

Nederlandse samenvatting

Sinds de eerste pathologische beschrijving van multiple sclerose (MS) door Jean-Martin Charcot (1868) zijn er bijna twee eeuwen gepasseerd. Vandaag de dag worden patiënten en artsen echter nog steeds geconfronteerd met MS als een ziekte met onbekende oorzaak en geen mogelijkheid tot definitieve genezing. Succesvol onderzoek heeft in de afgelopen jaren geleid tot een nauwkeuriger en snellere manier van het diagnosticeren van MS. Helaas is het bij het stellen van de diagnose nog niet mogelijk om een betrouwbare prognose van het ziektebeloop te geven. Om meer inzicht te krijgen in hoe MS zich ontwikkelt bij individuele patiënten is het belangrijk om te begrijpen wat de verschillende kenmerken zijn van MS.

MS onder de microscoop: het perspectief van de neuropatholoog

De neuropathologie identificeert de (patho)fysiologische mechanismen achter MS. De belangrijkste pathologische kenmerken van MS zijn te vinden in de laesies: gebieden van demyelinisatie met kenmerken van ontsteking, verlies van axonen en verlittekening. Laesies worden gevonden in de witte en grijze stof van hersenen en ruggenmerg, en komen voor in een aantal verschillende stadia. Acute laesies worden gekenmerkt door massale aanwezigheid van ontstekingscellen. Wanneer de ontsteking verdwijnt en er geen herstel van het weefsel optreedt ontstaan in deze gebieden chronische laesies: gebieden van volledige demyelinisatie en verlittekening zonder grote hoeveelheden ontstekingscellen. Naast ontsteking en demyelinisatie is er bij mensen met MS ook sprake van neuro(axo)nale degeneratie, het verdwijnen van zenuwbanen. In chronische laesies is de axonale dichtheid verlaagd tot 20-30% van de normale axonale dichtheid in 'gezonde' witte stof. Deze afname wordt vaak gezien als teken van neurodegeneratie, én kan zelfs optreden buiten de laesies. Een ander belangrijk proces is remyelinisatie, waarbij afgebroken myeline weer opnieuw aangemaakt wordt. Dit is een belangrijk proces waarbij aangedaan hersenweefsel weer voor een deel hersteld kan worden. Voor succesvolle remyelinisatie is de aanwezigheid van voldoende en goed functionerende oligodendrocyten en de voorlopercellen hiervan – oligodendrocyt voorloper cellen – cruciaal. Het is op dit moment niet duidelijk waardoor dit herstelproces toch vaak faalt.

MS en MRI: het perspectief van de neuroradioloog

Waar de neuropatholoog zich voornamelijk bezig houdt met het identificeren van ziektemechanismen en processen op celniveau, beoogt de neuroradioloog de ziekteprocessen te visualiseren. MRI (Magnetic Resonance Imaging) is een zeer gevoelige methode voor het in beeld brengen van laesies. Door de verschillende technieken waarop MRI-beelden worden gemaakt en de verschillende mogelijkheden van het analyseren van de beelden, kunnen met MRI de verschillende pathologische processen (zoals boven beschreven) in beeld worden gebracht. De witte stof laesies kunnen bijvoorbeeld met behulp van T2-gewogen en FLAIR sequenties goed gezien worden. Daarnaast kunnen met behulp van T1-gewogen sequenties, met en zonder contrast, gebieden met acute ontsteking (i.e. met gadolinium aankleurende laesies) en definitieve weefselschade (black holes) in beeld gebracht worden. Een andere

inmiddels zeer belangrijke techniek is het meten van hersenvolumes als maat voor atrofie (de afbraak van zenuwweefsel) veroorzaakt door neuro(axo)nale degeneratie.

