

## University of Groningen

### Breaking Barriers

van Schaik, Pauline

DOI:  
[10.33612/diss.717461499](https://doi.org/10.33612/diss.717461499)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2023

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
van Schaik, P. (2023). *Breaking Barriers: delivery of a novel therapeutic drug to promote remyelination in multiple sclerosis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.717461499>

#### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

#### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# **Nederlandse samenvatting**

**Pauline E.M. van Schaik**

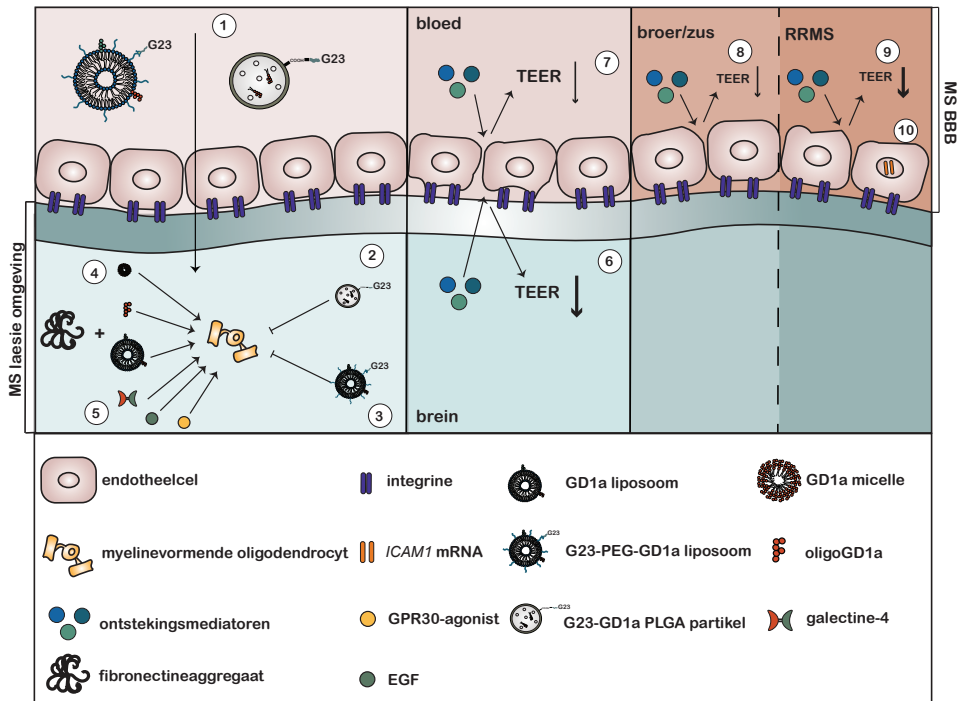
Department of Biomedical Sciences of Cells & Systems, Section Molecular Neurobiology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, the Netherlands.

