Inhoudsopgave

Voorwoord ..... **I**
Lijst met afkortingen ..... **II**
Lijst met figuren ..... **III**
Lijst met tabellen ..... **IV**
Samenvatting ..... **V**
Inleiding **1**
1. Multiple sclerose 1
2. Regulatoire T-cellen 3
2.1 Natural killer T-cellen (NKT-cellen) 4
2.2 $CD4^+$ regulatoire T-cellen 4
2.3 $CD8^+$ regulatoire T-cellen 5
3. T-celvaccinatie 7
3.1 Algemene aspecten van T-cel vaccinatie 7
3.1.2 Klinische studies 8
3.2 Inductie of stimulatie van regulatoire netwerken door TCV 9
3.2.1 Anti-idiotype netwerken 10
3.2.2 Anti-ergotype netwerken 10
4. Onderzoeksopzet 15
Materialen en Methoden **16**
1. Patiënten en gezonde controles 16
2. Gebruikte media en stimuli/antigenen 16
3. Bepaling van T-cel reactiviteit met behulp van ELISPOT 17
4. Meting T-cel reactiviteit met behulp van een proliferatie gebaseerde assay (CFSE assay) 18
5. MHC restrictie analyse 19
6. Fenotypering via FACS-kleuring 19
7. Isolatie en aanmaak van anti-ergotype T-cellijnen/klonen 20
8. Supernatans inhibitietest 21
9. Bepaling van het cytokineprofiel via intracellulaire FACS-kleuring 21
Resultaten **23**
1. Bepaling van T-cel reactiviteit ten opzichte van kandidaat ergotopen via IFN-γ

ELISPOT 23
1.1 Optimalisatie van het celaantal en de ergotoop peptide concentratie 23
1.2 Bepaling van T-cel reactiviteit ten opzichte van HSP60 afgeleide peptiden en IL2R-α peptide in gezonde controles en MS-patiënten 25
2. Meting van T-cel reactiviteit op basis van proliferatie door gebruik van CFSE assay. 27
2.1 Optimalisatie van de CFSE assay 27
2.2 MHC-restrictie ten opzichte van IL2R-α peptide 32
2.3 Reactiviteit van T-cellen tegen PHA blasten 33
2.4 Reactiviteit van PBMC tegen de HSP60 afgeleide peptiden 34
2.5 Screening van de reactiviteit ten opzichte van de kandidaat ergotopen in gezonde controles en MS-patiënten 35
3. Supernatans inhibitietest 38
Discussie **40**
Referenties **47**

Voorwoord

4 jaar extra studeren na het secundair onderwijs lijkt enorm lang maar niets is minder waar. Deze periode is voorbij gevlogen net zoals de stageperiode op het einde van deze 4 jaar. Ik kan nu wel zeggen dat de stageperiode één van de hoogtepunten was van mijn opleiding biomedische wetenschappen.

Tijdens deze stageperiode heb ik enorm veel bijgeleerd op het gebied van het schrijven en uitvoeren van praktisch werk maar ook op het gebied van samenwerking in een labo. Dit heb ik allemaal te danken aan Hellings Niels, mijn stagebegeleider. Hij was er niet alleen in het labo voor mij maar ook daarbuiten en samen hebben we van een soms toch wel vermoeiende periode een fijne tijd gemaakt. Ik wil hem daarom ook via deze weg bedanken voor zijn hulp bij het schrijven van mijn thesis maar ook voor zijn geduld en voor de plezierige momenten. Ik ben hem ook erg dankbaar voor de moeite die hij gedaan heeft om in de laatste drie weken nog staaltjes van MS-patiënten te zoeken. Dankjewel Niels!

Verder zou ik ook professor Stinissen, directeur van BIOMED en mijn copromotor, willen bedanken, die ons studenten gedurende vier jaar heeft mee gedragen op het pad van het wetenschappelijk onderzoek. Ook zijn opmerkingen bij het schrijven van deze thesis waren zeer welkom.

Vervolgens wil ik graag dokter Medaer bedanken voor het leveren van bloedstalen van MS-patiënten

Ten vierde wil ik Loes, Koen, Marielle, Joris, Jerome, Veerle, Debby, Cindy, Kurt, Leentje en zeker ook Igna bedanken omdat zij het werken op biomed steeds aangenaam maakten maar ook omdat ze altijd bereid waren om te helpen en te antwoorden op veel gestelde vragen.

Daarnaast zijn natuurlijk ook mijn medestudenten belangrijk geweest in de afgelopen 4 jaar en gedurende de stageperiode. We hebben elkaar gesteund en geholpen maar ook veel gelachen en plezier gemaakt. In het bijzonder wil ik graag Klaartje, Ellen, Davina, Marijse, Katrien, Veerle en Nursen bedanken voor de fijne tijd!

Tot slot wil ik mijn ouders, mijn broer en vriend Erwin bedanken voor hun enthousiasme en steun gedurende de afgelopen jaren, maar ook voor hun troost en aanmoedigende woorden wanneer het iets moeilijker vooruit ging. Zonder hun zou ik nooit zo ver gekomen zijn als waar ik nu sta. Dankjewel!

Lijst met afkortingen

AA: adjuvant artritis
ACID: activatie geïnduceerde celdood
ALP: alkalisch fosfatase
AM: autoloog medium
Anti-id: anti-idiotype T-cellen
APC: antigeen presenterende cel
BFA: Brefeldine A
BHB: bloed-hersenbarrière
BSA: bovine serum albumine
CaI: Calcium ionomycine
CD: cluster of differentiation
CDR: complementarity determining region
CFSE: 5,6-carboxyfluoresceïn diacetate succinimidyl ester
CP: chronisch progressief
CSF: cerebrospinaal vocht
CZS: centraal zenuwstelsel
DC: dendritische cellen
ΔPF: delta prolifererende fractie
DNA: deoxyribonucleic acid
EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis
EDSS: Espanded disability status scale
Elisa: Enzyme-linked immunosorbent assay
Elispot: solid phase enzyme-linked immunospot assay
ER: endoplasmatisch reticulum
FACS: fluorescence-activated cell sorter
FITC: Fluorescein isothiocyanate
HLA: human leukocyt antigen
HSP: heat shock protein
IFN: interferon
IL: interleukine
IL2R: interleukine 2 receptor
IL2R-α: alfa keten van de IL2R
ILT: inhibitorisch Ig-like transcript
MBP: myelin basic protein
MHC: major histocompatibility complex
MOG: myelin oligodendrocyt glycoprotein
MS: multiple sclerose
MSRV: MS-associated retrovirus
NK T-cellen: natural killer T-cellen
OG: oligodendrocyt
PBMC: perifeer bloed mononucleaire cellen
PBS: Phosphate buffered saline
PE: phycoerythrine
PerCP: peridin chlorophyll protein
PHA: phytoheamagglutinine
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate
PLP: proteolipid protein
RR: relapsing-remitting
SI: stimulatie index
SN: supernatantia
Terg: anti-ergotype T-cellen
TCR: T-celreceptor
TCV: T-celvaccinatie
TGF: transforming growth factor
TNF: tumor-necrose-factor
Treg: regulatoire T-cel
TT : tetanus toxoïd
7AAD: 7-amino actinomycine D

Lijst met figuren

Figuur 1: Huidige hypothese van de immunopathogenese van MS. 3
Figuur 2: Model van de interacties van Qa-1-restricted regulatoire $CD8^+$ T-cellen. 6
Figuur 3: Overzicht van regulatoire mechanismen geïnduceerd door TCV. 11
Figuur 4: Balans tussen Terg (T reg in tekening) neutralisatie en Terg "renewal". 12
Figuur 5: Analyse van levende cellen. 20
Figuur 6: Antigen en cel dosis respons curve voor HSP60 T-cel reactiviteit gemeten met IFN-γ Elispot. 24
Figuur 7: T-cel reactiviteit ten opzichte van verschillende HSP60 peptide concentraties. 25
Figuur 8: IL2R-α T-cel reactiviteit bij gezonde controles en MS-patiënten. 26
Figuur 9: Een optimale CFSE labeling concentratie van 0,5 μM. 28
Figuur 10: Reactiviteit van T-cellen ten opzichte van de alfa keten van IL2R. 29
Figuur 11: Stimulatie van PBMC met IL2R-α peptide of MBP gedurende verschillende dagen. 30
Figuur 12: KM en 24-well plaat als ideale condities bij de proliferatie van T-cellen. 31
Figuur 13: Bepaling van de optimale IL2R-α peptide concentratie en het geschikte celaantal per well. 32
Figuur 14: MHC restrictie ten opzichte van het IL2R-α peptide en MBP. 33
Figuur 15: Anti-ergotype reactiviteit van PBMC tegen geactiveerde T-cellen (PHA blasten) 34
Figuur 16: Mogelijke problemen bij de analyse van ontdooide CFSE gelabelde PBMC. 36
Figuur 17: ΔPF van de $CD4^+7AAD^-$ T-cellen van gezonde controles en MS-patiënten na stimulatie met IL2R-α en MBP 37
Figuur 18: Correlatie tussen anti-MBP en anti-IL2R-α reactiviteit in gezonde controles. 38
Figuur 19: Het effect van het SN van een IL2R-α specifieke T-cellijn op de activatie van een TT kloon. 39

Lijst met tabellen

Tabel 1: Overzicht van verschillende soorten regulatoire T-cellen (Tregs). 5
Tabel 2: Overzicht van verschillende uitgevoerde humane T-celvaccinatie studies. 9
Tabel 3: Eigenschappen van de gezonde controles en MS-patiënten. 16
Tabel 4: Aminozuursequenties van IL2R-α peptide en HSP60 afgeleide peptiden..... 17
Tabel 5: Overzicht van gebruikte antilichamen bij intracellulaire cytokine staining. 22
Tabel 6: Stimulatie van T-cellen met HSP60 afgeleide peptiden. 26
Tabel 7: Proliferatieve respons tegen verschillende HSP60 peptide sequenties..... 35
Tabel 8: T-cel reactiviteit ten opzichte van HSP60 peptide 4 in gezonde controles en MS-patiënten. 38

Samenvatting

Multiple Sclerose wordt beschouwd als een chronische inflammatoire aandoening van het centraal zenuwstelsel. Autoreactieve T-cellen blijken een belangrijke rol te spelen in het ontstekingsproces. Deze autoreactieve T-cellen komen echter ook voor in de periferie van gezonde individuen maar leiden niet noodzakelijk tot het ontstaan van de ziekte. Dit duidt erop dat er perifere regulatoire netwerken bestaan, die de activatie en expansie van autoreactieve T-cellen voorkomen. Tot deze netwerken behoren onder andere de anti-idiotype en anti-ergotype T-cellen (Terg). In tegenstelling tot de anti-idiotype respons is de anti-ergotype respons nog niet voldoende gekarakteriseerd. Vermoedelijk herkennen Terg een ergotoop op de autoreactieve geactiveerde T-cel. Kandidaat ergotopen zijn CD25, de alfa keten van de IL-2 receptor (IL2R-α), en heat shock protein 60 (HSP60). Deze stage had als doel de karakterisatie van T-cellen specifiek voor deze kandidaat ergotopen.

Reactiviteit van T-cellen tegen de kandidaat ergotopen werd in eerste instantie gemeten met behulp van een IFN-γ Elispot. Vermits T-cellen een lage reactiviteit vertoonden ten opzichte van HSP60 en er geen significante verschillen waren tussen gezonde controles en MS-patiënten op het gebied van de reactiviteit tegen IL2R-α, werd gekozen voor een proliferatie gebaseerde assay, de CFSE assay. Tijdens de optimalisatie van deze techniek werd aandacht besteed aan de CFSE labeling concentratie, de stimulatie/incubatieduur van de culturen, het type kweekplaat en medium, het celaantal en tot slot de concentratie van de kandidaat ergotopen. Uit deze experimenten bleek eveneens dat vooral de $CD4^+$ T-cellen reactief waren tegen IL2R-α en dat dit afgeleide peptide gepresenteerd werd via HLA-DR (II) moleculen. Na de optimalisatie werd de reactiviteit van PBMC ten opzichte van de kandidaat ergotopen vergeleken in gezonde controles (n=9) en MS-patiënten (n=4). De reactiviteit tegen IL2R-α was niet verschillend in gezonde controles en MS-patiënten zoals aangetoond met de IFN-γ Elispot. Verder bleek dat bij gevaccineerde MS-patiënten de hoge gemiddelde reactiviteit tegen IL2R-α geassocieerd was met de onderdrukking van de MBP T-cel reactiviteit. Het gebruik van een groter aantal stalen is echter vereist om hieromtrent een éénduidige conclusie te trekken. Er werd geen reactiviteit waargenomen tegen een HSP60 afgeleid peptide in beide groepen. In een laatste onderdeel van de stage werd gepoogd het mechanisme van de anti-ergotype respons beter te begrijpen door na te gaan of gesecreteerde componenten (zoals cytokines) van IL2R-α specifieke T-cellen een inhiberend effect hebben op de activatie en proliferatie van geactiveerde T-cellen. Uit de experimenten bleek dat de proliferatie niet geïnhibeerd werd, zoals verwacht, maar licht gestimuleerd. Andere mechanismen zullen vermoedelijk betrokken zijn bij anti-ergotype regulatie. Verdere karakterisatie van de kandidaat ergotopen is vereist om een beter inzicht te krijgen in de anti-ergotype respons en kan nieuwe mogelijkheden bieden voor de ontwikkeling van specifiekere therapieën.

Inleiding

1. Multiple sclerose

Multiple sclerose (MS) is een chronische inflammatoire aandoening van het centraal zenuwstelsel (CZS) en de meest voorkomende neurologische ziekte bij jonge volwassenen (20-40 jaar). Het klinische beeld van de ziekte varieert van individu tot individu gaande van verstoring van zicht en gevoel tot algemene cognitieve disfuncties en verlamming. Pathologisch wordt MS gekarakteriseerd door focale lesies of plaques in de witte stof van het CZS. Deze lesies ontstaan als gevolg van het verlies van myeline, de beschermende laag rond axonen en zenuwen, dat geproduceerd wordt door oligodendrocyten (overzichtsartikel 1).

Een aantal interagerende factoren dragen bij tot de pathogenese van MS. Allereerst verhogen bepaalde genetische factoren de kans op ontwikkeling van MS, hetgeen men heeft kunnen afleiden uit familie- en tweelingstudies. Zo zijn de "humane leukocyt antigeen" (HLA) allelen uitgebreid bestudeerd. De sterkste associatie is terug te vinden bij HLA-DR2 genen (2). Daarenboven dragen HLA klasse I allelen waarschijnlijk bij aan de gevoeligheid voor MS (3). Ook de T-celreceptor (TCR) alfa en bèta genen zijn onderzocht. Sommige studies toonden aan dat er een genetisch verband is tussen TCR genen en MS (4), anderen zagen dit verband niet (5).

Naast de genetische achtergrond dragen waarschijnlijk ook omgevingsfactoren bij aan het relatieve risico om MS te ontwikkelen. Zo zijn er aanwijzingen dat infectie een rol speelt. Een groot aantal virussen is reeds onderzocht als eventuele oorzaak van MS zoals bijvoorbeeld het mazelenvirus, humane herpesvirussen en retrovirussen (MS-associated retrovirus MSRV) zonder hoge specificiteit voor MS. Ondanks het feit dat er geen harde bewijzen zijn voor één bepaald virus, mag het niet uitgesloten worden dat een infectie betrokken is bij de ziektemechanismen die leiden tot MS (overzichtsartikel 1).

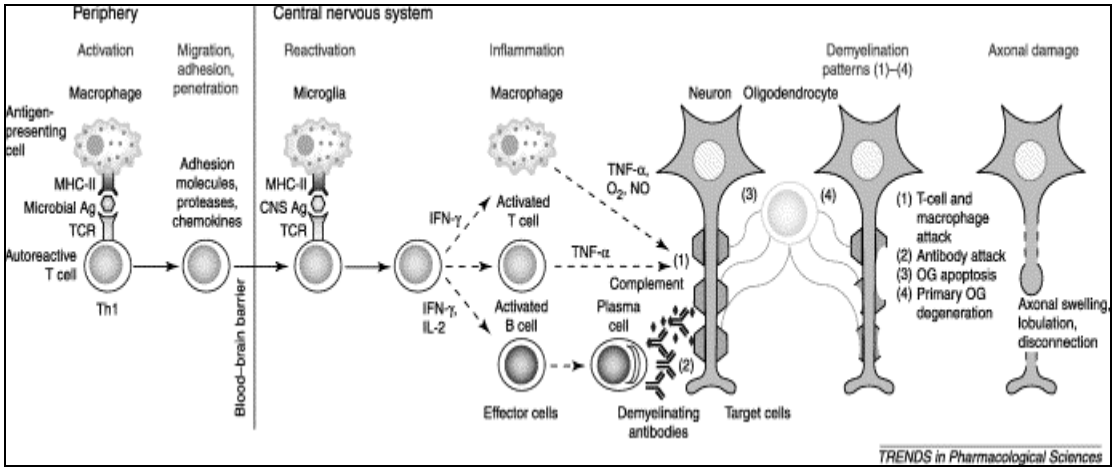
Ook auto-immune processen spelen een essentiële rol in de pathogenese van de ziekte. Autoreactieve T-cellen specifiek voor bepaalde componenten van het myeline (MBP myelin basic protein, PLP proteolipid protein en MOG myelin oligodendrocyt glycoprotein) veroorzaken waarschijnlijk een inflammatoire reactie in de hersenen, die uiteindelijk leidt tot beschadiging van het myeline. Een eerste stap in de huidige hypothese omhelst de activatie van myeline specifieke T-cellen in het bloed (overzichtsartikel 1). Eén van de mogelijke mechanismen hierbij betrokken is moleculaire mimicry waarbij autoreactieve T-cellen kruisreageren met antigene determinanten die identiek of gelijkaardig zijn aan normale

celcomponenten van de gastheer (zoals bijvoorbeeld MBP) (6). De in vivo geactiveerde autoreactieve T-cellen zullen klonaal expanderen in het bloed van MS-patiënten en vervolgens de bloed-hersen-barrière (BHB) doorkruisen (zie figuur 1). De migratie door deze barrière wordt bevorderd door adhesiemoleculen die de geactiveerde T-cellen en endotheelcellen tot expressie brengen onder invloed van de lokaal geproduceerde pro-inflammatoire cytokines. In het CZS worden de myeline reactieve T-cellen terug geactiveerd zodra zij hun specifiek myeline epitoop herkennen dat lokaal gepresenteerd wordt door onder andere microgliacellen. De geheractiveerde T-cellen produceren massaal pro-inflammatoire cytokines zoals tumor necrose-factor-alfa (TNF-α) en interferon-gamma (IFN-γ) wat een verdere influx van andere inflammatoire cellen, zoals B-cellen en macrofagen, tot gevolg heeft. Hoewel de myelineschede het primaire doelwit is in dit proces, stelt men vast dat de myeline-producerende oligodendrocyten en soms ook neuronen in een latere fase afsterven. Demyelinisatie zal het uiteindelijke gevolg zijn waarbij de myeline-afbraak het resultaat is van een samenwerking tussen cytotoxische T-cellen, zuurstofradicalen, antilichamen en cytokine-geïnduceerde cytotoxiciteit. De zenuwgeleiding zal afnemen, hetgeen gepaard gaat met een manifestatie van de gekende klinische symptomen (overzichtsartikel 1).

Toevallig gestimuleerde autoreactieve T-cellen komen ook bij gezonde personen voor maar leiden niet automatisch tot auto-immuniteit. Voorgaande studies hebben namelijk aangetoond dat er perifere regulatoire netwerken bestaan, die pathogene T-cellen onder controle houden of onderdrukken zodra ze geactiveerd worden. Tot deze regulatoire netwerken behoren onder andere de anti-idiotype en anti-ergotype T-cellen. Een verstoord netwerk zou kunnen leiden tot een minder goede suppressie van pathogene T-cellen en uiteindelijk tot auto-immune ziektes, zoals MS (7).

Een éénduidige therapie voor MS bestaat tot nu toe nog niet. Huidige behandelingen zijn er vooral op gericht om de symptomen te verminderen en ontsteking te onderdrukken. In de meeste gevallen zorgt de behandeling voor een niet-specifieke onderdrukking van het immuunsysteem en wordt er dus geen onderscheid gemaakt tussen een pathologische auto-immune respons en een beschermende immuunrespons. Voorbeelden van dergelijke immuunsuppressiva zijn corticosteroïden en azathioprine (6). Een andere goedgekeurde behandeling voor MS is interferon-β (IFN-β). IFN-β heeft een inhiberend effect op de proliferatie van T-cellen en vertoont antivirale eigenschappen. Gunstige klinische effecten van IFN-β zijn onder andere een vertraagd ziekte herval en een afname van actieve MRI hersenlesies. Glateramer acetaat is een derde voorbeeld van een goedgekeurde behandeling (overzichtsartikel 1). Het nadeel van deze medicijnen is echter dat er bijwerkingen kunnen

optreden en dat ze niet voor een genezing van de ziekte zorgen. Daarom is er nog steeds nood aan meer specifieke en efficiëntere therapieën. T-cel gerichte strategieën zoals T-celvaccinatie (TCV) zouden mogelijk specifieker kunnen ingrijpen in het ziekteproces. Hierbij tracht men de (verstoorde) regulatoire netwerken te stimuleren om zo specifieke autoreactieve T-cellen te onderdrukken.



Figuur 1: Huidige hypothese van de immunopathogenese van MS (8).

MHC II : major histocompatibility complex II, Ag : antigen, TCR : T-celreceptor, Th1: T-helper 1 subset, CNS: centraal zenuwstelsel, IFN-γ: interferon γ, IL-2: interleukine 2, TNF-α: tumor-necrose-factor α, O_2: moleculaire zuurstof, NO: stikstofmonoxide, OG: oligodendrocyt.

