

*Labelling van myeline-reactieve T-cellen met behulp van  
paramagnetische partikels voor trafficking studies in EAE.*

**Tony Schabregs**

promotor:

**Prof. Dr. Piet Stinissen,  
Prof. Dr. Jan Gelan**

co-promotor:

**Drs. Kurt Baeten**

**Academiejaar: 2004-2005**

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

**INHOUDSOPGAVE:**

<b>INHOUDSOPGAVE</b>	I
<b>AFKORTINGEN</b>	III
<b>VOORWOORD</b>	IV
<b>SAMENVATTING</b>	V
<b>1. INLEIDING</b>	1
1.1 Introductie	1
1.2 Verschillende vormen van multiple sclerosis	1
1.3 Pathologie van multiple sclerosis	2
1.4 Therapieën voor multiple sclerosis	4
1.5 Experimentele autoimmune encephalomyelitis (EAE)	5
1.6 Beeldvormingstechnieken geschikt voor T-cel trafficking studies	8
1.7 Doelstelling van de studie	11
<b>2. MATERIALEN EN METHODEN</b>	12
2.1 Materialen	12
2.2 Methoden	12
2.2.1 Cel isolatie	12
a) Isolatie van thymocyten	12
b) Productie van ConA supernatans	13
c) Bekomen van een MBP-reactieve T-cel lijn	13
d) EasySep procedure	14
2.2.2 Analyse fenotypische kenmerken	15
2.2.3 Proliferatie assay	15

2.2.4 Cellabeling	15
a) Magnetische labelling	15
b) Fixatie van gelabelde cellen	16
c) Histologische kleuring	16
2.2.5 Adoptieve transfer	17
2.2.6 Atomic absorption spectroscopy (AAS)	17
2.2.7 Magnetic resonance imaging (MRI)	17
a) Preparatie van de stalen voor MRI	17
b) Gebruikte parameters voor analyse van de stalen met MRI	18
3. RESULTATEN	19
3.1 Optimalisatie van detectie van SPIO gelabelde T-cellen met histologische kleuring	19
3.2 Optimalisatie cellabelling met paramagnetische SPIO partikels	21
3.2.1 Toepassing van eerder beschreven labellingsconcentratie	21
3.2.2 Optimalisatie van PLL concentratie	22
3.2.3 Optimalisatie van SPIO concentratie bij verschillende PLL hoeveelheden	24
3.3 Isolatie en karakterisatie van CD4 <sup>+</sup> en CD8 <sup>+</sup> myeline-reactieve T-cellijnen	27
3.4 Labelling van myeline-reactieve T-cellijnen	29
3.5 Bepaling van de hoeveelheid opgenomen ijzerpartikels per cel	31
3.6 Visualisatie van gelabelde T-cellen door middel van hoge resolutie MRI	33
3.7 Trafficking van gelabelde T-cellen in EAE	33
4. DISCUSSIE	35
5. REFERENTIES	39

---

**AFKORTINGEN:**

APC: Antigen presenterende cel  
AAS: *Atomic absorption spectroscopy*  
BHB: Bloed-hersen-barrière  
BLI: *Bioluminescent imaging*  
CAS: ConA supernatans  
CD: *Cluster of differentiation*  
CFA: *Complete Freund's adjuvans*  
CFS: Cerebrospinale vloeistof  
CZS: Centraal zenuwstelsel  
DAB: Diaminobenzidine  
EAE: Experimentele autoimmune encephalomyelitis  
EC: Endotheliale cellaag  
FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*  
FCS: Foetaal kalf serum  
FITC: Fluoresceïne isothiocyanaat  
FOV: *Field of view*  
GA: Glaterameer acetaat  
ICAM-1: Intercellulaire adhesie molecule 1  
IFN: Interferon  
LFA-1: *Lymphocyte function associated antigen 1*  
MBP: Myeline basic proteïne  
MHC: *Major histocompatibility complex*  
MOG: Myeline-oligodendrocyt glycoproteïne  
MRI: *Magnetic resonance imaging*  
MS: Multiple Sclerosis  
NO: *Nitric oxide*  
OL: Oligodendrocyten  
PB: *Prussian blue*  
PE: Phytoerythrine  
PERCP: Peridine chlorofyl-a proteïne  
PET: *Positron emission tomography*  
PLP: Proteolipoproteïne  
PPMS: *Primary-progressive multiple sclerosis*  
RF: Radiofrequentie spoel  
RRMS: *Relapsing-remitting multiple sclerosis*  
SPMS: *Secondary-progressive multiple sclerosis*  
SPECT: *Single photon emission tomography*  
SPIO: *Superparamagnetic iron oxide*  
TCR: T-cel receptor  
TE: Echotijd  
TGF- $\beta$ : *Transforming growth factor  $\beta$*   
TNF: Tumor necrosis factor  
TR: Repetitietijd  
VLA-4: *Very late activation molecule 4*

---

**VOORWOORD:**

Vooraf zou ik enkele mensen willen bedanken die het voltooien van deze thesis mee mogelijk hebben gemaakt.

Als eerste wil ik mijn promotoren Prof. Dr. P. Stinissen en Prof. Dr. Jan Gelan willen bedanken, voor het begeleiden van een leerrijke stage en het lezen en verbeteren van mijn thesis.

Eveneens wil ik mijn tweede beoordelaar, Prof. Dr. M. Ameloot bedanken voor het kritisch nalezen en beoordelen van mijn thesis.

Ook zou ik Dr. Peter Adriaensens willen bedanken voor het uitvoeren van de MRI metingen, en Dr. Frank Vandenabeele voor het maken van de vele foto's op histologie.

Een speciaal woord van dank wil ik richten tot mijn copromotor Kurt Baeten. Kurt, bedankt voor de begeleiding in het labo, voor het doorgeven van je wetenschappelijke inzichten, voor je raad bij het verwerken van gegevens en teksten. Kortom bedankt voor de hulp waarmee ik mijn thesis tot een goed einde kon brengen.

Verder dank ik Jerome, Niels, Joris, Debbie, Wilfried, en al mijn medestudenten voor de talrijke praktische tips en de fijne werksfeer.

Ten slotte wil ik nog een woord van dank richten tot mijn ouders die mij al zolang steunen. Ik ben jullie oneindig dankbaar voor jullie vertrouwen in mij, voor de vele aanmoedigingen als het weer wat minder ging,... Vooral dankzij jullie heb ik eindelijk mijn doel kunnen bereiken.

**SAMENVATTING:**

Multiple sclerosis (MS) is een chronische inflammatoire aandoening van het centraal zenuwstelsel. De ziekte wordt gekenmerkt door een immuungemedieerde beschadiging van de oligodendrocyten en het myeline rondom de zenuwen. Autoreactieve T-cellen die specifiek zijn voor verschillende myeline componenten worden beschouwd als een belangrijke schakel in de pathogenese van MS. Ondanks veel onderzoek zijn er echter nog steeds grote hiaten in de kennis over deze autoreactieve T-cellen. Om een beter inzicht te krijgen over de plaats en het tijdstip waarop deze cellen hun schadelijke werking uitoefenen zal gebruik gemaakt worden van een zeer recent ontwikkelde techniek. Enkele pilootstudies toonde de mogelijkheid om cellen te labelen met paramagnetische partikels aan waardoor trafficking van deze cellen kan plaatsvinden met hoge resolutie MRI.

In dit project werd een optimalisatie uitgevoerd voor de labelling van myeline-actieve rat T-cellen met superparamagnetische iron oxide partikels (SPIO). In de initiële experimenten werd gebruik gemaakt van rat thymocyten waarbij de concentraties van SPIO en het transfectie agens poly-L-lysine uit eerder beschreven muizenstudies werden gebruikt. De analyse werden uitgevoerd door middel van histologische kleuringen. Een belangrijke vaststelling was echter de aanwezigheid van storende vrije SPIO-PLL complexen. De oplossing van dit probleem leidde tot een optimalisatie studie waaruit een nieuwe labellingsconditie bekomen werd zonder hinderende complexen en met een verhoogde labellingsefficiëntie. Na deze optimalisatie werd voor de eerste maal een labelling van rat MBP-actieve T-cellen uitgevoerd. De gemiddelde ijzeropname van de myeline-actieve T-cellen als ook de mogelijkheid tot visualisatie werden vervolgens met respectievelijk AAS en MRI geverifieerd. Aangezien een toename in de hoeveelheid ijzer per cel verkregen werd door de nieuwe labellingsconditie werden de mogelijk nadelige effecten hiervan op de viabiliteit onderzocht. In deze studie konden geen effecten van de labelling op een belangrijke viabiliteitsparameter, namelijk de activatie worden vastgesteld. Tot slot werd een pilootexperiment uitgevoerd waarbij voor de eerste maal de inductie van EAE in ratten met gelabelde CD4<sup>+</sup> MBP-actieve T-cellen plaatsvond.

Met de resultaten van deze studie is er nu een krachtig middel voor handen waarmee het uitvoeren van trafficking studies van MBP-actieve T-cellen maar ook andere T-cellen in EAE en diverse andere diermodellen mogelijk is. Hierdoor kan er belangrijke nieuwe informatie verkregen worden over pathogene mechanismen van niet alleen multiple sclerosis maar ook van een hele verscheidenheid aan andere ziekten.

---

## **1. INLEIDING:**

### **1.1 Introductie:**

Multiple Sclerosis (MS) is een chronisch inflammatoire ziekte van het centraal zenuwstelsel (CZS) die waarschijnlijk veroorzaakt wordt door een disregulatie van het immuunsysteem [1]. De ziekte heeft vooral een hoge incidentie bij jonge volwassenen van blanke origine en komt dubbel zo vaak voor bij vrouwen dan bij mannen [2]. De klinische manifestaties zijn variabel zowel wat betreft de neurologische symptomen als de graad van invaliditeit. Gemeenschappelijke symptomen omvatten visuele en neurologische schade, verlamming en andere neurologische afwijkingen soms vergezeld met aanzienlijke cognitieve disfunctie [3]. Een diagnose van MS wordt gesteld aan de hand van de klinische manifestaties en ondersteunende paraklinische testen. Met behulp van deze paraklinische testen kunnen ziekten die een gelijkaardige klinisch verloop kennen gemakkelijk uitgesloten worden. Deze testen omvatten *magnetic resonance imaging* (MRI), oligoklonale banden en cerebrospinale vloeistof (CSF) analyse. MRI wordt vooral aangewend om CZS laesies, kenmerkend voor MS, op te sporen. Oligoklonale banden en CSF analyse zijn eerder gericht op het aantonen van intrathecale immuungemedieerde inflammatie [4,5].

### **1.2 Verschillende vormen van multiple sclerosis:**

Bij aanvang kan MS klinisch onderverdeeld worden als *relapsing-remitting* MS (RRMS, 85-90% van de gevallen), of *primary progressive* MS (PPMS, 10-15% van de gevallen). De RR vorm kan beschreven worden als een reeks van aanvallen, met symptomen die zich kunnen ontwikkelen in uren tot enkele dagen. Deze kunnen vervolgens enkele dagen tot weken aanhouden tot ze geleidelijk aan weer verdwijnen [6]. De aanvallen worden waarschijnlijk veroorzaakt door de vervanging van geactiveerde myeline reactieve T-cellen in het CZS, waar ze zorgen voor acute inflammatie met geassocieerd oedeem. Uiteindelijk zal ongeveer 40% van de relapsing-remitting patiënten overgaan in een secundair progressieve neurodegeneratieve afwijking waarbij er zich een chronische inflammatie van het CZS ontwikkelt, *secondary-progressive* MS (SPMS) [7]. PPMS wordt gekenmerkt door de afwezigheid van acute aanvallen en bestaat meestal uit een graduele klinische achteruitgang.

### **1.3 Pathologie van multiple sclerosis:**

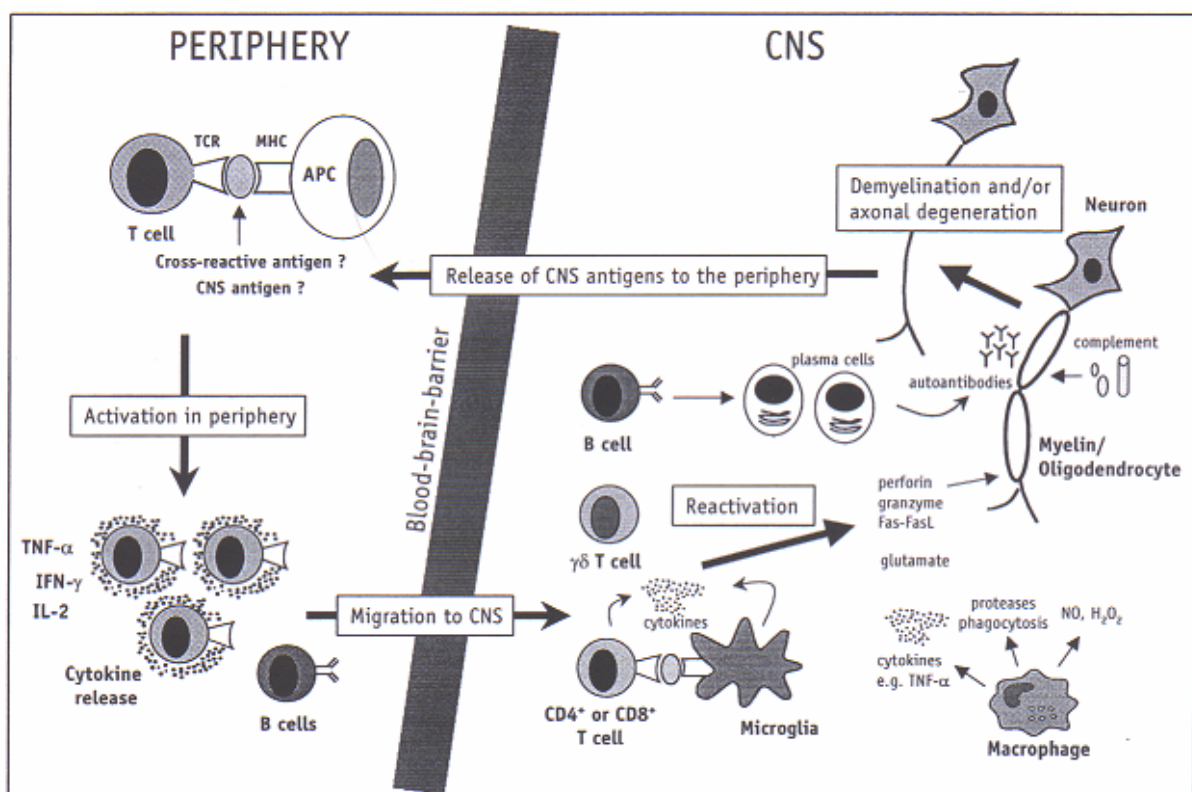
MS wordt pathologisch gekarakteriseerd door plaques of laesies in de witte stof van het CZS die het resultaat zijn van focaal verlies van myeline. Deze laesies bevinden zich verspreid over het CZS maar komen voornamelijk voor in de periventriculaire regio's, de optische zenuwen, de hersenstam en het ruggenmerg [8]. Het inflammatoire celprofiel van actieve laesies wordt gekarakteriseerd door T-cellen, B-cellen en macrofagen [9]. Het verlies van myeline in deze laesies veroorzaakt een verminderde elektrische insulatie van de axonen en neuronen resulterend in een verminderde zenuwpulsgeleiding. In het CZS zijn oligodendrocyten (OL) verantwoordelijk voor de productie van myeline. Ze doen dit door middel van een vijftiental brede uitlopers. In tegenstelling tot de Schwann cellen die zorgen voor de perifere myelinisatie is er in het CZS geen neurolemma aanwezig aangezien het lichaam en de kern van OL het axon niet mee omgeven. De afwezigheid van het neurolemma leidt ertoe dat het axon in het CZS slechts in staat is tot beperkt herstel na schade [10]. Aanvankelijk blijven OL bij MS grotendeels behouden waardoor er remyelinisatie kan optreden [11]. In latere fasen worden de oligodendrocyten zelf ook beschadigd en zal er axonaal verlies optreden, waarschijnlijk leidend tot blijvende neurologische afwijkingen [8]. Zoals aangegeven in vele studies worden auto-immune inflammatoire ziekten van het CZS geïnitieerd door autoreactieve hersenspecifieke T-lymfocyten die, mogelijk na activatie door virale epitopen (moleculaire mimicry) of door bacteriële en virale superantigenen, het CZS binnen dringen via de bloed-hersen-barriere (BHB) [12,13]. Door deze activatie ondergaan T-cellen klonale expansie waarna ze van naïeve cellen in effectorcellen veranderen. Deze effectorcellen worden gekenmerkt door de upregulatie van costimulatorische en adhesie moleculen zoals *lymphocyte function-associated-(LFA) antigen-1* en het *very late activation (VLA)-4 molecule* dat de adhesie aan de endotheliale cellaag (EC) vergemakkelijkt. Bovendien kunnen naïeve T-cellen ook antigenen herkennen die gepresenteerd worden door de EC om vervolgens de BHB aan te vallen [14,15,16]. Na aankomst in het CZS worden de T-cellen gereactiveerd door de ontmoeting met het autoantigen gepresenteerd door lokale antigen presenterende cellen (APC's), de microglia cellen of de perivasculaire macrofagen. Deze geactiveerde autoreactieve T-cellen zorgen voor de secretie van pro-inflammatoire cytokines zoals interferon (IFN), tumor necrosis factor (TNF), en chemokines die niet specifieke immuuncellen kunnen aantrekken. Bovendien vervullen ze een ondersteunende functie voor B-cellen. Bij aankomst in het CZS kunnen de B-cellen namelijk differentiëren tot

---



antigen secreterende cellen na interactie met T-cellen waardoor een humorale immuunrespons wordt verkregen [17]. De samenloop van al deze gebeurtenissen leidt tot de aantasting van oligodendrocyten resulterend in demyelinisatie en weefselbeschadiging.

