

Dutch summary

Nederlandse samenvatting

Grijze stof pathologie bij MS: Histopathologische, moleculair biologische en MRI studies

Multiple sclerose (MS) is een ziekte van het centrale zenuwstelsel (CZS) (de hersenen en het ruggenmerg). MS doet doorgaans zijn intrede tussen het 20^e en 30^e levensjaar en heeft dan ook een enorme impact op het dagelijks leven van de patiënten. In het merendeel van de patiënten (~80%) begint de ziekte met een zogenaamde relapsing-remitting (RRMS) beloop. Deze patiënten krijgen te maken met zogenaamde 'schubs' waarbij ontstekingsreacties in het CZS aanwezig zijn. Deze schubs, die kunnen leiden tot een veelvoud aan neurologische symptomen (bijv. eenzijdig gezichtsvelduitval, gevoelsstoornissen, verzwakte ledematen), verdwijnen 'spontaan' na verloop van tijd geheel of gedeeltelijk. Het merendeel van deze patiëntengroep komt uiteindelijk terecht in een zogenaamde secundair progressieve (SP) fase, waarbij de ziekte gekenmerkt wordt door een langzame neurologische achteruitgang. Tijdens deze fase neemt het aantal ontstekingsreacties in het CZS sterk af, maar zien we juist een sterke toename van de mate van atrofie (verlies aan brein volume). Overigens komt (RR)MS twee keer zo veel voor bij vrouwen als bij mannen. Een minderheid van de MS patiënten (~15%) ervaart vanaf het begin van de ziekte een geleidelijke neurologische achteruitgang *zonder* schubs, deze vorm wordt dan ook primair progressieve MS (PPMS) genoemd. Opvallend genoeg begint primaire progressieve MS vaak op ongeveer dezelfde leeftijd als de secundaire progressieve fase. PPMS komt bij vrouwen en mannen evenveel voor. Voor de progressieve vorm van MS, dus zowel PPMS als SPMS, is op dit moment geen effectieve behandeling beschikbaar. Het verkrijgen van meer inzicht in de ziekteprocessen die bij progressieve MS een rol spelen is dus ook van cruciaal belang om een succesvolle strategie te ontwikkelen om de neurologische achteruitgang een halt toe te roepen of idealiter zelfs te doen keren.

Van MS wordt veelal gedacht dat het een autoimmuunziekte is waarbij een scala aan omgevings- en genetische factoren ertoe bijdragen dat het eigen (auto) CZS wordt aangevallen door ons afweer (immuun) systeem. Kleine genetische mutaties (zgn. SNPs) in verschillende immuungerelateerde genen verhogen de kans op het krijgen van de ziekte. Mutaties in het zgn. major histocompatibility complex II lijken hier de grootste invloed op te hebben. Daarnaast zijn een aantal omgevingsfactoren geassocieerd met een verhoogde kans op het krijgen van MS. Enkele voorbeelden zijn infecties (m.n. Epstein-Barr virus), vitamine D deficiëntie en verlaagde zonlicht blootstelling, roken en hygiëne.

De hersenen kun je grofweg opdelen in de witte- en de grijzestof. In de grijzestof bevinden zich met name de zenuwcellen (neuronen) en in de witte stof hun lange uitlopers (axonen). De axonen worden omgeven door een isolerend laagje myeline (de myeline-schede), deze wordt gevormd door zgn. oligodendrocyten. Het myeline zorgt ervoor dat de elektrische impulsen, gegenereerd vanuit de cellen in de grijzestof, razendsnel worden doorgegeven aan een doelorgaan (bijv. spieren in de arm of been) of doelcel. Naast de functie van het snel doen laten verlopen van elektrische signalen, zorgt de isolerende myeline-schede voor extra bescherming van het lange en kwetsbare axon. Bij verlies van de myeline-schede zal ook het kwetsbare axon worden aangetast. Bij MS is het zo dat de oligodendrocyten, hun myeline-vormende uitlopers en daarnaast ook de axonen worden aangetast. In het begin van de ziekte, tijdens de RR fase, worden deze componenten m.n. aangetast door het immuunsysteem, waarbij ontstekingsprocessen