---

## Nederlandse samenvatting

In het centraal zenuwstelsel produceren oligodendrocyten myeline, wat ze om de vezels van zenuwen (axonen) wikkelen. Dit myeline beschermt en voedt de axonen, en zorgt voor een snelle overdracht van prikkels tussen zenuwcellen en soepele aansturing van spieren<sup>741</sup>. Kenmerkend voor de ziekte multiple sclerose (MS) is de afbraak van myeline (demyelinisatie) in het centraal zenuwstelsel, waardoor axonen kwetsbaarder worden voor schadelijke invloeden van buitenaf<sup>3-5,66</sup>. De afbraak van myeline kan zorgen voor het ontstaan van verscheidene symptomen, zoals veranderingen in het zicht, algehele vermoeidheid, moeite met lopen, spierzwakte, problemen met het urineren, en cognitieve achteruitgang<sup>7</sup>. Lokale ontstekingen, infiltratie van ontstekingscellen uit de bloedbaan, en neurodegeneratieve processen dragen bij aan het demyelinisatie proces, al is de exacte oorzaak nog niet bekend<sup>6-11,744</sup>. In het begin van de ziekte wordt nieuw myeline geregenereerd (remyelinisatie), echter de efficiëntie hiervan neemt af gedurende het verloop van de ziekte<sup>70,89,487,488,642,742,743</sup>. Veranderingen in het steunweefsel (ECM) in de aangetaste gebieden (laesies) dragen bij aan het ontstaan van een omgeving die het herstel van myeline vertraagt of voorkomt<sup>15,137,745-748</sup>. Het is eerder aangetoond dat het klonteren (aggregeren) van het ECM-eiwit fibronectine in de gedemyeliniseerde gebieden (laesies) bij MS bijdraagt aan het uitblijven van remyelinisatie<sup>25</sup>. Een tijdelijke verhoging in de hoeveelheid fibronectine na afbraak van myeline bereidt het gedemyeliniseerd gebied voor op het regenereren van myeline, o.a. door afweercellen van het brein (microglia) en voorlopercellen van oligodendrocyten aan te trekken<sup>22,225,749</sup>. Echter, wanneer fibronectine aanwezig blijft in de vorm van aggregaten wordt de uitrijping van de voorlopercellen en het vermogen van oligodendrocyten om myeline te vormen belemmerd<sup>24,25,210</sup>. Therapeutische middelen die het remmende effect van fibronectineaggregaten op voorlopercellen en oligodendrocyten tenietdoen leveren daarom een positieve bijdrage aan de behandeling van MS.

We hebben eerder aangetoond dat ganglioside GD1a, een vetachtig molecuul (lipide) dat gevonden wordt in de buitenwand (plasmamembraan) van een cel, het remmende effect van fibronectineaggregaten op myelinevorming kan opheffen<sup>31</sup>. Doordat de bloed-hersenbarrière (BHB) het centraal zenuwstelsel afsluit van het merendeel aan grote moleculen uit de bloedbaan, is het voor GD1a lastig om het



**Figuur 1. Schematische samenvatting van de belangrijkste bevindingen in dit proefschrift.**

1. G23-gedecoreerde gepegyleerde (PEG) liposomen en G23-gedecoreerde PLGA-nanodeeltjes passeren over een *in vitro* menselijke bloed-hersenbarrière (BHB)-cellaag. Dit biedt perspectief om via deze nanocarriers medicijnen naar de hersenen te transporteren. 2,3. G23-gedecoreerde GD1a-geladen PLGA-nanodeeltjes (2) en G23-gedecoreerde gepegyleerde GD1A-geladen liposomen (3) verbeteren de myelinemembraanvorming in een fibronectine omgeving niet. Gepegyleerde liposomen zijn toxisch voor gerijpte oligodendrocyten. 4. GD1a, het suikergedeelte hiervan (oligoGD1a), en GD1a geleverd door niet-gepegyleerde liposomen, neutraliseren het negatieve effect van fibronectine (klonten) op myelinemembraanvorming *in vitro* en in hersenweefselplakjes. 5. Ook heffen EGF, GPR30-agonist G1 en galectine-4 de door fibronectine gemedieerde remming van myelinemembraanvorming op. 6,7. Blootstelling aan hersenzijdige ontstekingsmediatoren (6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  en IL-1 $\beta$ ) vermindert de barrièreweerstand (TEER) van de iPSC-afgeleide BHB-cellaag. Bloedzijdige blootstelling aan deze mediators heeft een licht negatief effect (7). 8,9. Blootstelling aan bloedzijdige ontstekingsmediatoren vermindert de integriteit (TEER) van een relapsing-remitting MS (RRMS)-iPSC-afgeleide BHB-cellaag (9) sterker dan de integriteit van de BHB-cellaag van hun broer of zus (8). 10. Blootstelling aan bloedzijdige ontstekingsmediatoren verhoogt de genexpressie van ICAM-1 in een RRMS iPSC-afgeleide BHB cellaag, maar niet in de BHB-cellaag van hun broer of zus.

brein te bereiken. De BHB bestaat namelijk uit een strak aaneengesloten cellaag en alleen voedingsstoffen die belangrijk zijn voor het functioneren van het brein worden toegelaten<sup>32-34</sup>. Het goed functioneren van de BHB is essentieel voor het behoud van een gezond centraal zenuwstelsel.