2. Regulatoire T-cellen

Het immuunsysteem heeft een aantal mechanismen ontwikkeld om de homeostatische balans te behouden. Een voorbeeld hiervan zijn de homeostatische mechanismen intrinsiek aan antigen activatie. Zo is het co-stimulatoir signaal B7/CD28 nodig voor de volledige activatie van T-cellen. Geactiveerde T-cellen zullen vervolgens CTLA-4 tot expressie brengen dat competitief met CD28 bindt aan B7 en zo een inhiberende werking heeft op de geactiveerde T-cellen (6, overzichtsartikel 9). Een ander voorbeeld van een dergelijk controlemechanisme is activatie geïnduceerde celdood (AICD) van T-cellen na T-celreceptor stimulatie met hun antigeen (overzichtsartikel 9).

Er zijn eveneens mechanismen nodig om een onderscheid te maken tussen lichaamsvreemde en lichaamseigen stoffen. De thymus speelt hierbij een belangrijke rol omwille van de klonale deletie van zogenaamde zelf-reactieve T-cellen (overzichtsartikel 10). Klonale deletie van zelf-reactieve T-cellen in de thymus en inductie van T-cel anergie kunnen echter niet de enige verklaring zijn voor het behoud van zelf-tolerantie. Pathogene autoreactieve T-cellen komen namelijk ook voor in de periferie van gezonde personen. Om die reden moeten er nog andere

regulatoire mechanismen zijn die voorkomen dat autoreactieve T-cellen geactiveerd worden en auto-immuniteit veroorzaken (11). Tot deze regulerende netwerken behoren de regulatoire T-cellen. Regulatoire T-cellen (Tregs) worden ingedeeld in 3 grote groepen: de NKT-cellen, de $CD4^+$ T-cellen en de $CD8^+$ T-cellen (overzichtsartikel 9).

2.1 Natural killer T-cellen (NKT-cellen)

NKT-cellen (tabel 1) zijn een unieke populatie van cellen, die een brug vormen tussen het aangeboren en verworven immuunsysteem. Ze brengen zowel receptoren van de natural killer cellen tot expressie als een TCRαβ (12). De NKT-cellen herkennen en vernietigen tumorcellen die een glycolipide antigen tot expressie brengen dat een structurele gelijkenis vertoont met het glycolipide α-galactosylceramide. Deze lipiden worden gepresenteerd aan de NKT-cellen door een major histocompatibility complec (MHC) klasse Ib molecule, CD1d (13). Aanvankelijk dacht men dat deze NKT-cellen enkel van belang zijn bij de vernietiging van tumorcellen. In een later stadium werd uit diermodel studies echter duidelijk dat ze ook betrokken kunnen zijn bij de regulatie van Th1-gemedieerde responsen in auto-immuun ziekten (14). Zo werd een reductie in het aantal NKT-cellen onder meer aangetoond in auto-immune aandoeningen zoals diabetes (15) en MS (16).

NKT-cellen interageren met en beïnvloeden andere Tregs en effector T-cellen tijdens de vroege fase van de auto-immune respons (17). Zij secreteren bijvoorbeeld cytokines zoals IL-4 en IL-10, die een shift veroorzaken van de Th1-Th2 balans bij $CD4^+$ T-cellen. Verder hebben ze ook een invloed op $CD8^+$ T-cellen maar deze interactie is complex en nog niet helemaal duidelijk (18).

2.2 $CD4^+$ regulatoire T-cellen

De $CD4^+$ regulatoire T-cellen worden vaak in twee groepen verdeeld: $CD4^+CD25^-$ T-cellen en $CD4^+CD25^+$ T-cellen, waarvan de laatste groep recent veel aandacht krijgt. Net zoals NKT-cellen zijn de $CD4^+CD25^+$ Tregs natuurlijk voorkomende suppressor T- cellen, die constitutief aanwezig zijn (overzichtsartikel 9). In tegenstelling tot de NKT-cellen behoren de $CD4^+CD25^+$ T-cellen tot de verworven tak van het immuunsysteem. De werking van de regulatoire $CD4^+CD25^+$ T-cellen is nog vrij onduidelijk maar uit onderzoek is gebleken dat specifieke suppressie van $CD4^+CD25^-$ T-cellen op een celcontact-afhankelijke manier gebeurt (19). Targetcellen voor $CD4^+CD25^+$ T-cellen kunnen zowel $CD4^+$ als $CD8^+$ T-cellen zijn maar ook B-cellen en zelfs natural killer cellen (20). Men denkt dat $CD4^+CD25^+$ T-cellen $CD8^+$ T-cellen op twee manieren kunnen inhiberen. Ten eerste zouden deze regulatoire cellen

de transcriptie en productie van IL-2 inhiberen. Ten tweede hebben studies aangetoond dat de $CD4^+CD25^+$ T-cellen de ontwikkeling van effectorfuncties van $CD8^+$ T-cellen inhiberen, zoals de secretie van IFN-γ (19).

Het grootste verschil tussen de $CD25^+$ en $CD25^-$ (Tr1 of Th3 genaamd) regulatoire T-cellen is dat $CD4^+CD25^-$ T-cellen hun regulerend effect vooral uitoefenen via de productie van cytokines zoals TGF-β en IL-10 en niet via cel-cel contact (overzichtsartikel 9). Andere belangrijke eigenschappen van deze regulatoire cellen zijn terug te vinden in tabel 1.

Tabel 1: **Overzicht van verschillende soorten regulatoire T-cellen (Tregs) (overzichtsartikel 9).**

Properties of Treg subsets

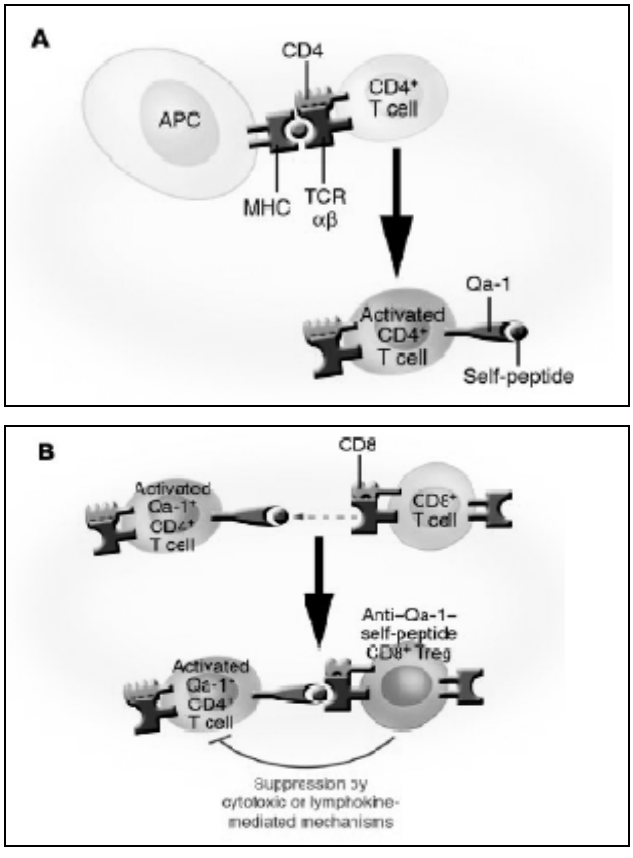
Subsets of Tregs	Target cells of suppression	Molecular interaction between regulatory cells and inducer/target cells		Stage of immunity affected	Regulatory mechanisms	In vivo function
		Induction phase	Effector phase			
NKT cells	Tumor cells, pathogen-activated T cells, and/or APCs	TCR recognizing CD1d/glycolipid; restricted by CD1d	Same as induction phase	Natural; innate	IL-4, IL-10, TGF-β, IFN-γ; cytotoxicity	Destruction of tumors and pathogens; regulation of Th1-mediated autoimmune diseases
$CD4^+CD25^-$ Tregs	T and B cells; ?APCs	Activated by MHC class II–peptide nonspecifically	May function by elaborating cytokines	Primary early	Predominately mediated by cytokines	Suppression of a variety of autoimmune diseases
$CD4^+CD25^+$ Tregs	T cells; ?APCs	Activated by MHC class II–peptides nonspecifically	Target and specificity is unknown; suppression is not MHC restricted	Primary early[A]	Requires cell-cell contact, cytokines	Prevention of a variety of autoimmune diseases, regulation of allograft rejection; immune response to pathogens
Qa-1–restricted $CD8^+$ Tregs	Antigen-activated T cells differentially expressing Qa-1–self-peptide complexes	TCR recognizing Qa-1/hydrophobic self-peptides; restricted by Qa-1	Same as induction phase	Secondary late[A]	Cytotoxicity; requires cell-cell contact, ?cytokines	Fine tuning peripheral TCR repertoire; maintaining self-tolerance and controlling autoimmune disease
$CD8^+CD28^-$ Tregs	DCs	Activated by classical MHC class Ia–peptide, nonspecifically?	Target of suppression is unknown	Primary early	Upregulation of ILT3 and ILT4 on DCs	Possibly regulation of autoimmunity

2.3 $CD8^+$ regulatoire T-cellen

Uit experimenten met het diermodel experimentele auto-immune encephalomyelitis (EAE) kon men besluiten dat $CD8^+$ T-cellen enerzijds effectorfuncties van de ziekte kunnen mediëren maar anderzijds zijn er ook $CD8^+$ T-cellen die een regulerende en protectieve rol kunnen hebben (21). In tegenstelling tot NKT-cellen en $CD4^+CD25^+$ T-cellen zijn $CD8^+$ cellen niet constitutief aanwezig. Ze worden geïnduceerd door antigen geactiveerde $CD4^+$ Th1 cellen. $CD8^+$ regulatoire T-cellen kunnen onderverdeeld worden in twee groepen (tabel 1), namelijk de $CD8^+CD28^-$ Tregs en de *Qa-1 restricted* $CD8^+$ Tregs (overzichtsartikel 9). De $CD8^+CD28^-$ Tregs inhiberen de opregulatie van co-stimulatoire moleculen op dendritische

cellen (DC). Daarnaast stimuleren ze bij deze DC de opregulatie van inhibitorisch Ig-like transcript 3 (ILT3) en van ILT4 receptoren. Op die manier wordt via deze DC de activatie en klonale expansie van auto-immune $CD4^+$ Th1 cellen voorkomen (21, 22).

Bij Qa-1-restricted $CD8^+$ Tregs bestaat de regulatoire pathway daarentegen uit een aantal opeenvolgende gebeurtenissen (figuur 2). Initieel worden $CD4^+$ T-cellen geactiveerd tijdens de primaire immuunrespons, waarbij TCR op $CD4^+$ T-cellen interageren met het autoantigen gepresenteerd door MHC klasse II moleculen op antigeen presenterende cellen (APC). Deze initiële interactie induceert de expressie van Qa-1-zelf-petide complexen, die niet voorkomen op T-cellen in rust. Dit complex wordt vervolgens herkend door $CD8^+$ regulatoire T-cellen, waardoor deze T-cellen differentiëren tot effectorcellen. De effectorcellen onderdrukken op hun beurt de $CD4^+$ T-cellen, die het Qa-1-zelf-peptide complex tot expressie brengen (23). De onderliggende mechanismen van de suppressie zijn nog niet volledig duidelijk maar men vermoedt dat de $CD8^+$ T-cellen differentiëren tot cytotoxische effector T-cellen, die de $CD4^+$ target T-cellen lyseren en/of downregulerende lymfokines secreteren (24). Deze bevindingen zijn ook reeds aangetoond in *in vitro* experimenten met het menselijke homoloog van het muizen Qa-1, nl. het HLA-E molecule (25).



(A) Initiële activatie van $CD4^+$ T-cel TCR's met peptide MHCII complexen induceert de expressie van Qa-1 op de $CD4^+$ T-cellen.

(B) Anti-Qa-1-self-peptide $CD8^+$ precursor T- cellen worden geactiveerd door $CD4^+$ T-cellen, die Qa-1 tot expressie brengen. De Qa-1-restricted $CD8^+$ Tregs zorgen voor een selectieve downregulatie van de antigen geactiveerde $CD4^+$ T-cellen.

Figuur 2: Model van de interacties van Qa-1-restricted regulatoire $CD8^+$ T-cellen (overzichtsartikel 9).

Een auto-immune aandoening is vermoedelijk niet het gevolg van een deficiëntie van één soort suppressor cellen maar het gevolg van een defect op verschillende niveaus van het systeem van immuunregulatie, gemedieerd door verschillende T-cellen (overzichtsartikel 9). Omwille van hun eigenschappen zijn Tregs aantrekkelijk om te gebruiken op klinisch niveau, zoals bij T-celvaccinatie (overzichtsartikel 10).

3. T-celvaccinatie

3.1 Algemene aspecten van T-cel vaccinatie

Het concept van T-celvaccinatie (TCV) wordt vaak vergeleken met de klassieke vaccinaties. Het grote verschil is echter dat de stoffen, die hier geëlimineerd moeten worden, geen microbiële stoffen zijn maar pathogene autoreactieve T-cellen. Daarenboven heeft TCV niet als doel de ziekte te voorkomen (preventie) maar te behandelen (therapie). De eliminatie tracht men te bereiken door een immunisatie uit te voeren met afgezwakte autoreactieve T-cellen (overzichtsartikel 26). Dat het de moeite loont om TCV verder uit te testen bij auto-immune aandoeningen blijkt uit studies met EAE, het diermodel voor MS. EAE wordt geïnduceerd door ratten te immuniseren met MBP of PLP in compleet Freund's adjuvant. T-cellen specifiek voor deze myeline componenten zorgen voor de ontwikkeling van een chronische ziekte die sterk lijkt op MS bij mensen. Wanneer nu ratten geïnjecteerd worden met afgezwakte autoreactieve T-cellen specifiek voor MBP, ontwikkelen ze geen symptomen van EAE. Ze zijn zelfs resistent tegen de inductie van EAE wanneer ze in een later stadium een letale dosis van geactiveerde MBP specifieke T-cellen of MBP in adjuvant toegediend krijgen (6). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat het bestaande perifeer regulatoir netwerk gestimuleerd wordt. T-celvaccinatie activeert twee soorten Tregs: anti-idiotype T-cellen (anti-id) en anti-ergotype T-cellen (Terg) (27, 28).

In de meeste TCV experimenten bestaat het T-cel vaccin uit autologe, geactiveerde, klonaal geëxpandeerde $CD4^+$ MBP reactieve T-cellijnen (overzichtsartikel 26). Het is echter algemeen gekend dat T-cellen, die andere myelinecomponenten dan MBP herkennen, eveneens bijdragen aan het ziekteproces in MS. Tot deze kandidaat myeline antigenen behoren het PLP en het MOG (overzichtsartikel 1). Als deze T-celpopulaties in het vaccin opgenomen kunnen worden, zal de efficiëntie van het TCV protocol verbeteren. Een alternatief hiervoor is geactiveerde T-cellen specifiek uit de ziekte locatie, het cerebrospinaal vocht (CSF), te isoleren en te gebruiken als vaccin (28).

3.1.2 Klinische studies

De succesvolle resultaten van TCV in dierexperimenten hebben ertoe geleid dat humane klinische studies uitgevoerd werden om het therapeutische effect van TCV te evalueren. In een eerste open label studie werden acht patiënten met relapsing-remitting (RR) of chronische progressieve (CP) MS driemaal geïmmuniseerd met geactiveerde, bestraalde autologe MBP-specifieke T-celklonen met een tijdsinterval van 2 à 4 maanden. Er werden geen bijwerkingen vastgesteld en een matige klinische verbetering in vijf van de acht patiënten. De vijf patiënten vertoonden namelijk een langere tijdsperiode tussen 2 aanvallen, een stabilisatie van de EDSS (expanded disability status scale) score en een beter magnetic resonance imaging verloop dan een niet-behandelde patiënten populatie (28, 29). De vaccins induceerden een anti-idiotype T-celrespons die gepaard ging met een zeer specifieke depletie van circulerende MBP reactieve T-cellen in alle patiënten (30, 31). De MBP reactieve T-cellen waren niet detecteerbaar gedurende 1 à 2 jaar na vaccinatie. Na een extra periode van 1 à 3 jaar verschenen MBP-reactieve T-cellen opnieuw in vijf patiënten, hetgeen in twee patiënten overeenkwam met een klinisch herval. Isolatie van deze "nieuwe" T-cellen toonde aan dat ze min of meer dezelfde eigenschappen hadden als de oorspronkelijke MBP-reactieve T-cellen vóór TCV: ze produceerden namelijk een gemengd cytokine patroon met vooral een productie van IFN-γ, IL-2 en TNF-α en weinig of geen IL-4, IL-10 en TGF-β, en ze reageerden met hetzelfde MBP epitoop. De klonale oorsprong van de MBP-reactieve T-cellen geïsoleerd voor en na TCV was wel verschillend. Een mogelijke verklaring is dat de nieuwe MBP-reactieve T-cellen al aanwezig waren voor TCV maar dat ze op dat moment gedomineerd werden door andere klonen. Door uitschakeling van de dominante klonen, kregen de andere aanwezige klonen de kans te expanderen. In een volgende ronde van TCV konden deze "nieuwe" myeline reactieve T-celklonen opnieuw efficiënt verwijderd worden (32).

In een volgende piloot studie werd de efficiëntie van een T-cel vaccin, dat T-cellen bevat geïsoleerd uit het CSF van MS-patiënten, bestudeerd. In deze studie werden vijf MS-patiënten 3 maal gevaccineerd met bestraalde geactiveerde $CD4^+$ T-cellen uit het CSF van de patiënten, met een tijdsinterval van 2 maanden. Gekweekte CSF $CD4^+$ T-cellijnen vertoonden reactiviteit tegen MBP, MOG en/of PLP. Er weden geen toxische effecten of nevenwerkingen na vaccinatie gerapporteerd. In alle patiënten werden anti-ergotype responsen geïnduceerd en werd anti-MBP/PLP/MOG reactiviteit laag gehouden of gereduceerd. In 3/5 patiënten werden proliferatieve responsen tegen het CSF vaccin geobserveerd (28).

Tabel 2 geeft een overzicht van klinische TCV studies, die door verschillende onderzoeksgroepen uitgevoerd werden, zowel voor MS als voor andere auto-immune aandoeningen.

Tabel 2: Overzicht van verschillende uitgevoerde humane T-celvaccinatie studies (overzichtsartikel 26).

Immune disease	Vaccine composition	Subjects	Clinical phase	Center
Multiple sclerosis	Blood derived T-cell lines specific for:			
	MBP	RR-MS ($n=5$) PP-MS ($n=1$) SP-MS ($n=2$)	I (Completed) [11]	LUC, Diepenbeek, Belgium
		RR-MS ($n=49$)	I (Completed) [16]	LUC, Diepenbeek, Belgium
	MBP peptides	RR-MS ($n=28$) SP-MS ($n=26$)	II (Completed) [17]	Baylor College, Houston, USA
	Whole bovine myelin	SP-MS ($n=4$) SP-MS ($n=80$)	I (Completed) [18] II (Ongoing)	USC, Los Angeles, USA
	Hydrolyzed bovine brain white matter	CP-MS ($n=40$)	I (Ongoing)	Buenos Aires, Argentinia
	Myelin peptides	RR-MS ($n=30$)	I/II (Ongoing)	Hadassah Hospital, Jerusalem, Israel
	MBP and MOG peptides	RR-MS ($n=20$)	I/II (Ongoing)	Sheba Medical Center, Jerusalem, Israel
	CSF-derived T cells	PP-MS ($n=4$)	I (Completed) [44]	Harvard Medical School, Boston, USA
	CSF-derived activated $CD4^+$ T cells	RR-MS ($n=4$) SP-MS ($n=1$)	I (Completed) [28]	LUC, Diepenbeek, Belgium
	CSF-derived activated $CD4^+$ T cells	RR-MS ($n=60$)	II (Ongoing)	LUC, Diepenbeek, Belgium
Rheumatoid Arthritis	Synovial tissue/fluid derived T-cells	RA ($n=13$)	I (Completed) [24]	University Hospital, Leiden, The Netherlands
Crohn's Disease	Gut-derived $CD4^+$ T-cells	CD ($n=2$)	Pilot [26]	University of Aarhus, Denmark
AIDS	Blood derived T cells specific for rCD4	HIV ($n=7$)	I (Completed)	Hadassah Hospital, Jerusalem, Israel

3.2 Inductie of stimulatie van regulatoire netwerken door TCV

Experimenten in EAE hebben aangetoond dat TCV regulatoire netwerken induceert of stimuleert die autoreactieve T-cellen onderdrukken. Anti-idiotype T-cellen ($CD8^+$) herkennen de TCR van de MBP reactieve vaccin klonen en zijn in staat deze klonen te lyseren.

Naast deze anti-idiotype responsen, zijn er waarschijnlijk ook nog andere mechanismen die bijdragen aan de beschermende immuunresponsen. Er is aangetoond dat anti-ergotype responsen gericht tegen een activatie merker op autoreactieve T-cellen ook een belangrijke rol spelen bij de suppressie van geactiveerde T-cellen (33). Waarschijnlijk behoren γδ T-cellen ook tot deze anti-ergotype T-cellen (Terg) (33) en zijn ze betrokken bij T-T cel interacties die versterkt worden door TCV (34). Tot slot inhiberen humorale responsen, geïnduceerd door

TCV in EAE, de proliferatie van de vaccin klonen. Belangrijk om weten is dat de humorale responsen in patiënten duidelijk minder uitgesproken zijn in vergelijking met de humorale responsen waargenomen in het EAE model (33). Figuur 3 geeft een overzicht van de mogelijke regulatiemechanismen, geïnduceerd door TCV.

