

<b>Inhoudstabel .....</b>	<b>i</b>
<b>Lijst van afkortingen.....</b>	<b>iii</b>
<b>Lijst van figuren en tabellen.....</b>	<b>v</b>
<b>Voorwoord .....</b>	<b>vi</b>
<b>Samenvatting .....</b>	<b>vii</b>
<b>1 Inleiding.....</b>	<b>1</b>
1.1 Proteomica.....	2
1.2 Multiple Sclerose.....	2
1.2.1 Definitie, pathologie, kenmerken.....	2
1.2.2 Etiologie.....	2
1.2.2.1 Huidige hypothese omtrent de immunopathogenese van MS ..	3
1.2.2.2 Genetische en omgevingsfactoren.....	4
1.2.3 Diagnose van MS.....	5
1.2.4 Behandeling van MS.....	6
1.3 Oligodendrocyten en myeline .....	7
1.3.1 Oligodendrocyten en de myelineschede .....	7
1.3.2 Het myeline.....	7
1.3.3 Oligodendrocyten, de- en remyelinisatie in MS .....	9
1.4 Probleemstelling.....	13
<b>2 Materialen en methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1 Isolatie van oligodendrocyten uit de hersenen van mature ratten .....	14
2.2 Stimulatie van de oligodendrocyten met LIF .....	15
2.3 Oogsten van de oligodendrocyten.....	15
2.4 Extractie van eiwitten uit oligodendrocyten.....	15
2.5 Twee-dimensionele gelelektroforese.....	16
2.5.1 Staalvoorbereiding .....	16
2.5.2 Isoelectric focusing.....	16
2.5.3 Equilibratie van de IPG-strips.....	16
2.5.4 SDS-PAGE .....	17

2.5.5 Zilverkleuring .....	17
2.5.6 Prikken en digestie van de eiwitspots .....	17
2.6 Identificatie van de proteïnen met behulp van massaspectrometrie.....	18
2.7 Twee-dimensionele vloeistofchromatografie (2D-LC).....	20
2.7.1 Staalvoorbereiding .....	20
2.7.2 Vloeistofchromatografie .....	21
2.8 Western Blot.....	22
2.9 Immunokleuring van paraffinecoupes.....	23
<b>3 Resultaten.....</b>	<b>25</b>
3.1 2D-GE gevolgd door massaspectrometrische analyse .....	25
3.2 2D-L gevolgd door massaspectrometrische analyse .....	34
3.3 Western blot .....	40
3.4 Immunokleuring .....	41
<b>4. Discussie .....</b>	<b>43</b>
4.1 Inventarisatie oligodendrocytproteoom.....	43
4.2 Differentiële expressie.....	47
4.3 Stathmine.....	53
<b>Literatuurlijst .....</b>	<b>57</b>
<b>Bijlage.....</b>	<b>62</b>

**Lijst van afkortingen**

2D-DIGE	twee-dimensionele differentiële gelelektroforese
2D-GE	twee-dimensionele gelelektroforese
2D-LC	twee-dimensionele vloeistofchromatografie
APC's	antigeenpresenterende cellen
BHB	bloed-hersenbarrière
BSA	bovien serum albumine
CHAPS	[3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propaansulfonaat]
CNP	2',3'-cyclisch nucleotide 3'-fosfohydrolase
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
COFRADIC	<i>combined fractional diagonal chromatography</i>
COP-1	<i>copolymer-1</i>
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> , ruggenmergvocht
CZS	centraal zenuwstelsel
DAB	diaminobenzidine
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DRP-2	<i>dihydropyrimidinase-related proteïn 2</i>
DTT	dithiotreitol
EAE	experimentele autoimmune encephalomyelitis
EDTA	<i>ethylenediamine tetra acetic acid</i>
E-FABP	<i>epithelial/epidermal fatty acid binding protein</i>
EGTA	<i>ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FCS	foetaal kalfserum
GA	glatiramer acetaat
GC	galactocerebroside
GST(P)	glutathion S-transferase (P)
HLA	humaan leukocyt antigen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSP's	<i>heat shock proteins</i>
ICAT	<i>isotope coded affinity tagging</i>
ICDH	isocitraat dehydrogenase
IEF	<i>isoelectric focusing</i>
IFN- $\beta$	interferon beta
IFN- $\gamma$	interferon gamma
IL-10	interleukine 10
IPG	geïmmobiliseerde pH-gradiënt
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LIFR- $\beta$	LIF-receptor $\beta$
M	macrofagen
MAG	myeline-geassocieerd glycoproteïne
MaS	massaspectrometrie
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOG	myeline/oligodendrocyt-glycoproteïne
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i>
MS	multiple sclerosis

## Lijst van afkortingen

---

NF- $\kappa$ B	nucleaire factor- $\kappa$ B
OG	oligodendrocyten
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
<i>PDA3</i>	<i>proteïne disulfide isomerase A3</i>
<i>PDI</i>	<i>proteïne disulfide isomerase</i>
pI	isoelektrisch punt
PLP	<i>proteolipid protein</i>
PMSF	fenylmethyl sulfonyl fluoride
PP-MS	primair progressieve MS
PVDF	polyvinylideen difluoride
ROI	reactieve zuurstofintermediären
RR-MS	<i>relapsing-remitting</i> MS
SCX	<i>strong cation exchange</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfaat</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfaat</i> polyacrylamide gelelektroforese
SOD	superoxide dismutase
SP-MS	secundair progressieve MS
Tc1	klasse 1 beperkte T-cellen
TCR	T-cel receptor
TGF- $\beta$	transforming groeifactor beta
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
Tpm	toeren per minuut
Xcorr	correlatiecoëfficiënt

**Lijst van figuren en tabellen**

- Figuur 1: Pathogenese van multiple sclerose  
Figuur 2: Myelinisatie van axonen door een oligodendrocyt in het centrale zenuwstelsel  
Figuur 3: Overzicht van de pathogene mechanismen betrokken in de vorming van de laesies bij multiple sclerose  
Figuur 4: Schematische weergave van de twee-dimensionele vloeistofchromatografie  
Figuur 5: Het oligodendrocytproteoom van de rat  
Figuur 6: Rapport van Mascot van de MS/MS-fragmentatie van de peptidensequentie SSFFVNGGLTLGGQK van het eiwit profiline 1 uit spot 7 (figuur 1 bijlage)  
Figuur 7: Rapport van Sequest voor het eiwit profiline  
Figuur 8: Rapport van Mascot voor het eiwit profiline  
Figuur 9: Voorbeeld van een spot (18) die duidelijk opgereguleerd is in een gel van het oligodendrocytstaal gekweekt in groemedium gesupplementeerd met LIF (a) in vergelijking met een gel van het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groemedium (b)  
Figuur 10: Relatieve expressiewaarden van 8 spots  
Figuur 11: Het aantal MS/MS-files per fractienummer van het oligodendrocytstaal gekweekt in groemedium (a) en het oligodendrocytstaal gestimuleerd met LIF (b)  
Figuur 12: Overzicht van het aantal peptiden gebruikt voor de identificatie van de oligodendrocytproteïnen  
Figuur 13: Overzicht van de identificaties van de proteïnen  
Figuur 14: Proteïne-aantallen geïdentificeerd in het oligodendrocytstaal gekweekt in groemedium enerzijds en in het oligodendrocytstaal gekweekt in groemedium gesupplementeerd met LIF anderzijds.  
Figuur 15: Proteïne-aantallen geïdentificeerd in het ratoligodendrocytstaal, gekweekt in groemedium, met behulp van 2D-GE en 2D-LC  
Figuur 16: Indeling van de proteïnen geïdentificeerd met behulp van 2D-GE en 2D-LC van het oligodendrocytstaal opgekweekt in enkel groemedium naargelang hun functie in de cel  
Figuur 17: Western blot met het stathmine-antilichaam  
Figuur 18: Immunokleuring met het stathmine-antilichaam op paraffine-coupees van hersenmateriaal van controle en EAE-rat  
Figuur 19: Proteoomkaart van de oligodendrocyt van de volwassen rat
- Tabel 1: Gradiënt doorlopen bij LC-ESI-MS/MS  
Tabel 2: Gemiddelde relatieve expressiewaarden van een aantal spots in de verschillende gelen  
Tabel 3: Voorbeeldmatrix van het proteïne cofiline 1  
Tabel A: Proteïnen van de oligodendrocyt geïdentificeerd met behulp van 2D-GE gekoppeld aan LC-MS/MS  
Tabel B: Overzicht van de geïdentificeerde proteïnen van het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groemedium door middel van 2D-LC  
Tabel C: Overzicht van de geïdentificeerde proteïnen van het oligodendrocytstaal gekweekt in groemedium gesupplementeerd met LIF door middel van 2D-LC

**Voorwoord**

Iedere studentenloopbaan heeft zijn eigen scharniermomenten. Voor het eerst naar school, naar de lagere school, het secundair onderwijs, naar de universiteit en na 4 jaar hard zwoegen uiteindelijk een thesis opstellen en verdedigen.

Telkens een gelegenheid om op terug te blikken en om vooruit te kijken. Hoe verder men vordert hoe meer men geneigd is de zaken cognitiever te benaderen. Het gevoel, de emotioneliteit blijft echter haar rechten opeisen. Zo past hier dan ook een uitgebreid woord van dank aan iedereen die bijgedragen heeft aan mijn ontwikkeling.

Allereerst zou ik prof. Dr. Stinissen willen bedanken om mij te mogelijkheid te geven om deze leerzame stage te doorlopen in zijn instituut. Ook wil ik mijn promotor prof. Johan Robben bedanken om mij te laten kennis maken met de wondere wereld van proteomica.

Meest nabij in dit studiewerk was mijn begeleidster ir. Debora Dumont. Naast professionele en wetenschappelijke begeleiding was zij al die tijd een ondersteunende raadvrouw. Mijn oprechte dank en waardering.

Wetenschappelijk werk is meestal ook teamwerk. Vandaar dat ik dr. Jean-Paul Noben wil bedanken voor de hulp bij de vloeistofchromatografieën. Ook dank aan Veronique Haesen die altijd klaar stond met vele praktische tips in het labo. Verder dank ik Eric Royackers voor de vele uren die hij besteedde aan de massaspectromtrische analyse van de stalen en Wilfried Leyssens voor de decapitatie van de ratjes. Ook dank ik tweede beoordelaar dr Niels Hellings voor het nalezen en beoordelen van mijn thesis. Uiteraard verdienen ook lic. Kurt Baeten en lic. Joris Vanderlocht een woordje van dank voor de hulp bij de eerste isolaties. Ook dank aan dr. Frank Vandenabeele voor de microscopische analyses en dr. Jerome Hendrikx voor de hulp bij de immunokleuringen.

Ook mijn medestudenten wil ik bedanken. Vooral Veerle met wie ik vele uurtjes samen doorbracht in het labo, verdient een pluim voor haar hulp en het geduld. Ook wil ik graag mijn goede vriendin Katrien bedanken voor deze fantastische vier jaar. Jij was er altijd voor mij, zowel tijdens de moeilijke als tijdens de fijne momenten op school.

Tenslotte wil ik mijn ouders, zus en vriend Kurt bedanken voor de hulp over de jaren heen: dankuwel!

Marijse Gilissen

**Samenvatting**

De meeste ziekten manifesteren zich omdat op eiwitniveau belangrijke processen uit de hand lopen. Daarom is eiwitonderzoek essentieel voor het begrijpen van celfuncties, weefselfuncties en vele ziekten. Het onderzoek naar de proteïnen die tot expressie gebracht worden door een genoom (eenvoudig organisme) of weefsel noemt men proteomica. In dit eindwerk werd een proteomica-bendaring toegepast in het onderzoek naar Multiple sclerose (MS). Multiple sclerose is een chronische inflammatoire, demyeliniserende ziekte van het centrale zenuwstelsel. De pathologie van MS wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van meerdere sclerotische laesies of plaques, gevonden in de witte stof van het centrale zenuwstelsel. Deze sclerotische plaques ontstaan doordat het myeline en de myelinevormende cellen (oligodendrocyten) aangevallen worden tijdens een inflammatoire respons, resulterend in demyelinisatie. Het myeline is van cruciaal belang voor de impulsgeleiding in zenuwbanen en beschadiging ervan leidt tot een verstoorde zenuwfunctie. Tot op heden zijn er nog geen proteomica-studies betreffende oligodendrocyten beschreven. Een eerste doelstelling van deze stage was dan ook de inventarisatie van het oligodendrocytproteoom van de Lewis rat. Oligodendrocyten werden uit de hersenen van ratten geïsoleerd en in cultuur gebracht, waarna de proteïnen werden geanalyseerd met behulp van twee-dimensionele gelelektroforese (2D-GE) en twee-dimensionele vloeistofchromatografie (2D-LC), beide gekoppeld aan massaspectrometrie. In een tweede luik werden oligodendrocyten gestimuleerd met het neuropoïetisch cytokine *leukemia inhibitory factor* (LIF), waarna het proteoom werd geanalyseerd met hogervermelde technieken. Een eerdere studie uitgevoerd op BIOMED toonde immers aan dat het cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) apoptose veroorzaakt bij mature rat-oligodendrocyten en dat door co-incubatie met LIF deze oligodendrocyten grotendeels beschermd worden tegen TNF-geïnduceerde apoptose. Verschillen in eiwitexpressie in oligodendrocytculturen, opgegroeid in enkel groeimedium of in groeimedium gesupplementeerd met LIF werden opgespoord, zowel met de 2D-GE als de 2D-LC-methode. De differentiële expressie van een aantal proteïnen, waaronder stathmine werd beschreven. Een verdere evaluatie van de geïdentificeerde proteïnen kan bijdragen aan de verdere ontrafeling van de onderliggende mechanismen van oligodendrocytbescherming door LIF.