Klinische kenmerken van MS: perspectief van de neuroloog

De klinische kenmerken die uiteindelijk het gevolg zijn van de doorgaande ontsteking en neurodegeneratie zijn divers en worden gekenmerkt door een breed spectrum van neurologische symptomen. Patiënten worden onderverdeeld in een aantal klinische subtypes. Het meest voorkomende subtype is relapsing-remitting MS (RRMS), dat voorkomt bij 80% van alle MS-patiënten. Dit subtype wordt gekenmerkt door aanvallen van acute neurologische verslechtering (de relapsing fase, ofwel een exacerbatie/schub/relapse). Deze periode van verslechtering wordt gevolgd door een periode van (on)volledig herstel (de remitting fase). Bij een deel van de patiënten met een relapsing-remitting begin van MS worden de relapses uiteindelijk minder frequent en treedt er een langzame progressieve neurologische achteruitgang op. Het ziekte-type wordt dan geclassificeerd als secundair progressieve MS (SPMS). Een derde subtype, primair progressieve MS (PPMS), wordt gekenmerkt door langzame progressieve neurologische achteruitgang vanaf het begin van de ziekte. Tenslotte is er nog benigne MS (BMS), een subdiagnose die retrospectief wordt gesteld wanneer MS een goedaardig, niet-invaliderend beloop kent.

Onderzoek naar MS: etiologie en ziektebeloop

Het onderzoek naar MS wordt verricht door de combinatie van disciplines, waaronder neurologen, radiologen en pathologen. Voor iedere discipline gelden verschillende manieren van kijken naar dezelfde processen, zoals hierboven beschreven: de patholoog ziet ontsteking als laesies met ontstekingscellen, de radioloog ziet ontsteking als aankleurende laesies op MRI-scans en de neuroloog ziet ontsteking vaak als exacerbatie/schub. Het is inmiddels bekend dat de klinische, radiologische en pathologische kenmerken van MS grote variatie tonen (bijvoorbeeld een ziektebeloop met veel relapses, versus een ziektebeloop met weinig relapses, of veel laesies op MRI-beelden versus juist weinig laesies). Op dit moment is deze variatie nog grotendeels onbegrepen. De precieze oorzaak van MS is eveneens onbekend, maar waarschijnlijk gaat het om een combinatie van omgevingsfactoren, zoals roken en vitamine D expositie, en genetische factoren. De variatie in het menselijk leukocyt antigen (HLA)-gen op chromosoom 6p21.3 (DRB*1501 allel) is de meest prominente risicofactor. Opvallend genoeg zijn de factoren die worden geassocieerd met een vergroot risico op het ontwikkelen van MS (zoals de DRB*1501 variant) slechts matig geassocieerd met het ziekteverloop. Dit doet vermoeden dat de processen die bepalend zijn voor het ontstaan van de ziekte anders zijn dan de processen die bepalend zijn voor het ziekteverloop. MS is dus allesbehalve een eenduidige ziekte; MS wordt gekenmerkt door heterogeniteit, waardoor klinische, pathologische, en radiologische bevindingen niet gezamenlijk een verklaring voor ontstaansmechanismen of ziekteverloop kunnen bieden tot op heden. Juist het begrijpen van de variatie in ziektebeloop is voor artsen en patiënten in de spreekkamer zo belangrijk: waar een deel van de patiënten uiteindelijk te maken krijgt met immobiliteit en ernstige neurologische beperkingen, is er ook een patiëntengroep met alleen milde klachten zonder belemmeringen in het dagelijks leven. Het kunnen geven van een prognose en zelfs het

bepalen van een het behandelingschema gericht op het verwachte ziektebeloop is van groot belang. Een van de belangrijke vragen is nu op welke manier het dan toch mogelijk is, om na decennia onderzoek dan toch manieren kunnen vinden om het wetenschappelijk onderzoek naar MS zodanig in te richten dat de heterogeniteit uiteindelijk wel begrepen wordt.

