

10|

**TOLL-LIKE RECEPTOREN IN HET CENTRALE
ZENUWSTELSEL: REGELAARS VAN ONTSTEKINGEN,
BESCHERMING, ONTWIKKELING EN HERSTEL**

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Multipale sclerose (MS) is een chronische ontstekingsziekte van het centrale zenuwstelsel (CZS), dat bestaat uit hersenen en ruggenmerg. MS is een van de belangrijkste oorzaken van invaliditeit van jong-volwassenen, wordt meestal voor het eerst geconstateerd tussen het 20^e en 40^e levensjaar, en treft ruwweg tweemaal zoveel vrouwen als mannen. MS wordt gekenmerkt door de voortdurend nieuwe ontwikkeling van ontstekingshaarden in witte en soms ook in grijze stof van de hersenen en het ruggenmerg. Deze lesies leiden tot afbraak van myeline, de beschermlaag van zenuwuitlopers, en tot schade aan de zenuwuitlopers zelf. Als gevolg hiervan worden zenuwimpulsen niet meer goed doorgegeven, waardoor uitvalsverschijnselen ontstaan. Bij de vroege ontwikkeling van MS lesies speelt de activering van microglia, de afweercellen van het CZS, een centrale rol. Het is de eerste stap in het proces van lesievorming, en als resultaat ervan komen soms stoffen vrij die schadelijk zijn voor de omringende zenuwcellen en oligodendrocyten, de myeline-vormende cellen. De oorzaak van deze vroege activering van microglia is nog onbekend. Het zou kunnen zijn dat microglia geactiveerd raken door virussen of andere micro-organismen. Virussen worden van oudsher verondersteld een rol te spelen bij het ontstaan en beloop van MS, maar echt bewijs voor het idee dat ze rechtstreeks MS zouden veroorzaken, is er niet. Microglia gebruiken verschillende receptoren, waaronder zogenoemde Toll-like receptoren (TLRs), om de eventuele aanwezigheid van virussen of bacteriën in hun directe omgeving te kunnen registreren. TLRs spelen een zeer belangrijke rol bij de aangeboren tak van het afweersysteem. De receptoren zijn oorspronkelijk ontdekt in de fruitvlieg *Drosophila*, en zijn tijdens de evolutie grotendeels geconserveerd gebleven, wat hun biologische belang onderstreept. Bij het herkennen van potentieel gevaarlijke organismen (pathogenen) helpen TLRs bij het in gang zetten van de aangeboren afweer, en vormen bovendien een cruciale schakel tussen het aangeboren en het verworven afweersysteem dat in tweede instantie actief kan worden. Er zijn in de mens tenminste 10 van dergelijke TLRs geïdentificeerd, die reageren op verschillende klassen van micro-organismen. Voor de meeste TLRs zijn er verschillende liganden (stoffen die de receptor binden) beschreven, zodat redelijk bekend is welke delen van virussen of bacteriën op deze manier worden herkend. Ook herkennen TLRs bepaalde lichaamseigen stoffen, die bij schade of ontsteking kunnen vrijkomen. In dit proefschrift staat onderzoek beschreven dat werd uitgevoerd om meer kennis te verwerven over de rol die TLRs zouden kunnen spelen bij de ontstekingshaarden die MS veroorzaken. Zijn TLRs betrokken bij activatie van microglia, het voorspel voor een MS lesie? Herkennen TLRs misschien lichaamseigen stoffen die vrijkomen bij een ontsteking, en dragen ze aldus bij tot het steeds weer terugkeren van het probleem? Hoe zit het met eventuele TLRs op andere cellen in de hersenen? Zijn er überhaupt TLRs te vinden in menselijke hersenen? Dit zijn een aantal van de vragen die we ons aan het begin van het project hadden gesteld.

Wereldwijd wordt er veel onderzoek gedaan aan de werking van TLRs, juist omdat ze zo'n belangrijke rol spelen in de afweer tegen ziekteverwekkers. Meestal worden TLR daarom onderzocht in cellen en weefsels die speciaal met afweer te maken hebben, zoals witte bloedcellen, lymfeklieren en milt. Hersenen horen daar doorgaans niet bij, maar in dit

proefschrift is juist daarop de aandacht gevestigd vanwege de problematiek rondom MS. In het
182

