

Academiejaar 2004-2005



*Protectieve effecten van T-lymfocyten in MS :  
Betrokkenheid van LIF*

**Nursen GOL**

**Promotor: Prof. dr. STINISSEN**

**Stagebegeleider: De heer Joris VANDERLOCHT**

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van  
de graad Licentiaat in de Biomedische Wetenschappen,  
afstudeervariant Biologische Gezondheidskunde

Inhoudstabel

<b><i>Inhoudstabel</i></b> .....	<b><i>I</i></b>
<b><i>Lijst met afkortingen</i></b> .....	<b><i>III</i></b>
<b><i>Lijst met figuren</i></b> .....	<b><i>IV</i></b>
<b><i>Voorwoord</i></b> .....	<b><i>V</i></b>
<b><i>Samenvatting</i></b> .....	<b><i>VI</i></b>
<b><i>1. Inleiding</i></b> .....	<b><i>1</i></b>
<b>1.1 Algemene inleiding</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Multiple Sclerosis.....	1
1.1.2 Immunopathogenese.....	2
1.1.3 De mechanismen van primaire demyelinisatie.....	3
<b>1.2 Protectieve auto-immuniteit</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Productie van neurotrofines door immuuncellen .....	5
<b>1.3 Neuropoëtische factoren</b> .....	<b>5</b>
1.3.1 LIF als neurotrofe factor .....	6
1.3.2 Het werkingsmechanisme van LIF .....	7
<i>JAK/STAT signaalweg</i> .....	7
<i>MAP-kinase signaalweg</i> .....	8
<i>IP3-signalweg</i> .....	8
<b>1.4 Onderzoeksopzet</b> .....	<b>10</b>
<b><i>2 Materialen en methoden</i></b> .....	<b><i>11</i></b>
<b>2.1 Celkweek</b> .....	<b>11</b>
2.1.1 Celisolaties .....	11
2.1.2 Stimulatie van immuuncellen.....	11
<b>2.2 Proliferatieassay</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3 Toxiciteitstest: Evaluatie van de apoptose</b> .....	<b>13</b>
<b>2.4 MTT-viabiliteitsassay voor monocyt</b> .....	<b>13</b>
<b>2.5 Analyse van het cytokineprofiel</b> .....	<b>13</b>
<b>2.6 Flow cytometrische analyse van de receptorexpressie</b> .....	<b>15</b>
<b>2.7 Intracellulaire FACS</b> .....	<b>15</b>
<b><i>3. Resultaten</i></b> .....	<b><i>16</i></b>
<b>3.1 Effecten van LIF op immuuncellen</b> .....	<b>16</b>
3.1.1 Toxische effecten van LIF.....	16
3.1.2 Effecten van LIF op de proliferatie .....	18
3.1.3 Effecten van LIF op de cytokinesecretie van PBMC's .....	19
3.1.4 Expressie van de LIF-receptor subeenheden op immuuncellen.....	19

## Inhoudstabel

---

<b>3.2 Studie van kandidaatstimuli die de secretie van LIF door immuuncellen reguleren</b>	<b>20</b>
3.2.1 Effecten van IFN- $\beta$ .....	21
3.2.2 Effecten van Leptine .....	25
3.2.3 Effecten van Simvastatine.....	28
3.2.4 Effecten van Luteoline .....	31
<b>4. Discussie .....</b>	<b>34</b>
<b>5. Referenties .....</b>	<b>39</b>

### Lijst met afkortingen

APC	<i>Antigen presenterende cel</i>
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
BHB	<i>Bloed-hersen-barriere</i>
CT-1	<i>Cardiotrofine-1</i>
CLC	<i>Cardiotrofine-like cytokine</i>
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
CPM	<i>Counts per minute</i>
CZS	<i>Centraal zenuwstelsel</i>
EAE	<i>Experimentele auto-immune encephalomyelitis</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescent activated cellsorter</i>
FCS	<i>Foetaal kalfs serum</i>
FITC	<i>Flourescein isothiocyanaat</i>
GP 130	<i>Glycoproteïne 130</i>
HRP-SA	<i>Horse Radish peroxidase</i>
IFN- $\gamma$	<i>Interferon gamma</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B-kinase</i>
KM	<i>Kweekmedium</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MBP	<i>Myeline basic proteïne</i>
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
MS	<i>Multiple sclerosis</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
OsM	<i>Oncostatin-M</i>
PBMC	<i>Perifere bloed mononucleaire cellen</i>
PBS	<i>Fosfaat gebufferde zoutoplossing</i>
PE	<i>Phycoerythine</i>
PERCP	<i>Peridinin chlorophyll protein</i>
PHA	<i>Phytohemaglutinine</i>
PI3	<i>Phosfatidylinositol-3</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPA	<i>Ribonuclease protection assay</i>
RR-MS	<i>Relapse remitting Multiple sclerosis</i>
SOCS	<i>Suppressors of signaling</i>
SP-MS	<i>Secondary Progressive Multiple sclerosis</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TCR	<i>T-cel receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alfa</i>
7-AAD	<i>7-amino-actinomycin D</i>

## Lijst met figuren

---

### Lijst met figuren

<b>Figuur 1:</b> Immunopathogenese van MS .....	<b>3</b>
<b>Figuur 2:</b> Signaaltransductiewegen van LIF .....	<b>9</b>
<b>Figuur 3:</b> Optimalisatie van de CD3PE, Annexine V-FITC en 7-AAD kleuring .....	<b>17</b>
<b>Figuur 4:</b> Flowcytometrische analyse van de effecten van LIF op de apoptose van immuuncellen .....	<b>17</b>
<b>Figuur 5:</b> Het effect van LIF op de proliferatie van PBMC's .....	<b>18</b>
<b>Figuur 6:</b> De cytokinesecretie na stimulatie met verschillende concentraties van LIF.....	<b>19</b>
<b>Figuur 7:</b> Het effect van IFN- $\beta$ op de proliferatie van PBMC's .....	<b>21</b>
<b>Figuur 8:</b> De cytokinesecretie na stimulatie met verschillende concentraties van IFN- $\beta$ .....	<b>22</b>
<b>Figuur 9:</b> De invloed van IFN- $\beta$ op de viabiliteit en IL-10 secretie van monocyten.....	<b>24</b>
<b>Figuur 10:</b> Het effect van leptine op de proliferatie van PBMC's .....	<b>25</b>
<b>Figuur 11:</b> De cytokinesecretie na stimulatie met verschillende concentraties van leptine....	<b>26</b>
<b>Figuur 12:</b> De invloed van leptine op de viabiliteit en IL-10 secretie van monocyten.....	<b>28</b>
<b>Figuur 13:</b> Het effect van IFN- $\beta$ op de proliferatie van simvastatine .....	<b>29</b>
<b>Figuur 14:</b> De cytokinesecretie na stimulatie met verschillende concentraties van simvastatine .....	<b>29</b>
<b>Figuur 15:</b> De invloed van simvastatine op de viabiliteit en IL-10 secretie van monocyten..	<b>31</b>
<b>Figuur 16:</b> Het effect van luteoline op de proliferatie van PBMC's .....	<b>32</b>
<b>Figuur 17:</b> Het effect van luteoline op de secretie van LIF door PBMC's .....	<b>32</b>
<b>Figuur 18 :</b> De invloed van luteoline op de viabiliteit en IL-10 secretie van monocyten.....	<b>33</b>

---

<b>Tabel 1:</b> Bepaling van de expressie van gp 130 en LIFR- $\beta$ op immuuncellen via flowcytometrie .....	<b>20</b>
--	-----------

### Voorwoord

Na een periode van 4 jaar, hopelijk en eindelijk tot een mooi resultaat. Periodes afwisselend met 'pieken' van rust en stress en vooral tijdens mijn stage. Af en toe een onhandigheid gevolgd door veel moed en geduld vereiste herstelexperimenten. Die telkens beloond werden. Ofwel door een glimlach ofwel door een uitdagende volgende stap. Een stap die niet al te gemakkelijk was maar wel veel belovend. Met veel resultaten en schrijfwerk die meermalig aan verbetering toe waren. En uiteindelijk een eindwerk die te danken is aan zovele mensen. In de eerste plaats zou ik mijn dank willen richten tot Prof. dr. Stinissen die mij de gelegenheid heeft gegeven mijn stageonderzoek in het Biomedisch Onderzoekscentrum te beëindigen. Verder zou ik Dr. Hellings willen bedanken die heel wat leeswerk heeft moeten doen en mijn met zijn ideeën omtrent mijn werkmethode op het labo positief bekritiseerd heeft. Daarnaast zou ik Leentje ook heel erg willen bedanken. Ondanks de mislukkingen met het labowerk deed zij zeer enthousiast haar werk verder. Haar geduld en hulp apprecieer ik heel erg. Ook zou ik al de doctoraatsstudenten en andere medewerkers zoals Igna en Christel willen bedanken. Bij iets zwaardere periodes heb ik ook veel gehad aan mijn medestudenten. Heel erg bedankt. En zeker een dankwoord aan de 'veelzijdige' Joris die mij ondanks de moeilijkheden op alle vlakken hulp heeft aangeboden. Zowel het aanleren van verschillende technieken als het schrijven zou dankzij zijn hulp niet gelukt zijn. Merci hiervoor.

Tot slot zou ik mijn ouders heel erg willen bedanken om hun hulp en steun tijdens de iets zwaardere periodes.

Dankuwel.

### Samenvatting

Multiple Sclerosis (MS) is een van de meest voorkomende neurologische aandoeningen bij jonge volwassenen. Deze chronische ontstekingsziekte wordt gekenmerkt door een infiltratie van T-cellen en macrofagen in de witte stof van het centraal zenuwstelsel (CZS). Onder invloed van deze immuuncellen worden zenuwvezels gedemyeliniseerd waardoor er op verschillende plaatsen plaques of laesies ontstaan. Ondanks de schadelijke effecten van immuuncellen blijken deze cellen echter ook een protectieve eigenschappen te vertonen. Recent werd aangetoond dat autoreactieve T-cellen in staat zijn neurotrofe factoren met name Leukemia inhibitory factor (LIF) te produceren. Dit neuroregulatorisch cytokine blijkt zowel op neuronen als gliale cellen een protectieve invloed uit te oefenen.

Om een beeld te krijgen van het effect van LIF op het immuunsysteem werd in deze studie het effect van LIF op T-cellen en de regulatie van de LIF secretie na behandeling met verschillende factoren verder uitgediept.

Hiervoor werd eerst het toxisch effect van LIF op immuuncellen nagegaan. Uit de resultaten bleek dat de LIF behandeling geen invloed had op de viabiliteit van deze cellen. Verder werd het effect van LIF op de proliferatie van PBMC's bepaald. De bekomen data toonden geen invloed van LIF op zowel de proliferatie als de cytokinesecretie van T-cellen aan.

Een verklaring hiervoor kan gegeven worden met behulp van de receptorstudie. Dit onderzoek toonde aan dat een zeer kleine populatie van de T-cellen een functionele LIF receptor hebben. Ook blijkt de LIF receptor complex hoofzakelijk op monocyten aanwezig te zijn.

Om de regulatie van de LIF secretie door immuuncellen nader te bestuderen werden PBMC's behandeld met IFN- $\beta$ , leptine, simvastatine en luteoline. Behandeling van PBMC's met IFN- $\beta$  en leptine toonde aan dat de LIF secretie niet gereguleerd wordt als een T<sub>H</sub>2 cytokine noch als een T<sub>H</sub>1 cytokine. Verder werden opmerkelijke verschillen in de LIF regulatie van PBMC's van MS-patiënten in vergelijking met PBMC's van de gezonde controles vastgesteld. Bij simvastatine bijvoorbeeld werd een significante stijging in de LIF secretie geobserveerd terwijl deze onveranderd bleven bij PBMC's van de gezonde controles. Het verschil in regulatie van de LIF secretie in onbehandelde MS-patiënten in vergelijking met de gezonde controles zou erop kunnen wijzen dat de defecte LIF regulatie bijdraagt aan de pathogenese van MS. Hiervoor is echter verder onderzoek nodig.

### 1. Inleiding

#### 1.1 Algemene inleiding

##### **1.1.1 Multiple Sclerosis**

Multiple sclerosis (MS) is een auto-immune aandoening van het centraal zenuwstelsel (CZS). De ziekte wordt gekarakteriseerd door multiple sclerotische laesies of plaques. De plaques zijn het resultaat van inflammatoire reacties in de witte stof van het CZS [1]. Deze inflammatoire reacties in het hersenweefsel hebben een degenererende invloed op de myelineschede rond de axonen. In een vroeg stadium van MS kan de demyelinisatie van axonen nog hersteld worden door de beperkte remyeliniserende capaciteit van oligodendrocyten. In een later stadium echter zal deze eigenschap door schade aan oligodendrocyten zelf verloren gaan. Hierdoor zal de prikkelgeleiding en de conductiesnelheid van de zenuwimpulsen door de axonen belemmerd worden wat leidt tot motorische en sensorische dysfuncties [2].

Bij ongeveer 80 tot 90% van de gevallen begint MS met een *relapsing-remitting* vorm (RR-MS) met een reeks herhaaldelijk, terugkerende aanvallen waar de patiënt volledig of gedeeltelijk van herstelt. Van de patiënten met deze vorm van MS gaat ongeveer 40% over naar een meer chronische progressieve vorm, de secundaire progressieve MS (SP-MS) gekenmerkt door een meer gradueel verloop kent. Bij 10 tot 20% van de gevallen manifesteert MS zich als een primair progressieve vorm zonder herhaaldelijke, acute aanvallen [3,4,5].

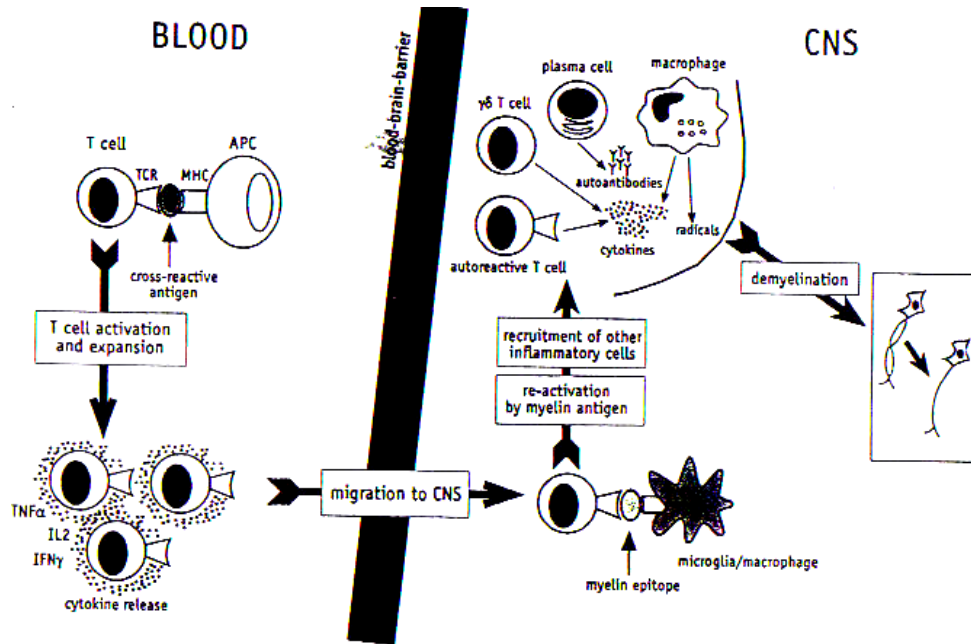
De diagnose van MS is gebaseerd op de *magnetic resonance imaging*-(MRI)-techniek, gecombineerd met de klinische symptomen. Deze methode biedt de mogelijkheid de beschadigde regio's in het hersenweefsel niet invasief te visualiseren. Dit vergemakkelijkt de opvolging van het klinisch verloop en de ernst van de ziekte [5,6].



### 1.1.2 Immunopathogenese

De meest aanvaarde hypothese omtrent het ziektemechanisme verantwoordelijk voor MS stelt dat er in de periferie een activatie optreedt van naïeve myeline-reactieve T-cellen. De activatie van deze myeline reactieve T-cellen in de periferie leidt tot de expansie en de migratie van deze cellen doorheen de bloed-hersen-barriere (BHB) van het CZS. In het CZS vindt reactivatie plaats door de myeline-epitopen op de lokale antigeen presenterende cellen (APC) zoals microglia en macrofagen. De heractivatie van deze T-cellen induceert de secretie van pro-inflammatoire cytokines zoals *tumor necrosis factor alfa* (TNF- $\alpha$ ) en *interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ). Deze chemoattractieve cytokines zorgen voor de opregulatie van de expressie van MHC klasse II-moleculen en adhesiemoleculen op het endotheel [7]. Dit laatste zorgt voor een verhoogde migratie van macrofagen, T- en B-cellen en leidt zo tot een verdere progressie van de inflammatie (Figuur 1) [4].