De autoreactieve T-cellen, die vermoedelijk een belangrijke initiator functie in deze ziekte uitoefenen, komen echter ook voor bij gezonde individuen. In normale toestand bieden klonale deletie en T-cel anergie maar ook extrinsieke regulatie mechanismen actief in het perifere immuunsysteem bescherming tegen zowel de vorming van autoreactieve immuunresponsen als de initiatie van auto-immune ziekten [18,19]. Bijkomend wordt het CZS beschermd door de dichte endotheliale juncties van de BHB, de afwezigheid van dendritische cellen in het CZS parenchym en de aanwezigheid van een immuunonderdrukkende micro-omgeving. Deze immuunsuppressieve omgeving wordt tot stand gebracht door de productie van anti-inflammatoire cytokines en de expressie van fas-ligand (CD154) wat apoptose induceert bij T-cellen. Bij MS patiënten blijkt deze immuunregulatie echter verstoord te zijn [20].



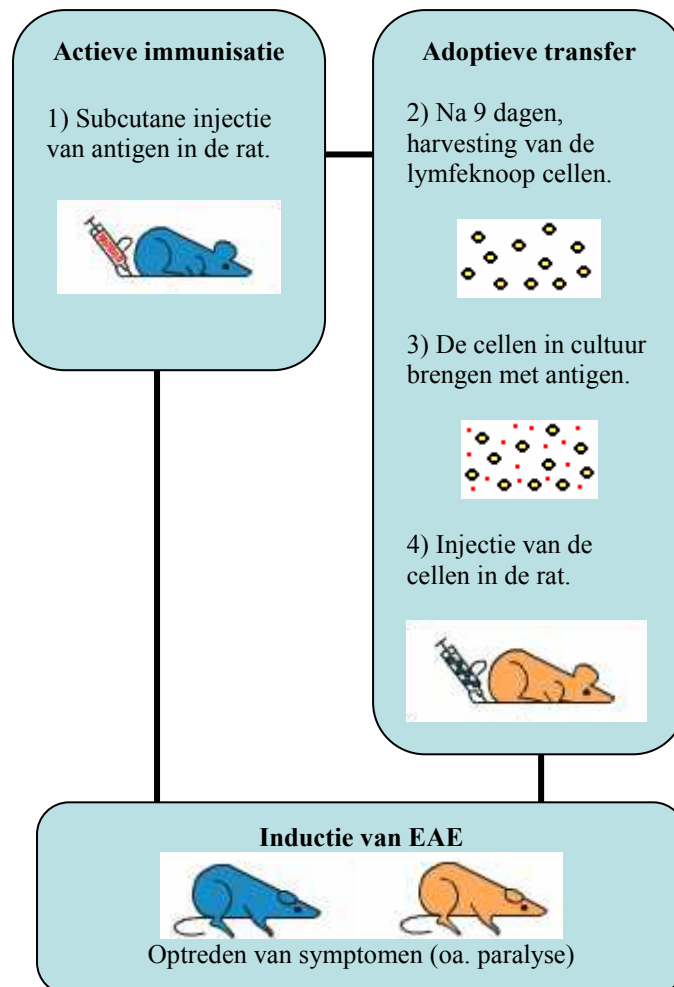
**Figuur 1:** Schematisch overzicht van huidige hypothese met betrekking tot de immunopathogenese van MS (Stinissen et al, 1997). APC: antigen presenterende cel; CNS: central nervous system; MHC: major histocompatibility complex; TCR: T-cel receptor; TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukine; IFN: interferon.

#### **1.4 Therapieën voor multiple sclerosis:**

De klassieke behandelingswijze voor MS bestaat vooral uit niet specifieke immuunmodulerende therapieën. De meest succesvolle hiervan zijn interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) en glatiramer acetaat (GA). Behandeling met IFN- $\beta$  zorgt voor een verminderde relapse rate, vertraagde progressie van invaliditeit en minder actieve laesies in de hersenen. Het werkingsmechanisme van dit type I interferon bestaat uit een modulatie van de expressie van adhesiemoleculen en matrix metalloproteïnen resulterend in een verminderde afbraak van de BHB. Bovendien treedt een shift van de cellulaire immuunrespons op van Th1 naar een Th2 profiel met inhibitie van de MHC expressie in een proinflammatoire omgeving [21]. Het GA bestaat uit een mengsel van polypeptiden die opgebouwd zijn uit een willekeurige sequentie van 4 aminozuren (glutamine, lysine, alanine, tyrosine). Een behandeling met GA bij patiënten met relapsing-remitting MS zorgt voor een verminderde klinische activiteit van de ziekte. Het mogelijke werkingsmechanisme bestaat eruit de myeline antigenspecifieke T-cel klonen functioneel te inhiberen via de antigenpresentatie en te zorgen voor een shift van een Th1 naar een Th2 cytokineprofiel [22]. Hoewel deze therapieën oorspronkelijk niet gefundeerd waren op een uitgebreide kennis over de pathofysiologie van MS, leidde onderzoek naar het werkingsmechanisme van deze middelen tot nieuwe inzichten in de ziekte. Voor de ontwikkeling van specifieke immuuntherapieën is kennis over de pathogenese cruciaal. Hierbij spelen de genetische achtergrond, de omgevingsfactoren, de immuunreactiviteit, de kwetsbaarheid van het targetweefsel en de klinische en pathologische heterogeniciteit een belangrijke rol. Een van deze nog experimentele specifieke immuuntherapieën is T-cel vaccinatie. Het doel van deze therapie is om een immuunrespons op te wekken tegen de autoreactieve T-cellen die betrokken zijn bij de pathogenese van MS. Deze schadelijke T-cellen worden uit het bloed geïsoleerd, geïnactiveerd door bestraling en tot slot gereinjecteerd. Studies toonden aan dat deze T-cel vaccinatie resulteert in een depletie van circulerende autoreactieve T-cellen. Een mogelijke verklaring hiervoor is te vinden bij de anti-idiotypische en anti-ergotypische eigenschappen in respons op deze verzwakte T-cellen [23]. De beeldvormingstechnieken die in dit project gebruikt worden om de trafficking van myeline-reactieve T-cellen te visualiseren zullen ook hier gebruikt kunnen worden voor de verdere opheldering van het mechanisme van deze therapie.

## 1.5 Experimentele autoimmuune encephalomyelitis (EAE):

De grote complexiteit van het achterliggend ziektemechanisme bij MS maken een passend diermodel noodzakelijk voor de opheldering ervan. EAE leent zich hier perfect voor. Inductie van EAE in dieren leidt tot de ontwikkeling van een ziekte met grote klinische en histopathologische overeenkomsten met MS. Dit model wordt dan ook reeds lange tijd gebruikt voor het begrijpen van zowel de immuungemedieerde pathologie als het progressieve klinisch verloop ervan. EAE is echter geen spontane auto-immune ziekte en dient geïnduceerd te worden in ratten en andere genetisch vatbare diersoorten door immunisatie met CZS weefsel of gezuiverde myeline componenten, zoals myeline basic proteïne (MBP), proteolipoproteïne (PLP). Naast een actieve immunisatie kan EAE ook geïnduceerd worden door adoptieve transfer van gesensitiseerde myeline reactieve T- cellen [24,25].



**Figuur 2:** Schematische weergave van inductie EAE. De twee klassieke methoden zijn actieve immunisatie (links) en adoptieve transfer (rechts).

Voor dit onderzoek wordt er gebruik gemaakt van het EAE model bij Lewis ratten. Dit EAE model werd in vroegere studies grondig gekarakteriseerd en bleek een goed model te zijn voor de karakterisatie van bepaalde MS pathologieën [26]. Het voordeel van dit model in vergelijking met bijvoorbeeld het muismodel is de grote uniformiteit wat betreft de susceptibiliteit, initiatietijd en graad van paralyse na immunisatie met lage dosen (50-250 µl/ml) MBP in complete Freund's adjuvans (CFA) [27]. Inductie van EAE bij muizen daarentegen vereist echter meerdere injecties van hogere dosissen MBP en de additie van een extra adjuvans [28]. De hoge graad van inteelt vergemakkelijkt bovendien het uitvoeren van adoptieve transfer studies.

EAE bij Lewis ratten wordt gekarakteriseerd als een paralytische ziekte met een uitgebreide mononucleaire cel infiltratie van het ruggenmerg, hersenstam en cerebellum. Laesies in de cerebrale cortex zijn zeldzaam en demyelinisatie komt niet voor [29]. De huidige hypothese betreffende de ontwikkeling van EAE bij de Lewis rat stelt dat na immunisatie van de ratten, afhankelijk van de gebruikte inductie methode, binnen vijf tot negen dagen de eerste encephalitogene T-cellen verschijnen [30]. De daarop volgende secretie van IFN- $\gamma$  door deze T-cellen zorgt voor expressie van MHC klasse II en intercellulaire adhesie molecule 1 (ICAM-1) op de microvaatjes van het CZS [31]. Hierna gaan de encephalitogene T-cellen de BHB oversteken en worden macrofagen en microglia cellen aangetrokken. Deze laatste zetten stoffen zoals *nitric oxide* (NO), TNF en producten van het stollingssysteem vrij zorgend voor oedeem [32,33]. De klinische symptomen die optreden bij EAE zijn waarschijnlijk het resultaat van de werking van deze inflammatoire mediators. De remissie wordt vermoedelijk ingeluid door de activatie van CD4 suppressor T-cellen die migreren naar het CZS. In het CZS gaan deze cellen een interactie aan met de encephalitogene T-helper 1 cellen en secreteren ze *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) verantwoordelijk voor de downregulatie van de proinflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  en TNF [34]. De schadelijke auto-reactieve T-cellen worden door de suppressor T-cellen door middel van apoptose geëlimineerd uit het CZS [35]. Tenslotte vindt er suppressie plaats van het door IFN- $\gamma$  geactiveerde endotheel, waardoor de nieuw gevormde encephalitogene T-cellen de BHB niet meer kunnen oversteken [36].

Het tijdstip waarop de klinische manifestaties zich voordoen bij EAE ratten is afhankelijk van de manier van immunisatie. Inductie van EAE door middel van actieve immunisatie leidt ertoe dat het langer duurt alvorens de manifestaties zich uiten [24]. Dit valt te verklaren doordat het geïnjecteerde antigeen eerst gepresenteerd moet worden door lokale APC's

---

waarmee residente myeline reactieve T-cellen worden geactiveerd en vervolgens hun schadelijke werking kunnen gaan uitoefenen. Bij passieve immunisatie wordt de antigenpresentatie vooraf *in vitro* uitgevoerd en worden reeds geactiveerde myeline-reactieve T-cellen geïnjecteerd. Na 4 tot 5 dagen treden de eerste symptomen op. Bij passieve immunisatie verschillen de klinische manifestaties naargelang men gebruik maakt van CD4<sup>+</sup> of CD8<sup>+</sup> myeline-reactieve T-cellen. CD4<sup>+</sup> cellen zorgen voor een ziektebeeld dat grotendeels overeenkomt met de symptomen die optreden bij actieve immunisatie waarbij paralyse, gewichtsverlies en incontinentie optreden [37]. Een passieve immunisatie met CD8<sup>+</sup> T-cellen geeft daarentegen symptomen geassocieerd zijn met een afwijking aan het bovenste motorneuron, zoals ataxia, spastische reflexen, ongecoördineerde bewegingen en paralyse van de achterste poten [38]. Wanneer de inflammatie bij EAE echter te wijd verspreid is in de hersenstam treedt er meestal sterfte op. Dit is echter uitzonderlijk het geval en ratten zullen in de meeste gevallen gewoon spontaan herstellen. Na herstel zijn de ratten bestand tegen verdere pogingen om de ziekte met hetzelfde myeline peptide te herinduceren. Dit is echter niet het geval wanneer de ziekte wordt geïnduceerd met een andere peptide of myeline component. Bovendien bleken ratten ook resistentie te vormen na voeding van meerdere lage doses MBP (orale tolerantie) [24].

Naast het acute EAE model werden ook andere modellen ontwikkeld voor onderzoek naar de relapsen en de demyelinisatie betrokken in latere fasen van MS. Wanneer er een transfer van myeline-oligodendrocyt glycoprotëine (MOG) specifieke antilichamen samen met encephalitogene T-cellen plaatsvindt, komt er een significante hoeveelheid demyelinisatie voor (chronische relapsing EAE). MOG-geïnduceerde EAE wordt geassocieerd met axonale schade in actieve, inactieve en remyeliniserende laesies, waardoor het een geschikt model is voor de ontwikkeling van axon-beschermende therapieën [39].

Het acute Lewis EAE model is uitermate geschikt voor het ontrafelen van het inflammatoir proces dat aan de basis ligt van MS. Bewijzen hiervoor zijn te vinden in de aanwezigheid van perivasculaire cuffs en de betrokkenheid van myeline-reactieve T-cellen in de ontwikkeling van acute EAE als bij MS [37]. Toch blijven belangrijke vragen bestaan over de werkelijke oorzaak van de verlamingsverschijnselen en over het optreden van verschillende inflammatoire patronen ondanks dezelfde volgorde van symptomen.

## **1.6 Beeldvormingstechnieken geschikt voor T-cel trafficking studies:**

Voor de karakterisatie van biologische processen in proefdieren zijn verschillende technieken beschikbaar, namelijk traditionele histologische technieken, *bioluminescent imaging* (BLI), MRI, *positron emission tomography* (PET) en *single photon emission tomography* (SPECT). Van deze technieken zijn histologie, BLI en MRI het meest toegankelijk.

Bij de traditionele histologische technieken wordt er gebruik gemaakt van licht microscopie die fixatie van het weefsel, sectionering, kleuring en beeldvorming vereisen, al dan niet gevolgd door een opeenvolgende reconstructie om een 3D beeld te verkrijgen. Het is een tijd kostende onderneming die een paar dagen tot enkele weken in beslag kan nemen. Dit maakt ook dat de karakterisatie van dynamische processen met deze technieken haast onmogelijk is. Het eventueel opofferen van meerdere proefdieren op verschillende tijdstippen kan immers nooit de continuïteit van de opvolging *in vivo* evenaren. Traditionele histologische technieken hebben echter wel een hoge resolutie die niet met andere technieken bekomen kan worden. Histologie is daarom ook uitermate geschikt om resultaten, bekomen met andere technieken, te verifiëren [40].

Een minder invasieve beeldvormingstechniek is BLI. BLI maakt gebruik van een enzymatische reactie tussen een luciferase enzym en zijn substraat, luciferine, om zichtbaar licht op te wekken. De te karakteriseren cellen worden vooraf eerst getransfecteerd met een luciferase reporter gen en kunnen na transplantatie in het dier gevisualiseerd worden door toevoeging van het substraat. Een variëteit aan luciferase genen (bacteriële *lux*, vuurvlieg *luc*, en Renilla *Rluc*) zijn bruikbare reporters voor het meten van biologische activiteit. Het nadeel van luciferasen is echter dat ze slechts zwak oplichten met lage resolutie en sensitiviteit tot gevolg. Bovendien dient er een exogeen substraat te worden toegediend waarvan de distributie geen eenvoudige opdracht is. Dit alles maakt BLI dan ook minder geschikt voor het uitvoeren van gedetailleerde trafficking studies [40,41,42].

Een andere niet invasieve techniek die tevens een hoge resolutie en sensitiviteit vertoont is MRI. De grote meerderheid van MRI technieken is gebaseerd op de manipulatie van waterstofkernen in een groot statisch magnetische veld. Door gebruik te maken van spoelen, aanwezig in de magneet, wordt er een gradiënt in de X, Y en Z directies geproduceerd. Hierbij worden de waterstof atomen van een voorwerp, die zich als ongeordende dipolen gedragen, in eenzelfde richting geordend. Naast deze spoelen is er ook een radiofrequentie (RF) spoel die een tijdelijke RF-puls kan produceren. Deze puls zorgt voor een verstoring van het

---

magnetisch veld waarbij een verandering in de energie toestand van de waterstofkernen optreedt resulterend in een netto excitatie. De excitatie door deze puls wordt gevolgd door een natuurlijke magnetische relaxatie wat de basis vormt voor het signaal dat door een scanner gedetecteerd wordt als een verandering in electromagnetische flux. Een belangrijke functie van deze scanner is om de snelheid te bepalen waarmee deze dipolen relaxeren naar hun basis oriëntatie, wat vertaald wordt in een MR signaal. Afhankelijk van de concentraties aan de waterstof atomen (*spindensity*) en de eigenschappen van hun chemische en fysische omgeving, zullen deze verschillende relaxatie tijden hebben en dus ook verschillende MR signalen vertonen. Dit is een van de belangrijkste manieren waarop er contrast wordt verkregen in het MRI beeld. De timing parameters van pulsexcitatie -en recording kunnen door de centrale computer gewijzigd worden, resulterend in beelden met verschillende types van magnetisch contrast. De twee meest gebruikte timing parameters staan bekend als T1 en T2 weging. T1 weging maakt gebruik van de relaxatie in het longitudinale vlak, gekenmerkt door een afgave van de opgeslagen magnetische energiequanta aan de omgeving. T2 weging is gebaseerd op de transversale relaxatie die het gevolg is van uitwisseling van spinquanta tussen naburige magnetische dipolen [40,43].