---

Door medicijnen te verpakken in zogenaamde nanocarriers kunnen deze de hersenen worden binnen gesluisd. Wij hebben eerder aangetoond dat het koppelen van het peptide G23, dat de BHB-cellaag herkent, zorgt voor het transport van de nanocarriers over de BHB<sup>337,338,341,344</sup>. Het werk beschreven in dit proefschrift heeft als doel om GD1a over de BHB te transporteren, zonder de therapeutische werking te verliezen. De beschreven bevindingen zijn een eerste stap in de ontwikkeling van een behandeling om myeline te herstellen bij (progressieve) MS. Tevens vergroot het onze kennis van nanocarrier transport over de BHB en afgifte van medicijnen aan oligodendrocyten die het remmende effect van fibronectineaggregaten op myelineherstel tenietdoen.

**Hoofdstuk 1** geeft een uitgebreid overzicht van de rol van fibronectine(aggregaten) bij het uitblijven van remyelinisatie bij mensen met MS en geeft aanwijzingen om het remmende effect van fibronectine op myelinevorming te overwinnen. Daarnaast hebben we manieren beschreven om medicijnen naar de hersenen te brengen via nanocarriers. Hierbij lag de focus op het gebruik van liposomen en poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanodeeltjes. Het gebruik van nanocarriers als een afleversysteem heeft verschillende voordelen, waaronder een langdurige en langzame afgifte van medicijnen, bescherming van het therapeutische middel, voorkomen van vroegtijdige opname door cellen in de bloedbaan, en het vermogen om een therapie selectief op weefsels en organen, zoals de hersenen, te richten<sup>271,273-278,280</sup>. We hebben manieren beschreven waarop nanocarriers kunnen worden aangepast, met als doel nanocarriers en hun therapeutische lading over de BHB te transporteren en te richten op chronische MS-laesies die fibronectine (aggregaten) bevatten. Met name het gebruik van een peptide dat een domein (EDA) van fibronectine herkent<sup>28,29</sup>, en peptides die de BHB herkennen<sup>300,334,343,344,335-342</sup>, kunnen het gericht afgeven van een medicijn naar de laesies verbeteren. Voor gerichte levering aan myelinevormende cellen kan een ligand (bijv. een antilichaam) dat selectief eiwitten aan het oppervlak van voorlopercellen van oligodendrocyten herkent worden overwogen<sup>315,407,408</sup>.

In **Hoofdstuk 2** bouwen we voort op deze principes door te onderzoeken of liposomen en polymere PLGA-deeltjes GD1a functioneel kunnen afleveren aan oligodendrocyten. We hebben *in vitro* aangetoond dat GD1a-bevattende en met G23 gedecoreerde PLGA-nanodeeltjes verbeterd transport over een menselijke

BHB-monolaag vertonen (Fig. 1-1), Echter, deze PLGA nanodeeltjes verbeterden niet de myelinemembraanvorming in een fibronectine-rijke omgeving (Fig. 1-2). GD1a is een lipide dat waarschijnlijk wordt opgenomen in de lipide-dubbellaag van liposomen en vanuit daar gemakkelijk wordt uitgewisseld of een interactie aangaat met moleculen in het plasmamembraan van oligodendrocyten. De GD1a-bevattende liposomen verbeterden significant de myelinemembraanvorming in de aanwezigheid van fibronectine. Ook zagen we een licht verbeterd herstel van myeline in gekweekte hersenweefselplakjes met fibronectineaggregaten (Fig. 1-4). Vergeleken met niet-gedecoreerde GD1a-bevattende liposomen, toonden de G23-gedecoreerde liposomen en licht verbetering in het transport over de BHB-cellaag (Fig. 1-1). Gepegyleerde liposomen, die vereist zijn voor G23-decoratie, bleken echter cytotoxisch voor oligodendrocyten (Fig. 1-3). Deze resultaten tonen aan dat met G23-gedecoreerde PLGA-nanodeeltjes en gepegyleerde liposomen niet geschikt zijn voor de afgifte van GD1a aan oligodendrocyten. Aangezien GD1a waarschijnlijk het herstellend effect op of in het plasmamembraan uitoefent, hebben we getest of oligosaccharide GD1a (oligoGD1a), het suikergedeelte van GD1a, het uitblijven van myelinemembraanvorming in een fibronectine(aggregaat)-rijke omgeving kon overwinnen. Dit was inderdaad, net als GD1a, het geval (Fig. 1-4). Eerder onderzoek heeft aangetoond dat oligoGM1 de BHB kan passeren<sup>456,466</sup>. Aangezien GM1 een voorloper is van GD1a en moleculair sterk vergelijkbaar is, is het waarschijnlijk dat oligoGD1a zonder de hulp van nanocarriers de BHB kan passeren. Dit betekent dat oligoGD1a een veelbelovend therapeutisch middel kan zijn om myeline te herstellen bij mensen met (progressieve) MS. Vervolgonderzoek in experimentele modellen moet uitwijzen of dit inderdaad zo is.