Over de oorzaak van de initiële activatie van naïeve myelinereactieve T-cellen in de periferie is geen eenduidigheid. Een eerste mechanisme dat aan de basis van deze activatie zou kunnen liggen is *molecular mimicry*. Door het optreden van een infectie kunnen autoantigenen nagebootst worden door virale of bacteriële peptiden. Deze peptiden zouden door kruisreactiviteit aanleiding kunnen geven tot de activatie van autoreactieve T-cellen in het perifere bloed [4,8,9]. Een tweede mogelijke verklaring voor deze activatie zou kunnen liggen bij virale of bacteriële superantigenen. Deze antigenen kunnen een specifieke activatie van autoreactieve T-cellen induceren door een verbinding te maken tussen een specifieke regio van de T-cel receptor (TCR) en MHC klasse II-moleculen. Een laatste mogelijk mechanisme voor het activeren van autoreactieve T-cellen vormt de *bystander activatie*. Een verhoogde secretie van pro-inflammatoire cytokines kan door de opregulatie van MHC- en costimulatorische moleculen een algemeen verhoogde antigeenpresentatie veroorzaken, leidend tot een verhoogde kans op de activatie van autoreactieve T-cellen [2,4].



**Figuur 1: Immunopathogenese van MS.** De activatie van de myeline reactieve T-cellen in de periferie leidt tot de expansie en de migratie van deze cellen doorheen de BHB van het CZS. In het CZS vindt heractivatie plaats door de myeline-epitopen op de lokale APC's. De heractivatie leidt tot de secretie van pro-inflammatoire cytokines zoals TNF- $\alpha$  en IFN- $\gamma$ . Deze chemoattractieve cytokines zorgen voor een verhoogde migratie van macrofagen, T- en B-cellen en leidt zo tot een verdere progressie van de inflammatoire respons [4].

### 1.1.3 De mechanismen van primaire demyelinisatie

Onderzoek naar de pathologie van plaques met actieve myeline destructie brachten een interindividuele heterogeniteit en een intra-individuele homogeniteit voor de mechanismen van de demyelinisatie aan het licht [10]. De pathologische indeling van de verschillende patronen van myeline destructie werd bekomen op basis van het verlies van de myelineproteïnen, de ligging en extensie van de plaques, de depositie van antilichamen en complementfactoren, de mate van oligodendrocytdestructie en complementactivatie en de de- en remyelinisatie in de laesies [5]. Op basis hiervan werden 4 patronen gedefinieerd. Gemeenschappelijk over al de patronen kon een macrofaag- en T-cel- gedomineerde infiltraat worden vastgesteld [10].

Bij patroon I en patroon II treedt de myelineschede op als primair doelwit voor destructie. Ook zijn bij beide gevallen de scherp afgelijnde demyeliniserende plaques in de venen en venules gecentreerd. Patroon I onderscheidt zich door demyelinisatie gemedieerd door secretieproducten van macrofagen zoals TNF- $\alpha$  en reactieve zuurstofradicalen (ROS). De depositie van antilichamen (Ig G) gericht tegen myelinecomponenten en activatie van de

componenten van het complementsysteem (C9neo) in de demyeliniserende laesies kunnen teruggevonden worden bij patroon II [10,11].

Bij de laatste twee patronen, patroon III en patroon IV speelt de degeneratie van oligodendrocyten een belangrijke rol. Bij patroon III treedt er een preferentieel verlies van MAG op, duidend op het verlies van oligodendrocyten (distale oligodendrogliopathie). De laesies in dit patroon worden waarschijnlijk veroorzaakt door een T-cel gemedieerde vasculitis van de kleine bloedvaten met secundaire ischemische schade van de omliggende witte stof. Patroon IV wordt geassocieerd met de primaire progressieve vorm van MS. Deze zeldzame vorm wordt getypeerd door een niet-apoptotische degeneratie van oligodendrocyten in een smalle rand van de periplaque in de witte stof. De beschadiging van deze cellen is vermoedelijk te wijten aan de verhoogde sensitiviteit van de oligodendrocyten voor inflammatoire mediators [10,11].

### **1.2 Beschermende auto-immuniteit**

Bij het ziekteproces van MS vindt er na de primaire schade aan het CZS een secundaire degeneratie van de initieel niet beschadigde neurale cellen plaats. Deze beschadiging wordt veroorzaakt door cytotoxische mediators geproduceerd in de oorspronkelijke laesies. De aanwezigheid van immuuncellen zoals macrofagen en T-cellen betrokken bij deze degeneratie werd als exclusief schadelijk beschouwd. Recente studies tonen echter ook een mogelijk beschermende rol van deze immuuncellen aan [12]. Studies van de onderzoeksgroep van *Schwartz* gaven zelfs aan dat secundaire degeneratie minder optreedt in aanwezigheid van macrofagen. De beschermende functie van autoreactieve T-cellen werd ook aangetoond bij beschadiging van de oogzenuw en het ruggenmerg van ratten. Hierbij resulteerde de toediening van *myeline basic protein* (MBP) reactieve T-cellen in de toename van de accumulatie van deze T-cellen op de plaats van beschadiging. Dit kon in vergelijking met controle dieren gecorreleerd worden met een sneller herstel van de beschadigde weefsels [13, 14]. Deze bevindingen suggereren dat de aanwezigheid van autoreactieve T-cellen in het normale T-cel repertoire intentioneel en mogelijk zelf beschermend kan zijn [15,16].

Auto-immuniteit wordt volgens dit concept gezien als een beschermend mechanisme voor het beschermen van het CZS tegen minitrauma's [17]. Bij een gedereguleerde activiteit van de auto-immune responsen kan er echter ook een auto-immune aandoening (MS) ontwikkeld worden [17, 18,19].

### 1.2.1 Productie van neurotrofines door immuuncellen

De auto-immune reacties bij MS zijn geassocieerd met pro-inflammatoire cytokines zoals TNF- $\alpha$  en IFN- $\gamma$ . Recente bevindingen tonen aan dat immuuncellen echter ook in staat zijn neurotrofe factoren te produceren. Neurotrofe factoren vormen een heterogene groep van factoren waarvan de protectieve eigenschappen op CZS cellen reeds aangetoond zijn [20]. Deze neurotrofines zouden een belangrijke rol kunnen spelen in de bescherming van het CZS tegen de pro-inflammatoire cytokines.

Historisch gezien was nerve growth factor (NGF) de eerste neurotrofische factor van de neurotrofinefamilie. De ontdekking van deze factor werd gevolgd door de identificatie van andere gerelateerde proteïnen met gelijkaardige neurotrofische functies waaronder *brain-derived growth factor* (BDNF), NT-3, NT-4 en NT-5 [21]. Een andere subfamilie van de neurotrofische factoren vormen de neuropoëtische factoren waaronder *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) en *leukemia inhibitory factor* (LIF) [22,23].

Recent werd aangetoond dat neurotrofe factoren geproduceerd kunnen worden door autoreactieve T-cellen [22]. Verder werd aangetoond dat auto-immune T-cellen neuroprotectieve factoren zoals *nerve growth factor* (NGF), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) kunnen secreteren na beschadiging van het CZS [23]. Deze T-cel gemedieerde productie van neurotrofines zou een fysiologisch, protectieve reactie tot stand te kunnen brengen via inhibitie van de neuronale destructie. Verder is bewezen dat T-cellen *in vitro* en in actief demyeliniserende MS-laesies een verhoogde productie van BDNF kunnen veroorzaken [24].

Recent werd de productie van de neuropoëtische factor, *leukemia inhibitory factor* (LIF) door myeline reactieve T-cellen en monocytten *in vitro* en in MS-laesies vastgesteld [25].

### 1.3 Neuropoëtische factoren

De IL-6 cytokines superfamilie is een grote familie van cytokines die allen via dezelfde receptor signaleren. Deze familie kan onderverdeeld worden in de neurokines en de rest van de IL-6 familie. De neurokines zijn een familie van polyfunctionele regulatoren, die een grote verscheidenheid aan functies uitvoeren op een groot aantal celtypes. Tot deze groep behoren LIF, CNTF, *cardiotrofine* (CT-1), *cardiotrofine-like cytokine* (CLC) en *oncostatin-M* (OsM).

Hoewel alle leden van de IL-6 superfamilie gebruik maken van het glycoproteïne 130 (gp130) cytokine receptor complex, binden enkel de neurokines aan het LIFR/gp130 complex al dan niet in combinatie met een derde receptor component in het complex. De binding van deze neurokines met hun respectievelijke receptor leidt tot de heterodimerisatie van gp130 en LIFR, gevolgd door de activatie van de Jak/STAT, de MAP-kinase en de IP-3 *pathway* [26].

LIF was oorspronkelijk gekarakteriseerd en gekloneerd als een differentiatie inducerende factor voor de murine leukemie M1 cellijn. Later werd het pleiotroop karakter van deze factor duidelijk. Ondertussen is LIF aangetoond een regulator van proliferatie en differentiatie te zijn in talrijke celtypen. Daarnaast blijkt LIF van belang te zijn bij de implantatie van het embryonale blastocyt. Dit werd bevestigd door een verhoogde expressie van LIF en zijn respectievelijke receptor in het endometrium van fertiele vrouwen en de verlaagde expressie bij een subgroep van infertiele vrouwen [27].

Ook speelt LIF een belangrijke rol het botmetabolisme waarbij deze de proliferatie van zowel osteoblasten als osteoclasten kan verhogen. De expansie van osteoblasten en osteoclasten leidt tot respectievelijk de vorming en de resorptie van het botweefsel [28].

### 1.3.1 LIF als neurotrofe factor

Recent werd aangetoond dat LIF naast de eerder vermelde functies ook een belangrijke functie vertoont in het CZS. Dit neuroregulatorisch cytokine blijkt op zowel neuronen als gliale cellen een invloed uit te oefenen [29]. De protectieve effecten van LIF op sensorische en motorische neuronen zijn reeds beschreven. Dit cytokine blijkt de differentiatie van neuronale precursorcellen, het behoud en de regeneratie van mature neuronen na schade aan het zenuwweefsel te bevorderen [29,30].

Het gunstig effect van LIF werd evenals bij neuronen ook bij oligodendrocyten geconstateerd. Toevoeging van LIF aan in vitro culturen van oligodendrocyten leidde tot een reductie van de TNF- $\alpha$  geïnduceerde apoptose van oligodendrocyten [25,31].

Ondanks beperkte kennis omtrent de precieze rol van LIF op astrocyten blijkt LIF de differentiatie van astrocyten te bevorderen [32]. Bovendien heeft een studie in het dierenmodel van EAE aangetoond dat LIF een protectief effect kan uitoefenen op het ziekteproces. Een dagelijkse intraveneuze toediening van LIF leidde tot een verminderde ernst van de klinische symptomen in zowel het chronisch als het acute EAE model [33]. Deze verbetering kon geassocieerd met een verhoogde oligodendrocytenoverleving en was niet gerelateerd met een reductie van de inflammatie [34].

### 1.3.2 Het werkingsmechanisme van LIF

De interactie van LIF met zijn receptorcomplex LIFR/gp130 kan afhankelijk van celtype en differentiatiestadium resulteren in de activatie van verscheidene signaalwegen: de JAK/STAT, de MAP-kinase en de PI3-kinase pathway.

#### *JAK/STAT signaalweg*

Binding van LIF aan zijn receptor zorgt voor de heterodimerisatie van de receptorsubeenheden, gp 130 en LIFR-B. Na reciproke autofosforylatie van de Janus kinases (Jak1, Jak2 en Tyk2) op het intracellulair gedeelte van de receptor worden de tyrosine residu's op het cytoplasmatisch gedeelte van het gp 130/LIFR-B-complex gefosforyleerd. De gefosforyleerde tyrosine residu's fungeren als docking sites voor de SH2-domeinen van *signal transducers and activators of transcription*-(STAT)-proteïnen. Jak katalyseert de tyrosinefosforylatie van het receptorgebonden STAT. De geactiveerde STAT proteïnen dimeriseren en verplaatsen zich vervolgens naar de nucleus waar ze aan specifieke DNA sequenties binden en zo de expressie van verschillende genen induceren.

Activatie van de JAK/STAT signaalweg zou aanleiding kunnen geven tot antia-apoptotische effecten door inductie van de SOCS genen. SOCS proteïnen inhiberen de cytokine geïnduceerde signaalwegen van de Jak/STAT pathway. Dit negatieve feedback mechanisme werd tot stand gebracht worden door de inhibitie van de Jak tyrosine kinase activiteit. De activiteit van Jak kan belemmerd worden door de binding van SOCS 1 aan de Jak kinase of de binding van SOCS 3 aan de receptorsubeenheid gp 130 [26,35,36,37].

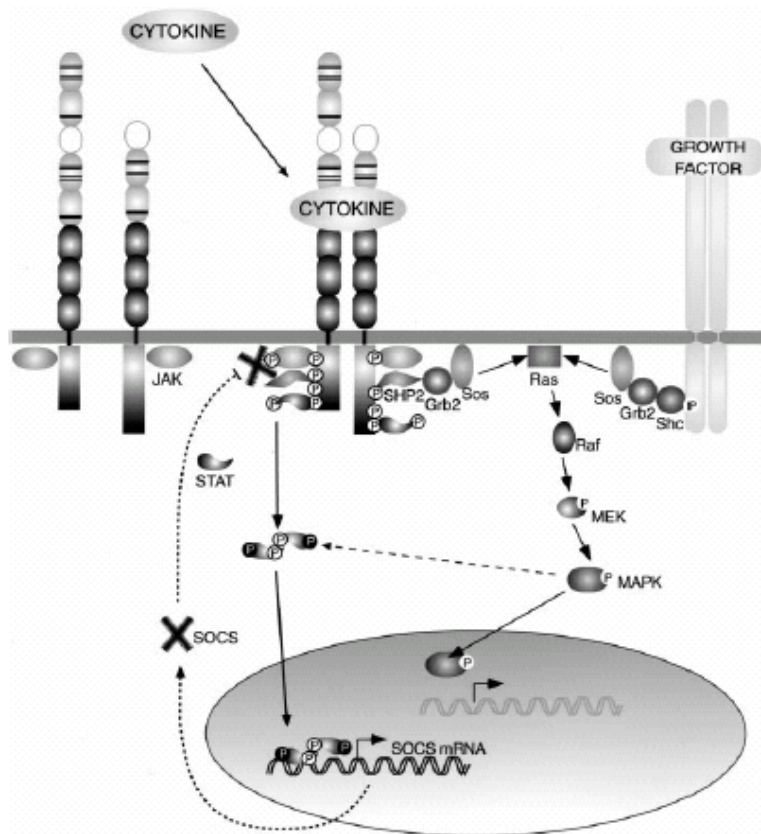
De protectie van LIF tegen de apoptose van oligodendrocyten kan echter ook teweeggebracht worden door de STAT3-geïnduceerde transcriptie van de anti-apoptotische genen, Bcl-2 en Bcl-xl [38].

### ***MAP-kinase signaalweg***

Een alternatieve signaalweg die geactiveerd kan worden na binding van LIF is de *mitogen activated protein*-(MAP)-kinase *pathway*. Deze volgt een cascade van reacties die start als er tyrosine residu's van de receptor gefosforyleerd worden en docking sites voor SHP2 vormen. Het gefosforyleerd SHP2-molecule bindt aan het adapterproteïne Grb2 dat met behulp van SOS de MAP-kinase activiteiten op gang gaat brengen. Hierbij zal de interactie van SOS met de receptorcomplex op de membraan de Ras activeren. Ras kan op zijn beurt een fosforylatiecascade van verschillende kinases induceren. Uiteindelijk zal *extracellular signal-regulated kinase*-(ERK)-1/2 geactiveerd worden. Deze kinase zal zich vervolgens naar de kern verplaatsen waar de fosforylatie van c-fos en c-jun tot stand gebracht worden. Naast de fosforylatie van deze laatste induceert ERK ook de activatie van Bcl-2. De fosforylatie van Bcl-2 leidt tot de heterodimerisatie van het apoptotisch proteïne Bax met het anti-apoptotisch molecuul Bcl-2. De vorming van dit complex kan het proapoptotisch Bax molecule neutraliseren waardoor een volledige bescherming van oligodendrocyten voor de apoptotische dood kan geleverd worden [26,36,37,39].