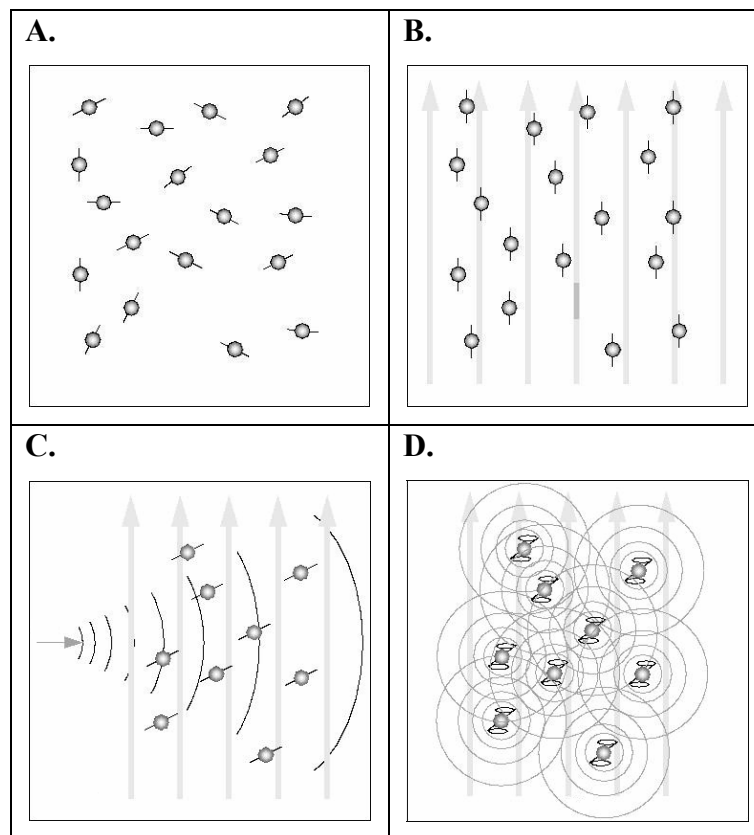
MRI is echter niet beperkt tot enkel endogeen contrast. Toediening van exogene MRI contrast stoffen veroorzaken een verandering van de relaxatie tijden in de subregio's waar er zich een accumulatie van de stof heeft plaatsgevonden, waardoor deze als lichter of donkerder verschijnen. T1 contrast stoffen zorgen voor een positieve contrast versterking. Dit wordt waargenomen als een lichter MRI beeld. T2 contrast stoffen doen juist het omgekeerde en zorgen voor een negatieve contrast versterking [43,44].

MRI beelden kunnen verkregen worden als 3D data sets, wat zorgt voor een zeer accurate voorstelling van een sample op relatief korte tijd (soms enkele uren). Bovendien is er de mogelijkheid tot *in vivo* analyse wat van groot belang is bij longitudinale studies waar men eenzelfde subject over een bepaald tijdsverloop gaat volgen. Dit laat dan ook toe om dynamische gebeurtenissen (bvb. de migratie van T-cellen) te observeren door meerdere malen beelden te maken. Er zijn echter ook enkele nadelen aan deze techniek. De contrast stoffen die gebruikt worden als cellulaire labels moeten in grote hoeveelheden worden geïnjecteerd. Dit is niet vanzelfsprekend en kan soms toxisch zijn [40].

De hierboven genoemde nadelen kunnen worden omzeild door gebruik te maken van recent ontwikkelde *superparamagnetic iron oxide* (SPIO) als contrast stof. Eerdere studies toonden aan dat deze partikels aangewend kunnen worden om een hele range aan cellen, waaronder T-

---

cellen, te labelen. Bovendien zijn ze niet toxisch en blijken ze geen effect te hebben op het cytokine profiel of de proliferatie van de cel [45].



**Figuur 3:** In de afwezigheid van een magnetisch veld gedragen de waterstofkernen zich als ongeordende dipolen (A). Wanneer ze nu in een groot statisch magnetisch veld geplaatst worden, gaan ze zich oriënteren in de richting van het veld (B). Bij aanbrengen van een radiofrequentie (RF) puls wordt het magnetisch veld verstoord en zal er een verandering in de energie toestand van de waterstofkernen optreden resulterend in een netto excitatie (C). Het stoppen van de RF-puls zorgt voor een natuurlijke magnetische relaxatie wat de basis vormt voor het signaal dat door een scanner gedetecteerd wordt (D).



### **1.7 Doelstelling van de studie:**

De doelstelling van dit project is door trafficking een beter inzicht te krijgen over de plaats en het tijdstip waarop myeline reactieve T-cellen hun schadelijke werking uitoefenen. Om hierover gedetailleerde informatie te bekomen zal dan ook gebruik gemaakt worden van hoge resolutie MRI. Voor een specifieke opvolging van myeline reactieve T-cellen dienen deze geïsoleerd en *ex vivo* gelabeld te worden met SPIO partikels. De labelingsefficiëntie zal worden geverifieerd met een immunohistochemische kleuring met Prussian blue in combinatie met diaminobenzidine (DAB) en kan zodoende ook geoptimaliseerd worden. Vervolgens zullen deze gelabelde MBP reactieve T-cellen geïnjecteerd worden in naïeve Lewis ratten wat verwacht wordt te leiden tot de inductie van EAE. Door de ziekteverwekkende T-cellen voor, tijdens en na de ziekte op te volgen kan er meer informatie bekomen worden over hun pathogeen mechanisme. De resultaten bekomen door middel van hoge resolutie MRI zullen bovendien met histologisch onderzoek worden geverifieerd. Een verdere opheldering van het werkingsmechanisme van myeline reactieve T-cellen in het EAE diermodel kan belangrijke informatie verschaffen over hun bijdrage in MS.

## **2.1 MATERIALEN:**

### **2.1.1 Groeimedium, stimulatiedium:**

RPMI 1640 medium (Gibco, Auckland, Nieuw Zeeland) aangevuld met 1% natrium pyruvaat (Gibco, Auckland, Nieuw Zeeland), 1% niet-essentiële aminozuren (Gibco, Auckland, Nieuw Zeeland), 100U/ml streptomycine (Life Technologies, Paisley, Schotland), 20 $\mu$ M mercaptoethanol (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Duitsland), 10% foetaal kalf serum (FCS, Hyclone Europe, Erembodegem, België) en 5% ConA supernatans (Cas) werd gebruikt als groeimedium voor T-cellen. RPMI 1640 medium aangevuld met 1% natrium pyruvaat, 1% niet-essentiële aminozuren, 100U/ml streptomycine, 20 $\mu$ M mercaptoethanol, 2% ratserum werd gebruikt als stimulatie medium voor MBP-reactieve T-cellen.

## **2.2 METHODEN:**

### **2.2.1 Cel isolatie:**

#### a) Isolatie van thymocyten:

Voor de isolatie van thymocyten werd gebruik gemaakt van vrouwelijke Lewis ratten (Harlan, Nederland) van 6 tot 10 weken oud. Na decapitatie van de Lewis rat werd de thymus geïsoleerd uit de thorax en werd het orgaan, na verwijdering van overtollig vet, opgevangen in koude PBS (Cambrex Bioscience, Verviers, België) of RPMI. Na spoeling in dit medium werd de thymus door middel van een stamper en een zeefje gehomogeniseerd. Het verkregen homogenaat werd gecollecteerd in een 14 ml buis (Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) en werd aangelengd met PBS. Na het uitvoeren van enkele wasstappen werd de kwantiteit van de cellen bepaald aan de hand van een Fuchs-Rosenthal telkamer en trypaan blauw (Biochrom AG, Berlijn, Duitsland). Na telling werden de cellen in kweek gebracht aan  $2 \times 10^6$  cellen per ml stimulatiedium. Stimulatie van deze cellen vond plaats met ConA (2,5 $\mu$ g/ml).

b) Productie van ConA supernatans:

Voor de *in vitro* kweek van rat T-cellen gedurende een langere termijn dient het medium aangerijkt te worden met IL-2. Als bron van IL-2 wordt in deze studie gebruik gemaakt van Cas. Voor de productie van Cas werd een milt geïsoleerd uit een Lewis rat. Na verwijdering van overtollig vet werd het orgaan opgevangen in koude PBS of RPMI. Vervolgens werd het gehomogeniseerd door middel van een stamper en een zeefje. Op het homogenaat werd een dichtheitsgradiënt centrifugatie uitgevoerd (Histopaque, Sigma diagnostics, St Louis, USA). De bekomen cellen werden gewassen in RPMI. Na celtelling werden de cellen opgelost in groei- medium aan  $2 \times 10^6$  cellen/ml in een 24 well plaat (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Duitsland). Stimulatie vond plaats met ConA ( $2,5 \mu\text{g/ml}$ ). Na een incubatieperiode van 48 uur werd het supernatans uit de plaat geïsoleerd en afgedraaid aan 3000 rpm. Ten slotte werd het supernatans hiervan gefilterd en uitverdeeld in fracties van 10 ml voor invriezen bij  $-20^\circ\text{C}$ .

c) Bekomen van een MBP-reactieve T-cel lijn:

Voor actieve immunisatie werden 7 tot 9 weken oude Lewis ratten geïmmuniseerd met behulp van cavia MBP ( $250 \mu\text{g/ml}$ ) in oplossing met *Mycobacterium tuberculosis* ( $2500 \mu\text{g/ml}$ ) in complete Freund's adjuvans (Sigma Aldrich, St Louis, USA). Na intraperitoneale verdoving met Nembutal werd  $200 \mu\text{l}$  van deze oplossing via subcutane injectie in beide achterpoten aangebracht. Negen dagen na immunisatie werd de rat gedecapiteerd en werden de inguinale lymfeknopen geïsoleerd en na verwijdering van overtollig vet opgevangen in koude PBS of RPMI. Door mechanische dissociatie met behulp van een stamper en een zeefje werd hieruit een celsuspensie verkregen. Na celtelling werden de lymfeknoopcellen de eerste maal gestimuleerd met cavia MBP ( $33 \mu\text{g/ml}$ ). De verkregen cellen werden in een 6cm kweekschaal gebracht aan  $7 \times 10^6$  cellen/ml in stimulatiedium. Na 3 dagen in stimulatiedium werden de cellen geharvest en geplaatst aan  $10 \times 10^6$  cellen in een 10cm kweekschaal op groeimedium. Bij overmatige proliferatie werden de cellen gesplitst over meerdere kweekplaten. Na 10 tot 14 dagen vond een restimulatie plaats. Om de T-cel lijn te restimuleren werd er gebruik gemaakt van APC's afkomstig uit de thymus van een Lewis rat. Deze cellen werden na isolatie eerst gepulst met cavia MBP ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) voor 3 uur, vervolgens bestraald ( $3000 \text{ rad}$ ) en aan  $100 \times 10^6$  APC's per  $5 \times 10^6$  T-cellen in een 10cm kweekschaal gebracht met

stimulatiemedium. Voor het uitvoeren van T-cel trafficking studies werden de cellen bij de tweede stimulatie met ConA (2,5µg/ml) in afwezigheid van APC's gestimuleerd.

d) EasySep procedure:

Voor het verkrijgen van CD8<sup>+</sup> myeline reactieve T-cellen werd deze specifieke subset geïsoleerd uit de celsuspensie afkomstig van de inguinale lymfeknoopcellen van een geïmmuniseerde rat. De geïsoleerde lymfeknoopcellen werden aan een concentratie van 1x10<sup>8</sup> cellen/ml gesuspenseerd in een gebufferd medium (PBS + 2% FCS + 1 mM EDTA) in een 12 x 75 ml polystyrene buis. Aan deze suspensie werd een CD32 bindende Fc blocking antilichaam (100µl/ml suspensie, Stemcell technologies, Meylan, Frankrijk) toegevoegd om niet specifieke selectie van monocyten, macrofagen, granulocyten en eosinofielen te verhinderen. Vervolgens vond er een incubatie plaats gedurende 15 minuten met een PE-geconjugerd antilichaam (0,2 mg/ml), CD8 PE (BD Biosciences, Erembodegem, België), dat selectief bond aan de CD8<sup>+</sup> T-cellen in de suspensie. Na een wasstap werd er voor 15 minuten een anti-PE selectie cocktail (100µl/ml suspensie, Stemcell technologies, Meylan, Frankrijk), bestaande uit monoklonale antilichamen bispecifiek voor PE en dextran toegevoegd. Incubatie van 10 minuten met dextran gecoate magnetische nanopartikels (50µl/ml suspensie) maakte vervolgens de isolatie van de CD8<sup>+</sup> celfractie met behulp van de EasySep magneet (Stemcell technologies, Meylan, Frankrijk) mogelijk. De celsuspensie werd gedurende 5 minuten op de EasySep magneet geplaatst. Door de magneet om te keren werd het supernatans en dus de ongewenste celpopulatie (CD8<sup>-</sup>) overgebracht naar een verzamelbuis, terwijl de magnetisch gelabelde CD8<sup>+</sup> cellen door het magnetisch veld van de EasySep magneet weerhouden bleven. De achtergebleven CD8<sup>+</sup> cellen werden opgezuiverd door de stappen met de EasySep magneet een vijftal keren te herhalen. Zuiverheidscontrole vond plaats door middel van flowcytometrie.

### **2.2.2 Analyse fenotypische kenmerken:**

Voor het analyseren van de oppervlakte merkers van de aangewende cellen werd gebruik gemaakt van *fluorescence-activated cell sorting* (FACS). Voor de kleuring van oppervlakte merkers werden de cellen geïncubeerd in de aanwezigheid van gelabelde (FITC, PE, PERCP) monoklonale antilichamen tegen muis IgG1/IgG2a als isotype controle, CD3, CD4, CD8 en CD25 gedurende 30 minuten in FACS-buffer (PBS + 1% FCS + 0.1 % Na-azide). Detectie en analyse van de kleuringen gebeurde met een FACS-Calibur toestel en met Cellquest software (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium).

### **2.2.3 Proliferatie assay:**

De antigenspecificiteit van de MBP-reactieve T-cellijnen werd bepaald door de cellen te onderwerpen aan een proliferatie test. Om de proliferatieve capaciteit te meten werd gebruik gemaakt van een klassieke <sup>3</sup>H-thymidine incorporatie assay. De T-cellen (20.000 T-cellen/well) werden gestimuleerd met behulp van APC's (200.000 APC's/well) in een 96 well plaat met ronde bodem (Nunc, Roskilde, Denemarken). Deze APC's werden gedurende 3 uur gepulst met cavia-MBP (100µg/ml) waarna ze bestraald (3000 rad) werden. Drie dagen na de stimulatie werden de cellen geïncubeerd met 1µCi <sup>3</sup>H-thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK). Na een incubatieperiode van ongeveer 16 uur werd de plaat geharvest met een automatische celharvester (Pharmacia, Uppsala, Zweden). Vervolgens werd de hoeveelheid ingebouwde radioactiviteit gemeten met een Beta-plaat scintillatie teller (Wallac, Turku, Finland) en kon de stimulatie index bepaald worden. Wanneer deze groter was dan 3 werd een T-celijn als antigenspecifiek beschouwd.

### **2.2.4 Cellabeling:**

#### a) Magnetische labelling:

Voor het uitvoeren van de labelling dienden de T-cellen gedurende 2-3 dagen geactiveerd te worden met ConA (2,5µg/ml) of MBP (100µg/ml). Deze geactiveerde T-cellen werden na telling opgelost aan  $4 \times 10^6$  cellen per ml groeimedum in een 24 well plaat. De SPIO-PLL oplossing bestaande uit RPMI met 800µg/ml SPIO + 2µg/ml PLL + 1% niet-essentiële

---

aminozuren + 1% natrium pyruvaat werd gemixt in een rotator gedurende 30 minuten. Vervolgens werd de SPIO-PLL oplossing aan een verhouding van 1:1 toegevoegd aan de T-cellen. Als negatieve controle werd in de plaats van de SPIO oplossing cultuurmedium zonder Cas toegevoegd. Na een incubatietijd van ongeveer 17 uur werden de cellen 3 maal gewassen in PBS. Tenslotte werden de gelabelde en de niet gelabelde cellen geresuspendeerd aan  $2 \times 10^6$  cellen per ml kweekmedium. In dit project vond er een optimalisatie plaats van de T-cellabeling waarbij verschillende concentraties aan SPIO en PLL gebruikt werden. Hier wordt enkel de optimale concentratie beschreven.

b) Fixatie van gelabelde cellen:

Om een hechting van de T-cellen aan de ronde dekglasjes ( $\varnothing=12\text{mm}$ ) te bekomen, dienden deze gecoat te worden met PLL. Hiervoor werden ze gedurende 60 minuten in een 10% PLL oplossing gebracht. Na spoeling met  $\text{H}_2\text{O}$  werden ze aan de lucht gedroogd. Vervolgens werden de T-cellen aan een concentratie van  $2 \times 10^6$  cellen / ml aangebracht. Na een incubatie periode van 60 minuten werden de cellen op de dekglasjes verder gefixeerd door ze gedurende 30 minuten op unifix (Klinipath, Turnhout, België) te brengen. Tenslotte werden niet bindende resten van de glaasjes afgespoeld met PBS. De preparaten werden vervolgens geanalyseerd door middel van een histologische kleuring.

c) Histologische kleuring:

De gefixeerde cellen werden gedurende 60 min geïncubeerd met een 2% kalium-ferrocyanide (Merck, Darmstadt, Duitsland) in een 2% waterstofchloride oplossing voor Prussian Blue (PB) kleuring. Na enkele wasstappen met PBS kon de PB kleuring versterkt worden met Diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich, St- Louis, USA). Gedurende 2 tot 5 min werden de glaasjes gebracht in een oplossing met 0,014 % DAB en 0,03% waterstofperoxide. Tenslotte vond er na enkele wasstappen met PBS een kernkleuring plaats met Mayer's hematoxyline (Merck, Darmstadt, Duitsland). Voor de preservatie werden de dekglasjes bevestigd op microscoopglasjes door middel van aquatex (Merck, Darmstadt, Duitsland) .