eerste deel van dit proefschrift hebben we daarom allereerst het voorkomen bestudeerd van TLRs in menselijk hersenweefsel. Ook hebben we veel van het onderzoek gedaan met gebruikmaking van gekweekte hersencellen, microglia, oligodendrocyten en astrocyten – samen ook wel aangeduid met de term “gliacellen”. Over de aanwezigheid van TLRs in menselijke hersenen, of op afzonderlijke hersencellen was bij de start van het project nog niets bekend. In **hoofdstuk 2** hebben we de aanwezigheid van een aantal TLRs in de ontstekingshaarden bij MS daarom in kaart gebracht. Bij histopathologische studies van zulke ontstekingshaarden (lesies) bleek dat de hoeveelheid TLRs in vroege actieve lesies flink toeneemt, vooral op geactiveerde microglia. In late actieve lesies werden TLRs vooral op astrocyten gevonden. Daarnaast hebben we laten zien dat gekweekte gliacellen ook in staat zijn om TLRs te maken; onderzoek aan TLRs kan dus prima worden uitgevoerd met gebruikmaking van zulke gekweekte cellen. Microglia hebben een breder TLR repertoire dan astrocyten of oligodendrocyten, want ze maken alle familieleden van TLR1 tot en met TLR10 terwijl de andere gliacellen zich beperken tot het bezit van slechts enkele TLRs. Bovendien zitten TLRs in microglia binnen in de cel, terwijl ze op bijvoorbeeld astrocyten op het celoppervlak zitten. In hoofdstuk 3, 4 en 5 is onderzocht wat nu precies het effect is van TLR activering op de verschillende gliacellen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de functionele effecten van verschillende TLR liganden op microglia. Microglia zijn afweercellen in de hersenen, en ze reageren doorgaans het snelst en meest gevoelig op veranderingen in het omringende weefsel. Bij het onderzoek werd productie van een flink aantal ontstekingsfactoren in de kweekvloeistof van microglia gemeten. Enigszins tegen de verwachting in reageerden microglia steeds goeddeels op dezelfde manier op de confrontatie met uiteenlopende TLR liganden. De cellen maakten steevast stoffen aan die weliswaar afweercellen te hulp roepen, maar tegelijk ook een belangrijke rol spelen bij het dempen van afweerreacties. Dit suggereert dat de belangrijkste rol van microglia niet is om direct onderscheid te maken tussen verschillende virussen of bacteriën, en een daarop speciaal afgestemde reactie te vertonen, maar slechts om hun aanwezigheid op te pikken en vervolgens alarmsignalen aan de omgeving door te geven. Microglia zetten aldus een afweerreactie in gang om het gevaar te bestrijden, maar beschermen tegelijkertijd het hersenweefsel tegen al te sterke reacties.

In **hoofdstuk 4** is de aandacht verlegd naar oligodendrocyten, de cellen die myeline maken. De manier waarop oligodendrocyten uit voorlopercellen in hersenen worden gevormd, is van belang voor een beter begrip van mogelijke herstelmechanismen na een ontsteking. In MS lesies worden veel oligodendrocyten beschadigd maar werkt herstel nauwelijks. Het zou nuttig kunnen zijn om zulk herstel met nieuwe geneesmiddelen te ondersteunen. In tegenstelling tot microglia hebben oligodendrocyten een beperkt repertoire TLRs. De resultaten in hoofdstuk 4 laten zien dat activering van vooral één ervan, TLR2, een flinke invloed heeft op de uitrijping van voorlopercellen van oligodendrocyten tot volwassen myeline-vormende oligodendrocyten. Hoewel nog veel meer onderzoek nodig zal zijn om deze vondst te vertalen in een bruikbare route om herstel te stimuleren, laten de gegevens wel zien

dat TLRs op oligodendrocyten veel meer een rol lijken te spelen bij groei en herstel, dan bij het op gang brengen van afweerreacties. De resultaten **in hoofdstuk 5** geven aan dat dat eveneens geldt voor bepaalde TLRs op astrocyten. Astrocyten, de meest voorkomende cel in de menselijke hersenen, zijn van groot belang voor het beschermen van hersenweefsel tegen allerlei schadelijke invloeden van buitenaf, voor een goede interne stofwisseling, en voor het opruimen van schadelijke stoffen. Ook spelen ze een nog goeddeels onbegrepen rol bij cognitieve en/of associatieve processen. Ook astrocyten hebben een minder groot aantal TLRs dan microglia, en vooral TLR3 en TLR4 springen nogal in het oog. Bij gekweekte astrocyten wordt veel TLR4 op het celoppervlak aangetroffen, terwijl TLR3 heel sterk en selectief wordt aangemaakt als de astrocyten signalen van ontstekingen oppikken. Met gebruikmaking van een cDNA array profileringsmethode is gekeken naar het effect van activering van TLR3 of TLR4 op de aanmaak van verschillende stoffen door menselijke astrocyten. Met deze techniek werd de aanmaak van 268 verschillende stoffen tegelijkertijd vastgelegd, en konden we aldus een redelijke indruk krijgen van de verschillende signalen die de astrocyt in zo'n situatie uitstuurt naar zijn omgeving. Terwijl we eerder in hoofdstuk 3 lieten zien dat microglia steeds op ongeveer dezelfde manier reageren op activatie van verschillende TLRs, gold dit beslist niet voor astrocyten. In dit geval namelijk bleek dat activatie van TLR3 een unieke reactie opwekte, waarbij de astrocyten een groot aantal beschermende en ontstekingsremmende stoffen gingen produceren. Activatie van TLR4 had dit effect niet. Tevens laat dit hoofdstuk zien dat de kweekvloei stof die verzameld werd nadat astrocyten via TLR3 waren geactiveerd, inderdaad de overleving van menselijke hersencellen verbetert, cellen voor nieuwe bloedvaten laat groeien, en littekenvorming remt. Al deze gunstige effecten wijzen erop dat TLR3 op astrocyten een belangrijke schakel is in een van nature beschermende reactie, en juist niet bedoeld is om ontstekingen in de hersenen in gang te zetten. De vraag die daar direct op volgt, is natuurlijk of er in zich het zenuwstelsel zelf dan ook een stof bevindt die TLR3 zou kunnen activeren. We weten uit onderzoek van anderen dat bepaalde delen van virussen dit zouden kunnen, maar het leek ons onwaarschijnlijk dat een mogelijk cruciale beschermende functie van TLR3 in de hersenen volledig afhankelijk zou zijn van toevallige virusinfecties.

