

MULTIPLE SCLEROSIS

Multiple sclerosis (MS) is een chronische ontstekingsaandoening van het centraal zenuwstelsel (CZS) wat zowel het brein als ruggenmerg omvat. Op beide locaties kunnen ontstekingen ontstaan waardoor schade wordt veroorzaakt aan zenuwen. In een gezonde situatie zit er een isolerend laagje, myeline, om de zenuwen waardoor deze efficiënt signalen door kunnen geven aan onder andere zenuwen die bijvoorbeeld spieren aansturen. Door de ontstekingen wordt de myeline afgebroken waardoor de zenuwen veel minder efficiënt signalen door kunnen geven. Dit verschijnsel resulteert in de verschillende symptomen, zoals krachtverlies en krampachtige bewegingen, waardoor MS gekenmerkt wordt. Het is nog onduidelijk waardoor MS ontstaat maar een van de meest aangehangen hypothese is dat MS een auto-immuun aandoening is waarbij specifieke witte bloed cellen genaamd T cellen, onderdeel van het immuunsysteem, een ontstekingsreactie initiëren tegen het myeline waarna andere witte bloedcellen zoals macrofagen en cellen van het brein deelnemen aan het ontstekingsproces. Wereldwijd zijn ongeveer twee miljoen MS patiënten waarbij twee keer zoveel vrouwen MS hebben vergeleken met mannen. De gemiddelde leeftijd waarop MS symptomen beginnen ligt tussen de 25 en 32 jaar waardoor MS een van de meest voorkomende oorzaak is van neurologische aandoeningen en invaliditeit onder jong volwassenen.

Het CZS is een delicate omgeving waar in een normale situatie geen plaats is of beperkt plaats is voor bepaalde actieve stoffen en cellen, zoals witte bloed cellen, die wel in de rest van het lichaam veel mogen voorkomen. Hiernaast zijn er juist ook stoffen die essentieel zijn voor normaal functioneren van het CZS en die daarom in het CZS moeten blijven. De constructie die dit reguleert noemt men de bloed-hersen barrière (BHB); deze bloedvaten in het CZS bevatten andere eigenschappen dan de bloedvaten elders in het lichaam waardoor een specifiek milieu in CZS mogelijk gemaakt wordt. De BHB bestaat uit verschillende onderdelen en soorten cellen waarvan de endotheel cellen bijzonder zijn aangezien ze anders zijn dan de endotheel cellen uit bloedvaten elders in het lichaam. Endotheel cellen zijn langwerpige cellen die de binnenkant van een bloedvat bekleden, zij staan direct in contact met het langsstromende bloed. De endotheel cellen van de BHB brengen dezelfde eiwitten meer tot expressie en brengen extra eiwitten tot expressie vergeleken met endotheel cellen uit bloedvaten elders in het lichaam. Een voorbeeld hiervan zijn tight junction (TJ) eiwitten; dit zijn eiwitten op endotheel cellen die ervoor zorgen dat naast elkaar liggende cellen elkaar heel strak kunnen vasthouden doordat de eiwitten op de naast elkaar liggende endotheel cellen met elkaar binden. Hierdoor wordt het moeilijker voor stoffen en cellen in het bloed om door de endotheel cellen heen het brein in te gaan. Het volgende belangrijke celtype wat tot de BHB behoort is de astrocyt; dit is een hersencel met uitlopers waaraan eindvoetjes zitten. Deze eindvoetjes liggen dicht tegen het endotheel aan en scheiden in een gezonde situatie stoffen uit waar de endotheel cellen op reageren door extra dicht en strak tegen elkaar aan te liggen o.a. door verhoogde expressie van de eerder genoemde TJ eiwitten. Andere onderdelen van de BHB zijn de cellen genaamd pericyten en een netwerk van eiwitten genaamd extracellulaire matrix.