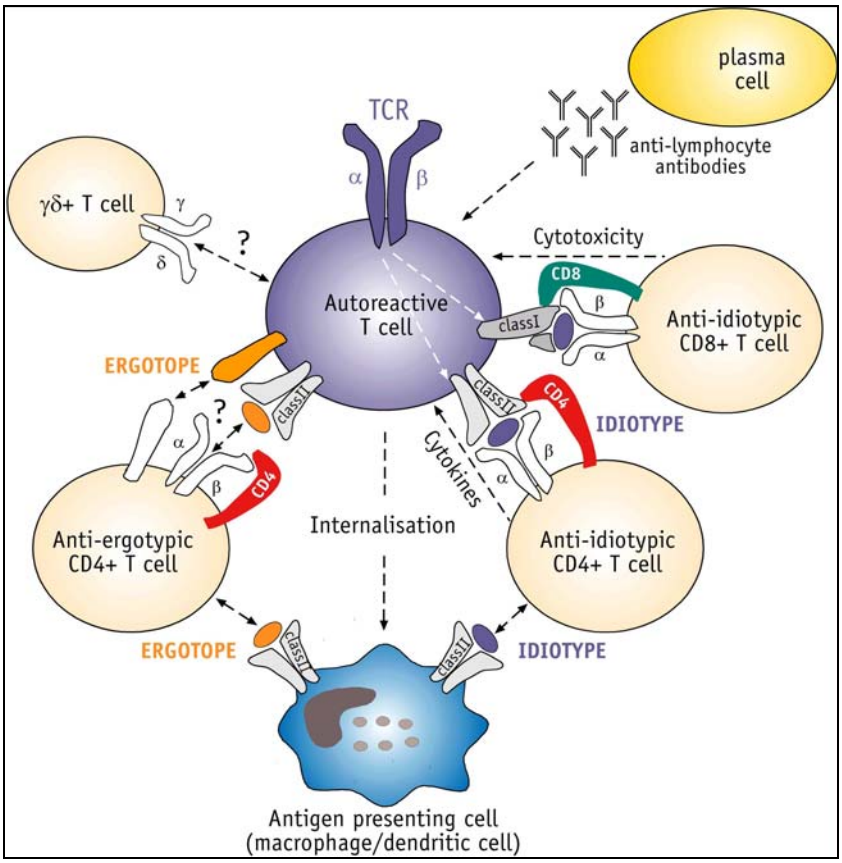
3.2.1 Anti-idiotype netwerken

Het anti-idiotype netwerk vertoont een hoge complexiteit. $CD8^+$ anti-idiotype T-cellen geïsoleerd uit gevaccineerde MS-patiënten oefenen een inhiberende werking uit (via productie van cytokines) en zijn ook cytotoxisch ten opzichte van de MBP reactieve T-cellen in het vaccin en dit op een MHC I restrictieve manier (30, 31). Anderzijds zouden ze een shift veroorzaken van een Th1 naar een meer protectief Th2 cytokine patroon (overzichtsartikel 35). De $CD8^+$ anti-idiotype T-cellen herkennen waarschijnlijk TCR determinanten in de hypervariabele CDR3 regio (*complementarity-determining region 3*) of in de minder variabele CDR2 regio van de $CD4^+$ autoreactieve T-cel (31, 36). Naast de $CD8^+$ T-cellen werden ook $CD4^+$ TCR specifieke T-cellen aangetoond maar in dit geval is er sprake van een MHC II restrictie. Na stimulatie produceren deze $CD4^+$ T-cellen grote hoeveelheden IL-10 en kunnen zo vermoedelijk zorgen voor een suppressie van de circulerende MBP reactieve T-celklonen (37). Ten tweede kunnen de $CD4^+$ T-cellen de $CD8^+$ anti-idiotype T-cellen activeren, waardoor de cytotoxische activiteit van de $CD8^+$ in werking treedt, zoals eerder vermeld in 2.3 (overzichtsartikel 38). Er bestaan verschillende modellen die een antwoord trachten te geven op de vragen hoe target TCR gepresenteerd worden en hoe anti-idiotype T-cellen ze vervolgens herkennen. Endogene TCR peptiden kunnen gepresenteerd worden aan anti-idiotype T-cellen door zelf-MHC moleculen, zowel MHC I als II (39, 40). Deze TCR peptiden kunnen enerzijds ontstaan tijdens de normale proteïne turnover van endogene kloon specifieke TCR. Anderzijds kunnen de TCR proteïnen, afkomstig van dode T-cellen, opgenomen worden door antigeenpresenterende cellen, macrofagen bijvoorbeeld. Vervolgens verwerken de macrofagen de TCR en brengen ze een stukje van de TCR samen met MHC II moleculen tot expressie op hun oppervlak. Deze twee hypotheses verklaren ook het feit dat bij vorige vaccinaties zowel $CD8^+$ MHC I restrictieve als $CD4^+$ MHC II restrictieve anti-idiotype T-cellen gedetecteerd werden (37, 41).

3.2.2 Anti-ergotype netwerken

TCR anti-idiotype regulatie is niet het enige effectormechanisme van TCV, anti-ergotype immuniteit speelt eveneens een belangrijke rol. Het begrip “anti-ergotype T-cellen” is

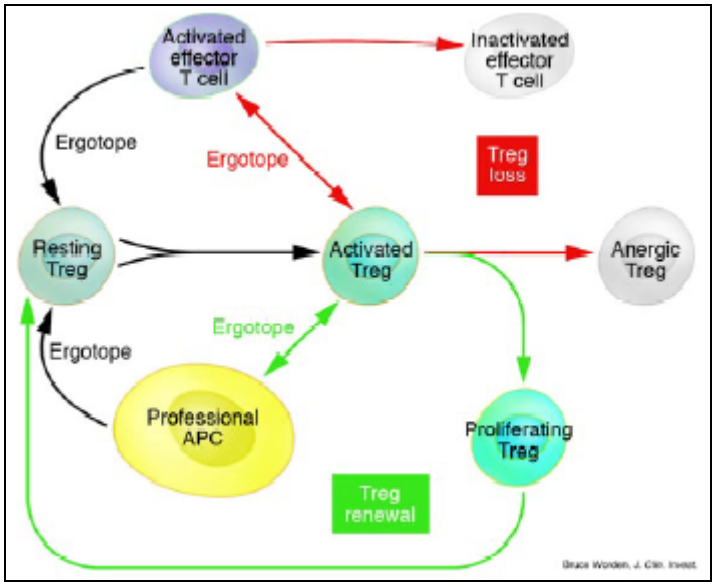
afkomstig van het feit dat deze T-cellen reactief zijn tegen een activatiemerker, ergotoop, van T-cellen in het vaccin. Terg worden vandaar als volgt gedefinieerd: T-cellen, die reactief zijn tegen autologe geactiveerde T-cellen maar niet tegen dezelfde T-cellen in rust, ongeacht het idiotype en dus antigenspecificiteit van de geactiveerde T-cellen. Twee zaken zijn dus van belang: activatie van de stimulator T-cellen en celcontact tussen de Terg en de geactiveerde T-cel via het ergotoop.



Figuur 3: **Overzicht van regulatoire mechanismen geïnduceerd door TCV (overzichtsartikel 26).**

Anti-ergotype responsen zijn van korte duur en komen ook voor in gezonde personen. Ze maken dus deel uit van natuurlijk voorkomende T-celregulatie. Terg worden terug gevonden in de thymus, milt en lymfeknopen. Studies hebben aangetoond dat naïeve Terg $CD8^+$ positief zijn en TCR α/β^+ of TCR γ/δ^+ vertonen. De respons van naïeve TCR α/β^+ $CD8^+$ Terg vertoont een MHC I restrictie en is afhankelijk van B7 en CD28. De respons van TCR γ/δ^+ $CD8^+$ Terg is eveneens afhankelijk van B7 en CD28 maar vertoont noch een MHC I restrictie noch een MHC II restrictie. Verder onderzoek moet uitwijzen of dergelijke Terg beperkt worden door niet-klassieke MHC moleculen zoals Qa-1/HLA-E (overzichtsartikel 38). Wanneer Terg blootgesteld worden aan een ergotoop blijkt dat naast het $CD8^+$ fenotype ook het $CD4^+$

fenotype voorkomt. Zij herkennen het volledige ergotoop of een deel van het ergotoop gepresenteerd door MHC II moleculen op de geactiveerde stimulator T-cellen (42). Professionele APC, zoals macrofagen, kunnen ook ergotoop peptiden presenteren aan Terg (zie figuur 3) maar de respons van de Terg is dan niet hetzelfde als hun respons op volledig geactiveerde T-cellen. Wanneer geactiveerde effector T-cellen namelijk Terg activeren, zal de interactie tussen de twee typen cellen leiden tot een inactivatie van de effector T-cellen maar ook tot anergie van de Terg. Het gevolg is dus een neutralisatie van Terg. Wanneer het ergotoop daarentegen gepresenteerd wordt door APC worden geactiveerde Terg niet anergisch maar vertonen ze een sterke proliferatie. De prolifererende Terg activeren op hun beurt Terg in rust (figuur 4).



Figuur 4: **Balans tussen Terg (T reg in tekening) neutralisatie en Terg "renewal" (overzichtsartikel 38).**

→ Negatieve regulatie

→ Positieve regulatie

Deze cyclus van Terg "renewal" verhoogt het aantal Tergs en zorgt voor een in standhouding van de Terg populatie. Mogelijk werkt deze renewal niet voldoende bij MS-patiënten (overzichtsartikel 38). Door ergotoop peptiden toe te voegen aan het T-cel vaccin, zouden de APC aangesproken kunnen worden en kan "Terg renewal" zorgen voor een uitschakeling van de auto-immune effector T-cellen (overzichtsartikel 35).

Uit *in vitro* experimenten is gebleken dat immunologische processen in de lymfeknopen stimulator T-cellen activeert waardoor zij het ergotoop tot expressie brengen, hetgeen de proliferatie van Terg induceert. Hoogst waarschijnlijk stimuleren Terg de verdere expansie van elkaar. Een laatste kenmerk van de anti-ergotype respons is dat Terg vermoedelijk

noodzakelijk zijn voor de inductie van de anti-idiotype respons. Deze laatste verschijnt immers na de anti-ergotype respons (43).

Welke moleculen komen nu in aanmerking als kandidaat targets van anti-ergotype T-T interacties? In principe kan elk molecule functioneren als ergotoop als het aan de twee voorwaarden voldoet: het moet gepresenteerd worden door geactiveerde T-cellen en het moet Terg activeren (overzichtsartikel 38). Daarenboven moet het een structurele component zijn van geactiveerde T-cellen en geen secretoire component (43). CD25 en Heat Shock Protein 60 (HSP60) zijn dergelijke kandidaat ergotopen.

CD25 is de alfa keten van de IL-2 receptor (IL2R) en een prominente merker voor geactiveerde T-cellen. De IL2R staat in voor de autocrien gestuurde proliferatie van geactiveerde T-cellen en bestaat uit drie ketens: een α-keten, een β-keten en een γ-keten. Deze laatste wordt op de meeste lymfoïde cellen constitutief tot expressie gebracht terwijl de α- en β-keten verhoogd tot expressie komen na antigen geïnduceerde lymfocytactivatie. Bijgevolg brengen alleen antigen-*geactiveerde* $CD4^+$ en $CD8^+$ T-cellen de hoge affiniteits-IL2R (α-, β-, en γ-keten) tot expressie en prolifereren ze in respons op fysiologische niveaus van IL-2. Als de antigenconcentratie daalt, valt ook IL-2 weg waardoor de expressie van de α- en β-keten zal verlagen. Cellen zullen vervolgens apoptose ondergaan (6).

Dat CD25 in aanmerking komt als kandidaat ergotoop blijkt uit een recente studie waarbij ratten gevaccineerd werden met CD25. Deze DNA vaccinatie beschermde de ratten tegen de inductie van adjuvant artritis (AA). De CD25 DNA vaccinatie op zich veroorzaakte geen versterking van de anti-ergotype respons tegen geactiveerde T-cellen en er werden geen cytokines gedetecteerd. Wanneer AA echter geïnduceerd werd bij gevaccineerde en niet-gevaccineerde ratten, bleek de anti-ergotype respons meer uitgesproken te zijn bij de gevaccineerde ratten. Bovendien was de proliferatie van T-cellen gericht tegen CD25 alleen waarneembaar bij CD25 DNA-gevaccineerde ratten. CD25-vaccinatie had eveneens zijn effect op de cytokine productie. Terg van niet-gevaccineerde ratten secreteerden namelijk vooral IFN-γ. Dit Th1 cytokine heeft waarschijnlijk een inhibitorisch effect op de activatie van anti-ergotype T-cellen die niet zullen prolifereren maar zelf ook IFN-γ secreteren. DNA vaccinatie met CD25 daarentegen zorgt voor een aanrijking van de anti-ergotype T-cellen, waardoor ze enerzijds hun proliferatieve eigenschappen bewaren en anderzijds IL-10 produceren. Dit IL-10 kan vervolgens voor een shift van een Th1 naar een Th2 fenotype zorgen van normalerwijze pathogene T-cellen (42).

CD25 is echter ook een merker van $CD4^+CD25^+$ regulatoire T-cellen die CD25 constitutief tot expressie brengen. Deze regulatoire T-cellen inhiberen de proliferatie van $CD4^+$ T-cellen.

Terg daarentegen onderdrukken de proliferatie van auto-immune T-cellen niet maar zorgen vermoedelijk voor een cytokine shift. Dus zowel $CD4^+CD25^+$ regulatoire T-cellen als Terg spelen een rol bij de controle van auto-immune T-cellen maar op een verschillend niveau (42). CD25 is waarschijnlijk een betrouwbare merker voor geactiveerde T-cellen, maar T-cel ergotopen kunnen ook moleculen zijn die niet uitsluitend op geactiveerde T-cellen voorkomen. ***HSP60*** is een dergelijk voorbeeld. Dit molecule behoort tot de familie van de heat-shock proteïnen en is één van de belangrijkste moleculaire chaperonen die constitutief tot expressie wordt gebracht in zowel prokaryoten als eukaryoten. HSP60 speelt, naast zijn inductie bij stress situaties, een voorname rol bij het vouwproces van proteïnen en bij de assemblage van oligomerische proteïnen (44). De HSP60 aminozuursequentie is sterk evolutionair geconserveerd gebleven waardoor zijn functies waarschijnlijk ook bewaard zijn gebleven (44, 45). Ondanks het feit dat HSP60 vooral tot expressie komt in mitochondriën en chloroplasten, hebben recente studies aangetoond dat het ook aanwezig is op het celoppervlak (44). Deze lokalisatie en de opmerking van de evolutionaire conservatie komen overeen met de veronderstelling dat HSP60 een belangrijk autoantigen zou zijn en op die manier betrokken zou kunnen zijn bij een groot aantal auto-immune ziektes en pathogene infecties. De HSP60 expressie is echter niet verhoogd in auto-immune aandoeningen (44, 45). Een andere reden waarom HSP60 moleculen betrokken zouden zijn bij orgaan-specifieke auto-immune ziektes, is dat zij een prominente rol uitoefenen bij de maturatie van dendritische cellen (DC) en dat zij de secretie van Th1 cytokines door deze cellen beïnvloeden (46).

Ondanks deze bevindingen blijkt dat HSP60 eveneens opgebouwd is uit regulatoire sequenties en dat T-cel responsen tegen deze regulatoire HSP60 epitopen inflammatoire aandoeningen, zoals reumatoïde artritis, reguleren (47). DNA vaccinatie van Lewis ratten met peptide Hu3 (KFGADARALMLQGVVDLLADA) induceerde T-cel responsen tegen dit Hu3. Bovendien werden Hu3-gevaccineerde ratten beschermd tegen AA. De inductie van AA ging namelijk gepaard met de expansie en/of activatie van de regulatoire cellen, die op voorhand geïnduceerd werden door vaccinatie met Hu3. Deze HSP60-specifieke T-cellen, geïnduceerd door Hu3 vaccinatie, secreteerden vooral IL-10 en TGF-β en in mindere mate IFN-γ. Het laatst genoemde cytokine is kenmerkend voor de progressie van AA. Daarom wordt verondersteld dat de HSP60 specifieke T-cellen aangetrokken worden naar de ontstoken gewrichten, waar ze gestimuleerd worden om IL-10 en TGF-β te produceren, die op hun beurt de pathogene T-celklonen verantwoordelijk voor AA controleren (47).

Relevant aan dit discussiepunt (HSP60: auto-immuun versus regulatoir) is de ontdekking dat HSP60 epitopen als ergotoop gepresenteerd kunnen worden aan Terg door geactiveerde T-

cellen. De anti-ergotype respons vertoont een MHC II restrictie maar er moet geen peptide toegevoegd worden aan de reagerende T-cellen. De geactiveerde T-cellen zorgen namelijk voor een opregulatie van hun HSP60 expressie en presenteren vervolgens bepaalde HSP60 peptiden aan de Terg. Ook hier is de activatie van de stimulatorcellen van groot belang, Terg reageren niet op T-cellen in rust (overzichtsartikel 38).

4. Onderzoeksopzet

Tijdens de stageperiode zal de reactiviteit tegen de kandidaat ergotopen (IL2R-α en HSP60) verder bestudeerd worden in gezonde controles en in MS-patiënten. De algemene T-cel reactiviteit tegen ergotoop-afgeleide peptiden wordt gemeten met behulp van *solid phase enzyme-linked immunospot assay* (Elispot). Dit is een cytokine gebaseerde assay waarbij vooral gekeken wordt naar de IFN-γ en IL-10 productie. Een alternatieve manier om T-cel reactiviteit ten opzichte van de ergotoop afgeleide peptiden te meten is via een 5,6-carboxyfluorescerend diacetaat succinimidyl ester (CFSE) assay. Met deze proliferatie gebaseerde assay kan men niet alleen de proliferatie meten maar ook het fenotype van reactieve T-cellen bepalen. De CFSE assay zal in eerste instantie geoptimaliseerd worden. Het fenotype (CD4, CD8 $\alpha\beta^+/\gamma\delta^+$) zal ook bepaald worden via flowcytometrie (*fluorescence-activated cell sorter* FACS). Een gedetailleerde studie van de functie van Terg zal uitgevoerd worden via de aanmaak van ergotoop specifieke T-celklonen.

Op het gebied van mechanisme en functie zullen we nagaan of cytokines, die door de Terg geproduceerd worden, inhiberend werken op de proliferatie van geactiveerde T-cellen, van zowel gezonde controles als MS-patiënten. Tot slot worden de verschillen in functionaliteit van Terg uit MS-patiënten en gezonde controles met elkaar vergeleken.

Een gedetailleerde karakterisatie van de anti-ergotype responsen en de ergotype targets, zal naar de toekomst toe belangrijk zijn om hun rol, die ze bij T-cel immunoregulatie spelen, te ontrafelen. Daarenboven kan dit ook leiden tot de ontwikkeling van specifiekere vaccins en therapieën voor MS.

Materialen en Methoden

1. Patiënten en gezonde controles

Bij het uitvoeren van de experimenten werd gebruik gemaakt van Perifeer bloed mononucleaire cellen (PBMC) van 16 gezonde controles en 13 MS-patiënten. Tabel 3 toont de verschillende eigenschappen van beide groepen.

Tabel 3: Eigenschappen van de gezonde controles en MS-patiënten.

Gezonde controle	M/V	Leeftijd
NOJ	M	48
RUI	V	45
MAJ	M	41
LOJ	M	26
THM	V	27
DEA	V	53
SOV	V	33
BLJ	V	44
GIB	V	45
SME	V	37
HEJ	M	29
SLL	V	23
DRR	M	22
BAK	M	24
VEK	M	26
VEI	V	30

Patiënt	M/V	Leeftijd	Type MS	Ziekte duur (jr)	Behandeling
EGM	V	26	RR	4	/*
DRW	M	35	RR	3	/
DER	M	35	RR	6	/
SER	M	38	RR	4	/
PEG	M	46	RR	8	/
SIR	V	53	RR	8	/
KUH	V	55	RR	2	/
HEI	V	25	RR		/
SLE	V	55	RR	1	/
VMF	M	44	RR	2	TCV
SCS	V	17	RR	2	TCV
VBE	V	48	RR	4	/
COJ	V	50	SP	13	interferonβ -1a

*/ = geen behandeling

2. Gebruikte media en stimuli/antigenen

PBMC werden geïsoleerd door middel van een Ficoll (histopaque, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) densiteitscentrifugatie en gekweekt in RPMI-1640 medium waaraan 1% natrium pyruvaat, 1% niet-essentiële aminozuren (Invitrogen Life technologies, Paisely, Schotland) en 10% geïnactiveerd foetaal kalf serum (HyClone, Erembodegem, België) (kweekmedium) of autoloog geïnactiveerd serum (autoloog medium) aan toegevoegd werd. Humaan MBP werd geïsoleerd uit de witte stof van humane hersenen zoals beschreven (48). Tetanus toxoid (TT) werd verkregen van RIVM (Bilthoven, Nederland). IL2R-α peptide en HSP60 afgeleide peptiden (tabel 4) werden gesynthetiseerd en gezuiverd (> 95% zuiverheid) door Severn Biotech Ltd (Worcester, UK). Anti-CD3 (kloon 2G3, eigen productie, BIOMED) of *phytohaemagglutinine* (PHA, Difco, Detroit, MI, USA) werd gebruikt als positieve controle.

