

De rol van TNF- α autoantilichamen in de ziekte van Crohn

Bachelorscriptie
Eelke Brandsma
S1571257

De rol van TNF- α autoantilichamen in de ziekte van Crohn.....	1
Introductie	3
Symptomen bij de ziekte van crohn	3
Mechanisme van de ziekte van crohn	4
Het monocytencompartment, de initiator van de ziekte van Crohn.....	4
Problemen met downregulatie van het immuunsysteem na contact met een pathogeen.....	6
Het effect van een T _h 1 –cytokine profiel op de permeabiliteit van de darm.....	7
Oorzaak van de ziekte van crohn en mechanismes waarop ingegrepen kan worden.....	7
Huidige behandelmethoden.....	7
Het effect van apoptose van darmepitheel op de permeabiliteit	8
Het mechanisme achter weefselherstel door Anti-TNF- α behandeling.....	8
Werkingsmechanisme achter anti-TNF- α behandeling op myofibroblaststimulatie	9
Het therapeutische effect van anti-TNF- α behandeling.....	9
Lange termijnwerking van Infliximab.....	10
Het mogelijke therapeutische effect van autoantilichamen.....	10
Selectie van B-cellen met autoantilichamen tegen TNF- α	11
Conclusie.....	11
Literatuurlijst.....	13
Literatuurlijst.....	13

Introductie

Er zijn verschillende ziektes waar het pro-inflammatoire cytokine TNF- α een belangrijke rol speelt in de schade die veroorzaakt wordt door de ziekte. Een van de ziektes waarin TNF- α een belangrijke rol speelt in de veroorzaakte symptomen is de ziekte van Crohn. In deze scriptie zal ik uitvoerig ingaan op de mechanismes van deze ziekte en zal ik ook beschrijven wat voor symptomen kunnen optreden bij deze ziekte. Aan de hand van de mechanismes zal ingegaan worden op mogelijke interventiestrategieën bij deze ziektes. Het mooiste is natuurlijk om een ziekte aan te pakken bij de wortel. In dat geval wordt namelijk het probleem verholpen. Dit is in de ziekte van Crohn helaas niet mogelijk, omdat het exacte mechanisme over het ontstaan van de ziekte niet bekend is. Er zal dan ook een interventiestrategie besproken worden die de ziekte van Crohn zoveel mogelijk kan onderdrukken.

Deze interventiestrategie zal ook besproken worden aan de hand van het medicijn dat momenteel het meest gebruikt wordt, namelijk Infliximab. Nadat het werkingsmechanisme van infliximab besproken is zal ook besproken worden wat het belangrijkste probleem is met infliximab. Nadat dit probleem bekend is zal er uitgelegd worden hoe dit probleem waarschijnlijk omzeilt kan worden. Dit brengt ons dan ook gelijk bij de nieuwe interventiestrategie voor de ziekte van Crohn. Deze nieuwe interventiestrategie omvat het gebruik van autoantilichamen. Allereerst zal besproken worden wat het grote voordeel is van het gebruik van autoantilichamen. Als dit bekend is zal worden besproken hoe patiënten met autoantilichamen geselecteerd kunnen worden. Na selectie van deze patiënten kunnen uit deze patiënten de B-cellen geïsoleerd worden die autoantilichamen maken tegen TNF- α . Na selectie van deze autoantilichaam producerende B-cellen zal besproken worden hoe deze antilichamen vermenigvuldigd kunnen worden. Deze scriptie zal vervolgens afgesloten worden met een conclusie.

Symptomen bij de ziekte van crohn

De ziekte van crohn is een inflammatoire ziekte in het verteringsstelsel. Bij deze ziekte ontstaan voor het grootste gedeelte ontstekingen in de het distale gedeelte van de dunne darm. Er kunnen echter ook ontstekingen optreden in de colon en dan met name in het proximale gedeelte. Daarnaast kunnen ook ontstekingen optreden aan andere organen die onderdeel uitmaken van het digestieve kanaal. De eerste ziekteverschijnselen die optreden zijn plaatselijke ontstekingen in de darmen en het ontstaan van oppervlakkige mucosale zweren met segmentale distributie. Na verloop van tijd smelten deze segmentaal gedistribueerde laesies samen waardoor er een transmurale en granulomateuze ontstekingsreactie ontstaat. De granulomateuze ontstekingsreactie van de ziekte van crohn omvat het vormen van aggregaten van de volgende immuuncellen; lymfocyten, macrofagen plasmacellen en multinucleaire "giantcells". Deze aggregaten worden gevormd onder invloed van verscheidene cytokines waaronder TNF- α . [1] Naast het ontstaan van ontstekingen in de darm is er nog een symptoom dat deze ziekte erg onprettig maakt. Er kunnen namelijk ook verstoppingen in de darm ontstaan doordat er onder invloed van slecht migrerende myofibroblasten te veel bindweefsel gevormd kan worden bij wondheling waardoor deze te hoge hoeveelheid aan bindweefsel uiteindelijk voor vernauwing en verslechterde nutriëntenopname in de darm kan zorgen. Deze vernauwing kan na verloop van tijd dan ook verstoppingen in de darm opleveren.

De gevolgen van deze ontstekingen en verstoppingen zijn dat de patiënten last hebben van diarree, vermagering, bloedarmoede, groeiachterstand, bloedverlies en van fistels. De symptomen diarree, vermagering, bloedarmoede en groeiachterstand worden veroorzaakt doordat de opnamecapaciteit van de darm verminderd is. Hierdoor kan een tekort aan voedingsstoffen ontstaan. Het bloedverlies bij patiënten wordt veroorzaakt door de

ontstekingen in de darmen. Alle genoemde symptomen kunnen de kwaliteit van leven erg beïnvloeden. De patiënten krijgen immers te maken met allerlei gevolgen van de ziekte zoals vermagering, bloedarmoede en bloedverlies. Dit heeft tot gevolg dat de patiënten vaak erg moe zijn. Daarnaast hebben de patiënten ook erg vaak last van diarree wat natuurlijk ook erg onprettig is. Een goed medicijn om deze ziekte onder controle te houden zou de kwaliteit van leven van deze patiënten dan ook erg kunnen verbeteren.