Tijdens een actieve periode bij MS patiënten verkeren zeer lokale gebieden van het CZS zich in een ontstekingsstatus waarbij o.a. de BHB niet meer goed functioneert. Tijdens deze ontstekingsstatus verkeren ook de cellen van de BHB zoals de endotheel cellen en de astrocyten in een ontstekingstoestand. Zowel de endotheel cellen als de astrocyten brengen ontsteking stoffen tot expressie waardoor ze bijdragen aan het doorlaten van ontstekingscellen vanuit het bloed het brein in. Een zeer belangrijke rol in dit proces is weggelegd voor de endotheelcellen van de BHB. De endotheel cellen worden onder invloed van ontsteking plakkerig door expressie van bepaalde eiwitten op het oppervlak. Hiernaast verliezen ze expressie van TJ eiwitten waardoor naast elkaar liggende endotheel cellen niet meer zo vast tegen elkaar aan liggen. Witte bloedcellen zoals T-cellen blijven aan de plak-eiwitten van de endotheelcellen plakken en kunnen vervolgens makkelijker door het endotheel heen het brein in migreren waar ze schade aanrichten. Belangrijk hierbij om te weten is dat dit een normaal proces is om eventuele infecties in het brein aan te pakken. In het geval van MS gaat het echter niet om een reactie tegen een eventuele bacterie maar om een reactie tegen een lichaamseigen product, het myeline.

PROMOTIEONDERZOEK

Het doel van dit proefschrift is om betrokkenheid van nieuwe moleculaire mechanismen bij de regulatie van de BHB tijdens een gezonde status en tijdens ziekte te bepalen met als doel in te grijpen op deze mechanismen teneinde het ziekteproces te remmen. Tetraspanines zijn moleculen waarvan aangetoond is dat ze betrokken zijn bij het migratie proces van witte bloedcellen. In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift laten we zien dat de tetraspanines CD9 en CD81 tot expressie komen in het brein. CD9 en CD81 komen tot expressie op de vaten in het brein terwijl beide moleculen ook in het parenchym tot expressie komen. *In vitro* laten we zien dat een hersenenendotheel cellijn en astrocyten ook allebei de tetraspanines tot expressie brengen. Onder ontsteking omstandigheden wordt de expressie van CD9, maar niet van CD81, verhoogd door de endotheel cellen maar niet door de astrocyten. Functioneel gezien hebben we aangetoond dat endotheliaal CD9 en CD81 betrokken zijn bij migratie van monocyten, witte bloedcellen, door de endotheel cellen heen. Tot slot hebben we aangetoond dat het blokkeren van CD9, en niet van CD81, met antilichamen resulteert in een verbeterde barrière functie van de endotheel cellen.

In toevoeging tot de tetraspanines, hebben we een specifieke klasse receptoren, de sphingosine-1 fosfaat (S1F) receptoren, en het effect van moleculen welke hieraan binden bestudeerd in hoofdstukken 3, 4 en 5. In **hoofdstuk 3** hebben we eerst S1F receptoren 1 (S1F₁) en 3 (S1F₃) bestudeerd waarbij we hebben onderzocht welke cellen in het brein deze receptoren tot expressie brengen en wat er met de expressie van deze receptoren gebeurt in het brein van MS patiënten. S1F₁ en S1F₃ werden tot expressie gebracht door astrocyten in controle hersenweefsel. In hersenweefsel van MS patiënten vonden we een sterke toename in expressie van beide receptoren in astrocyten in zowel actieve als inactieve MS laesies. Vervolgens hebben we *in vitro* bestudeerd of we dit konden imiteren waarbij menselijke astrocyten in celweek werden gestimuleerd met het ontstekingsbevorderend stofje tumor necrose factor- α (TNF- α). We laten zien dat onder deze ontstekingsomstandigheden expressie in astrocyten van beide SIF receptoren inderdaad omhoog gaat. Tevens tonen wij aan dat deze astrocyten reageren op het medicijn Gilenya wat een SIF receptor modulator is. Onder invloed van dit medicijn worden astrocyten die met TNF- α gestimuleerd zijn minder inflammatoir. Dit betekent dat wij aantonen dat astrocyten in het brein en met name tijdens MS een doel zijn voor het medicijn Gilenya en dat ze onder invloed van dit medicijn minder inflammatoir worden.

