van de UPR kan bijdragen aan de activatie van tegenstrijdige mediators, met als gevolg activatie van zowel celdeling, celoverleving als celdood. Gezonde cellen kunnen goed omgaan met minimale stresses, maar dergelijke geringe stress zou catastrofaal kunnen zijn voor VWM cellen.

Waarom de abnormale UPR activatie specifiek optreedt in glia is niet duidelijk. Het is voorstelbaar dat de UPR sneller geactiveerd wordt in cellen met een zeer actieve eiwitsynthese. Oligodendrocyten moeten grote hoeveelheden eiwit produceren voor de myeline schede en veel van deze eiwitten worden in het ER gemoduleerd. Deze grote ER-afhankelijkheid zou oligodendrocyten kwetsbaar kunnen maken voor elke vorm van ER-stress. Van astrocyten is bekend dat ze relatief ongevoelig zijn voor de meeste vormen van stress, maar het is ook bekend dat continue verhoging van CHOP leidt tot dood van astrocyten [4].

Activatie van de UPR is beschreven bij verschillende neurologische aandoeningen. In de meeste gevallen is de UPR geactiveerd doordat het mutante eiwit een abnormale conformatie heeft. Mutaties kunnen leiden tot abnormale vouwing van eiwitten en accumulatie van de verkeerd gevouwen eiwitten in het ER,

met UPR activatie als gevolg (bijvoorbeeld *PLP1* missense mutaties bij de ziekte van Pelizaeus Merzbacher [5] en expansie van instabiele repeat-sequenties bij verschillende neurologische aandoeningen zoals de spinocerebellaire ataxieën [6-8]). Bij VWM wordt de UPR op een andere manier geactiveerd, namelijk door overexpressie van ATF4 ten gevolge van verminderde eIF2B activiteit en niet ten gevolge van conformatie verandering van het mutante eiwit.

De waarnemingen die in hoofdstuk 5 worden beschreven geven aan hoe belangrijk het is om hersenmateriaal van VWM patiënten in detail te bestuderen. Histologisch onderzoek van aangedane cerebellaire witte stof van VWM patiënten, zoals beschreven in hoofdstuk 5, bracht een aantal ongewone mitotische figuren aan het licht. Deze waarneming duidt mogelijk op een defect in de celcyclus van VWM glia. Wij onderzochten de aard van deze afwijkingen nader met behulp van histologie en immunologische technieken. De resultaten sloten uit dat het om aneuploidie ging; zij waren suggestief voor een fout in de mitose in de getroffen glia van deze VWM patiënten.

In hoofdstuk 6 wordt differentiatie van glia uitgebreider bekeken. Bij VWM patiënten is de uitwendige vorm van de hersenen normaal. Er zijn geen ontwikkelingsdefecten, zoals afwijkingen in de gyratie of misvormde structuren. Histopathologische studies [9] en MRI (figuur 1, hoofdstuk 7) tonen echter aan dat het myelinisatie-proces al vanaf jonge leeftijd is verstoord, later gevolgd door meer prominente witte stof afwijkingen. Deze bevindingen zouden kunnen worden verklaard door een dysfunctie van astrocyten en oligodendrocyten vanaf jonge leeftijd. Een gebrek aan mature oligodendrocyten zou kunnen leiden tot een gebrek aan myeline en vervolgens tot myeline verlies. Dysfunctie van astrocyten zou bij kunnen dragen aan het defect in de myelinisatie en vervolgens kunnen leiden tot cysteuze witte stofdegeneratie, samenhangend met ontbreken van adequate astrogliosis. Er zijn veel aanwijzingen in de pathologie die deze hypothesen steunen [9-12]. Alle gepubliceerde artikelen beschrijven relatief geringe astrogliose, abnormale hyperplastische astrocyten, in groten getale

aanwezig in gespaarde witte stof en maar in geringe aantallen in de cysteuze witte stof. De response van de oligodendrocyten is meer divers en lijkt gerelateerd aan het stadium van de ziekte [10-23]. Over het algemeen is het aantal oligodendrocyten afgenomen, maar relatief hoog voor de ernst van de witte stof degeneratie.