## 1 Inleiding

### 1.1 Proteomica

De meeste ziekten manifesteren zich omdat op eiwitniveau belangrijke processen uit de hand lopen. Daarom is eiwitonderzoek essentieel voor het begrijpen van celfuncties, weefselfuncties en vele ziekten (1). Het onderzoek naar de proteïnen die tot expressie gebracht worden door een genoom (eenvoudig organisme) of weefsel noemt men proteomica (2). Het proteomica-onderzoek is belangrijk omwille van een aantal redenen: het niveau van mRNA expressie is vaak niet representatief voor de hoeveelheid aan actieve proteïnen in een cel; de gensequentie beschrijft geen post-translationele modificaties, die mogelijk essentieel zijn voor de functie en de activiteit van het proteïne; en de studie van het genoom beschrijft geen dynamische cellulaire processen (1). Daarom is het belangrijk om naast de studie van het genoom, ook aandacht te hebben voor de analyse van proteïnen.

Proteomica bestaat meestal uit twee stappen: (1) de scheiding van proteïnen en (2) de analyse en identificatie van proteïnen voornamelijk via massaspectrometrie (MaS). Bij tweedimensionele gelelektroforese (2D-GE) worden de proteïnen in de eerste dimensie gescheiden op basis van verschillen in hun netto-lading, *isoelectric focusing* (IEF) genoemd, en in de tweede dimensie worden de proteïnen gescheiden op basis van hun grootte in polyacrylamidegelen (3). Ondanks de vele voordelen van 2D-GE zijn er ook een aantal klassen van proteïnen die niet duidelijk voorgesteld worden op 2D-GE-gelen. Dit geldt namelijk voor proteïnen die slechts in zeer kleine hoeveelheden tot expressie komen, voor membraanproteïnen, voor proteïnen die zeer zuur of basisch zijn, en voor zeer kleine of zeer grote proteïnen (4,5). Tegenwoordig is er een evolutie merkbaar naar gel-vrije methoden om hogervermelde tekortkomingen te omzeilen. Een voorbeeld van een gel-vrije techniek is tweedimensionele vloeistofchromatografie (2D-LC). Bij deze techniek worden peptiden gescheiden op basis van hun polariteit met behulp van een *strong cation exchange* (SCX)-kolom. De opgevangen peptidenfracties kunnen nadien geanalyseerd worden met behulp van Mas (6).

De bovenstaande proteomica-technieken worden tegenwoordig in vele studies gebruikt voor het opsporen van ziekte-gerelateerde proteïnen, zoals bij MS (7), kanker (8) of Alzheimer (9).



## **1.2 Multiple Sclerose**

### **1.2.1 Definitie, pathologie, kenmerken.**

Multiple sclerose (MS) is een chronische inflammatoire, demyeliniserende ziekte van het centrale zenuwstelsel (CZS) (10). De ziekte manifesteert zich voornamelijk bij jonge volwassenen met een leeftijd tussen 20 en 40 jaar en treft tweemaal zoveel vrouwen als mannen (11). De pathologie van MS wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van meerdere sclerotische laesies of plaques, gevonden in de witte stof van het centrale zenuwstelsel (12). Deze sclerotische plaques ontstaan doordat het myeline en de myelinevormende cellen (oligodendrocyten) aangevallen worden tijdens een inflammatoire respons, resulterend in demyelinisatie (13). Het myeline is van cruciaal belang voor de impulsgeleiding in zenuwbanen en beschadiging ervan leidt tot een verstoorde zenuwfunctie. De meest voorkomende klinische manifestaties van MS zijn dan ook stoornissen aan het gezichtsvermogen, verlamingsverschijnselen, incontinentie en buitengewone vermoeidheid (14).

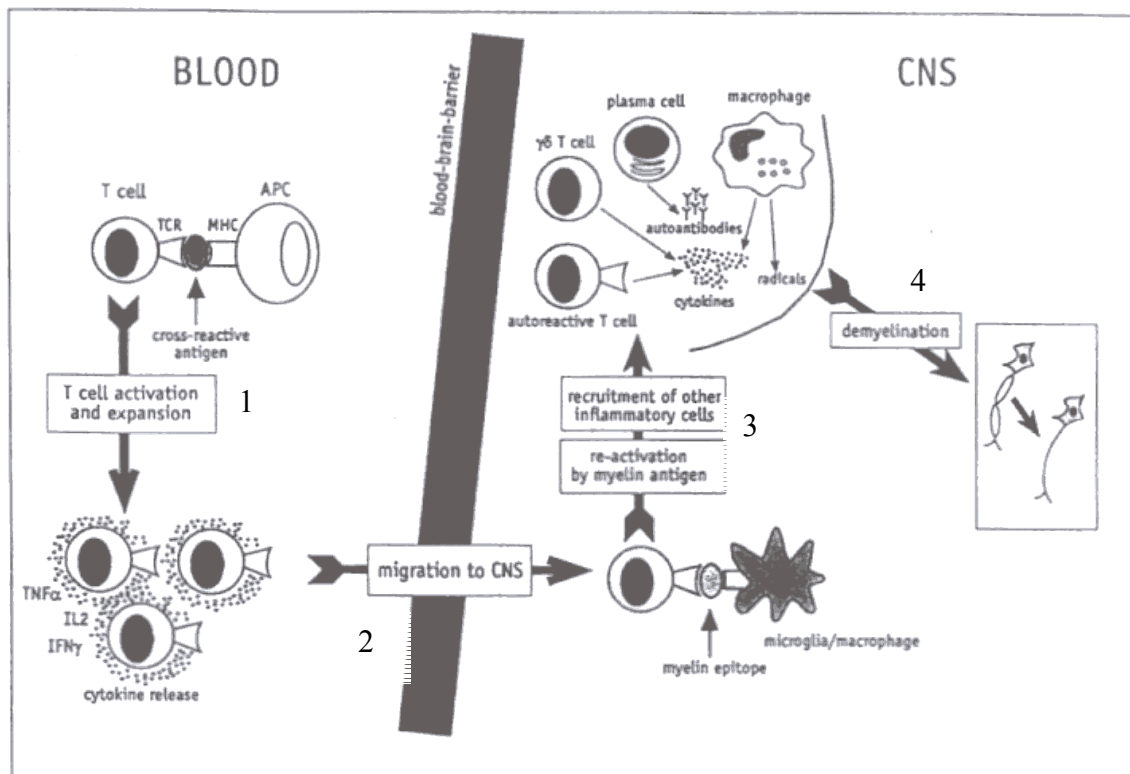
MS kan in verschillende vormen onderverdeeld worden naargelang de aan- of afwezigheid van opflakkingen en/of ziekteprogressie. In 85-90% van de patiënten is er sprake van *relapsing-remitting* MS (RR-MS). Deze vorm van MS wordt gekenmerkt door een reeks van opflakkingen, waarbij nieuwe klachten optreden of waarbij er een toename is van reeds bestaande klachten. Na een opflakking herstelt de patiënten gedeeltelijk of volledig. Vaak gaat deze vorm na een aantal jaren over in de progressieve vorm, gekend als secundair progressieve MS (SP-MS). Bij deze vorm is er geen sprake meer van acute aanvallen, maar is er een geleidelijke verergering van de neurologische toestand merkbaar (15). Bij een kleinere groep van patiënten is er sprake van een derde vorm, primair progressieve MS (PP-MS). Deze vorm wordt gekenmerkt door de afwezigheid van acute opflakkingen en vertoont van in het begin van de ziekte een geleidelijke klinische achteruitgang (16).

### **1.2.2 Etiologie**

Ondanks uitgebreid wetenschappelijk onderzoek, blijft de etiologie van MS grotendeels ongekend. De huidige hypothese veronderstelt dat MS een auto-immune aandoening is en dat vatbaarheid beïnvloed wordt door zowel genetische als exogene factoren (10).

### 1.2.2.1 Huidige hypothese omtrent de immunopathogenese van MS

Een van de eerste hypothetische gebeurtenissen in de pathogenese van MS is de activatie van myeline reactieve T-cellen in de periferie. Eenmaal geactiveerd gaan deze autoreactieve T-cellen zich uitbreiden en verdelen over het centrale zenuwstelsel (17). De migratie doorheen het dichte endotheel van de bloed-hersenbarrière (BHB) wordt bevorderd door de expressie van adhesiemoleculen en de vrijlating van pro-inflammatoire cytokines door de geactiveerde T-cellen (18-20). Binnen het CZS worden de myeline reactieve T-cellen gereactiveerd éénmaal ze in contact komen met hun specifieke myeline-epitop, gepresenteerd door antigeenpresenterende cellen (APC's): microgliacellen of perivasculaire macrofagen (21).



**Figuur 1: Pathogenese van multiple sclerose**

Overzicht van de belangrijkste stappen in de pathogene cascade van multiple sclerose: (1) activatie van autoreactieve T-cellen in de periferie; (2) transmigratie van pro-inflammatoire T-cellen en monocyten doorheen de bloed-hersenbarrière; (3) versterking van lokale inflammatie en activatie van aanwezige APC's, zoals microglia en macrofagen; (4) effector stadium van de ziekte, met schade aan myelineschede (22) .

De gereactiveerde T-cellen zullen lokaal pro-inflammatoire cytokines, zoals tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), produceren, leidend tot de opregulatie van de MHC klasse II moleculen op astrocyten en microglia en adhesiemoleculen op het BHB-

endotheel. Dit zal de instroom van T-cellen, B-cellen, macrofagen vergemakkelijken, zo bijdragend aan de versterking van de inflammatoire immuunrespons. Demyelinisatie zal het uiteindelijke resultaat zijn van deze vicieuze cirkel van gebeurtenissen. Waarschijnlijk is de afbraak van het myeline het gevolg van de gecombineerde effecten van cytotoxische cellen (macrofagen en  $\gamma\delta$  T-cellen), zuurstofradicalen, demyeliniserende auto-antilichamen, en cytokine geïnduceerde toxiciteit (vb. TNF) (23-25).

Aangezien myeline-autoreactieve T-lymfocyten en auto-antilichamen gericht tegen myeline deel uitmaken van het T-cel/antilichaam repertoire van zowel MS-patiënten als van gezonde individuen (26-28), blijft de vraag echter hoe deze myeline-actieve T-cellen geactiveerd worden in MS. Er bestaan verschillende hypothesen die verklaren hoe naïeve autoreactieve T-cellen geactiveerd worden en deze hypothesen sluiten elkaar niet uit (29).

De eerste hypothese, *bystander* activatie, veronderstelt dat myeline-autoreactieve cellen geactiveerd worden in pro-inflammatoire omgevingen die zich voordoen in een geïnfecteerd orgaan (bv. door een virus). Onder deze omstandigheden zullen pro-inflammatoire cytokines leiden tot een stijging in antigeenpresentatie door middel van de opregulatie van MHC en costimulatoire moleculen, die mogelijk de drempel voor activatie verlagen (30) en de afname van zelftolerantie bevorderen (31).

Een tweede hypothese wordt ook moleculaire mimicrie genoemd. Moleculaire mimicrie is het proces waarbij een infectie met een virus T-cellen activeert door middel van een kruisreactie met eigen antigenen (32). Er zijn al vele diermodellen beschreven die aantoonen dat een infectie met een welbepaalde microbe kan leiden tot een bepaalde auto-immune ziekte (33).

Een laatste hypothese veronderstelt dat T-cellen ook geactiveerd kunnen worden door microbiële superantigenen. Op basis van herkenning van bepaalde T-cel receptor V-beta-producten zal een relatief groot deel van het T-cel repertoire geactiveerd worden. Hierdoor krijgt men een snelle, overweldigende proliferatie van cellen en een enorme cytokine-productie (34).

### **1.2.2.2 Genetische en omgevingsfactoren**

Bewijs voor een invloed van genetische factoren op de pathogenese van MS wordt geleverd door studies van families en tweelingen (10). Deze studies geven aan dat het risico op het krijgen van MS significant hoger ligt bij eerstegraads verwanten van MS-patiënten, vergeleken met de algemene bevolking (35). Uit studies naar tweelingen kan men afleiden dat er een klinische concordantie is van 31% in monozygote tweelingen en van 5% in dizygote

tweelingen. Het verschil in concordantie tussen monozygote en dizygote tweelingen geeft duidelijk aan dat er genetische invloeden zijn bij MS. Maar de concordantie in monozygote tweelingen is enkel gedeeltelijk, waaruit men kan afleiden dat niet één enkel gen, maar eerder meerdere genen gecombineerd met niet-genetische factoren bijdragen aan vatbaarheid voor MS (10). Studies toonden een sterk verband aan tussen vatbaarheid voor MS en de aanwezigheid van de humane leukocyt antigen (HLA)-genen, zoals HLA-DRB5\*0101 en DQB\*0602. Andere allelen zijn slechts matig geassocieerd met vatbaarheid voor MS (22). Ondanks dat verschillende studies een sterke genetische component voor MS hebben aangetoond, blijft het zeer moeilijk om specifieke genen die mogelijk betrokken zijn, te identificeren (29).

