

# De expressie van $\alpha$ B-crystalline bij Multiple Sclerose:

waar, wanneer, hoe en waarom?

promotie van J.J. Bajramović

## Samenvatting

Op vrijdag 19 mei 2000 promoveerde Drs. J.J. Bajramović aan de Universiteit van Rotterdam op het proefschriftonderzoek getiteld: 'De expressie van  $\alpha$ B-crystalline in de hersenen bij Multiple Sclerose: waar, wanneer, hoe en waarom?' Zijn promotor was Prof. Dr. E. Claassen; als co-promotor trad Dr. J.M. van Noort op. Hieronder staan de voornaamste bevindingen van zijn onderzoek beschreven.  
(*Ned Tijdschr Neurol* 2000;4:272-274)

## Inleiding

Multiple Sclerose (MS) is een autoimmuunziekte waarbij de myelineschedes in het centraal zenuwstelsel van patiënten het doelwit zijn van het eigen immuunsysteem. Met name T cellen spelen een belangrijke rol bij het ontstaan van de ziekte. Deze cellen lijken een myelinecomponent te herkennen en hierop te reageren. De immuunrespons die optreedt, resulteert uiteindelijk in schade aan het myeline en aan axonen, met de voor MS kenmerkende neurologische verschijnselen als gevolg. Sleutelvragen in MS-onderzoek zijn *waarom* het immuunsysteem bij MS-patiënten op myeline reageert en tegen *welke* component(en) deze afweerreactie precies gericht is.

Tot op heden heeft het vele onderzoek dat is verricht naar eventuele afwijkingen in het immuunsysteem van MS-patiënten geen concrete verschillen opgeleverd. Dit proefschrift beschrijft experimenten die tot doel hadden om eventuele verschillen tussen myeline uit MS-aangedane hersenen en gezond hersenweefsel vast te stellen, zonder daarbij a priori te veronderstellen dat het immuunsysteem bij MS-patiënten afwijkend zou zijn.

## $\alpha$ B-crystalline, een nieuw potentieel auto-antigeen

Omdat wij voornamelijk geïnteresseerd waren in die verschillen die de eventuele respons van het immuunsysteem op myeline zouden kunnen beïn-

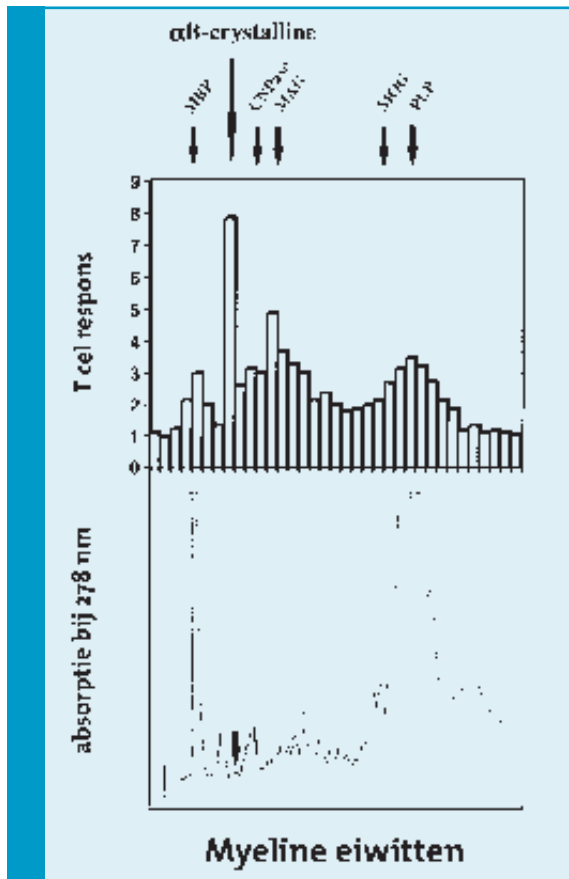
vloeden, werd gekozen voor de volgende proefopzet. Zowel myeline dat was verkregen uit MS-aangedane hersenen als myeline dat was verkregen uit de hersenen van gezonde controles werd in kleine fracties gescheiden. Deze fracties werden vervolgens aan T cellen uit perifere bloed aangeboden en de respons van deze T cellen op de verschillende fracties werd gemeten.

