

Dutch summary

Mitochondriaal dysfunctioneren in multiple sclerosis

Dutch summary

Multiple sclerose (MS) is een ingrijpende aandoening van het centraal zenuwstelsel en de meest voorkomende oorzaak van niet-trauma gerelateerde invaliditeit in jong volwassenen. MS treft ongeveer 1 op de 1000 personen in Nederland en vrouwen hebben een 2,5 keer grotere kans op het krijgen van de ziekte dan mannen. In 80% van de gevallen begint de ziekte met een relapsing-remitting verloop (RRMS), tijdens deze fase worden periodes van invaliditeit, zoals visuele en motorische problemen, afgewisseld met klachtenvrije periodes. Uiteindelijk, gemiddeld na 10 jaar, zal de ziekte overgaan in secundair progressieve MS (SPMS), welke gekenmerkt wordt door een geleidelijke achteruitgang van functioneren. Overige patiënten starten met een dergelijk progressief verloop van de ziekte, wat bekend staat als primair progressief MS (PPMS).

Tot dusver is het onbekend waarom sommige mensen MS krijgen en anderen niet. Wel weet men dat zowel genetische- als omgevingsfactoren bijdragen aan het ontstaan van de ziekte. Over het algemeen wordt aangenomen dat de ziekte wordt veroorzaakt door een auto-immuun proces gericht tegen myeline en oligodendrocyten, de myeline producerende cellen, in het centraal zenuwstelsel. Myeline is de isolatielaag rondom axonen die ervoor zorgt dat elektrische impulsen sneller en efficiënter door het axon worden geleid. Het pathologische kenmerk van MS is dan ook plaatselijke afbraak van myeline in de witte stof van het brein of ruggenmerg door ontstekingscellen, de MS laesies. Laesies zijn er in verschillende stadia: het begin stadium staat bekend als een actieve laesie, hierin bevinden zich veel ontstekingscellen die het myeline afbreken. Een actieve laesie gaat over in een chronisch actieve laesie, waarin myeline en ontstekingscellen zijn verdwenen uit de kern van de laesie, terwijl aan de rand nog veel ontstekingscellen zijn die ervoor zorgen dat de laesie expandeert. Uiteindelijk zal de ontsteking zich volledig terug trekken uit de hersenen, een gebied achterlatend wat volledig gedemyeliniseerd is, een zgn. chronisch inactieve laesie. In het begin van de ziekte kunnen laesies nog geremyeliniseerd worden, terwijl later in de ziekte laesies worden opgevuld door littekenweefsel gevormd door astrocyten. De afgelopen jaren is het steeds duidelijker geworden dat er naast witte stof laesies ook veel laesies in de grijze stof ontstaan, voornamelijk later in de ziekte. In de grijze stof bevindt zich minder myeline dan in de witte stof, maar grijze stof bevat wel vrijwel alle neuronen. Opmerkelijk is dat grijze stof laesies gekenmerkt worden door een mild ontstekingproces, in tegenstelling tot actieve witte stof laesies; de reden van myeline afbraak in de grijze stof is dan ook onbekend. Wellicht dat microglia, de ontstekingscellen van het brein, verantwoordelijk zijn voor dit proces.

Naast het verlies van myeline in witte en grijze stof, worden in MS laesies ook veel axonen en neuronen onherstelbaar beschadigd. Tegenwoordig wordt algemeen aangenomen dat verlies van axonen en neuronen leidt tot de typische klinische klachten die gepaard gaan met progressieve MS. Aan het begin van mijn promotie onderzoek waren de verschillende mechanismen die leiden tot neurodegeneratie in MS niet volledig bekend, maar er werd gedacht dat mitochondriën weleens een belangrijke rol konden spelen. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was dan ook het ontrafelen van de rol die mitochondriën spelen in de ziekte MS, met een sterke focus op neurodegeneratie.

Mitochondriën zijn kleine organellen die grotendeels verantwoordelijk zijn voor het leveren van de benodigde energie aan de cel. Energie wordt geleverd aan de cel in de vorm van ATP, dat wordt gevormd door oxidatieve phosphorylering (OxPhos). Tijdens dit proces wordt energie die opgeslagen zit in koolhydraten en vetten met behulp

van zuurstof omgezet in ATP. Mitochondriën zijn dan ook essentieel voor het goed functioneren van cellen, en zijn zelfs van extra belang in neuronen vanwege het hoge energie verbruik. In veel neurodegeneratieve aandoeningen, zoals de ziekte van Alzheimer en Parkinson, spelen slecht functionerende mitochondriën dan ook een belangrijke rol in het ziekteproces. Naast het feit dat slecht functionerende mitochondriën minder ATP opleveren, produceren ze ook grote hoeveelheden zeer schadelijke zuurstofradicalen. Vrije radicalen, zoals superoxide en waterstofperoxide (is eigenlijk niet een radicaal), beschadigen dan de mitochondriën en de rest van de cel. Uiteindelijk leidt de combinatie van verminderde energie en verhoogde radicaal productie tot celdood.