Tabel 4: Aminozuursequenties van IL2R-α peptide en HSP60 afgeleide peptiden.

peptide	Positie	Sequentie
IL2R-α	140-161	IYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHR
HSP60 1	106-128	NEEAGDGTTATVLARSIAKEGF
HSP60 2	133-149	KGANPVEIRRGVELAVD
HSP60 3	179-197	DKEIGNIISDAMKKVGRKG
HSP60 4	267-281	HRKPLLIIAEDVDGE
HSP60 6	297-311	VVAVKAPGFGDNRKN
HSP60 8	425-441	LNATRAAVEEGIVLGGG

3. Bepaling van T-cel reactiviteit met behulp van ELISPOT

Bij het bestuderen van T-cel reactiviteit werd gebruik gemaakt van een cytokine gebaseerde assay, de *Solid Phase Enzyme-Linked Immunospot Assay* (ELISPOT). Deze techniek kan beschouwd worden als een modificatie van de klassieke ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) en werd oorspronkelijk gebruikt voor de detectie van antilichaam-secreterende B-cellen. Tegenwoordig wordt deze techniek ook gebruikt voor de visualisatie van de cytokineproductie door T-cellen (49).

In de stageperiode werden antigen specifieke T-cellen geanalyseerd op basis van de productie van de cytokines IFN-γ en IL-10. In een eerste stap werden 96-well nitrocellulose membraan platen (Millipore Corporation, Bedford, MA) overnacht bij 4 °C gecoat met anti-humaan IFN-γ of IL-10 (MabTech, Stockholm, Zweden). Niet gebonden antilichamen werden vervolgens wegwassen met wasbuffer (10X PBS, Tween-20 (Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Duitsland) en gedestilleerd water (AD)). Een blokkering van de niet-specifieke bindingsplaatsen vond plaats door incubatie van de Elispotplaat met kweekmedium (KM) bij 37°C gedurende 2 uren. Hierna werd het KM verwijderd en werden PBMC toegevoegd aan een concentratie van $2{,}5x10^5$ cellen per well in de aanwezigheid van het IL2R-α peptide (5µg/ml) of HSP60 afgeleide peptiden (5µg/ml). Als positieve controle werd anti-CD3 (2µg/ml) en als negatieve controle enkel KM (zonder antigen) toegevoegd aan de cellen. Na een incubatie van 20 uur op 37°C werden de cellen weggewassen met behulp van wasbuffer en gebonden IFN-γ/IL-10 werd gevisualiseerd door in een eerste stap biotine gelabeld anti-humaan IFN-γ/IL-10 (MabTech, Stockholm, Zweden) antilichaam 1/1000 verdund in wasbuffer met 5% *bovine serum albumine* (BSA, US Biological, Swampscott, MA) toe te voegen. Na een 2 uur durende incubatie op kamertemperatuur (KT) volgde in een tweede stap de toevoeging van 1/1000 verdund Streptavidine-alkalisch fosfatase (ALP)-PQ (MabTech, Stockholm, Zweden), dat vier bindingsplaatsen bevat voor biotine. Spots verschenen door additie van BCIP/NBT (Pierce,

Rockford, IL, USA), het substraat voor ALP-PQ. Deze kleurreactie werd gestopt door een wasstap met AD. Spots werden geteld onder een dissectie microscoop. Het verschil tussen het aantal spots in respons op het toegevoegde antigen en het aantal spots in KM is een maat voor de specifieke reactiviteit van de T-cellen ten opzichte van het betreffende antigen.

4. Meting T-cel reactiviteit met behulp van een proliferatie gebaseerde assay (CFSE assay)

Gedurende de laatste 30 jaar heeft men antigen specifieke lymfocyt proliferatie gemeten via de inbouw van ^{3}H-thymidine in het DNA van cellen. Deze techniek laat echter de detectie van zeldzame autoantigen specifieke T-cellen niet toe. Daarenboven kan men het fenotype van de prolifererende cellen niet bepalen. Een nieuwe methode om de proliferatie van cellen te meten, namelijk de CFSE assay, biedt een oplossing voor deze mogelijke problemen (50).

Deze techniek detecteert, identificeert en kwantificeert prolifererende T-cellen in vitro op basis van een verdunning van de fluorescerende kleurstof *5,6-carboxylfluoresceïn diacetate succinimidyl ester* (CFSE), waarmee de cellen op voorhand gelabeld zijn. CFSE is opgebouwd uit twee acetaat gedeeltes en een functionele groep namelijk een succinimidyl ester. Deze vorm van het molecule kan door de membraan penetreren en is niet-fluorescent. Wanneer het echter in de intracellulaire omgeving terecht komt, zullen endogene esterases de acetaat groepen verwijderen waardoor CFSE niet meer doorheen de celmembraan kan en sterk fluorescent wordt. Daarenboven zal de succinimidyl ester reageren met vrije aminogroepen zodat *dye-protein* complexen gevormd worden (51).

De fluorescentie van de CFSE gelabelde cellen halveert bij iedere celdeling. Gedeelde dochtercellen kunnen dus eenvoudig geïdentificeerd worden met behulp van flow cytometrie. Bovendien kan men het fenotype van prolifererende cellen karakteriseren via aankleuring van intracellulaire of oppervlaktemerkers (zie verder) (50).

Voorafgaand aan de labeling van vers geïsoleerde of ontdooide PBMC werd een 10 mM stockoplossing van CFSE (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Nederland) verdund in *phosphate buffered saline* (PBS, eigen productie, BIOMED) tot een werkoplossing van 1 µM. PBMC werden gelabeld gedurende 7 minuten bij 37°C aan een eindconcentratie van 0,5 µM CFSE bij een celconcentratie van 20 miljoen per ml in PBS/0,1%BSA. Om niet gebonden en reeds vrijgezet CFSE (dode cellen) weg te wassen, werden de gelabelde PBMC 1 maal gewassen, geresuspendeerd in KM en gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 37°C. In een laatste stap werden de PBMC geresuspendeerd in een geschikt volume aan een concentratie van 4 miljoen cellen per ml.

Het uitplaten van de cellen gebeurde in een 24-well plaat (Greiner bio-one, Frickenhause, Duitsland) aan een concentratie van 2 miljoen cellen per well. Deze cellen werden vervolgens gedurende 7 dagen gekweekt in de aanwezigheid van IL2R-α peptide (10 µg/ml) of MBP (40 µg/ml). Als positieve controle werd PHA (2µg/ml) of anti-CD3 (2µg/ml) gebruikt, de negatieve controle bestond uit CFSE gelabelde cellen in KM (geen stimulus). Aan de hand van een FACS-analyse (zie verder) kon op dag 7 de fractie prolifererende cellen en het fenotype van de prolifererende cellen bepaald worden. Er werden standaard data van $1x10^4$ cellen binnen de lymfocyt gate gemeten. Vanuit de FACS data werd enerzijds de delta prolifererende fractie (ΔPF) berekend door de achtergrondproliferatie (proliferatie gemeten in KM zonder toegevoegde stimulus) af te trekken van de prolifererende fractie in respons op het gebruikte antigen. Anderzijds werd de stimulatie index (SI) bepaald door de verhouding van ΔPF na antigen stimulatie en ΔPF in KM. De respons op het antigen kan als positief beschouwd worden wanneer de ΔPF gelijk is aan of groter is dan 1.0% én de SI gelijk is aan of groter is dan 2.0 (52).

5. MHC restrictie analyse

De MHC restrictie van de T-celrespons ten opzichte van IL2R-α peptide of MBP werd geanalyseerd met behulp van monoklonale antilichamen tegen MHC I (W6/32, ATCC, Becton DickinsorsT1 TDDlgië), HLA-imul25e

peptide gepulste, bestraalde PBMC ($1x10^5$ cellen/well). Recombinant IL-2 (5 U/ml, Roche Diagnostics, Brussel, België) werd 24 uur later toegevoegd. Op dag 14 werden IL2R-α peptide reactieve T-cellen geïdentificeerd met behulp van een split well assay. Hiervoor werd elke gekweekte well gesplitst in vier gelijke aliquots, die vervolgens in duplo gerestimuleerd werden met niet gepulste, bestraalde PBMC (negatieve controle) of met IL2R-α peptide gepulste, bestraalde PBMC. Aan de originele culturen werd vers KM met IL-2 (5 U/ml) toegevoegd tot het oorspronkelijke volume.

Na 3 dagen werd de reactiviteit gemeten via de ^{3}H-Thymidine inbouw in het DNA. Hiervoor werd 1/20 verdund ^{3}H-Thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK) gedurende de laatste 5 uur incubatie toegevoegd. Vervolgens werden de cellen op een filter gezogen met behulp van een cel harvester (Wallac, Turku, Finland). Op de gedroogde filter werd een β-scintillatie vloeistof (Wallac, Turku, Finland) gepipetteerd waarna de radioactiviteit gemeten werd met een scintillatie teller (Wallac, Turku, Finland). Een T-cellijn/kloon wordt als positief beschouwd wanneer de stimulatie index (gemiddelde counts met antigen / gemiddelde counts in de controle wells) groter is dan 3.

8. Supernatans inhibitietest

Het effect van het supernatans van geactiveerde IL2R-α T-cellijnen (anti-ergotype T-cellen) op de activatie van T-cellen werd gemeten in een supernatans inhibitietest. Hiervoor werd een TT-reactieve T-cellijn (indicator lijn) van een gezonde donor, geheractiveerd met TT gepulste, bestraalde PBMC in aanwezigheid van toenemende hoeveelheden van T-cel supernatans (12,5 % en 25 %). Deze supernatantia waren afkomstig van recent geactiveerde IL2R-α peptide specifieke T-cellen. Na drie dagen werd de proliferatie gemeten met behulp van de ^{3}H-Thymidine incorporatie assay, zoals eerder beschreven (zie punt 7).

9. Bepaling van het cytokineprofiel via intracellulaire FACS-kleuring.

De bepaling van het cytokineprofiel van T-celculturen via intracellulaire FACS kan in vier stappen opgedeeld worden: activatie van de cellen, oppervlakte kleuring, fixatie en permeabilisatie en tot slot een intracellulaire cytokine kleuring.

T-cellen werden gesuspendeerd in RPMI + 10% FCS aan een concentratie van 2 miljoen cellen/ml en geactiveerd met phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 25 ng/ml), Calcium ionomycine (CaI, 1 µg/ml, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) in aanwezigheid van Brefeldine A (BFA, 10 µg/ml, Pharmingen BD, San Diego, USA). PMA is een intracellulaire messenger en activeert een proteïne kinase C. CaI (een Ca^{2+} ionofoor) extraheert calcium^{2+} en andere

divalente kationen uit de extracellulaire omgeving, waardoor de intracellulaire Ca concentratie verhoogt. Samen induceren zij bijgevolg een cellulaire respons, die de accumulatie van intracellulaire cytokines bevordert. BFA, ook wel golgiplug genoemd, blokkeert vervolgens het proteïnetransport van het endoplasmatisch reticulum (ER) naar het golgicomplex zodat de te analyseren cytokines in de cel blijven.

Na een vier uur durende incubatie bij 37°C werden de cellen in een 96-well V bodem plaat gebracht en 15 minuten op KT geïncubeerd met een antilichaam tegen de oppervlaktemerker CD3 of CD4. Een fixatie en permeabilisatie van de cellen werd in een volgende stap bereikt door incubatie in een cytofix/cytoperm (Pharmigen BD, San Diego, USA) oplossing gedurende 20 minuten op 4°C gevolgd door een wasstap met een Perm Wash buffer (Pharmigen BD, San Diego, USA). Fixatie van de cellen zorgt ervoor dat hun cellulaire morfologie, intracellulaire antigeniciteit en structurele integriteit behouden blijft. Anderzijds is een permeabilisatie noodzakelijk opdat de later toegevoegde antilichamen tegen intracellulaire cytokines de celmembraan, de cytosol, het membraan van het ER en golgicomplex zouden kunnen penetreren. In een laatste stap werden intracellulaire cytokines gekleurd door toevoeging van hun overeenkomstige antilichamen. Verder werd een controlekleuring meegenomen (IgG2a-FITC/IgG1-PerCP, Becton Dickinson, Erebodegem, België) voor de juiste kwadrantsettings en een antilichaam tegen de activatie merker CD69, als controle voor minimale activatie (minimaal 80% $CD3^{+}CD69^{+}$). Tabel 5 geeft een overzicht van de verschillende gebruikte antilichaamcombinaties. Het aflezen van de stalen gebeurde ten slotte met de Facscalibur flow cytometer.

Tabel 5: Overzicht van gebruikte antilichamen bij intracellulaire cytokine staining.

1	IgG2a-FITC/IgG1-PerCP
2	CD3-PerCP/CD69-PE *
3	CD3-PerCP/IFNγ-PE *
4	CD3-PerCP/IL4-PE *
5	CD3-PerCP/IL10-PE *

*Als alternatief voor CD3-PerCP werd CD4-PerCP gebruikt.

Resultaten

Het hoofddoel van de stage was het onderzoek naar kandidaat ergotopen in het bijzonder de alfa keten van de interleukine 2 receptor (IL2R-α) en heat shock protein 60 (HSP60). Om de reactiviteit van T-cellen te meten ten opzichte van deze kandidaat ergotopen werd er gebruik gemaakt van twee technieken, namelijk Elispot en CFSE assay. In beide technieken werden PBMC gestimuleerd met een peptide afgeleid van IL2R-α of met afgeleide peptiden van HSP60 (zie tabel 4). Het IL2R-α peptide (140-161) omvat bindingspatronen voor HLA-DR (klasse II). De HSP60 afgeleide peptiden komen overeen met aminozuursequenties, die zich enerzijds in het regulatoir gebied van het volledige eiwit bevinden en anderzijds in het auto-immune gebied (zie inleiding). Deze peptiden werden ook geselecteerd op basis van bindingsaffiniteit met HLA-DR.
In eerste instantie werden beide technieken geoptimaliseerd. Vervolgens werden eventuele verschillen bestudeerd tussen gezonde controles en MS-patiënten, op het gebied van reactiviteit ten opzichte van deze kandidaat ergotopen.

1. Bepaling van T-cel reactiviteit ten opzichte van kandidaat ergotopen via IFN-γ ELISPOT

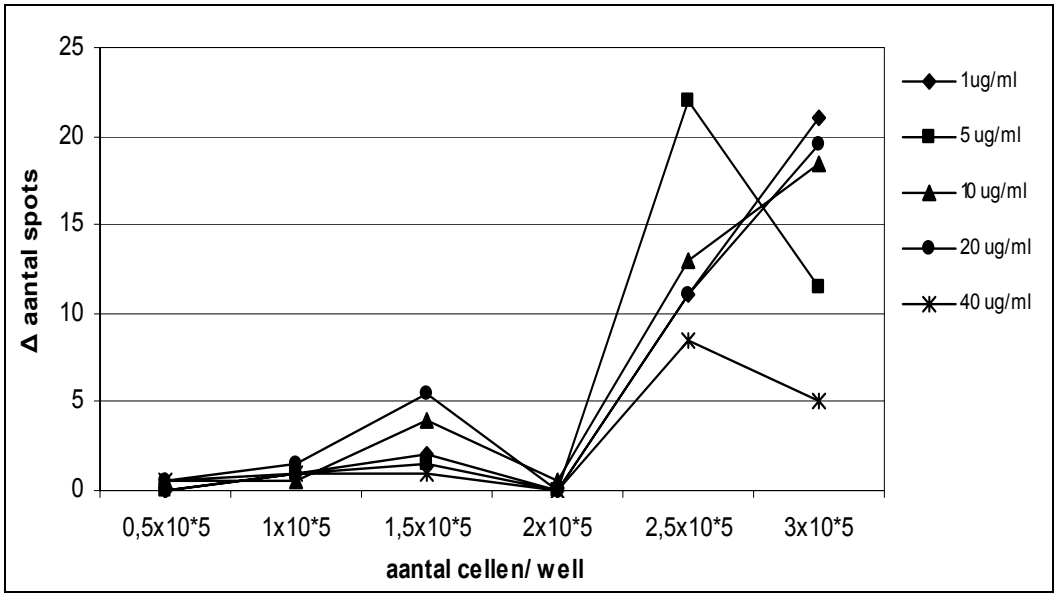
Om de reactiviteit van T-cellen te meten ten opzichte van het peptide afgeleid van IL2R-α en de HSP60 afgeleide peptiden, werd er gebruik gemaakt van Elispot. Hierbij worden PBMC gestimuleerd met antigen en T-cellen reactief tegen het betreffende antigen produceren cytokines. Deze cytokines worden aangetoond met antilichamen, hetgeen zichtbaar wordt in de vorm van spots. Het aantal spots is een weergave van het aantal reactieve T-cellen en dus een maat voor de T-cel reactiviteit van de gestimuleerde PBMC ten opzichte van de gebruikte antigenen.
In eerste instantie werd deze techniek geoptimaliseerd voor wat betreft de celdensiteit en peptide concentratie. Vervolgens werden PBMC van gezonde controles en MS-patiënten getest voor reactiviteit tegen de kandidaat ergotopen: namelijk de verschillende HSP60 afgeleide peptiden en het IL2R-α peptide (140-161).

1.1 Optimalisatie van het celaantal en de ergotoop peptide concentratie

Eerst werd nagegaan wat de optimale celaantallen en peptide concentratie zijn om T-cel reactiviteit tegen ergotoop peptiden te meten met IFN-γ Elispot. De optimale IL2R-α peptide

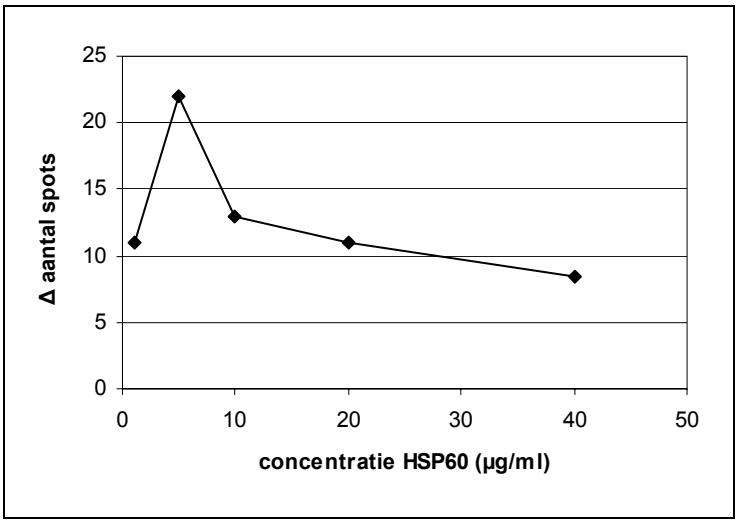
concentratie voor Elispot (10 µg/ml) werd reeds in eerder uitgevoerde experimenten bepaald. Om de optimale HSP60 peptide concentratie en celaantal te bepalen werden toenemende hoeveelheden PBMC ($0,5x10^5$ - $3x10^5$ cellen/well) van een gezonde donor gestimuleerd met oplopende concentraties van HSP60 peptide 3 (1 µg/ml – 40 µg/ml).

Uit figuur 6 kan men afleiden dat voor alle geteste peptidenconcentraties geen significante toename van spots en dus T-cel reactiviteit is waar te nemen wanneer het celaantal wordt opgevoerd tot $2x10^5$ cellen/well. Vanaf $2,5x10^5$ cellen per well is er wel een duidelijke stijgende trend van het aantal spots waarneembaar en dit voor de meeste geteste peptidenconcentraties. Uit hetzelfde experiment kon eveneens de optimale concentratie van HSP60 afgeleid worden. Hiervoor werd in figuur 7 het aantal spots uitgezet bekomen bij een stimulatie van $2,5x10^5$ cellen per well met 1, 5, 10, 20, en 40 µg/ml HSP60 peptide. Het aantal spots neemt toe naarmate de HSP60 peptide concentratie toe neemt van 1 tot 5 µg/ml, waar het aantal spots en de T-cel reactiviteit een piek bereikt. Vanaf 10 µg/ml daalt de reactiviteit gradueel met een minimale waarde bij 40 µg/ml. Bij de verdere toepassing van Elispot voor de analyse van HSP60 reactiviteit zullen de condities $2,5x10^5$ cellen/well en 5 µg/ml HSP60 peptide gebruikt worden als optimale parameters.



Figuur 6: Antigen en cel dosis respons curve voor HSP60 T-cel reactiviteit gemeten met IFN-γ Elispot.

Voor de bepaling van het optimale celaantal per well, werd een Elispot assay opgezet waarbij PBMC van een gezonde donor volgens een toenemend celaantal (X-as) werden toegevoegd. Deze PBMC werden telkens gestimuleerd met een toenemende concentratie van HSP60 (1µg/ml – 40 µg/ml). Het aantal getelde spots in de niet gestimuleerde conditie (KM) werd afgetrokken van het aantal getelde spots na stimulatie met HSP60 peptide. Het resulterende aantal spots (Δ aantal spots) is uitgezet op de Y-as.



Figuur 7: T-cel reactiviteit ten opzichte van verschillende HSP60 peptide concentraties.
$2{,}5x10^5$ PBMC per well werden gestimuleerd met verschillende HSP60 peptide concentraties gaande van 1 tot en met 40 µg/ml (X-as) voor 1 donor. Het aantal getelde spots in de niet gestimuleerde conditie (KM) werd afgetrokken van het aantal getelde spots na stimulatie met HSP60 peptide. Het resulterende aantal spots (Δ aantal spots) is uitgezet op de Y-as.