### ***IP3-signalweg***

De laatste mogelijke signaalweg is de IP3-kinase *pathway*. Na ligandbinding en fosforylatie van de tyrosine kinedomeinen van de receptor, worden de 2 subeenheden van het fosfatidylinositol-3-(PI3)-kinase (p85 en p110) naar het membraan getransporteerd. Hier wordt de transformatie van grote hoeveelheden van PI(4,5)P<sub>2</sub> naar PI(3,4,5)P<sub>3</sub> tot stand gebracht. Deze fosforylatie activeert het Akt/PKB kinase die vervolgens het *I-κB-kinase* (IKK) zal fosforyleren [37,40]. De activatie van IKK leidt tot de fosforylatie van IκBα die op zijn beurt anti-apoptotische factoren zoals *nuclear factor kappa* (NF-κB), Bcl-2 en Bcl-xl zal activeren. De overexpressie van Bcl-2 en Bcl-xl kan de caspase-protease cascade en de apoptose inhiberen. Hierbij kan de vrijlating van cytochroom-(cyto)-c en de activatie van caspase 3 en caspase 9 belemmerd worden [39]. Bovendien kan de LIF-geïnduceerde PI3-kinase activatie de celoverleving bevorderen door het pro-apoptotisch proteïne Bad te fosforyleren. Tengevolge van deze fosforylatie kan de binding aan Bcl-xl geblokkeerd en de inhibitie van de Bcl-xl activiteiten geëlimineerd worden [41].



**Figuur 2:** De signaaltransductiewegen, Jak/STAT en MAP-kinase geactiveerd na interactie van LIF met het receptorcomplex. De ligandbinding bij de Jak/STAT pathway veroorzaakt heterodimerisatie van de LIF-R-subeenheden, gp 130 en LIFR-B. Na activatie van de cytoplasmatische Janus kinases (Jaks), de tyrosine fosforylatie van de receptor en de cytoplasmatische STAT's verplaatsen de geactiveerde en gedimeriseerde STAT's zich naar de kern waar deze de transcriptie van verschillende genen (SOCS) activeren. Bij de MAP-kinase signaalweg zal na LIF-stimulatie SHP2 interageren met het gp 130 subeenheid en zo gefosforyleerd worden. Het geactiveerd SHP2 proteïne zal vervolgens aan het adaptermolecule Grb2 binden waarna deze via Sos en Ras de Map-kinase pathway zal medieren. Uiteindelijk zal het geactiveerde MAP-kinase proteïne de kern binnentreden waar deze de gentranscriptie zal induceren (Turnley, 2000).



### 1.4 Onderzoeksopzet

In deze stage zal het concept van de productie van neurokines door immuuncellen verder uitgediept worden. In de eerste fase zullen de autocriene effecten van LIF op immuuncellen van gezonde controles en MS-patiënten bestudeerd worden. Hierbij zal worden nagegaan of immuuncellen in het bezit zijn van LIF-receptoren. Verder zal de invloed van LIF op de proliferatie, de cytokineproductie en de apoptosegevoeligheid van immuuncellen bepaald worden. In een latere fase zullen factoren onderzocht worden die mogelijk betrokken zijn bij de regulatie van de LIF productie door de T-cellen. Hiervoor zullen T-cellen behandeld worden met IFN- $\beta$ , Leptine, Simvastatine en Luteoline. Bovendien zal met behulp van ELISA onderzocht worden of de productie van LIF kan gecorreleerd worden met een specifiek T<sub>H</sub>-fenotype.

De identificatie van factoren die de lokale productie van LIF door immuuncellen zou ons de mogelijkheid geven meer inzicht te verwerven in de modulatie van het immuunsysteem om zo nieuwe en meer specifieke therapieën te ontwikkelen.

## **2 Materialen en methoden**

### **2.1 Celkweek**

#### **2.1.1 Celisolaties**

##### ***Isolatie van PBMC's***

Perifere mononucleaire cellen (PBMC's) werden geïsoleerd uit humaan perifere bloed, door gebruik te maken van de dichtheitsgradiënt centrifugatie (HistoPaque, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). De bekomen cellen werden gewassen met RPMI 1640 en geresuspendeerd in kweekmedium (KM; RPMI 1640, 0,5% penicillin/streptomycin-oplossing ([penicillin]  $10^5$  IU/ml, [streptomycin]  $10^5$  µg/ml), met 10% foetaal kalfsserum (FCS; Hyclone, Logan, Utah), 0,1% pyruvaat en 0,1% niet-essentiële aminozuren).

##### ***Isolatie van Monocyten***

Om monocyten vanuit de perifere mononucleaire celpopulatie te isoleren werd gebruik gemaakt van de negatieve monocyt isolatie kit (DynaL Biotech ASA, Oslo, Norway). Deze isolatie begon met de toevoeging van een antilichamenmix (CD2, CD7, CD16, CD19, CD56, CD235a) gericht tegen ongewenste cellen waaronder de T-, B- en NK-cellen, de rode bloedcellen en granulocyten. Dit werd gevolgd door de additie van superparamagnetische Dynabeads die een verbinding vormen met antilichamen die reeds gekoppeld zijn aan de ongewenste cellen. Om uiteindelijk een zuivere populatie van monocyten uit de PBMC's te bekomen werd met behulp van een magneet de magnetisch gelabelde ongewenste cellen geïsoleerd.

##### ***Kweek van PHA-blasten***

PHA blasten werden bekomen door PBMC's te stimuleren met IL-2 (5 U/ml) en PHA (Phycohemaglutanine) gedurende minimaal 5 dagen. De gestimuleerde cellen werden aan een celdensiteit van  $5 \times 10^6$  cellen per 10 ml KM per kweekfles uitverdeeld en in kweek gebracht bij 37° C en 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.1.2 Stimulatie van immuuncellen**

Alle immuuncellen werden in kweek gebracht in KM en uitverdeeld aan een dichtheid van  $1 \cdot 10^5$  cellen per well, uitgezonderd monocyten die uitgezaaid werden aan een celdensiteit van  $5 \cdot 10^4$  cellen per well hadden. Deze cellen werden gestimuleerd met LIF [1, 15, 50, 100 ng/ml] (Immunologicalsdirect, Oxford, UK), IFN-β [1, 10,  $10^2$ ,  $10^3$  units/ml] (Immunosource, Halle,

België), leptine [0.1, 1, 10, 10<sup>2</sup> nM] (Peprotech, Rocky Hill, US), luteoline [0.1, 1, 5, 15, 50 µM] en simvastatine [50 nM, 250 nM, 1 µM, 10 µM] (Calbiochem, Darmstadt, Germany) al dan niet in combinatie met antilichaam tegen CD3 (anti-CD3; 2 µg/ml). De activatie van monocyten gebeurde onder dezelfde condities behalve in combinatie met LPS als stimulus (Lipopolysaccharide; 5 mg/ml; Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### **2.2 Proliferatieassay**

De geïsoleerde PBMC's van willekeurig gekozen gezonde controles (HC) en onbehandelde MS-patiënten werden gedurende 4 dagen in aanwezigheid van KM in 96-well platen met ronde bodem (Nunc, Roskilde, Denemarken) in cultuur gebracht. Na 72 uren incubatieperiode werd het supernatans geoogst voor de cytokine bepaling en werd gedurende de laatste 16 uren de cellen gepulst met 1µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidine (Amersham, buckinghamshire, UK). Vervolgens werden de cellen geoogst met een automatische cel harvester (Pharmacia, Uppsala, Zweden). De ingebouwde radioactiviteit werd gemeten met een Beta scintillatie teller (Wallac, Turku, Finland) en uitgedrukt in counts per minute (CPM).

De proliferatie werd relatief uitgezet ten opzichte van de anti-CD3 condities door gebruik te maken van de onderstaande formule:

$$\text{Relatieve Proliferatie (\%)} = \frac{\text{CPM}_{\text{testconditie}}}{\text{CPM}_{\text{anti-CD3 conditie}}} \times 100$$

Voor elke stimulus werd deze relatieve proliferatie bepaald voor verschillende personen. De gemiddelde relatieve proliferatie werd in grafiek uitgezet.

Voor de analyse van de bekomen resultaten werd de *Wilcoxon signed-rank test* gebruikt. Deze niet parametrische test vergelijkt de mediaan van een reeks data met een hypothetische waarde in een betrouwbaarheidsinterval van 0,05. In dit geval neemt de hypothetische waarde de relatieve waarde van anti-CD3 namelijk 100 aan.

De verschillen tussen de mediaan van de bekomen data en 100 worden significant genoemd als  $p < 0,05$ .

### **2.3 Toxiciteitstest: Evaluatie van de apoptose**

Om te evalueren of de gebruikte kandidaatstimuli toxische effecten hebben werden de gestimuleerde cellen gedurende 48, 72, 96 uren bij 37° C en 5% CO<sub>2</sub> in kweek gebracht. Voordat de cellen gekleurd werden, werden ze gepreïncubeerd met het antilichaam gericht tegen de Fc receptoren op monocyten. Vervolgens werden aan de cellen Annexine V-FITC (Bender Med Systems) opgelost in bindingsbuffer toegevoegd die gedurende 30 minuten bij 4° C geïncubeerd werden. Tot slot werden de met bindingsbuffer gewassen cellen opgelost in FACS-buffer en gedurende 30 minuten bij 4°C geïncubeerd met *7-amino-actinomycin D* (7-AAD) en de antilichamen gericht tegen CD3 of CD4. De niet gestimuleerde cellen in KM of de met anti-CD3 geactiveerde cellen zonder de stimuli werden als negatieve controle gebruikt. Als positieve controle werden de PBMC's gedurende 12 uren met Staurosporine [500 nM] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) behandeld. Uiteindelijk werden de gelabelde en gewassen cellen na resuspensie in de bindings- en FACS-buffer geanalyseerd met de *flow cytometer* (BD Biosciences, Erembodegem, België).

### **2.4 MTT-viabiliteitsassay voor monocyten**

Voor de analyse van de effecten van stimuli op de viabiliteit van monocyten werd gebruik gemaakt van de MTT-assay. Deze cellen werden eerst behandeld met MTT (10%; Sigma) waarna ze gedurende 4 uren bij 5% CO<sub>2</sub> en 37°C geïncubeerd werden. Bij deze incubatiefase wordt MTT opgenomen en door metabole actieve cellen gereduceerd tot onoplosbare formazankristallen. Aangezien deze producten onder kristalvorm niet te meten zijn werden deze door toevoeging van een suspensie van DMSO en glycine opgelost. Uiteindelijk werd de optische densiteit (OD) bij 450 nm gemeten met behulp van een ELISA reader (ICN Biomedicals, Asse, Belgium).

### **2.5 Analyse van het cytokineprofiel**

De cytokineproductie (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10) in de T-celculturen werd onderzocht door gebruik te maken van een sandwich ELISA. Hierbij werd gebruik gemaakt van 96 well ELISA platen (MaxiSorp, Nunc). De wells werden overnacht gecoat bij 4°C met het capture antilichaam (Cytosets, Biosource Europe, Nivelles, België). Niet specifieke bindingsplaatsen werden geblokkeerd met 0,5% bovine serum albumine (BSA, US Biological, Swampscott, USA) in coatingsbuffer. Vervolgens werd, na het wassen van de platen met wasbuffer (0,9% NaCl en 0,1% Tween-20), het staal of serieel verdunde standaard oplossing gedurende 2 uren

## Materialen en methoden

---

op kamertemperatuur geïncubeerd met het overeenkomstig biotine gelabeld detectie antilichaam (Cytosets, Biosource Europe, Nivelles, België) en verdunningsbuffer. Vervolgens werden de platen 4 maal gewassen en gedurende 30 minuten geïncubeerd met streptavidine-geconjugeerd *horse radish peroxidase* (HRP; Jackson immunoresearch Labs, West Grove, PA). Een kleurreactie werd tot stand gebracht door gebruik te maken van een TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> citraat buffer als substraat. Bij voldoende kleuring werd de enzymatische reactie gestopt door gebruik te maken van 1,8N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De optische dichtheid werd gemeten bij 450 nm met behulp van een ELISA-reader (ICN Biomedicals, Asse, België). De cytokineconcentraties werden berekend met behulp van de standaardcurves, gebaseerd op een seriële verdunningsreeks van gekende cytokine concentraties.

Voor de bepaling van LIF in het supernatans werd gebruik gemaakt van een commercieel beschikbare LIF ELISA kit (Bender medsystems, San Bruno, USA). Bij deze ELISA werd voor het verdunnen van het coatingsantilichaam PBS gebruikt in plaats van de coatingsbuffer. Ook werd het biotine geconjugeerd antilichaam niet gelijktijdig met de standaardreeks en de stalen geïncubeerd. Deze werd pas na de incubatiefase van de standaardreeks en de stalen gedurende een uur op kamertemperatuur geïncubeerd. Bij de volgende stappen werd zoals bij de klassieke ELISA na toevoeging van het HRP-enzyme de kleurreactie gestopt en gemeten bij 450 nm. De cytokineconcentratie werd weer op dezelfde manier berekend.

De cytokinesecretie werd relatief uitgezet ten opzichte van de anti-CD3 condities door gebruik te maken van de onderstaande formule:

$$\text{Relatieve [cytokine] (\%)} = \frac{[\text{cytokine}]_{\text{testconditie}} - [\text{cytokine}]_{\text{KM}}}{[\text{cytokine}]_{\text{anti-CD3 conditie}} - [\text{cytokine}]_{\text{KM}}} \times 100$$

Voor elke stimulus werd de cytokinesecretie bepaald voor n personen. De gemiddelde relatieve hoeveelheid van elk specifiek cytokine werd in grafiek uitgezet.

Voor de analyse van de bekomen resultaten werd de *Wilcoxon signed-rank test* gebruikt. Deze niet parametrische test vergelijkt de mediaan van een reeks data met een hypothetische waarde in een betrouwbaarheidsinterval van 0,05. In dit geval neemt de hypothetische waarde de relatieve waarde van anti-CD3 namelijk 100 aan.

### **2.6 Flow cytometrische analyse van de receptorexpressie**

De detectie van de aanwezigheid van de LIF-receptor subeenheden op immune cellen werd uitgevoerd met behulp van de *fluorescence activated cell sorter*-(FACS)-analyse.

De te analyseren cellen werden geresuspendeerd in FACS buffer (fosfaat gebufferde zoutoplossing met 1% FCS en 0,1% Na-azide). Vervolgens werden de Fc receptoren op monocyten geblokkeerd door de PBMC's te preincuberen met een Fc receptor blokker (aCD32, Stem Cell Technologies) gedurende 30 minuten bij 4°C.

De expressie van de LIFR-subunits werd nagegaan door middel van het muis monoklonaal antilichaam gericht tegen gp130. Om na te gaan welke cellen deze receptorsubunit tot expressie brengen werd een secundaire kleuring uitgevoerd met antilichamen gericht tegen CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD25 en CD56. De isotype (IgG $\gamma$ 1-FITC/IgG $\gamma$ 2) werd als controle gebruikt. De vermelde monoklonale antilichamen zijn fluorescent gemerkt [fluoresceïne isothiocyanate (FITC), phycoerythine (PE) of peridine chlorofyl-a proteïne (PERCP), (BD Biosciences)].

Naast immuuncellen werden de aanwezigheid van de LIF-receptor-subcomponenten ook op neurale cellen onderzocht. Hierbij werden de uit rattenhersenen geïsoleerde astrocyten en oligodendrocyten geïncubeerd met CD130. De controlestalen werden niet gelabeld (KM) of geïncubeerd met de isotype (IgG  $\gamma$ 1- FITC/IgG $\gamma$ 2-PE).

De gekleurde cellen werden gewassen in FACS-buffer (1 x PBS, 5% FCS en 0.1% Na-azide) waarna ze geanalyseerd werden met een FACS Calibur *flow cytometer* (BD Biosciences, Erembodegem, België).

### **2.7 Intracellulaire FACS**

Voor de intracellulaire FACS-kleuring van de LIF-receptorsubeenheid (LIFR- $\beta$ ) werden de met FACS-buffer gewassen PBMC's gefixeerd en gepermealiseerd met Cytifix/Cytoperm (BD Pharmingen biosciences, Erembodegem, België). Dit werd gevolgd door een aantal wasstappen met Perm/Wash buffer (BD Biosciences, Erembodegem, België). Na deze wasstappen werden de cellen geïncubeerd met de antilichamen gericht tegen CD 190 (LIFR- $\beta$ ; Santa, Cruz Technology, Santa Cruz, USA). Om de aanwezigheid van deze subeenheid op T-cellen te identificeren werd een secundaire kleuring met het antilichaam tegen CD 3 uitgevoerd. Als controle werd de isotype (Ig  $\gamma$ 1-FITC/Ig $\gamma$ 2) gebruikt. De fluorescenties van de specifiek gelabelde componenten werden afgelezen met behulp van een *flow cytometer* (FACS Calibur, BD Biosciences, Erembodegem, België).

### 3. Resultaten

#### **3.1 Effecten van LIF op immuuncellen**

Om de effecten van LIF op de PBMC-populatie nader te bestuderen werd eerst het effect van LIF op de viabiliteit van van PBMC's nagegaan. Verder werd de invloed van LIF op de proliferatie van en cytokinesecretie door PBMC's achterhaald.