De manier waarop onderzoek uitgevoerd wordt – en de problemen daarin

Over het algemeen wordt het onderzoek naar de oorzaak en het beloop van MS gericht op de vraag hoe de hersenen van mensen met MS verschillen van gezonde mensen. Bovendien wordt er vaak gekeken naar de verschillen tussen de klinische subtypes. Een van de hypothesen is dat mensen genetisch van elkaar verschillen: mogelijk dat genetische variatie tussen mensen met MS, uiteindelijk op een subtiele manier de pathologische processen kan beïnvloeden, en daarmee bij kan dragen aan een milder danwel ernstiger ziektebeloop. Het onderzoek wat hiernaar in het verleden verricht is, heeft helaas ook teleurstellende resultaten gekend omdat het niet eenduidig genetische varianten heeft kunnen identificeren die het ziektebeloop van MS beïnvloeden. Een van de mogelijk redenen hiervoor is dat wanneer er gekeken wordt naar het ziektebeloop, én de verschillen tussen de subtypes van MS er een aantal aannames gedaan worden over de combinaties tussen radiologische, klinische en pathologische kenmerken van MS. Om te beginnen wordt er vaak verondersteld dat ontsteking het primaire proces is achter relapsing-remitting MS. Ook wordt vaak aangenomen dat neurodegeneratie verantwoordelijk is voor de progressieve fase. Deze aannames zijn echter niet zo maar gerechtvaardigd. MRI-studies die kijken naar het verloop van MS en die de verschillen tussen de klinische subtypes onderzoeken laten zien dat de mate van afwijkingen op T2- en T1-gewogen beelden (als maat voor ontsteking) slechts in bescheiden mate zijn geassocieerd met de mate van klinische achteruitgang bij RRMS. Atrofie (als maat voor neurodegeneratie) in brede zin en vooral van de cerebrale grijze stof in engere zin, lijkt beter geassocieerd met de mate van uiteindelijke handicap bij progressieve MS. Het blijkt alleen niet mogelijk dit als een voorspeller te gebruiken in de dagelijkse klinische praktijk. Bovendien komt atrofie al voor bij RRMS, en wordt ontsteking ook gezien in chronische laesies bij progressieve MS patiënten. Daarbij komt dat pathologische studies die zoeken naar verschillen in pathologische mechanismen tussen de MS subtypes, tot op heden grotendeels teleurstellend zijn geweest. Er zijn weliswaar kleine verschillen op het gebied van de pathologie gevonden, maar deze lijken onvoldoende om oorzakelijke mechanismen te kunnen identificeren. Bovendien is het niet duidelijk in hoeverre ontsteking en degeneratie met elkaar geassocieerd zijn en zijn ze bijzonder moeilijk los van elkaar te meten en analyseren. Kortom, de diversiteit van MS in de kliniek en de verschillende disciplinaire aandachtspunten in onderzoek cirkelen heen om een gedeeld probleem: de heterogeniteit van MS.

De basis van dit proefschrift - richting het endofenotyperen van MS

Om uiteindelijk een antwoord te krijgen op de vragen welke factoren nu de variabiliteit in ziektebeloop bepalen, en of het uiteindelijk mogelijk is om voor een individuele patiënt een prognose te geven van het ziektebeloop, beoogt dit proefschrift duidelijk te maken dat het aanbrenge van het huidige veelal gehanteerde onderscheid – namelijk die van de klinische subtypes- hier niet geschikt voor is. Het is mogelijk veel beter om onderzoek te baseren op

onderscheid in andere subtypes – ofwel fenotypes – gebaseerd op verschillen tussen patiënten in radiologische of pathologische karakteristieken. Simpel gezegd beargumenteert dit proefschrift dus de noodzaak van, en doet het een voorstel voor een andere manier van nadenken over MS als ziekte.

Dit proefschrift beoogt dit doel aan de hand van twee hoofdvragen: valt de heterogeniteit van MS wel uit te drukken door ziekte-fenotypes gebaseerd op radiologische en pathologische kenmerken? En is het vervolgens toch mogelijk genetische varianten te identificeren – ook wel endofenotyperen genoemd – die een rol kunnen spelen in de verschillende expressievormen van MS? Hiertoe zijn drie stappen gezet: A) fenotyperen van MS op basis van radiologie (**hoofdstuk 2**), B) fenotyperen van MS op basis van pathologie (**hoofdstukken 3 en 4**), C) het endofenotyperen van MS (**hoofdstuk 5 en 6**).