Zoals reeds vermeld blijken, naast genetische factoren ook omgevingsfactoren belangrijk te zijn in de ontwikkeling van de ziekte (29).

Er werd reeds aangetoond dat de incidentie van MS toeneemt met de afstand verwijderd van de evenaar (10). MS heeft ook een hoge prevalentie in Kaukasiërs en de ziekte komt zelden voor bij Aziaten of Afrikanen (35).

In de laatste jaren werden er verschillende mogelijke kandidaatvirussen onderzocht op een mogelijk oorzakelijk verband met MS. Verschillende virussen, waaronder mazelen, het menselijk herpesvirus en rabiës, werden reeds geïsoleerd uit MS-hersenweefsel, maar er kon geen bewijs geleverd worden voor een duidelijk verband met MS (10). Dit sluit echter de mogelijkheid niet uit dat infectieuze stoffen de ziekte kunnen uitlokken.

### **1.2.3 Diagnose van MS**

Er is nog geen specifieke laboratoriumtest beschikbaar voor MS. De diagnose van MS is momenteel gebaseerd op klinisch onderzoek, analyse van de ziektegeschiedenis, *magnetic resonance imaging* (MRI), en laboratoriumtests zoals de analyse van ruggenmergvocht (*cerebrospinal fluid*, CSF) (door middel van celtellingen en detectie van oligoclonale IgG-banden) (36).

Conventionele MRI wordt wereldwijd gebruikt voor het stellen van een diagnose van MS, en is een paraklinisch middel om de ziekte in verloop van de tijd te volgen en om de effecten van nieuwe therapieën te evalueren.

De analyse van biochemische merkers van de ziekte en van de schade aan het CZS kunnen de beeldvormingstechnieken aanvullen (37). Er zijn reeds verschillende studies die aangeven dat sommige immuunparameters mogelijk verband houden met de activiteit van de ziekte. Zo zijn er een aantal cytokines gevonden die verhoogd zijn in verschillende klinische fases van

*relapsing-remitting* MS. Verhoogde niveaus van de pro-inflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  correleren met de klinische opflakkingen gezien bij MS, terwijl verhoogde niveaus van de anti-inflammatoire cytokines interleukine 10 (IL-10) and *transforming growth factor* beta (TGF- $\beta$ ) verbonden zijn met de remissies (38).

#### **1.2.4 Behandeling van MS**

MS is één van de weinige auto-immune ziektes waarvoor immunomodulerende therapieën, zoals IFN- $\beta$  en GA (glatiramer acetaat of COP-1), zijn goedgekeurd. IFN- $\beta$  werd oorspronkelijk geïntroduceerd als een antivirale stof; GA was ontwikkeld om EAE (experimentele autoimmune encephalomyelitis) te induceren, maar nadien bleek deze stof therapeutisch reactief te zijn. Beide agentia zijn enkel matig effectief: ze reduceerden het risico op opflakkingen van de ziekte met ~30%, vertraagden de progressie van de ziekte of vertraagden de aanvang van de ziekte in grote fase III *trials* (22). De werkingsmechanismen van beide agentia zijn nog niet gekend. Er zijn reeds verschillende mogelijke werkingsmechanismen voor IFN- $\beta$  beschreven, waaronder down-regulatie van proliferatie, inhibitie van de secretie van metalloproteïnases, blokkeren van T-cel migratie, en stimulerende effecten op de productie van immunomodulerende cytokines (10). Glatiramer acetaat (copolymer-1) is een synthetisch peptidemengsel dat het *myelin basic proteïn* (MBP), een component van het myeline, simuleert. Ondanks dat het werkingsmechanisme nog niet volledig gekend is, vermoed men dat dit geneesmiddel T-cellen blokkeert door te werken als een ‘weglokker’ van het myeline. Een ander werkingsmechanisme lijkt stimulatie van T-suppressor cellen te zijn die het CZS doorkruisen en *bystander suppressie* voorzien (39). Deze therapieën kennen echter nog veel bijwerkingen (29).

Ondanks het ontbreken van een uniform geaccepteerd model voor MS, is er toch enige overeenstemming over de inflammatoire gebeurtenissen gemedieerd door autoreactieve T-cellen in het CZS. Daarom zijn therapeutische aanpakken verschoven van algemene onderdrukking van het immuunsysteem naar meer specifieke doelwitten (29). Deze experimentele therapieën omvatten T-cel vaccinatie (40), T-cel receptor (TCR) vaccinatie (41), MHC-peptide blokkers, monoklonale antilichamen gericht tegen leukocyt differentiatiemoleculen (anti-CD3 (42), anti-CD4 (43)), en cytokine-modulatoren (TNF $\alpha$  antagonisten, IL-10, TGF- $\beta$  (44)). Deze experimentele therapieën zullen hier echter niet besproken worden.

Eén van de grote uitdagingen in het onderzoek naar MS is het zoeken naar strategieën die remyelinisatie van chronisch gedemyeliniseerde axonen zullen bevorderen. Hierbij kan men

twee aanpakken veronderstellen. De eerste methode heeft als bedoeling de oligodendrocyt-populatie van de patiënt *in vivo* te manipuleren om zo zelf-remyelinisatie te bevorderen. In een tweede aanpak is de strategie het vervangen van de afwezige of gehinbeerde oligodendrocyten in of nabij MS-plaques door middel van transplantatie van myeliniserende cellen (29).

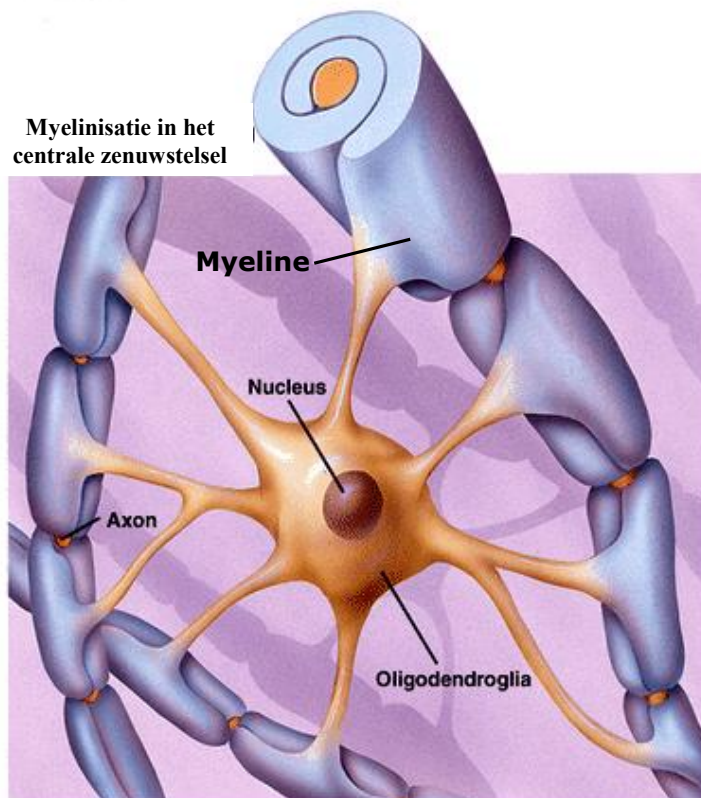
### **1.3. Oligodendrocyten en myeline**

#### **1.3.1 Oligodendrocyten en de myelineschede.**

Oligodendrocyten ontstaan uit migrerende en mitotische precursoren, worden vervolgens progenitors, en ontwikkelen zich uiteindelijk tot postmitotische myelineproducerende cellen. De opeenvolgende expressie van ontwikkelingsmerkers, vaak herkend door specifieke monoklonale antilichamen, verdelen het ontwikkelingsproces in verscheidene fenotype stadia, gekarakteriseerd door verschillende proliferatieve capaciteiten, migratie-mogelijkheden, en dramatische veranderingen in morfologie (45). De oligodendrocyt-ontwikkeling kan morfologisch getypeerd worden door de opeenvolgende verschijning van verschillende brede uitsteeksels, gevolgd door de ontwikkeling van kleinere, secundaire en tertiaire uitsteeksels, terwijl op hetzelfde moment de expressie van myelinecomponenten gestart wordt. Wanneer er geen axonen aanwezig zijn vormt er zich een uitgestrekte, webachtige structuur rondom de cel die alle myelinecomponenten bevat (de myeline *sheet*) (46). Wanneer er een axon gedetecteerd wordt, zullen de secundaire en tertiaire uitsteeksels zich samen met de myeline *sheet* terugtrekken (47), terwijl slechts enkele uitsteeksels naar het axon toe groeien en het vervolgens omgeven. Alle myelinecomponenten worden naar het uiteinde van deze uitsteeksels getransporteerd, die zich rondom het axon gewonden hebben, zo leidend tot het typische opeengepakte, meerlagige myelinemembraan: de myelineschede (figuur 2)(46).

#### **1.3.2 Het myeline**

Myeline bestaat voor 70-80% uit lipiden en naast een grote fractie aan cholesterol bestaat de lipidenpool voor 25-30% uit het glycosfingolipide galactosylceramide en zijn derivaat (46). De kwantitatieve belangrijkste myelineproteïnen zijn PLP (50% van de totale hoeveelheid myelineproteïnen) en MBP (30%).



**Figuur 2: Myelinisatie van axonen door een oligodendrocyt in het centrale zenuwstelsel**

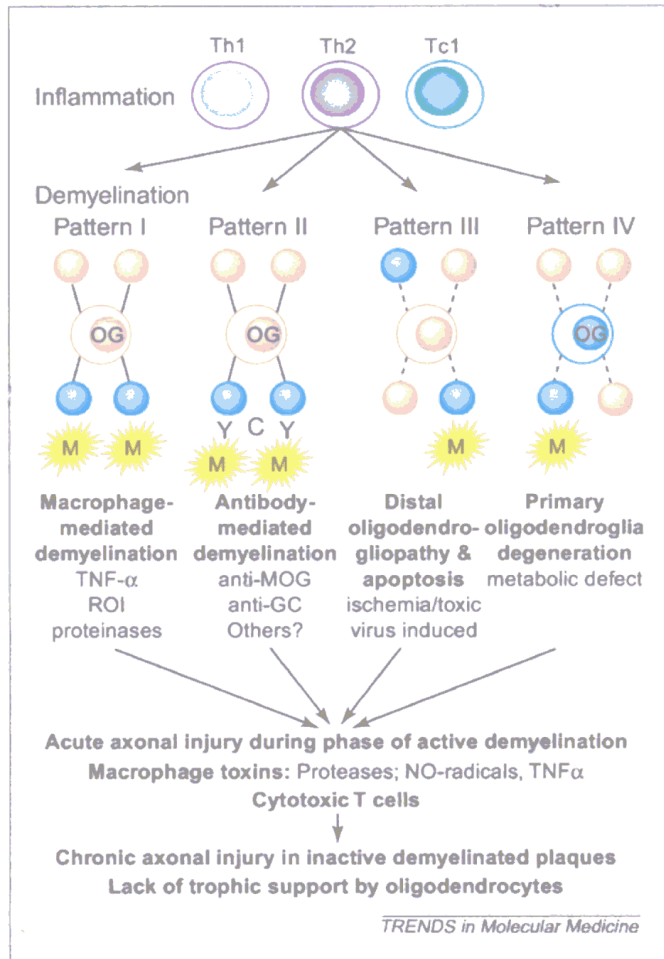
De oligodendrocyt draait zijn uitlopers rondom nabijgelegen axonen en vormt zo een aantal lagen myeline.

De primaire functies van deze proteïnen zijn het stabiliseren van de aaneengehechte myelinemembranen in het compacte myeline, MBP in de intracellulaire ruimte en PLP in de extracellulaire ruimte (48). Het myeline-geassocieerde glycoproteïne (MAG) is een lid van de immunoglobuline-superfamilie, en is voornamelijk gelokaliseerd in de peri-axonale regio (49). Er wordt vermoed dat MAG betrokken is in het (co-)mediëren van de adhesie tussen oligodendrocyt en axon, en in de myelinevorming, maar zijn exacte functie blijft voorlopig ongekend (50). Ook bevinden zich in het myeline een deel bijkomende, kleinere proteïnen, zoals het myeline/oligodendrocyt-glycoproteïne (MOG), één van de mogelijke antigene determinanten in multiple sclerose (46). Het 2',3'-cyclisch nucleotide 3'-fosfohydrolase (CNP) is zowel aanwezig in het plasmamembraan van de oligodendrocyten als in het niet-compacte deel van de myelineschede (51). CNP blijkt een belangrijke rol te spelen in differentiatie, voornamelijk bij de vorming van de uitsteeksels (52).

