

## Nederlandse Samenvatting

Multiple sclerose (MS) is een chronische, neurodegeneratieve aandoening van het centrale zenuwstelsel (CZS) die gekenmerkt wordt door inflammatie, disfunctioneren van de bloed-hersen barrière, en axonverlies. Hoewel de oorzaak van MS nog onbekend is, worden van zowel genetische als omgevingsinvloeden gedacht dat zij betrokken zijn bij het ontstaan van de eerste symptomen van MS. Het wordt geacht de meest voorkomende verkregen neurologische ziekte te zijn die tot permanente handicap leidt in jongvolwassenen. De meerderheid van patiënten (ongeveer 85%) laat een zogeheten relapse-remitting (RR) ziekteverloop zien, waarbij aanvallen van neurologische achteruitgang worden afgewisseld met periodes van herstel. Na verloop van tijd zal 60-70% van RR patiënten progressieve neurologische achtergang laten zien. Dit wordt secundaire-progressieve (SP)MS genoemd. Daarnaast ontwikkelt 10-15% van de patiënten primaire-progressieve (PP)MS, wat wordt gekenmerkt door een constante verslechtering van de klinische symptomen vanaf de aanvang van de ziekte, zonder tussentijds herstel. Neurologische en cognitieve evaluatie worden op dit moment gebruikt om MS vast te stellen en diens ontwikkeling in kaart te brengen, evenals magnetic resonance imaging (MRI) scans. Desalniettemin is de ernst en het klinische verloop van MS extreem variabel tussen patiënten en voor het grootste deel onvoorspelbaar. Ondanks de nieuwe inzichten die in de afgelopen decennia zijn gedaan wat betreft het begrijpen en karakteriseren van de pathologie die gepaard gaat met MS, zijn er tot op heden slechts enkele betrouwbare biomarkers beschikbaar in de kliniek. Er is daarom vraag naar een biomarker die ziekteactiviteit en verloop kan voorspellen. Daarnaast is er nog geen curatieve behandeling mogelijk, ondanks dat er meerdere medicijnen beschikbaar zijn voor het verminderen van de inflammatoire relaps frequentie en voor de toename in invaliditeit. Hierdoor blijft het ontwikkelen van medicatie met een specifiekere werking en de ontwikkeling van effectievere medicatie zeer belangrijk. Deze zou mogelijk gericht kunnen zijn op het moduleren van het ziekteverloop. Hoewel de pathofysiologie niet voldoende begrepen is, leidt MS tot infiltratie van perifere bloed mononucleaire cellen (PBMCs), met name monocyten/macrofagen, in het parenchym van het CZS waar myeline antigenen worden herkend en aangevallen. Na activatie door inflammatoire mediators hechten monocyten zich aan de hersen endotheel met behulp van adhesie moleculen, waarna ze door de ontstoken bloed-hersen barrière migreren en differentiëren tot macrofagen in het parenchym van de hersen. Afhankelijk van het inflammatoire milieu kunnen macrofagen een pro- of anti-inflammatoir fenotype aannemen en dragen ze bij aan weefselschade of weefselherstel, respectievelijk. Voor anti-inflammatoir macrofagen in het bijzonder is aangetoond dat deze een rol hebben bij het verwijderen van myeline restanten en daardoor betrokken zijn bij het verminderen van inflammatie en weefselherstel.

Tissue Transglutaminase (TG2), een calcium-afhankelijk enzym dat crosslinking tussen eiwitten katalyseert, is het best beschreven lid van de Transglutaminase familie. Naast transamidering heeft TG2 verscheidene andere enzymatische functies, zoals dat van

disulfide isomerase, G-proteïne (GTPase), en eiwit kinase. Ondanks dat het voornamelijk voorkomt in het cytoplasma, TG2 ook geassocieerd met de celoppervlakte alsmede met het mitochondriële of nucleaire membraan. Het kan daarnaast bijdragen aan de vorming van de extracellulaire matrix doordat het wordt uitgescheiden. TG2 komt constitutief tot expressie in vele soorten weefsel en celtypen, waaronder macrofagen, en wordt geupreguleerd op een celtype-specifieke wijze in respons op verscheidene fysiologische en pathologische stimuli. Vanwege de vele functies van TG2 worden diens expressie en enzymatische activiteit strikt gereguleerd door de cel, en disfunctioneren van TG2 wordt geassocieerd met verscheidene vormen van humane pathologie.