zowel het myeline als de axonen aantasten. Met name de aantasting van axonen zorgt ervoor dat verbindingen tussen hersengebieden en doelorganen worden onderbroken en verklaart dan ook goed de neurologische verschijnselen die bij de MS patiënten kunnen optreden. Het verlies van myeline kan in een aantal gevallen worden ondervangen doordat de resterende axonen opnieuw worden voorzien van een (beschermend) laagje myeline, dit proces wordt 'remyelinisatie' genoemd. Gezien het feit dat de ontstekingsreacties in het CZS in het *begin van de ziekte* een belangrijke rol spelen bij het ontstaan van schade aan myeline en axonen, is het niet verbazingwekkend dat krachtige ontstekingsremmers als natalizumab (dit medicijn zorgt ervoor dat ontstekingscellen niet in staat zijn het CZS in te komen en in de bloedbaan blijven) een sterke reductie bewerkstelligt wat betreft het aantal schubs en het aantal ontstekingsreacties in het CZS bij RRMS patiënten. Wel moet hierbij worden aangetekend dat natalizumab, vanwege de bijwerkingen, momenteel niet beschikbaar is als eerstelijns therapie.

Ondanks deze successen zijn er voor progressieve MS geen therapeutische opties beschikbaar. In de progressieve fase doven de ontstekingsprocessen langzaam uit maar vindt er desondanks nog steeds schade plaats aan de myeline en axonen. De onderliggende mechanismen hiervan zijn nog niet opgehelderd, maar spelen mogelijk een cruciale rol tijdens progressieve MS. Het afgelopen decennium is steeds duidelijker geworden dat tijdens de progressieve fase in toenemende mate afwijkingen worden gevonden in de grijzestof. De grijzestof, kan grofweg worden opgedeeld in de cerebrale cortex (hersenschors; de windingen en groeven aan de buitenkant van het brein) en de diepe grijzestof kernen. Met uiterst gevoelige immunohistochemische methoden is aangetoond dat in de progressieve fase juist in deze gebieden demyelinisatie (het verdwijnen van de myeline-scheden) optreedt en dat er ook een sterke atrofie (inkrimping) plaatsvindt van deze hersengebieden. Daarbij komt dat deze grijzestof afwijkingen, i.t.t. witte stof afwijkingen, een stuk beter de mate van klinische achteruitgang bij MS patiënten kunnen verklaren. Echter, mede door het feit dat deze grijzestof afwijkingen lange tijd over het hoofd zijn gezien, zijn de onderliggende ziektemechanismen grotendeels onbekend. Daarom was **het doel van dit proefschrift om meer inzicht te krijgen in de grijzestof pathologie bij MS**, en zo een beter begrip te krijgen van mogelijk onderliggende mechanismen en hun klinische relevantie. Met dit onderzoek hoopten we aanwijzingen te vinden die uiteindelijk moeten leiden tot mogelijke therapeutische interventies die de grijzestof schade een halt toe roepen en daarmee de onderliggende neurologische progressie.

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene inleiding gegeven ten aanzien van het onderwerp en de hoofdonderzoeksvragen van dit proefschrift.

In **hoofdstuk 2** hebben we gekeken naar de meningen (hersenvliezen) van MS patiënten en de mogelijke relatie van ontsteking in de meningen met demyelinisatie in de cerebrale cortex. Verder hebben we in dit hoofdstuk gekeken naar myeline afbraakproducten in de meningen en ten slotte naar gedemyeliniseerde corticale laesies en hun relatie met klinische eigenschappen van MS patiënten. Ruim 10 jaar geleden werd de aanwezigheid van corticale laesies bij MS patiënten (her)ontdekt. Deze corticale laesies bleken, i.t.t. tot de laesies in de witte stof, niet/nauwelijks ontstoken te zijn (één van de redenen waarom corticale laesies zo lang over het hoofd zijn gezien). Daarom werd al snel geopperd