### **2.2.5 Adoptieve transfer:**

Voor het uitvoeren van adoptieve transfer studies met MBP reactieve T-cellen werd gebruik gemaakt van 10 tot 12 weken oude vrouwelijke Lewis ratten. Zowel de ongelabelde als gelabelde MBP reactieve T-cellen werden opgelost aan  $20 \times 10^6$  cellen in 200  $\mu$ l PBS. Vervolgens werden de cellen per conditie via een intraperitoneale injectie in de Lewis ratten gebracht. De dieren werden vervolgens dagelijks onderzocht op gewichtsverlies en klinische symptomen. De klinische symptomen werden als volgt gescoord: 0 = geen symptomen; 1 = gedeeltelijk verlies van staart toniciteit; 2 = verlies van staart toniciteit, moeite met rechtop staan; 3 = wankel gang en milde paralyse; 4 = paralyse van de achterpoten en incontinentie; 5 = stervende of dood.

### **2.2.6 Atomic absorption spectroscopy (AAS):**

Na labelling werden de cellen gewassen met PBS en geteld. Vervolgens werd in een 14 ml buis aan  $6 \times 10^5$  cellen opgelost in 2 ml PBS. Eén milliliter bestaande uit 65% HNO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) en 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany) werd toegevoegd. De oplossing werd geïncubeerd voor 24 uur om de cellen te laten lyseren. Het aggregaat werd vervolgens gefilterd en het ijzergehalte werd gemeten met *atomic absorption spectroscopy* (Solaar, Unicam, Cambridge, UK).

### **2.2.7. Magnetic resonance imaging (MRI):**

#### a) Preparatie van de stalen voor MRI:

Voor visualisatie van de gelabelde cellen werd gebruik gemaakt van capillairen ( $\varnothing=1,8$ mm, L=10 cm). In de capillairen werden  $3 \times 10^4$  gelabelde/niet gelabelde cellen, opgelost in 30  $\mu$ l PBS, aangebracht.

Voor visualisatie van de gelabelde cellen in het CZS van de geïmmuniseerde ratten (adoptieve transfer) werden deze bij het optreden van de eerste klinische symptomen gedecapiteerd en werden de hersenen en het ruggenmerg geïsoleerd. Deze laatste werd opgedeeld in drie stukken (3cm).

b) Gebruikte parameters voor analyse van de stalen met MRI:

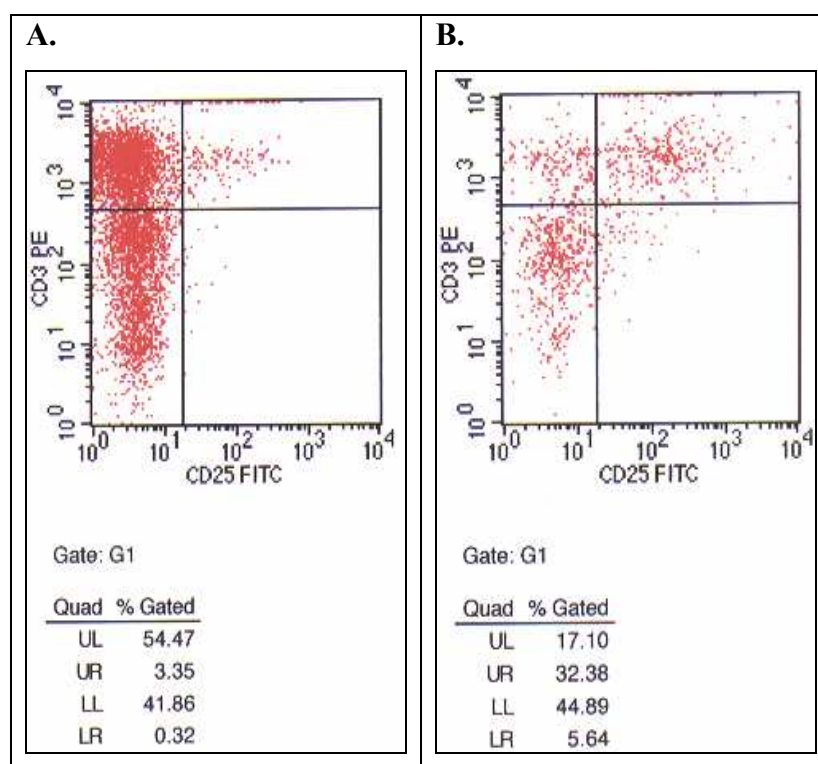
De stalen werden onderzocht in drie orthogonale vlakken met een Varian (Varian, Nuclear Magnetic Resonance Instruments, Palo Alto, California, USA) Inova 400 spectrometer (9,4 Tesla) gebruik makend van een *multislice spin-warp technique* en een *imaging probe* van 25 mm in diameter. Om de voordelen van sensitiviteit en resolutie van hoge resolutie MRI te combineren met een optimaal contrast voor T2 gewogen beelden, werd een repetitietijd (TR) van 2500 milliseconden en een echartijd (TE) van 60 milliseconden gebruikt. Voor de transversale beelden werden slices gemaakt met een dikte van 1,1 tot 2 mm en een field of view (FOV) van 25x25 voor hersenen en capillairen en 9x9 voor ruggenmerg. Voor saggitale en coronale beelden werden slices gemaakt met een dikte van 1,1 tot 2 mm en een field of view (FOV) van 35x25 voor capillairen en 35x9 voor ruggenmerg. Voor de lineaire veldgradiënten werden waarden van  $\pm 8\text{G/cm}$ ,  $6\text{G/cm}$  en  $7\text{G/cm}$  respectievelijk voor de *read*, *phase* en *slice* gradiënt.



### 3. RESULTATEN:

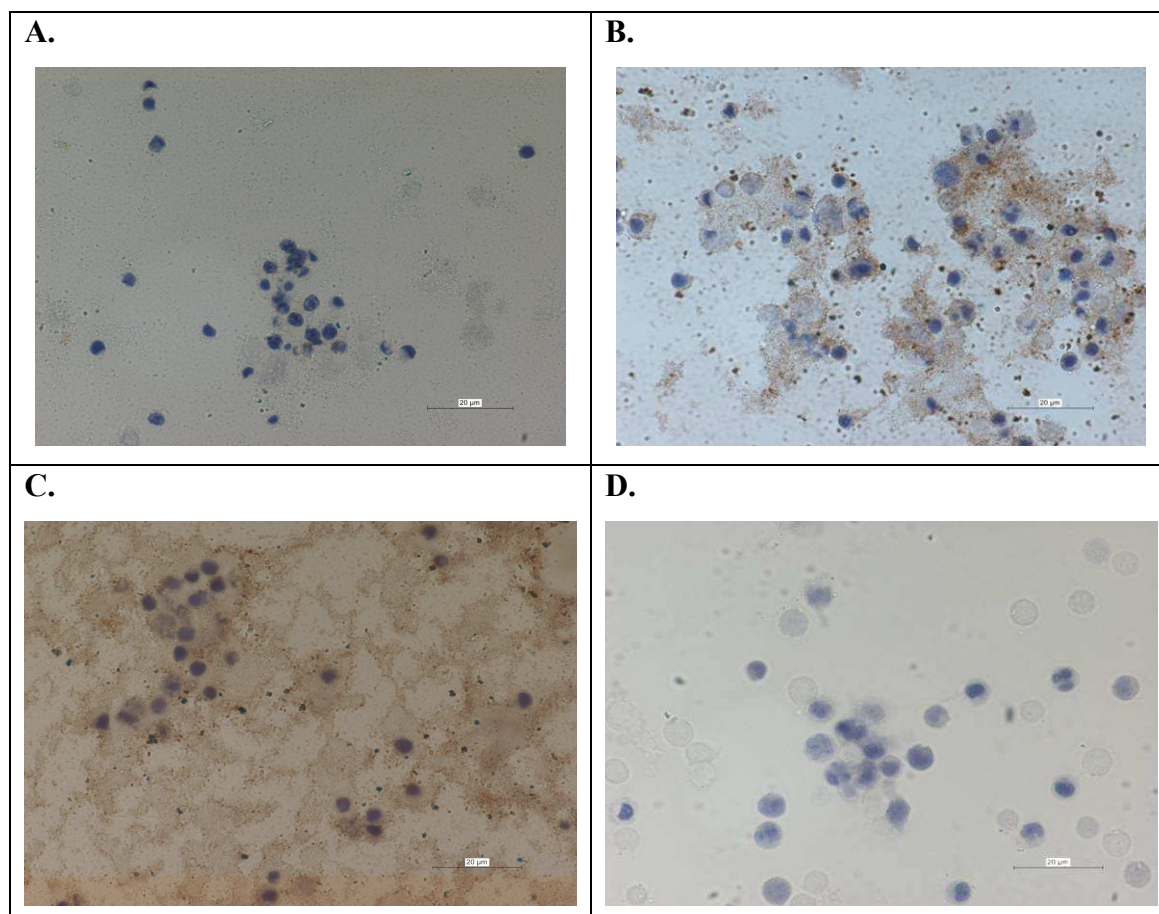
#### 3.1 Optimalisatie van detectie van SPIO gelabelde T-cellen met histologische kleuring:

Voor het aantonen van de SPIO partikels werden verschillende methoden getest. Hierbij werd een vergelijking gemaakt tussen een aankleuring met de ijzerkleuring Prussian Blue (PB) en de ijzeraankleuring PB versterkt met DAB. Om aspecifieke kleuringen te voorkomen werden een aankleuring met enkel DAB en de aankleuring van niet gelabelde cellen als controle ingebouwd. Voor de labelling werd gebruik gemaakt van thymocyten geïsoleerd uit een Lewis rat. Alvorens de cellen te labelen moesten ze eerst geactiveerd worden waardoor een betere opname van de SPIO partikels werd bereikt. Dit werd bewerkstelligd door een incubatieperiode van 3 dagen met ConA. De activatie werd geverifieerd door middel van een CD3 PE / CD25 FITC FACS kleuring (figuur 4).



**Figuur 4:** Flowcytometrische analyse van de dubbelkleuring CD3 PE /CD25 FITC van thymocyten gestimuleerd met ConA. **A:** kleuring van de thymocyten op dag 0 van de stimulatie, **B:** kleuring van de thymocyten op dag 3 van de stimulatie.

Uit de resultaten kon een duidelijk toegenomen activatie van de thymocyten waargenomen worden na stimulatie met ConA. Op dag 3 van de stimulatie bleek ongeveer 65,4% van de T-cellen geactiveerd te zijn ten opzichte van 5% op dag 1. Na de stimulatie met ConA werden de thymocyten gelabeld met een SPIO-oplossing bestaande uit 50µg/ml SPIO en 3µg/ml PLL. De hiervoor gehanteerde waarden werden overgenomen uit een studie met muizen T-cellen [46]. Het resultaat van de verschillende aankleuringen wordt afgebeeld op figuur 2. Een aankleuring met enkel PB resulteert in een fel blauwe aankleuring van de gelabelde thymocyten (figuur 2A). Een versterking met DAB zorgde door een bijkomende bruinkleuring voor een verbeterde detecteerbaarheid van de gelabelde cellen (figuur 2B). Aspecifieke kleuring kan worden uitgesloten aangezien er geen aankleuring van niet gelabelde cellen kan worden vastgesteld alsook de aankleuring met enkel DAB negatief is (figuur 2C, D).

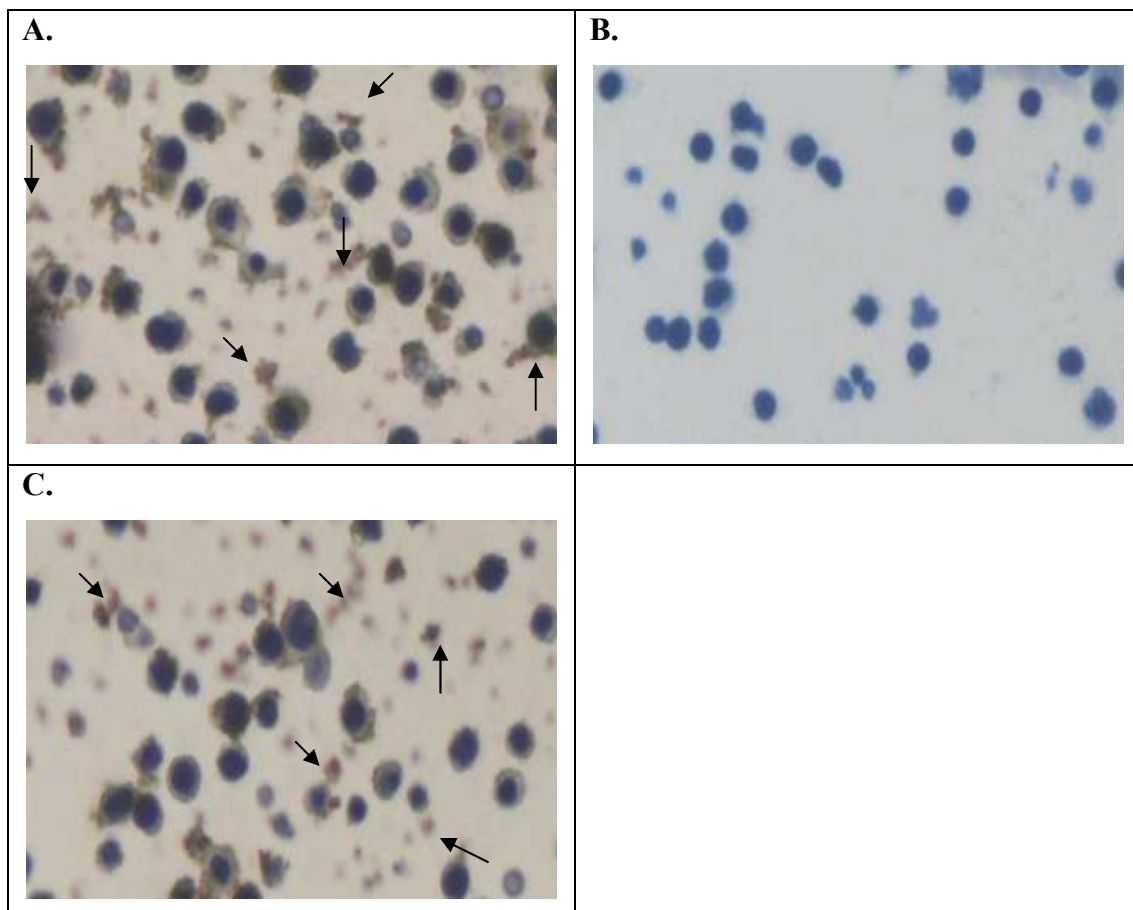


**Figuur 2:** Het uitvoeren van een ijzeraankleuring van (on)gelabelde thymocyten (50µg/ml SPIO en 3µg/ml PLL). **A:** aankleuring van gelabelde thymocyten met Prussian Blue, **B:** Prussian Blue aankleuring versterkt met DAB van gelabelde thymocyten, **C:** DAB aankleuring van gelabelde thymocyten (controle), **D:** aankleuring van niet gelabelde thymocyten (controle). Cellen werden voor labelling gestimuleerd met ConA voor 3 dagen.

### 3.2 Optimalisatie cellabelling met paramagnetische SPIO partikels:

#### 3.2.1 Toepassing van eerder beschreven labellingsconcentratie:

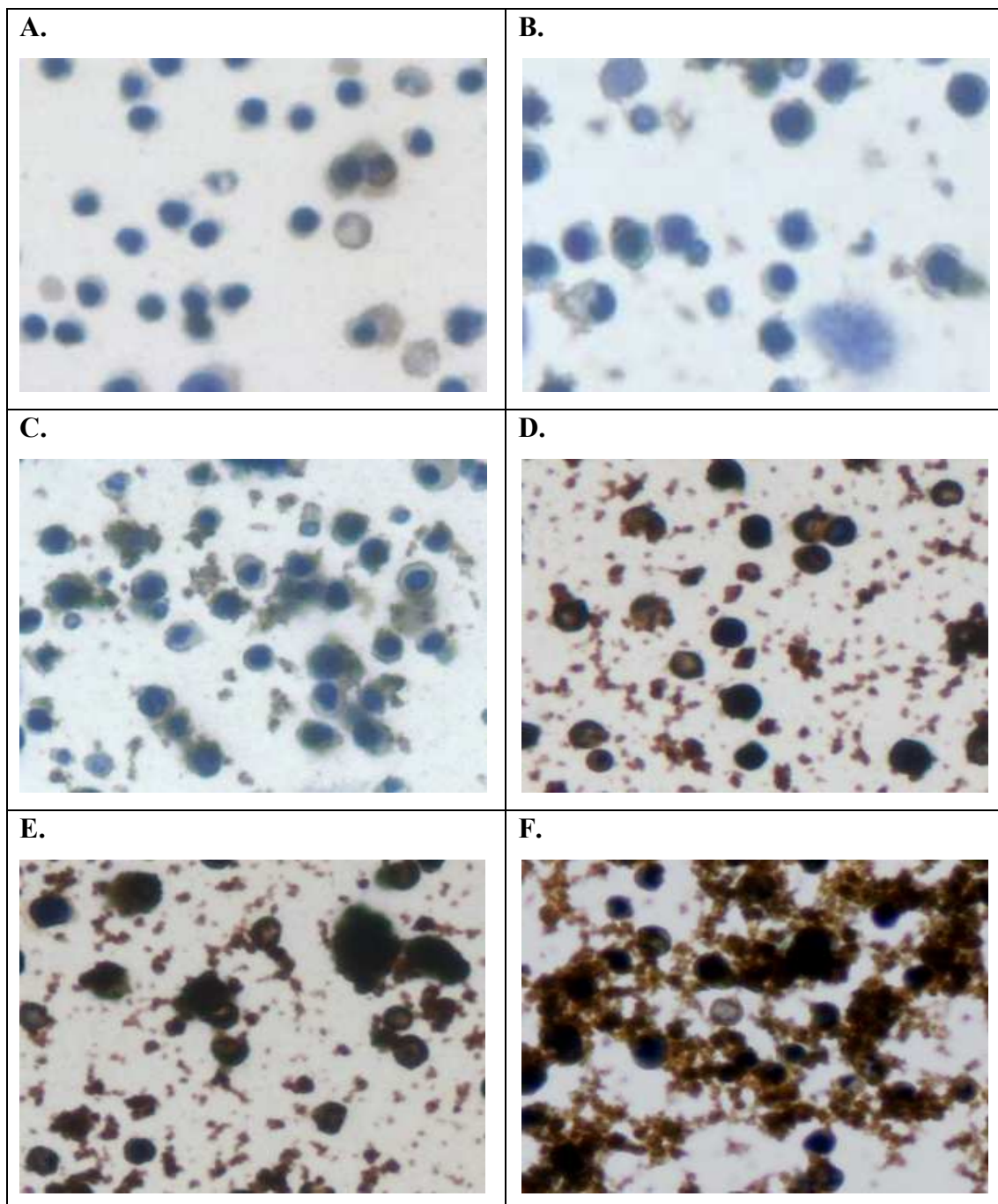
De labelling van T-cellen werd geoptimaliseerd op thymocyten verkregen uit de thymus van een Lewis rat. Na een stimulatieperiode van 3 dagen met ConA werden de thymocyten gelabeld met een SPIO-PLL oplossing bestaande uit 50 $\mu$ g/ml SPIO en 3 $\mu$ g/ml PLL. De labellingsefficiëntie werd geverifieerd door een PB ijzerkleuring enhanced met DAB (figuur 3A). Resultaten geven aan dat naar schatting 60% van de thymocyten gelabeld zijn en daarenboven zijn veel vrije SPIO-PLL complexen aanwezig tussen de cellen. Deze vrije SPIO-PLL complexen konden niet verwijderd worden door een toename van het aantal wasstappen (figuur 3C), noch door uitvoering van een dichtheitsgradiënt centrifugatie.