### **1.3.3. Oligodendrocyten, de- en remyelinisatie in MS**

MS wordt gekarakteriseerd door demyelinisatie, maar ook remyelinisatie wordt vaak tijdens de ziekte vastgesteld. In acute laesies gaat het ontstekingsproces gepaard met demyelinisatie en verlies van oligodendrocyten. Tijdens het herstel van deze laesies dringen echter oligodendrocyt-progenitorcellen het gebied van demyelinisatie binnen, om zich vervolgens te vermenigvuldigen en te ontwikkelen tot myeliniserende oligodendrocyten (53,54). Deze cellen myeliniseren axonen en herstellen de lokale schade, resulterend in de vorming van schaduwplaques (55,56). De mogelijkheid om te remyeliniseren lijkt het meest efficiënt te zijn in acute laesies, maar neemt na verloop van tijd af. In chronische laesies bevinden zich nog oligodendrocyten, maar wordt er weinig remyelinisatie gezien. Deze bevindingen geven aan dat er mogelijk nog actieve oligodendrocyten aanwezig zijn in chronische laesies, maar dat deze cellen er niet in slagen om axonen te remyeliniseren (57,58). Er is reeds bewezen dat in sommige gevallen van chronische MS de vernietiging van oligodendrocyten pas volgde na demyelinisatie, terwijl in andere gevallen er eerst vernietiging van oligodendrocyten optrad, leidend tot secundaire demyelinisatie (59). Deze feiten geven aan dat er een diepgaande heterogeniteit is in patronen van demyelinisatie tussen verschillende patiënten. Alle actieve demyeliniserende laesies waren geassocieerd met een inflammatoir proces, met daarbij voornamelijk T-cellen en macrofagen als inflammatoire infiltraten. Ondanks de gelijkenissen in de inflammatoire reactie kunnen de laesies onderverdeeld worden in vier patronen van myelinedestructie (figuur 2).





**Figuur 3: Overzicht van de pathogene mechanismen betrokken in de vorming van de laesies bij multiple sclerose**

Inflammatie: studies geven aan dat T helper 1 (Th1) cellen een rol hebben bij het induceren van ontstekingsreacties in het centrale zenuwstelsel. Pro-inflammatoire cytokines vrijgelaten door deze Th1-cellen activeren macrofagen, die verantwoordelijk zijn voor het merendeel van de demyelinisatie en de axonale beschadiging. T helper 2 (Th2) cellen en cytotoxische, klasse I beperkte T-cellen (Tc1) zijn mogelijk ook betrokken bij deze laesies. Demyelinisatie: myelineschedes en oligodendrocyten (OG) kunnen vernietigd worden, waarschijnlijk door verschillende mechanismen in verschillende individuen. Dit resulteert in verschillende patronen van demyelinisatie in actieve laesies. Demyelinisatie kan geïnduceerd worden door macrofagen (M) en/of hun toxische producten (resulterend in patroon I), door specifieke demyeliniserende antilichamen en complement (resulterend in patroon II), door destructieve veranderingen in distale uitlopers, voornamelijk deze van peri-axonale oligodendrocyten (distale oligodendrogliepathie), gevolgd door apoptose (resulterend in patroon III), of door een primaire vernietiging van oligodendrocyten gevolgd door aantasting van het myeline (resulterend in patroon IV). Mogelijke mediators van de vernietiging van myeline en oligodendrocyten zijn tumor necrosis factor  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ), reactieve zuurstof-intermediaren (ROI), antilichamen gericht tegen myeline oligodendrocyt glycoproteïne (anti-MOG) of galactocerebroside (anti-GC). Axonale schade: axonale schade volgt op de acute vernietiging van de myelineschedes. In de actieve fase van de demyelinisatie, wordt de axonale schade waarschijnlijk geïnduceerd door toxines van macrofagen of door rechtstreekse effecten van cytotoxische T-cellen. De chronische axonale schade gezien in inactieve plaques wordt mogelijk veroorzaakt door een gebrek aan trofische ondersteuning door gliacellen, zoals oligodendrocyten, maar kan ook te wijten zijn aan inflammatoire mediators, geproduceerd door macrofagen, die aanwezig blijven in de meest actieve chronische laesies (62).

In de patronen I en II is de myelineschede het belangrijkste doelwit van het vernietigingsproces (60). Bij deze patronen werd er sparing van oligodendrocyten in actieve plaques en herpopulatie van inactieve plaques met grote aantallen oligodendrocyten vastgesteld (61).

Patroon I (macrofaag-geassocieerde demyelinisatie) lijkt het meest op de myelinedestructie gezien in ratmodellen van auto-immune encephalomyelitis (EAE). In deze modellen zijn de toxische producten van geactiveerde macrofagen, zoals TNF $\alpha$  of reactieve zuurstofspecie, voornamelijk verantwoordelijk voor de vernietiging van de myeline 'sheets'.

Laesies gelijkaardig met patroon II (antilichaam-gemedieerde demyelinisatie) werden teruggevonden in EAE-modellen die geïnduceerd waren door sensitisering met myeline oligodendrocyt glycoproteïne (MOG). In dit model wordt de demyelinisatie geïntroduceerd door samenwerking tussen encephalitogene T-cellen, verantwoordelijk voor de ontsteking, en demyeliniserende anti-MOG antilichamen (62). Patroon I onderscheidt zich bovendien van alle anderen door de uitgesproken immunoglobuline en complementreactiviteit geassocieerd met de afbraak van myeline aan de rand van de actieve plaque (61).

De patronen III en IV worden gekarakteriseerd door een bijna volledig verlies van oligodendrocyten in zowel actieve als inactieve plaques (61). Tot nu toe werden de patronen III en IV nog niet vastgesteld in experimentele modellen (62).

Distale oligodendroglieopathie-geassocieerde demyelinisatie (patroon III), wordt voornamelijk gevonden in virus-geïnduceerde menselijke ziektes van de witte stof (62).

De mechanismen verantwoordelijk voor de laesies van patroon IV (primaire oligodendrocyt-degeneratie) - deze laesies komen het minst frequent voor in de MS-populatie en worden enkel bij de groep patiënten met PP-MS teruggevonden - zijn nog niet duidelijk.

Ondanks dat de patronen van demyelinisatie heterogeen waren tussen patiënten, waren de laesies van eenzelfde patiënt gelijkaardig. Dit suggereert dat de laesiepatronen geen verschillende stappen zijn van één enkel pathogeen mechanisme, maar verschillende mechanismen aanwezig binnen een deelgroep van MS-patiënten. Een beter begrip van de pathogene mechanismen in demyeliniserende laesies zal belangrijke gevolgen hebben voor de ontwikkeling en toepassing van gepaste therapieën (61).

Schade aan oligodendrocyten wordt waarschijnlijk veroorzaakt door gecombineerde effecten van cytotoxische cellen, zuurstofradicalen, demyeliniserende auto-antilichamen en cytokine geïnduceerde toxiciteit (vb. TNF- $\alpha$ ) (10). Het precieze mechanisme van de oligodendrocyt-

beschadiging is echter nog niet gekend, maar TNF- $\alpha$  werd aangeduid als één van de belangrijkste mediators (29).

Tumor necrosis factor  $\alpha$  is een pleiotroop cytokine, dat een brede reeks van cellulaire effecten kan induceren, van apoptotische celdood tot proliferatie en differentiatie. TNF- $\alpha$  kan oligodendrocyten vernietigen *in vitro* (23), maar TNF- $\alpha$  kan echter ook de proliferatie van oligodendrocyt-progenitorcellen en remyelinisatie *in vivo* bevorderen. Dit duaal effect is afhankelijk van welke van de twee TNF-receptoren, TNFR1 (p55) of TNFR2 (p75) de signalen transduceert (63). Terwijl de p55-receptor apoptotische signalen doorgeeft aan de cel (64) en eerder betrokken is in de initiatie van demyelinisatie (63), oefent de p75-receptor trofische effecten uit op de oligodendrocyt cellijn en medieert anti-inflammatoire immunoregulerende effecten in het CNS (65).

Overleving van oligodendrocyten *in vivo* kan echter bevordert worden door een andere groep van cytokines, neurotrofische cytokines genoemd, waaronder *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) en *leukemia inhibitory factor* (LIF) (66). Deze cytokines hebben anti-inflammatoire of ziekteremmende eigenschappen. Het cytokine CNTF, dat oorspronkelijk geïdentificeerd werd als een overlevingsfactor voor geïsoleerde neuronen, bevordert de differentiatie, maturatie en overleving van oligodendrocyten. Om de rol van endogeen CNTF in inflammatoire demyeliniserende ziekten te onderzoeken, bestudeerden Linker en zijn collega's MOG-geïnduceerde experimentele auto-immune encephalomyelitis (EAE) - het belangrijkste dierenmodel gebruikt in de studie naar MS - in CNTF-deficiënte en wild-type muizen. Uit deze studie bleek dat de ziekte ernstiger was in de CNTF-deficiënte muizen en dat herstel slecht was, met een daling van 60% in het aantal prolifererende oligodendrocytprecursorcellen, en een stijging van meer dan 50% in de snelheid van oligodendrocyt apoptose. Er kan dan ook geconcludeerd worden dat CNTF een belangrijke protectieve factor is in demyeliniserende ziekten van het centrale zenuwstelsel (67). Het multifunctionele cytokine LIF werd oorspronkelijk geïdentificeerd als een factor die de proliferatie inhibeert en de differentiatie van macrofagen induceert. LIF werkt in zowel op neuronen als op een aantal andere celtypen (68). In een studie naar de effecten van LIF in chronische en relapsing-remittende EAE, bleek dat toediening van LIF de ernst van de ziekte verminderde in beide EAE-modellen (66). Meer recent werd in *in vivo* studies aangetoond dat LIF effectief is in het verhinderen van oligodendrocytdood in het muismodel van multiple sclerose, EAE. (69)

Zowel LIF als CNTF signaleren door middel van een heterodimeer receptorcomplex, bestaande uit het glycoproteïne 130 (gp130) en LIF-receptor  $\beta$  (LIFR- $\beta$ ). De interactie van LIF met zijn receptorcomplex kan afhankelijk van celtype en differentiatiestadium resulteren in de activatie van verscheidene signaalwegen: de JAK/STAT, de MAP-kinase en de PI3-kinase pathway. Deze resultaten suggereren dus dat signalering via het gp130-LIFR- $\beta$  complex een belangrijke component kan zijn van het endogene neurobiologische verdedigingsmechanisme tegen inflammatoire CZS-schade (66).

#### **1.4 Probleemstelling**

Multiple Sclerose (MS) is een inflammatoire chronische ziekte van het centrale zenuwstelsel, die gekarakteriseerd wordt door demyelinisatie. Zowel het myeline als de oligodendrocyten zelf kunnen het doelwit zijn in de pathogenese van MS. Het onderzoek naar oligodendrocyten vormt dan ook een belangrijk onderdeel binnen het onderzoek naar MS.

Tot op heden zijn er nog geen proteomica-studies betreffende oligodendrocyten beschreven. Een eerste doelstelling van deze stage is dan ook de inventarisatie van het oligodendrocytproteoom van de rat. Oligodendrocyten worden uit de hersenen van ratten geïsoleerd en in cultuur gebracht, waarna de proteïnen worden geanalyseerd met behulp van twee-dimensionele gelelektroforese (2D-GE) en twee-dimensionele vloeistofchromatografie (2D-LC), beide gekoppeld aan massaspectrometrie.

Een eerdere studie uitgevoerd op het BIOMED toonde aan dat het cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) apoptose veroorzaakt bij mature rat-oligodendrocyten. Door co-incubatie met het neuropoïetische cytokine *leukemia inhibitory factor* (LIF) worden deze oligodendrocyten grotendeels beschermd tegen TNF-geïnduceerde apoptose. In een tweede luik worden oligodendrocyten gestimuleerd met LIF, waarna het proteoom wordt geanalyseerd met hogervermelde technieken. Verschillen in eiwitexpressie in deze culturen worden opgespoord en kunnen leiden tot de identificatie van proteïnen, betrokken bij de protectieve mechanismen van LIF in oligodendrocyten. Op deze manier wordt een proteomica-benadering gehanteerd met als doel de onderliggende mechanismen van oligodendrocytbescherming door LIF verder te ontrafelen.

