

Samenvatting

Samenvatting

Multiple Sclerose (MS) is een ernstige chronische, inflammatoire aandoening van het centrale zenuwstelsel (CZS). MS komt vooral voor bij jong volwassenen en meer bij vrouwen dan bij mannen (2:1) en uit zich vooral in motorische en sensorische stoornissen. Een belangrijk pathologisch kenmerk van MS is het migreren van leukocyten vanuit de bloedbaan naar het CZS. Deze cellen zijn betrokken bij het proces van demyelinisatie, afbraak van de bescherm laag (myeline; de witte stof) rondom de zenuwbanen. Tijdens het ziekteproces zijn meerdere neuropathologische processen gaande zoals activatie van glia cellen, waaronder astrocyten, die betrokken zijn bij littekenvorming in het CZS en er is verminderde myeline vorming door oligodendrocyten wat resulteert in beschadiging aan neuronen met als gevolg voortschrijdende neurologische uitval.

De oorzaak van MS is tot op heden niet bekend. Wel zijn er reeds medicijnen ontwikkeld, vooral gericht op remming van de inflammatie, die deels effectief zijn en de voortgang van het ziekteproces verminderen. Helaas zijn deze medicijnen niet in staat om mensen met MS te genezen en geven deze behandelingen veel bijwerkingen. Het is daarom noodzakelijk om de moleculaire en cellulaire processen te analyseren die bijdragen aan het neuropathologisch beeld van MS. Dit zal uiteindelijk kunnen leiden tot de ontwikkeling van nieuwe, meer selectieve, therapieën om MS te bestrijden.

Dit proefschrift bevat verschillende studies naar de bijdrage van het enzym weefsel Transglutaminase (tTG of TG2) in verschillende neuropathologische processen die een rol spelen bij MS. TG2 is een multifunctioneel enzym dat voorkomt in het hele lichaam. TG2 kan post-translationele veranderingen van eiwitten tot stand brengen, zoals bij de clustering van het amyloid eiwit in de hersenen van Alzheimer patienten. Bovendien kan TG2 werken als een G-eiwit, betrokken bij signaaltransductie van bijvoorbeeld α -adrenerge receptoren. TG2 is aanwezig in het cytoplasma van cellen, maar kan ook op het cel-oppervlak en extracellulair voorkomen. Het extracellulaire TG2 kan de interactie tussen β -integrines en extracellulaire matrix eiwitten, waaronder fibronectine, bevorderen, waarmee het een belangrijke rol speelt in cel-matrix interacties. Op basis van bovenstaande karakteristieken van TG2 is met behulp van cel experimenten duidelijk geworden dat TG2 betrokken is bij verschillende fysiologische processen zoals migratie van cellen, vorming van de extracellulaire matrix, apoptose en differentiatie van cellen. Echter, omdat deze processen (deels) ook een rol spelen in de pathogenese van MS hebben wij de hypothese geformuleerd dat TG2 van cruciaal belang is in verschillende neuropathologische processen die ten grondslag liggen aan MS. Het onderzoek dat deze hypothese getoetst heeft, staat beschreven in dit proefschrift.

Om TG2 eiwit levels kwantitatief te kunnen meten in humaan en proefdier (muis en rat) weefsel en cellen hebben we een assay ontwikkeld, de 'sandwich enzyme-linked immunosorbent assay' (ELISA) die specifiek TG2 eiwit meet (hoofdstuk 2). Deze studie is de eerste die een kwantitatieve assay beschrijft waarmee TG2 eiwit hoeveelheden gemeten kunnen worden in zowel humaan als proefdier materiaal. Er is weinig kruisreactiviteit met andere transglutaminase familieleden. Deze assay is van groot belang voor het onderzoek dat beschreven staat in dit proefschrift, maar ook voor andere onderzoeksgroepen die werken aan TG2.