**Figuur 3:** Het uitvoeren van een PB ijzeraankleuring versterkt met DAB van thymocyten (50 $\mu$ g/ml SPIO en 3 $\mu$ g/ml PLL). **A:** gelabelde thymocyten, **B:** ongelabelde thymocyten, **C:** gelabelde thymocyten na uitvoering van bijkomende wasstappen met PBS. Cellen werden voor labelling gestimuleerd met ConA voor 3 dagen. De vrije SPIO-PLL complexen worden in de figuren 2A en 2C aangetoond door middel van pijltjes.

### 3.2.2 Optimalisatie van PLL concentratie:

Om te komen tot een oplossing voor de aanwezigheid van vrije SPIO-PLL complexen, werd de PLL concentratie van de originele labellingsoplossing gewijzigd. Het effect van zowel een daling als een stijging in PLL concentratie werd nagegaan. Met de volgende condities werden thymocyten gelabeld; 50µg/ml SPIO + 0 /1 /2 /4 /5 /10µg/ml PLL. De labelingefficiëntie werd geverifieerd door een PB ijzerkleuring versterkt met DAB (figuur 4). Een verlaging van de hoeveelheid PLL zorgde voor een vermindering in vrije SPIO-PLL complexen maar resulteerde bovendien ook in een verlaging van de labellingsgraad (figuur 4 B/C). Een verhoging van de hoeveelheid PLL zorgde echter voor een toename in vrije complexen (figuur 4 E/F). Het werken zonder PLL leidde tot de afwezigheid van vrije complexen maar had als gevolg dat het aantal gelabelde cellen laag was.



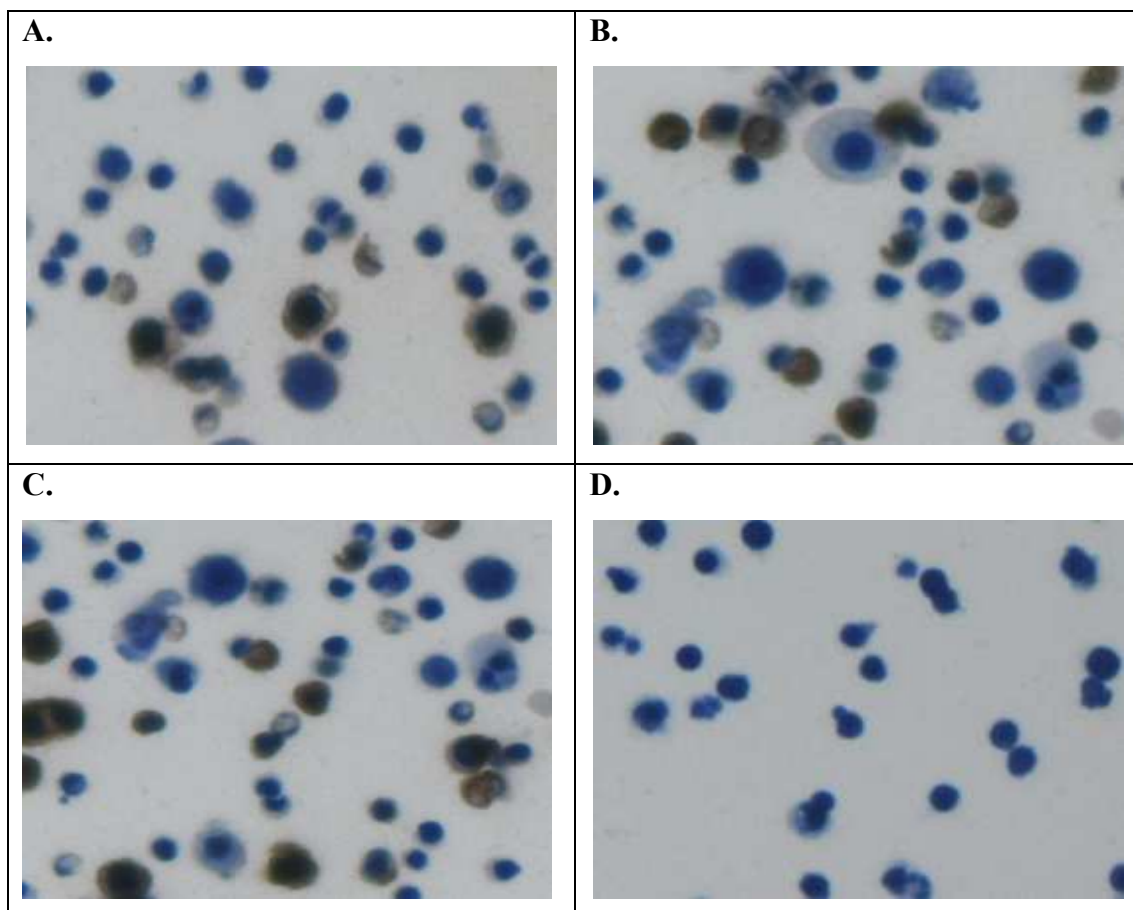
**Figuur 4:** Het uitvoeren van een PB ijzeraankleuring versterkt met DAB van gelabelde thymocyten. Thymocyten werden gelabeld met 50µg/ml SPIO en een variabele hoeveelheid PLL **A:** 0µg/ml PLL, **B:** 1µg/ml PLL, **C:** 2µg/ml PLL, **D:** 4µg/ml PLL, **E:** 5µg/ml PLL, **F:** 10µg/ml PLL. Cellen werden voor labelling gestimuleerd met ConA voor 3 dagen.



### 3.2.3 Optimalisatie van SPIO concentratie bij verschillende PLL hoeveelheden:

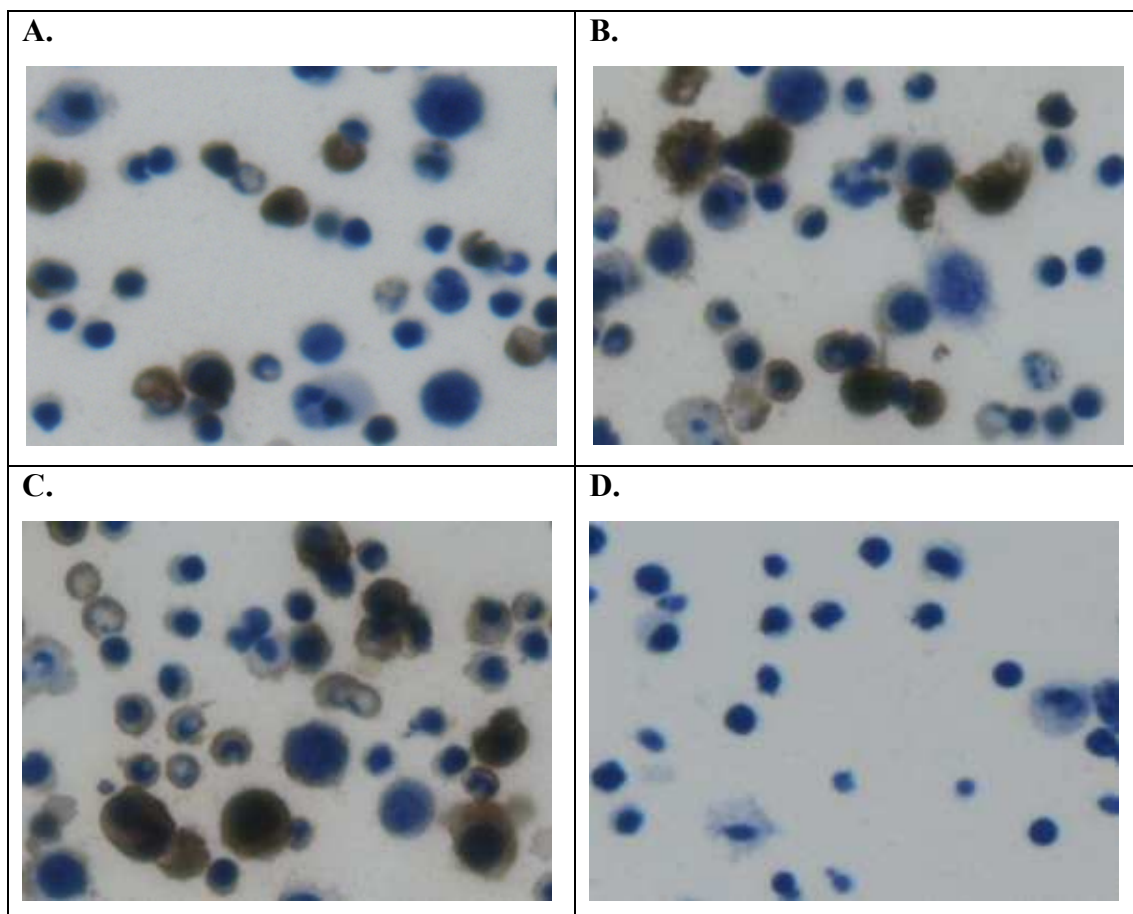
Om te komen tot een toename in labellingsgraad zonder vrije SPIO-PLL complexen, werden er wijzigingen aangebracht in de concentratie SPIO bij lage PLL concentraties in de labellingsoplossing.

Aangezien een labelling bij afwezigheid van PLL resulteerde in het uitblijven van de vrije SPIO-PLL complexen, werd getracht de hiermee gepaard gaande daling in labellingsgraad te compenseren door een verhoging in SPIO concentratie (figuur 8). De thymocyten werden met de volgende oplossingen gelabeld; 200/400/800 $\mu$ g/ml SPIO. Het resultaat was een beperkte toename van het aantal gelabelde cellen bij stijging van de SPIO concentratie. Er werd een labellingsgraad respectievelijk voor de 3 condities gevonden van naar schatting 10%, 25% en 40%. Bovendien bleven de vrije SPIO-PLL complexen afwezig.



**Figuur 8:** Het uitvoeren van een PB ijzeraankleuring versterkt met DAB van (on)gelabelde thymocyten. **A:** thymocyten gelabeld met 200 $\mu$ g/ml SPIO en 0 $\mu$ g/ml PLL, **B:** thymocyten gelabeld met 400 $\mu$ g/ml SPIO en 0 $\mu$ g/ml PLL, **C:** thymocyten gelabeld met 800 $\mu$ g/ml SPIO en 0 $\mu$ g/ml PLL, **D:** ongelabelde thymocyten. Cellen werden voor labelling gestimuleerd met ConA voor 3 dagen.

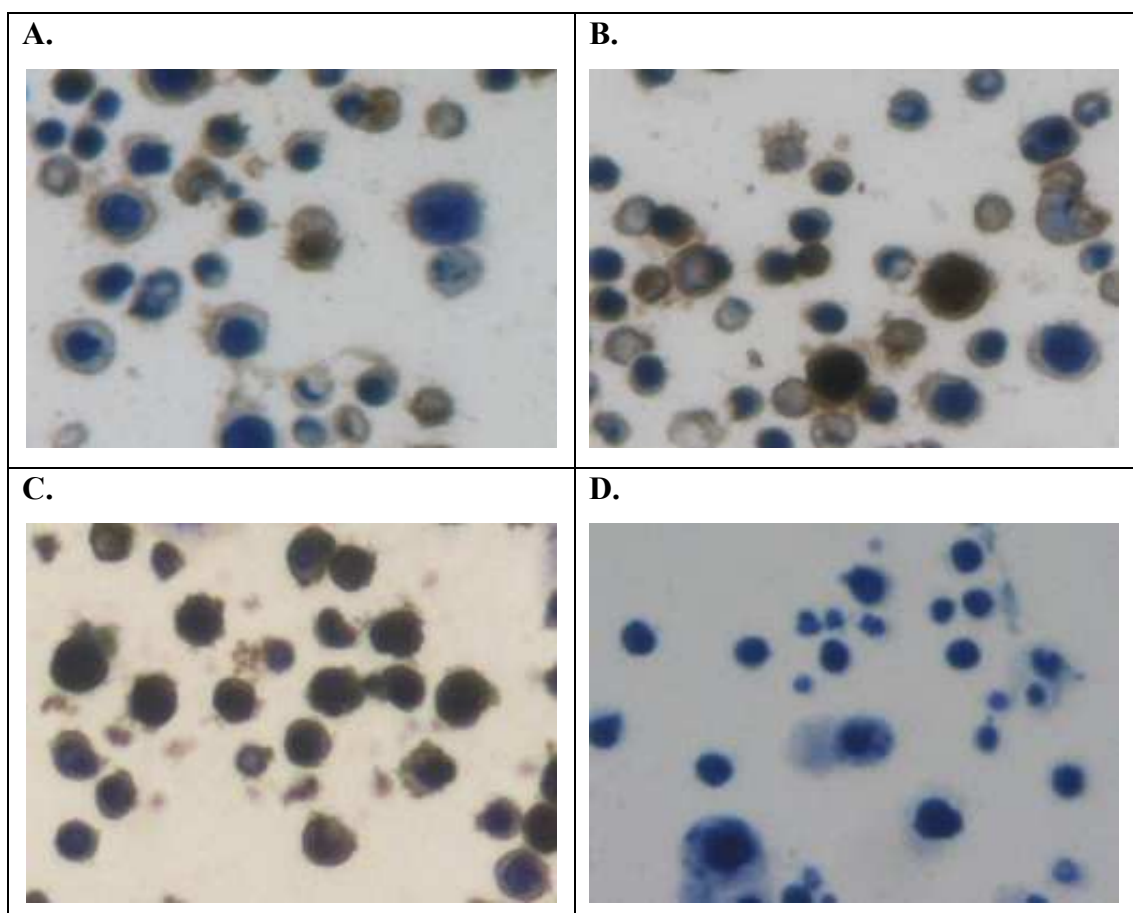
Omdat een toename in SPIO concentratie bij afwezigheid van PLL niet tot het gewenste effect leidde (>60% labellingsgraad), werd de combinatie van een lage PLL concentratie getest bij hogere SPIO concentraties (figuur 9). De thymocyten werden met de volgende condities gelabeld; 200/400/800 $\mu$ g/ml SPIO + 1 $\mu$ g/ml PLL. Dit resulteerde in een toename van de labellingsgraad bij stijging van de SPIO concentratie. Er werd een labellingsgraad respectievelijk voor de 3 condities gevonden van naar schatting 30%,50% en 65%. Weerom zijn er geen vrije SPIO-PLL complexen te bemerken.



**Figuur 9:** Het uitvoeren van een PB ijzeraankleuring versterkt met DAB van (on)gelabelde thymocyten. **A:** thymocyten gelabeld met 200 $\mu$ g/ml SPIO en 1 $\mu$ g/ml PLL, **B:** thymocyten gelabeld met 400 $\mu$ g/ml SPIO en 1 $\mu$ g/ml PLL, **C:** thymocyten gelabeld met 800 $\mu$ g/ml SPIO en 1 $\mu$ g/ml PLL, **D:** ongelabelde thymocyten. Cellen werden voor labelling gestimuleerd met ConA voor 3 dagen.

Om nog tot een hogere labellingsgraad te komen in vergelijking met die uit de literatuur, werd een tweede verhoging in PLL concentratie uitgevoerd (figuur 10). Voor labelling van thymocyten werden de volgende oplossingen gebruikt; 200/400/800 $\mu$ g/ml + 2 $\mu$ g/ml PLL. Dit resulteerde in een toename van de labellingsgraad bij stijging van de SPIO concentratie. Er werd een labellingsgraad respectievelijk voor de 3 condities gevonden van naar schatting 50%,60% en 80%. De SPIO-PLL complexen komen slecht in lage aantallen voor.

Aangezien een verdere verhoging in PLL concentratie zou leiden tot een meer significante toename van de ongewenste vrije SPIO-PLL complexen, wordt de laatste labellingsconditie (800 $\mu$ g/ml SPIO + 2 $\mu$ g/ml PLL) als optimaal beschouwd.