Dutch summary

dat ontstekingsprocessen in de daarboven gelegen meningen (en mogelijk daarbij vrijkomende 'myelinotoxische' stoffen) bij het ontstaan van deze corticale demyelinisatie, die overigens zéér uitgebreid kan zijn, een mogelijke rol zou kunnen spelen. Daartoe besloten wij om de hypothese dat de aanwezigheid van ontstekingscellen in de meningen van MS patiënten en de aanwezigheid van corticale demyelinisatie met elkaar in verband zouden staan, in **hoofdstuk 2.1** te testen. In dit hoofdstuk hebben we uitgebreid en nauwkeurig onderzocht in de meningen van MS patiënten of er een spatiële relatie bestond tussen de aanwezigheid van meningeale inflammatie en corticale demyelinisatie. Ondanks dat we een significante toename vonden van verschillende typen ontstekingscellen in de meningen van MS patiënten, vonden we zowel op globaal niveau als op regionaal niveau *geen* relatie met de aanwezigheid van subpiale (= oppervlakkig gelegen) demyelinisatie. Ondanks natuurlijk enige teleurstelling dat we onze hypothese moesten verwerpen deden we bij toeval een andere bevinding welke het onderwerp is van **hoofdstuk 2.2**. In dit hoofdstuk beschrijven we de aanwezigheid van grote hoeveelheden myeline in de meningen van MS patiënten. Opmerkelijk was dat deze myeline afbraakproducten met name buiten de cellen (extracellulair) gelegen waren. Aangezien we deze bevinding niet goed konden plaatsen ("vrij" myeline zou theoretisch opgeruimd moeten worden door het immuunsysteem) hebben we vervolgens getest of deze bevinding wel specifiek was. Daartoe hebben we weefsel van patiënten met andere neurologische aandoeningen (zoals de ziekte van Alzheimer, infarcten en kinderrwittestofziekten) en ook van niet-neurologische patiënten gecontroleerd op de aanwezigheid van myeline in de meningen. Ook werden mogelijke technische redenen voor het aantreffen van de myeline producten uitgesloten. Keer op keer bleek dat het extracellulaire myeline in de meningen zeer specifiek was voor MS patiënten (niet aanwezig in de andere patiëntenweefsels). Daarnaast vonden we dat deze extracellulaire myeline ook in de zgn. perivasculaire ruimtes (ook wel de ruimte van Virchow-Robin) gevonden kon worden. Dit zou mogelijk kunnen impliceren dat gedegenererd myeline bij MS patiënten, via de perivasculaire ruimte draineert naar de meningen. Waarom dit losliggende myeline in de meningen van MS patiënten, i.t.t. bijvoorbeeld wat we vonden bij patiënten met een herseninfarct, niet wordt opgeruimd door het immuunsysteem blijft vooralsnog onbekend, maar dient in verdere studies te worden uitgezocht. In **hoofdstuk 2.3** onderzochten we, histopathologisch gezien, drie groepen MS patiënten. De eerste groep MS patiënten (19 patiënten) werd gekarakteriseerd door de (vrijwel) volledige *afwezigheid* van corticale demyelinisatie. De tweede groep werd gekarakteriseerd door de *aanwezigheid* van uitgebreide corticale demyelinisatie (22 patiënten). Deze laatste groep kon vervolgens nog worden opgedeeld in een groep met corticale laesies maar *zonder* de aanwezigheid van geactiveerde microglia (de intrinsieke immuuncellen van het CZS) aan de randen van hun corticale laesies (10 patiënten) en een groep *mét* geactiveerde microglia aan de randen van hun corticale laesies (12 patiënten). We vonden dat de groep MS patiënten *mét* geactiveerde microglia aan de randen van hun corticale laesies een stuk jonger overleden (gemiddeld 53,5 jaar) dan MS patiënten zonder corticale laesies (gemiddeld 66,9 jaar) of MS patiënten met corticale laesies maar zonder geactiveerde microglia aan hun randen (gemiddeld 68,7 jaar). Ook zagen we dat de patiëntengroep met geactiveerde microglia aan de randen van corticale laesies een agressiever (d.w.z. korter) ziektebeloop hadden. Verder vonden we dat er een correlatie bestond tussen de aanwezigheid van ontstekingsactiviteit in wittestof laesies en corticale laesies met geactiveerde microglia. Dit geeft waarschijnlijk aan dat patiënten met

microglia in de randen van hun corticale laesies, buiten dat ze een klinisch en pathologisch onderscheidbare subgroep representeren, over het geheel genomen een ernstigere ontstekingsactiviteit hebben in hun CZS.