Mechanisme van de ziekte van crohn

Allereerst is het belangrijk om te weten onder invloed van welke factoren de ziekte van crohn optreedt. Het optreden van de ziekte van crohn is namelijk geen simpele oorzaak-gevolg relatie, maar een samenspel van darmflora, genetische gevoeligheid en immuungemedieerde weefselschade[2-4]. Deze immuungemedieerde weefselschade ontstaat doordat de regulatie van het intestinale immuunsysteem niet op de juiste wijze gemedieerd wordt. De regulatie tussen de darmflora en het intestinale immuunsysteem luistert namelijk erg nauw. Deze regulatie zou gezien kunnen worden als een gecontroleerde fysiologische ontsteking[5]. Het mucosale immuunsysteem is namelijk een zeer gevoelig sensorisch “orgaan” die bij kleine veranderingen in het micromilieu in de darm in staat is om op te treden. Het is belangrijk dat het mucosale immuunsysteem in een dusdanige staat is dat er een beperkte respons is tegen voedselantigenen en tegen de normale darmflora. Terwijl er wel een sterke respons op moet treden tegen pathogene micro-organismen[6]. Hieruit kan dus worden afgeleid dat de regulatie van de immuunrespons zeer nauw gereguleerd dient te worden. Er moet immers heel goed onderscheid gemaakt kunnen worden tussen pathogene micro-organismen en tussen de normale darmflora. Problemen met patroonherkenning draagt dan ook voor een deel bij aan de ontwikkeling van de ziekte van Crohn. Naast Problemen met patroonherkenning zijn er bij patiënten met de ziekte van Crohn ook problemen met de intestinale barrière en het lijkt er op dat deze patiënten een te zwak aangeboren immuunsysteem hebben. Doordat in eerste instantie een te zwakke immuunreactie op zou treden tegen micro-organismen. Worden deze micro-organismen niet goed uitgeschakeld, waardoor het aangeboren immuunsysteem het adaptieve immuunsysteem activeert. Doordat dit adaptieve immuunsysteem niet goed wordt downgereguleerd kunnen chronische ontstekingen in de darm ontstaan. In de volgende alinea's zullen de mechanismes achter de verschillende onderdelen die een belangrijk effect hebben op het ziektebeeld bij de ziekte van Crohn besproken worden.

Het monocytencompartment, de initiator van de ziekte van Crohn

Bij de ziekte van Crohn gaat het doden van micro-organismen door het aangeboren immuunsysteem niet zoals het zou moeten. Doordat cellen van het aangeboren immuunsysteem niet voldoende aanwezig zijn(neutrofielen) of hun werk niet goed doen(macrofagen) worden micro-organismen niet goed gedood waardoor het adaptieve immuunsysteem geactiveerd wordt. De initiatie van de ziekte van Crohn zou veroorzaakt kunnen worden door bacteriën uit de normale darmflora of door pathogenen. Het ontstaan van de ziekte van Crohn zou ook veroorzaakt kunnen worden door normale darmbacteriën. Door normale slijtage van het darmepitheel kunnen deze bacteriën de barrière passeren[7]. Op het moment dat normale darmbacteriën het epitheel van de darm passeren moeten deze gedood worden. Normaal gesproken worden deze bacteriën dan ook gedood door macrofagen. Als echter de doding van deze bacteriën niet goed gaat doordat de macrofagen de bacteriën niet kunnen doden dan wordt het adaptieve immuunsysteem geactiveerd door presentatie van antigenen van deze bacterie op de membraan van antigeen presenterende cellen(APC)[8]. Deze antigenen kunnen gepresenteerd worden via MHC klasse 1 en MHC klasse 2. Door presentatie van antigenen via MHC 1 kunnen cytotoxische T-cellen deze cellen doden. Door cytokineproductie door APC's en presentatie van antigenen via MHC 2 door deze APC's kan activatie van T-

helpercellen plaatsvinden. Deze T-helpercellen kunnen van verschillende types zijn. De types die voor de ziekte van Crohn van belang zijn, zijn Th17 en Th1. De activatie van deze 2 types T-helpercellen gaan een intestinale microbiële infectie tegen. Hierbij zorgt de Th1 respons voor de cytotoxische factoren die zorgen voor het doden van de pathogenen. De respons van Th17 is met name belangrijk voor de ontstekingsreactie die er voor zorgt dat ontstekingsfactoren de immuunrespons mediëren. De hoeveelheid onderzoek naar de mediatie van Th1(IL-12) en Th17(IL-23) is nog beperkt. Maar het is wel bekend dat deze cytokines geproduceerd worden door dendritische cellen en macrofagen. Hieruit lijkt het dan ook zo te zijn dat de oorzaak van een te sterke T-celrespons (mechanisme wordt besproken in “problemen met downregulatie van het immuunsysteem na contact met een pathogeen”) ligt in de aangeboren immuniteit.[7]

Het zojuist besproken proces zou ook veroorzaakt kunnen worden door een pathogeen micro-organisme. In eerste instantie werd gedacht dat de ziekte van Crohn veroorzaakt werd door een pathogeen, omdat bij 50% van de patiënten met het pathogeen mycobacterium tuberculosis(MT) werd aangetroffen[9]. De hoge ratio van aanwezigheid van deze bacterie bij patiënten in vergelijking met gezonde individuen wees erop dat deze bacterie wel eens een belangrijke rol kon spelen in het initiëren van de ziekte. Er is dan ook geprobeerd om patiënten te behandelen met antibiotica zodat dit pathogeen onderdrukt. Er trad echter geen significante verbetering op van het ziektebeeld[10]. Dit wijst er dus op dat dit zeker niet de enige oorzaak is van de ziekte van Crohn. MT is een pathogene bacterie die gezonde individuen al veel “moeite” kost om te onderdrukken[7]. Doordat bij de ziekte van Crohn sprake is van een onvoldoende werkend aangeboren immuunsysteem zullen patiënten met deze ziekte deze bacterie niet kunnen uitschakelen waardoor de activatie van het adaptieve immuunsysteem plaatsvindt via de route die zojuist beschreven is. MT zou dus het begin kunnen zijn van de ziekte. Maar dit pathogeen is zeker niet noodzakelijk om de ziekte van Crohn te ontwikkelen.