Het identificeren van interactiepartners van GD1a is belangrijk voor de efficiënte aflevering van GD1a aan oligodendrocyten. Zoals aangetoond in **Hoofdstuk 3**, blijft GD1a grotendeels in het plasmamembraan van oligodendrocyten, in tegenstelling tot GM1, dat snel door de cel wordt opgenomen. Dit is een aanwijzing dat GD1a het therapeutische effect uitoefent op een molecuul dat aanwezig is in het plasmamembraan en niet in de cel. Eerdere studies hebben aangetoond dat GD1a dimerisatie van de receptor voor epidermale groeifactor (EGFR) induceert, zelfs in afwezigheid van EGF<sup>493,496</sup>. Dit suggereert dat de EGFR een waarschijnlijke interactiepartner van GD1a is. In hoofdstuk 3 laten we zien dat het herstellende effect van GD1a werd tegengegaan door een remmer

---

van de EGFR. Ook stimuleert EGF, net als GD1a, myelinemembraanvorming in aanwezigheid van fibronectine via dezelfde signaaltransductie route; activatie van proteïnekinase A (PKA) en fosforylering van cAMP-responsbindend element-eiwit op serine 133 (CREB-S133). Tot onze verassing blokkeerde de EGFR-remmer CREB-S133-fosforylering in met EGF-behandelde, maar niet in met GD1a-behandelde oligodendrocyten, wat aangeeft dat GD1a mogelijk een additionele interactiepartner heeft. Transactivering van EGFR door de G-eiwit-gekoppelde receptor 30 (GPR30) via PKA is eerder gezien<sup>519-521,534-536</sup>. In overeenstemming met deze eerdere bevindingen vonden we dat een GPR30-antagonist (G15) het herstellende effect van GD1a op de myelinemembraanvorming in een fibronectine-rijke omgeving verhinderde. Ook bootst een enkele behandeling met een GPR30-agonist (G1) het effect van GD1a na. Dit geeft aan dat GD1a de EGFR via GPR30 in oligodendrocyten kan transactiveren. Een PKA-remmer blokkeerde het positieve effect van deze GPR30-agonist op myelinemembraanvorming. Dit toont aan dat activatie van GPR30 de myelinemembraanvorming in de aanwezigheid van fibronectine via PKA kan verhogen. Meer studies zijn nodig om te bepalen of EGFR- of GPR30-gemedieerde signalering gehinderd is in voorlopercellen en oligodendrocyten die aanwezig zijn in MS-laesies. Het moduleren van de activiteit van deze receptoren kan een alternatieve route zijn voor het stimuleren van myelineherstel in MS-laesies die fibronectine aggregaten bevatten. Echter, in gekweekte hersenplakjes met fibronectine aggregaten zorgde GD1a, maar niet EGF en G1, voor een verbetering van myelineherstel. Dit wijst erop dat er additionele mechanismes zijn waardoor GD1a een positief effect heeft op myelineherstel in een fibronectine-omgeving.