In **hoofdstuk 3** hebben we gekeken naar hippocampus pathologie bij MS patiënten. De hippocampus is evolutionair gezien een oud stuk cortex dat voornamelijk betrokken is bij het werkgeheugen en visuo-spatieële geheugen. Van beide cognitieve functies weten we dat deze frequent zijn aangedaan bij MS patiënten. In een eerdere studie konden we al aantonen dat er in de hippocampi van MS patiënten regelmatig demyelinisatie optreedt. In **hoofdstuk 3.1** van dit proefschrift hebben we onderzocht of het cholinerge neurotransmitter systeem, dat een belangrijke input geeft aan de hippocampus en dat essentieel is voor leren en geheugen afwijkend is bij MS patiënten. Van mensen met de ziekte van Alzheimer weten we al heel lang dat de hippocampus wordt aangetast en dat het cholinerge neurotransmitter systeem is aangedaan. Vandaar dat we ter vergelijking hippocampus materiaal van Alzheimer patiënten meenamen in ons onderzoek. Ten eerste hebben we gekeken naar de activiteit en eiwitexpressie van het enzym choline acetyltransferase (ChAT): dit enzym zorgt voor de synthese van acetylcholine. Daarnaast hebben we gekeken naar de activiteit en eiwitexpressie van het acetylcholine degraderende enzym acetylcholinesterase (AChE). Net als bij de ziekte van Alzheimer vonden we in de hippocampi van MS patiënten een duidelijke afname in de activiteit en expressie van het acetylcholine synthetiserende enzym ChAT. Dit duidt waarschijnlijk op een afname van cholinerge input vanuit het basale voorbrein, de plaats waar de cholinerge neuronen gelegen zijn. Wat betreft het enzym AChE zagen we geen afname (of toename) van de activiteit en expressie van dit enzym in MS hippocampi, dit i.t.t. de ziekte van Alzheimer waar we zoals verwacht wel een afname van AChE vonden. Dit alles kan erop wijzen dat er een verstoorde cholinerge balans is in de hippocampi van MS patiënten. **Hoofdstuk 3.2** is een correspondentie waarbij we reageren op een recent uitgevoerde klinische trial, waarbij de AChE inhibitor donepezil is gebruikt om het geheugen van MS patiënten te herstellen door de acetylcholine levels te doen laten stijgen. In onze correspondentie pleiten we ervoor dat, gezien het feit dat AChE nog intact is bij MS patiënten (zie hoofdstuk 3.1), dit enzym harder moet worden geremd om in de synapsspleet een adequate concentratie acetylcholine over te houden (d.w.z. een hogere dosis donepezil geven). Dit i.t.t. de situatie bij de ziekte van Alzheimer waarbij we geen imbalance vonden. Onze onderzoeksgegevens zouden dus mogelijk kunnen verklaren waarom de onderzoekers geen effect vonden op het cognitief functioneren van de patiënten. Verder waren we van mening dat in de betreffende studie er een scherper contrast had moeten worden aangebracht tussen patiënten met een nog intacte cognitie en patiënten die cognitieve problemen ervaren. Hopelijk kunnen in de toekomst alsnog trials worden opgezet waarbij het geheugen van (daarvoor geschikte) MS patiënten wordt getracht te verbeteren d.m.v. het herstellen van de cholinerge imbalance.

In **hoofdstuk 4** hebben we d.m.v. genexpressie analyses (microarray) getracht inzicht te krijgen in pathogenetische mechanismen die mogelijk ten grondslag liggen aan grijze- en wittestof laesies. In **hoofdstuk 4.1** werden aanvankelijk geen grote verschillen gevonden tussen genexpressie niveau's in corticale laesies en normaal ogende cortex van MS patiënten. Toch werd in het corticale weefsel een opregulatie gevonden van

Dutch summary

immuunglobuline-gerelateerde genen. Toen we terug gingen kijken naar het weefsel waar we het materiaal vandaan hadden gehaald, zagen we dat het corticale weefsel nog meningeaal weefsel bevatte. Aangezien in eerdere publicaties aanwijzingen werden gevonden dat de meningen van MS patiënten een niche zouden zijn voor Epstein-Barr virus geïnfecteerde B-cellen, besloten wij om met een zeer gevoelige detectiemethode (d.w.z. kwantitatieve PCR) de aanwezigheid van dit virus te verifiëren. Echter, wij vonden geen aanwijzingen voor aanwezigheid van het Epstein-Barr virus. Ook andere onderzoeksgroepen hebben na ons tevergeefs geprobeerd het Epstein-Barr virus in de breinen van MS patiënten aan te tonen. Dit maakt dat de aanwezigheid van het Epstein-Barr virus, en zijn mogelijke rol bij het ontstaan van zowel witte stof laesies en corticale demyelinsatie voorsnog tot een onbesliste zaak. In **hoofdstuk 4.2** hebben we m.b.v. microarray technologie gekeken naar de genexpressie niveau's van het hele genoom en tegelijkertijd naar micro-RNA (mi-RNA) expressie niveau's van chronisch actieve witte stof laesies en subpiale corticale laesies. Mi-RNA's zijn korte stukjes RNA die de expressie van genen (op mRNA niveau) kunnen reguleren. Zo is het mogelijk om zogenaamde 'pathway analyses' uit te voeren door de expressie niveau's van miRNA's en mRNA's met elkaar te vergelijken en voorspelde mRNA 'targets' te koppelen aan de expressie niveau's van miRNA's. Hieruit volgde een aantal interessante miRNA-mRNA 'pathways'. Een van de meest in het oog springende miRNA's die was 'gedownreguleerd' in zowel chronische actieve witte stof laesies als subpiale corticale laesies, was miRNA-219. Deze downregulatie hebben we vervolgens geconfirmeerd m.b.v. in situ hybridisatie. Van miRNA-219 was namelijk recentelijk aangetoond dat deze essentieel is voor myelinisatie. In een separate studie binnen onze groep (Strijbis et al., in voorbereiding), hebben we recentelijk kunnen aantonen dat er in corticale laesies van MS patiënten grote aantallen oligodendrocyt voorloper cellen aanwezig zijn, maar dat deze niet allemaal lijken te kunnen uitrijpen tot volwassen oligodendrocyten. Mogelijk is de downregulatie van miRNA-219 met dit fenomeen geassocieerd.