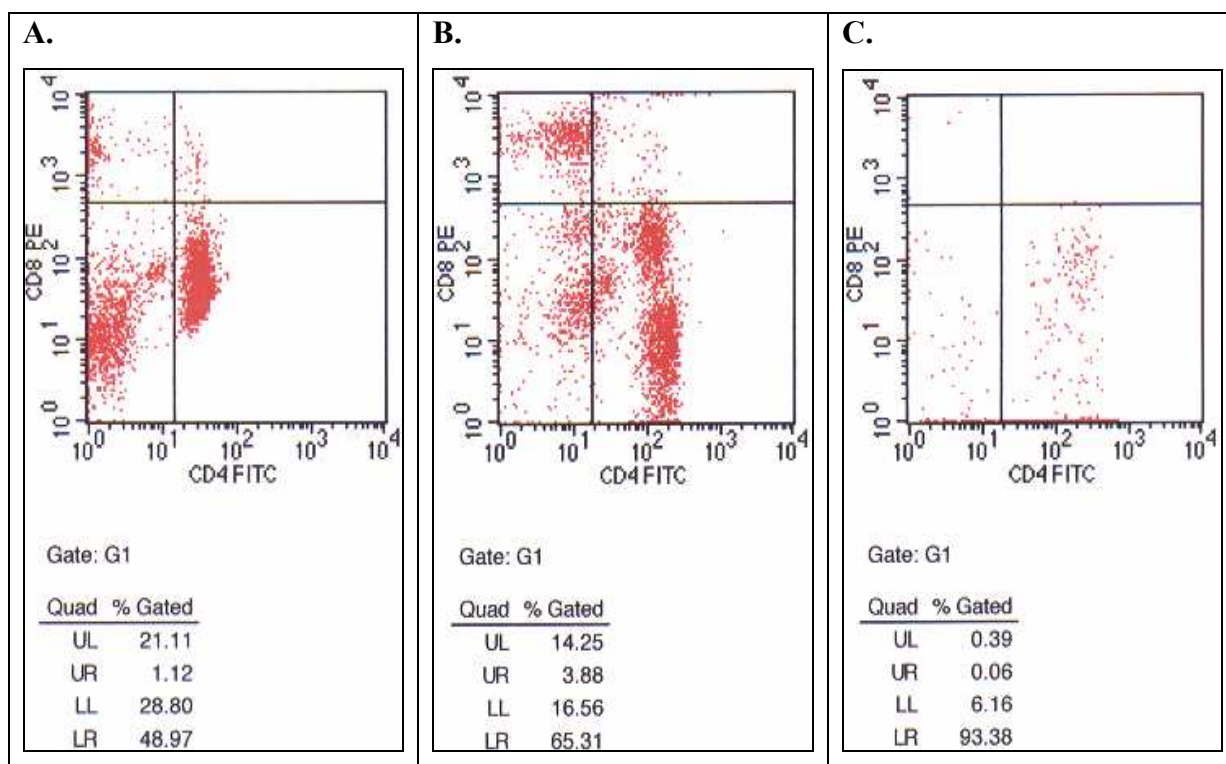


**Figuur 10:** Het uitvoeren van een PB ijzeraankleuring versterkt met DAB van (on)gelabelde thymocyten. **A:** thymocyten gelabeld met 200 $\mu$ g/ml SPIO en 2 $\mu$ g/ml PLL, **B:** thymocyten gelabeld met 400 $\mu$ g/ml SPIO en 2 $\mu$ g/ml PLL, **C:** thymocyten gelabeld met 800 $\mu$ g/ml SPIO en 2 $\mu$ g/ml PLL, **D:** ongelabelde thymocyten. Cellen werden voor labelling gestimuleerd met ConA voor 3 dagen.



### 3.3 Isolatie en karakterisatie van CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> myeline-reactieve T-cellijnen:

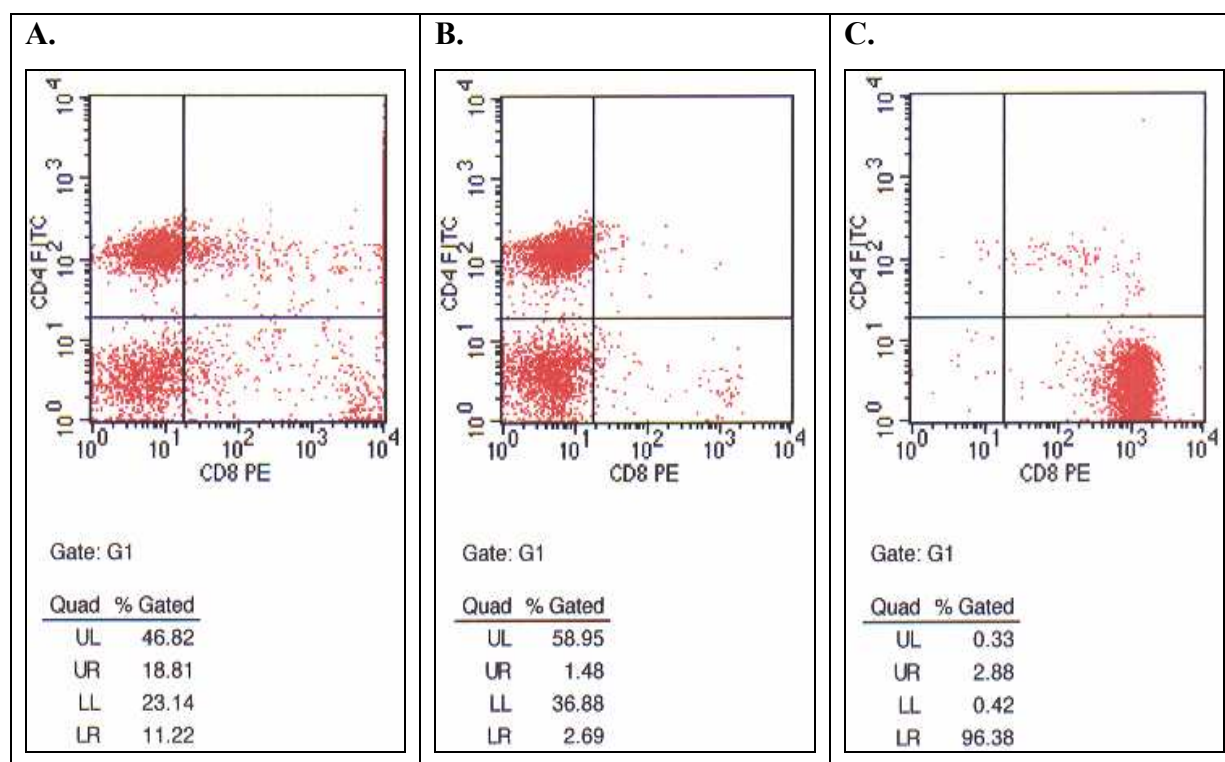
Voor de isolatie van MBP-reactieve T-cellen werden telkens 2 vrouwelijke Lewis ratten (7-9 weken oud) geïmmuniseerd met cavia MBP in oplossing met *Mycobacterium tuberculosis* in compleet Freund's adjuvans. Na 9 dagen werden de inguinale lymfeknopen geïsoleerd en werden de oppervlaktemerkers van de verkregen celpopulatie geanalyseerd door middel van flowcytometrie. Eerdere studies toonden aan dat het cultiveren van de lymfeknooppellen van ratten geïmmuniseerd met MBP steeds leidt tot een aanrijking van de CD4<sup>+</sup> celpopulatie. Ook in deze studie kon een aanrijking worden vastgesteld (figuur 12). Aanvankelijk bestond de lymfeknoopp celpopulatie voor ongeveer 49% uit CD4<sup>+</sup> en 21,1% CD8<sup>+</sup>. Na 14 dagen is dit geëvolueerd tot 93,4% uit CD4<sup>+</sup> en 0,4% CD8<sup>+</sup>.



**Figuur 11:** Flowcytometrische analyse gedurende 14 dagen van de CD4<sup>+</sup> FITC/CD8<sup>+</sup> PE dubbelkleuring van een ongezuiverde lymfeknoopp celpopulatie 9 dagen na immunisatie met MBP. **A:** kleuring op dag 0, **B:** kleuring op dag 3, **C:** kleuring op dag 14.

Aangezien bij het induceren van EAE door middel van passieve immunisatie verschillende klinische manifestaties optreden naargelang er gebruik gemaakt wordt van CD4<sup>+</sup> of CD8<sup>+</sup> myeline-reactieve T-cellen, werd er een CD8<sup>+</sup> Easysep isolatie uitgevoerd voor het verkrijgen

van CD4<sup>+</sup> en van CD8<sup>+</sup> celfracties uit een lymfeknoop celpopulatie. De zuiverheid van elke celfractie werd vervolgens door een CD4<sup>+</sup> FITC/CD8<sup>+</sup> PE FACS kleuring geanalyseerd. Uit deze resultaten blijkt het merendeel van de lymfeknoopcellen al bij isolatie CD4<sup>+</sup> te zijn (figuur 12). Van de ongezuiverde lymfeknoop celpopulatie is ongeveer 46,9% CD4<sup>+</sup>, 11,2% CD8<sup>+</sup> en 18,8% dubbel positief. Het kleine percentage aan CD8<sup>+</sup> kan echter met een grote zuiverheid worden geïsoleerd door gebruik te maken van de Easysep methode. Van de CD8 geïsoleerde lymfeknoop fractie is 0,3% CD4<sup>+</sup> en 96,4% CD8<sup>+</sup>. De CD8 gedepleteerde fractie bestaat uit 59% CD4<sup>+</sup> en 2,7% CD8<sup>+</sup>.



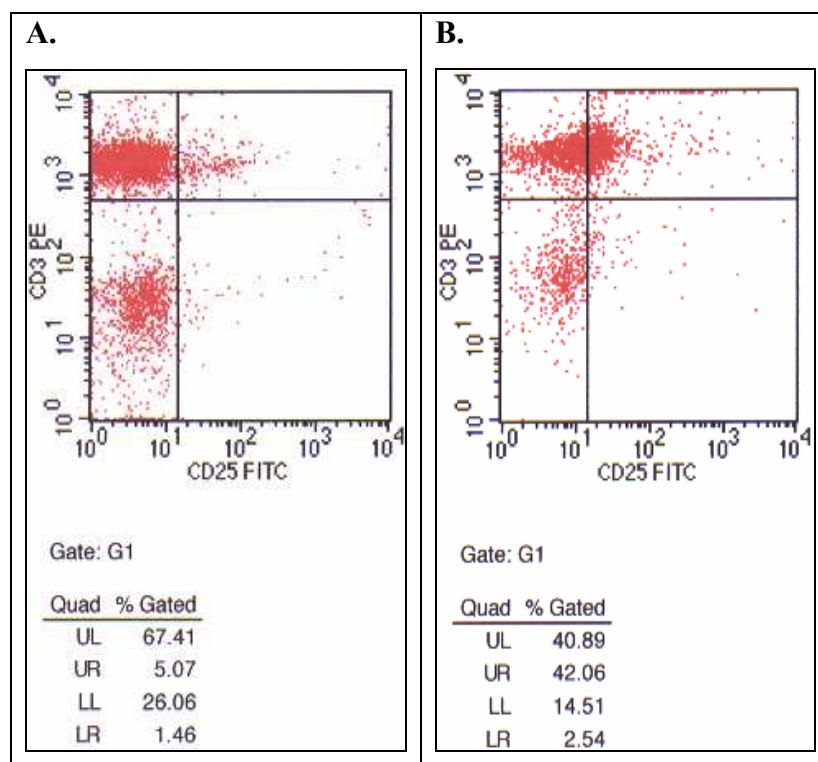
**Figuur 12:** Flowcytometrische analyse van de CD4<sup>+</sup> FITC/CD8<sup>+</sup> PE dubbelkleuring van lymfeknoopcellen en de gedepleteerde celfracties 9 dagen na immunisatie met MBP. A: de ongezuiverde lymfeknoop celpopulatie, B: de CD8 gedepleteerde lymfeknoop fractie, C: de CD8 geïsoleerde lymfeknoop fractie.

De MBP specificiteit van de geïsoleerde lymfeknoop cellen werd bepaald door middel van een proliferatie assay. Voor de lymfeknoop celpopulaties waarbij een verdere opzuivering van de CD8<sup>+</sup> fractie was uitgevoerd werd de MBP specificiteit van zowel de opgezuiverde als de overblijvende CD8 gedepleteerde fractie geanalyseerd. Enkel bij een stimulatie index hoger dan 3 werden de cellen als MBP reactief beschouwd. Bij het uitvoeren van een proliferatie assay op de CD8<sup>+</sup> fractie werd telkens geen SI hoger dan 3 vastgesteld. Een verklaring

hiervoor is te vinden in de hoge letaliteit die de cellen in kweek vertoonden. Deze cellen werden dan ook niet verder gebruikt in het vervolg van deze studie. Voor één lymfeknoep celpopulatie gedepleteerd van CD8<sup>+</sup> cellen werd een SI index van 10,3 bereikt. De proliferatie index van een ongezuiverde lymfeknoep celpopulatie bedroeg 45,7. Beide isolaties werden beschouwd als zijnde MBP reactief.

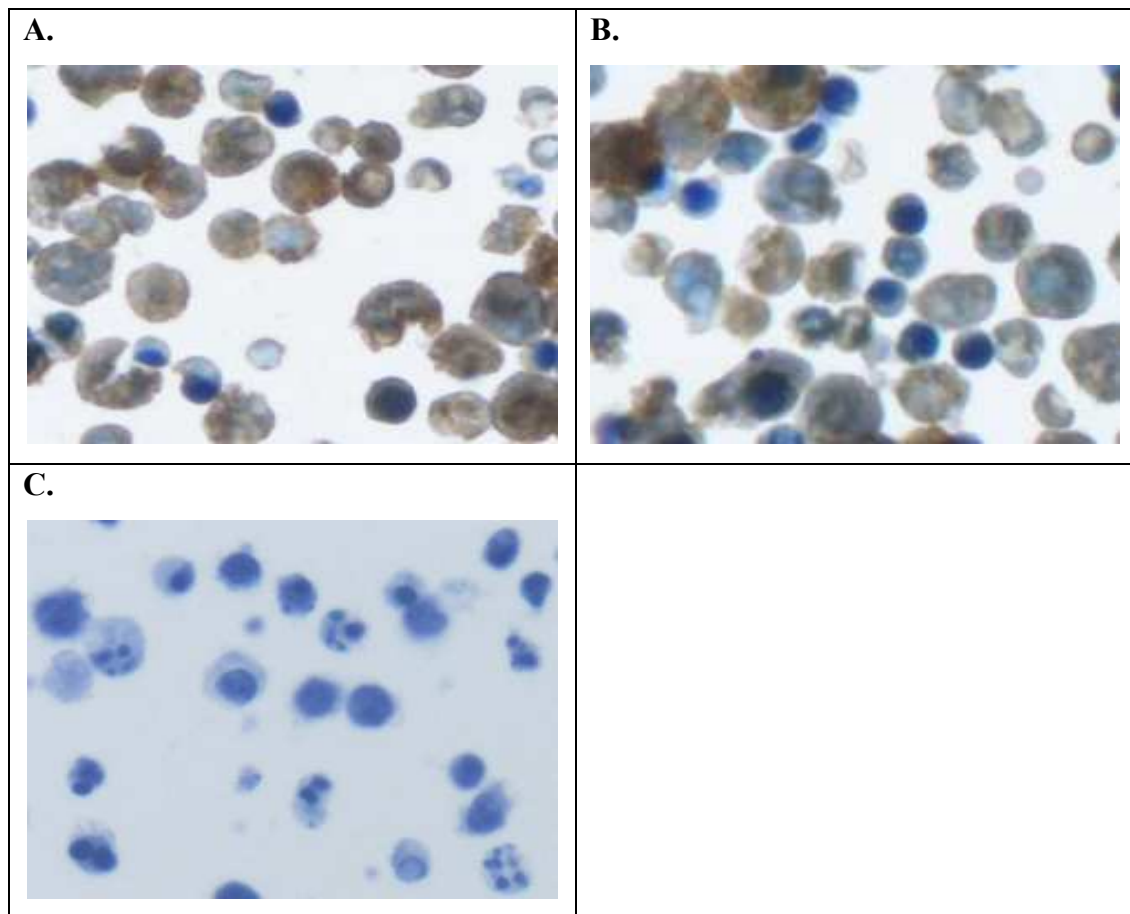
### 3.4 Labelling van myeline-reactieve T-cellijnen:

Na te zijn gekomen tot een optimale labellingsconcentratie werd de SPIO opname capaciteit van MBP-reactieve T-cellen getest. Hiervoor werden MBP-reactieve T-cellen gedurende 3 dagen gestimuleerd met MBP. Om de graad van activatie te bepalen, werd een CD3 PE / CD25 FITC FACS kleuring uitgevoerd (figuur 13). Hierbij kon een duidelijk verschil in activatie van de cellen worden vastgesteld. Op dag 3 van de stimulatie bleek ongeveer 50,7% van de T-cellen geactiveerd te zijn ten opzichte van 6% op dag 1.



**Figuur 13:** Flowcytometrische analyse van de CD3 PE/CD25 FITC dubbelkleuring van MBP-reactieve T-cellen gestimuleerd met MBP. **A:** kleuring van de T-cellen op dag 1 van de stimulatie, **B:** kleuring van de T-cellen op dag 3 van de stimulatie.