Resultaten

In **hoofdstuk 2** is een *fenotypische stratificatie* geprobeerd, gebaseerd op MRI- kenmerken van zowel ontsteking als neurodegeneratie. De mate van neurologische uitval is uiteindelijk het resultaat van zowel ontsteking als neurodegeneratie die beide voorkomen bij MS. Over het algemeen wordt aangenomen dat ontsteking de grootste bijdrage levert aan de invaliditeit in de vroege fase van de ziekte (de remitting fase), terwijl aanzienlijke neurodegeneratie later de overhand neemt (de progressieve fase). Vaak wordt aangenomen dat er een lineair verband bestaat tussen beiden: hoe meer van de hersenen aangedaan is door ontsteking, hoe uitgesprokener de atrofie. De mate van atrofie neemt inderdaad aanzienlijk toe tijdens de progressieve fase van MS, maar komt echter ook in de vroege fase van MS voor. Zelfs in CIS-patiënten, mensen die één periode van neurologische klachten hebben gehad, is de mate van ontsteking een prognostische factor voor het krijgen van RRMS. De hoeveelheid ontsteking draagt ook bij aan de klinische handicap, maar in het algemeen zijn de associaties tussen grijze stof atrofie en de klinische beperking sterker. Studies die deze twee samen besturen zijn helaas zeldzaam.

Hoofdstuk 2 toont ten eerste aan dat er *geen lineair verband bestaat tussen de mate van ontsteking en neurodegeneratie*. Uitgebreide ontsteking is weliswaar geassocieerd met neurodegeneratie (uitgedrukt als atrofie) bij een deel van de patiënten, maar er zijn ook patiëntengroepen die juist meer een ontstekingsprofiel (veel ontsteking en relatief weinig atrofie), dan wel een degeneratief profiel (veel atrofie en weinig inflammatie) vertonen ongeacht de duur van de ziekte. Wanneer patiënten artificieel onderverdeeld worden in vier radiologische subgroepen blijkt dat patiënten met weinig ontsteking en weinig neurodegeneratie relatief weinig klachten hebben. Is er echter sprake van een degeneratief profiel, dan neemt de ernst van de uitvalsverschijnselen toe. Bij een combinatie van veel ontsteking en degeneratie blijkt er sprake van de meeste klinische beperking. Dezelfde analyse in een subgroep van patiënten met slechts een korte ziekteduur (< 10 jaar) laat overeenkomende resultaten zien. *Deze radiologische onderverdeling in fenotypes blijkt dus niet alleen klinisch informatief, maar voorspelt ook een slechtere prestatie na een relatief korte ziekteduur. Bovendien blijkt dat neurodegeneratie niet alleen een belangrijke bijdrage*

levert aan klinische invaliditeit in latere stadia van de ziekte, maar ook in de jaren direct na de diagnose.

In lijn met de onderverdeling op basis van radiologische kenmerken (radiologische fenotypes), is er in **hoofdstuk 3 en 4** gekeken naar een onderverdeling gebaseerd op histopathologische kenmerken (pathologische fenotypes). Hiertoe is door autopsie verkregen hersenweefsel bestudeerd op de aanwezigheid en kenmerken van remyelinisatie (**hoofdstuk 3**) en ontstekings eigenschappen van corticale laesies (**hoofdstuk 4**).

Onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 3** toont aan dat *remyelinisatie vaker voor komt in grijze stof laesies, dan in witte stof laesies*. Mogelijkerwijs komt remyelinisatie vaker voor bij patiënten met een primair-progressief beloop (PPMS). Bovendien zijn er verschillen in het aantal oligodendrocyt-voorloper cellen en volwassen oligodendrocyten tussen witte stof en grijze stof laesies. **Hoofdstuk 4** beschrijft een fenotypische stratificatie gebaseerd op de aanwezigheid van grijze stof laesies en witte stof laesies met specifieke aanwijzingen voor ontsteking. Er blijkt geen verschil te bestaan tussen patiënten met en zonder grijze stof laesies met betrekking tot leeftijd bij overlijden of duur van de ziekte. Een deel van de patiënten met grijze stof laesies heeft echter een rand van geactiveerde microglia (rim-activated microglia – RAM, een kenmerk van ontsteking). *Deze RAM-groep vertoont significant meer demyelinisatie van de hersenschors, de buitenste laag van de hersenen, dan de patiënten zonder enig teken van microglia-activatie. Bovendien zijn patiënten in de RAM-groep aanzienlijk jonger bij overlijden, en hadden zij een kortere ziekteduur.* Dit verschil wordt niet gezien wanneer patiënten-groepen niet specifiek gecategoriseerd worden in verschillende fenotypes.