In het voorgaande gedeelte is besproken waardoor een te sterke adaptieve immuunrespons optreedt door een gebrek aan aangeboren immuniteit. Voor een gebrek aan aangeboren immuniteit zijn verschillende bewijzen te leveren. Voordat dit besproken kan worden is het belangrijk om te beschrijven welke onderdelen van de aangeboren immuniteit invasie van micro-organismen tegengaan. Voor het voorkomen van microbiële invasie zijn de volgende componenten van belang: Darmepitheel, zuurgraad van de maag, peristaltiek, α -defensines, normale darmflora, monocytten, macrofagen, neutrofielen en APC's[7]. Het testen voor anti-microbiële activiteit van α -defensine in de inhoud van de darm van patiënten met de ziekte van Crohn bleek significant lager te zijn dan de anti-microbiële activiteit hiervan bij gezonde personen[11]. Dit is dan ook de eerste aanwijzing dat er bij de ziekte van Crohn problemen zijn met de eerste lijn van verdediging. Naast deze aanwijzing is het ook bekend dat er bij patiënten met de ziekte van Crohn mutaties zijn in het NOD2 gen en in het gen dat codeert voor de TLR4 receptor[12-15]. Dit zijn receptoren die aanwezig zijn bij monocytten en die belangrijk zijn voor de herkenning van pathogenen. Deze receptoren maken deel uit van de Pattern Recognition Receptors (PRRs). Deze PRRs kunnen pathogen-associated molecular patterns (PAMP) herkennen zodat micro-organismen gedood kunnen worden. Binding van pathogenen aan TLR4 kan leiden tot fagocytose door macrofagen(dit zijn cellen die kunnen ontstaan uit monocytten). Na het omsluiten van het pathogeen door fagosomen kunnen deze fuseren met lysosomen. Door fusie van fagosomen met lysosomen ontstaan fagolysosomen. In de fagolysosomen vindt de degradatie van het pathogeen plaats[7]. Door de productie chemokines en cytokines worden neutrofielen gerecruteerd[16]. Deze neutrofielen kunnen pathogenen doden door de productie van zuurstofradicalen. Uit het

onderzoek van Marks et al bleek dat bij patiënten met de ziekte van Crohn een zeer lage accumulatie van neutrofielen optrad na trauma van het darmepitheel[17]. Deze neutrofielen zijn erg belangrijk voor het onder controle houden van een acute infectie. Ook dit is weer een aanwijzing voor een verminderde aangeboren immuniteit bij patiënten met de ziekte van Crohn. Doordat er inmiddels verschillende aanwijzingen waren voor een verminderde aangeboren immuniteit is door Korzenik J. R. et al onderzocht van het effect van de groeifactor sargramostim (een groeifactor die de productie van cellen van het aangeboren immuunsysteem stimuleert) was op de ziekte van Crohn, hieruit bleek dat er een verbetering van het ziektebeeld optrad. En dat de kwaliteit van leven verbeterde[18].

Uit het zojuist beschreven gedeelte kan geconcludeerd worden dat monocyten en de hieruit ontstane dendritische cellen en macrofagen het startpunt vormen voor de ziekte van Crohn, door een inadequate reactie op pathogenen. Door deze inadequate reactie wordt het adaptieve immuunsysteem geactiveerd wat tot verergering van de ziekte leidt. Hoe deze activatie van het adaptieve immuunsysteem leidt tot verergering van de ziekte zal in de komende alinea's besproken worden.

Problemen met downregulatie van het immuunsysteem na contact met een pathogeen

Bij gezonde personen wordt de geactiveerde T-celrespons in de mucosa gecontroleerd door 2 verschillende pathways. Deze pathways lijken beide niet goed te werken bij mensen met de ziekte van Crohn. De eerste pathway heeft betrekking op de rol van regulatoire T-cellen om een ontsteking te beheersen. Perifere regulerende T-cellen (T_{regs}) geven immunosuppressieve cytokines af zoals IL-10 en TGF- β . Deze cytokines stimuleren het aanmaken van cytotoxische T-lymfocyt geassocieerde antigeen 4 (CTLA-4), CTLA-4 is een negatieve regulator van T-celactivatie[19]. CTLA-4 downreguleert T-celactivatie doordat het CD28 vervangt waardoor co-stimulatie van de T-cel verdwijnt dit beëindigt de T-celrespons. CTLA-4 productie kan een T-celreactie dus beëindigen. En hiermee kan er dus voor gezorgd worden dat ontstekingen onder controle blijven. Doordat er bij de ziekte van Crohn te weinig immunosuppressieve cytokines (bijv IL-10 TGF- β) worden geproduceerd worden ontstekingen niet goed onder controle gehouden waardoor uiteindelijk de zweren in de darmen kunnen ontstaan.