Mature astrocyten en oligodendrocyten ontstaan uit een gemeenschappelijke immature voorloper. De differentiatie van deze voorloper cellen in ofwel astrocyten ofwel oligodendrocyten kan bestudeerd worden door middel van immunohistochemische markers, specifiek voor de verschillende stadia van ontwikkeling. Met behulp van post-mortem hersenmateriaal van VWM patienten en controles, hebben we aanwijzingen gevonden voor een verstoring van dit maturatie proces bij VWM patienten. Er is een gebrek aan normale, volwassen astrocyten en oligodendrocyten. De bevindingen zoals beschreven in hoofdstuk 6 suggereren dat de myeline deficiëntie in VWM waarschijnlijk wordt veroorzaakt door een tekort aan volwassen, myeline-producerende oligodendrocyten, en dat de geringe astrocytose wordt veroorzaakt door een defect in de maturatie van voorlopers naar normale, rijpe astrocyten. De conclusie is dat er voornamelijk delende voorloper-cellen van de astrocytaire lijn aanwezig zijn in de witte stof bij VWM en dat veel van deze cellen in apoptose gaan.

Met deze resultaten hebben wij aanwijzingen gevonden dat VWM een ziekte is waarbij glia vanaf een vroeg stadium selectief zijn aangedaan. Hoewel de achterliggende reden voor de kwetsbaarheid van glia cellen niet is opgehelderd, laten we aan aantal mogelijk betrokken mechanismen zien. Het belangrijkste inzicht gebaseerd op onze bevindingen is, dat transplantatie van glia-voorlopercellen, bedoeld om de hersenen van VWM patienten in een vroeg stadium, als de witte stof onvoldoende myeline bevat maar verder nog wel intact is, te voorzien van gezonde oligodendrocyten en astrocyten, misschien wel de beste therapeutische optie is. Gezonde glia-voorlopers kunnen zowel oligodendrocyten als astrocyten produceren en de aanwezigheid van deze gezonde glia kan de ziekte verhinderen om zich verder te ontwikkelen. Transplantatie van glia-voorloper

cellen heeft reeds aangetoond te leiden tot extensieve myelinisatie in myeline-deficiënte muizen [22,23].

De belangrijkste resultaten van ons onderzoek zijn verkregen met behulp van patiëntenmateriaal. Het voordeel hiervan is dat er geen vertaling van model naar patiënt gedaan hoeft te worden. Het nadeel ervan is dat we altijd gebonden zijn aan het eindstadium van de ziekte, terwijl ook eerdere stadia van de ziekte-ontwikkeling interessant zijn. Voor verdere studies is een muismodel met een VWM mutatie onmisbaar. De verschillende stadia van de ziekte kunnen dan beter onderzocht worden. Mutante hersencellen kunnen in kweek gebracht worden. Hierdoor kunnen de effecten van VWM mutaties op de verschillende celtypen apart en in combinatie met ander cellen in co-culturen onderzocht worden. Het effect van verschillende stress-factoren op het ziekte verloop kan onderzocht worden, zowel in intacte muizen als in celkweken. De mogelijkheid van glia-voorloper transplantatie kan onderzocht worden in de VWM muis.

Figuur1 (zie Hoofdstuk 7) Patiënt met VWM (a en b verkregen bij 21 maanden; c bij 38 maanden) en een gezonde persoon (d verkregen bij 19 maanden). Bij de VWM patiënt laat het T2-gewogen beeld bij 21 maanden (a) zien dat de subcorticale witte stof een iets hoger signaal heeft dan de cortex, hetgeen duidt op gebrek aan myeline. Bij de gezonde controle laat het T2-gewogen beeld op hetzelfde niveau (d) zien dat bijna de gehele cerebrale witte stof een lager signaal heeft dan de cortex, hetgeen duidt op bijna volledige myelinisatie, normaal voor de leeftijd. Daarnaast laten de T2-gewogen (a) en FLAIR beelden (b) van de patiënt bij 21 maanden een brede periventriculaire rand met een hoog signaal zien, wat duidt op een ernstiger afwijking van de witte stof dan alleen hypomyelinisatie. Gezien de afwezigheid van gebieden met een laag signaal op FLAIR opname zijn er geen aanwijzingen voor cysteuze degeneratie van de witte stof. Bij 38 maanden (c) toont de FLAIR opname dat een gedeelte van de frontale witte stof nu een lager signaal heeft, passend bij beginnende cysteuze degeneratie.