##### **3.1.1 Toxische effecten van LIF**

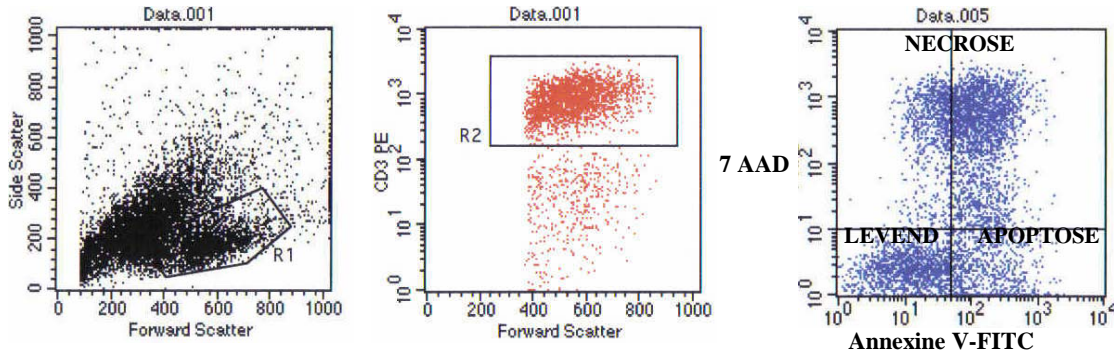
Om na te gaan of LIF toxisch is voor T-cellen werden geïsoleerde PBMC's behandeld met verschillende concentraties van LIF (1, 15, 50, 100 ng/ml). Na 24, 48 of 72 uren incubatie werden deze cellen gekleurd met Annexine V-FITC, 7-AAD en het antilichaam gericht tegen CD3. De fluorescent gelabelde cellen werden vervolgens geanalyseerd met behulp van de flow cytometrie.

##### ***Optimalisatie van de CD3PE, Annexine V-FITC en 7-AAD kleuring***

*Figuur 3* geeft de optimalisatie van de gate settings voor de viabiliteitskleuring van de cellen die behandeld zijn met de positieve controle, Staurosporine (500 nM) weer. Om lymfocyten te onderscheiden van andere mononucleaire cellen werd een lymfocytengate (R1) gemaakt op basis van *forward* en *side light scatter* gegevens (*Figuur 3A*). Om T-lymfocyten binnen de lymfocytenfractie te bekijken werd met behulp van een tweede gate (R2) een CD3-PE-positieve selectie gemaakt. Dit is terug te vinden in *figuur 3B*. *Figuur 3C* geeft het resultaat van de Annexine V-FITC/7-AAD-kleuring voor CD3<sup>+</sup> cellen.

Levende cellen (cellen met asymmetrische verdeling van de fosfatidyl serine) zijn terug te vinden in het onderste kwadrant links. Necrotische cellen hebben een gepermeabiliseerd membraan waardoor deze positief kleuren voor 7-AAD. Deze cellen zijn in de bovenste twee kwadranten te zien. Apoptotische cellen zijn intacte cellen met een symmetrische fosfolipidenverdeling en zijn terug te vinden in het onderste rechter kwadrant.

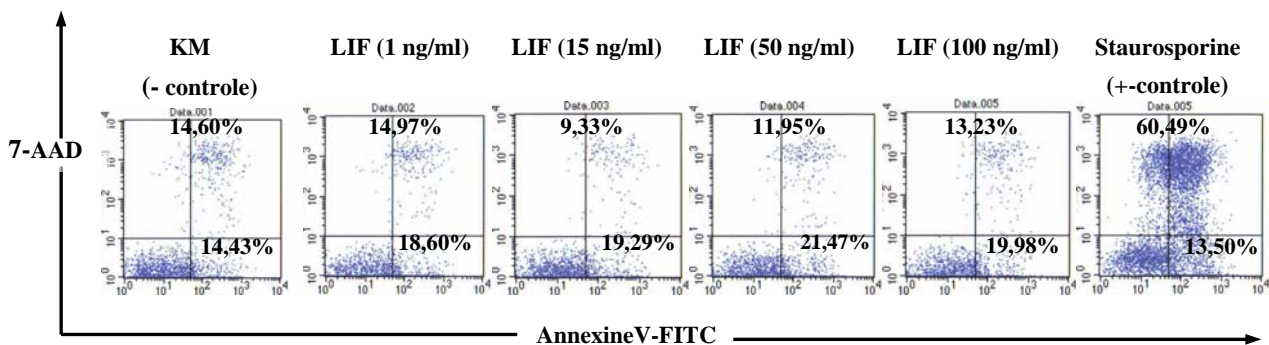
## Resultaten



**Figuur 3:** Optimalisatie van de CD3PE, Annexine V-FITC en 7-AAD kleuring. Gate R1 geeft de lymfocytenfractie van de PBMC's weer. De T-lymfocyten zijn te vinden in gate R2. De Annexine/7-AAD kleuring van de CD3<sup>+</sup> T-lymfocyten na behandeling met Staurosporine (500 nM; positieve controle).

### *Effecten van LIF op de viabiliteit van T-cellen*

Voor de bepaling van het effect van LIF op de viabiliteit van T-cellen werd door middel van de hoger beschreven dubbele gate (Gate R2; Figuur 3B) het aantal necrotische en apoptotische cellen na 3 dagen incubatie bepaald. De apoptotische cellen voor elke LIF concentratie worden in de onderste rechter kwadranten van *figuur 4* weergegeven. Het aantal necrotische cellen zijn in de linker en rechter boven kwadranten te zien. De cellen die niet behandeld werden met LIF (KM) werden als de negatieve controle gebruikt. De cellen die behandeld werden met het apoptose-inducerende Staurosporine (500 nM) zijn de positieve controle. Deze werd als de positieve controle aangenomen. Het aantal dode cellen na behandeling met LIF is 29.03%, 33.57%, 28.62%, 33,42%, 33.21% en 73.99% voor KM, LIF (1 ng/ml), LIF (15 ng/ml), LIF (50 ng/ml), LIF (100 ng/ml) en Staurosporine (positieve controle) respectievelijk. Deze data bewijzen dat LIF geen toxisch effect heeft op T-cellen.



**Figuur 4:** Flowcytometrische analyse van de effecten van LIF op de apoptose van immuuncellen. De verschillende concentraties van LIF blijken na 3 dagen incubatie geen toxisch effect te veroorzaken op PBMC's.



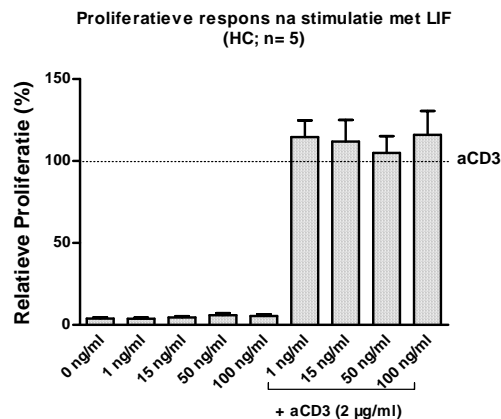
### 3.1.2 Effecten van LIF op de proliferatie

Om na te gaan of LIF de proliferatie van T-cellen doet toenemen, werden van 4 gezonde controles PBMC's geïsoleerd. Deze werden uitgezaaid aan  $1.10^5$  cellen per well en gedurende 3 dagen gestimuleerd met verschillende concentraties van LIF (1, 15, 50, 100 ng/ml). Om de invloed van LIF op de aCD3 (2  $\mu$ g/ml) geïnduceerde proliferatie te achterhalen werden aCD3 behandelde PBMC's ook behandeld met verschillende LIF concentraties.

Na 3 dagen incubatie werd de proliferatie voor elke cultuur in 6 wells nagegaan met behulp van een klassieke thymidine incorporatie assay (zie 2.2 Proliferatieassay).

De relatieve proliferatie werd voor elke concentratie van LIF in aan- of afwezigheid van aCD3 berekend door de gemiddelde cpm van de 6 welltjes van elke conditie eerst te delen door de gemiddelde cpm van de 6 welltjes van de ongestimuleerde conditie en dan de bekomen data te normaliseren naar anti CD3 (100%). Deze is weergegeven als een stippellijn. In *figuur 5* is de gemiddelde relatieve proliferatie voor elke concentratie van LIF van 5 gezonde controles uitgezet. Uit deze figuur blijkt dat LIF bij 100 ng/ml nauwelijks een proliferatieve respons (17%) veroorzaakt bij ongestimuleerde cellen.

Ook blijkt LIF geen invloed te hebben op de aCD3 geïnduceerde proliferatie hetgeen bewezen wordt door de niet significante verschillen tussen de relatieve proliferatie bij PBMC's behandeld met aCD3 en PBMC's behandeld met zowel aCD3 als LIF.

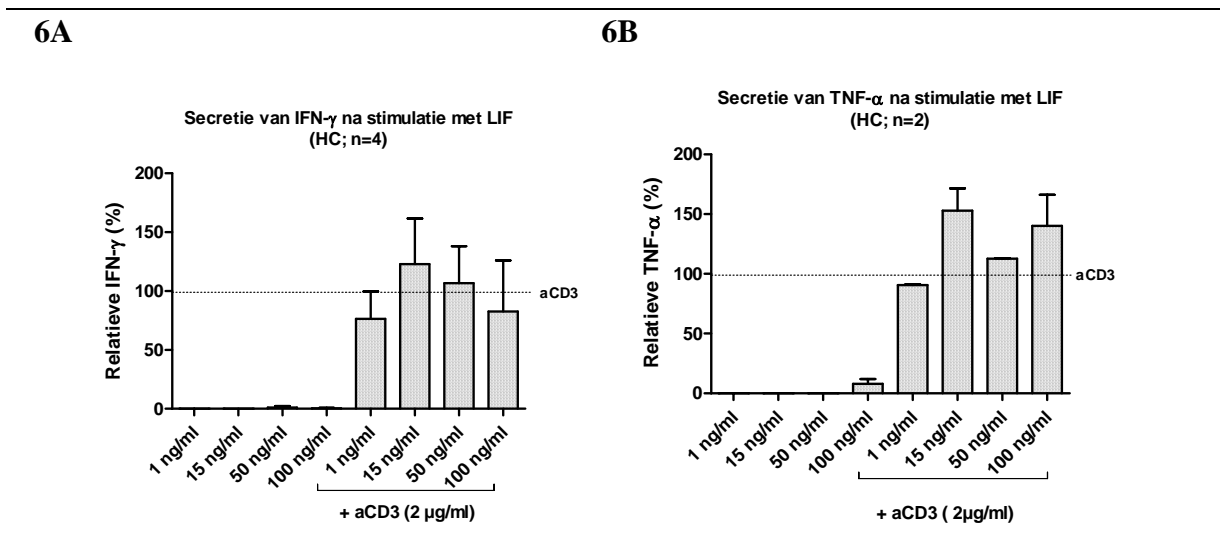


**Figuur 5:** Effect van LIF op de proliferatie van PBMC's van gezonde controles (n=5). Stimulatie index werd voor elke conditie relatief uitgezet tegenover de anti CD3-conditie. De proliferatie bij aCD3 wordt weergegeven als een stippellijn.

### 3.1.3 Effecten van LIF op de cytokinesecretie van PBMC's

Parallel met de proliferatiecapaciteit werd ook de cytokinesecretie van PBMC's na stimulatie met verschillende concentraties van LIF bepaald. Hiervoor werd gebruik gemaakt van commercieel beschikbare antilichaamparen specifiek voor IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 en IL-10 waarmee een sandwich ELISA werd uitgevoerd (zie 2.5). Omdat de cytokinesecretie donorafhankelijk was werd deze relatief ten opzichte van de cytokinesecretie van de aCD3 conditie uitgedrukt. De cytokinesecretie van de aCD3 conditie (100%) wordt in *figuur 6* weergegeven als een stippellijn.

Vanuit *figuur 6A* en *6B* kan waargenomen worden dat de verschillende LIF-concentraties geen invloed heeft op de secretie van IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  ( $p > 0.05$ , *Wilcoxon rank-signed test*). Ook voor IL-10 werden er geen significante verschillen gedetecteerd (data niet getoond). Omdat de IL-4 secretie zich na stimulatie met LIF onder de detectielimiet bevindt zijn deze resultaten niet weergegeven.



**Figuur 6:** De cytokinesecretie na stimulatie met verschillende concentraties van LIF. (A) (B) LIF blijkt geen doorslaggevend effect te hebben op de secretie van IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  door PBMC's van de gezonde controles.

### 3.1.4 Expressie van de LIF-receptor subeenheden op immuuncellen

Om de effecten van exogeen LIF op het immuunsysteem te bestuderen werd de aanwezigheid van een functionele LIF-receptor op immuuncellen van verschillende donoren onderzocht. Hiervoor werd met specifieke antilichamen gericht tegen de 2 receptorsubeenheden (gp 130 en LIFR- $\beta$ ) en met celspecifieke antilichamen (CD3, CD4, CD8, CD20, CD56) een kleuring uitgevoerd die geanalyseerd werd met behulp van de flow cytometrie (zie 2.6).

## Resultaten

Tabel 1 toont aan dat PBMC's voor 40-65% in het bezit zijn van gp 130. Bij analyse van subpopulaties van PBMC's werd gp 130 voornamelijk op T-lymfocyten (65%) en monocyten (90-95%) en in mindere mate bij B-cellen (3%) teruggevonden. Wanneer PBMC's gedurende 3 dagen behandeld werden met PHA werd echter nog maar op 17% van de T-cellen gp 130 gedetecteerd. De gp 130-expressie door T-cellen daalt bij activatie want van de geactiveerde (CD25<sup>+</sup>) cellen is maar 6% gp 130 positief (data niet getoond).

Om over een functionele LIF-receptor te beschikken moet naast gp130 ook LIFR- $\beta$  aanwezig zijn op de celmembraan. Deze receptorsubeenheid komt voor op monocyten (88%), NK- (50%) en B-cellen (15%). Een erg klein percentage van de T-lymfocyten is LIFR- $\beta$  positief (3%).

**Tabel 1:** Bepaling van de expressie van gp 130 en LIFR- $\beta$  op immuuncellen via flowcytometrie.

	Gp 130 (%)	LIFR- $\beta$ (%)
<b>PBMC</b>	40-65	22
<b>T-cellen</b>	65	3
<b>CD4</b>	70	2
<b>CD8</b>	40	5
<b>Monocyten</b>	90-95	88
<b>B-cellen</b>	3	15
<b>NK-cellen</b>	0	50

### *3.2 Studie van kandidaatstimuli die de secretie van LIF door immuuncellen reguleren*

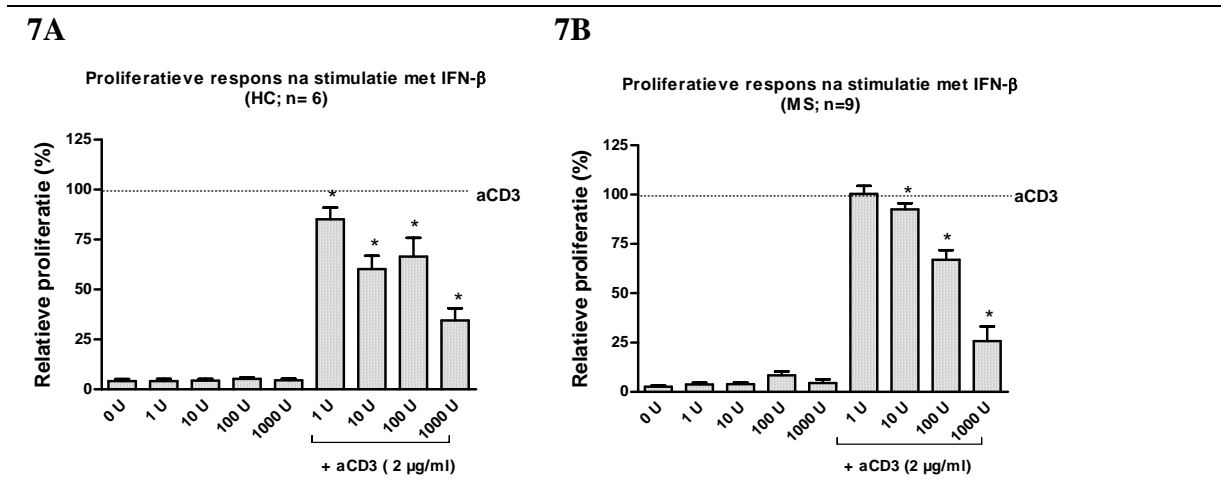
Aangezien er reeds neuroprotectieve effecten van LIF aangetoond zijn kan dit van therapeutisch belang zijn bij auto-immune aandoeningen. Om de regulatie van de secretie van dit protectief cytokine nader te achterhalen werden PBMC's en monocyten behandeld met verschillende stimuli waaronder IFN- $\beta$ , Leptine, Luteoline, Simvastatine en Retinoïnezuur. Via de immunomodulatoire effecten van deze stimuli werd nagegegaan of LIF te correleren is met een specifiek T<sub>H</sub>-fenotype.