Hoofdstuk 6 en 7 beschrijven daarom een serie proeven die waren bedoeld om te speuren lichaamseigen eiwitten in het centrale zenuwstelsel die als activatiesignaal voor TLRs zouden kunnen dienen, en in het bijzonder voor TLR3. De manier waarop dat werd gedaan is enigszins ingewikkeld, maar wel effectief gebleken. Om de erfelijke informatie te krijgen voor eiwitten die van nature in hersenen voorkomen is deze eerst uit een set hersentumoren gezuiverd, en in stukjes geknipt. Deze stukjes, duizenden ervan, zijn vervolgens steeds afzonderlijk teruggebracht in nieuwe cellen die een tijdje de gelegenheid kregen om de nieuw ingebrachte informatie te vertalen naar echte eiwitten. Daarna werd de kweekvloei stof van deze cellen – met de nieuwe eiwitten erin – weer aan astrocyten aangeboden, om te zien of deze astrocyten erop zouden reageren. Dat bleek in een aantal gevallen inderdaad te gebeuren, en terugkijkend naar het stukje erfelijke informatie op basis waarvan dat klaarblijkelijk actieve eiwit werd gemaakt, kon vrij gemakkelijk worden vastgesteld om welk eiwit het ging. Tenslotte is onderzocht of de reactie van astrocyten op zo'n actief eiwit ook daadwerkelijk afhankelijk was van herkenning door een TLR familielid, en zo ja welk familielid

dat dan was. **In hoofdstuk 6** staat beschreven hoe we er aldus in geslaagd zijn om het eiwit CD14 te identificeren als een lichaamseigen activator van TLR2. **In hoofdstuk 7** staat vervolgens in detail uitgelegd hoe deze aanpak ook nog het eiwit stathmine opleverde als een lichaamseigen activator van TLR3. Op die vondst is patent aangevraagd, want het was wel bekend dat stathmine binnen cellen in de hersenen een belangrijke rol speelt bij groei, migratie en ontwikkeling, maar nog niet dat er eveneens een ontstekingsremmend effect van kan uitgaan. Hoe stathmine dit precies doet, is voorlopig nog niet helemaal duidelijk. Opmerkelijk is dat het eiwit zich kan oprollen tot een staafvormige spiraal, en dan erg lijkt op de structuur uit virussen waarvan we al wisten dat die door TLR3 herkend wordt. In hoofdstuk 7 laten we zien dat inderdaad alleen deze spiraalvorm effectief is. Toch lijkt er meer voor nodig dan alleen TLR3 om de reactie van astrocyten op stathmine op gang te krijgen.

Samenvattend, de bevindingen in dit proefschrift laten zien dat net als in andere organen TLRs in het centrale zenuwstelsel een duidelijke rol spelen bij het op gang brengen van ontstekingen en afweerreacties. Maar het verhaal blijkt veel verder te gaan dan dat. Op elk van de verschillende soorten hersencellen vinden we een eigen set TLRs, en op elk van die cellen heeft elke TLR weer een heel eigen functie. Deze functies beperken zich niet alleen tot het aanschakelen van afweerreacties, maar ze controleren ook de migratie van cellen, en hun ontwikkeling en overleving. Hoewel het onderzoek in dit proefschrift zich beperkt heeft tot gliacellen, weten we inmiddels uit het werk van anderen dat ook zenuwcellen zich van TLRs bedienen. Van alle nieuwe gegevens springt misschien nog wel het meest in het oog de belangrijke rol die TLRs in het zenuwstelsel lijken te hebben bij het onder controle houden van ontstekingen, en het dempen van afweerreacties in plaats van het stimuleren ervan. Deze cruciale beschermende functie wordt mede aangestuurd door lichaamseigen stoffen in het zenuwstelsel zelf, zoals CD14 en stathmine. Door de verbluffende variatie in TLR functies binnen hersenen en ruggenmerg zal het niet eenvoudig zijn om met simpele ingrepen bepaalde TLR functies te stimuleren of te remmen. Toch wijzen de resultaten van dit proefschrift erop dat gerichte activatie of remming van bepaalde TLRs unieke mogelijkheden kan bieden om aandoeningen in het centrale zenuwstelsel beter onder controle te krijgen. Het zal overigens nog wel even doorpuzzelen zijn over manieren om dat op een effectieve en gecontroleerde manier te doen. Dit geldt ook voor MS waarbij zo ongeveer elke hersencel in ontstekingsgebieden op zijn eigen manier en met zijn eigen set TLRs meespeelt in het proces van ontsteking, en herstel.