1.2 Bepaling van T-cel reactiviteit ten opzichte van HSP60 afgeleide peptiden en IL2R-α peptide in gezonde controles en MS-patiënten

Reactiviteit van T-cellen ten opzichte van de verschillende HSP60 afgeleide peptiden (1-8, tabel 4) werd getest in een gezonde donor door $2{,}5x10^5$ cellen/well te stimuleren met het respectievelijke HSP60 afgeleide peptide (5 µg/ml). Tabel 6a geeft het aantal getelde spots weer overeenkomend met het aantal IFN-γ producerende T-cellen in gestimuleerde of niet gestimuleerde condities (kweekmedium, KM). In tabel 6b werden dezelfde condities uitgetest voor autoloog medium (AM). Berekende p-waardes (met behulp van tweezijdige student t-toets), zijn eveneens in beide tabellen terug te vinden. Door deze p-waardes te vergelijken met het significantieniveau 0.05, kan er bepaald worden of er significante verschillen optreden tussen het aantal IFN-γ^+ spots van ongestimuleerde T-cellen en van T-cellen gestimuleerd met HSP60 afgeleide peptiden. Alle p-waardes (behalve die behorend bij HSP60 peptide 3) in tabel 6a en 6b zijn groter dan 0.05, hetgeen er op duidt dat er in deze donor significante T-cel reactiviteit werd gevonden tegen slechts 1 van de HSP60 afgeleide peptiden. Bovendien kan men uit deze twee tabellen afleiden dat de achtergrond reactiviteit in AM (2, 3, 3) hoger is in vergelijking met KM (0, 0, 0). Reactiviteit ten opzichte van de positieve controle (anti-CD3) was hoog (meer dan 100 spots, data niet getoond). Hoewel deze data slechts afkomstig zijn van 1 gezonde donor kan besloten worden dat T-cel reactiviteit ten opzichte van HSP60 peptiden moeilijk kan gedetecteerd worden gebruik makende van IFN-γ Elispot.

Tabel 6: Stimulatie van T-cellen met HSP60 afgeleide peptiden.

Tabel 6a: Stimulatie van T-cellen in KM

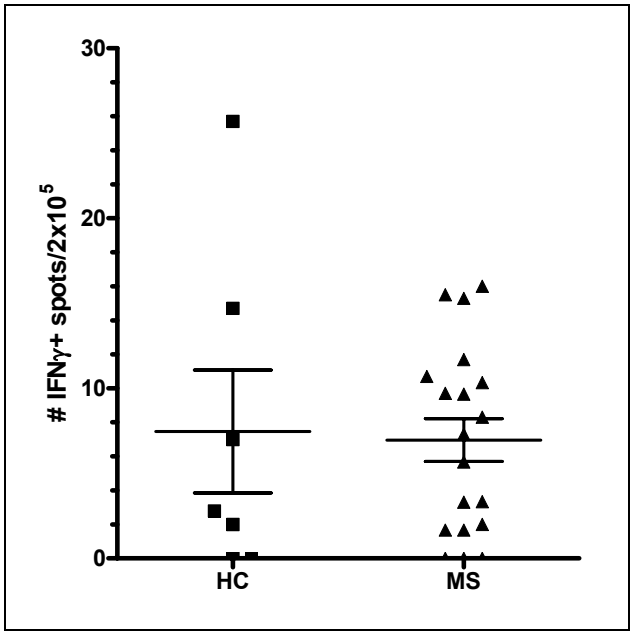
	aantal getelde spots*			P-waarde
KM	0	0	0	
HSP60 1	1	4	2	0,06
HSP60 2	4	2	0	0,16
HSP60 3	6	2	3	0,04
HSP60 4	0	2	0	0,37
HSP60 6	0	1	1	0,12
HSP60 8	0	5	2	0,18

Tabel 6b: stimulatie van T-cellen in AM

	aantal getelde spots*			P-waarde
AM	2	3	3	
HSP60 1	4	1	2	0,74
HSP60 2	6	2	2	0,65
HSP60 3	3	5	1	0,80
HSP60 4	2	0	1	0,07
HSP60 6	2	1	2	0,10
HSP60 8	1	2	2	0,10

* het aantal spots/well werd in drie verschillende spots geteld

Verder werd de reactiviteit van T-cellen ten opzichte van IL2R-α peptide getest in gezonde controles (n=7) en MS-patiënten (n=19). Hiervoor werden $2x10^5$ cellen per well gestimuleerd met IL2R-α peptide (10 µg/ml). Significante T-cel reactiviteit ten opzichte van IL2R-α (140-161) werd gedetecteerd in 5/7 gezonde controles en in 16/19 MS-patiënten (figuur 8). De gemiddelde reactiviteitswaarden verschillen niet significant tussen beide groepen (HC: 7,45 $\pm$ 3,61 MS; 6,95 $\pm$ 1,26).



Figuur 8: IL2R-α T-cel reactiviteit bij gezonde controles en MS-patiënten.

Om verschillen in reactiviteit te meten met IFN-γ Elispot ten opzichte van IL2R-α peptide bij gezonde controles (HC) en MS-patiënten, werden $2x10^5$ PBMC/well van beide groepen gestimuleerd met dit peptide (10 µg/ml). In beide populaties is de reactiviteit laag en deze varieert sterk bij de gezonde controles.

2. Meting van T-cel reactiviteit op basis van proliferatie door gebruik van CFSE assay.

Wanneer cellen gelabeld worden met CFSE, zullen de acetaat groepen van deze stof gesplitst worden door endogene esterases waardoor de stof een sterke fluorescentie vertoont. Als de gelabelde cellen vervolgens delen, zal de fluorescentie in de dochtercellen halveren. Op die manier kan antigen specifieke proliferatie van cellen eenvoudig bepaald worden met behulp van flow cytometrie. Bovendien kan men tegelijkertijd de prolifererende cellen fenotyperen met behulp van een FACS kleuring.

Het is de bedoeling deze assay te gebruiken om de proliferatieve T-cel respons tegen kandidaat ergotopen te meten. Enerzijds zal de proliferatie van T-cellen van MS-patiënten na stimulatie met de kandidaat ergotopen vergeleken worden met die van gezonde controles. Anderzijds kan de respons van MS-patiënten op de kandidaat ergotopen voor en na T-celvaccinatie (TCV) vergeleken worden.

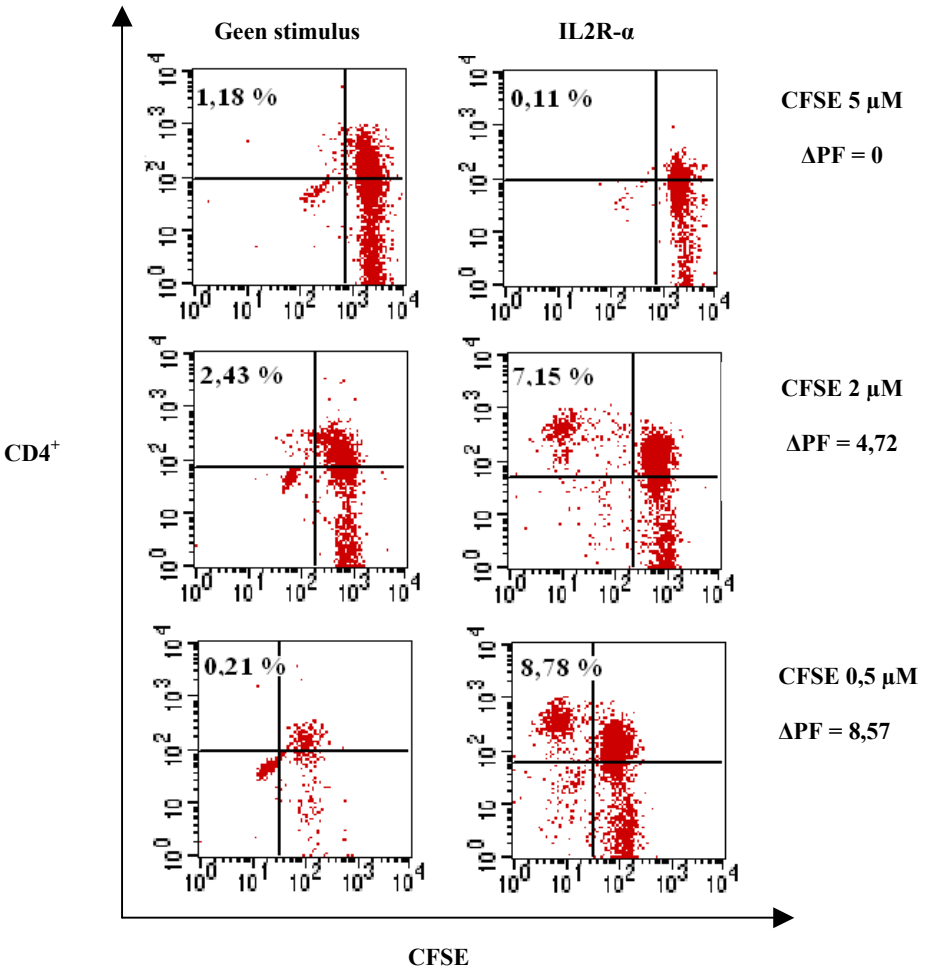
Om deze assay reproduceerbaar toe te passen diende deze eerst geoptimaliseerd te worden. Tijdens deze optimalisatie werden volgende aandachtspunten bestudeerd: de optimale labeling concentratie, de stimulatie/incubatieduur van de culturen, het type kweekplaat en medium, het celaantal en tot slot de concentratie van de kandidaat ergotopen. Verder werd MHC restrictie onderzocht met specifieke antilichamen tegen de verschillende MHC-moleculen en werd de proliferatieve respons van PBMC ten opzichte van PHA blasten (bron van geactiveerde cellen) bekeken.

2.1 Optimalisatie van de CFSE assay

CFSE labeling concentratie

In een eerste stap werd de optimale CFSE labeling concentratie bepaald. PBMC, afkomstig van een gezonde donor werden gelabeld met 5 µM, 2 µM of 0,5 µM CFSE en gestimuleerd met IL2R-α peptide (140-161) gedurende 7 dagen aan een densiteit van 2 miljoen cellen per well in een 24 well plaat. Figuur 9 illustreert dat bij een hoge CFSE concentratie het fluorescent signaal ook hoger wordt: bij 5 µM CFSE ligt dit signaal tussen 10^3 en 10^4, bij 2 µM rond 10^3 en bij 0,5 µM rond 10^2. In deze figuur kan men bovendien een omgekeerd evenredig verband zien tussen de CFSE concentratie en de waargenomen T-cel reactiviteit (uitgedrukt in ΔPF). Wanneer de cellen met de hoogste CFSE concentratie gelabeld worden (5 µM) was de ΔPF laag (0). Wanneer de cellen echter met een lagere concentratie gelabeld worden (0,5 µM) werd duidelijk reactiviteit waargenomen (ΔPF = 8,52 %). Bovendien is de achtergrondproliferatie (CFSE gelabelde cellen in KM zonder stimulus) het laagst bij een lage CFSE concentratie (0,21 %) en neemt die toe bij hogere CFSE labeling concentraties.

Uit het voorgaande kan besloten worden dat de laagste achtergrondproliferatie en de hoogste specifieke reactiviteit werd waargenomen wanneer een labeling concentratie van 0,5 µM werd gebruikt.



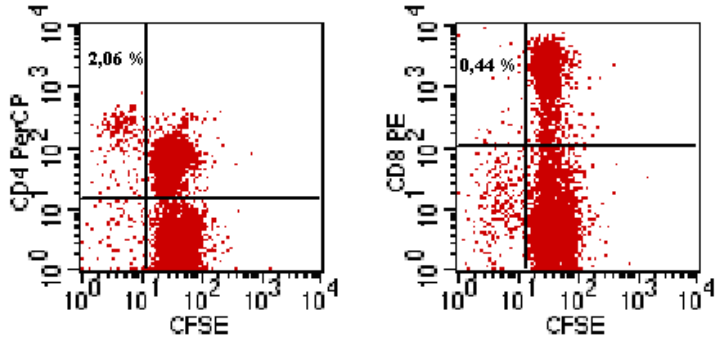
Figuur 9: Een optimale CFSE labeling concentratie van 0,5 µM.

Bij de bepaling van de geschikte CFSE labeling concentratie werden PBMC van een gezonde donor gelabeld met 5 µM (boven), 2 µM (midden) of 0,5 µM (onder) CFSE en gedurende 7 dagen gestimuleerd met IL2R-α peptide (140-161).

Fenotype

Om het fenotype van prolifererende T-cellen te bepalen na stimulatie met de kandidaat ergotoop IL2R-α peptide werden PBMC van gezonde donoren gelabeld met CFSE (0,5 µM) en gestimuleerd met IL2R-α peptide (140-161). Na deze stimulatie werd de proliferatie gemeten en het fenotype bepaald van de prolifererende cellen via een FACS kleuring waarbij men gebruik maakte van de antilichamen CD4-PerCP en CD8-PE. Bij alle uitgevoerde experimenten bleek dat voornamelijk de $CD4^+$ T-cellen reactief zijn ten opzichte van het IL2R-α peptide in tegenstelling tot de $CD8^+$ T-cellen.

Figuur 10 is een type voorbeeld van deze specifieke proliferatie (2,06 % $CD4^+$; 0,44 % $CD8^+$) weergegeven voor één donor.

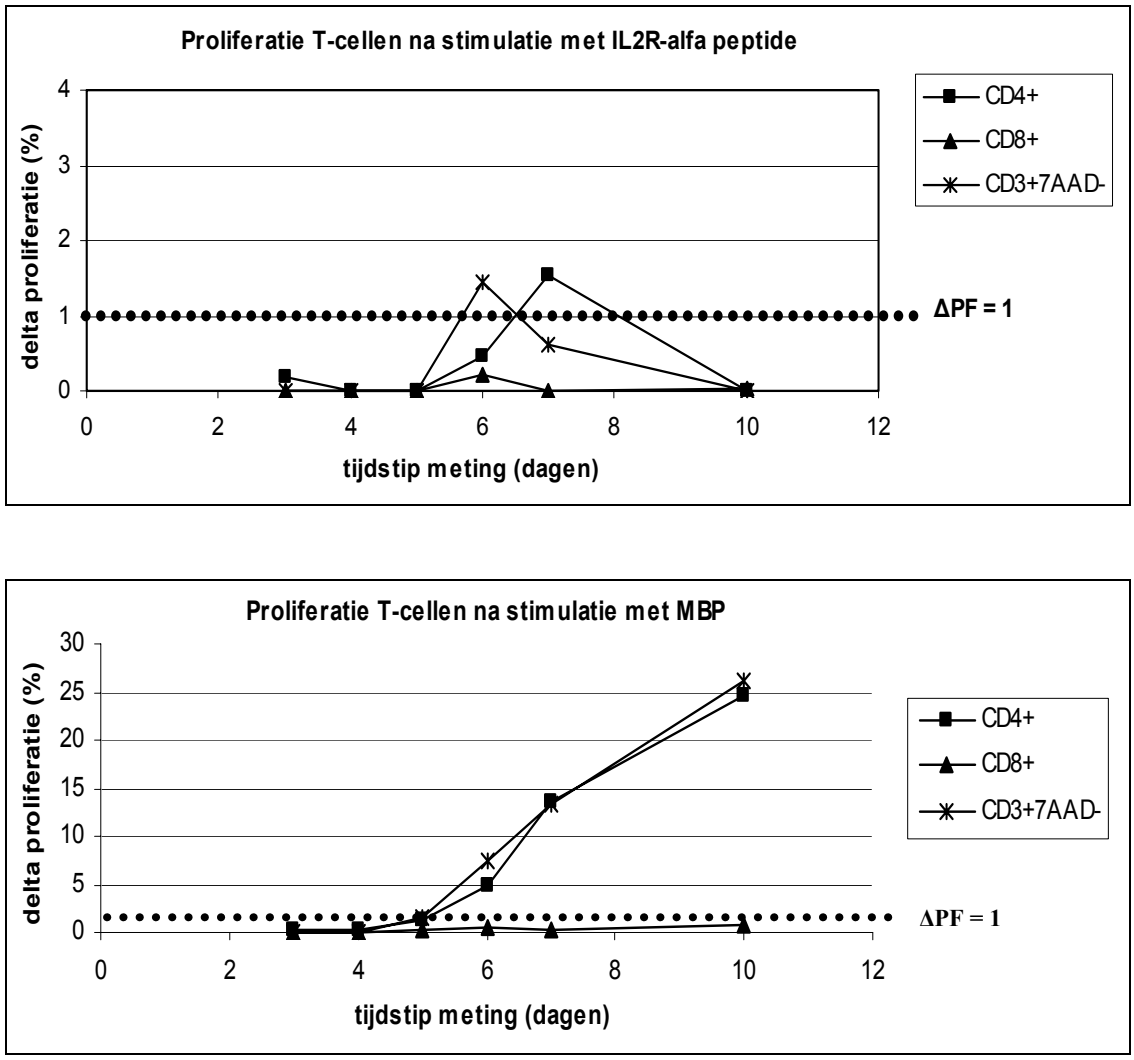


Figuur 10: Reactiviteit van T-cellen ten opzichte van de alfa keten van IL2R.

PBMC werden gelabeld met CFSE en gestimuleerd met IL2R-α peptide (140-161). Bepaling van het fenotype via een FACS kleuring laat zien dat vooral $CD4^+$ T-cellen (links) reactiviteit vertonen (2,06 %) in tegenstelling tot de $CD8^+$ T-cellen (rechts, 0,44 %).

Incubatieduur van de culturen

Een volgende stap in de optimalisatie van de CFSE assay, was de bepaling van de incubatieduur. Hiervoor werden PBMC van een gezonde donor gelabeld met 0,5 µM CFSE en gestimuleerd met IL2R-α peptide (5 µg/ml) of met MBP (40 µg/ml) gedurende 3, 4, 5, 6, 7 en 10 dagen. Op deze dagen werd telkens de proliferatie gemeten en werd de delta proliferatie (Δ PF = proliferatie in respons op antigen – achtergrondproliferatie (proliferatie in KM)) berekend. Figuur 11 toont de Δ PF (Y-as), gemeten op de verschillende dagen (X-as), van zowel $CD4^+$ T-cellen, $CD8^+$ T-cellen als van $CD3^+7AAD^-$ T-cellen. Net zoals in figuur 10 zijn de $CD8^+$ T-cellen weinig of niet reactief tegen zowel IL2R-α peptide (bovenste grafiek) als tegen MBP (onderste grafiek) aangezien er geen merkbare stijging van de proliferatie plaats vindt naarmate het aantal dagen toeneemt. De ΔPF van IL2R-α peptide gestimuleerde $CD4^+$ T-cellen stijgt daarentegen wel vanaf dag 5 en bereikt een maximum op dag 7 en daalt vervolgens weer op dag 10. MBP gestimuleerde $CD4^+$ T-cellen vertonen dezelfde trend maar de ΔPF stijgt verder tot en met dag 10. Bij de ΔPF van $CD3^+7AAD^-$ T-cellen is een gelijkaardig patroon waarneembaar: de ΔPF van IL2R-α peptide gestimuleerde $CD3^+7AAD^-$ T-cellen stijgt vanaf dag 5 en bereikt een maximum op dag 7 en valt terug naar een lagere proliferatie op dag 10. De ΔPF van MBP gestimuleerde $CD3^+7AAD^-$ T-cellen kent eveneens een stijging vanaf dag 5. Ook hier zet deze stijgende trend zich voort tot en met dag 10. Verdere metingen van de proliferatieve respons van T-cellen zullen uitgevoerd worden op dag 7. De hierna volgende besprekingen hebben steeds betrekking op de proliferatie gemeten op dag 7.



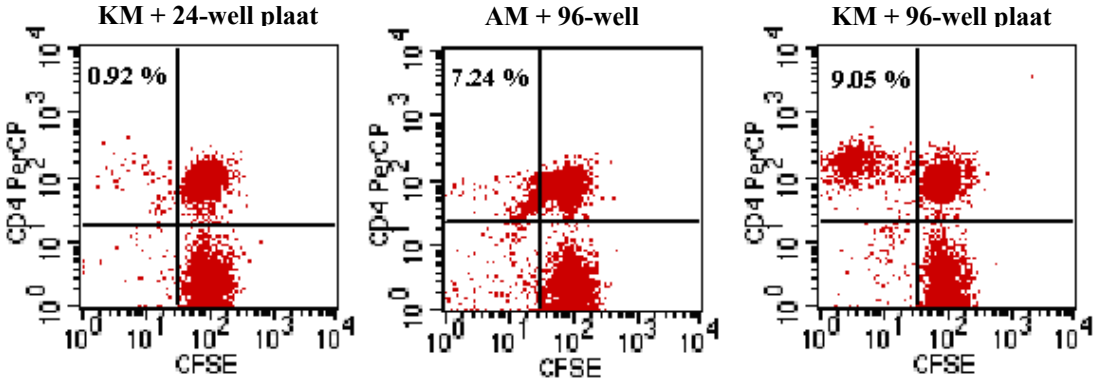
Figuur 11: Stimulatie van PBMC met IL2R-α peptide of MBP gedurende verschillende dagen.

CFSE gelabelde PBMC van een gezonde donor werden gestimuleerd met IL2R-α peptide (boven) of MBP (onder) gedurende 3, 4, 5, 6, 7 of 10 dagen (X-as). De delta proliferatie (ΔPF) werd berekend voor $CD4^+$ T-cellen, $CD8^+$ T-cellen en CD3+7AAD- T-cellen en wordt weergegeven op de Y-as. ΔPF > 1 geeft een significante proliferatieve respons aan ten opzichte van het betreffende antigen (hier aangegeven met een stippellijn).

Medium en type kweekplaat

Om te testen in welk medium (KM of AM) en in welk type plaat (96-well of 24-well) de achtergrondproliferatie het laagst is, werden CFSE (0,5 μM) gelabelde PBMC aangebracht in een 96-well plaat ($2x10^5$ cellen per well) of in een 24-well plaat ($2x10^6$ cellen per well) en gestimuleerd met de verschillende antigenen. Als medium werd enerzijds KM en anderzijds AM gebruikt. Verder werd voor iedere conditie een controle well met niet gestimuleerde PBMC opgezet zodat de achtergrondproliferatie bepaald kon worden. Voor deze donor (figuur 12) is de achtergrondproliferatie het laagst in KM in een 24-well plaat (0.92 %) maar

is hoger in AM (7.24 %) en bereikt zelfs een waarde van 9.05% wanneer de cellen gekweekt worden in een 96-well plaat in KM. De achtergrondproliferatie wordt dus het laagst gehouden in een 24-well plaat en bij gebruik van kweekmedium.