Naast een tekort aan immunosuppressieve cytokines wordt er bij de ziekte van Crohn ook nog eens te veel IL-6 geproduceerd. IL-6 zorgt er door binding aan de IL-6 receptor (membraangebonden en oplosbaar) voor dat wordt voorkomen dat geactiveerde T-cellen in apoptose gaan, hierdoor ontstaat accumulatie van geactiveerde T-cellen in de mucosa en daarmee een verlenging van de ontsteking [20-21]. Normaal gesproken gaan geactiveerde T-cellen in apoptose nadat het pathogeen gedood is. Maar doordat er bij de ziekte van Crohn sprake is van een te hoge hoeveelheid IL-6 blijven geactiveerde T-cellen actief. Dus ook dit zorgt er voor dat de ontstekingsreactie niet beëindigt wordt[22]. De bekende symptomen bij de ziekte van Crohn zijn zweren in de darmen. Deze zweren worden veroorzaakt doordat er weefsel schade optreedt onder invloed van een ontstekingsreactie. Bij een T_H1 activatie hoort het volgende cytokineprofiel; TNF- α , IL-1, IL-6 en IFN- γ . Deze cytokines zorgen ervoor dat er geactiveerde metalloproteïnases gevormd worden. Het gaat hier dan met name om stromosolyn-1, stromosolyn-1 zorgt uiteindelijk voor schade aan de weefsels[23-26]. Normaliter is deze weefsel schade functioneel, omdat onder andere door deze weefsel schade cellen van het immuunsysteem naar de plaats van ontsteking worden geleid. Zodat het pathogeen dat op deze plaats zit onschadelijk gemaakt kan worden. Als echter na het doden van het pathogeen geen downregulatie van het immuunsysteem plaatsvindt dan krijgt het weefsel niet de kans om te herstellen waardoor de zweer chronisch wordt.

Het effect van een T_h1 –cytokine profiel op de permeabiliteit van de darm

Naast een gebrek aan downregulatie van de immuunrespons is er ook bekend dat er bij de ziekte van Crohn problemen zijn met de permeabiliteit van de darm. De epitheelcellen van de darm worden normaal gesproken namelijk sterk aan elkaar gebonden door tight junctions. Deze tight junctions bestaan onder andere uit de eiwitten claudine en occludine. Van met name claudine is een heel legio aan soorten bekend. Een groot deel van deze claudines draagt bij aan het vormen van sterke tight junctions in de darm waardoor de permeabiliteit afneemt. Er zijn echter ook claudines waarvan bekend is dat deze zorgen voor porievorming in de darm. De belangrijkste hiervan is claudine 2. Claudine 2 draagt bij aan porievorming in de darm en hierdoor kunnen er dus meer antigenen uit de darm het epitheel passeren. Waardoor een ontstekingsreactie verder versterkt kan worden. Een verhoogde expressie van claudine 2 is gevonden bij patiënten die in de actieve fase van de ziekte verkeren. Hierdoor werd vermoed dat de expressie van claudine 2 wel eens afhankelijk kon zijn van pro-inflammatoire cytokines. Dit effect is dan ook getest met behulp van western blotting. Hieruit bleek dat de expressie van claudine 2 behoorlijk toenam onder invloed van $TNF-\alpha$. Door deze verhoogde expressie neem de permeabiliteit van de darm toe waardoor er meer antigenen door het darmepitheel lekken. Ook hierdoor wordt de ontstekingsreactie weer versterkt[27].

Oorzaak van de ziekte van Crohn en mechanismes waarop ingegrepen kan worden

De ziekte van Crohn is zoals uit het voorgaande gedeelte over de mechanismes van de ziekte van Crohn afgeleid kan worden erg complex. En er zijn dan ook veel factoren die aan de ontstekingen in de darm bijdragen. Of de ziekte nu veroorzaakt wordt door pathogenen of door passage van het darmepitheel door commensaalbacteriën is niet exact bekend. Voor een te zwakke aangeboren immuniteit die er vervolgens voor zorgt dat de adaptieve immuniteit wordt ingeschakeld waardoor weefselschade aan de darmen op kan treden lijken inmiddels wel sterke aanwijzingen. Dat de schade die uiteindelijk ontstaat in de darmen wordt veroorzaakt door de T_h1 respons lijkt inmiddels ook steeds duidelijker. Daarnaast beïnvloedt deze respons ook de permeabiliteit van de darm waardoor commensaalbacteriën door het darmepitheel heen kunnen lekken en hierdoor de ontstekingsreactie nog meer versterken. Het onderdrukken van deze T_h1 -respons zou dan ook een zeer geschikte interventiestrategie kunnen zijn. Dit zou bijvoorbeeld kunnen door het pro-inflammatoire cytokine $TNF-\alpha$ te onderdrukken. Er is al gebleken dat onderdrukking van $TNF-\alpha$ een positief effect heeft op het verloop van de ziekte van Crohn[28]. Dit is natuurlijk geen optimale interventiestrategie, omdat het een kwestie is van symptoomonderdrukking. Echter doordat het exacte mechanisme achter de te beperkte aangeboren immuunrespons niet precies bekend is, is dit de beste strategie om de ziekte te onderdrukken.

Huidige behandelmethoden

De huidige behandelmethoden bij de ziekte van Crohn zijn met name gericht op anti- TNF behandeling. Bij deze behandeling wordt er een antilichaam ingespoten tegen $TNF-\alpha$. Door inspuiten van dit antilichaam wordt onder andere oplosbaar $TNF-\alpha$ weggevangen waardoor de ontstekingsreactie al deels onderdrukt wordt. Daarnaast bindt dit anti- $TNF-\alpha$ -antilichaam ook aan membraangebonden $TNF-\alpha$. Dit membraangebonden $TNF-\alpha$ zit onder andere op geactiveerde T-cellen en monocytën. Door binding van het antilichaam aan dit membraangebonden $TNF-\alpha$ gaan deze cellen in apoptose[29-30]. Naast het versterken van apoptose in geactiveerde T-lymfocyten en monocytën heeft dit antilichaam nog een belangrijk effect op de apoptose van cellen. Namelijk het verminderen van apoptose in de epitheliale cellen, omdat onder andere de hoeveelheid pro-inflammatoire cytokines daalt[31]. Het gaat dan niet alleen om een lagere hoeveelheid $TNF-\alpha$, maar ook om onderdrukking van andere

cytokines. Er zijn immers minder geactiveerde T-cellen en monocytten waardoor de inflammatie onderdrukt wordt. Immers minder actieve T-cellen/monocytten betekent dat er ook minder pro-inflammatoire cytokines aanwezig zijn.