Uit deze experimenten viel een aantal belangrijke conclusies te trekken. Niet de reacties van T cellen verschilden tussen MS patiënten en gezonde controles, maar de aard van het myeline. Eén eiwitfractie, afkomstig uit MS-aangedaan myeline, bleek bijzonder sterk in staat te zijn om T cellen te activeren. Belangrijker was dat de corresponderende fractie afkomstig uit gezond myeline deze capaciteit miste. Door de eiwitfractie uit MS-myeline nader te onderzoeken kon deze sterk immunogene component geïdentificeerd worden als het stress eiwit  *$\alpha$ B-crystalline*, dat slechts in zeer geringe hoeveelheden voor bleek te komen in gezond hersenweefsel.

## Waar en wanneer komt $\alpha$ B-crystalline precies tot expressie?

Vervolgonderzoek bij patiëntenmateriaal maakte duidelijk dat  $\alpha$ B-crystalline vrij gemakkelijk in het aangedane hersenweefsel van MS-patiënten aan te tonen was, en wel in oligodendrocyten en in astrocyten. Al in de vroegste stadia van laesievorming werd  $\alpha$ B-crystalline gevonden in deze celtypen, terwijl het eiwit niet aantoonbaar was in gezond hersenweefsel. Het bijzonder immunogene karakter van  $\alpha$ B-crystalline gecombineerd met de aanwezigheid ervan in verschillende typen gliacellen gaf echter nog geen aanwijzingen over de eventuele zichtbaarheid van het betreffende eiwit voor T cellen in MS-aangedaan hersenweefsel.

Een T cel reageert namelijk niet op intacte eiwitten, maar op een klein fragmentje ervan, een zogenaamd peptide. Om te kunnen reageren op een peptide (bijvoorbeeld afkomstig van het  $\alpha$ B-crystalline eiwit) moet een eiwit eerst door gespecialiseerde antigeen-presenterende cellen (APC) opgenomen worden, verteerd worden en vervolgens aangeboden worden aan T cellen. Pas bij herkenning van dit peptide, voorzien van de juiste co-stimulatoire sig-

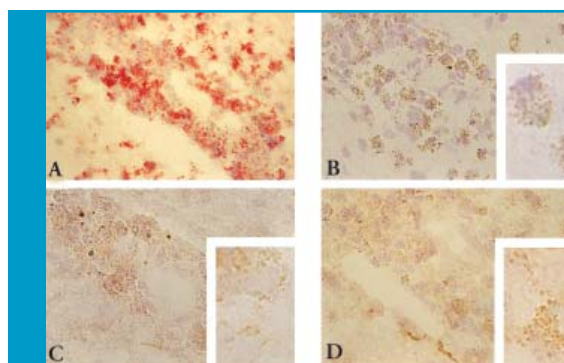


**Figuur 1.** Na scheiding van de verschillende myeline-eiwitten uit MS-aangedaan hersenweefsel (onderste paneel), blijken T cellen het krachtigst te reageren op  $\alpha$ B-crystalline (bovenste paneel).

nalen, zullen de specifieke T cellen reageren. In beginnende MS laesies is dit proces te volgen omdat er soms myeline (afbraakproducten) terug te vinden zijn in macrofagen (een bepaald type APC). Dit myeline zal in de macrofaag verteerd worden en vervolgens zullen de uit myeline afkomstige peptiden aan T cellen aangeboden kunnen worden. In verschillende, zeer vroege, MS laesies slaagden we erin om ook  $\alpha$ B-crystalline tussen deze myeline-afbraakproducten in macrofagen terug te vinden. Deze macrofagen brachten de juiste co-stimulatoire signalen tot expressie en bevonden zich in de directe nabijheid van T cellen. *In vitro* experimenten waarbij T cellen werden gecombineerd met macrofagen die vooraf MS-aangedaan myeline "gevoerd" hadden gekregen, bevestigden dat in zo'n situatie een krachtige  $\alpha$ B-crystalline-specifieke T cel reactie volgt. Alle ingrediënten voor T cel activatie door  $\alpha$ B-crystalline blijken dus juist in vroeg actieve MS laesies samen voor te komen.