### 3.2.1 Effecten van IFN- $\beta$

#### *Effecten op PBMC's*

Om de regulatie van de secretie van LIF na incubatie met IFN- $\beta$  na te gaan werden PBMC's geïsoleerd van 6 gezonde controles en 7 onbehandelde MS-patiënten uitgeplaat aan een dichtheid van  $1.10^5$  cellen per well en werden deze cellen behandeld met verschillende concentraties van IFN- $\beta$  (0, 1, 10,  $1.10^2$ ,  $1.10^3$  U) al dan niet in combinatie met anti-CD3 (2  $\mu\text{g/ml}$ ). Na een incubatie van 3 dagen werd het supernatans geoogst en werd op de cellen een proliferatie assay (zie 2.2 Proliferatieassay) uitgevoerd.

De proliferatie van PBMC's van de gezonde controles (n=6) en MS-patiënten (n=9) na incubatie met IFN- $\beta$  kan teruggevonden worden in *figuur 7*. Deze figuur toont aan dat toenemende concentraties van IFN- $\beta$  de proliferatie van anti CD3 gestimuleerde PBMC's inhibeert. Significante dosisafhankelijke verschillen werden voor de gezonde controles en MS-patiënten reeds bij 10 U geobserveerd. Bij de gezonde controles vertoont de hoogste concentratie van IFN- $\beta$  (1000 U) een remming met 65% (p= 0.0156) op de proliferatie (**7A**). Voor de PBMC's van MS-patiënten blijkt deze IFN- $\beta$  concentratie een inhibitie van 74% te veroorzaken (p= 0.01) (**7B**).



**Figuur 7:** Het effect van IFN- $\beta$  op de proliferatie van PBMC's van de gezonde controles en MS-patiënten. **(A)** **(B)** Een toename in de concentratie van IFN- $\beta$  leidt tot de inhibitie van de proliferatie van PBMC's van de gezonde controles en MS-patiënten. \* = p-waarde < 0,05; \*\* = p-waarde < 0,01 voor aCD3 gestimuleerde PBMC's.

## Resultaten

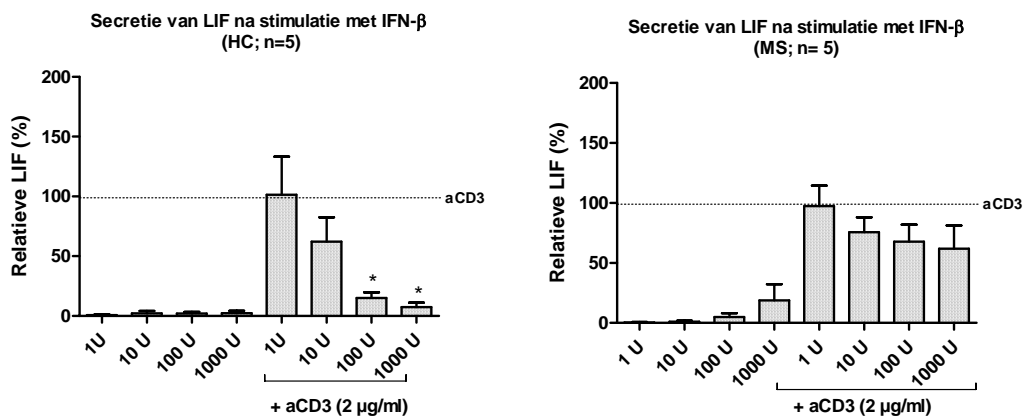
Om de cytokinesecretie te kunnen correleren met de proliferatie (en dus onrechtsreeks ook het celtaantal) werd de cytokinesecretie (LIF, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) geëvalueerd in supernatans dat afgenomen is bij de proliferatietest.

*Figuur 8A* toont aan dat IFN- $\beta$  met een toenemende concentratie de secretie van LIF onderdrukt bij de anti-CD3 gestimuleerde PBMC's van gezonde controles (n=5) en MS-patiënten (n=5). Het onderdrukkend vermogen van de hoogste concentratie van IFN- $\beta$  (1000 U) op de LIF secretie bedraagt bij de gezonde controles 93% (p= 0,0156). Ook bij de PBMC's van de MS-patiënten daalt de LIF secretie maar deze is eerder klein en bedraagt 38% (p> 0,05). Opmerkelijk is de dosisafhankelijke verhoging in de IL-10 secretie wanneer niet gestimuleerde PBMC's van de gezonde controles behandeld werden met IFN- $\beta$  (*Figuur 8B*).

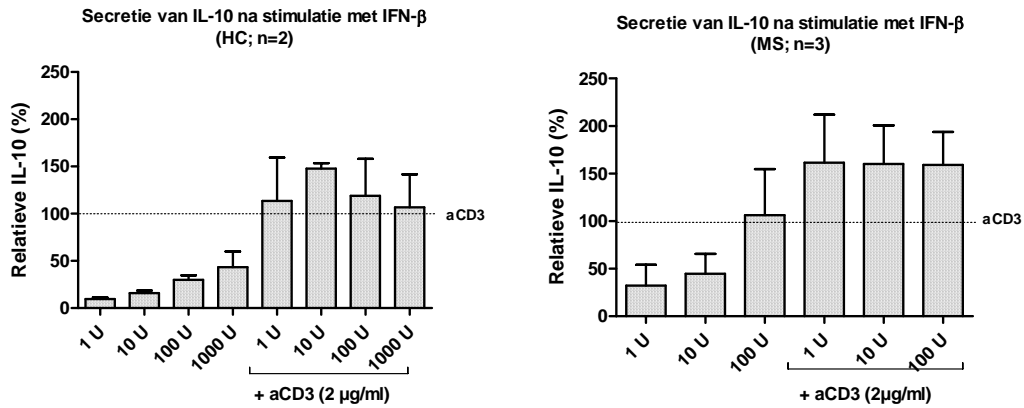
De IL-10 secretie bij MS-patiënten blijkt geen duidelijk effect van IFN- $\beta$  te ondergaan. Zoals te zien in *figuur 8C* en *8D* vertonen de pro-inflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  een soortgelijk patroon. Voor beide cytokines werd wanneer de anti CD3 gestimuleerde condities behandeld werden met toenemende concentraties van IFN- $\beta$  een dosisafhankelijke reductie waargenomen.

De onderdrukking van de IFN- $\gamma$  secretie door PBMC's gestimuleerd met anti CD3 bedraagt 52% voor de gezonde controles terwijl dit procentueel verschil bij MS-patiënten 46% is. De TNF- $\alpha$ -secretie door PBMC's gestimuleerd met anti CD3 bij de gezonde controles werd bij een IFN- $\beta$ -concentratie van 1000 U met 56% geïnhibeerd. Bij MS-patiënten werd een reductie van 73% geobserveerd bij stimulatie met een IFN- $\beta$ -concentratie van 100 U.

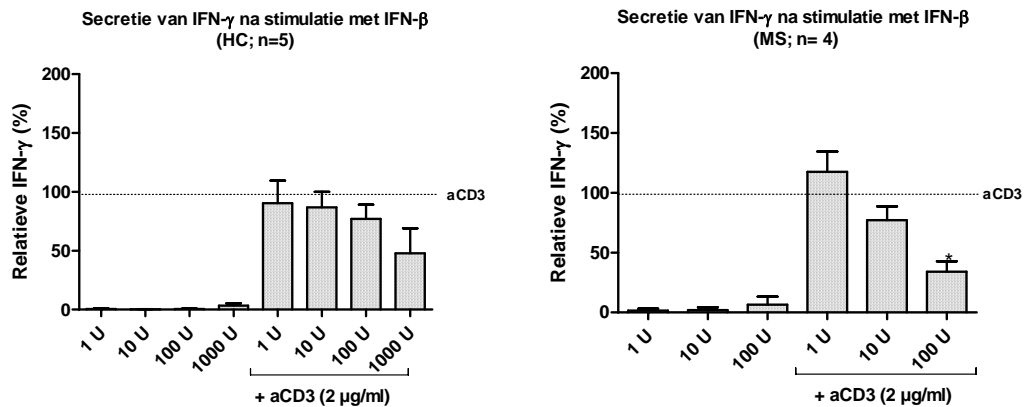
### 8A



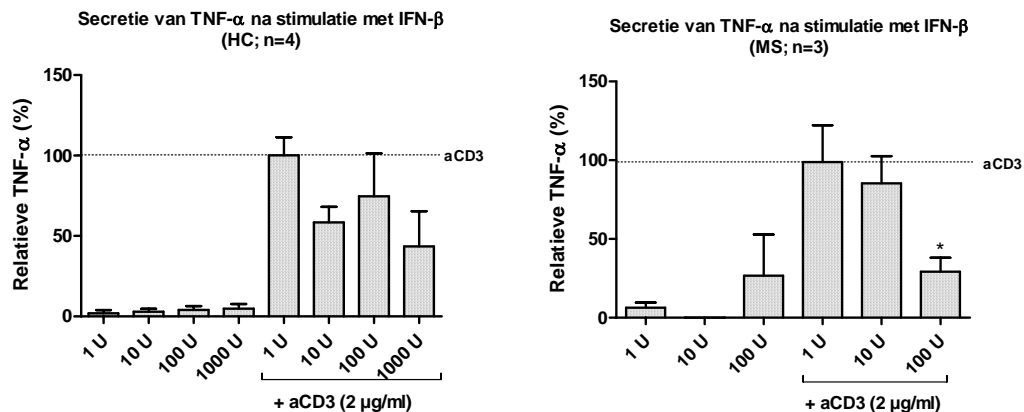
8B



8C



8D



**Figuur 8:** Het effect van IFN- $\beta$  op de secretie van (A) LIF, (B) IL-10, (C) IFN- $\gamma$  en (D) TNF- $\alpha$  door PBMC's van de gezonde controles en MS-patiënten. De secretie van IL-4 wordt niet weergegeven omdat de secretie van dit cytokine zich onder de detectielimiet bevindt. \*= p-waarde < 0,05; \*\*= p-waarde < 0,01 voor aCD3 gestimuleerde PBMC's.

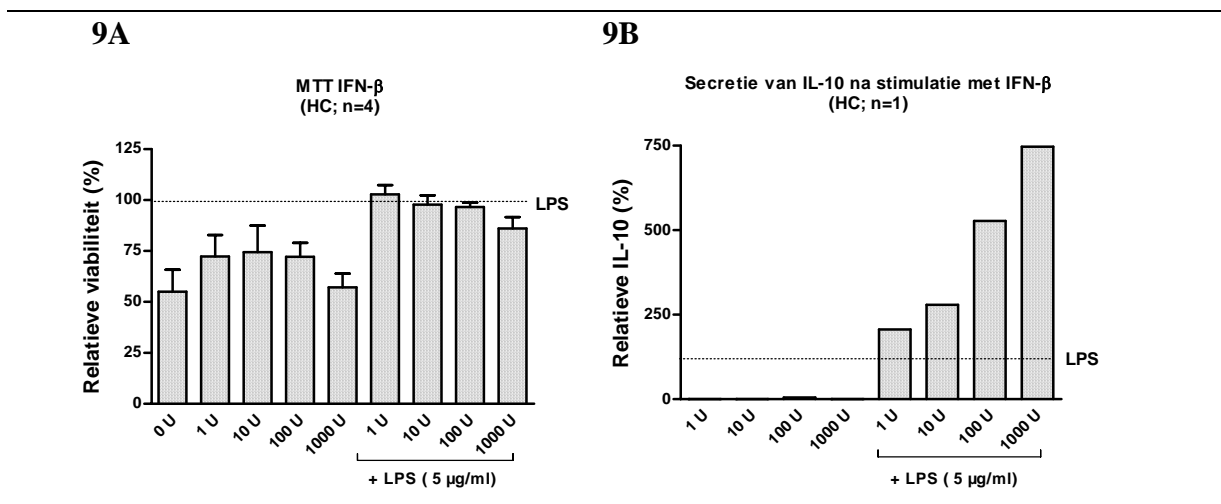
### Effecten op monocytten

Om de regulatie van de LIF secretie door monocytten te achterhalen werd eerst het effect van IFN- $\beta$  op de viabiliteit van monocytten nagegaan. Hiervoor werden PBMC's van 4 gezonde controles geïsoleerd waaruit dan vervolgens via de negatieve selectie de monocytten afgezonderd werden. Deze werden uitgezaaid aan  $5 \cdot 10^4$  cellen per well en gedurende 3 dagen gestimuleerd met verschillende IFN- $\beta$  concentraties (0, 1, 10, 100, 1000 U) al dan niet in combinatie met LPS (5 mg/ml). Na toevoeging van MTT en incubatie van 4 uren werden de gevormde formazanproducten opgelost en gemeten bij 450 nm met een ELISA-reader.

De bekomen data werden na normalisatie naar LPS (100%) uitgedrukt als de relatieve viabiliteit. Deze worden weergegeven in *figuur 9*. Uit deze figuur blijkt dat IFN- $\beta$  tot een kleine inhibitie van de viabiliteit van monocytten leidt. Deze inhibitie blijkt met de hoogste concentratie van IFN- $\beta$  (1000 U) bij monocytten gestimuleerd met LPS een verlaging van 14% te veroorzaken.

Bij analyse van de cytokinesecretie is duidelijk dat IFN- $\beta$  de secretie van IL-10 verhoogt (Figuur 9B). Deze dosisafhankelijke upregulatie van de secretie van IL-10 blijkt bij de hoogste concentratie van IFN- $\beta$  (1000 U) een waarde van 647% aan te nemen.

Bij rustende monocytten wordt geen dosisafhankelijke stijging in de IL-10 secretie gezien.



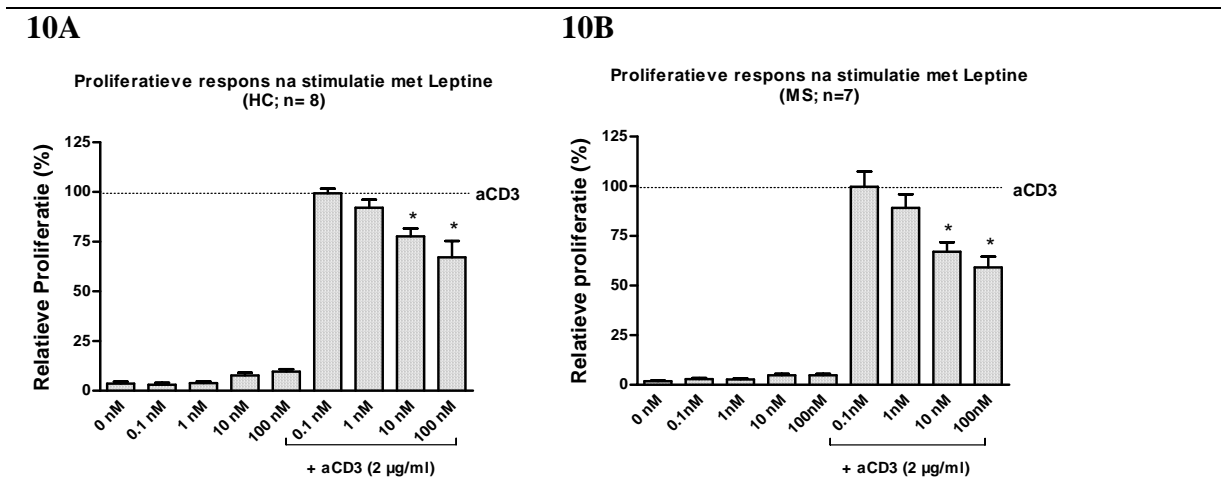
**Figuur 9:** De invloed van IFN- $\beta$  op de (A) viabiliteit en (B) IL-10 secretie van monocytten.

3.2.2 Effecten van Leptine

Effecten op PBMC's

Om het effect van leptine op de proliferatie van PBMC's van de gezonde controles (n= 8) en MS-patiënten (n=7) te achterhalen werd zoals bij IFN-β de PBMC's geïsoleerd en gestimuleerd met verschillende leptineconcentraties (0.1, 1, 10, 100 nM).

De invloed van leptine op deze PBMC's wordt weergegeven in *figuur 10*. Deze figuur toont dat behandeling met leptine tot een dosisafhankelijke reductie in de proliferatie van PBMC's van alle personen leidt. Deze reductie is bij een leptineconcentratie van 100 nM significant verschillend van de relatieve waarde bij zowel de gezonde controles (p= 0.078) als de MS-patiënten (p= 0.02). PBMC's niet gestimuleerd met anti-CD3 vertonen een kleine stijging in de proliferatie bij zowel de gezonde controles als de MS-patiënten. Bij de gezonde controles is dit vanaf een Leptineconcentratie van 1 nM een gemiddelde toename van 4% (p>0.05). Bij MS-patiënten is dit een gemiddeld proliferatieve toename van 3% (p>0.05).