In **hoofdstuk 2, 3 en 4** van dit proefschrift hebben we gekeken naar mitochondriaal (dys)functioneren/mitochondriële processen in de witte stof van MS patiënten. Hiervoor maakten we gebruik van autopsie materiaal van MS patiënten en non-neurologische controles. In **hoofdstuk 2** beschreven wij een verhoogd aantal mitochondriën in zowel actieve als inactieve MS laesies, en vonden deze verhoging in astrocyten en axonen. Het grotere aantal mitochondriën in axonen in MS laesies is waarschijnlijk het directe gevolg van demyelinisatie. Direct na demyelinisatie kan het axon geen signalen meer geleiden, dit kan echter hersteld worden door o.a. redistributie van Na²⁺ kanalen. Maar signaalgeleiding door gedemyeliniseerde axonen vraagt veel meer energie, waardoor meer mitochondriën nodig zijn. Zoals gezegd, vonden wij ook een duidelijke verhoging van het aantal mitochondriën in astrocyten, welke gepaard ging met verhoogde activiteit van complex IV en mitochondriaal oxidatieve stress. Eerdere studies hebben aangetoond dat de activiteit van met name complex I van de OxPhos keten vermindert is in MS laesies. Deze vermindering is waarschijnlijk het gevolg van verhoogde productie van vrije radicalen en/of stikstofmonoxide door ontstekingscellen en zal op zijn beurt leiden tot verhoogde productie van superoxide door mitochondriën. De verhoging van complex IV activiteit zou een compensatoire reactie kunnen zijn op de veranderingen in complex IV, terwijl de aanwezigheid van mitochondriaal oxidatieve stress wordt veroorzaakt door vrije radicaal productie door mitochondriën en naburige ontstekingscellen. In **hoofdstuk 3** lieten we zien dat de expressie van parkin, een mitochondriaal eiwit, verhoogd is in astrocyten in MS laesies. Parkin is een eiwit betrokken bij het verwijderen van slecht functionerende mitochondriën in de cel. Het opruimen van niet goed functionerende mitochondriën is essentieel voor het neuron, dat anders door een combinatie van teveel vrije radicalen en te weinig energie zou degenereren. Wij vermoeden dan ook dat de in **hoofdstuk 2** beschreven veranderingen in astrocytaire mitochondriën samen met de aanwezige ontsteking de oorzaak zijn voor de verhoogde parkin expressie. Deze data suggereert dat de veranderingen in mitochondriën in astrocyten weleens kunnen bijdragen aan schade aan bijvoorbeeld axonen in MS laesies, bijvoorbeeld door verhoogde vrije radicaal productie. Maar, astrocyten staan ook bekend als cruciale cellen in het beschermen van de hersenhomeostase. Zo vonden wij in **hoofdstuk 4** dat astrocyten in actieve MS laesies een verhoogde expressie hebben van peroxiredoxine 3 en thioredoxine 2, twee mitochondriële antioxidanten. In vitro hebben wij vervolgens aangetoond dat astrocyten met meer mitochondriële antioxidanten beter in staat zijn neuronen te beschermen tegen vrije zuurstof radicalen, die ook verhoogd aanwezig zijn in actieve MS laesies. Onze data suggereert zowel een degeneratieve/negatieve en protectieve rol voor astrocyten in witte stof laesies in MS, vervolg onderzoek zou moeten uitwijzen welk van de twee de

Dutch summary

overhand heeft en of dit verschillend is de verschillende laesie stadia.