## 2 Materialen en methoden

### 2.1 Isolatie van oligodendrocyten uit de hersenen van mature ratten

Zes volwassen Wistar ratten werden gedecapiteerd en hersenen werden gedissecteed. De hersenen werden vervolgens mechanisch fijngemalen en verscheidene keren gespoeld met PBS (*phosphate buffered saline*) om reeds zoveel mogelijk rode bloedcellen te verwijderen. Het hersenmateriaal werd vervolgens aangelengd met PBS tot 30ml, waaraan 400 $\mu$ l DNase (10mg/ml) en 4,5ml trypsine (25 $\mu$ g/ml) toegevoegd werden om de cellen te dissociëren. Na een incubatieperiode van 30 min op een roerplaat bij 37°C werd trypsine geïnactiveerd door toevoeging van 10% foetaal kalfserum (FCS). De suspensie werd over een 132 $\mu$ m filter gebracht, aangelengd met PBS tot 400ml en vervolgens uitverdeeld over 8 falcontubes. Deze falcontubes werden gecentrifugeerd gedurende 10 min aan 1200 toeren per minuut (tpm) (Sorvall RT 6000D). Het supernatans werd afgenomen en de pellet werd opgelost in PBS en aangelengd tot een volume van 17,5ml. Deze celsuspensie werd dan overgebracht naar een polycarbonaatbuisje gevuld met 7,5ml Percoll. Na ultracentrifugatie aan 15000 tpm bij 4°C (L8-70 Ultra centrifuge, Beckman), werden er drie lagen onderscheiden: een bovenste myelinelaag, daaronder een gliale cellaag met o.a. astrocyten, microglia en oligodendrocyten, en een onderste rode bloedcellaag. De bovenstaande laag van PBS en myeline werd afgenomen. De gliale cellaag werd overgebracht naar een falcontube en aangelengd tot 50ml met PBS. Vervolgens werden de cellen gecentrifugeerd op kamertemperatuur bij 2000 tpm (Sorvall RT 6000D). Na centrifugatie werd het supernatans afgegoten en werden de pellets geresuspendeerd in 5ml Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) met 5% FCS. De celsuspensie werd aangelengd tot 50ml met DMEM met 5% FCS en gedurende 10 min gecentrifugeerd bij kamertemperatuur aan 1200 tpm (Hettich Universal 2S). Het supernatans werd verwijderd en de pellet werd geresuspendeerd in 5ml DMEM met 5% FCS. Het aantal cellen werd geteld in een Bürker telkamer en de celsuspensie werd uitverdeeld aan 10 miljoen cellen per kweekflesje. Op dag 2 van de isolatieprocedure werd het supernatans in de kweekflesjes overgebracht naar een falcontube. Vervolgens werden de kweekflesjes nagespoeld met 5 ml DMEM met 5% FCS en dit werd bij het afgenomen supernatans gevoegd. Het supernatans werd gecentrifugeerd gedurende 10 min bij kamertemperatuur aan 1200 tpm (Hettich Universal 2S). Het supernatans werd verwijderd en de pellet werd opgelost in DMEM met 5% FCS en overgebracht naar de helft van het aantal kweekflesjes in vergelijking met dag 1. Op deze manier werden de oligodendrocyten selectief aangerijkt door differentiële celadhesie, want in tegenstelling tot astrocyten en microglia hechten de

oligodendrocyten zich nauwelijks vast aan het plastic celkweekmateriaal. Op dag 3 werd het supernatans van het kweekflesje overgebracht naar een falcontube. Na centrifugatie gedurende 10 min aan 1200 tpm (Hettich Universal 2S) werd het supernatans verwijderd en de pellet opgelost in DMEM met 5% FCS. De cellen werden geteld en uitgeplaat in 24 *well* platen, gecoat met poly-L-lysine om de oligodendrocyten te laten hechten, aan een concentratie van 1 à 1,5 miljoen cellen per ml.

## **2.2 Stimulatie van de oligodendrocyten met LIF**

Een deel van de in cultuur gebrachte oligodendrocyten werd na 8-10 dagen in cultuur gestimuleerd met het neuroprotectieve cytokine LIF (15ng/ml). Na een incubatieperiode van ongeveer 48 uur werden de oligodendrocyten geoogst.

## **2.3 Oogsten van de oligodendrocyten**

Eerst werd het medium van de 24 *well* platen afgenomen. De wells werden dan voorzichtig gespoeld met 500µl PBS en nadien werd er aan iedere well 500µl van een 1/10 verdunning van trypsine in PBS toegevoegd. Na een incubatieperiode van 10 min werd er aan iedere well 500µl FCS toegevoegd. De suspensie in de wells werd afgenomen en overgebracht naar een falcontube, die gecentrifugeerd werd gedurende 10 min bij 1200 tpm (Hettich Universal 2S). Het supernatans werd afgenomen en de celpellet werd gespoeld met PBS. Deze celsuspensie werd opnieuw gecentrifugeerd gedurende 10 min aan een snelheid van 1200 tpm (Hettich Universal 2S). Het supernatans werd nadien afgenomen en de celpellet werd bewaard bij -20°C tot aan verder gebruik.

## **2.4 Extractie van eiwitten uit oligodendrocyten**

Om de eiwitten uit de cellen te extraheren werd de celpellet opgelost in lysisbuffer (50mM Tris-Hcl pH 8, 6M ureum, 5mM DTT en 4% CHAPS). Vervolgens werden de cellen gehomogeniseerd met behulp van een rotor-stator. De stalen werden gecentrifugeerd gedurende 10 min aan 13200 tpm (IEC MicroMax). Het supernatans werd na centrifugatie afgenomen en bewaard bij -20°C voor verder gebruik. Om de exacte eiwitconcentratie van de stalen te kennen, werd er een eiwitbepaling uitgevoerd, volgens de methode beschreven door Bradford (63).

## 2.5 Twee-dimensionele gelelektroforese

### 2.5.1 Staalvoorbereiding

Een volume supernatans overeenkomend met 100 $\mu$ g eiwit werd aangebracht op een UltrafreeMC filter (Millipore, Bedford, USA) met een *cut off* massa van 5000 Da en gedurende 20 min gecentrifugeerd bij 13200 tpm (IEC MicroMax) totdat het staalvolume gereduceerd was tot  $\sim$ 30  $\mu$ l. Dit staalvolume werd aangelengd met rehydratiebuffer (7M ureum, 2M thiourem, 4% CHAPS,  $\frac{1}{2}$  tablet protease inhibitoren, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM PMSF) tot een eindvolume van 450 $\mu$ l.

### 2.5.2 Isoelectric focusing

IEF is een elektroforese-methode waarbij proteïnen gescheiden worden op basis van hun isoelektrisch punt (*pI*). Proteïnen zijn namelijk amfotere moleculen; zij dragen ofwel een positieve, negatieve, of een neutrale netto-lading, afhankelijk van de pH van hun omgeving. De *pI* is de specifieke pH waarbij de proteïnen een neutrale netto-lading dragen. Belangrijk bij de IEF-techniek is de aanwezigheid van een pH-gradiënt. In een pH-gradiënt, onder invloed van een elektrisch veld, zal het proteïne bewegen naar de positie in de gradiënt waar zijn netto-lading neutraal is. Wanneer het proteïne verder van zijn *pI*-waarde migreert, verandert de lading en migreert het proteïne terug, dit noemt men het focusserend effect. IEF werd uitgevoerd met het IPGphor systeem (GE Healthcare, Uppsala, Zweden) en geïmmobiliseerde pH-gradiënt (IPG) strips van 24 cm met een lineair pH-gebied van 3-10 (GE Healthcare). De stalen, reeds opgelost in rehydratiebuffer, werden verspreid in 6 striphouders. Vervolgens werden de IPG-strips aangebracht op het staal in de striphouders. Nadien werd er DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) aangebracht om uitdroging van de strips te verhinderen. Gedurende de eerste 12 uren werd een rehydratiestap uitgevoerd bij 20°C. Nadien startte het eigenlijke IEF-programma (1 uur bij 500V, 1 uur bij 1000V en 8 uur en 20 minuten bij 8000V). Na afloop werden de strips gespoeld met milliQ water en bewaard bij -80°C tot aan verder gebruik.

### 2.5.3 Equilibratie van de IPG-strips

De IPG-stips werden verplaatst van -80°C naar -20°C gedurende 30 minuten en vervolgens ontdooid. De IPG-strips werden geïncubeerd met equilibratiebuffer (50mM TRIS-HCl, 6 M ureum, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenolblauw) met 1% DTT gedurende 20 minuten en vervolgens met equilibratiebuffer met 4,25% iodacetamide gedurende 20 minuten. Nadien

werden de strips gespoeld met 1x SDS elektroforesebuffer (25mM Tris, 192 mM glycine en 0,1% SDS pH 8,3).

#### **2.5.4 SDS-PAGE**

SDS-PAGE is een elektroforese-methode die gebruikt wordt voor de scheiding van polypeptiden op basis van hun moleculaire massa. SDS-PAGE werd uitgevoerd met behulp van de EttanDALTsix unit (GE Healthcare). De IPG-strips werden op de gelen (12,5% T) geplaatst en overgoten met een vloeibare agarose-oplossing (0,5% agarose in 25mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glycine, 0,1% SDS en 0,002% bromofenolblauw). Nadat de agarose gestold was, werd de cassette aangebracht in het elektroforesetoestel en werd de 1x SDS-elektroforesebuffer aangebracht in de onderste bufferkamer, daarna werd de bovenste bufferkamer gevuld met 2x SDS elektroforesebuffer (50mM Tris, 384 mM glycine en 0,2% SDS pH 8,3). Vervolgens werd de proteïnetransfer (30 minuten bij 120 mA) gestart, waarna de eigenlijke scheiding van de proteïnen bij 240mA werd uitgevoerd totdat de bromofenolblauw het einde van de gel bereikte.

#### **2.5.5 Zilverkleuring**

Na afloop van de elektroforese werden de gelen gekleurd met zilvernitraat om de eiwitspots zichtbaar te maken volgens de methode beschreven door Shevchenko (ref.). Allereerst werden de gelen tussen de glazen platen verwijderd en overnacht geïncubeerd in fixatieoplossing (50% methanol/ 5% azijnzuur). Vervolgens werden de gelen gewassen met 50% methanol en water elk gedurende 10 minuten. Hierna werden de gelen geïncubeerd in 0,02% natriumthiosulfaat gedurende 3 minuten. De gelen werden vervolgens twee maal gewassen in MilliQ water. Na deze wasstap werden de gelen in de 0,1% zilvernitraat-kleuroplossing geplaatst gedurende 20 minuten. Vervolgens werden de gelen twee maal gewassen in MilliQ water om nadien in de ontwikkelingsoplossing (0,04% formaline in 2% natriumcarbonaat) geplaatst te worden. De ontwikkeling werd gestopt door de gelen over te brengen in een 5% azijnzuuroplossing. De gelen werden bewaard in MilliQ water bij 4°C en ingescand met een digitale scanner (Image scanner, UTA III; GE Healthcare). De eiwitpatronen op de gelen werden vergeleken met behulp van de Z3-software V3.0 (Compugen Ltd, Tel Aviv, Israël).

#### **2.5.6 Prikken en digestie van de eiwitspots**

Om het detecteren van eiwitten mogelijk te maken met behulp van massaspectrometrie is het noodzakelijk de eiwitten te splitsen tot peptiden met behulp van een enzyme. De spots werden



manueel verwijderd, gewassen met acetonitrile en gedroogd met behulp van een vacuümcentrifuge. Aan de gedroogde gelstukjes werd een oplossing van 10mM DTT in 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  toegevoegd. Na een incubatieperiode van 1 uur bij  $56^\circ\text{C}$  werd het supernatans verwijderd en werden de gelstukjes geplaatst in een oplossing van 55mM iodacetamide in 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . De gelstukjes werden geïncubeerd gedurende 45 minuten bij kamertemperatuur, waarna het supernatans afgenomen werd. Vervolgens volgde een wasstap van 10 minuten met 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  en nadien een dehydratiestap met acetonitrile. Deze wasstap en dehydratiestap werden herhaald en de gelstukjes werden gedroogd in de vacuümcentrifuge. Na het drogen van de gelstukjes volgde de eigenlijke digestie door middel van toevoeging van de digestiebuffer met trypsine (12,5 ng trypsine/ $\mu\text{l}$  133mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). De gelstukjes werden vervolgens 45 minuten geïncubeerd in een ijsbad en het supernatans werd afgenomen. Digestiebuffer (50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) werd toegevoegd en de gelstukjes werden overnacht bij  $37^\circ\text{C}$  geplaatst. Na deze incubatieperiode werd het supernatans afgenomen en bewaard. Aan de gelstukjes werd 20mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  toegevoegd, waarna ze 20 minuten gesoniceerd werden. Opnieuw werd het supernatans afgenomen en bewaard. Nadien werden de gelstukjes geïncubeerd in een oplossing van 5% mierzuur in 50% acetonitrile en gesoniceerd gedurende 20 minuten. Het supernatans werd afgenomen en bewaard. Deze laatste stappen werden 2 keer herhaald. Het volledige afgenomen supernatans werd bewaard bij  $-20^\circ\text{C}$  tot aan de massaspectrometrische analyse. Net voor de massaspectrometrische analyse werd het supernatans drooggedampt, opgelost in 15 $\mu\text{l}$  interne standaard-oplossing (2 mg cortisone in 20 ml acetonitrile, vervolgens 25000 keer verder verdunnen in solvent B (100 mM azijnzuur in water)) en 5 minuten ultrasoon gezet.

## **2.6 Identificatie van de proteïnen met behulp van massaspectrometrie**

De peptidenfragmenten, afkomstig van de digestie van de eiwitspots, werden geïdentificeerd met behulp van *high performance liquid chromatography* (HPLC) gekoppeld aan massaspectrometrie gebruik makende van het LCQ classic toestel (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA).

Het staal werd in de autosampler geplaatst en de massaspectrometer werd gestart vanaf de Sequence Setup Page van Xcalibur. Vervolgens kreeg de HPLC-pomp (L 6200 intelligent pomp, Merck Hitachi) een startsignaal om te pompen. Door gedurende 5 minuten te pompen met solvent B werd het mengsel van peptidenfragmenten eerst aangebracht op een C18-prekolom (2cm lengte, 100 $\mu\text{m}$  interne diameter, Nanoseparations, Nieuwkoop, Nederland), met als doel het staal te concentreren en storende elementen, zoals bijvoorbeeld zouten, te

verwijderen. Vervolgens werd er gestart met een elutiegradiënt (tabel 1), waardoor het staal overgedragen werd naar de analytische kolom (18 cm lengte, 50µm ID, C<sub>18</sub>, Nanoseparations). Beide kolommen maken gebruik van het principe van *reverse-phase* HPLC, waarbij de peptiden gebonden worden door middel van hydrofobe interacties met de stationaire C<sub>18</sub>-fase. Een stijgende gradiënt van acetonitrile kan dan gebruikt worden om de gebonden peptiden te elueren. Peptiden worden geëluëerd in dalende mate van polariteit, de meest polaire peptiden zullen dus als eerste in het eluaat terechtkomen en de minst polaire peptiden als laatste. Op deze manier worden de peptiden dus eerst gescheiden op basis van hydrofobiciteit vooraleer ze geanalyseerd worden met de massaspectrometer.