Het niet goed functioneren van de BHB is een vroeg kenmerk en initieert mogelijk een deel van de MS-pathologie<sup>6,435</sup>. Het is bekend dat ontstekingsfactoren afkomstig van afweercellen (o.a. T-cellen) uit de bloedbaan het functioneren van de BHB beïnvloeden in relapsing remitting MS (RRMS) door de doorlaatbaarheid van de barrière te verhogen<sup>562,564,565,750</sup>. Bij primaire progressieve MS (PPMS) wordt aangenomen dat er een (blijvende) ontstekingsreactie achter een gesloten BHB plaatsvindt<sup>436,609,751</sup>. Het begrijpen van intrinsieke verschillen in de werking van de BHB-cellaag (BMEC) tussen mensen met en zonder MS kan het begrip van de ziekte en het ontwikkelen van geschikte therapieën helpen. Het gebruik van geïnduceerd pluripotente cellen (iPSCs) kan ons iets leren over het ontstaansmechanisme van

deze ziekte. In het lab kunnen deze iPSCs omgevormd worden tot menselijke hersencellen, en ons iets leren over de werking van deze cellen in een bepaalde ziekte. In **Hoofdstuk 4** hebben we in kaart gebracht of de RRMS- en PPMS-afgeleide iPSC-BMEC (iBMEC)-cellaag, en hun respectievelijke niet-aangetaste broer of zus iBMEC-cellaag, zich verschillend gedragen als reactie op ontstekingsmediatoren (pro-inflammatoire cytokines). Zonder cytokinebehandeling vertoonden de RRMS- en PPMS- en hun niet-aangetaste broer of zus iBMECs-cellaag een vergelijkbare doorlaatbaarheid van de barrière. Interessant is dat de permeabiliteit van de iBMEC-cellaag, gemeten met de trans-endotheel elektrische weerstand (TEER) en onafhankelijk van de ziektestatus van de donor, sterk verminderde als reactie op aanwezigheid van cytokines aan de hersenzijde (Fig. 1-6). Behandeling aan de bloedzijde van de endotheel laag leidde niet tot een sterke afname van de TEER (Fig. 1-7). Wanneer werd gekeken naar ziekte-specifieke effecten werd duidelijk dat cytokine behandeling aan de bloedzijde de permeabiliteit van de RRMS-iBMEC-cellaag verminderde (Fig. 1-9), wat niet werd waargenomen in de iBMEC-cellaag van broers of zussen (Fig. 1-8). Hoewel er geen duidelijke verandering in de lokalisatie van eiwitten die de barrière tussen de cellen vormen werd waargenomen, verhoogde de cytokine behandeling aan de bloedzijde de gen-expressie van intercellulair adhesiemolecuul 1 (ICAM-1) in de RRMS-iBMEC-cellaag maar niet in de iBMEC-cellaag van de broer of zus (Fig. 1-10). Deze resultaten wijzen op een ziekte-specifiek effect van cytokine-behandeling op de barrière integriteit, terwijl er geen verschillen in barrière-integriteit werd opgemerkt in afwezigheid van cytokines.

Evenals fibronectine beïnvloeden ook andere factoren in MS-laesies het vermogen van voorlopercellen om uit te rijpen naar oligodendrocyten<sup>15,134,137,138</sup>. Deze andere factoren kunnen de efficiëntie van therapieën die gericht zijn op het tegengaan van fibronectine-gemedieerde remming van remyelinisatie veranderen of tegengaan. Bijvoorbeeld, galectine-4 is een lectine dat wordt afgegeven door zenuwcellen (neuronen) die geen myeline hebben om de vroegtijdige uitrijping van voorlopercellen van oligodendrocyten te remmen<sup>654</sup>. Net zoals fibronectine, is deze negatieve 'timer' van myelinevorming aanhoudend aanwezig in chronische MS-laesies<sup>647-653</sup>. Identificatie van de interactiepartners van galectine-4 op het plasmamembraan van oligodendrocyten kan helpen bij het vinden van een therapeutisch middel dat het remmende effect van galectine-4 op de uitrijping van voorlopercellen tegen kan gaan.