Omdat corticale laesies met standaard MRI technieken veelal gemist worden (ook één van de redenen waarom corticale laesies zo lang over het hoofd zijn gezien) hebben we in **hoofdstuk 5** getracht door middel van verschillende MRI technieken de visualisatie van corticale laesies d.m.v. MRI te verbeteren. In **hoofdstuk 5.1** hebben we geprobeerd te achterhalen waarom de meeste corticale laesies met conventionele MRI worden gemist en waarom een klein deel wel wordt gedetecteerd. Daartoe hebben we m.b.v. kwantitatieve MRI en histopathologische vergelijkingen gekeken of er verschillen aan te wijzen waren voor MRI-zichtbare en MRI-onzichtbare corticale laesies. Uiteindelijk bleek dat de zichtbaarheid van corticale laesies op conventionele MRI beelden voornamelijk afhangt van de totale hoeveelheid aanwezige corticale demyelinisatie. D.w.z. dat wanneer een corticale laesie wordt gedetecteerd met conventionele MRI, het waarschijnlijk is dat er uitgebreidere corticale demyelinisatie aanwezig is en dat daarmee dus slechts het topje van de (pathologische) ijsberg zichtbaar is op standaard MRI. In **hoofdstuk 5.2** hebben we sensitiviteit en specificiteit voor de detectie van corticale laesies van een relatief nieuwe MR sequentie, namelijk 3D DIR, bepaald d.m.v. een directe vergelijking met de goud standaard van de histopathologie. De 3D DIR sequentie hebben we vervolgens vergeleken met een andere MRI sequentie die vaak wordt gebruikt voor de detectie van corticale laesies, namelijk 3D FLAIR. We vonden dat de sensitiviteit voor de detectie van

subpiaale corticale laesies 1,6-voud hoger is dan 3D FLAIR met een overall sensitiviteit van 18%, relatief nog steeds laag dus. De pathologische specificiteit van de 3D DIR sequentie was echter wel heel hoog, namelijk 90%. Dat wil dus zeggen dat wanneer een laesie wordt gedetecteerd met 3D DIR er met grote zekerheid kan worden gezegd dat het daadwerkelijk om een corticale laesie gaat. Dit werd ook duidelijk in een Editorial dat ons artikel zal vergezellen in het vakblad *Neurology*, getiteld: "Visualization of cortical lesions with 3D DIR: few, but true".

Tezamen laten de studies zoals beschreven in dit proefschrift zien dat grijzestof schade bij MS patiënten een belangrijk klinisch-pathologisch fenomeen is. Dit proefschrift heeft meerdere vertrekpunten opgeleverd voor verder verdiepend onderzoek naar grijzestof pathologie bij MS patiënten. Op deze manier werken we toe naar het steeds meer inzichtelijk maken van de onderliggende ziekte-mechanismen die ten grondslag liggen aan grijzestof schade in MS. Inzicht in deze processen zal het in de (nabije) toekomst hopelijk mogelijk maken om met name cognitieve achteruitgang bij MS patiënten beter te begrijpen en om tot een therapeutische strategie te komen die ziekte progressie bij MS patiënten kan vertragen, herstellen of voorkomen.