**Figuur 10:** Het effect van leptine op de proliferatie van PBMC's van de gezonde controles (n=8) en MS-patiënten (n=7). Leptine leidt tot de inhibitie van de proliferatie van geactiveerde PBMC's van de gezonde controles (A) en MS-patiënten (B). \*= p-waarde < 0,05; \*\*= p-waarde < 0,01 voor aCD3 gestimuleerde PBMC's.

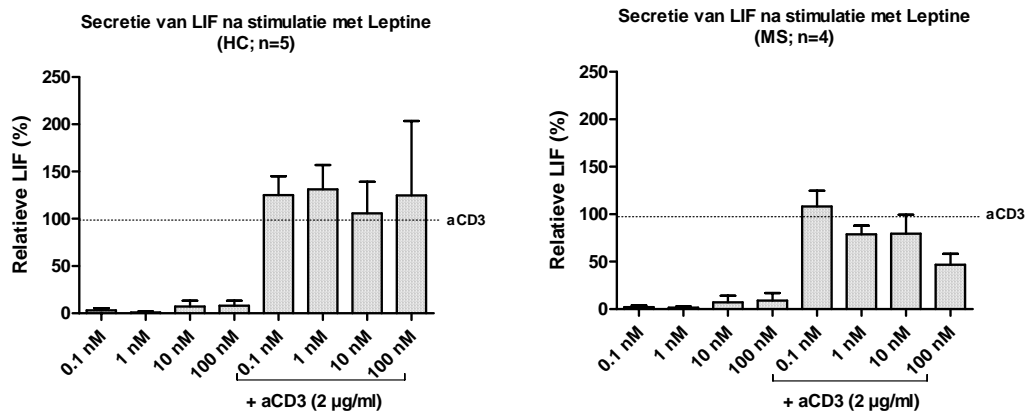
Van de met leptine behandelde PBMC's werd parallel met de proliferatie ook de cytokinesecretie gemeten. *Figuur 11* geeft een opvallend verschil in de LIF secretie aan tussen de gezonde controles en MS-patiënten. Stimulatie met verschillende Leptineconcentraties (0.1, 1, 10, 10<sup>2</sup> nM) vertoont geen significant verschil in de secretie van LIF door anti-CD3 gestimuleerde PBMC's van de gezonde controles (n=5).



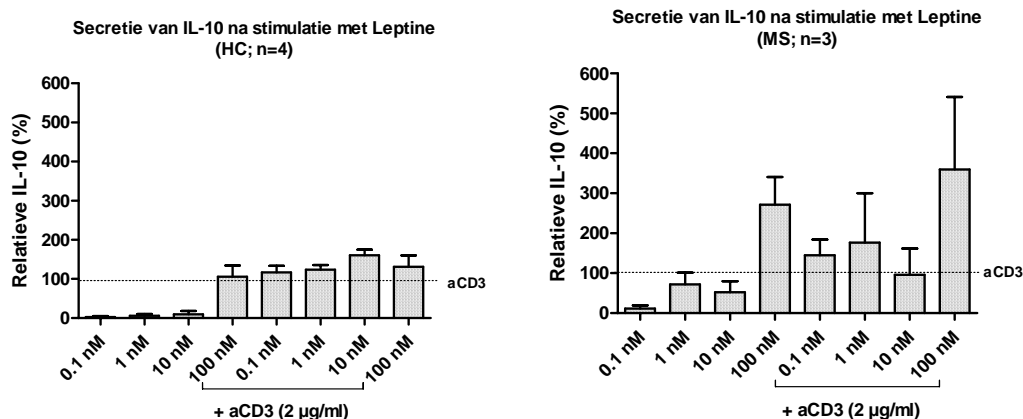
## Resultaten

Bij MS-patiënten (n=4) wordt echter bij een leptineconcentratie van 100 nM een reductie met 53% in de LIF secretie waargenomen. Bij de hoogste leptineconcentratie (100 nM) is een toename in de secretie van IL-10 (Figuur 10B), IFN- $\gamma$  (Figuur 10C) en TNF- $\alpha$  (Figuur 10D) bij zowel de ongestimuleerde als de anti-CD3 gestimuleerde condities van MS-patiënten te detecteren. De IL-10 secretie door PBMC's niet gestimuleerd met anti-CD3 bij behandeling met 100 nM nam met ongeveer 271% toe ( $p>0.05$ ). Bij vergelijking van de niet met aCD3 gestimuleerde PBMC's met PBMC's gestimuleerd met 100 nM leptine zonder anti-CD3 werd een significante toename in de secretie van IFN- $\gamma$  geconstateerd. Deze toename bedraagt 210%. Dit was bij de met anti-CD3 gestimuleerde PBMC's een toename van 624% (Figuur 10C). De secretie van TNF- $\alpha$  door niet gestimuleerde PBMC's nam na stimulatie met 100 nM leptine significant toe met 230%. Bij anti-CD3 gestimuleerde PBMC's was dit een verhoging van 302%. *Figuur 10 D* toont aan dat bij de gezonde controles enkel voor de secretie van TNF- $\alpha$  een significant verschil tussen de ongestimuleerde en de met anti-CD3 gestimuleerde condities werd waargenomen. Stimulatie met 100 nM leptine van de niet gestimuleerde PBMC's bleek de secretie van TNF- $\alpha$  te verhogen met 148%. Bij de met anti-CD3 gestimuleerde PBMC's was dit een verhoging van 266%.

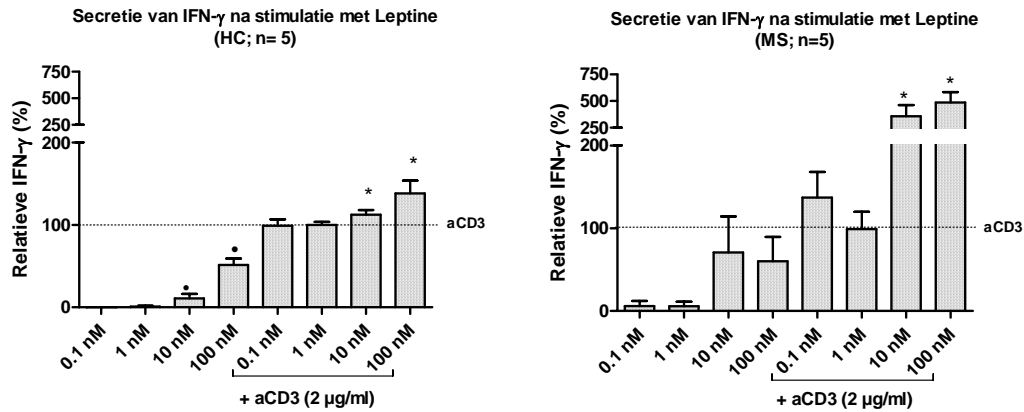
### 11A



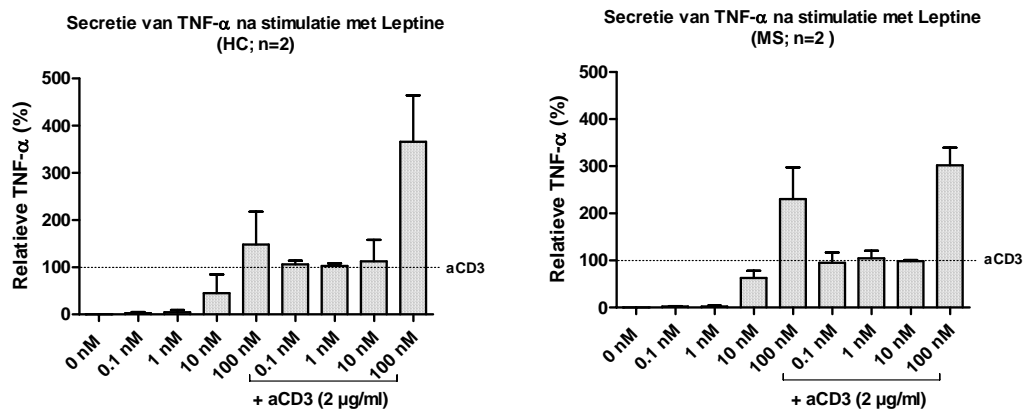
### 11B



11C



11D



**Figuur 11:** Het effect van leptine op de secretie van (A) LIF, (B) IL-10, (C) IFN- $\gamma$  en (D) TNF- $\alpha$  door PBMC's van de gezonde controles en MS-patiënten. De secretie van IL-4 wordt niet weergegeven omdat de secretie van dit cytokine zich onder de detectielimiet bevindt.

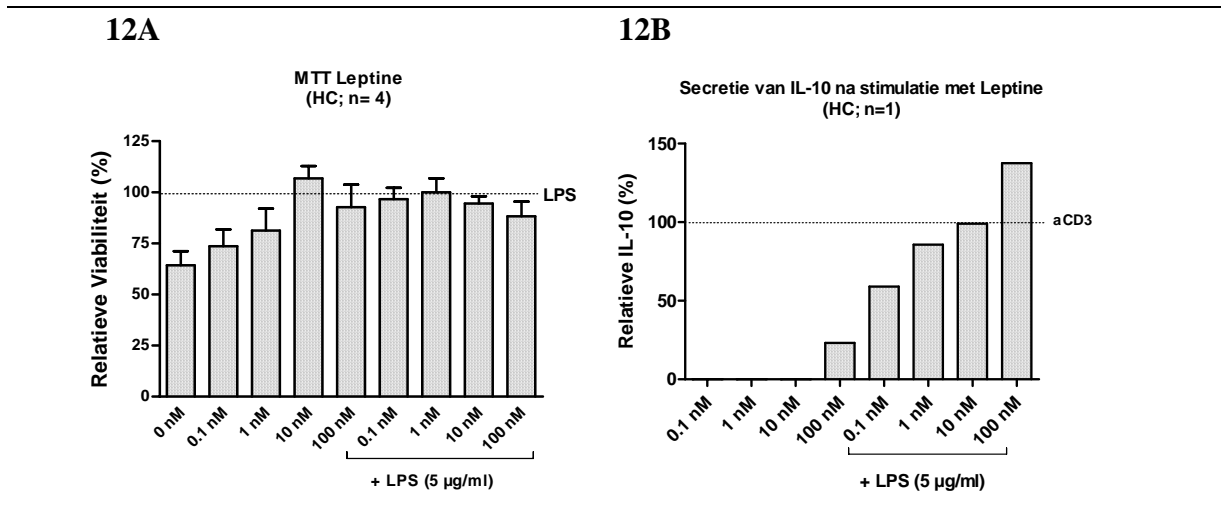
*Effecten op monocytten*

Om de secretie van LIF door monocytten onder invloed van leptine te onderzoeken werden van 4 donoren PBMC's geïsoleerd waaruit vervolgens de monocytten negatief geselecteerd werden. De geïsoleerde monocytten werden vervolgens gestimuleerd met Leptine (0.1, 1, 10, 100 nM) al dan niet in combinatie met LPS (5 mg/ml).

Na stimulatie met Leptine werden bij rustende monocytten bij de condities tot en met 10 nM een verhoging met 30% in de viabiliteit gedetecteerd ( $p > 0.05$ ; Figuur 12A). Bij een Leptineconcentratie van 100 nM daalt dit echter. Stimulatie met LPS zorgt ook voor een dosisafhankelijke vermindering in het aantal levende cellen. Bij een Leptineconcentratie van 100 nM wordt een reductie van 12% in de viabiliteit van monocytten gedetecteerd. Ook kan waargenomen worden dat de viabiliteit van niet met LPS gestimuleerde monocytten met een concentratie van 100 nM met 28% verhoogd wordt.

## Resultaten

*Figuur 12B* toont aan dat de secretie van IL-10 na stimulatie met Leptine een dosisafhankelijke verhoging blijkt te volgen. Bij de hoogste concentratie van Leptine is dit een verhoging van 38%.



**Figuur 12:** De invloed van Leptine op de (A) viabiliteit en (B) IL-10 secretie van monocytten.

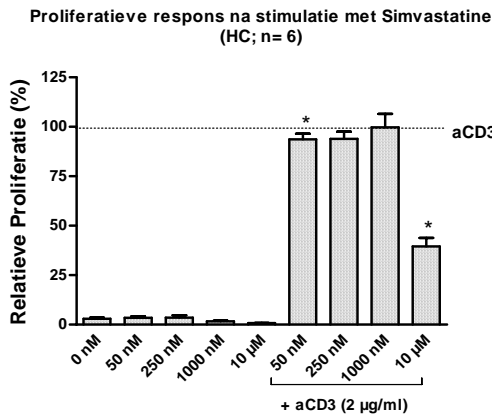
### 3.2.3 Effecten van Simvastatine

#### *Effecten op PBMC's*

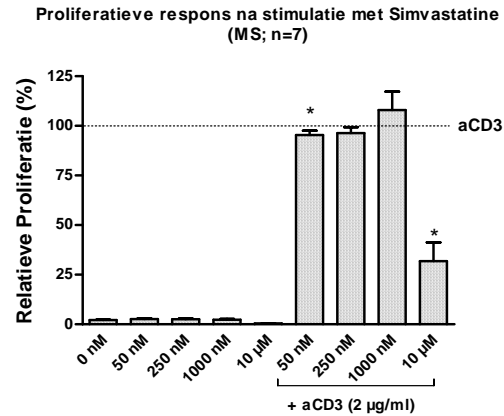
Om de LIF secretie na stimulatie met Simvastatine te correleren met een bepaald T<sub>H</sub>-fenotype werd eerst de invloed van Simvastatine op de proliferatie van PBMC's van de gezonde controles (n=6) en MS-patiënten (n=7) nagegaan. Hiervoor werden de geïsoleerde PBMC's gedurende 3 dagen geïncubeerd en gestimuleerd met Simvastatine (50, 250, 1000 nM, 10µM) al dan niet in combinatie met anti-CD3.

*Figuur 13* toont aan dat lage concentraties van Simvastatine geen effect heeft op de proliferatie van de gestimuleerde PBMC's van de gezonde controles (n=6) en MS-patiënten (n=7). Een concentratie van 10 µM van Simvastatine blijkt echter de proliferatie van de anti-CD3 gestimuleerde PBMC's van de gezonde controles met 62% te inhiberen (*Figuur 13A*). In het geval van MS-patiënten is dit een afname van 70% (*Figuur 13B*).

13A



13B

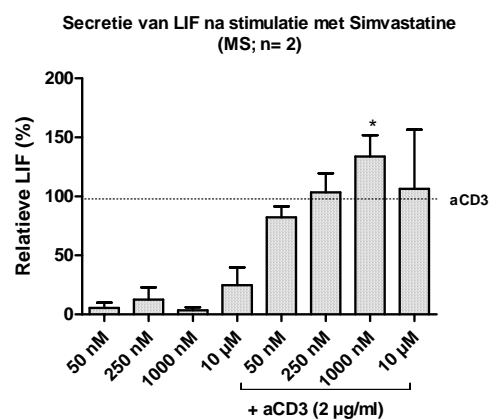
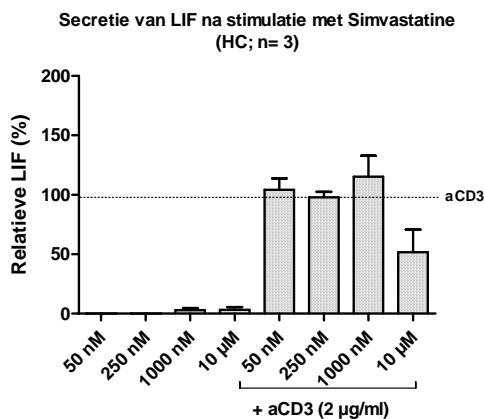


**Figuur 13:** Het effect van simvastatine op de proliferatie van PBMC's van de gezonde controles (n=6) en MS-patiënten (n=7). Simvastatine blijkt een onderdrukkend invloed te hebben op de proliferatie van de PBMC's van alle personen. \*= p-waarde < 0,05; \*\*= p-waarde < 0,05; \*\*\*= p-waarde < 0,01 voor aCD3 gestimuleerde PBMC's.