**Tabel 1:** Gradiënt doorlopen bij LC-ESI-MS/MS

Tijd	Solvent A*	Solvent B**	Flow (µl/min)
0 min	0 %	100 %	8
5 min	0 %	100 %	8
5.1 min	5 %	95 %	500
60 min	60%	40 %	500
60.1 min	0 %	100 %	500
69.5 min	0 %	100 %	500
69.6 min	0 %	100 %	8

\*Solvent A: 100 mM azijnzuur in acetonitrile

\*\*Solvent B: 100 mM azijnzuur in water

Alle massaspectrometers bestaan uit drie hoofdcomponenten: de ionenbron, de massa-analysator en de detector. In deze experimenten werd er gebruik gemaakt van electrospray ionisatie (ESI) als ionisatie-methode, waarbij het staal in vloeibare fase omgezet wordt naar ionen in gasfase. Het staal wordt door een fijne metalen capillair gepompt, waarover een groot potentiaal-verschil aangelegd wordt, resulterend in een elektrostatische spray van ionen. Deze ionen passeren een capillair met een temperatuur van 150°C, zodat de ionen in gasfase blijven en niet kunnen neerslaan, en komen vervolgens terecht in de ionenval. Hier bewegen de ionen, onder invloed van een elektrisch veld, in stabiele banen, die afhankelijk zijn van de massa en de lading van het ion. Door vervolgens het elektrisch veld gradueel aan te passen, worden de ionbanen onstabiel, waardoor de ionen opeenvolgend van lage m/z (verhouding van massa tot lading) naar hoge m/z uit de ionenval naar de detector gestuurd worden. Op deze manier wordt een *fullscan* massaspectrum bekomen. Met behulp van een software-programma, Xcalibur, werden de drie meest intense precursorionen, de zogenaamde parentionen, geselecteerd. Deze parentionen werden door toevoeging van extra energie verder

gefragmenteerd in de ionenval in dochterionen. Wanneer peptiden gefragmenteerd worden, kunnen er twee complementaire fragmenten ontstaan. Wanneer de lading achterblijft op het N-terminaal gedeelte van het gesplitste peptide spreken we van een b-ion, en wanneer de lading achterblijft op het C-terminaal gedeelte van het peptide spreken we van een y-ion. Door de parentionen dus verder te fragmenteren bekomen we een MS/MS-spectrum, waaruit de b- en y-ionen van het parention afgeleid kunnen worden. Door het verschil in m/z-waarde te berekenen tussen opeenvolgende b-of y-ionen, kan de peptidensequentie bepaald worden. De MS/MS-data werden verwerkt door het software-programma Sequest versie 27 binnen BioWorks 3.0 (Thermo Electron Corporation) in combinatie met de databank Swissprot, subgroep Rodentia. Deze databank bestaat uit proteïnen van knaagdieren en deze proteïnen zullen *in silico* getrypsiniseerd worden. Vervolgens koppelt Sequest de experimenteel bekomen MS/MS-spectra aan de theoretische spectra en geeft met een correlatiecoëfficiënt (Xcorr) aan in hoeverre de spectra overeenkomen. Naast Sequest, werd er ook gebruik gemaakt van het programma Mascot (Matrix Science), dat hetzelfde doel heeft, maar met andere algoritmen werkt en de data aanbiedt aan een andere internetdatabank, namelijk NCBI, subgroep Rodentia. Bij beide programma's werd er één gemiste klieving toegestaan en werden cysteïne-carbamidomethylatie en oxidatie van methionine, histidine en tryptofaan opgegeven als statische en dynamische chemische modificaties, respectievelijk.

## **2.7 Twee-dimensionele vloeistofchromatografie (2D-LC)**

### **2.7.1 Staalvoorbereiding**

Oligodendrocyten werden geïsoleerd uit de hersenen van volwassen Wistar ratten en in kweek gebracht, zoals voorheen beschreven (2.1). Na 10 dagen in cultuur werden de oligodendrocyten gelyseerd en werden de proteïnen geëxtraheerd (zie paragraaf 2.3). Ter voorbereiding van de vloeistofchromatografie werd 40µg van de geëxtraheerde proteïnen geïncubeerd met denaturatiebuffer (50mM Tris-Hcl pH 8, 6M ureum, 5mM DTT, 4% CHAPS) gedurende 1 uur bij 56°C. Vervolgens werd er een oplossing van 30mM iodacetamide in 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> met pH 7,8 toegevoegd. Na een incubatieperiode van 45 minuten in het donker op kamertemperatuur, werd alles over een UltrafreeMC filter gebracht met een *cut off* massa van 5000 Da en gecentrifugeerd bij 13200 tpm. Vervolgens werden deze filters 4 maal gespoeld met 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 7,8. Aan het retendaat werd trypsine in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (2µg/100µl) toegevoegd. Na incubatie overnacht bij 37°C werd er methanol toegevoegd en werden de stalen drooggedampt in de vacuümcentrifuge. De stalen werden

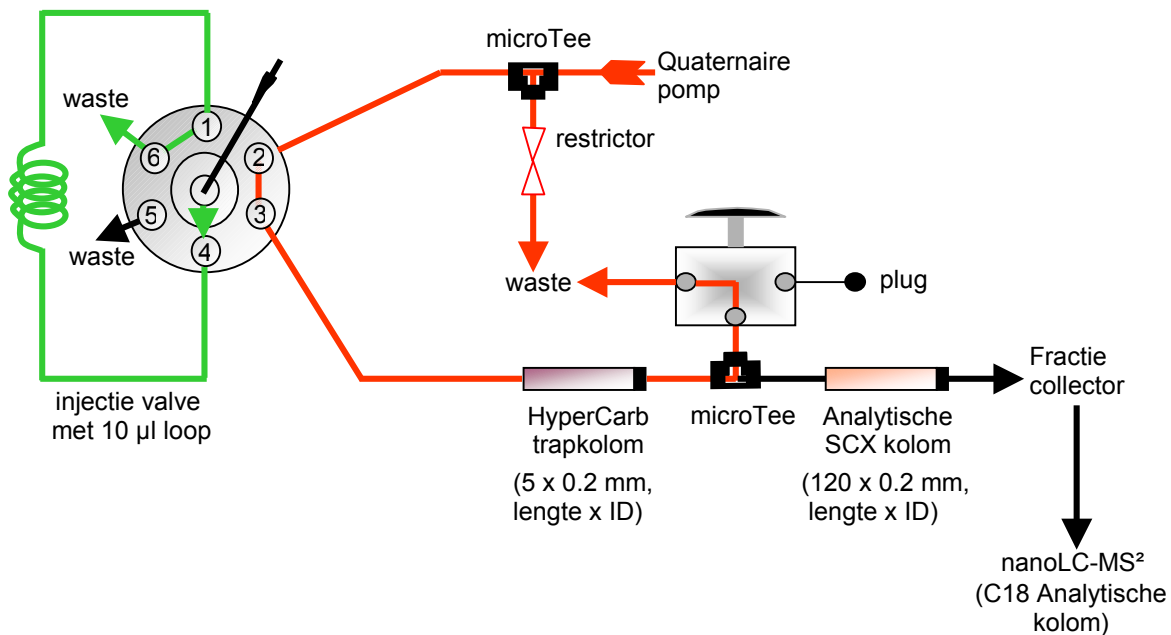
opgelost in 25µl oplossing A (0,5% azijnzuur in water) en vervolgens gebruikt voor de 2D-LC.

### 2.7.2 Vloeistofchromatografie

De *input flow* werd geleverd door een HP 1050 pomp (Hewlett Packard) en bedroeg 0,08 ml/min en 0,4 ml over de trapkolom en over het systeem (trapkolom en analytische kolom) (figuur 4), respectievelijk. Bij het starten werd er door de pomp 100% oplossing A (0,5% azijnzuur in water) gepompt. De *output flow* enkel over de trapkolom gemeten met de naaldvalve open bedroeg ~4µl/min. Ongeveer 10µl staal werd in de loop geïnjecteerd en op tijdstip nul werd de injectorkraan in de inject-positie geplaatst, waardoor het staal op de HyberCarb trapkolom (7µm partikelgrootte, 5 mm lengte, 0,2 mm interne diameter) (Nanoseparations) kon binden. De doorstroom werd veiligheidshalve opgevangen. De trapkolom had tot doel het staal te concentreren en te ontzouten. Na 5 minuten werd de naaldvalve toegedraaid en werd de injectorkraan terug in de *load*-positie gezet, zodat de *flow* over het hele systeem ging. De *input flow* werd zo ingesteld dat deze op dit tijdstip automatisch verhoogd werd tot 0,4 ml/min. De *output flow* gemeten over het hele systeem bedroeg ~2µl/min. Vervolgens werd de loop gevuld met de transfervloeistof (70% acetonitrile, 0,5% azijnzuur, 29,5% Milli Q). Op het tijdstip van 6,5 min werd de injectorkraan gedurende 30 seconden in de inject-positie geplaatst, waardoor de transfervloeistof over de kolom gebracht werd. Hierdoor werden de peptiden van de trapkolom naar de PolySULFOETHYL Aspartamide kolom (5µm partikelgrootte, 12 cm lengte, 0,2 mm interne diameter) (Nanoseparations) overgebracht. Deze *Strong Cation Exchange* (SCX)-kolom is negatief geladen en zal de positief geladen peptiden vasthouden. Op tijdstip 7 min werd de injectorkraan terug in de *load*-positie gedraaid en werd er gestart met het pompen van een lineaire zoutgradiënt (6%/min) vertrekkend van 100% oplossing A naar 100% oplossing B (250mM KCl, 35% acetonitrile en 0,5% azijnzuur) en vervolgens naar 100% oplossing C (500mM KCl, 35% acetonitrile en 0,5% azijnzuur). Door toevoeging van deze stijgende zoutconcentraties zullen de peptiden geëluëerd worden van de kolom en gescheiden worden naargelang hun lading. Op tijdstip 7 min werd de *output flow* opgevangen in fracties van 1 min in microvials.

Aan de opgevangen fracties werd 20µl van een cortisone-werkoplossing (2 mg cortisone in 20 ml acetonitrile, dit 25000 keer verder verdunnen in solvent B) toegevoegd. Cortisone werd gebruikt als interne standaard om massaspectrometrie te volgen. Elke opgevangen fractie werd vervolgens geanalyseerd met behulp van LC-ESI-MS/MS zoals voorheen beschreven

(zie 2.7), met één modificatie, namelijk de lineaire gradiënt van 5% tot 60% v/v acetonitrile in 100mM azijnzuur werd opgebouwd gedurende 120 min i.p.v. 60 min.



**Figuur 4: Schematische weergave van de twee-dimensionele vloeistofchromatografie**

Het peptidenstaal werd geladen via een injectieloop en op t=0min overgebracht naar de HyperCarb trapkolom. Op t=6,5min werd de transfervloeistof geïnjecteerd, waardoor het staal overgebracht werd naar de analytische SCX-kolom. De petiden werden vervolgens geëluëerd met een lineaire gradiënt van KCl startend van 100% oplossing A naar 100% oplossing B, naar vervolgens 100% oplossing C. De peptidenfracties werden opgevangen en geanalyseerd met behulp van nano-LC-ESI-MS/MS.