Vervolgens is onderzocht of TG2 aanwezig is in inflammatoire laesies in humaan post-mortem materiaal van MS patiënten en in een diermodel voor MS. In hoofdstuk 3 is voor het eerst aangetoond dat TG2 aanwezig is in infiltrerende monocyten/macrofagen in actieve en chronisch-actieve MS laesies. Ook is TG2 aanwezig in monocyten/macrofagen in het ruggenmerg van ratten met chronische-relapsing experimentele autoimmune encephalomyelitis (cr-EAE). Om te onderzoeken of TG2 een klinisch relevante rol speelt in MS, hebben we TG2 activiteit tijdens cr-EAE geremd met KCC009, een klein peptide dat specifiek TG2 activiteit remt. Remming van TG2 activiteit leidde tot een onmiddellijke en dramatische vermindering van klinische problemen, zelfs wanneer de behandeling met KCC009 pas start tijdens het ziekteproces. Verder neuropathologisch onderzoek in het ruggenmerg van deze dieren liet zien dat, na remming van TG2 activiteit, er minder infiltratie was van monocyten en een verminderde afname van myeline. We concluderen dat TG2 belangrijk is voor infiltratie van monocyten/macrofagen in het CZS wat uiteindelijk leidt tot demyelinisatie.

In hoofdstuk 4 laten we zien dat, in actieve en chronisch-actieve MS laesies, TG2 ook aanwezig is in reactieve astrocyten. Naast de infiltratie van inflammatoire cellen vanuit de bloedbaan het CZS in, is ook reactieve astroglie (littekenvorming) een belangrijk neuropathologisch kenmerk van MS. Deze reactieve astrocyten vormen het littekenweefsel dat hoogst waarschijnlijk gefaciliteerd wordt door een veranderde samenstelling van verschillende eiwitten in de ECM, waaronder fibronectine. In hoofdstuk 4 laten we zien dat TG2 in astrocyten betrokken is bij adhesie van astrocyten aan fibronectine en migratie over fibronectine. Dit suggereert dat TG2 betrokken is bij de interactie van astrocyten met fibronectine, wellicht door het veranderen van de samenstelling van de ECM.

Deze bevindingen worden bevestigd in hoofdstuk 5 waar de rol van TG2 in rat astrocyt adhesie aan, en migratie over fibronectine is bestudeerd. Van belang hierbij is de waarneming dat inflammatoire cytokinen de hoeveelheid TG2, maar ook TG activiteit in de cel, en ook op het cel oppervlak verhogen. Dit kan de versterkte interactie tussen astrocyten en het ECM eiwit fibronectine verklaren. Op basis van deze waarneming denken wij dat TG2 van belang is bij de vorming van het littekenweefsel met de bijbehorende ECM veranderingen die gevonden worden in chronische laesies bij MS patiënten.

Een ander neuropathologisch aspect is de verminderde myeline vorming in chronische MS laesies. Een van de oorzaken hiervan kan zijn dat de oligodendrocyt voorloper cellen (oligodendrocyt precursor cellen (OPCs)) niet in staat zijn zich te ontwikkelen tot volwassen, myeline vormende oligodendrocyten. Omdat TG2 betrokken is bij differentiatie van verschillende celtypes, waaronder bijvoorbeeld neuronen, is de rol van TG2 in differentiatie van OPCs bestudeerd zoals beschreven staat in hoofdstuk 6. *In vitro* studies laten zien dat TG2 met name tot expressie komt in OPCs en verlaagd is wanneer deze cellen gaan differentiëren. Wanneer TG2 activiteit geremd werd in de gekweekte OPCs was er een verminderde differentiatie en myeline-vorming waar te nemen in deze cellen. Verder onderzoek waarbij gebruik werd gemaakt van een diermodel voor de- en re-myelinisatie in TG2 deficiënte (knock-out) muizen, laat zien dat TG2 knock-out muizen minder in staat zijn tot remyelinisatie van de witte stof in de hersenen in vergelijking tot controle dieren. We concluderen dan ook dat TG2 belangrijk is voor de differentiatie van oligodendrocyten en daardoor een rol speelt in myelinisatie van zenuwbanen.

Kort samengevat, in dit proefschrift laten we zien dat TG2 aanwezig is in de hersenen van MS patiënten als ook in het CZS van een diermodel voor MS. De verschillende studies geven aan dat TG2 functioneel betrokken is bij verschillende neuropathologische processen onderliggend aan MS. Hoewel enerzijds remming van TG2 een interessant aangrijpingspunt lijkt voor therapie van MS (hoofdstuk 3), is anderzijds stimulatie van TG2 productie en activiteit therapeutisch interessant om tot verhoogde myelinisatie van de laesies te komen (hoofdstuk 6). Manipulatie van de productie en activiteit van TG2 is potentieel zeer interessant voor therapieontwikkeling in MS, maar zorgvuldigheid dient te worden betracht bij de mate van manipulatie en ook moet men rekening houden met de fase van het ziekteproces.