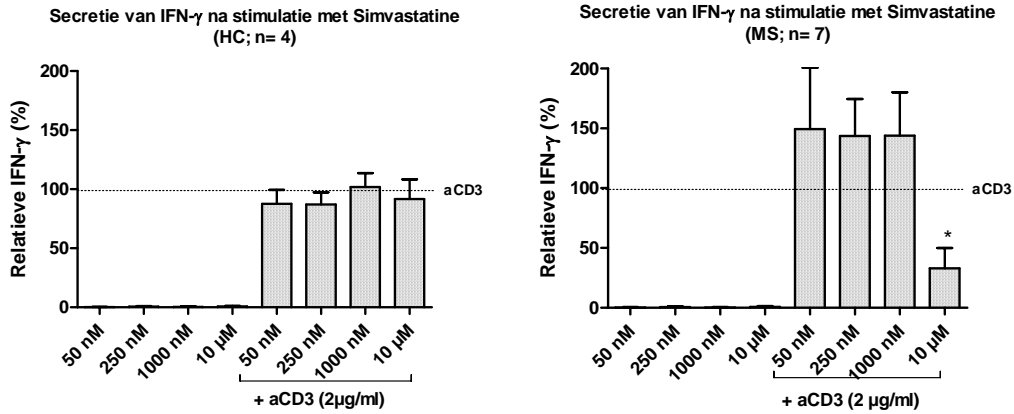
De analyse van de cytokinesecretie na stimulatie met Simvastatine werd zoals bij de voorgaande stimuli ook uitgevoerd met behulp van de ELISA-methode. Hierbij werd de invloed van Simvastatine op de secretie van LIF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 en IL-10 bepaald.

*Figuur 14A* toont aan dat Simvastatine bij een concentratie van 1000 nM een toename van 31% in de LIF secretie van aCD3 gestimuleerde PBMC's van MS-patiënten (n=4) teweeg brengt. Deze klein toename was in elke donor waar te nemen en werd niet geobserveerd in PBMC's van de gezonde controles. Bij de hoogste concentratie van Simvastatine (10  $\mu$ M) werd bij aCD3 gestimuleerde PBMC's eerder een afname in de LIF secretie geobserveerd. Uit *figuur 14B* en *14C* blijkt de secretie van IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  niet significant beïnvloed te worden door Simvastatine.

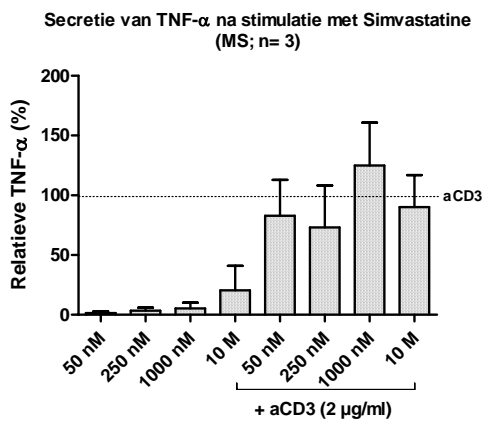
14A



14B



14C

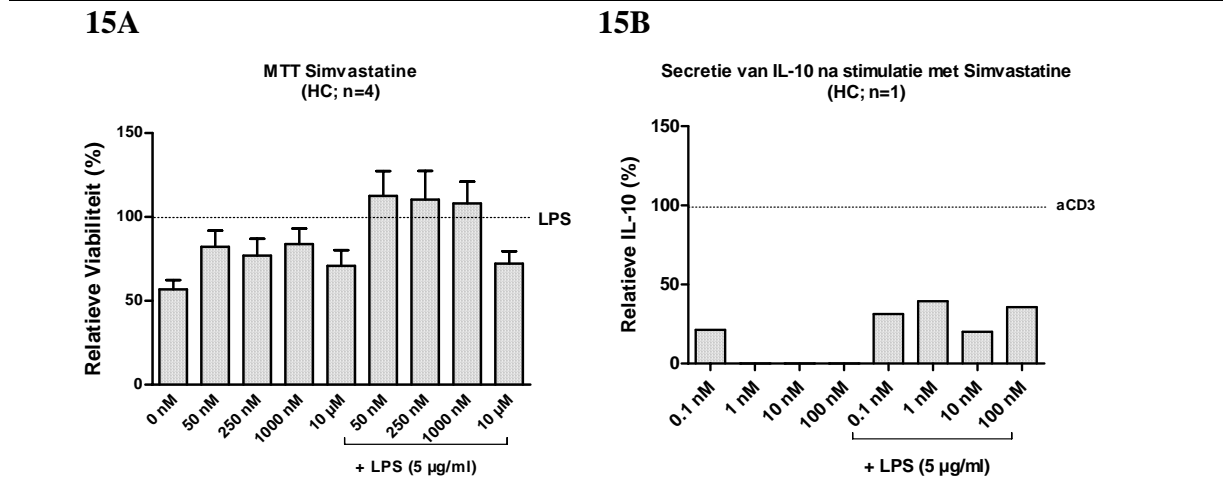


**Figuur 14:** Het effect van Simvastatine op de secretie van (A) LIF, (B) IFN- $\gamma$  en (C) TNF- $\alpha$  door PBMC's van de gezonde controles en MS-patiënten. De secretie van IL-4 en IL-10 worden niet weergegeven omdat de secretie van deze cytokines zich onder de detectielimiet bevinden. \*= p-waarde < 0,05.

*Effecten op monocytten*

Om het effect van simvastatine op monocytten te bepalen werden geïsoleerde monocytten gestimuleerd met simvastatine (50, 250, 1000 nM, 10  $\mu$ M) al dan niet in combinatie met LPS (5 mg/ml).

Uit *figuur 15A* kan afgeleid worden dat stimulatie van monocytten met simvastatine tot een daling in het aantal levende cellen gestimuleerd met LPS leidt. Hierbij geeft een stimulatie met 10  $\mu$ M Simvastatine een afname met 28% aan. Verder kan geconstateerd worden dat behandeling van monocytten met simvastatine tot een daling van de IL-10 secretie in de LPS behandelde leidt (Figuur 15B).



**Figuur 15:** De invloed van Simvastatine op de (A) viabiliteit en (B) IL-10 secretie van monocytten.

### 3.2.4 Effecten van Luteoline

#### *Effecten op PBMC's*

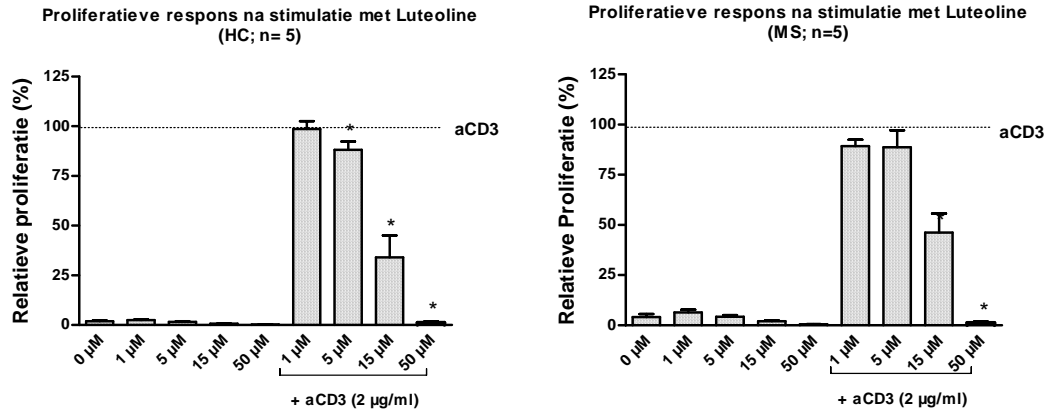
Het effect van luteoline op PBMC's werden op 5 gezonde controles en 5 MS-patiënten bestudeerd. Om het effect op de proliferatie van en cytokinesecretie door deze cellen te achterhalen werden deze gestimuleerd met verschillende concentraties van luteoline (1, 5, 15, 50 µM) al dan niet in combinatie met anti-CD3.

Het effect van luteoline op de proliferatie van PBMC's wordt weergegeven in *figuur 16*. Uit deze figuur kan worden afgeleid dat luteoline de proliferatie van geactiveerde PBMC's van zowel de controle- als de MS-groep onderdrukt. Bij een concentratie van 50 µM blijkt dit bijna een volledige (99%) onderdrukking te zijn.

## Resultaten

16A

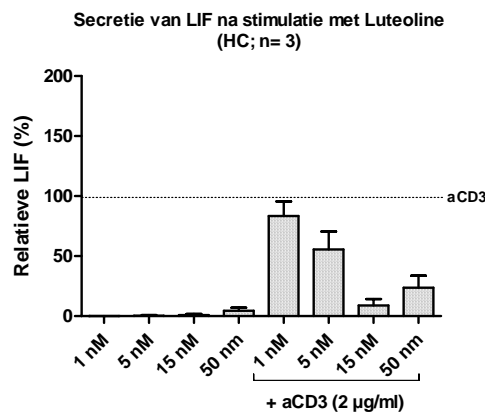
16B



**Figuur 16:** Het effect van Luteoline op de proliferatie PBMC's van (A) de gezonde controles (n=5) en (B) MS-patiënten (n=5). Luteoline veroorzaakt een uitermate hoge reductie in de proliferatiecapaciteit van geactiveerde PBMC's. \*= p-waarde < 0,05; \*\*= p-waarde < 0,01

Met de bepaling van de invloed van luteoline op de cytokinesecretie door PBMC's van de gezonde controles en MS-patiënten werd door gebruik te maken van de ELISA-methode de secretie van IL-10 onderzocht. Deze data zijn terug te vinden in *figuur 17*.

*Figuur 17* toont aan dat parallel met de effecten op de proliferatie luteoline ook de LIF secretie door gestimuleerde PBMC's van de gezonde controles (n=3) bij de hoogste luteolineconcentratie (50 µM) met 63% inhibeert. Aangezien de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 en IL-10 ELISA's nog niet uitgevoerd zijn zijn de resultaten hiervan niet weergegeven.



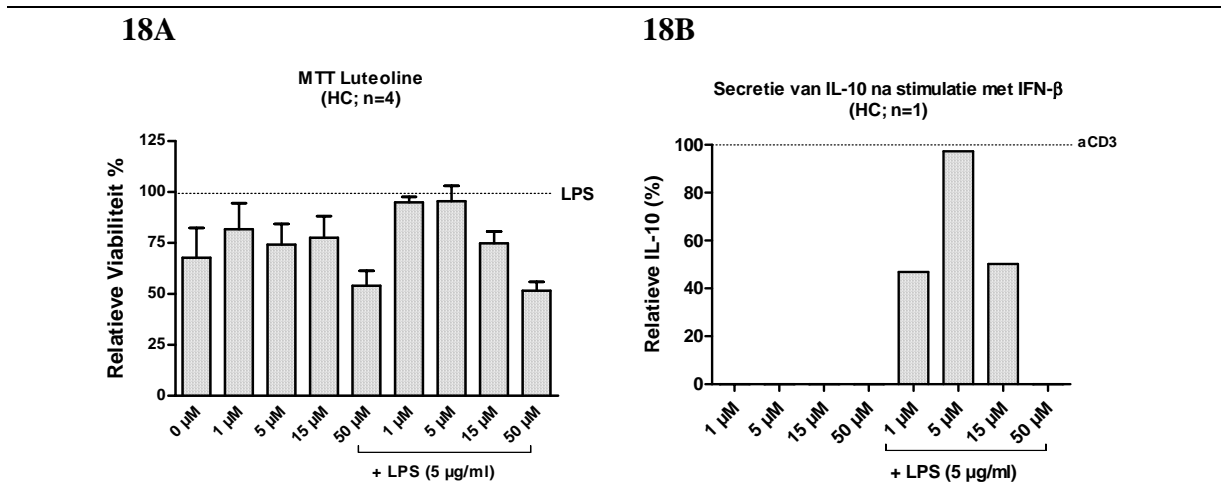
**Figuur 17:** Het effect van Luteoline op de secretie van (A) LIF door PBMC's van de gezonde controles. De secretie van IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 en IL-10 worden niet weergegeven omdat de secretie van deze cytokines nog niet uitgevoerd zijn.

### Effecten op monocyten

Voor de bepaling van de invloed van luteoline op de secretie van LIF werden geïsoleerde monocyten gestimuleerd met verschillende concentraties van luteoline (1, 5, 15, 50  $\mu\text{M}$ ). Na een incubatieperiode van 3 dagen werd aan de celfractie MTT toegevoegd om zo de metabolische activiteit van monocyten te achterhalen. Verder werd de supernatantia geanalyseerd op de aanwezigheid van IL-10.

*Figuur 18A* duidt aan dat de stimulatie met luteoline tot een dosisafhankelijke inhibitie van de viabiliteit van de met LPS gestimuleerde monocyten leidt. Deze inhibitie bedraagt 48%.

Bij analyse van de IL-10 secretie na behandeling met luteoline kan vanaf een concentratie van 5  $\mu\text{M}$  een dalende trend in de secretie van IL-10 gedetecteerd worden (*Figuur 18B*). Deze data zijn echter preliminair.



**Figuur 18** : De invloed van Luteoline op de (A) viabiliteit en (B) IL-10 secretie van monocyten.



### 4. Discussie

Het traditononeel concept van MS schetst de schade aan myeline en oligodendrocyten als een gedereguleerd immuunrespons waarbij de autoreactieve T-cellen een belangrijke rol spelen in initiatie van deze ziekte.

Recente inzichten geven aan dat autoreactieve T-cellen niet alleen destructief maar ook protectief kunnen zijn [12]. Hoe deze cellen protectief zijn is nog steeds onbekend. Wel wordt verondersteld dat deze protectie minstens gedeeltelijk via de secretie van neurotrofines teweeggebracht kan worden [22,23].

Aangezien een voorgaande studie aangetoond heeft dat LIF geproduceerd kan worden door cellen van het immuunsysteem en omdat LIF producerende immuuncellen ook kunnen teruggevonden worden in MS laesies werd in deze studie de regulatie van de LIF secretie onderzocht. Hiervoor werden verschillende immuuncelfracties behandeld met factoren die LIF secretie mogelijk zouden kunnen moduleren. Volgens de protectieve werking van LIF op neuronen en oligodendrocyten is men in het kader van MS pathologie op zoek naar stimuli die de LIF secretie zouden kunnen verhogen. Daarom werd eerst de invloed van een verhoogde LIF concentratie op immuuncellen nagegaan. Om toxische effecten van LIF op T-cellen na te gaan werden LIF (0-100 ng/ml) behandelde immuuncellen geanalyseerd met de Annexine/7-AAD/CD3 kleuring. LIF behandeling resulteerde niet in een veranderde viabiliteit na 72h incubatie. Bovendien kon er geen effect van LIF op de proliferatie van PBMC's geobserveerd worden. Ook werd geen invloed van LIF op de anti-CD3 geïnduceerde proliferatie en secretie van cytokines vastgesteld. Het gebrek aan immunomodulatoir effecten van LIF op T-cellen kan gemakkelijk verklaard worden door de receptorstudie die werd uitgevoerd. Om een functionele LIFR te hebben moeten zowel gp 130 als LIFR- $\beta$  tot expressie komen. In onze studie werd aangetoond dat slechts 3% van de T-cellen de LIF bindende receptorcomponent (LIFR- $\beta$  of ook CD 190 genoemd) hebben. Bovendien verliezen T-cellen ook de gp 130 expressie bij activatie. Ook blijken hoofdzakelijk monocyten een functioneel LIF receptor complex te hebben. We hebben echter geen onderzoek gedaan naar de effecten van LIF op monocyten.

Deze bevindingen zijn consistent met reeds gepubliceerde data van Butzkueven et al. [33]. Deze onderzoekers hebben de invloed van LIF op EAE (een proefdiermodel voor MS) bestudeerd. Naast reeds eerder besproken effecten (zie 3.1) observeerden zij na behandeling met LIF ook geen verandering in de proliferatieve capaciteit van muis splenocyten en T-cel klonen. Ook werd geen verandering in de productie van  $T_H1$  en  $T_H2$  cytokines na behandeling met LIF gerapporteerd. Onze bevindingen tonen duidelijk aan dat dit ook voor humane cellen het geval is.

Om de regulatie van LIF secretie door immuuncellen te bestuderen werden PBMC's van gezonde controles en onbehandelde MS-patiënten gedurende 3 dagen behandeld met verschillende factoren. Simultaan met de LIF secretie werden ook de secreties van IFN- $\gamma$  en IL-10 (als voorbeeld van een  $T_H1$  respectievelijk  $T_H2$  cytokine) en TNF- $\alpha$  bepaald. Een factor die een van de huidige behandelingen van MS vormt is IFN-beta. Klinisch is aangetoond dat behandeling van RR-MS patiënten met IFN- $\beta$  een verlaagde relapse rate veroorzaakt [42].