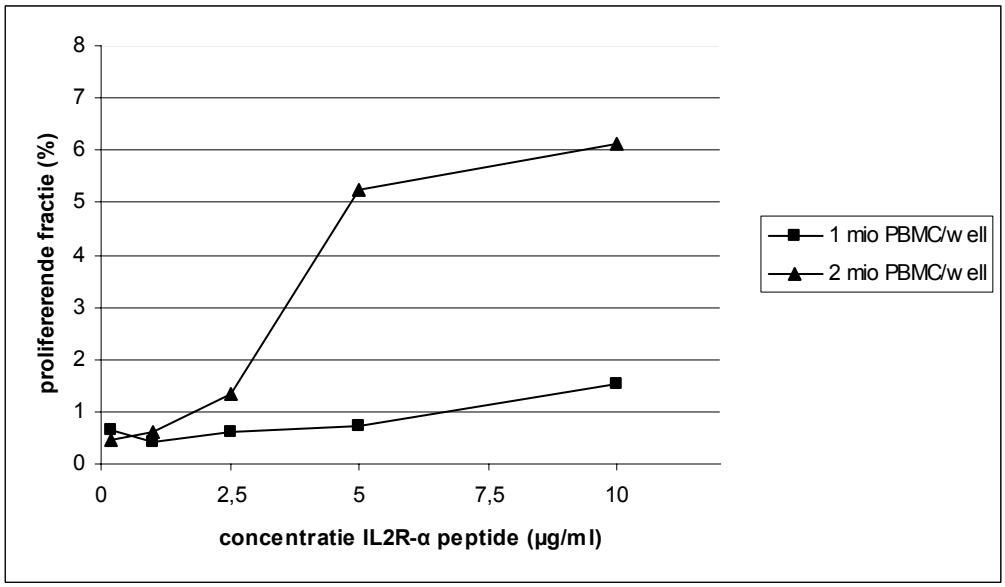


Figuur 12: KM en 24-well plaat als ideale condities bij de proliferatie van T-cellen.

Om na te gaan welk type medium en plaat geschikt zijn bij toepassing van de CFSE assay, werden PBMC van een gezonde donor gelabeld met 0,5 µM CFSE. Voor iedere conditie (KM, AM, 24- of 96-well plaat) werd een controle well (niet gestimuleerde PBMC) opgezet zodat de achtergrondproliferatie van deze PBMC bepaald kon worden.

Peptide concentratie en geschikt celaantal

Een vijfde en laatste stap in het optimalisatieproces omvatte de bepaling van de geschikte IL2R-α peptide concentratie en het aantal cellen per well. PBMC van één gezonde donor werden gelabeld met 0,5 µM CFSE en enerzijds uitgeplaat aan een densiteit van één miljoen cellen per well en anderzijds aan twee miljoen cellen per well. Voor beide condities werden de PBMC gedurende 7 dagen gestimuleerd met 0.2, 1, 2.5, 5 of 10 µg/ml IL2R-α peptide (140-161). In figuur 13 wordt de concentratie van IL2R-α peptide uitgezet in functie van de prolifererende fractie $CD4^+$ T-cellen. Bij een celdensiteit van één miljoen cellen per well is de prolifererende fractie bij geen enkele toegepaste IL2R-α peptide concentratie hoger dan twee procent; tot en met 5 µg/ml IL2R-α peptide komt dit percentage niet boven één procent. Bij een densiteit van twee miljoen cellen per well vertoont de proliferatie daarentegen een stijging naarmate de IL2R-α peptide concentratie toeneemt. Net zoals bij de conditie van één miljoen cellen per well wordt het percentage van twee procent niet overschreden wanneer een IL2R-α peptide concentratie gebruikt wordt van 0.2 tot en met 2.5 µg/ml. Vanaf 5 µg/ml kent de proliferatie een opvallende stijging en de reactiviteit is nog hoger bij 10 µg/ml waar een waarde van 6,11 procent bereikt wordt. Uit figuur 13 kan besloten worden dat een celdensiteit van twee miljoen cellen per well en een IL2R-α peptide concentratie van 10 µg/ml leiden tot het hoogste percentage prolifererende $CD4^+$ T-cellen.



Figuur 13: Bepaling van de optimale IL2R-α peptide concentratie en het geschikte celaantal per well.
CFSE gelabelde (0,5 µM) PBMC geïsoleerd uit één donor werden uitgeplaat aan een celdensiteit van enerzijds 1 miljoen cellen per well en anderzijds 2 miljoen cellen per well en vervolgens gestimuleerd met verschillende IL2R-α peptide concentraties (0.2, 1, 2.5, 5 of 10 µg/ml). De IL2R-α peptide concentratie werd uitgezet in functie van de prolifererende fractie $CD4^+$ T-cellen.

Cytokine patroon van IL2R-α reactieve T-cellen

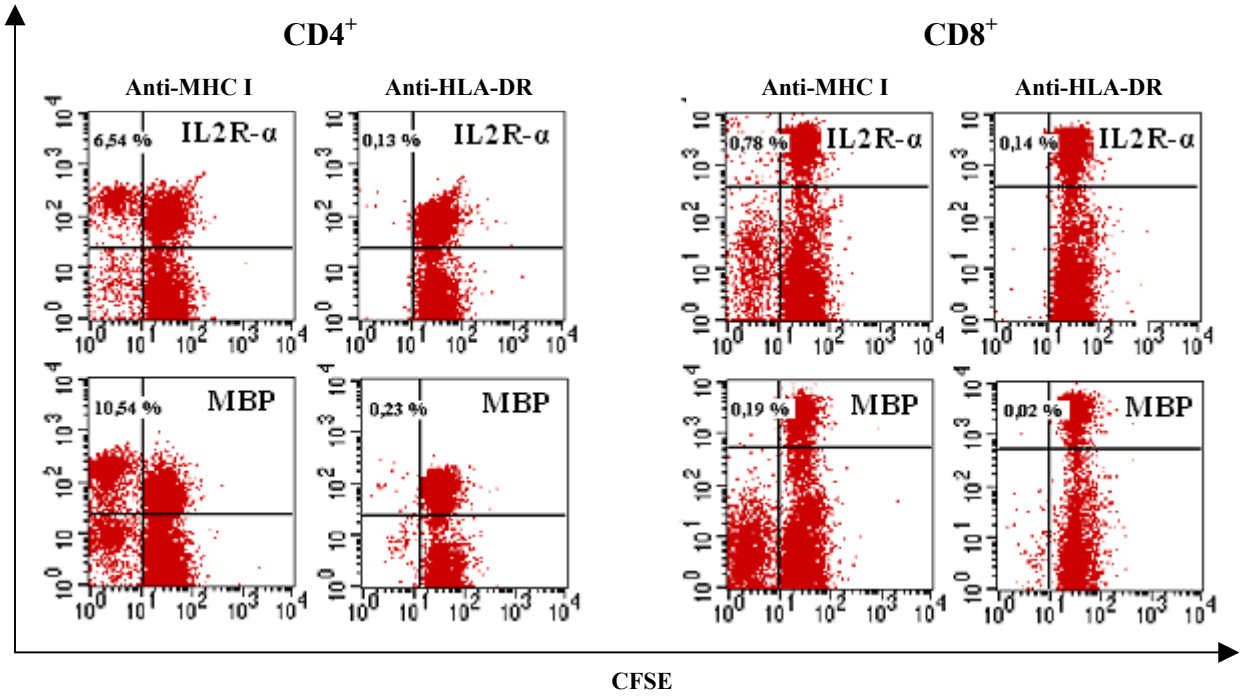
Om het cytokine patroon te bepalen van T-cellen reactief ten opzichte van IL2R-α werd er gebruik gemaakt van een intracellulaire FACS kleuring. Aangezien verwacht wordt dat de reactieve T-cellen op een vroeger tijdstip na stimulatie reeds cytokines produceren, werd in eerste instantie de kinetiek bepaald. Hiervoor werden CFSE gelabelde PBMC gestimuleerd met IL2R-α peptide en werd de intracellulaire cytokineproductie (IFN-γ, IL-4 en IL-10) bepaald op dag 1, op dag 2, …. op dag 7. De bekomen resultaten (data niet getoond) lieten zien dat er weinig of geen cytokines geproduceerd werden de eerste vier dagen. Vanaf dag 5 was wel cytokineproductie detecteerbaar. Dit werd echter uitgetest op een ontdooid staal waarbij een verhoogde achtergrondproliferatie en ook cytokineproductie werd gevonden in de niet-gestimuleerde conditie. Omdat uit deze experimenten niets besloten kon worden, werd deze techniek niet verder toegepast tijdens de stageperiode.

2.2 MHC-restrictie ten opzichte van IL2R-α peptide

Om van de gemeten proliferatieve reactiviteit de MHC-restrictie te testen werden CFSE gelabelde PBMC 30 minuten tot 1 uur geïncubeerd met een antilichaam tegen MHC I (HB95, 10 µg/ml) of HLA-DR (HB55, 10 µg/ml) of met een controleantilichaam (muis monoclonaal anti-toxoplasma, 10 µg/ml) alvorens IL2R-α peptide of MBP toegevoegd werden. Figuur 14

laat duidelijk zien dat wanneer PBMC van een gezonde donor geïncubeerd worden met een antilichaam tegen HLA-DR, er geen proliferatie van de $CD4^+$ T-cellen optreedt na toevoeging van zowel IL2R-α peptide (ΔPF = 0,13 %) als van MBP (ΔPF = 0,23 %). Incubatie van de PBMC met een antilichaam tegen MHC I moleculen inhibeert de proliferatie van $CD4^+$ T-cellen niet na toevoeging van IL2R-α peptide of MBP. Deze condities leiden namelijk tot een prolifererende fractie van respectievelijk 6,54% en 10,54%. De proliferatie van $CD4^+$ T-cellen in respons op zowel IL2R-α peptide als op MBP kent dus een MHC II restrictie.

Incubatie van de PBMC met zowel HB95 als HB55 heeft geen effect op de proliferatie van $CD8^+$ T-cellen na antigenstimulatie. Dit bewijst nogmaals dat $CD8^+$ T-cellen weinig reactiviteit vertonen ten opzichte van IL2R-α peptide en MBP.



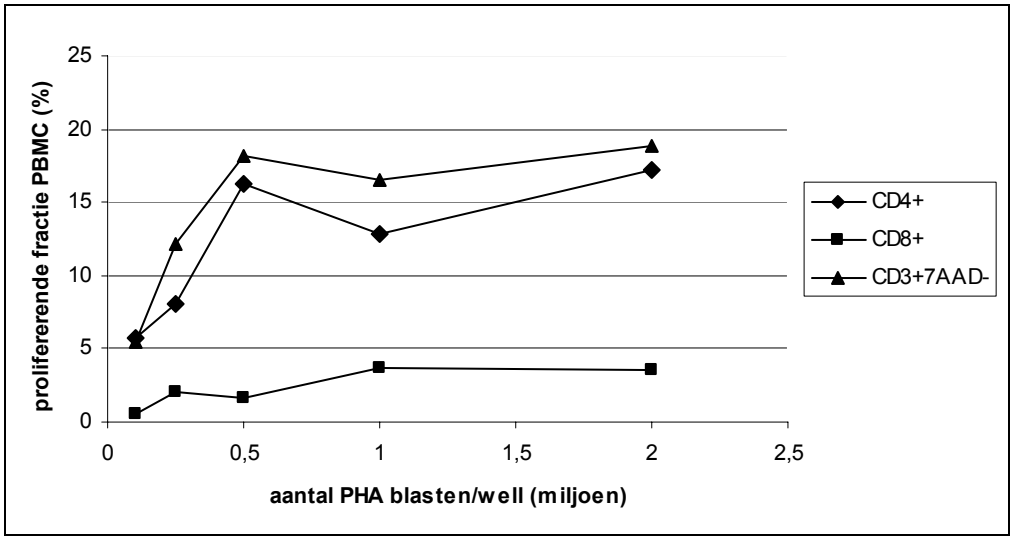
Figuur 14: MHC-restrictie ten opzichte van het IL2R-α peptide en MBP.

Wanneer uit een gezonde donor geïsoleerde PBMC geïncubeerd worden met een antilichaam tegen MHC I moleculen alvorens de stimuli toe te voegen, vertonen $CD4^+$ T-cellen reactiviteit tegen zowel IL2R-α peptide (links boven) als tegen MBP (links onder). Incubatie van PBMC met een antilichaam tegen HLA-DR inhibeert daarentegen de proliferatie (rechter verticaal gedeelte) van $CD4^+$ T-cellen. Er is geen effect op de $CD8^+$ T-cellen waarneembaar.

2.3 Reactiviteit van T-cellen tegen PHA blasten

De reactiviteit van T-cellen tegen (kandidaat) ergotopen is tot nu toe bestudeerd door CFSE gelabelde PBMC rechtstreeks te stimuleren met het ergotoop. Een andere manier om dit te onderzoeken is de additie van bestraalde geactiveerde T-cellen als stimulus aan PBMC. De

geactiveerde T-cellen presenteren mogelijk zelf ergotoop moleculen. Hiervoor werden CFSE gelabelde (0,5 µM) PBMC van één gezonde donor geïncubeerd met bestraalde PHA T-cel blasten (geactiveerde T-cellen) onder verschillende condities: twee miljoen PBMC per well werden gestimuleerd met respectievelijk $1x10^5$, $2.5x10^5$, $5x10^5$, $1x10^6$, $1.5x10^6$ of $2x10^6$ PHA blasten. De proliferatieve respons van de gelabelde PBMC ten opzichte van de PHA blasten wordt weergegeven in figuur 15. Deze grafiek toont dat de reactiviteit van $CD3^+7AAD^-$ T-cellen in het begin (van $1x10^4$ tot en met $5x10^5$ PHA blasten) in stijgende lijn toeneemt. Wanneer het aantal PHA blasten echter hoger wordt, kent de proliferatie geen sterke stijgingen meer maar fluctueert deze ongeveer rond eenzelfde waarde. Aangezien de reactiviteit van de $CD8^+$ T-cellen ten opzichte van de PHA blasten ook hier laag is, kan er besloten worden de vooral de $CD4^+$ T-cellen bijdragen aan de verhoogde reactiviteit van de $CD3^+7AAD^-$ T-cellen ten opzichte van de PHA blasten.



Figuur 15: Anti-ergotype reactiviteit van PBMC tegen geactiveerde T-cellen (PHA blasten).
De bepaling van de reactiviteit van T-cellen ten opzichte van kandidaat ergotopen kan bestudeerd worden door incubatie van PBMC met een bron van geactiveerde T-cellen. Daarom werden CFSE gelabelde PBMC, afkomstig van een gezonde donor gedurende 7 dagen gestimuleerd met toenemende celaantallen van PHA T-cel blasten (X-as). De proliferatieve respons wordt in bovenstaande grafiek uitgezet op de Y-as.

2.4 Reactiviteit van PBMC tegen de HSP60 afgeleide peptiden

Naast de alfa keten van de IL2R werden een aantal HSP60 afgeleide peptiden onderzocht op hun eigenschap als kandidaat ergotoop. Daarom werden PBMC, geïsoleerd uit een gezonde donor, gelabeld met CFSE (0,5 µM) en gestimuleerd met deze peptiden (HSP60 peptide 1, 2, 3, 4, 8 en een mix van peptiden 1 tot en met 8) aan een densiteit van 2 miljoen cellen per well.

De proliferatieve respons werd na 7 dagen bepaald met behulp van een FACS kleuring. Met de FACS statistieken werden de ΔPF en de SI berekend, die terug te vinden zijn in tabel 7.

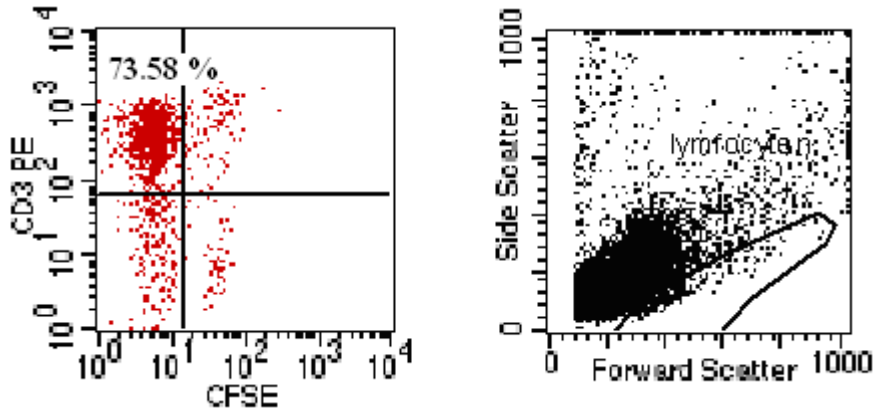
Tabel 7: Proliferatieve respons tegen verschillende HSP60 peptide sequenties.

	CD4		CD8	
	ΔPF	**SI**	**ΔPF**	**SI**
MIX HSP60	0,48	1,73	0,01	1,07
HSP60 1	0	0,35	0,17	2,13
HSP60 2	0	0,89	0,2	2,33
HSP60 3	0	0,21	0,07	1,47
HSP60 4	**1,98**	**4,00**	0,3	3,00
HSP60 8	0	0,53	0,04	1,27

Wanneer de criteria ΔPF groter dan 1% én een SI van meer dan 2 aangehouden worden, blijkt uit tabel 7 dat voor deze gezonde donor enkel een significante reactiviteit is terug te vinden tegen HSP60 peptide 4 (vet gedrukte waardes). In tegenstelling tot de resultaten met betrekking tot Elispot (eerder beschreven in tabel 6) vertonen de T-cellen hier geen proliferatieve respons na stimulatie met HSP60 peptide 3. Er dient echter opgemerkt te worden dat de resultaten in tabel 6 betrekking hebben op een andere gezonde donor.

2.5 Screening van de reactiviteit ten opzichte van de kandidaat ergotopen in gezonde controles en MS-patiënten

Na het optimaliseren van de CFSE assay, werd vervolgens de reactiviteit ten opzichte van de kandidaat ergotopen vergeleken in gezonde controles en MS-patiënten. Tijdens het optimalisatieproces werd telkens gebruik gemaakt van vers geïsoleerde PBMC. Bij de uitvoering van de screening werd in eerste instantie echter gebruik gemaakt van ontdooide PBMC van 10 gezonde controles en 10 onbehandelde MS-patiënten. De ontdooide PBMC werden vervolgens gelabeld met 0,5 µM CFSE en gedurende zeven dagen gestimuleerd met IL2R-α (10 µg/ml), HSP60 (5 µg/ml) of MBP (40 µg/ml) in een 24 well plaat. Na zeven dagen werd de antigen-reactieve proliferatie bepaald. De prolifererende fractie van de verschillende celtypes kon echter niet gemeten worden. Dit was te wijten aan enerzijds een te hoge achtergrondproliferatie of anderzijds aan een te laag aantal levende lymfocyten in de lymfocyt gate (zie figuur 16). De culturen waren er over het algemeen slecht aan toe.



Figuur 16: Mogelijke problemen bij de analyse van ontdooide CFSE gelabelde PBMC.

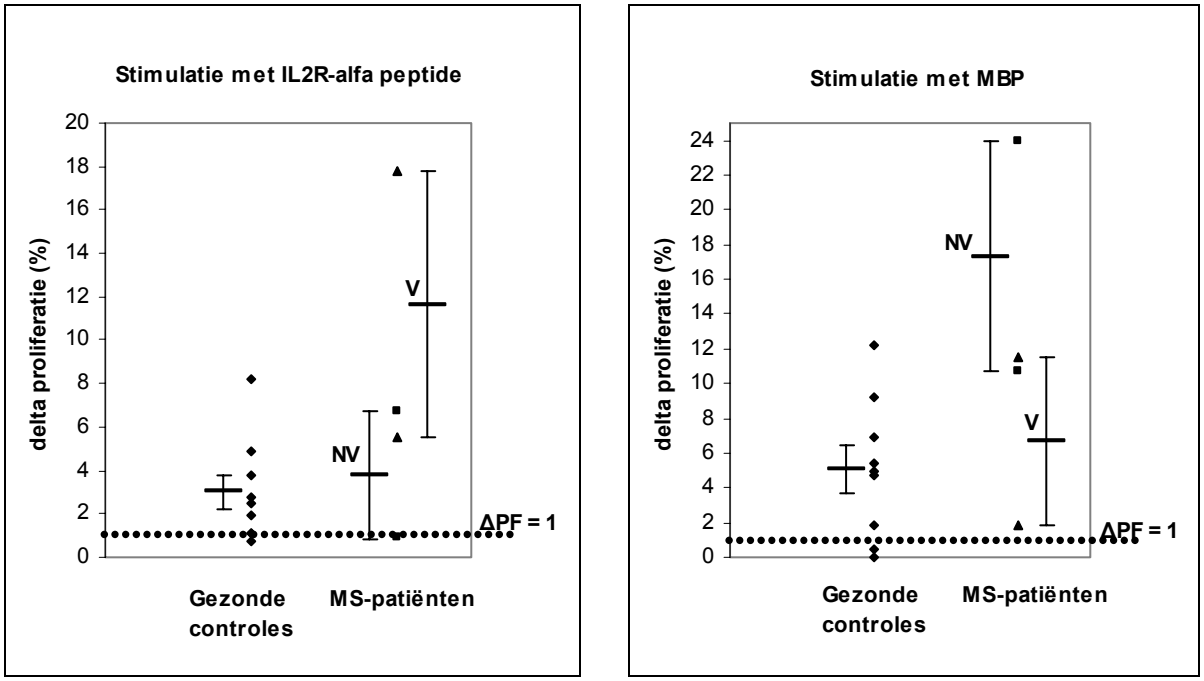
Wanneer ontdooide PBMC gelabeld worden met CFSE en vervolgens gedurende 7 dagen gestimuleerd worden met de verschillende antigenen, kan de prolifererende fractie niet bepaald worden. De achtergrondproliferatie neemt namelijk extreem hoge waardes aan (linker panel 73,58 %). Bovendien was in enkele gevallen het aantal levende lymfocyten in de lymfocyt gate te laag om verder te analyseren.