Vervolgens tonen we in **hoofdstuk 4** meer effecten aan van het medicijn Gilenya op astrocyten. In dit hoofdstuk tonen we aan dat er in hersenweefsel van MS patiënten waar een ontsteking zit een verstoorde balans is in een bepaald soort vetten genaamd sphingolipiden vergeleken met hersenweefsel van MS patiënten waar geen ontsteking zit en met hersenweefsel van personen zonder MS. We hebben ontdekt dat een van deze vetsoorten genaamd de ceramides minder tot expressie komen in actieve MS laesies en dat de verhouding van de verschillende ceramides verstoord is. Ceramides zijn een soort sphingolipiden die geassocieerd zijn met ontsteking. Door nader onderzoek hebben we aangetoond dat het de astrocyten in actieve MS laesies zijn die een van deze ceramides, C16 ceramide, verhoogd tot

expressie brengen ondanks de algemene afname van de totale ceramides in actieve MS laesies. Door astrocyten onder ontstekingsomstandigheden te behandelen met Gilenya zien we dat de astrocyten weer minder ceramide tot expressie brengen. Functioneel vertaalt zich dat in minder migratie van monocyt door endotheel cellen heen als de endotheel cellen worden blootgesteld aan kweekvloeistoffen afkomstig van deze behandelde astrocyten..

Tot slot bestuderen we in **hoofdstuk 5** de functie van een van de andere S1F receptoren in endotheel cellen, het betreft hier S1F₅. We maken gebruik van twee S1F₅ modulatoren waaronder Gilenya en een selectieve S1F₅ modulator. Door een hersenendotheel cellijn tijdens de celweek te behandelen met Gilenya en de selectieve S1F₅ modulator wordt een betere barrièrefunctie van het endotheel bewerkstelligd. Als gevolg hiervan zien we verminderde monocyte migratie door de behandelde endotheelcellen heen. Vervolgens hebben we expressie van de S1F₅ receptor verlaagd door deze genetisch te onderdrukken. De barrière functie van deze endotheel cellen ging hierdoor achteruit, wat verklaard kon worden door verlaagde expressie van tight junction (TJ) eiwitten. Hiernaast ging de expressie van andere belangrijke eiwitten, zoals transport eiwitten, omlaag. Interessant genoeg werd door het verlagen van de expressie van S1F₅ in de endotheel cellijn de expressie van ontstekings-eiwitten (MCP-1, IL-8, IL-1 β , TNF- α , ICAM-1 en VCAM-1) verhoogd. Functioneel vertaalde deze bevindingen zich in verhoogde adhesie van monocyt aan het endotheel en verhoogde migratie van monocyt door het endotheel heen. Deze ontstekingsstatus van het endotheel, ontstaan door het verlagen van de S1F₅ receptor, werd deels veroorzaakt door een transcriptie factor (NF- κ B) waarvan bekend is dat deze een centrale rol speelt in ontstekingsprocessen.

CONCLUSIE

Samengevat hebben we in dit proefschrift aangetoond dat moleculaire mechanismen in zowel endotheelcellen als in astrocyten betrokken zijn bij het in stand houden van de bloed-hersens barrière eigenschappen, maar ook bij het in stand houden van een ontstekingsstatus van de bloed-hersens barrière. We hebben laten zien dat tetraspanines zoals CD9 op endotheelcellen in staat zijn om migratie van ontstekingscellen te ondersteunen en dat er een belangrijke rol is weggelegd voor sphingolipiden en de sphingolipid receptoren, in zowel endotheel cellen als in astrocyten. In MS laesies werd een verstoorde sphingolipide balans gevonden, maar we hebben aangetoond dat in het brein zowel endotheel cellen als astrocyten positief kunnen reageren op S1F receptor modulators. Dit hebben wij gedaan door in celkweek aan te tonen dat een opgewekte ontstekingsstatus in deze cellen werd verlaagd door deze receptoren als target te gebruiken. Daarnaast is het belang aangetoond van S1F₅ in het in stand houden van een gezond fenotype van hersendotheelcellen. Verlies van signalering door deze receptor resulteert in een reversibele verhoogde ontstekingsstatus van het endotheel. Concluderend kunnen we zeggen dat in de toekomst meer selectieve moleculen ontwikkeld en gebruikt kunnen worden om progressie van MS pathologie te voorkomen en daarbij zo min mogelijk bijwerkingen te induceren.