Het onderwerp van **hoofdstuk 5 en 6** is mitochondriale dysfunctie in de grijze stof van MS patiënten. Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat mitochondriën in de neuronen van MS patiënten ernstig beschadigd zijn. Zo is er een verlaagde expressie van bepaalde onderdelen van de OxPhos keten, en is er verminderde activiteit van OxPhos complexen I, III en IV. Hiernaast is het mitochondriaal DNA in corticale neuronen in MS ernstig beschadigd. De meest logische verklaring voor schade aan mitochondriaal DNA is oxidatieve stress, dat veroorzaakt kan worden door naburige geactiveerde microglia en/of door radicaal productie in de mitochondriën zelf. Gevolg van beschadiging van mitochondriaal DNA is verminderd functioneren van de OxPhos keten, wat weer zal leiden tot minder energie productie en verhoogde superoxide productie. De verminderde expressie van vele genen die coderen voor verschillende OxPhos onderdelen leidde er toe dat wij vermoedden dat er iets mis was met de transcriptie van OxPhos genen. Om die reden hebben wij in **hoofdstuk 5** gekeken naar de expressie van transcriptiefactoren en cofactoren betrokken bij OxPhos gen expressie. Zo hebben wij verminderde PGC-1 α geïdentificeerd als een mogelijke verklaring voor de mitochondriale veranderingen in MS neuronen. PGC-1 α is een transcriptionele cofactor die de expressie reguleert van diverse genen betrokken bij energie metabolisme en mitochondrieel functioneren. Zo reguleert PGC-1 α onder andere de expressie van OxPhos onderdelen, mitochondriale antioxidanten en uncoupling proteïns. Het is daarom ook niet verassend dat al deze eiwitten verminderd tot expressie komen in neuronen in MS cortex, zoals wij beschreven in **hoofdstuk 5**. In vitro, hebben wij laten zien dat een verlaging van de hoeveelheid PGC-1 α in neuronen leidt tot mitochondriale dysfunctie, verhoogde ROS productie en een verhoogd percentage celdood onder exogene oxidatieve stress. Aangezien er ook sprake is van exogene oxidatieve stress in de cortex van MS patiënten, vermoeden wij dat verlaagde PGC-1 α expressie in neuronen bijdraagt aan het neuronale verlies. Het is dan ook erg interessant dat wij een relatie vinden tussen de hoeveelheid neuronale celdood en PGC-1 α expressie in neuronen in MS patiënten.

In tegenstelling tot wat vaak wordt gedacht, is de mitochondriale populatie van een cel erg veranderlijk. De processen die leiden tot veranderingen in vorm, hoeveelheid en distributie van mitochondriën zijn fissie en fusie, beide het onderwerp van **hoofdstuk 6**. Mitochondriale fissie en fusie zijn essentiële processen in neuronen, die er samen voor zorgen dat de mitochondriale populatie kan voldoen aan de lokale behoefte aan energie. Daarnaast zorgen fissie en fusie er voor dat de totale mitochondriale populatie van een cel gedurende lange tijd goed blijft functioneren. Aangezien het functioneren van mitochondriën in neuronen in MS cortex verstoord is, hebben wij onderzocht of er mogelijk veranderingen zijn in genen en eiwitten betrokken bij mitochondriale fissie en fusie in MS cortex. De resultaten in **hoofdstuk 6** laten zien dat genexpressie van de vijf genen betrokken bij mitochondriale fissie en fusie verminderd zijn in de cortex van MS patiënten, maar dat deze vermindering niet altijd statistische significantie bereikt. De verschillen op eiwit niveau tussen MS cortex en 'gezonde' cortex zijn over het algemeen nog kleiner. Wel laten we zien dat in een neuronale cellijn expressie van de fissie en fusie genen wordt gereguleerd door PGC-1 α . Dus verminderde expressie van PGC-1 α , zoals beschreven in **hoofdstuk 5**, is een mogelijke verklaring voor de verlaagde expressie van fissie en fusie genen in MS cortex. Of dit consequenties heeft valt te betwijfelen, omdat

we niet of nauwelijks verschillen vinden in expressie van fissie en fusie eiwitten. Verder onderzoek is dus nodig om daadwerkelijk vast te stellen of mitochondriale fissie en fusie is veranderd in MS cortex en of dit invloed heeft op de ziekte.

Tezamen laten de studies beschreven in dit proefschrift zien dat er sprake is van diverse mitochondriële veranderingen in de hersenen van MS patiënten. Wij en andere onderzoeksgroepen hebben verschillende veranderingen gevonden in axonale mitochondriën die doen vermoeden dat zij een belangrijke rol spelen bij axonaal verlies. Onze data omtrent mitochondriën in astrocyten is tweeledig en verder onderzoek zou moeten uitwijzen of zij het omliggende hersenweefsel beschermen of juist bijdragen aan degeneratie. De laatste twee studies lieten zien dat er op transcriptioneel niveau al veel mis is met mitochondriën in de grijze stof van MS patiënten. Het verlies van PGC-1 α lijkt een belangrijke factor te zijn in het dysfunctioneren van neuronale mitochondriën en daarmee bij te dragen aan neuronaal verlies. Dit alles maakt PGC-1 α een interessante kandidaat voor een mogelijke nieuwe therapie om de progressie van MS te remmen.