Het effect van apoptose van darmepitheel op de permeabiliteit

Naast de verhoogde apoptose-ratio van geactiveerde T-cellen en monocytten wordt de apoptose van darmepitheelcellen juist onderdrukt. Dit komt met name door een lagere hoeveelheid TNF- α . TNF- α zorgt namelijk voor een verhoogde apoptose-ratio in deze cellen. In hoeverre een vermindering van het aantal darmepitheelcellen direct bijdraagt aan een verhoogde permeabiliteit is nog de vraag. Er is echter wel een onderzoek bekend waar is geprobeerd om beïnvloeding van de permeabiliteit door tight-junction eiwitten uit te sluiten[31]. Bij dit onderzoek is gekeken naar het effect van anti-TNF- α op de regulatie van de tight-junction eiwitten occludine, claudine 1 en claudine 4. Er bleek dat de therapie geen significant effect had op de hoeveelheid tight-junction eiwitten. Daarnaast is er gekeken naar de hoeveelheid apoptose van epitheelcellen en naar de doorlaatbaarheid van de darm. Het bleek dat er meer apoptose plaatvond bij patiënten met de ziekte van Crohn en dat deze apoptose-ratio hersteld kon worden naar normaal met behulp van anti-TNF- α behandeling. Vervolgens is ook gekeken naar het effect van anti-TNF- α behandeling op de doorlaatbaarheid van de darm. Het bleek dat de doorlaatbaarheid van de darm lager werd na behandeling met anti-TNF- α , wat volgens dit onderzoek zou impliceren dat de hoeveelheid apoptose van epitheelcellen wel eens voor een groot deel bij zou kunnen dragen aan de verhoogde doorlaatbaarheid van de darm. Hier vallen echter wel kanttekeningen bij te maken. Er is namelijk maar gekeken naar een aantal tight-junction eiwitten. Het kan zijn dat er bij andere tight-junction eiwitten wel een groot effect is. Uit het onderzoek van Zeissig et al[27] bleek namelijk dat TNF- α een groot effect heeft op de regulatie van het porievormende tight-junctioneiwit claudine 2. Er treed namelijk een sterk verhoogde expressie van claudine 2 op als epitheelcellen van de darm gestimuleerd worden met TNF- α . Het verlagen van de permeabiliteit van de darm met behulp van anti-TNF- α behandeling zou dan ook wel eens te maken kunnen hebben met het onderdrukken van het porievormende eiwit claudine 2. Dit zou dus betekenen dat het nog maar de vraag is in hoeverre epitheliale apoptose bijdraagt aan verhoogde permeabiliteit in de darm. Wat het exacte werkingsmechanisme achter een verlaagde epitheliale permeabiliteit van de darm als gevolg anti-TNF- α behandeling is, is dan ook nog niet bekend.

Het mechanisme achter weefselherstel door Anti-TNF- α behandeling

De vermindering van de epitheliale permeabiliteit in de darm bijdraagt aan de verbetering van het ziektebeeld is verklaarbaar omdat er door vermindering van de permeabiliteit minder antigenen door het darmepitheel heen lekken. We weten inmiddels ook dat het onderdrukken van de ontstekingsreactie door onder andere het in apoptose laten gaan van geactiveerde T-cellen en monocytten een positief effect heeft op het ziekteverloop. Maar wat zorgt ervoor dat het weefsel weer herstelt? Zoals beschreven stond in het gedeelte over het mechanisme achter de ziekte van Crohn hebben metalloproteinases een beschadigend effect op het weefsel in de darm. Deze metalloproteinases beschadigen namelijk de extracellulaire matrix van darmcellen. Er werd dan ook gedacht dat het therapeutische effect van een anti-TNF- α behandeling dan ook wel eens veroorzaakt zou kunnen worden door effecten van deze behandeling op metalloproteinases of op remmers van metalloproteinases. Uit het onderzoek van Di Sabbatino et al[32] bleek echter dat geen van de bestaande anti-TNF- α behandelingen effect had op de productie van metalloproteinases door myofibroblasten. De bestaande behandelingen (infliximab, adalimumab, etanercept, en p55-TNFR-IgG) hadden echter wel

een effect op de productie van TIMP-1. Het bleek namelijk dat de productie van TIMP-1 significant toenam onder invloed van anti-TNF- α behandeling. Doordat TIMP-1 de activiteit van metalloproteinasen remt draagt een verhoogde hoeveelheid TIMP-1 bij aan wondgenezing.

Werkingsmechanisme achter anti-TNF- α behandeling op myofibroblaststimulatie

De werking van anti-TNF- α op myofibroblasten werkt ook via membraangebonden TNF- α , echter in tegenstelling tot het effect van anti-TNF- α op geactiveerde T-lymfocyten en monocytten leidt binding van anti-TNF- α aan het membraangebonden TNF- α niet tot apoptose in myofibroblasten. In myofibroblasten leidt binding van het antilichaam aan membraangebonden TNF- α ook tot activatie van de p38 mapkinase signaaltransductie route, echter in tegenstelling tot geactiveerde T-lymfocyten en monocytten leidt de activatie van deze signaaltransductie route in myofibroblasten niet tot activatie van caspase. Door activatie van caspases wordt de cel aangezet tot apoptose. Bij myofibroblasten wordt de cel echter door activatie van de p38 mapkinase signaaltransductie route aangezet tot het aanmaken van TIMP-1. Hiermee is er dan ook een indicatie over het werkingsmechanisme van anti-TNF- α op myofibroblasten.[32]

Een ander belangrijk effect wat anti-TNF- α behandeling heeft op myofibroblasten, is dat het de migratie van deze cellen stimuleert[32]. Dit betekent dat de myofibroblasten naar beschadigd weefsel migreren en hier zorgen voor wondherstel. Nadat het weefsel is hersteld moeten de myofibroblasten weer uit de wond verdwijnen. Dit is belangrijk omdat er anders fibroses ontstaan die verstoppingen in de darm kunnen veroorzaken. Daarnaast hebben deze fibroses ook een negatief effect op de opnamecapaciteit van de darm voor nutriënten. Bij de ziekte van Crohn is een van de grote problemen dat er fibroses in de darm ontstaan. Doordat anti-TNF- α de myofibroblasten stimuleert om te migreren kan ook voorkomen worden dat er allerlei verstoppingen in de darm optreden door fibroses.