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat TG2 mogelijk een rol speelt bij MS pathologie. Onze groep heeft aangetoond dat TG2 tot expressie komt in infiltrerende MHC-II-positieve cellen in hersen parenchym van MS patiënten, maar niet in de hersen parenchym van gezonde controle (GC) proefpersonen. Daarnaast zorgt inhibitie van TG2-activiteit voor een vermindering van klinische symptomen in een diermodel van MS alsook de influx van monocyt/macrofagen naar het CZS. Deze thesis heeft als doel het uitbreiden van de huidige kennis over de betrokkenheid van TG2 in MS en zich te richten op TG2 expressie en functie *in vitro*, en de potentiële implicaties daarvan voor MS patiënten.

In **hoofdstuk 2** hebben we gekeken naar de expressie van TG2 in monocyt/macrofagen verkregen van MS patiënten en deze vergeleken met monocyt/macrofagen van GC proefpersonen. We vonden een hoger niveau van TG2 mRNA in monocyt/macrofagen van MS patiënten en een positieve correlatie tussen de hoeveelheid TG2 mRNA en anti-inflammatoire markers. Daarnaast lieten we zien dat IL-4 een van de voornaamste factoren van TG2-expressie inductie is in humane monocyt/macrofagen, waarbij TG2 bijdraagt aan hechting/migratie en een anti-inflammatoir fenotype mogelijk maakt van de cellen. We hypothesiseren dat circulerend IL-4 mogelijk verantwoordelijk is voor de verhoogde TG2 expressie en anti-inflammatoir fenotype van monocyt/macrofagen van MS patiënten, in vergelijking met dat van monocyt/macrofagen van GC proefpersonen.

Gebaseerd op deze resultaten hebben we ons vervolgens in **hoofdstuk 3** gericht op TG2 verkregen uit macrofagen. We hebben aangetoond dat net als in humane monocyt/macrofagen TG2 selectief wordt geupreguleerd door IL-4 in macrofagen. Daarbij leidt inhibitie van TG2 expressie in IL-4-gepolariseerde macrofagen (M(IL-4)) tot een pro-inflammatoir fenotype en tot een verslechtering van fagosoom maturatie na myeline fagocytose. Daarom stellen we een nieuwe functie van TG2 voor die in positieve zin bijdraagt aan het verwijderen van myeline restanten door M(IL-4) macrofagen.

In het tweede deel van de thesis hebben we de klinische implicaties van TG2 verkregen uit PMBC verkend. In **hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of TG2 mRNA verkregen uit PMBC een mogelijke biomarker kan zijn voor MS activiteit en/of progressie. We zagen dat TG2 mRNA positief geassocieerd is met de mate van invaliditeit in de patiënt (Expanded Disability Status Scale (EDSS)), terwijl het negatief geassocieerd is met genormaliseerd hersen volume (GBV) alsmede met genormaliseerd witte stof volume en genormaliseerd grijze stof volume

(GWSV en GGSV, respectievelijk) in MS patiënten als groep, en in het bijzonder in PP-MS patiënten. Daarnaast bleek voor RR-MS patiënten dat TG2 een verandering in de EDSS score kon voorspellen bij een tweejarige follow-up, wat de voorspellende waarde van TG2 onderstreept. We suggereren dat TG2 verkregen uit PBMC veelbelovend lijkt zijn als biomarker voor het ziekteverloop van MS, vooral voor PP-MS patiënten.

Naast het TG2 eiwit van volledige lengte (V1) zijn vier kortere splice-varianten (V2, V3, en V4a en V4B) beschreven in de literatuur met andere functies en activiteiten dan de V1 variant. Gebaseerd op de resultaten uit hoofdstuk 4 hebben we ons in **hoofdstuk 5** afgevraagd of TG2 een additioneel nut zou kunnen hebben als biomarker voor de diagnose van MS, met name in de PP-MS groep. We merkten op dat de expressie van splice-variant V4b, en het percentage van expressie (ten opzichte van de V1 volledige lengte variant) van twee splice-varianten (V4a en V4b), significant hoger was in PP-MS patiënten dan in GC proefpersonen. Om die reden stellen we voor dat de expressie van bepaalde TG2 splice-varianten relevant kunnen zijn voor PP-MS patiënten. Daarnaast speculeren we dat het expressiepatroon van TG2 splice-varianten in PBMC mogelijk als diagnostische marker kan dienen om GC proefpersonen en PP-MS patiënten van elkaar te onderscheiden.

In conclusie, we hebben voor het eerst de rol van TG2 afkomstig van bloed cellen bestudeerd in de pathologie van MS. Door gebruik te maken van verschillende benaderingen, van fundamenteel tot aan translationeel onderzoek, hebben wij onze huidige kennis over TG2 verbreed en de complexiteit van TG2 biologie in het veld van MS kunnen benadrukken. Tot slot, ons werk laat zien dat er een potentiële klinische toepassing is voor TG2 als biomarker voor de ziekte progressie van MS.