**2.8 Western Blot**

De proteïnen, geëxtraheerd uit de oligodendrocyten (beschreven onder 2.4), werden onderworpen aan Western Blot. In een eerste stap werden de proteïnen elektroforetisch gescheiden op basis van hun moleculair gewicht. Voor de 1-dimensionele SDS-PAGE (elektroforese-eenheid Biorad) werd gebruik gemaakt van een 12% *resolving* gel en een 4% *stacking* gel. Alvorens de stalen te laden, werd een hoeveelheid staal, overeenkomend met 4 µg eiwit, ½ verdund in reducerende staalbuffer (4% SDS-PAGE, 12% glycerol, 2% β-mercaptoethanol, 50mM Tris pH 6,8) en vervolgens 5 minuten opgekookt. Naast de stalen werd er ook een merker (Precision plus protein™ dual color standars, Biorad, Hercules, Californië) geladen. Na het laden van de stalen werd er gedurende 55 minuten een spanningsveld van 200V aangelegd over de gelen door middel van een stroombron (Power Doc 1000, Biorad). Na de elektroforese werden de eiwitten via elektroblotting van de gel naar

een polyvinylideen difluoride (PVDF)-membraan (Millipore) overgebracht. De vezeldoeken, filtreerpapieren en gel werden gedurende 15 minuten geweekt in transferbuffer (25mM Tris, 192 mM glycine pH 8,3). Vervolgens werd de *gel sandwich* gevormd door op 1 zijde van de cassette een vezeldoek te plaatsen en hierop een filtreerpapier. De gel werd op het filtreerpapier aangebracht en daarop het PVDF-membraan gedrenkt in methanol, waarna opnieuw een filtreerpapier en een laatste vezeldoek volgde. De cassette werd samen met een *cooling unit* in transferbuffer gebracht tussen twee elektroden (Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell, Biorad). De elektroblotting vond plaats gedurende 1 uur bij 100V en 350mA. Na afloop werd de bloteenheid gedemonteerd en werd de blot gedurende anderhalf uur geïncubeerd in *blocking* buffer (2% melkpoeder in PBS pH 7,2). Vervolgens werd het membraan drie keer gedurende 5 minuten gewassen met wasbuffer (0,05% Tween-20, PBS pH 7,2). Het membraan werd gedurende 1 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd met het primaire antilichaam, anti-stathmine (Calbiochem, USA) 1/5000 verdunt in *blocking* buffer. Nadien werd het membraan opnieuw drie keer gedurende 5 minuten gewassen met wasbuffer. Het membraan werd gedurende 1 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd met een 1/2000 verdunning van het peroxidase-geconjugeerd secundair antilichaam, *polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins* (DakoCytomation, Denemarken), in *blocking* buffer, waarna de wasstap herhaald werd. Tenslotte werd het membraan in de DAB-kleuroplossing (50mM natriumacetaat pH 5,0, 0,2% DAB, 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) geplaatst. De kleuring werd gestopt door te spoelen met MilliQ water.

## **2.9 Immunokleuring van paraffinecoupes**

Een immunokleuring werd uitgevoerd op paraffinecoupes van hersenen van zowel een controlerat als een EAE-rat. Het gebruikte hersenmateriaal was afkomstig uit het hersengebied net boven de hersenstam en werd vooraf opgesneden met de  $\mu$ toon met een dikte van 6 $\mu$ m en op draagglasjes aangebracht. De immunokleuring had tot doel de gebieden te lokaliseren waar stathmine tot expressie gebracht wordt. Eerst werden de coupes gedeparaffineerd door een incubatie in 2 xyleenbaden. Hierna volgde een incubatie gedurende 2 à 3 min in 2 baden met 100% ethanol. Nadien werd er gedurende 20 min op kamertemperatuur geblokt met *blocking* buffer (methanol, 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) om het peroxidase aanwezig in de coupes te neutraliseren. Na het blokken werd er gedurende 4 à 5 minuten gespoeld met PBS, gevolgd door het markeren van het weefsel met behulp van een PAP-pen. Vervolgens werd er een tweede keer geblokt door op elk weefsel een oplossing van 10%

ratserum aan te brengen gedurende 20 min, met als doel specifieke binding te vermijden. Nadien werd er gedurende anderhalf uur geïncubeerd met het primair antilichaam, stathmine, 1/500, 1/1000 of 1/2000 verdund in een oplossing van 10% ratserum in PBS. Na incubatie met het primair antilichaam werden de weefsels gedurende 2 keer 10 min gespoeld met PBS, gevolgd door een incubatieperiode van 1 uur met het secundair antilichaam, peroxidase-geconjugeerd polyklonaal geit anti-konijn IgG (DakoCytomation). Het secundair antilichaam werd hiervoor 1/100 verdund in een oplossing van 0,1% BSA in PBS. Na incubatie met het secundair antilichaam werd er opnieuw gedurende 2 keer 10 min gespoeld met PBS, waarna de weefsels gekleurd werden met DAB gedurende 2 min. De kleuring werd gestopt in PBS en de weefsels werden vervolgens tegengekleurd met haematoxyline gedurende 30 sec. De weefsels werden nadien grondig gespoeld met kraantjeswater en gemonteerd met behulp van stijgende alcoholbaden (70% ethanol, 85% ethanol, 95% ethanol, 100% ethanol, xyleen) en entellan (Merck). De glaasjes werden vervolgens microscopisch geanalyseerd.

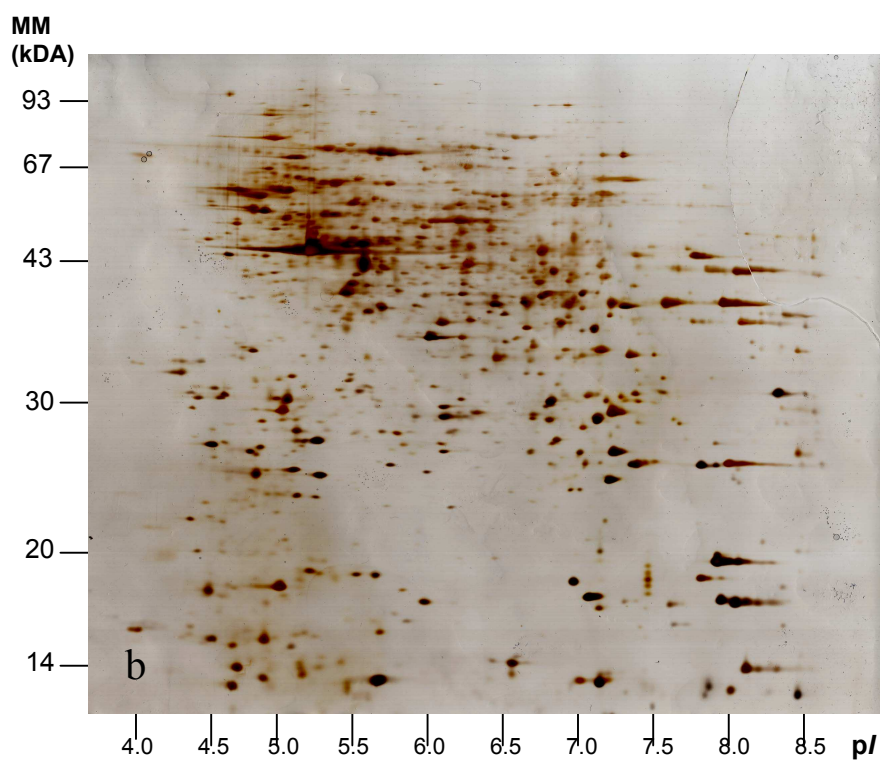
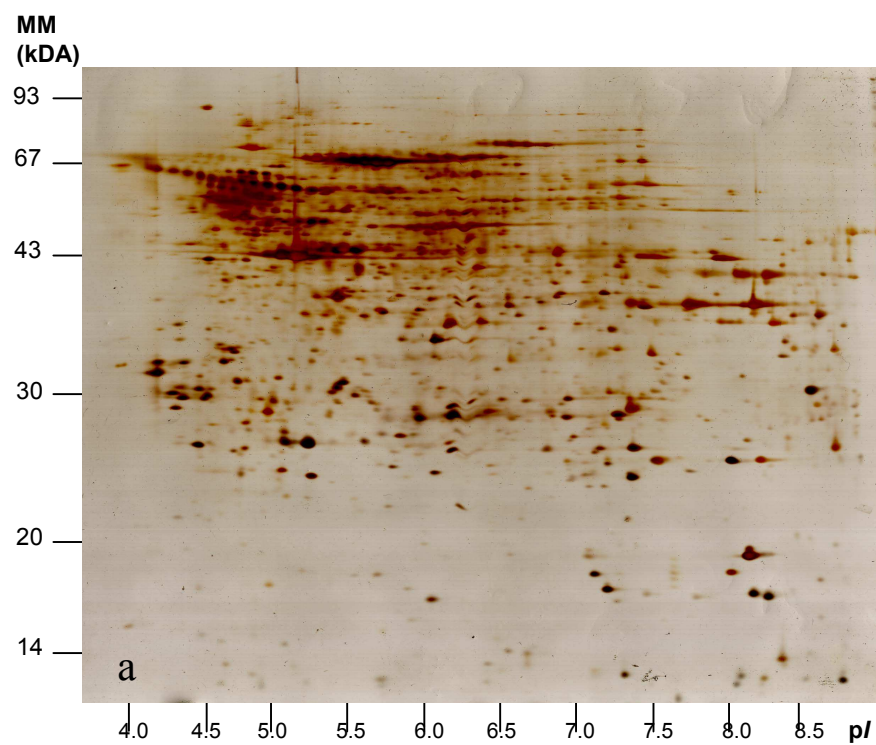
### **3 Resultaten**

Een eerste doelstelling van dit thesisonderzoek was de inventarisatie van het oligodendrocytproteoom van de rat. Oligodendrocyten werden geanalyseerd met behulp van twee-dimensionele gelelektroforese (2D-GE) en twee-dimensionele vloeistofchromatografie (2D-LC), beiden gekoppeld aan massaspectrometrie. In een tweede luik werden oligodendrocyten gestimuleerd met LIF, waarna het proteoom werd geanalyseerd met hogervermelde technieken. Verschillen in eiwitexpressie in de culturen opgekweekt in enkel groeimedium of in groeimedium gesupplementeerd met LIF, werden opgespoord en kunnen leiden tot de identificatie van proteïnen betrokken bij de protectieve mechanismen van LIF in oligodendrocyten.

#### **3.1 2D-GE gevolgd door massaspectrometrische analyse**

Culturen van rat-oligodendrocyten werden verkregen door hersenen te dissecteren uit mature ratten. Uit deze hersenen werden de oligodendrocyten geïsoleerd en in kweek gebracht. Per isolatie werden er 6 volwassen Wistar ratten geofferd en in totaal werden er 9 isolaties uitgevoerd. Gedurende 4 isolaties werd de helft van het aantal oligodendrocyten op dag 8 van de cultuur gestimuleerd met LIF. Op dag 10 van de kweek werden de oligodendrocyten gelyseerd en werden de proteïnen geëxtraheerd. De eiwitconcentratie werd bepaald aan de hand van de methode van Bradford. Gemiddeld leverden de isolaties slechts  $7 \cdot 10^6$  cellen op, waardoor slechts weinig proteïnen konden geïsoleerd worden. Voor een 2D-GE-experiment was per gel een eiwithoeveelheid van 100  $\mu\text{g}$  vereist. Er werden 7 gellen gelopen met stalen van rat-oligodendrocyten opgekweekt in enkel groeimedium, waarvan figuur 5a een voorbeeld toont, en 3 gellen werden gelopen met stalen van rat-oligodendrocyten opgekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF, waarvan een voorbeeld weergegeven wordt in figuur 5b.



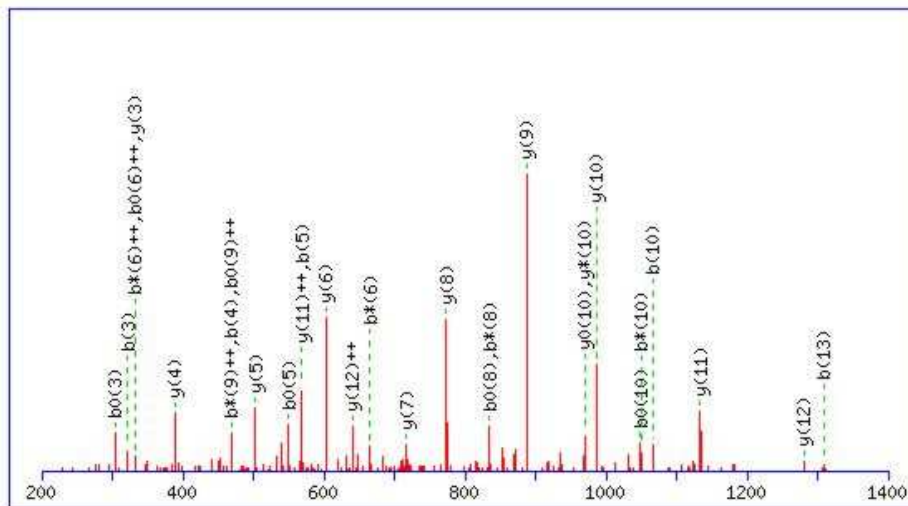


**Figuur 5: Het oligodendrocytproteoom van de rat**

Volwassen Wistar ratten werden gedecapiteerd en hersenen werden geïsoleerd. Uit deze hersenen werden vervolgens de oligodendrocyten geïsoleerd en in cultuur gebracht gedurende 10 dagen (a). Een deel van de in cultuur gebrachte oligodendrocyten werd na 8 dagen behandeld met LIF en vervolgens na 48 uren gelyseerd (b). De proteïnen werden geëxtraheerd, gevolgd door een eiwitbepaling. Honderd  $\mu\text{g}$  eiwit werd onderworpen aan IEF, gebruik makend van lineaire IPG-strips met een pH-gebied van 3 tot 10, gevolgd door SDS-PAGE en zilverkleuring.

Om een proteoomkaart van de oligodendrocyt van de rat op te stellen, werden de verschillende eiwitspots uit de gel verwijderd en onderworpen aan een trypsinedigestie, gevolgd door massaspectrometrische analyse. In totaal werden er een 300-tal spots geprikt en onderworpen aan digestie, gevolgd door massaspectrometrische analyse.