Remyelinisatie is een interessante kandidaat als fenotype. Het is eerder aangetoond dat het variabel voorkomt en lijkt uitgebreider aanwezig te zijn in bepaalde subgroepen van patiënten. Een interessante vraag is of deze heterogeniteit zou kunnen worden veroorzaakt door verschillen in het aantal oligodendrocyten. Met betrekking tot de mechanismen hierachter vonden we drie aanwijzingen die kunnen wijzen op verschillende pathofysiologische functies in grijze en witte stof: een aanzienlijk lager aantal jonge en volwassen oligodendrocyten in witte stof laesies ten opzichte van normale witte stof, meer jonge oligodendrocyten en volwassen oligodendrocyten in grijze stof laesies in vergelijking met witte stof laesies, en meer jonge oligodendrocyten in geremyeliniseerde grijze stof laesies in vergelijking met grijze stof laesies zonder tekenen van remyelinisatie. Samenvattend: *de grijze en witte stof zijn substantieel anders en mogelijkerwijs bepalen omgevingsfactoren in deze weefsels de gevonden verschillen.*

Als laatste is er gekeken of genetische variatie zou kunnen bijdragen aan de fenotypische verschillen die worden waargenomen bij MS-patiënten. De **hoofdstukken 5 en 6** beschrijven studies naar de eventuele invloed van *genetische variatie in pathofysiologische mechanismen* die mogelijk belangrijk zijn bij MS, op fenotypische variabiliteit (gemeten met MRI) in MS. Omdat genetische studies vaak beperkt worden door de grootte van de datasets, in grote mate gekarakteriseerd worden door fout-positieve uitkomsten, en tevens te lijden hebben onder de complexiteit van de relatie tussen genetica, pathofysiologie en de te gebruiken fenotypes, is er

gebruik gemaakt van twee nieuwe statistische methodes om de data te analyseren. Er werd gekeken naar genen die betrokken zijn bij glutamaat metabolisme en genen die betrokken zijn bij epigenetische mechanismen. Beide genen variaties werden bekeken in relatie tot 7 MRI-bepaalde fenotypes. In het onderzoek dat beschreven staat in **hoofdstuk 5** zijn *consistente associaties gevonden tussen variatie in het ionotrope glutamaat receptor 2A (NMDA receptor sub-unit 2A , GRIN2A) gen en globaal hersenvolume*. In het onderzoek dat staat beschreven in **hoofdstuk 6** is gevonden dat *genetische variabiliteit in histon-deacetylase 11 en 9 (HDAC) en sirtuin 4 (SIRT4) en 5 (SIRT5) genen voorspellend zijn voor verschillen in hersenvolumes*.

Concluderend

Het op andere gronden dan klinische subtypes definiëren van verschillen tussen mensen met MS – namelijk radiologisch of pathologisch – maakt het mogelijk om de van de effecten van subtiele bevindingen beter te kunnen zien. Waar kleine verschillen vaak verloren gaan in het onderzoeken van grote groepen met een heterogene ziekte, maakt dit onderverdelen in radiologische en pathologische fenotypes het mogelijk om de relevantie van subtiele verschillen te onderzoeken. Het onderverdelen in radiologische fenotypes biedt de mogelijkheid een verschil in klinisch functioneren te identificeren ongeacht het subtype en ongeacht de ziekteduur. Het fenotyperen op pathologische kenmerken heeft het mogelijk gemaakt een subgroep van patiënten te identificeren die ontstekingskenmerken in de grijze stof laat zien. Hieruit volgde de belangrijke observatie dat deze mensen op jongere leeftijd overlijden. Het onderzoek naar genetische varianten laat ook subtiele verschillen in radiologische fenotypes zien. Hier moet echter de klinische relevantie nog van blijken.

Hoewel het antwoord op de vraag welke factoren bijdragen aan een variabel ziektebeloop nog niet is beantwoord, laat dit proefschrift wel zien dat door het anders inrichten van onderzoek, namelijk op basis van een onderverdeling in fenotypes, subtiele verschillen uitgelicht kunnen worden. Deze eerste stap draagt daarmee bij aan het uiteindelijke doel: het ontrafelen van de heterogeniteit van MS mogelijk zelfs de relatie tussen subtiele genetische variatie tussen mensen met MS en het uiteindelijke ziektebeloop- richting het endofenotyperen van MS.