Het therapeutische effect van anti-TNF- α behandeling

Er zijn inmiddels dus een aantal werkingsmechanismen van anti-TNF- α behandeling bekend. Namelijk; tight-junctionbeïnvloeding, het wegvangen van oplosbaar TNF- α , tegengaan van apoptose in epitheliale cellen, bevorderen van apoptose in geactiveerde T-cellen en monocytten, de verhoogde TIMP-1 productie en het verbeteren van de migratiemogelijkheden van myofibroblasten. Hoe al deze factoren elkaar precies beïnvloeden en welke andere factoren eventueel nog betrokken kunnen zijn maakt ook het mechanisme achter de behandelingsmethode erg complex. Er is echter wel bekend dat de huidige medicijnen een therapeutisch effect hebben op het verloop van de ziekte van Crohn. De positieve effecten van de medicijnen zijn onder andere het verminderen van zweren, het verminderen van obstructies in de darm door het tegengaan van fibroses. En het verbeteren van de permeabele functie van de darm.

Er zijn momenteel verschillende medicijnen op de markt namelijk infliximab, adalimumab, etanercept, en p55-TNFR-IgG. Niet al deze medicijnen hebben dezelfde effecten. En ook niet al deze medicijnen hebben effect op de zojuist beschreven werkingsmechanismen. Het momenteel meest gebruikte medicijn is infliximab. Dit medicijn heeft wel alle hierboven geschreven effecten en lijkt het bij het starten van een behandeling bij zeker 70% van de mensen een positief effect te hebben op het ziekteverloop. Er is echter een belangrijk probleem met dit medicijn. Het belangrijkste probleem met het medicijn is dat de werking van het medicijn na verloop van tijd sterk afneemt.

Uit huidige behandelingen met infliximab blijkt dat behandeling met infliximab het beste effect heeft als patiënten een injectie krijgen op 0, 2 en 6 weken. Deze injecties moet vervolgd worden met een onderhoudsinjectie iedere 8 weken zodat het positieve effect van het medicijn op het ziekteverloop onderhouden kan worden[33-36]. Er moet namelijk voor gezorgd worden dat er voldoende infliximab aanwezig blijft om de therapeutische werking hiervan te onderhouden. In deze hoeveelheid infliximab ligt dan ook de crux voor de werking van het medicijn. Als er namelijk te weinig infliximab aanwezig is, kan niet voldoende ingegrepen worden op de werkingsmechanismes van het medicijn.

Lange termijnwerking van Infliximab

Het verliezen van de werking van het medicijn zit hem dan ook in de hoeveelheid van het medicijn dat aanwezig is. Bij patiënten waarbij de symptomen weer verergeren na verloop van tijd terwijl wel de infliximab-behandeling gecontinueerd wordt is namelijk vaak sprake van het aanwezig zijn van antilichamen tegen infliximab(ATI). Uit verschillende studies is namelijk gebleken dat er een sterke associatie is tussen het aanwezig zijn van ATI's en het verliezen van de therapeutische werking van infliximab. Dit blijkt ten minste uit het gros van de studies. Het verliezen van de therapeutische werking van het medicijn is ook gecorreleerd met de antilichaam titer. Bij een zeer lage titer van ATI's zijn er namelijk gevallen bekend die nog wel een therapeutisch effect ondervinden van infliximab. Als er echter een hoge titer van ATI's is dan heeft dit in veel gevallen tot gevolg dat het therapeutische effect van infliximab verdwijnt.[37]

Het vormen van antilichamen tegen infliximab ligt in de oorsprong van het medicijn. Het medicijn is namelijk ontwikkeld door humaan TNF- α in te spuiten in muizen. De antilichamen die hiertegen gevormd werden, werden uiteindelijk geïsoleerd uit de muizen. Na isolatie van dit anti-TNF- α -antilichaam. Werd dit antilichaam gehumaniseerd door het constante gedeelte van het antilichaam te vervangen door een humane Fc-receptor. Een gedeelte van het antilichaam is dus nog van het materiaal van een muis. Doordat dit gedeelte van het antilichaam van een muis is kunnen hiertegen antilichamen gevormd worden door de patiënten die dit medicijn krijgen. Immers het gedeelte van het antilichaam dat gemaakt is in een muis wordt door het immuunsysteem gezien als een vreemd antigeen dat opgeruimd moet worden. Het vormen van ATI's komt dan ook doordat infliximab voor een gedeelte uit muizenmateriaal bestaat. Dit zou dus betekenen dat een volledig humaan antilichaam tegen TNF- α normaal gesproken geen last zou moeten hebben van antilichamen die gevormd worden tegen dit humane TNF- α antilichaam.