Vele studies hebben het modulatoir effect van IFN- $\beta$  op het immuunsysteem reeds aangetoond. Net zoals bij de pro-inflammatoire cytokines, IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  werd voor LIF een dosisafhankelijke reductie in de supernatantia van de IFN- $\beta$  behandelde PBMC's geobserveerd. Deze dosisafhankelijke reductie in de LIF inhoud duidt niet noodzakelijk op een verminderde LIF secretie per cel vermits de proliferatie (en dus ook het aantal cellen) gereduceerd is bij de IFN- $\beta$  behandelde condities. Wel kan met deze 'read-out' de regulatie van verschillende cytokines vergeleken worden. De reductie in de LIF inhoud van supernatantia van de met IFN- $\beta$  behandelde geactiveerde T-cellen werd ook geconstateerd bij een studie waarbij 2 weken na behandeling van MS-patiënten hogere LIF niveaus in het serum werden teruggevonden. De dosisafhankelijke reductie van LIF bij de gezonde controles is echter niet zichtbaar voor anti-CD3 gestimuleerde PBMC's van MS-patiënten. Vanuit de data is duidelijk dat IL-10 een ander secretiepatroon vertoont. In de niet met anti-CD3 gestimuleerde PBMC's wordt een duidelijke toename in de IL-10 secretie na IFN- $\beta$  behandeling waargenomen. Bij anti-CD3 gestimuleerde PBMC's worden geen verschillen in de IL-10 secretie vastgesteld en dat terwijl er door de remmende werking op de proliferatie veel minder cellen aanwezig zijn in de IFN- $\beta$  behandelde culturen.

Deze bevindingen zijn indicatief voor een verhoging in de IL-10 secretie. Omdat de monocyten in de PBMC fractie verantwoordelijk kunnen zijn voor deze secretie werd ook een zuivere monocyten fractie behandeld met IFN- $\beta$ . Onze preliminaire resultaten tonen aan dat monocyten hoogstwaarschijnlijk niet verantwoordelijk zijn voor de toename in de IL-10, immers rustende monocyten geen IL-10 produceren na IFN- $\beta$  behandeling.

Door de LPS behandeling geactiveerde monocytten tonen echter na behandeling met IFN- $\beta$  een grote variatie in de IL-10 secretie. Aangezien geen IL-10 secretie geobserveerd werd bij rustende monocytten behandeld met IFN- $\beta$  is het onwaarschijnlijk dat deze cellen verantwoordelijk zijn voor de IL-10 secretie in de PBMC culturen. De immunomodulatoire effecten van IFN- $\beta$  op het patroon van de cytokinesecretie is consistent met eerdere studies. Deze studies geven aan dat IFN- $\beta$  een immunosuppressief effect heeft en gepaard gaat met een afname van de secretie van T<sub>H</sub>1 en toename van de secretie van T<sub>H</sub>2 cytokines [43].

De resultaten in ons onderzoek tonen overtuigend aan dat LIF niet gereguleerd wordt als een T<sub>H</sub>2 cytokine. Deze bevinding contrasteert met de bevinding dat 2 weken na de behandeling van MS-patiënten hogere LIF niveaus in het serum kan teruggevonden worden. Wel is deze dosisafhankelijke reductie in de LIF secretie niet te zien bij anti-CD3 gestimuleerde PBMC's van MS-patiënten.

Leptine is een door adipocyten gesecreteerd hormoon dat betrokken is bij de regulatie van de voedselopname. Bovendien is leptine aangetoond betrokken te zijn bij de inductie en progressie van EAE en dat leptine toenames in het serum van MS-patiënten een relapse voorafgaan [44]. Reeds lang was bekend dat de voedingsstatus de immunrespons beïnvloedt. Recente studies tonen aan dat leptine hier verantwoordelijk voor is [45]. Omdat voor Leptine aangetoond is dat het de secretie van cytokines door mononucleaire cellen van MS-patiënten kan moduleren, werden de effecten van Leptine op de LIF secretie geanalyseerd [45,46].

Onze resultaten tonen zoals eerder vastgesteld dat de concentratie van de pro-inflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  duidelijk verhoogd wordt in Leptine gestimuleerde supernatantia van ongestimuleerde PBMC's. Deze stijging is ook waar te nemen bij anti-CD3 gestimuleerde PBMC's, hoewel Leptine de proliferatie inhibeert. Bij de ongestimuleerde PBMC's zien we echter ook een stijging in de IL-10 secretie. Onze initiële observaties op geïsoleerde monocytten (activatie en IL-10 secretie) samen met de literatuurgegevens suggereren dat deze toename toe te schrijven is aan monocytten [45].

Uit deze resultaten is duidelijk dat LIF ook niet gereguleerd wordt als een T<sub>H</sub>1 cytokine daar er geen significante verhoging na leptinebehandeling kan geobserveerd worden. Er waren eerder aanwijzingen van een verlaging.

De studies van *Lord et al.* hebben aangetoond dat Leptine de anti-CD3 gemedieerde proliferatie van T-cellen inhibeert. Ook werd een versterking van de secretie van pro-inflammatoire cytokines vastgesteld [47].

Statines, 3-hydroxyl-3methylglutary coenzyme A reductase inhibitoren, zijn therapeutica die gebruikt worden voor cholesterol reductie. Recent zijn echter immunomodulatoire eigenschappen van statines aan het licht gekomen en werd gesteld dat deze ook beschermend zouden kunnen werken bij inflammatoire aandoening zoals MS. Bij het dierenmodel van MS (EAE) werd na toediening van simvastatine een verbetering in de klinische symptomen aangetoond [48,49]. Klinisch pilootstudies toonden aan dat na behandeling van MS-patiënten met simvastatine een significante reductie in het aantal en volume van MRI laesies geconstateerd werd. Wegens de relevantie van simvastatine als kandidaat behandeling voor MS zijn we gaan onderzoeken of simvastatine behandeling ons iets kan leren over de regulatie van LIF secretie. Hoewel de studie van Neuhaus et al. [50] aantoonde dat Simvastatine in anti-CD3 gestimuleerde PBMC's de secretie van IFN- $\gamma$  en IL-4 induceert en de secretie van TNF- $\alpha$  en IL-10 onderdrukt, konden wij dit niet observeren. In onze culturen werden geen significante verschillen in de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  en IL-10 secretie geobserveerd. Wel is het interessant dat de LIF secretie in PBMC's van MS-patiënten significant toeneemt na behandeling met simvastatine (1  $\mu$ M). Dit effect werd voor elk van de 5 onbehandelde patiënten waargenomen maar was niet zichtbaar bij de gezonde controles.

De laatste stimulus die we voor de studie van de LIF regulatie bestudeerd hebben is luteoline. Luteoline is een flavonoïde waarvan de protectieve werking in zowel de acute en chronische vorm van EAE reeds aangetoond is. In dit onderzoek werd vastgesteld dat luteoline de klinische symptomen en de relapse inhibeert voor en na de aanvang van EAE. Ook werd een reductie in de inflammatoire reacties en axonale schade in het CZS geconstateerd [51].

De analyses van de luteoline behandelde PBMC is niet voltooid. Wel kan er al vastgesteld worden dat luteoline de anti-CD3 geïnduceerde proliferatie inhibeert. Gelijklopend met de remming van de proliferatie kan er ook een dosisafhankelijke vermindering in de LIF inhoud van de luteoline behandelde anti-CD3 gestimuleerde PBMC's geobserveerd worden. Uit literatuurgegevens blijkt dat luteoline via zijn immunomodulatoire effecten de productie van de pro-inflammatoir cytokines met name TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  en IL-6 door PBMC's gestimuleerd met LPS onderdrukt. Ook werd een suppressie van de metabolische activiteit van PBMC's gestimuleerd met LPS vastgesteld. Dit was geassocieerd met een verhoging van de dood van monocytten [52].

Hoewel deze studie niet volledig afgerond is tonen deze resultaten duidelijk aan dat LIF geen modulerende effecten heeft op T-cellen. Dit is te verklaren doordat een functionele LIF-receptor niet aanwezig is op T-cellen. Het blijft te onderzoeken of LIF wel effecten heeft op monocytfractie want onze studie toonde aan dat een functioneel LIF receptor complex (gp 130 en gp 190) aanwezig zijn op ongeveer 90% van de monocyten.

Zo kan bij de behandelingen met IFN- $\beta$  en leptine een andere trend waargenomen. Uit de behandeling met IFN- $\beta$  werd duidelijk dat LIF niet gesecreteerd wordt als een T<sub>H</sub>2 cytokine. De resultaten van de leptinebehandelingen gaven geen T<sub>H</sub>1 gereguleerd secretieprofiel van LIF weer. Opmerkelijk is dat de LIF secretie bij onbehandelde MS-patiënten verschillend gereguleerd is dan bij de gezonde personen. Bij de simvastatine behandeling bijvoorbeeld, werd bij PBMC's van MS-patiënten een significante verhoging in de LIF secretie waargenomen terwijl bij de gezonde controles geen veranderingen in de LIF secretie werden geconstateerd. Deze data zijn indicatief voor een verstoorde regulatie van de LIF secretie in MS-patiënten. Op basis hiervan kan niet besloten worden of deze verstoorde immuunregulatie bijdraagt aan het ziekteverloop van MS. Hiervoor dient verder onderzoek gedaan te worden.

### **5. Referenties**

- [1] Steinman L, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(6): 483-92.
- [2] Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol. Res.* 2002; 25(1): 27-51.
- [3] Bar-Or A, Oliveira EM, Anderson DE, Hafler DA. Molecular pathogenesis of multiple sclerosis., *J Neuroimmunol.* 1999; 100(1-2): 252-259.
- [4] Buntinx M, Stinissen P, Steels P, Ameloot M, Raus J. Immune-mediated oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic interventions, *Crit Rev Immunol.* 2002; 22(5-6): 391-424.
- [5] Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2004; 113(6): 788-794.
- [6] Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997; 120: 2059–69.
- [7] Prineas J. Pathology of the early lesion in multiple sclerosis. *Hum Pathol.* 1975 Sep;6(5):531-54.
- [8] Prat E, Martin R. The immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Rehabil Res Dev.* 2002; 39(2): 187-99.
- [9] Liblau R, Gautam AM. HLA, molecular mimicry and multiple sclerosis. *Rev Immunogenet.* 2000; 2(1): 95-104.
- [10] Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47(6): 707-17.
- [11] Kornek B, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis-new concepts. *Brain Res Bull* 2003; 15; 61(3): 321-6.
- [12] Schwartz M, Cohen IR. Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol Today.* 2000; 21(6): 265-8.
- [13] Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gothilf A, Cohen A, Kuchroo V, Cohen IR, Weiner H, Schwartz M. Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma; *J Neurosci* 2001; 21(11): 3740-8.

## Referenties

---

- [14] Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med.* 1999; 5(1): 49-55.
- [15] O'Connor KC, Bar-Or A, Hafler DA. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol.* 2001; 21(2): 81-92.
- [16] Goebels N, Hofstetter H, Schmidt S, Brunner C, Wekerle H, Hohlfeld R. Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence. *Brain.* 2000; 123(3): 508-18.
- [17] Schwartz M. Autoimmunity as the body's defense mechanism against the enemy within: Development of therapeutic vaccines for neurodegenerative disorders. *J Neurovirol.* 2002; 8(6): 480-5.
- [18] Schwartz M. Protective autoimmunity as a T-cell response to central nervous system trauma: prospects for therapeutic vaccines. *Prog Neurobiol.* 2001; 65(5): 489-96.
- [19] Schwartz M, Kipnis J. Multiple sclerosis as a by-product of the failure to sustain protective autoimmunity: a paradigm shift. *Neuroscientist.* 2002; 8(5): 405-13.
- [20] Zhe-Yu Chen, Li Cao, Li-Mei Wang, Chao Guo, Jun-Li Ye, Yan-Feng Chai and Zhi-Yong Yan. Development of Neurotrophic Molecules for Treatment of Neurodegeneration. *Current protein and peptide Science* 2001; 2: 261-276.
- [21] Heerssen HM, Segal RA. Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci.* 2002 ; 25(3): 160-5.
- [22] Moalem G, Gdalyahu A, Shani Y, Otten U, Lazarovici P, Cohen IR, Schwartz M. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity, *J Autoimmun* 2000; 15(3): 331-45.
- [23] Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol.* 2003; 53(3): 292-304.

## Referenties

---

- [24] Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 1999; 189(5): 865-70.
- [25] Vanderlocht J. Leukemia inhibitory factor (LIF) is produced by myelin reactive T cells from Multiple Sclerosis patients and protects against TNF-alpha induced oligodendrocyte apoptosis. [Submitted].
- [26] Heinrich, Iris Behrmann, Gerhard Müller-Newen, Fred Schaper and Lutz Graeve. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway1. [Review] *Biochem J* 1998; 334, 297-314.
- [27] Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(7): 3115-20.
- [28] Ishimi Y, Abe E, Jin CH, Miyaura C, Hong MH, Oshida M, Kurosawa H, Yamaguchi Y, Tomida M, Hozumi M, et al. Leukemia inhibitory factor/differentiation-stimulating factor (LIF/D-factor): regulation of its production and possible roles in bone metabolism. *J Cell Physiol*. 1992; 152(1): 71-8.
- [29] Murphy M, Dutton, R, Koblar, S, Cheema, S & Bartlett, P. Cytokines which signal through the LIF receptor and their actions in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 1997; 52, 355-378.
- [30] Richards LJ, Kilpatrick TJ, Dutton R, Tan SS, Gearing DP, Bartlett PF, Murphy M. Leukaemia inhibitory factor or related factors promote the differentiation of neuronal and astrocytic precursors within the developing murine spinal cord. *Eur J Neurosci*. 1996; 8(2): 291-9.
- [31] D'Souza S, Alinauskas K, and Antel JP. Ciliary Neurotrophic Factor Selectivity Protects Human Oligodendrocytes from Tumor Necrosis Factor-Mediated Injury, *Journal of Neuroscience and Research* 1995; 43: 289-298.



## Referenties

---

- [32] Mayer M, Bhakoo K, Noble M. Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro. *Development*. 1994; 120(1): 143-53.
- [33] Butzkueven H, Zhang JG, Soilu-Hanninen M, Hochrein H, Chionh F, Shipham KA, Emery B, Turnley AM, Petratos S, Ernst M, Bartlett PF and Kilpatrick TJ. LIF receptor signaling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nat Med* 2002; 8: 613-9.
- [34] Ransohoff RM, Howe CL, Rodriguez M. Growth factor treatment of demyelinating disease: at last, a leap into the light. *Trends Immunol*. 2002; 23(11): 512-6.
- [35] Starr R, Willson TA, Viney E M, Murray LJL, Rayner J R, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander, WSD Metcalf, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature* 1997; 387: 917 – 921.
- [36] Anhuf D, Weissenbach M, Schmitz J, Sobota R, Hermanns HM, Radtke S, Linnemann S, Behrmann I, Heinrich PC, Schaper F. Signal transduction of IL-6, leukemia-inhibitory factor, and oncostatin M: structural receptor requirements for signal attenuation. *J Immunol*. 2000; 165(5): 2535-43.
- [37] Heinrich, Iris Behrmann, Serge Haan, Heike M Hermanns, Gerhard Müller-Newen and Fred Schrafer. Review Article Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J* 2003; 374, 1–20.
- [38] Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis, *Oncogene*. 2000; 19(21): 2474-88.
- [39] Soane L, Cho HJ, Niculescu F, Rus H, Shin ML. C5b-9 terminal complement complex protects oligodendrocytes from death by regulating Bad through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Immunol*. 2001; 167(4): 2305-11.
- [40] Shigeo Koyasu. The role of PI3 in immune cells. *Nature Immunology* 2003; 4(4): 313-319.
- [41] Negoro S, Oh H, Tone E, Kunisada K, Fujio Y, Walsh K, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. *Circulation*. 2001; 103(4): 555-61.

## Referenties

---

- [42] Paty DW, Li DKB. The UBC MS/MRI Study Group and the INF(beta) Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI results of a multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993; 43; 662-7.
- [43] Ossege LM, Sindern E, Patzold T, Malin JP. Immunomodulatory effects of interferon-beta-1b in patients with multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1(6): 1085-100.
- [44] La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(5): 371-9.
- [45] Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature.* 1998; 394(6696): 897-901.
- [46] Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S, Gonzalez-Yanes C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol.* 2003; 133(1): 11-9.
- [47] Lord GM, Matarese G, Howard JK, Bloom SR, Lechler RI. Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol.* 2002; 72(2): 330-8.
- [48] Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM, Bravo M, Mitchell DJ, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature.* 2002; 420(6911): 78-84.
- [49] Aktas O, Waiczies S, Smorodchenko A, Dorr J, Seeger B, Prozorovski T, Sallach S, Endres M, Brocke S, Nitsch R, Zipp F. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *J Exp Med.* 2003 17; 197(6): 725-33.
- [50] Neuhaus O, Strasser-Fuchs S, Fazekas F, Kieseier BC, Niederwieser G, Hartung HP, Archelos JJ. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta 1b in MS. *Neurology.* 2002; 59(7): 990-7.
- [51] Hendriks JJ, Alblas J, van der Pol SM, van Tol EA, Dijkstra CD, de Vries HE. Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. *J Exp Med.* 2004; 200(12): 1667-72.

## Referenties

---

- [52] Hougee S, Sanders A, Faber J, Graus YM, van den Berg WB, Garssen J, Smit HF, Hoijer MA. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2005 Jan 15; 69(2): 241-8.