Na stimulatie werden de MBP-reactieve T-cellen gelabeld met een SPIO oplossing bestaande uit 800 $\mu$ g SPIO en 2 $\mu$ g PLL (figuur 14A). Naar schatting bleek ongeveer 80% van de MBP-reactieve cellen gelabeld te zijn. Bovendien werd er nagegaan of de MBP-reactieve T-cellen een week na labelling de opgenomen SPIO partikels nog bevatten (figuur 14B). Hierbij kon worden vastgesteld dat ook 7 dagen na labelling nog steeds gelabelde cellen in de cultuur aanwezig waren maar dat het percentage aan gelabelde cellen was afgenomen.

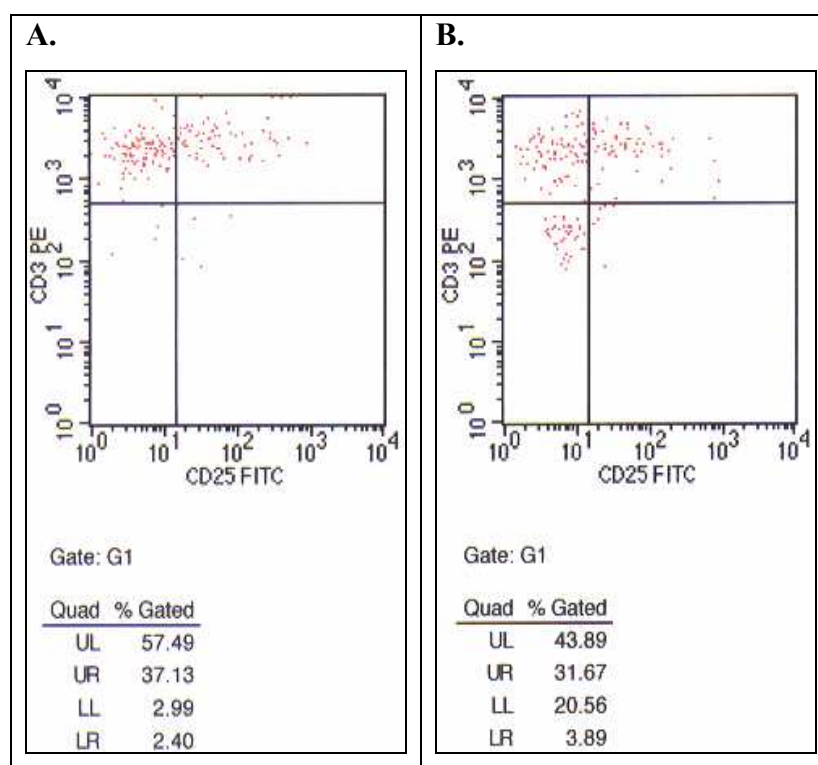


**Figuur 14:** Het uitvoeren van een PB ijzeraankleuring versterkt met DAB van (on)gelabelde MBP-reactieve T-cellen. **A:** MBP-reactieve T-cellen gelabeld met 800 $\mu$ g/ml SPIO en 2 $\mu$ g/ml PLL, **B:** MBP-reactieve T-cellen gelabeld met 800 $\mu$ g/ml SPIO en 2 $\mu$ g/ml PLL (kleuring na 7 dagen in kweek), **C:** ongelabelde MBP-reactieve T-cellen. Cellen werden voor labelling gestimuleerd met MBP voor 3 dagen.

Om te achterhalen of de cellabelling enig effect had op de activatie van de MBP-reactieve T-cellen werd er 7 dagen na labelling (10 dagen na stimulatie met MBP) een CD3 PE / CD25 FITC FACS kleuring uitgevoerd (figuur 15). Er is nagenoeg geen verschil tussen de

ongelabelde (figuur 15A) en gelabelde cellen (figuur 15B) wat betreft het percentage geactiveerde T-cellen, respectievelijk 39,24% en 41,9%. Dit experiment kon echter tot op heden slechts 1 malig uitgevoerd worden.

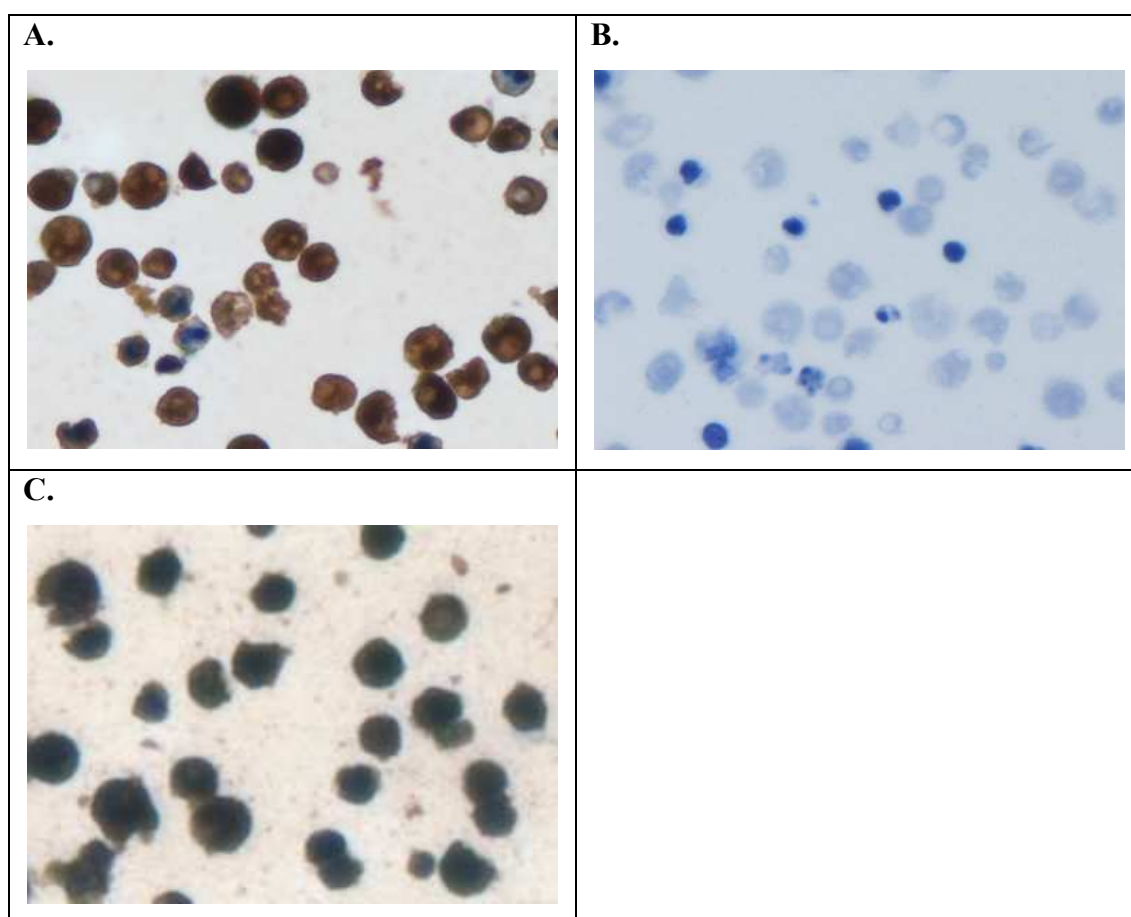
In een nevenstudie naar de APC die gebruikt worden tijdens de restimulatie van MBP-reactieve T-cellen werd echter vastgesteld dat ondanks bestraling deze cellen nog in staat zijn SPIO partikels op te nemen (Figuur 16C). Dit vormt een zeer belangrijk resultaat met het oog op de verdere adoptieve transfer van MBP-reactieve T-cellen.



**Figuur 15:** Flowcytometrische analyse van de CD3 PE/CD25 FITC dubbelkleuring van MBP-reactieve T-cellen 7 dagen na labelling (800µg/ml SPIO en 2µg/ml PLL). **A:** kleuring van ongelabelde cellen, **B:** kleuring van gelabelde cellen.

### 3.5 Bepaling van de hoeveelheid opgenomen ijzerpartikels per cel:

Na het bepalen van de optimale labellingsconditie van MBP-reactieve T-cellen door middel van histologische kleuringen, werd de ijzerconcentratie per cel bepaald door gebruik te maken van AAS. Hiervoor werden MBP-reactieve T-cellen eerst 2 dagen gerestimuleerd met ConA om het gebruik van APC's (thymocyten) te vermijden. Als negatieve controle werden ongelabelde cellen meegenomen. Bovendien werd de labellingsefficiëntie histologisch geverifieerd (figuur 16). Na het uitvoeren van AAS werd vastgesteld dat er een gemiddelde opname van 18 pg aan ijzer per cel is.

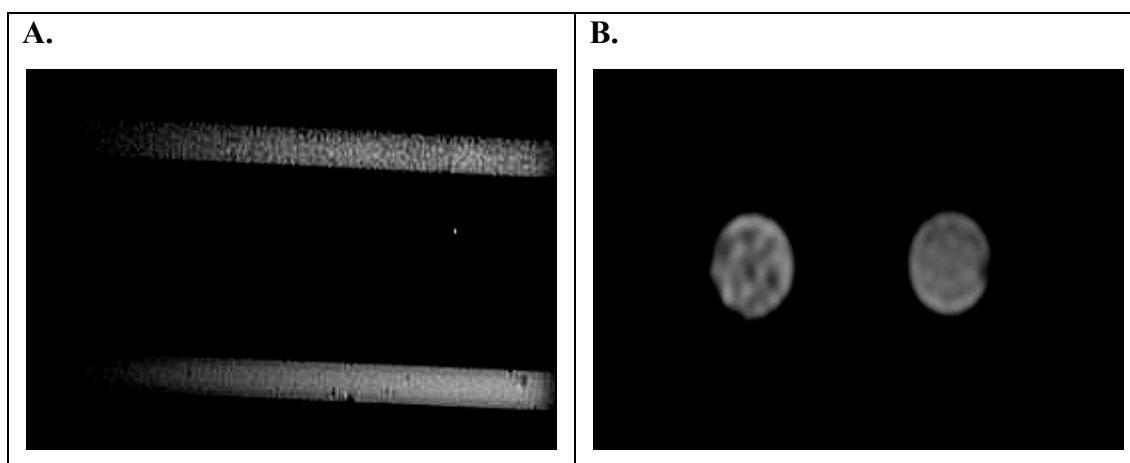


**Figuur 16:** Het uitvoeren van een PB ijzeraankleuring versterkt met DAB op (on)gelabelde MBP reactieve T-cellen (LF5). **A:** MBP-reactieve T-cellen gelabeld met 800µg/ml SPIO en 2µg/ml PLL, **B:** ongelabelde MBP-reactieve T-cellen, **C:** thymocyten gelabeld met 800µg/ml SPIO en 2µg/ml PLL 3 dagen na bestraling. MBP-reactieve T-cellen werden voor labelling gerestimuleerd met ConA voor 2 dagen.



### 3.6 Visualisatie van gelabelde T-cellen door middel van hoge resolutie MRI:

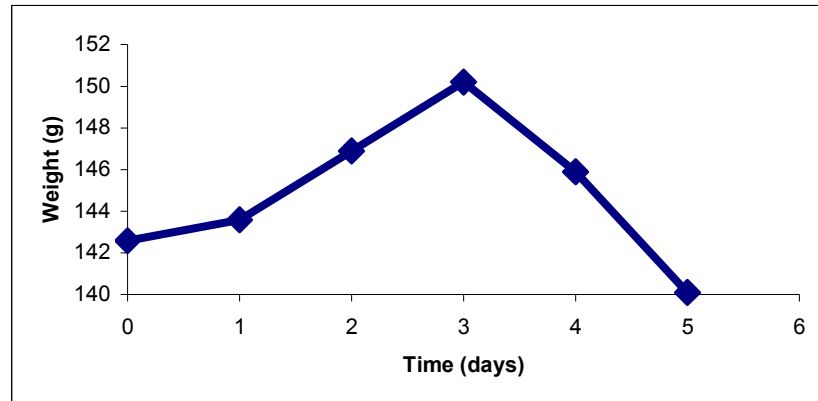
De visualisatie van gelabelde T-cellen door middel van hoge resolutie MRI vond plaats door gebruik te maken van capillairen gevuld met al dan niet gelabelde cellen (figuur 17). Uit de verkregen T2 gewogen beelden kan een duidelijke verminderde signaalintensiteit (15%) worden vastgesteld bij de capillairen met SPIO gelabelde T-cellen ten opzichte van de ongelabelde T-cellen. Bovendien duiden deze resultaten erop dat de aanwezigheid van gelabelde T-cellen ook daadwerkelijk gevisualiseerd kan worden door middel van hoge resolutie MRI.



**Figuur 17:** MRI visualisatie van (on)gelabelde MBP-reactieve T-cellen door gebruik te maken van capillairen ( $\varnothing=1,8\text{mm}$ ,  $L=10\text{ cm}$ ,  $TR=2500\text{ms}$ ,  $TE=60\text{ms}$ ). **A:** longitudinale visualisatie van de capillairen met boven de gelabelde en beneden de ongelabelde conditie, **B:** transversale visualisatie van de capillairen met links de gelabelde en rechts de ongelabelde conditie.

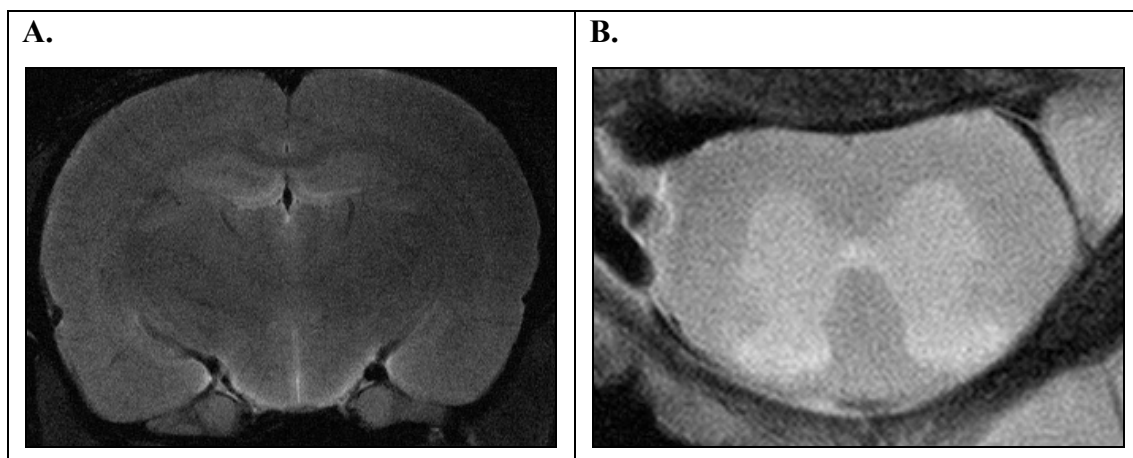
### 3.7 Trafficking van gelabelde T-cellen in EAE:

Om na te gaan of labelling van MBP-reactieve T-cellen een effect heeft op de ziekte inducerende capaciteit van deze cellen werd adoptieve transfer uitgevoerd op een Lewis rat. Na het uitvoeren werd dagelijks het gewicht geregistreerd om mogelijk gewichtsverlies dat gepaard gaat met een ziekte inductie te kunnen waarnemen. Aan de hand van deze data werd een gewichtscurve opgesteld (grafiek 1). Er is een duidelijk gewichtsverlies waar te nemen rond dag 3.



**Grafiek 1:** Gewichtscurve van Lewis rat vanaf het uitvoeren van adoptieve transfer met gelabelde MBP reactieve T-cellen (dag 0) tot aan de decapitatie voor analyse op MRI (dag 5).

Op dag 5 konden nog geen uitvalsverschijnselen worden vastgesteld maar wel een verdere gewichtsreducties van 7,5%, na decapitatie werd getracht de gelabelde T-cellen op te sporen in de hersenen en het ruggenmerg met behulp van MRI (figuur 18). Op deze MRI beelden konden echter geen gelabelde MBP-reactieve T-cellen worden teruggevonden in de hersenen en het ruggenmerg. Figuur 18 bevat een representatieve slice van de hersenen en het ruggenmerg maar noch in de gehele hersenen noch in het ruggenmerg konden gelabelde T-cellen worden aangetoond die in aanwezigheid als zwarte punten zouden waargenomen worden. Ook dit experiment kon tot op heden slechts éénmalig worden uitgevoerd.



**Figuur 18:** Het maken van T2 gewogen beelden (TE=60ms, TR=2500ms) met hoge resolutie MRI van de hersenen en het ruggenmerg van een Lewis rat na uitvoeren van adoptieve transfer met gelabelde MBP-reactieve T-cellen. **A:** MRI visualisatie van de hersenen (slicedikte=1,1 mm, FOV=25x25), **B:** MRI visualisatie van het ruggenmerg (slicedikte=1,1 mm, FOV=9x9).



**4. DISCUSSIE:**

De magnetische labelling van T-cellen samen met het gebruik van MRI geeft de mogelijkheid om in diermodellen voor multiple sclerose de migratie van deze cellen in het CZS te visualiseren en zo tot een beter begrip te komen van de onderliggende pathologie.

Voor de labelling van de myeline reactieve T-cellen in deze studie werd gebruik gemaakt van de paramagnetische SPIO partikels. Eerdere studies toonden aan dat bij slecht endocyterende cellen, waaronder T-cellen, een betere labelling verkregen wordt met deze grotere SPIO partikels in vergelijking met USPIO's partikels [47]. Omwille van de slechte endocyterende capaciteit van T-cellen werd naast het gebruik van de grotere SPIO partikels in deze studie onderzocht of het gebruik van het transfectie agens, PLL, een additionele stijging van de labellingsefficiëntie kon bewerkstelligen. Deze SPIO-PLL complexvorming leidt namelijk tot een verhoogde hechting van SPIO aan de celmembraan wat de endocytose bevordert en resulteert in de incorporatie van SPIO-PLL in de endosomen.