Het mogelijke therapeutische effect van autoantilichamen

Een volledig humaan TNF- α -antilichaam zou dan ook een erg interessant medicijn zijn voor ziektes waarbij een overschot aan TNF- α een grote rol speelt. Het probleem is echter dat het maken van humane antilichamen tegen een lichaamseigen cytokine(TNF- α) lastig realiseerbaar is. Inspuiten van humaan TNF- α bij een mens heeft namelijk niet het effect dat hiertegen antilichamen worden gevormd. Dit komt doordat het lichaam normaalgesproken geen antilichamen aanmaakt tegen lichaamseigen stoffen. Dit betekent dus dat het maken van een humaan antilichaam tegen TNF- α niet via deze weg kan plaatsvinden. Er is echter inmiddels wel onderzoek bekend waaruit gebleken is dat patiënten met reumatoïde artritis en Systemic Lupus Erythematosus(SLE) autoantilichamen maken tegen TNF- α . Uit dit onderzoek bleek ook dat bij toename van de hoeveelheid autoanti- TNF- α er verbetering

optrad van de symptomen. Het produceren van autoanti-TNF- α zou dan ook gezien kunnen worden als een laatste redmiddel van het lichaam om een te sterke immuunrespons die schade veroorzaakt aan het eigen lichaam te onderdrukken. Echter de verbetering van de situatie die optreedt door autoanti-TNF- α vorming is niet dusdanig dat deze patiënten geen behandeling meer nodig hebben. Het zou dan ook erg interessant zijn als de B-cellen die deze autoantilichamen produceren geselecteerd kunnen worden, zodat dit volledig humane anti-TNF- α buiten het lichaam geproduceerd kan worden. En vervolgens gebruikt kan worden als medicijn bij TNF- α gerelateerde ziektes zoals de in deze scriptie beschreven ziekte van Crohn.[39]

Wat het exacte mechanisme is achter de vorming van autoantilichamen tegen TNF- α is nog niet precies bekend. Het zou een onderdeel kunnen zijn van het aangeboren immuunsysteem maar het zou ook kunnen komen door een overschot aan TNF- α . In hoeverre autoantilichamen ook voorkomen bij de ziekte van Crohn is nog niet bekend. Het zou echter wel erg interessant zijn om te kijken of autoantilichamen tegen TNF- α ook aanwezig zijn bij patiënten bij de ziekte van Crohn. Vervolgens zou het interessant zijn om te kijken of het mogelijk is om de B-cellen te selecteren die deze autoantilichamen produceren.

Selectie van B-cellen met autoantilichamen tegen TNF- α

Zoals zojuist beschreven stond zou het erg interessant zijn om patiënten met de ziekte van Crohn te selecteren met autoantilichamen tegen TNF- α . Dit zou gedaan kunnen worden door het afnemen van bloed van deze patiënten, het is dan wel belangrijk dat deze patiënten geen anti-TNF- α -behandeling krijgen. Op het serum van dit bloed kan vervolgens een ELISA uitgevoerd worden om te kijken welke patiënten autoantilichamen hebben tegen TNF- α . Het is vervolgens zaak om van deze patiënten lymfklier-biopsen of gedeeltes van de darm te krijgen. Het krijgen van lymfklierbiopsen zal erg lastig zijn. Omdat deze normaal gesproken niet genomen worden bij deze patiënten. Wat echter wel tot de mogelijkheden behoort is het verkrijgen van stukken darm van deze patiënten. Patiënten met de ziekte van Crohn ondergaan namelijk regelmatig operaties aan de darmen. Bij zo'n operatie zou het weggesneden stuk darm bewaard kunnen worden zodat hier celextracten van gemaakt kunnen worden. Bij deze celextracten kunnen vervolgens de myelomacellen NS0 worden gevoegd in een verhouding van 4:1. De cellen uit het celextract kunnen vervolgens gefuseerd worden met de myelomacellen[40,41]. Na het fuseren van deze cellen zullen er hybridoma's ontstaan. Deze hybridoma's zullen uitgezaaid worden over verscheidene welletjes. Deze welletjes kunnen vervolgens getest worden voor het aanwezig zijn van anti-TNF- α producerende hybridoma's. Dit zal gedaan worden door een ELISA te doen op het supernatant van de verschillende welletjes. Na deze ELISA is bekend welke welletjes de geschikte cellen bevatten. Echter bevatten deze welletjes niet alleen de cellen die anti-TNF- α -antilichamen. Uit deze welletjes zullen dan ook de juiste cellen geselecteerd moeten worden. Dit kan gedaan worden met behulp van GFP NF κ B-FACS-analyse. Hiermee worden specifiek de cellen geselecteerd die de TNF- α -antilichamen produceren. Deze cellen kunnen vervolgens opgekweekt worden. Het antilichaam zal vervolgens afgescheiden worden en aanwezig zijn in het supernatant. Na het opzuigen van het supernatant kan het antilichaam dat hierin aanwezig is opgezuiverd worden. Waarna een volledig humaan TNF- α -antilichaam geproduceerd is.

Conclusie

Bij de ziekte van Crohn is er sprake van een te zwakke aangeboren immuunrespons waardoor de adaptieve immuunrespons geactiveerd wordt. Met name de rol van monocyten is erg belangrijk in het te zwakke aangeboren immuunsysteem. Nadat het adaptieve immuunsysteem