Aangezien de CFSE assay niet bleek te werken voor ontdooide stalen werd er geopteerd om de verdere analyse uit te voeren met vers geïsoleerde PBMC van zowel gezonde controles (n=9) als van MS-patiënten (n=4, waarvan 2 gevaccineerd met TCV).

De PBMC van de gezonde controles en van de MS-patiënten werden gelabeld met 0,5 µM CFSE en gedurende 7 dagen gestimuleerd met IL2R-α peptide (10 µg/ml), MBP (40 µg/ml) of HSP60 (5 µg/ml). Na 7 dagen werd de proliferatie gemeten met behulp van een FACS kleuring. Deze toonde, net zoals de eerder uitgevoerde experimenten, dat het grootste deel van de prolifererende T-celpopulatie vooral uit $CD4^+$ T-cellen bestond (data niet getoond). Vervolgens werd de ΔPF van de $CD4^+7AAD^-$ T-cellen van zowel de gezonde controles als van de MS-patiënten bepaald. De ΔPF na stimulatie met IL2R-α of MBP wordt weergegeven in figuur 17. Na stimulatie van de PBMC van gezonde controles met IL2R-α vertonen 8/9 controles een ΔPF > 1% en 6/8 een SI > 2 (niet weergegeven). Na stimulatie met MBP vertonen de PBMC van 7/9 gezonde controles een positieve proliferatieve respons (ΔPF > 1% én SI > 2). Drie (twee behandeld met TCV) van de vier MS-patiënten vertonen eveneens een positieve proliferatieve respons na stimulatie met IL2R-α. Als men naar de ΔPF van de $CD4^+7AAD^-$ T-cellen van de twee gevaccineerde MS-patiënten kijkt, blijkt dat de ΔPF van de patiënt die drie vaccins ontvangen (17,76 %) heeft hoger ligt in vergelijking met de ΔPF van de patiënt die slechts twee vaccins kreeg (5,53 %).

Verder illustreert deze figuur dat de gemiddelde T-cel reactiviteit tegen IL2R-α peptide van gevaccineerde MS-patiënten hoger ligt dan die van de niet-gevaccineerde MS-patiënten. Dit verschil bereikte geen significantie wat mogelijk te wijten is aan het beperkt aantal stalen.

Omgekeerd ziet men dat de gemiddelde T-cel reactiviteit tegen MBP van gevaccineerde MS-patiënten lager ligt dan die van niet-gevaccineerde MS-patiënten en vergelijkbaar is met de anti-MBP T-cel reactiviteit in de gezonde controles.

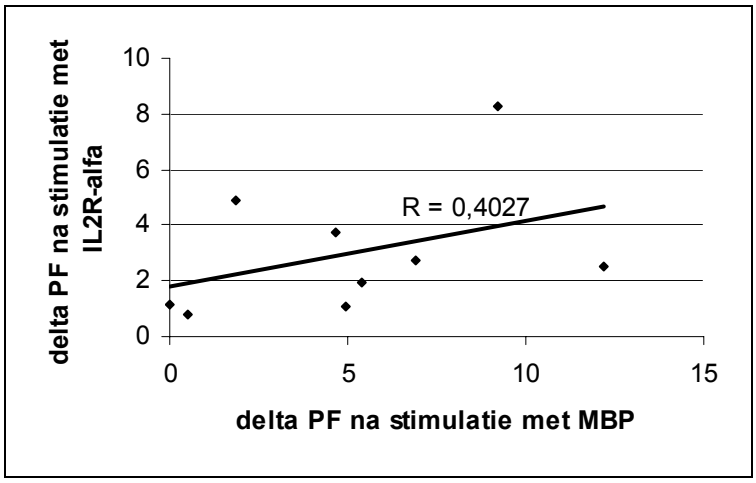


Figuur 17: **ΔPF van de $CD4^+7AAD^-$ T-cellen van gezonde controles en MS-patiënten na stimulatie met IL2R-α en MBP.**

CFSE gelabelde PBMC van gezonde controles en MS-patiënten werden gedurende 7 dagen gestimuleerd met IL2R-α peptide of MBP. De berekende ΔPF is uitgezet op de Y-as. NV= niet gevaccineerd ■, V= gevaccineerd, ▲

Wanneer de ΔPF van de $CD4^+7AAD^-$ T-cellen van gezonde controles na stimulatie met MBP uitgezet wordt in functie van de ΔPF van de $CD4^+7AAD^-$ T-cellen van gezonde controles na stimulatie met IL2R-α peptide, kan men een lichte positieve correlatie vaststellen, aangezien de R-waarde van de trendlijn 0,40 bedraagt (figuur 18).

Bovendien werd reactiviteit van $CD4^+7AAD^-$ T-cellen tegen HSP60 peptide 4 nagegaan in de groep van de gezonde controles en MS-patiënten (tabel 8). Hieruit blijkt dat geen enkele gezonde controle reactiviteit vertoont ten opzichte van het HSP60 peptide 4. Er is sprake van een positieve proliferatieve respons (vet gedrukte waardes) bij slechts één MS-patiënt. Er dient opgemerkt te worden dat juist deze gevaccineerde (3x) patiënt ook een sterke proliferatieve respons vertoont tegen IL2R-α peptide (17,76 % figuur 17).



Figuur 18: Correlatie tussen anti-MBP en anti-IL2R-α reactiviteit in gezonde controles.

Wanneer de ΔPF van $CD4^{+}7AAD^{-}$ T-cellen gestimuleerd met MBP uitgezet wordt in functie van de ΔPF van $CD4^{+}7AAD^{-}$ T-cellen gestimuleerd met IL2R-α is een zekere positieve correlatie waarneembaar.

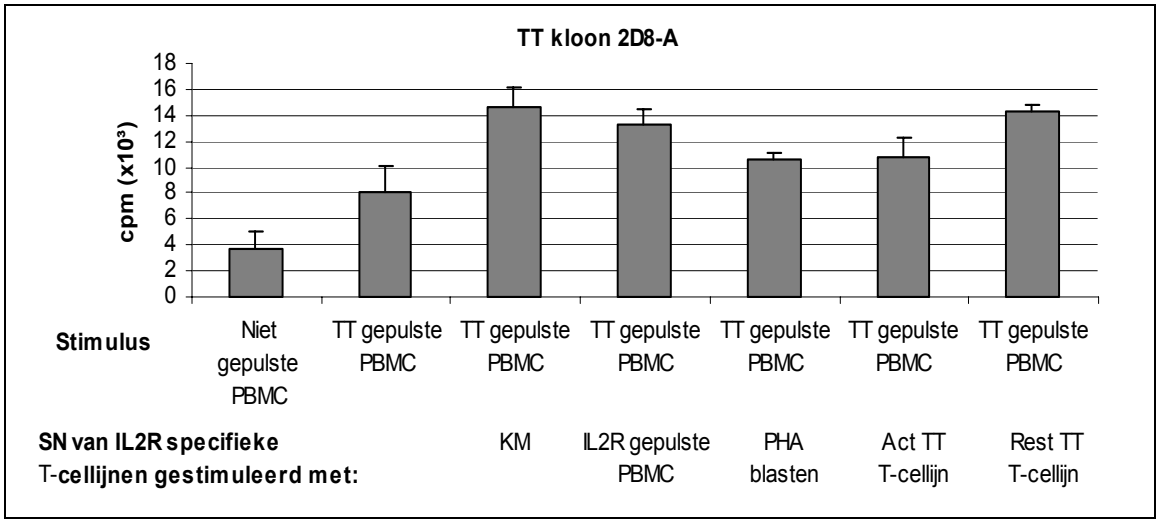
Tabel 8: T-cel reactiviteit ten opzichte van HSP60 peptide 4 in gezonde controles en MS-patiënten.

Gezonde controle		MS-patiënt	
Δ PF	**SI**	**Δ PF**	**SI**
0	0	0	0,97
0	0,46	**12,05**	**2,66**
0,11	1,09	0,89	1,24
0,77	1,41	0	0,45
0,76	1,42		
0,11	1,07		
0,6	0		
0	0,66		
0,05	1,01		

3. Supernatans inhibitietest

Terg herkennen volgens de huidige hypothese een ergotoop molecule op geactiveerde effector T-cellen waardoor de Terg geactiveerd worden en zo de effector T-cellen inactiveren. Het achterliggende mechanisme moet echter nog verder bestudeerd worden. Dit kan ondermeer nagegaan worden door het effect van de cytokines, geproduceerd door Terg, op de proliferatie van effector T-cellen te meten. Dit werd gedaan via een supernatans (SN) inhibitietest. Hierbij werd het SN van geactiveerde IL2R-α specifieke T-cellijnen in toenemende hoeveelheden toegevoegd aan een TT reactieve T-cellijn (indicator cellijn), die geheractiveerd wordt met TT gepulste bestraalde PBMC. De geteste SN waren afkomstig van een IL2R-α T-cellijn, die recent gestimuleerd was met IL2R-α gepulste bestraalde PBMC, bestraalde PHA blasten, een

geactiveerde of een rustende TT reactieve T-cellijn. Het effect op de proliferatie van de TT reactieve T-cellijn werd bepaald via een ^{3}H-Thymidine incorporatie assay. Figuur 19 toont de proliferatieve respons (cpm Y-as) na toevoeging van de verschillende supernatantia. Enerzijds is de proliferatie van de TT gepulste TT kloon hoger in vergelijking met de proliferatie van de niet gepulste TT kloon. Dit duidt erop dat het gaat om een specifieke TT kloon. Anderzijds geeft figuur 19 weer dat wanneer het SN van een gestimuleerde IL2R-α specifieke T-cellijn toegevoegd wordt aan de gerestimuleerde TT kloon de proliferatie van deze kloon licht toeneemt. Dit was waarneembaar voor elk van de SN, ongeacht het type restimulatie van de IL2R-α T-cellijn. Zelfs SN van rustende IL2R-α T-cellijnen (KM) leidde tot een stimulatie van de proliferatie.



Figuur 19: Het effect van het SN van een IL2R-α specifieke T-cellijn op de activatie van een TT kloon.
Het effect van IL2R-α specifiek T-cellijnen op de activatie van een TT kloon van een gezonde donor werd gemeten via een SN inhibitietest. Hiervoor werd aan een gerestimuleerde TT kloon het SN van IL2R-α specifieke T-cellijnen toegevoegd, die onlangs gestimuleerd werden met IL2R-α gepulste PBMC, PHA blasten, een geactiveerde (Act) TT T-cellijn of een TT T-cellijn in rust (Rest). Ook werd SN van een rustende IL2R-α T-cellijn getest (KM). De cpm, gemeten met de scintillatie teller, zijn terug te vinden op de Y-as. Ter controle van de specificiteit van de TT reactieve T-cellijn werd eveneens de proliferatie ten opzichte van niet gepulste PBMC gemeten.

Er was geen éénduidig effect zichtbaar van de verschillende hoeveelheden (25 µl en 50 µl) toegevoegde supernatantia (data niet getoond). Hieruit kan besloten worden dat de supernatantia van IL2R-α specifieke T-cellijnen een licht stimulerend effect hebben op de proliferatie van T-cellijnen

Discussie

Volgens de huidige hypothese spelen auto-immune T-cellen een belangrijke rol in de pathogenese van MS. Deze autoreactieve T-cellen komen ook bij gezonde individuen voor maar worden waarschijnlijk vernietigd of onderdrukt door regulatoire T-cellen. Tot deze regulatoire netwerken behoren onder andere anti-idiotype en anti-ergotype netwerken. T-celvaccinatie (TCV) stimuleert vermoedelijk deze netwerken zodat de pathogene T-cellen onderdrukt worden. De anti-idiotype respons is reeds goed gekarakteriseerd in tegenstelling tot de anti-ergotype respons. Waarschijnlijk herkennen anti-ergotype T-cellen (Terg) een ergotoop, dat gepresenteerd wordt door effector T-cellen (pathogene T-cellen) of macrofagen, en inactiveren zo de pathogene T-cellen. Kandidaat ergotopen zijn de alfa keten van de IL2R en HSP60. Deze stage had tot doel deze kandidaat ergotopen verder te karakteriseren.

Het effect van de kandidaat ergotopen op de proliferatie van T-cellen werd in eerste instantie bestudeerd met behulp van een cytokine gebaseerde assay, namelijk Elispot. Deze techniek werd geoptimaliseerd voor de condities celaantal per well ($2{,}5x10^5$ PBMC per well) en HSP60 concentratie (5 µg/ml). De reactiviteit ten opzichte van de verschillende HSP60 afgeleide peptiden werd vervolgens bepaald bij gezonde individuen. In dit experiment kon geen significante T-cel reactiviteit ten opzichte van HSP60 afgeleide peptiden worden waargenomen. In een tweede deel werd de reactiviteit ten opzichte van IL2R-α peptide getest in zowel gezonde controles als in MS-patiënten. Voor de meerderheid van donoren werd significante reactiviteit ten opzichte van IL2R-α peptide aangetoond. De gemiddelde T-cel reactiviteit bij MS-patiënten was echter niet significant verschillend ten opzichte van de gemiddelde T-cel reactiviteit in gezonde controles. Dit geeft aan dat MS-patiënten geen verminderde T-cel reactiviteit vertonen ten opzichte van het kandidaat ergotoop IL2R-α. Deze bevindingen zijn in lijn met eerder uitgevoerde studies, die aantonen dat er geen verschillen zijn tussen gezonde controles en MS-patiënten op het niveau van de frequentie van zelf-reactieve T-cellen. Men dient echter rekening te houden met de gebruikte techniek wanneer men de T-cel reactiviteit wil bepalen. Eerder werd aangetoond dat de geschatte frequentie van MBP reactieve T-cellen gemeten met een *limiting dilution assay* lager ligt dan wanneer er gebruik gemaakt wordt van Elispot. Bovendien moet men in rekening brengen dat de geschatte frequentie waarschijnlijk geen realistische weergave is van de *in vivo* frequentie (54). Een tweede verklaring voor de gevonden niet significante verschillen of lagere T-cel

reactiviteit kan gegeven worden door het feit dat IFN-γ mogelijk niet het optimale cytokine is dat getest moet worden. Mogelijk dient er meer aandacht besteed te worden aan regulatoire cytokines zoals IL-10, IL-4 of TGF-β. Daarnaast is het eveneens mogelijk dat er geen kwantitatieve verschillen zijn maar wel functionele verschillen zoals bijvoorbeeld cytotoxiciteit, het cytokineprofiel (Th fenotype) of de activatie status. Vermits kon afgeleid worden dat de reactiviteit van Elispot laag is tegen kandidaat ergotopen werd geopteerd om een proliferatie gebaseerde assay toe te passen, de CFSE assay. In deze assay worden cellen gelabeld met *5,6-carboxyfluoresceïn diacetate succinimidyl ester* (CFSE), een stof die na verwijdering van de acetaat groepen fluorescent wordt en waarvan de succinimidyl ester bindt met vrije aminogroepen binnen de cel. Naarmate de celdelingen vorderen zal de fluorescentie van de dochtercellen afnemen, wat een maat is voor de reactiviteit en gemeten kan worden via flow cytometrie.

Voordat de reactiviteit van PBMC ten opzichte van IL2R-α peptide en HSP60 afgeleide peptiden werd bepaald in gezonde controles en MS-patiënten (en eventuele verschillen hiertussen) werd deze proliferatie-gebaseerde assay eerst geoptimaliseerd. In dit proces werd aandacht besteed aan de CFSE labeling concentratie, de incubatieduur van de culturen, het type kweekplaat en medium, het celaantal en tot slot de concentratie van de kandidaat ergotopen. Onze resultaten toonden aan dat een labeling van de PBMC met 0,5 μM CFSE leidt tot de hoogste reactiviteit ten opzichte van het IL2R-α peptide en tot de laagste achtergrondproliferatie. Volgens Crawford et al. wordt de hoogste gevoeligheid echter bereikt bij een labeling van PBMC met 0,25 μM CFSE (52). De groep van Mannering et al. stelt dat de beste balans tussen CFSE labeling intensiteit en proliferatie verkregen wordt bij een CFSE concentratie van 0,5 μM (50), hetgeen in lijn is met de gevonden data. Uit onze experimenten blijkt dat wanneer PBMC met een hoge CFSE concentratie (5 μM) gelabeld worden er geen proliferatie meer kan waargenomen worden. De hoge CFSE concentratie is mogelijk toxisch of maakt de cellen anergisch. Een verhoogde proliferatie na zeven dagen in de niet-gestimuleerde conditie zou ook kunnen wijzen op toxische effecten van hoge CFSE concentraties aangezien necrotische cellen ook CFSE vrijzetten.

Volgens Mannering et al. wordt de hoogste T-cel reactiviteit (ΔPF) bekomen bij gebruik van een U-vormige 96-well plaat en stimulatie van de PBMC gedurende 10 dagen (50). Onze experimenten demonstreren dat de grootste ΔPF bereikt wordt na stimulatie van de PBMC gedurende 7 dagen en bij gebruik van een 24-well plaat. Na 10 dagen hebben reeds veel cellen apoptose ondergaan, hetgeen duidelijk te zien was met behulp van de 7AAD kleuring. In verdere analyses wordt gekozen voor het gebruik van een 24-well plaat omdat de

achtergrondproliferatie hierin lager bleek in vergelijking met de achtergrondproliferatie in een 96-well plaat. Ook de celaantallen blijken een cruciale rol te spelen. Een start aantal van twee miljoen cellen/well lijkt de gevoeligheid sterk te verhogen in vergelijking met slechts één miljoen cellen/well. De kans dat de laag frequente zelf-reactieve T-cellen terug te vinden zijn in de celsuspensie en prolifereren wordt zo immers verhoogd. Ook dit pleit voor het gebruik van 24-well platen in de CFSE assay.

Wanneer PBMC gestimuleerd worden met IL2R-α peptide vertonen vooral de $CD4^+$ T-cellen een proliferatieve respons in tegenstelling tot de $CD8^+$ T-cellen. Deze bevindingen komen overeen met de diermodel studies uitgevoerd door de groep van Cohen. Zij zagen namelijk vooral reactiviteit binnen het $CD4^+$ T-cel subtype ten opzichte van CD25 (42). Op zich is het niet verwonderlijk dat hoofdzakelijk reactiviteit gemeten wordt binnen de $CD4^+$ T-celpopulatie aangezien het gebruikte peptide immers bindingspatronen bevat voor HLA-DR. $CD4^+$ T-cellen vertonen een MHC II restrictie, ze worden enkel geactiveerd wanneer het betreffende antigen (het kandidaat ergotoop IL2R-α) gepresenteerd wordt via MHC II moleculen (6). Als IL2R-α peptide inderdaad gepresenteerd wordt door MHC II moleculen, verklaart dit eveneens de lage reactiviteit van $CD8^+$ T-cellen ten opzichte van het peptide, aangezien dit subtype antigenen herkent in combinatie met MHC I moleculen. Met behulp van blokking antilichamen tegen de verschillende MHC subtypes konden we aantonen dat de gemeten T-cel reactiviteit effectief te wijten was aan MHC II gerestricteerde herkenning van het IL2R-α peptide.
Ondanks het feit dat T-cellen reactief tegen IL2R-α vooral het $CD4^+$ fenotype vertonen, zijn er ook Terg die $CD8^+$ zijn. Men heeft reeds aangetoond dat naïeve Terg in de thymus, milt en lymfeknopen van de rat het $CD8^+$ fenotype dragen (overzichtsartikel 38) en dat deze Terg sterk lijken op humane Terg (55). Bovendien zijn er waarschijnlijk nog andere ergotopen naast IL2R-α en HSP60 waartegen de $CD8^+$ Terg reactiviteit vertonen.

Tergs worden gedefinieerd als T-cellen reactief tegen autoloog geactiveerde T-cellen maar niet tegen dezelfde T-cellen in rust. Met andere woorden, ergotoop moleculen worden gepresenteerd door autoloog geactiveerde T-cellen aan Terg, die op hun beurt hierdoor geactiveerd worden (overzichtsartikel 38). Een alternatieve manier om anti-ergotype reactiviteit te meten is via de stimulatie van PBMC met bestraalde PHA geactiveerde T-cel blasten. Onze resultaten tonen aan dat deze geactiveerde T-cellen de proliferatie van vooral $CD4^+$ T-cellen veroorzaken en niet van $CD8^+$ T-cellen. Deze data zijn in overeenstemming

met de reactiviteitspatronen tegen IL2R-α peptide. De PHA blasten presenteren mogelijk CD25 aan de Terg die hierdoor geactiveerd worden. De onderzoeksgroep van Lohse stelt daarnaast de hypothese dat wanneer Terg geactiveerd worden, ze elkaar verder zullen stimuleren door zelf IL2R-α te presenteren. Dit is echter *in vitro* nog niet aangetoond maar vermoedelijk vindt dit proces *in vivo* plaats tijdens de spontane anti-ergotype regulatoire mechanismen in de lymfeknopen (43). Het aantal gebruikte stimulatorcellen (PHA blasten) moet hoog genoeg zijn om reactiviteit in onze *in vitro* assay waar te nemen. Dit kan te verklaren zijn door het feit dat wanneer er niet voldoende PHA blasten zijn, er minder CD25 gepresenteerd wordt waardoor er minder van de aanwezige Terg geactiveerd zullen worden.