## Waarom en hoe komt $\alpha$ B-crystalline tot expressie?

Naast de identificatie van  $\alpha$ B-crystalline als auto-antigeen en het bestuderen van het voorkomen van  $\alpha$ B-crystalline in MS laesies, is een groot deel van het proefschrift gewijd aan de vraag waarom genoemde gliacellen in MS laesies  $\alpha$ B-crystalline maken. Hiertoe zijn, in samenwerking met de Nederlandse Hersenbank, zowel menselijke astrocyten als oligodendrocyten in kweek bestudeerd. Verschillende testsystemen zijn opgezet om zowel eiwit- en mRNA expressie te bestuderen van  $\alpha$ B-crystalline. De resultaten van het onderzoek bij astrocyten laten verrassenderwijs zien dat veelvoorkomende ontstekingsmediatoren als cytokines *niet* de oorzaak lijken te zijn van de verhoogde expressie van  $\alpha$ B-crystalline in het hersenweefsel van MS-patiënten. Weliswaar leidde blootstelling van gliacellen aan sommige van deze ontstekingsmediatoren wel degelijk tot de vorming van meer  $\alpha$ B-crystalline, maar het eiwit hoopte zich onder deze omstandigheden op in de celkern. Dit in tegenstelling tot de expressie van  $\alpha$ B-crystalline in hersenweefsel, waar het in het celplasma te vinden was. Recent zijn aanwijzingen verzameld dat oxidatieve stress (bijvoorbeeld in de vorm van  $H_2O_2$ ) een veel waarschijnlijker oorzaak is van de verhoogde aanmaak van  $\alpha$ B-crystalline door astrocyten bij MS. Onder deze vorm van stress hoopte het eiwit zich precies zo op als te zien in MS laesies: in het celplasma. Deze lokalisatie van  $\alpha$ B-crystalline bleek afhankelijk



**Figuur 2.** Alpha B-crystalline in myeline-fagocyterende macrofagen in actief demyeliniserende MS-laesies. De afbeeldingen A, B, C en D tonen seriële coupes met respectievelijk Oil-Red O (rood; kleurt vet- en dus myeline- aan), myeline basisch eiwit (MBP; bruin), myeline oligodendrocyt eiwit (MOG; bruin) en alpha B-crystalline (bruin) in lysosomale vesikels van infiltrerende macrofagen in MS hersenweefsel.

te zijn van de fosforyleringsstatus van  $\alpha$ B-crystalline. Wanneer oxidatieve stress p38-geactiveerde eiwitkinases (MAPKs) activeert, leidt dit tot het aanhechten van een fosfaatgroep op één speciale plaats in de eiwitketen van  $\alpha$ B-crystalline. Het gevolg is dat het eiwit loslaat van het cytoskelet en zich in vrije vorm ophoopt in het celplasma. Kennelijk leiden niet alle vormen van fysiologische stress tot dit specifieke verschijnsel. Ophoping van  $\alpha$ B-crystalline in het celplasma via dit mechanisme is mogelijk een voorwaarde voor de verhuizing van het eiwit naar myeline, waarin het uiteindelijk kan leiden tot T-cel activatie.

### Consequenties voor de patiënt?

De combinatie van beschrijvend onderzoek aan patiëntenmateriaal en van meer experimenteel onderzoek aan celkweken, heeft er toe geleid dat er een eiwit geïdentificeerd kon worden dat waarschijnlijk een belangrijke rol vervult als doelwit van de ontstekingsreactie bij MS. Hoewel de ontwikkeling van MS een gecompliceerd proces is, dat beïnvloed wordt door vele factoren, kunnen specifieke immuunreacties het verschil vormen tussen betrekkelijk onschuldige verstoringen binnen het centrale zenuwstelsel en verwoestende ontstekingsreacties

zoals bij MS. De hoop is daarom gevestigd op de mogelijkheid dat het terugdringen van deze specifieke immuunreacties de angel uit het systeem zou kunnen halen. Daarin ligt de uitdaging van het vervolgonderzoek. Er zijn in proefdiersystemen verschillende strategieën ontwikkeld om specifieke immuunreacties terug te dringen. Orale tolerisering bijvoorbeeld is een klassieke manier om dit te bewerkstelligen. Door het oraal toedienen van een bepaald antigeen kan men selectief proberen om de T cellen die specifiek zijn voor dit antigeen, onschadelijk te maken om zo een eventuele immuunrespons tegen dit antigeen te onderdrukken. De inspanningen bij TNO Preventie en Gezondheid zijn daarom momenteel gericht op de mogelijkheid via dit soort therapieën uiteindelijk de ontstekingsreacties bij MS te helpen dempen.

#### Correspondentie-adres promovendus:

**Dr. J.J. Bajramović, post-doc onderzoeker**

Unité des Virus Lents  
Batiment Retrovirus  
Institut Pasteur  
28, Rue du Docteur Roux  
75724 Paris Cedex 15  
Frankrijk