De labellingsefficiëntie van de SPIO-PLL concentratie (50µg/ml SPIO en 3µg/ml PLL) beschreven in de literatuur [46] werd eerst getest op rat thymocyten. Een labelling met deze oplossing resulteerde in een labellingspercentage van 60%. Daarenboven kwamen er veel vrije SPIO-PLL complexen voor tussen de cellen. De aanwezigheid van deze complexen bij het uitvoeren van adoptieve transfer kan tot onbetrouwbare resultaten leiden. Doordat deze complexen niet kunnen verwijderd worden uit de celsuspensie na de labellingsprocedure, kunnen ze bij het uitvoeren van adoptieve transfer samen met de MBP reactieve cellen geïnjecteerd worden in de Lewis rat. Eens ze in de het dier aanwezig zijn kunnen ze door de macrofagen gefagocyteerd worden waardoor deze cellen zich ook in gelabelde toestand gaan bevinden. Bijgevolg zou bij visualisatie van het CZS met MRI geen onderscheid kunnen gemaakt worden tussen de aanwezigheid van gelabelde MBP reactieve T-cellen en gelabelde macrofagen. Het was dan ook van cruciaal belang dat deze SPIO-PLL complexen na labelling verwijderd werden. Bijkomende wasstappen en een dichtheitsgradiënt centrifugatie brachten echter geen uitkomst. De dichtheitscentrifugatie zorgde naast een verwijdering van de vrije complexen voor de depletie van de populatie gelabelde thymocyten. Een verklaring hiervoor is waarschijnlijk te vinden bij de gewijzigde dichtheid van de gelabelde thymocyten. Omdat er geen mogelijkheid bestond om de vrije complexen na de labellingsprocedure te verwijderen, werd er besloten om via wijzigingen in de labellingsconcentratie tot een oplossing te komen.

---

Het effect van een wijziging in PLL concentratie werd eerst getest. Een verhoging van de hoeveelheid PLL in de labellingsoplossing resulteerde in een toename in vrije complexen. Een verlaging van de hoeveelheid PLL (0, 1, 2µg/ml) leidde tot een afname van het aantal vrije complexen, maar had dan weer als gevolg dat het aantal gelabelde cellen sterk verminderde. Om een oplossing te vinden voor het afgenomen labellingpercentage bij gebruik van lage PLL concentraties, werd het resultaat van een combinatie van deze lage PLL concentraties met een toename in SPIO concentratie getest. Dit resulteerde in een labellingsoplossing (800µg/ml SPIO en 2µg/ml PLL) met een percentage van 80% aan gelabelde cellen en een afwezigheid aan vrije SPIO-PLL complexen.

Voor de validatie van SPIO enhanced MRI was de gecorreleerde bepaling van de SPIO opname op cellulair niveau door middel van histologische methoden cruciaal. Uit deze studie bleek echter dat het gebruik van de conventionele Prussian Blue kleuring tot een zeer slechte detectie leidt van de ijzerpartikels in de T-cellen. Andere studies toonden aan dat deze kleuring bovendien niet volstond voor de detectie van ijzergeladen cellen in hersenweefsels [48]. Wanneer de Prussian Blue kleuring versterkt wordt met diaminobenzidine, zorgt de bijkomende bruinkleuring voor een duidelijk verschil tussen de gelabelde en ongelabelde cellen. Aan de hand van deze kleuringsmethode kan met zekerheid het labellingpercentage bepaald worden en bijgevolg ook de labellingsefficiëntie van de gebruikte SPIO-PLL oplossing.

In deze studie vond vervolgens voor de eerste maal labelling van MBP-reactieve T-cellen afkomstig uit ratten plaats. Na immunochemische kleuring werd een gelijkaardig labellingpercentage als bij de geactiveerde thymocyt T-cellen vastgesteld. Voor de restimulatie en dus activatie van de MBP reactieve cellen werd er geen gebruik gemaakt van APC's (thymocyten). Deze studie toont aan dat deze APC's ondanks bestraling nog mee gelabeld worden in de cultuur van de MBP-reactieve T-cellen. Als deze cellen bij het uitvoeren van adoptieve transfer samen met de MBP reactieve T-cellen worden geïnjecteerd, zorgen ze voor hetzelfde probleem als de SPIO-PLL vrije complexen. Ze kunnen namelijk door de macrofagen gefagocyteerd worden met labelling van deze cellen tot gevolg. Als alternatief werden de MBP reactieve T-cellen gerestimuleerd met ConA zonder gebruik te maken van APC's.

Hoewel eerdere labellingsstudies demonstreerden dat SPIO-PLL labelling van cellen geen korte noch lange termijn toxiciteit veroorzaakt en geen invloed heeft op de viabiliteit of het proliferatief karakter van de T-cel [47, 49], was het toch raadzaam om onderzoek te doen naar

---

het effect van de nieuwe labellingsconditie dit omwille van de significante toename in gebruikte ijzerpartikels. Om te achterhalen of de labelling geen invloed heeft op de activatie van de cellen, werd door uitvoering van een CD3 PE / CD25 FITC FACS kleuring een vergelijking gemaakt tussen gelabelde en ongelabelde cellen. Deze flow cytometrische assay toonde een onveranderde activatiegraad van gelabelde ten opzichte van de ongelabelde cellen. Bovendien is het ook raadzaam om informatie te krijgen op niveau van proliferatie alvorens tot definitieve conclusies te komen over de nieuwe labellingsoplossing.

Om na te gaan hoeveel ijzer de rat T-cellen gemiddeld opnemen onder deze labellingsconditie, werd er gebruik gemaakt van AAS. In vergelijking met andere studies, die slechts kwamen tot een opname van 0,26 tot 12,61pg ijzer per cel [50], kon in deze studie een concentratie van 18pg per cel worden bereikt wat een markante verbetering is. Deze verhoogde opname aan Fe in de gelabelde cellen zorgt voor een sterker detecteerbaar signaal waardoor deze cellen makkelijker te visualiseren zijn. Daarenboven biedt een hogere labellingsefficiëntie ook het voordeel dat cellen gedurende een hoger aantal celdelingen gevolgd kunnen worden. In de literatuur stond beschreven dat een mesenchymale stamcellen met een ijzerinhoud van 24pg tot 4 celdelingen opvolgbaar is [50]. Met deze nieuwe labellingsoplossing zouden de T-cellen met de huidige labellingscondities ook gedurende een 3 tot 4 tal celdelingen opvolgbaar zijn.

Vervolgens werd getest of dit gehalte aan ijzer per T-cel voldoende was om deze gelabelde cellen daadwerkelijk te kunnen visualiseren door middel van hoge resolutie MRI. Dit werd uitgevoerd door een oplossing van gelabelde/niet gelabelde cellen aan te brengen in een capillair. Na analyse met hoge resolutie MRI kon er een duidelijke verkorting (15%) van de transversale relaxatie snelheid worden vastgesteld bij het gelabelde staal. Dit zou moeten zorgen voor een duidelijke visualisatie van gelabelde MBP reactieve T-cellen in de weefsels van het CZS bij EAE. Eerdere studies toonden aan dat 200 T-cellen met een labelling van 1,4-3pg voldoende waren voor een visualisatie met een 1,5 Tesla MRI-toestel [46, 50].

Aanvankelijk werd ervan uitgegaan om naast de studie van de klassieke CD4<sup>+</sup> MBP reactieve T-cellen ook de recent beschreven CD8<sup>+</sup> MBP T-cellen te trafficken in een adoptieve transfer studie. Hiervoor werden deze cellen dan ook via een EasySep procedure geïsoleerd uit de volledige populatie lymfeknoopcellen. Er trad echter massale celsterfte op bij de CD8<sup>+</sup> cellen na stimulatie met geheel MBP proteïne. Een mogelijke verklaring zou erin kunnen liggen dat geheel MBP dat exogeen wordt toegediend aan APC's enkel wordt geprocessed voor presentatie op MHC II moleculen en enkel endogene peptiden worden geprocessed op MHC I

---

moleculen. Een oplossing zou dan ook kunnen liggen in de toediening van een MBP peptide dat zonder processing van buitenaf kan binden aan MHC I moleculen. Hiernaar dient echter bijkomend onderzoek verricht worden.

In deze studie vond voor de eerste maal de inductie van EAE plaats in ratten met gelabelde CD4<sup>+</sup> MBP reactieve T-cellen. Na verificatie van de labellingsgraad (80 %) met histologische kleuring werden deze cellen ingespoten in een vrouwelijke Lewis rat (dag0). De ziekte kende een identiek verloop met eerder beschreven studies van adoptieve transfer met niet gelabelde T-cellen. Drie dagen na injectie van de autoreactieve T-cellen kon een merkbare daling in lichaamsmassa worden vastgesteld. Deze lijn zette zich voort op dag 5. Aangezien er zich een daling in lichaamsgewicht van 7,5% op 2 dagen tijd voordeed en dit een van de eerste klinische symptomen van EAE vormt, werd besloten de hersenen en het ruggenmerg met hoge resolutie MRI te onderzoeken op de aanwezigheid van geïnvadeerde gelabelde MBP-reactieve T-cellen. Het resultaat hiervan bleek echter negatief. Een verklaring hiervoor zou kunnen liggen in het feit dat er nog onvoldoende infiltratie van gelabelde MBP reactieve T-cellen had plaatsgevonden in dit zeer vroege stadium van de ziekte. Bij een adoptieve transfer studie met gelabelde PLP reactieve T-cellen in muizen vond er ook slechts detectie van de T-cellen plaats rond de top van de ziekte [46]. In de hieropvolgende studie zal dan ook gestart worden met de detectie van de gelabelde MBP-reactieve T-cellen op de top van de ziekte.

Uit deze thesisstudie kan geconcludeerd worden dat er een zeer belangrijke vaststelling plaatsvond betreffende storende vrije SPIO-PLL complexen die optreden bij de labellingsconditie eerder beschreven in een andere studie. In dit project werd echter een nieuwe labellingsconditie bekomen die niet alleen resulteert in de afwezigheid van deze storende complexen, maar ook zorgt voor een verhoogde labellingsefficiëntie van de cellen. Hierdoor zou, met het oog op *in vivo* trafficking studies, de opvolgingsperiode van gelabelde cellen aanzienlijk verlengd worden. Bovendien zou de detectie van de gelabelde cellen op MRI door toename van de signaal intensiteit beter verlopen. Wanneer de eerste bevindingen over het onschadelijke karakter van de nieuwe labellingsconditie bevestigd worden door vervolgstudies, zal er een krachtig middel beschikbaar zijn voor het uitvoeren van trafficking studies naar de verschillende subsets T-cellen bij het EAE ratmodel. Dit kan uiteindelijk leiden tot een beter begrip van de onderliggende pathologie van de ziekte.

**5. REFERENTIES:**

1. Kornek B, Lassmann H: Neuropathology of multiple sclerosis - new concepts. *Brain Research bulletin* 2003;61:321-326.
2. Poser CM. The epidemiology of multiple sclerosis: A general overview. *Ann Neurol* 1994;36(S2):S180-S193
3. Hellings N, Raus J, Stinissen P: Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol research* 2002;25/1:27-51.
4. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silderberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*, 1983;13:227-231.
5. McDonald WI, Compston A, Edan G, *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis. guidelines for research protocols. *Ann Neurol*, 2001;50:121-127.
6. Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2004; 113/788-794.
7. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:1430-1438.
8. Raine CS, Scheinberg LC: On the immunopathology of plaque development and repair in multiple sclerosis. *J Neurol* 1988;20:189-201.
9. Wucherpfenning KW, *et al.*: T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 1992;175:993-1002.
10. Tortora GJ, Grabowski SR. Principles of anatomy and physiology. Ninth edition 2000;12:384-385.
11. Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C: Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sc* 2003;206:181-185.
12. Wucherpfennig KW, Strominger JL: Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity. viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695-705.
13. Liblau R, Gautam AM: HLA, molecular mimicry, and multiple sclerosis. *Rev Immunogen* 2000;2:95-104.
14. Burger DR, Ford D, Vetto RM, Hamblin A, Goldstein A, Hubbard M, *et al.* Endothelial cell presentation of antigen to human T cells. *Hum Immunol* 1981;3:209-230.

15. McCarron RM, Kempinski O, Spatz M, McFarlin DE. Presentation of myelin basic protein by murine cerebral vascular endothelial cells. *J Immunol* 1985;134:3100-3103.
  16. McCarron RM, Spatz M, Kempinski O, Hogan RN, Muehl L, McFarlin DE. Interaction between myelin basic proteinsensitized T lymphocytes and murine cerebral vascular endothelial cells. *J Immunol* 1986;137:3428-35.
  17. Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 2001;14:547-60.
  18. Furtado GC, Olivares-Villagomez D, Curotto de Lafaille MA, Wensky AK, Latkowski JA, Lafaille JJ. Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Rev* 2001;182:122-134.
  19. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD: Cutting edge. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002;169:4712-4716.
  20. Behi ME, Dubucquoi S, Lefranc D, Zéphir H, De Seze J, Vermersch P, Prin L. New insights into cell responses involved in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Letters* 2005; 96:11-26.
  21. Wee Yong V, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 1998;51:682–89.
  22. Gran B, Tranquill LR, Chen M, Bielekova B, Zhou W, Dhib-Jalbut S, et al. Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurol* 2000;55(11):1704-14.
  23. Achiron A, Mandel M: T-cell vaccination in multiple sclerosis. *Autoimmunity rev* 2004; 3/25-32.
  24. Prat E, Martin R: The immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of rehabilitation research and development* 2002; 39:187-200.
  25. Karliok SJ, Munoz D, Louis J, Strejan G: Correlation between MRI and clinicopathological manifestations in Lewis rats protected from EAE by acylated synthetic peptide of MBP. *Magnetic Resonance Imaging* 199;17;731-737.
  26. Hildebrandt IJ, Gambhir SS. Molecular imaging applications for immunology. *Clinical Immunol* 2004;111:210-224.
-

27. Lenz DC, Wolf NA, Swanborg RH. Strain variations in autoimmunity: attempted tolerization of DA rats results in the induction of EAE. *J Immunol* 1999;163:1763-1768.
  28. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunologic aspects of demyelinating diseases. *Ann Rev Immunol* 1992;10:153-187.
  29. Swanborg RH. EAE in rat: lessons in T cell immunology and autoreactivity. *Immunol rev* 2001;184/129-135.
  30. Hayosh NS, Swanborg RH. Autoimmune effector cells. VII. Cells isolated from thymus and spinal cord of rats with EAE transfer disease. *Am J Pathol* 1986;122:218-222.
  31. Dore-Duffy P, Balabanov R, Rafols J, Swanborg RH. Recovery phase of acute EAE in rats corresponds to development of endothelial cell unresponsiveness to IFN  $\gamma$  activation. *J Neurosc Res* 1996;44:223-234.
  32. Cross AH. Inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity correlate with disease activity in murine EAE. *J Neuroimmunol* 1996;71:145-153.
  33. Paterson PY, Koh CS, Kwaan HC. Role of the clotting system in the pathogenesis of neuroimmunologic disease. *Fed Proc* 1987;46:91-96.
  34. Stevens DB, Gould KE, Swanborg RH. Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits TNF- $\alpha$  / lymphotoxin production and adoptive transfer of disease by effector cells autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol* 1994;89:421-425.
  35. Dore-Duffy P, Balabanov R, Washington R, Swanborg RH. Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits cytokine-induced CNS endothelial cell activation. *Molec Chem Neuropathol* 1994;22:161-175.
  36. Tabi Z, McCombe PA, Pender MP. Apoptotic elimination of V $\beta$ 8.2<sup>+</sup> cells from CNS during recovery from EAE induced by the passive transfer of V $\beta$ 8.2<sup>+</sup> encephalitogenic cells. *Eur J Immunol* 1994;24:2609-2617.
  37. Karlik SJ, Munoz D, Louis J, Strejan G. Correlation between MRI and clinico-pathological manifestations in Lewis rats protected from EAE by acylated synthetic peptide of MBP. *Magnetic Resonance Imaging* 199;17:731-737.
  38. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Öhlén C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8<sup>+</sup> T-cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001;194:669-676.
-

39. Schroeter M, Stoll G, Weissert R, Hartung HP, Lassmann H, Jander S. CD8+ phagocyte recruitment in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 2003;163:1517-1524.
40. Pautler RG, Fraser SE: the years of contrast agent-micro-MRI in the new millennium. *Current opinion in immunology* 2003;15:385-392.
41. Welch DK, Kay SA: Bioluminescence imaging in living organisms. *Current opinion in biotechnology* 2005;16:1-6.
42. Hardy J, Edinger M, Bachmann MH, Negrin RS, Fathman CG, Contag CH. Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. *Exp hematol* 2001;29:1353-1360.
43. Massoud TF, Gambhir SS: Molecular imaging in living objects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes en development* 2003;17:545-580.
44. Morawski AM, Lanza GA, Wickline SA: Targeted contrast agents for magnetic resonance imaging and ultrasound. *Current opinion in biotechnology* 2005;16:1-4.
45. Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed* 2004;17:484-499.
46. Anderson SA, Shukaliak-Quandt J, Jordan EK, Arbab AS, Martin R, McFarland H, Frank JA. Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2004;55:654-659.
47. Frank JA, Miller BR, Arbab AS, Zywicke HA, Jordan EK, Lewis BK, Bryant LH, Bulte JW. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Exp Neuroimaging* 2003; 228:480-487.
48. Schroeter M, Saleh A, Wiedermann D, Hoehn M, Jander S. Histochemical detection of ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast medium uptake in experimental brain ischemia. *Magnetic resonance in medicine* 2004;52:403-406.
49. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Bulte JWM, Frank JA. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Brief communications* 2003;76:1123-1130.
50. Bulte JFM, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.* 2004;17:484-499.