De CFSE assay werd volledig op punt gesteld met behulp van vers geïsoleerde PBMC van gezonde controles. Om een vergelijkende studie te kunnen maken tussen gezonde controles en MS-patiënten op het niveau van de reactiviteit ten opzichte van de kandidaat ergotopen, werd gebruik gemaakt van ontdooide PBMC. De proliferatieve respons van deze PBMC kon echter niet geanalyseerd worden omdat de ΔPF in niet-gestimuleerde condities een te hoge waarde vertoonde of omdat het aantal levende lymfocyten te beperkt was. De hoge achtergrondproliferatie kan mogelijk te wijten zijn aan het ontdooien zelf of aan de efficiëntie van de CFSE labeling. Tijdens het ontdooien worden de PBMC behandeld met DNAse om het aan elkaar kleven van de cellen te voorkomen. Deze behandeling verlaagt het samen klitten van de cellen aanzienlijk. Toch is het mogelijk dat dit niet volledig effectief is. Wanneer vervolgens cellen gelabeld worden met CFSE zou het kunnen dat niet alle cellen CFSE kunnen opnemen waardoor een deel van de cellen ongelabeld blijft. Deze fractie cellen zal zich in hetzelfde kwadrant bevinden als de fractie prolifererende cellen. Als gevolg hiervan kunnen de FACS data foutief geïnterpreteerd worden. Een mogelijke oplossing voor dit probleem is het filteren van de celsuspensie zodat de cellen minder aan elkaar kleven en toegankelijker worden voor CFSE. Bovendien heeft het ontdooien van PBMC tot gevolg dat deze gevoeliger en zwakker zijn dan verse cellen. Hierdoor zouden ze de labeling en zeven dagen durende stimulatie niet overleven. Wanneer gelabelde cellen apoptotisch of necrotisch worden, zullen ze hun opgenomen en gebonden CFSE volledig vrijzetten. Opnieuw zal hier de fractie apoptotische cellen zich bij de fractie gedeelde cellen bevinden in de FACS plots. Om deze foutieve interpretatie te voorkomen en apoptotische cellen uit te sluiten, kan er gebruik gemaakt worden van een aankleuring van de cellen met 7AAD. Aangezien deze kleuring toegepast werd in onze experimenten, kan er besloten worden dat de hoge ΔPF in niet gestimuleerde condities vermoedelijk niet te wijten is aan apoptotische cellen. Een optie

zou kunnen zijn om ontdooide PBMC eerst in kweek te brengen om ze te laten herstellen en een aantal uren later te labelen met CFSE.

Aangezien de CFSE assay niet bleek te werken voor ontdooide stalen werd er gebruik gemaakt van verse stalen van 9 gezonde controles en 4 MS-patiënten. Twee van deze MS-patiënten werden reeds gevaccineerd met een T-celvaccin (respectievelijk 2 en 3 maal), de andere twee MS-patiënten werden niet gevaccineerd. Onze experimenten tonen aan dat het grootste deel van de gezonde controles T-cel reactiviteit vertoont ten opzichte van IL2R-α peptide en ook ten opzichte van MBP en dat er een zekere positieve correlatie is tussen beiden. De mate van T-cel reactiviteit tegen MBP is dus gekoppeld aan de T-cel reactiviteit tegen IL2R-α peptide wat erop kan wijzen dat de aanwezige MBP reactieve T-cellen bij gezonde individuen onder controle worden gehouden door de anti-IL2R-α T-cellen. Bovendien wordt door de groep van Lohse verondersteld dat anti-ergotype T-cellen deel uitmaken van de natuurlijke immuunrespons en dat zij noodzakelijk zijn voor de verdere onderdrukking van autoreactieve T-cellen door te helpen bij de initiële activatie van het anti-idiotype netwerk (43).

Volgens de huidige hypothese zijn de anti-ergotype netwerken in MS-patiënten afwezig of minder functioneel. Door middel van TCV tracht men deze netwerken terug te stimuleren zodat de autoreactieve T-cellen onderdrukt kunnen worden (overzichtsartikel 26). Onze reactiviteit metingen met de CFSE assay en Elispot tonen echter aan dat er geen significante verschillen zijn op het niveau van de T-cel reactiviteit tegen IL2R-α peptide (zoals elders vermeld). Opmerkelijk is dat T-cellen van de gevaccineerde MS-patiënten een hoge reactiviteit vertonen ten opzichte van IL2R-α peptide. De T-cel reactiviteit is het sterkst verhoogd in de MS-patiënt die 3 maal gevaccineerd werd in vergelijking met de MS-patiënt die slechts 2 vaccins kreeg. Dit doet vermoeden dat een derde vaccinatie nodig is voor een significante boosting van de anti-IL2R T-cel respons. De gemiddelde T-cel reactiviteit tegen MBP van de gevaccineerde MS-patiënten is lager dan tegen IL2R-α terwijl het omgekeerde geldt voor de niet-gevaccineerde MS-patiënten. Bovendien verschilt de gemiddelde MBP T-cel reactiviteit bij de gevaccineerde MS-patiënten niet significant van die van de gezonde controles. Beide observaties zouden kunnen suggereren dat TCV leidt tot een stijging van de anti-IL2R-α respons die gekoppeld wordt aan een onderdrukking van de anti-MBP respons. Om deze hypothese echter hard te maken, dient het aantal stalen uitgebreid te worden en de individuele patiënt-gebonden reactiviteitsprofielen tegen IL2R-α en MBP voor en na vaccinatie bestudeerd te worden.

In tegenstelling tot de waargenomen T-cel reactiviteit ten opzichte van IL2R-α in zowel gezonde controles als in MS-patiënten, tonen onze resultaten aan dat beide groepen geen reactiviteit vertonen ten opzichte van HSP60 peptide 4 (267-281). Slechts één MS-patiënt vertoont een sterke proliferatieve respons. Interessant is dat deze patiënt ook een hoge reactiviteit vertoont tegen IL2R-α peptide wat mogelijk weer geeft dat de anti-ergotype respons gericht kan zijn tegen meerdere ergotopen. De over het algemeen lage reactiviteit tegen HSP60 peptide 4 is in lijn met de gevonden lage reactiviteit bij toepassing van IFN-γ Elispot. Dit zou enerzijds een aanwijzing kunnen zijn in de richting dat HSP60 niet in aanmerking komt als kandidaat ergotoop. Anderzijds kan het erop duiden dat dit peptide 4 niet geschikt is als ergotoop maar dat een ander deel van het HSP60 proteïne regulatoire eigenschappen vertoont. Quintana et al. heeft aan kunnen tonen dat het HSP60 peptide Hu3 (31-50) mogelijk aan deze regulatoire eisen voldoet (47). De sequentie van dit peptide komt niet overeen met onze geteste peptiden.
Het ontbreken van reactiviteit tegen IL2R-α of HSP60 bij bepaalde MS-patiënten en gezonde controles sluit niet per se uit dat er geen anti-ergotype regulatie plaats vindt. Mogelijk vertonen Terg in deze personen immers reactiviteit tegen andere niet geteste ergotopen. Een grootschalige studie zal meer duidelijkheid dienen te geven over de verschillen in ergotoop reactiviteit tussen gezonde controles en MS-patiënten en over het feit of IL2R-α en HSP60 al dan niet in aanmerking komen als kandidaat ergotopen.

In een laatste stap werd geprobeerd de mechanismen van de anti-ergotype respons te achterhalen. Er wordt aangenomen dat Terg autoreactieve T-cellen onderdrukken of uitschakelen. De mechanismen hierachter zijn echter nog niet duidelijk maar een mogelijke manier van onderdrukking is via de productie van anti-inflammatoire of onderdrukkende cytokines. Dit werd onderzocht met behulp van de supernatans inhibitietest waarbij het SN van IL2R-α reactieve T-cellijnen aan geactiveerde indicator T-cellen toegevoegd werd. Na drie dagen werd de proliferatie gemeten met een ^{3}H-Thymidine assay. De gevonden resultaten zijn echter tegenstrijdig met de verwachtingen dat het supernatans een inhiberend effect zou hebben op de activatie van T-cellen. Er is namelijk een lichte toename van de proliferatie waarneembaar. De toenemende proliferatie kan te wijten zijn aan de aanwezigheid van IL-2 in het supernatans. De SN zijn afkomstig van IL2R-α reactieve T-cellijnen, die zelf recent geactiveerd werden. Aangezien een verhoogde IL-2 productie kenmerkend is voor alle geactiveerde cellen, wordt dit eveneens geproduceerd door de geactiveerde IL2R-α reactieve T-cellijn. Wanneer vervolgens het SN aan geactiveerde T-cellen toegevoegd wordt zal het IL-

2 hierin binden aan de interleukine 2 receptor op de geactiveerde T-cellen waardoor hun proliferatie zal toenemen. Mogelijk overtreft het effect van IL-2 de inhibitoire effecten van mogelijk andere aanwezige cytokines. De verhoogde proliferatie is echter ook zichtbaar wanneer SN van een niet-geactiveerde IL2R-α reactieve T-cellijn aan de TT reactieve T-cellijn toegevoegd wordt. Om meer duidelijkheid te krijgen over deze hypothese dienen deze cytokines gemeten te worden in het SN om na te gaan in welke mate iedere cytokine aanwezig is. Een andere mogelijke verklaring voor het feit dat de proliferatie niet onderdrukt wordt, is dat T-T celcontact noodzakelijk is voor een effectieve anti-ergotype functie (43). Vroegere experimenten in BIOMED toonden immers aan dat IL2R-α specifieke T-cellen enkel op een celcontact afhankelijke manier reageerden tegen geactiveerde T-cellen (56). Mogelijk is dit celcontact noodzakelijk voor de verdere onderdrukking van geactiveerde T-cellen. Dit kan erop wijzen dat de mechanismen van anti-ergotype responsen niet enkel op het niveau van cytokines bestudeerd moeten worden maar bijvoorbeeld ook op het niveau van cytotoxiciteit (bijvoorbeeld Fas-FasL gemedieerde cytotoxiciteit).

De vraag hoe Terg autoreactieve T-cellen onderdrukken blijft momenteel onbeantwoord. Een verdere karakterisatie van kandidaat ergotopen en van de mechanismen van de anti-ergotype responsen zal noodzakelijk zijn om een antwoord te kunnen geven op deze vraag. Als men achterhaald heeft welk molecule in aanmerking komt als ergotoop en welke de effectieve rol is van anti-ergotype responsen, zou men vereenvoudigde vaccins kunnen ontwikkelen. Het huidige vaccin bestaat uit afgezwakte geactiveerde autoreactieve T-cellen. Volgens de huidige hypothese presenteren deze geactiveerde T-cellen het ergotoop aan Terg, waardoor deze geactiveerd worden maar vervolgens anergisch worden (overzichtsartikel 38). Verder contact tussen geactiveerde T-cellen leidt tot celdood met het verlies van Terg tot gevolg. Ook de chronische stimulatie van autoreactieve T-cellen in MS zou zo kunnen leiden tot uitputting van Terg populaties. Cohen et al. heeft indicaties dat wanneer het ergotoop echter door APC gepresenteerd wordt in plaats van door geactiveerde T-cellen, dit niet tot anergie van de Terg leidt maar tot een effectieve boosting en hernieuwing van de Terg populatie (overzichtsartikel 38). Door een vaccin te ontwikkelen dat enkel het ergotoop molecule bevat, kunnen APC *in vivo* zorgen voor een mogelijk herstel van de Terg pool.
Een beter inzicht in de verschillende mechanismen van zowel de anti-ergotype responsen als in het proces van TCV zullen van groot belang zijn bij het beter begrijpen van auto-immune aandoeningen en bij de ontwikkeling voor specifiekere therapieën voor MS.

Referenties

1. Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerose. Immunologic Research 2002;25(1):27-51.
2. Serjeantson SW, Goa X, Hawkins BR, Higgins DA, Yu YL. Novel HLA-DR2-related haplotypes in Hong Kong Chinese implicate the DWB1*0602 allele in susceptibility to multiple sclerosis. European Journal of immunogenetics 1992;19:11-19.
3. Fogdell A, Ligers a, Groning M, Hillert J, Olerup O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. Tissue Antigens 2000;55:1095-1100.
4. Oksenberg JR, Gaiser CN, Cavalli-Sforza LL, Steinman L. Polymrphic markers of human T-cell receptor alpha and beta genes. Family studies and comparison of frequencies in healthy individuals and patients with multiple sclerosis and myasthenia gravis. Human Immunology 1998;22:111-121.
5. Vandevyver C, Buyse I, Philippaerts L, Ghabanbasani Z, Medaer R, Carton H, Cassiman JJ, Raus J. HLA and T-cell receptor polymorphisms in Belgian multiple sclerosis patients: no evidence for disease association with the T-cell receptor. Journal of Neuroimmunology 1994;52:25-32.
6. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. In: Immunology. New York: W.H. Freeman and Company; 2003.
7. Stinissen P, Hermans G, Hellings N, Medaer R, Raus J. Long-term effects of T cell vaccination in multiple sclerosis. In: Treatment of Autoimmune Disorders. Wien, Springer: Sticherling M; 2003. p. 129-149.
8. Neuhaus O, Archelos JJ, Hartung HP. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. Trends in Pharmacological Sciences 2003;24(3):131-138.
9. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. The Journal of Clinical Investigation 2004;114(9):1198-1208.
10. Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells: I. phenotype and physiology. APMIS 2004;112:629-641.
11. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HI, Hafler DA. Loss of functional suppression by $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. The Journal of Experimental Medicine 2004;199(7):971-979.

12. Bendela A. Mouse NK1+ T cells. Current Opinion of Immunology 1995 ;7.367-374.
13. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. Annual Review of Immunology 1997;15:535-562.
14. Gombert JM, et al. Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. European Journal of Immunology 1996;26:2989-2998.
15. Hammond KJ, et al. Alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. Journal of Experimental Medicine 1998;187:1047-1056.
16. Singh AK, et al. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. Journal of Experimental Medicine 2001;194:1801-1811.
17. Bendela A, Fearon DT. Innate pathways that control acquired immunity. Current Opinion of Immunology 1997;9:1-3.
18. Wilbanks GA, Streilein JW. Distinctive humoral immune responses following anterior chamber and intravenous administration of soluble antigen. Evidence for active suppression of IgG2-secreting B lymphocytes. Immunology 1990;71:566-572.
19. Câmara N, Sebille F, Lechler RI. Human $CD4^+CD25^+$ regulatory cells have marked and sustained effects on $CD8^+$ T cell activation. European Journal of Immunology 2003;33:3473-3483.
20. Shevach EM, Piccirillo CA. Naturally-occurring $CD4^+CD25^+$ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. Seminars in Immunology 2004;16(2):81-88.
21. Najafian N, et al. Regulatory functions of $CD8^+CD28^-$ T cells in an autoimmune disease model. The journal of Clinical Investigation 2003;112(7):1037-1048.
22. Chang CC, et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. Nature Immunology 2002;3:237-243.
23. Jiang H, et al. Murine $CD8^+$ T cells that specifically delete autologous $CD4^+$ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. Immunity 1995;2:185-194.
24. Jiang H, Chess L. The specific regulation of immune responses by $CD8^+$ T cells restricted by the MHC class IB molecule, Qa-1. Annual Review of Immunology 2000;18:185-216.
25. Li J, Goldstein I, Glickman-Nir H, Jiang H, Chess I. Induction of TCR Vbeta-specific $CD8^+$ CTL's by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E. Journal of Immunology 2001;167:3800-3808.

26. Hellings N, Raus J, Stinissen P. T-cell vaccination in multiple sclerosis: update on clinical application and mode of action. Autoimmunity Reviews 2004;3:267-275.
27. Lider O, reshef T, Beraud E, Ben Nun A, Cohen IR. Anti-idiotypic network induced by T cell vaccination against experimental autoimmune encephalomyelitis. Science 1988;239:181-183.
28. Van der AA A, Hellings N, Medear R, Gelin G, Palmers Y, Raus J, Stinissen P. T cell vaccination in multiple sclerosis patients with autologous CSF-derived activated T cells: results from a pilot study. Clinical Experimental Immunology 2003;131:155-168.
29. Medaer R, Stinissen P, Truyen L, Raus J, Zhang J. Depletion of myelin-basic-protein autoreactive T cells by T-cell vaccination: pilot trial in multiple sclerosis. Lancet 1995;346:807-808.
30. Zhang J, Medaer R, Stinissen P, Hafler D, Raus J. MHC-restricted depletion of human myelin basic protein-reactive T cells by T cell vaccination. Science 1993;261:1451-1454.
31. Zhang J, Vandevyver C, Stinissen P, Raus J. In vivo clonotypic regulation of human myelin basic protein-reactive T cells by T cell vaccination. Journal of Immunology 1995;155:5868-5877.
32. Hermans G, Medaer R, Raus J, Stinissen P. Myelin reactive T cells after T cell vaccination in multiple sclerosis: cytokine profile and depletion by additional immunizations. Journal of Neuroimmunology 2000;102:79-84.
33. Hermans G, Denzer U, Lohse A, Raus J, Stinissen P. Cellular and humoral immune responses against autoreactive T cells in multiple sclerosis patients after T cell vaccination. Journal of Autoimmunity 1999;13:233-246.
34. Stinissen P, Zhang J, Vandevyver C, Hermans G, Raus J. γδ T cell responses to activated T cells in multiple sclerosis patients induced by T cell vaccination. Journal of Neuroimmunology 1998;87:94-104.
35. Cohen IR. T-cell vaccination for autoimmune disease: a panorama. Vaccine 2002;20:706-710.
36. Zhang YC, Hong J, Rivera VM, Killian J, Zhang JZ. Preferential recognition of TCR hypervariable regions by human anti-idiotypic T cells induced by T cell vaccination. Journal of Immunology 2000;164:4011-4017.
37. Vandenbark AA, Chou YK, Whitham R, Mass M, Buenafe A, Liefeld D, et al. Treatment of multiple sclerosis with T-cell receptor peptides: results of a double-blind pilot trial. Nature Medicine 1996;2:1109-1115.

38. Cohen IR, Quintana FJ, Mimran A. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. The Journal of Clinical Investigation 2004;114(9):1227-1232.
39. Minami Y, Weissman AM, Samelson LE, Klausner RD. Building a multichain receptor: synthesis, degradation, and assembly of the T-cell antigen receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences 1987;84:2688-2692.
40. Broeren CP, Lucassen MA, van Stipdonk MJ, Van Der Zee R, Boog CJ, Kusters JG, et al. CDR1 T-cell receptor beta-chain peptide induces major histocompatibility complex class II-restricted T-T cell interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences 1994;91:5997-6001.
41. Stinissen P, Zhang J, Medaer R, Vandevyver C, Raus J. Vaccination with autoreactive T cell clones in multiple sclerosis: overview of immunological and clinical data. Journal of Neuroscience Research 1996;45:500-511.
42. Mimran A, Mor F, Carmi P, Quintana FJ, Rotter V, Cohen IR. DNA Vaccination with CD25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an antiergotypic response. The Journal of Clinical Investigation 2004;113(6):924-932.
43. Lohse AW, Spahn TW, Wölfel T, Herkel J, Cohen IR, Meyer KH. Induction of the anti-ergotypic response. International Immunology 1993;5(5):533-539.
44. Soltys BJ, Gupta RS. Cell surface localisation of the 60 kDa Heat Shock Chaperonin Protein (hsp60) in mammalian cells. Cell Biology International 1997;21(5):315-320.
45. Mallard K, Jones DB, Richmond J, McGill M, Foulis AK. Expression of the human Heat Shock Protein 60 in thyroid, pancreatic, hepatic and adrenal autoimmunity. Journal of Autoimmunity 1996;9:89-96.
46. Flohé SB, Brüggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohé S, Kolb H. Human Heat Shock Protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. The Journal of Immunology 2003;170:2340-2348.
47. Quintana FJ, Carmi P, Mor F, Cohen IR. DNA fragments of the human 60-kDa Heat Shock Protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis: identification of a regulatory HSP60 peptide. The Journal of Immunology 2003;171:3533-3541.
48. Deibler GE, Martenson RE, Kies MW. Large scale preparation of myelin basic protein from central nervus tissue of several mammalian species. Journal of Neuroimmunology 1972;2:139-165.
49. Czekinsky C, Nilsson L, Tarkowski A, Koopman J, Mestecky J, Ouchterlony Ö. The Solid Phase Enzyme-Linked Immunospot Assay (ELISPOT) for enumerating antibody-secreting cells: methodology and applications. In: Wiley J. ELISA and other solid phase

immunoassays. Theoretical and practical aspects. London Uk: Kemeny DM, Challacombe SJ; 1998. Hoofdstuk 10.

50. Mannering SI, Morris JS, Jensen KP, Purcell AW, Honeyman MC, van Endert PM, Harrison LC. A sensitive method for detecting proliferation of rare autoantigen-specific human T cells. Journal of Immunological Methods 2003;283:173-183.
51. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurment of CFSE dye dilution. Journal of Immunological Methods 2000;243:147-154.
52. Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Douek DC, Koup RA, Racke MK, Karandikar NJ. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific $CD8^+$ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. Blood 2004;103 (11):4222-4231.
53. Lecoeur H, Février M, Garcia S, Rivière Y, Gougeon ML. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. Journal of Immunological Methods 2001;253:177-187.
54. Hellings N., Barée M., Verhoeven C., D'hooghe MB., Medaer R., Bernard C., Raus J., Stinissen P. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. Journal of Neuroscience Research 2001;63:290-302.
55. Correale J., Rojany M., Weiner LP. Human $CD8^+$ TCR-αβ(+) and TCR-γδ (+) cells modulate autologous autoreactive neuroantigenspecific $CD4^+$ T-cells by different mechanisms. Journal of Neurimmunology 1997;80:47-64.
56. Hellings N., Govarts C., Raus J., Stinissen P. Anti-ergotypic T cell responses in healthy controls and multiple sclerosis patients. Journal of Neuroimmunology 2004;154:210 A694 (abstract).