---

In **Hoofdstuk 5** voerden we een proteomische (eiwit) analyse uit op neergeslagen galectine-4-bindingspartners in membraanfracties van oligodendrocyten die nog geen myeline vormden. We identificeerden zes eiwitten als bindingspartners van galectine-4. Hiervan zijn UGT8, een enzym specifiek voor de synthese van een belangrijk myeline lipide (galactosylceramide), en contactine-1, die betrokken is bij de aanvang van de expressie van het essentiële myeline eiwit MBP, (tijdelijk) aanwezig op het plasmamembraan van de uitlopers van bijna uitgerijpte oligodendrocyten. Een behandeling met galectine-4 veranderde de verdeling van UGT8 en contactine-1 over het membraan niet. Galectine-4 verlaagde wel de galactosylceramide levels in membraanmicrodomeinen, en verhoogde de levels in niet-membraanmicrodomeinen. De verlaagde galactosylceramide levels in membraandomeinen werden niet waargenomen in galectine-4-behandelde oligodendrocyten in de aanwezigheid van fibronectine. Galectine-4 en fibronectine zijn beide remmers van de volledige uitrijping van voorlopercellen naar myelinevormende oligodendrocyten<sup>654,24,25,121,209,210</sup>. Tot onze verbazing zagen we herstel van myeline in hersenweefselplakjes als galectine-4 en fibronectine (aggregaten) tegelijk aanwezig waren. Dus, fibronectine kan het remmende effect van galectine-4 op differentiatie tenietdoen, terwijl galectine-4 het remmende effect van fibronectine op myelinevorming tegengaat. Hoewel fibronectine en galectine-4 beide aanwezig zijn in MS-laesies, moet nog worden vastgesteld of galectine-4 door neuronen wordt uitgescheiden in de omgeving, en/of galectine-4 bindingspartners aanwezig zijn op het plasmamembraan van de uitlopers van bijna uitgerijpte oligodendrocyten in MS-laesies.

In conclusie, het werk gepresenteerd in dit proefschrift heeft bijgedragen aan de ontwikkeling van therapeutische strategieën om het uitblijven van myelineherstel door fibronectineaggregaten in MS-laesies te overwinnen. We hebben bewijs geleverd dat GD1a myelinevorming in een fibronectine-rijke omgeving stimuleert door een PKA-CREB-afhankelijk mechanisme te activeren via een interactie met receptoren (GPR30 en EGFR) op het plasmamembraan van oligodendrocyten. Interessant is dat ondanks dat galectine-4 zelf een remmer van myelinemembraanvorming is, galectine-4 het uitblijven van myelinemembraanvorming in een fibronectine-rijke omgeving tegengaat. Dit toont aan dat individuele remmende factoren op onverwachte manieren kunnen interageren. Verder hebben we aangetoond dat oligoGD1a remming van

myelinemembraanvorming in een fibronectine-rijke omgeving in dezelfde mate overwint als GD1a. Toekomstige studies zouden moeten bepalen of oligoGD1a de BHB passeert en het uitblijven van myelineherstel kan overwinnen in een MS-laesie, d.w.z. fibronectineaggregaat bevattende, omgeving. Daarnaast hebben we GD1a verpakt in G23-gedecoreerde liposomen en PLGA-deeltjes met als doel om zo GD1a het brein binnen te sluisen. Op deze manier passeert GD1a wel de BHB-cellaag. Echter waren G23-gedecoreerde liposomen en PLGA-deeltjes niet in staat om GD1a functioneel aan oligodendrocyten af te leveren. Hun vermogen om de BHB-cellaag te passeren en medicatie gericht af te leveren kan echter veelbelovend zijn als afgiftesystemen voor andere op myelineherstel-gerichte geneesmiddelen die bijvoorbeeld doelwitten in de cel moduleren. Aangezien de BHB-cellaag van mensen met RRMS anders reageert op ontstekingsmediatoren, moeten deze studies ook rekening houden met mogelijke verschillen tussen de BHB van mensen met en zonder MS.