geactiveerd is treedt er een Th1 respons op. Deze Th1 respons heeft vervolgens weer tot gevolg dat verscheidene tight-junction eiwitten beïnvloedt worden, waardoor er meer antigenen door de darmwand heen kunnen lekken. Dit versterkt vervolgens weer de ontstekingsreacties in de darm. Bij het optreden van de Th1 respons speelt TNF- α een belangrijke rol. Onderdrukking van TNF- α is dan ook een goede keuze als interventiestrategie. Deze interventiestrategie is dan ook een van de belangrijkste huidige strategieën om het leven van patiënten met de ziekte van Crohn te verbeteren. Het meest gebruikte medicijn is momenteel infliximab. Bij dit medicijn treedt echter het probleem op dat het therapeutische effect van het medicijn na verloop van tijd afneemt in een groot gedeelte van de patiënten. Deze afname van therapeutische werking is sterk gecorreleerd met het ontstaan van antilichamen tegen infliximab. Deze antilichamen tegen infliximab worden gevormd, omdat het medicijn in het variabele deel bestaat uit muizenmateriaal. Doordat dit gezien wordt als lichaamsvreemd antigeen worden hier door het lichaam antilichamen tegen gemaakt. Een verbeterde interventiestrategie zou dan ook een volledig humaan antilichaam zijn tegen TNF- α . Om aan een volledig humaan antilichaam tegen TNF- α te komen kan er gebruik worden gemaakt van autoantilichamen. Autoantilichamen zijn antilichamen die gericht zijn tegen lichaamseigen materiaal. Bij patiënten met reumatoïde artritis en SLE is het bekend dat er antilichamen gemaakt worden tegen TNF- α . De B-cellen die deze autoantilichamen produceren kunnen vervolgens geselecteerd worden, waarna hiervan hybridoma's gemaakt kunnen worden die het antilichaam tegen TNF- α produceren. Deze antilichamen zijn volledig humaan waardoor er mogelijk een interventiestrategie is ontstaan voor de ziekte van Crohn die ook op de lange termijn stand houdt!

Literatuurlijst

- 1 Schottenfeld D et al The Epidemiology and Pathogenesis of Neoplasia in the Small Intestine.
- 2 Sartor RB. Et al Enteric microflora in IBD: pathogens or commensals? *Inflamm Bowel Dis* 1997; 3: 230–35.
- 3 Shanahan F. et al Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 107–15.
- 4 Elson CO. et al Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 254–57.
- 5 Shanahan F. et al Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. *Am J Physiol* 2000; 278: G191–G196.
- 6 Shanahan F. et al Crohn's disease
THE LANCET • Vol 359 • January 5, 2002
- 7 Zhou L. et al Monocytes and their role in Crohn's disease
Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 192 – 202
- 8 Du P. L. et al Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity.
C. R. Biol., 327, 591–601.
- 9 Naser S. et al A Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease.
Lancet, vol 364,1039–1044. (2004)
- 10 Selby W et al. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology*, 132, 2313–2319. (2007)
- 11 Wehkamp J., et al NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, 53, 1658–1664. (2004)
- 12 Braat H. et al Consequence of functional Nod2 and Tlr4 mutations on gene transcription in Crohn's disease patients.
J.Mol. Med., 83, 601–609. (2005)
- 13 Hugot JP, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*; 411: 599–603. (2001)
- 14 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*; 411: 603–06.(2001)
- 15 Hampe J, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations.
Lancet; 357: 1925–28.(2001)
- 16 Nauseef W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view.
Immunol. Rev., 219, 88–102. (2007)
- 17 Marks D. et al Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation.
Lancet, 367, 668–678. (2006)
- 18 Korzenik J. R. Sargramostim for active Crohn's disease.
N. Engl. J. Med., 352, 2193–2201. (2005)
- 19 Read S, et al Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation.
J Exp Med 192: 295–302. (2000)
- 20 Boirivant M et al. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis.
Gastroenterology 116: 557–65. (1999)
- 21 Ina K et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance.
J Immunol; 163: 1081–90. (1999)
- 22 Atreya R, et al. Blockade of interleukin 6 trans signalling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo.
Nat Med; 6: 583–88. (2000)
- 23 Schuppan D, et al. MMPs in the gut: inflammation hits the matrix.
Gut; 47: 12–14. (2000)
- 24 Heuschkel RB, et al. Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease.
Gut 47: 57–62.(2000)
- 25 Pender SL, et al. A major role of matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut.
J Immunol ; 158: 1582–90.(1997)

- 26 Pender SLF, et al. Suppression of T cell-mediated injury in human gut by interleukin 10: role of matrix metalloproteinases. *Gastroenterology*; 115: 573–83.(1998)
- 27 Zeissig S et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, barrier dysfunction in active Crohn's disease 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease *Gut* ;56:61-72;(2007)
- 28 Present DH et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med*; 340: 1398–405.(1999)
- 29 ten Hove T, et al. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut*;50:206–11.(2000)
- 30 Luger A, et al. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology*;121:1145–57.(2001)
- 31 Zeissig S et al. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor α antibody treatment *Gut* 2004;53:1295–1302. (2003)
- 32 Di Sabbatino A et al. Functional Modulation of Crohn's Disease Myofibroblasts by Anti-Tumor Necrosis Factor Antibodies *GASTROENTEROLOGY*;133:137–149 (2007)
- 33 Panes et al. Crohn's disease: a review of current treatment with a focus on biologics . *Drugs* ; 67 : 2511 - 37 .(2007)
- 34 . Rutgeerts P et al . Review article: Infliximab therapy for inflammatory bowel disease-seven years on . *Aliment Pharmacol Ther* ; 23 : 451 - 63(2006) .
- 35 . Lichtenstein GR , et al. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators and infliximab in inflammatory bowel disease . *Gastroenterology*; 130 : 940 - 87(2006) .
- 36 . Clark M et al. American gastroenterological association consensus development conference on the use of biologics in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*; 133 : 312 - 39 (2007).
- 37 Javier P. Gisbert et al. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review *Am J Gastroenterol* 104:760-767;(2009)
- 38 Wardemann et al. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors *Science* 301 Pg:1374 -1377 (2003)
- 39 Wildbaum G et al. Beneficial Autoimmunity to Proinflammatory Mediators Restrains the Consequences of Self-Destructive Immunity *Immunity* Pages 679-688 19, Issue 5, (2003)
- 40 C.Chen et al. Deletion and editing of B cells that express antibodies to DNA. *J. Immunol.* 152: 1970-1982 (1994)
- 41 Matejuk et al. Exclusion of Natural Autoantibody-Producing B Cells from IgG Memory B Cell Compartment during T Cell-Dependent Immune Responses *The Journal of Immunology*, 182, 7634-7643(2009)