Na het bekomen van een *fullscan* massaspectrum, werden softwarematig de drie meest intense precursorionen, de zogenaamde parentionen, geselecteerd. Deze parentionen werden door toevoeging van extra energie verder gefragmenteerd in de ionenval in dochterionen. Door het verschil in *m/z*-waarde te berekenen tussen opeenvolgende b- of y-ionen uit het MS/MS-spectrum, kan de peptidensequentie bepaald worden. De bekomen b- en y-ionen uit het digest van spot 7 worden ter illustratie weergegeven in figuur 6.



#	b	b <sup>++</sup>	b <sup>*</sup>	b <sup>*++</sup>	b <sup>0</sup>	b <sup>0++</sup>	Seq.	y	y <sup>++</sup>	y <sup>*</sup>	y <sup>*++</sup>	y <sup>0</sup>	y <sup>0++</sup>	#
1	88.04	44.52			70.03	35.52	S							14
2	175.07	88.04			157.06	79.03	S	1367.73	684.37	1350.71	675.86	1349.72	675.36	13
3	<b>322.14</b>	161.57			<b>304.13</b>	152.57	F	<b>1280.70</b>	<b>640.85</b>	1263.67	632.34	1262.69	631.85	12
4	<b>469.21</b>	235.11			451.20	226.10	F	<b>1133.63</b>	<b>567.32</b>	1116.60	558.81	1115.62	558.31	11
5	<b>568.28</b>	284.64			<b>550.27</b>	275.64	V	<b>986.56</b>	493.79	<b>969.54</b>	485.27	<b>968.55</b>	484.78	10
6	682.32	341.66	<b>665.29</b>	<b>333.15</b>	664.31	<b>332.66</b>	N	<b>887.49</b>	444.25	870.47	435.74	869.48	435.25	9
7	739.34	370.17	722.31	361.66	721.33	361.17	G	<b>773.45</b>	387.23	756.43	378.72	755.44	378.22	8
8	852.43	426.72	<b>835.40</b>	418.20	<b>834.41</b>	417.71	L	<b>716.43</b>	358.72	699.40	350.21	698.42	349.71	7
9	953.47	477.24	936.45	<b>468.73</b>	935.46	<b>468.23</b>	T	<b>603.35</b>	302.18	586.32	293.66	585.34	293.17	6
10	<b>1066.56</b>	533.78	<b>1049.53</b>	525.27	<b>1048.55</b>	524.78	L	<b>502.30</b>	251.65	485.27	243.14			5
11	1123.58	562.29	1106.55	553.78	1105.57	553.29	G	<b>389.21</b>	195.11	372.19	186.60			4
12	1180.60	590.80	1163.57	582.29	1162.59	581.80	G	<b>332.19</b>	166.60	315.17	158.09			3
13	<b>1308.66</b>	654.83	1291.63	646.32	1290.65	645.83	Q	275.17	138.09	258.14	129.58			2
14							K	147.11	74.06	130.09	65.55			1

**Figuur 6: Rapport van Mascot van de MS/MS-fragmentatie van de peptidensequentie SSFFVNGTLTGGQK van het eiwit profiline 1 uit spot 7 (figuur 1 bijlage)**

De bekomen b- en y-ionen uit het digest van spot 7 worden weergegeven in het rood.

De MS/MS-data werden door het softwareprogramma TurboSequest aangeboden aan een databank op het internet, namelijk Swissprot, subgroep Rodentia. Vervolgens koppelt Sequest de experimenteel bekomen MS/MS-spectra aan de theoretische spectra, gegenereerd door *in silico* trypsinisatie van de proteïnen in de databank, en geeft met een correlatiecoëfficiënt (Xcorr) aan in hoeverre de spectra overeenkomen. Met de parameter  $\Delta$ CN geeft Sequest het verschil aan in Xcorr tussen de primaire en secundaire theoretische spectra met andere woorden  $\Delta$ CN geeft aan hoever de topscore verwijderd is van de rest van de spectra. Een voorbeeld van een Sequest-rapport wordt weergegeven in figuur 7. Enkel peptidensequenties waarvoor Xcorr- en  $\Delta$ CN-waarden voldeden aan de vooropgestelde eisen (Xcorr  $\geq 1,8$ ;  $\geq 2,5$ ;  $\geq 3,5$  voor respectievelijk één-, twee- en driewaardig geladen ionen en  $\Delta$ CN > 0,1) werden verder meegenomen voor de identificatie van de proteïnen.

```

1_A|IPI:IP100231358.4|SWISS-PROT:P62963|REFSEQ NP:NP_071956|ENSEMBL:ENSRNOP00000005_90 28|E:4.9e7|awq:1.8e6 {28,0,0,0,0}
649 4.0e6 1314 2 -1.8 1641.5 4.96 0.52 1888 1 21/26 -- ipi:ipi00231358 (R)DSLQDGEFTMDLR
643 3.2e6 1310 2 -1.2 1641.0 4.74 0.52 1861 1 21/26 -- ipi:ipi00231358 (R)DSLQDGEFTMDLR
562 1.4e6 1226 2 -0.9 1656.6 4.33 0.47 1672 1 21/26 -- ipi:ipi00231358 (R)DSLQDGEFTM*DLR
547 3.1e6 1215 2 -1.1 1455.9 4.19 0.59 1313 1 20/26 -- ipi:ipi00231358 (R)SSFFVNGLTLGGQK
551 5.8e6 1218 2 -2.7 1457.4 4.06 0.54 1148 1 20/26 -- ipi:ipi00231358 (R)SSFFVNGLTLGGQK
671 3.1e5 1330 2 -2.5 1642.3 4.05 0.50 1444 1 20/26 -- ipi:ipi00231358 (R)DSLQDGEFTMDLR
655 6.7e5 1318 2 -1.1 1656.8 3.76 0.44 1159 1 19/26 -- ipi:ipi00231358 (R)DSLQDGEFTM*DLR
651 8.0e5 1315 2 -2.1 1657.8 3.66 0.48 1497 1 20/26 -- ipi:ipi00231358 (R)DSLQDGEFTM*DLR
629 9.3e5 1299 2 -2.2 1619.1 3.51 0.46 645 1 20/30 -- ipi:ipi00231358 (K)TFVSITPAEVCVGVGK
633 2.7e6 1302 2 -1.4 1618.3 3.47 0.47 668 1 20/30 -- ipi:ipi00231358 (K)TFVSITPAEVCVGVGK
570 1.1e6 1234 2 -2.2 1457.0 3.17 0.42 645 1 18/26 -- ipi:ipi00231358 (R)SSFFVNGLTLGGQK
    
```

Z                      XCorr dCN                                      Sequence

**Figuur 7: Rapport van Sequest voor het eiwit profiline**

In dit rapport worden volgende parameters weergegeven voor het eiwit profiline: Z: lading; XCorr: geeft aan hoe de gevonden spectra overeenkomen met de theoretische spectra; dCN: het verschil tussen de XCorrs van de primaire en secundaire theoretische spectra; Sequence: peptidensequentie van de primaire overeenkomst (Thermo electron corporation, 2004)

Naast Sequest werd er ook gebruik gemaakt van het programma Mascot, dat hetzelfde doel heeft, maar met andere algoritmen werkt. Mascot zal de MS/MS-data aanbieden aan de NCBI-databank, subgroep Rodentia, op het internet. Als parameter werd er bij Mascot naar de p-waarde gekeken, enkel de peptiden met p<0,05 werden als significant beschouwd. Een voorbeeld van een rapport van Mascot voor het eiwit profiline wordt weergegeven in figuur 8.

In tabel A van de bijlage worden alle geïdentificeerde proteïnen, bekomen via toepassing van bovenstaande methode, weergegeven. De spotnummers in deze tabel komen overeen met de respectievelijke spotnummers in figuur 19 van de bijlage.

1. [gi|42476144](#) Mass: 15119 Score: 506 Queries matched: 29  
 profilin 1 [Rattus norvegicus]  
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">185</a>	874.72	873.71	873.54	0.18	0	27	4.7	1	TLVLLMGK
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">186</a>	874.73	873.72	873.54	0.19	0	(27)	4.9	1	TLVLLMGK
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">216</a>	512.93	1023.85	1022.55	1.30	0	(29)	2.5	1	EGVHGGLINK
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">217</a>	513.67	1025.33	1022.55	2.78	0	39	0.22	1	EGVHGGLINK
<a href="#">254</a>	385.49	1153.44	1150.65	2.80	1	16	62	6	EGVHGGLINKK

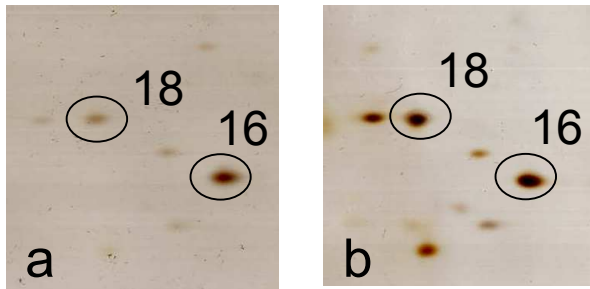
**Figuur 8: Rapport van Mascot voor het eiwit profilin**

De eerste lijn bevat de accesiecode, het moleculair gewicht van het proteïne (mass), de Mascot-score voor het proteïne en het aantal gekoppelde peptiden. Dit wordt gevolgd door een beschrijving van het proteïne, in dit geval profilin 1. Vervolgens staat een tabel weergegeven met een opsomming van de gekoppelde peptiden. Query: experimentele m/z-waarde; Mr(expt): experimentele m/z-waarde getransformeerd naar de relatieve moleculaire massa; Mr(calc): de berekende relatieve moleculaire massa van het gekoppelde peptide; Delta: verschil tussen de experimentele en berekende massa's ; Miss: aantal gemiste enzym-splitsingsplaatsen; Score: ionenscore; Expect: expectatiewaarde voor het gekoppelde peptide; Rank: ranglijst van de gekoppelde ionen Peptide: sequentie van het peptide.

Een tweede doelstelling van dit thesisonderzoek was een vergelijkende analyse van het proteoom van oligodendrocyten opgekweekt in enkel groeimedium en het proteoom van oligodendrocyten opgekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF. Op deze manier kunnen kandidaat-proteïnen, betrokken in de beschermende werking van LIF geïdentificeerd worden. Rat-oligodendrocyten werden geïsoleerd en in cultuur gebracht. In totaal werden er 9 isolaties uitgevoerd en tijdens 4 isolaties werd de helft van het aantal oligodendrocyten op dag 8 van de cultuur met LIF gestimuleerd. Op dag 10 van de kweek werden de oligodendrocyten gelyseerd en werden de proteïnen geëxtraheerd. De eiwitconcentratie werd bepaald aan de hand van de methode van Bradford. Gemiddeld leverden de isolaties slechts  $7 \cdot 10^6$  cellen op, waardoor weinig proteïnen konden geïsoleerd worden. Voor een 2D-GE-experiment was per gel een eiwithoeveelheid van 100 µg vereist. In totaal werden er 3 gelen gelopen met stalen van rat-oligodendrocyten opgekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF en 7 gelen werden gelopen met de stalen van rat-oligodendrocyten gekweekt in enkel groeimedium. Deze gelen werden gevisualiseerd door middel van zilverkleuring en met behulp van het softwareprogramma Z3 met elkaar vergeleken. Z3 is een analysesysteem voor een vergelijkende analyse van beelden van proteïnen gescheiden op 2D-GE-gelen. Het Z3-softwareprogramma detecteert verschillen tussen 2D-GE gelen op basis van relatieve expressiewaardes van de spots, rekening houdend met de achtergrondkleuring en de intensiteit van de andere spots. Allereerst werd er met het blote oog gekeken naar spots die mogelijk van intensiteit verschilden tussen de LIF-gelen en de GM-gelen. Een voorbeeld van een spot die



duidelijk van intensiteit verschilde tussen beide groepen van gellen staat weergegeven in figuur 9.



**Figuur 9: Voorbeeld van een spot (18) die duidelijk opgereguleerd is in een gel van het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF (a) in vergelijking met een gel van het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium (b)**

Op de figuur is duidelijk te zien dat de intensiteit van spot 18 hoger ligt in de gel van het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF in vergelijking met de gel van het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium, terwijl de intensiteit van spot 16 na evaluatie onveranderd blijft. Spot 16 en spot 18 werden geïdentificeerd als superoxide dismutase (SOD) Cu, Zn en stathmine, respectievelijk.

Vervolgens werden een 35-tal spots uitgekozen en voor deze spots werden de relatieve expressiewaarden opgezocht met behulp van een *spotdata*-tabel in Z3. De relatieve expressiewaarden van deze spots in de 7 gellen van de oligodendrocytstalen gekweekt in enkel groeimedium (GM-gelen genoemd), en in de 3 gellen van de oligodendrocytstalen gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF (LIF-gelen genoemd) werden met elkaar vergeleken. Voor iedere spot werd het gemiddelde berekend van de relatieve expressiewaarden van de GM-gelen en het gemiddelde van de relatieve expressiewaarden van de LIF-gelen. Ook werd de verhouding van de gemiddelde relatieve expressiewaarde van de GM-gelen tot de gemiddelde relatieve expressiewaarde van de LIF-gelen berekend voor iedere spot en omgekeerd. Wanneer de verhouding van de gemiddelde relatieve expressiewaarde van de LIF-gelen tot de gemiddelde relatieve expressiewaarde van de GM-gelen groter of kleiner is dan 1, is er sprake van een verhoogde of verlaagde expressie van dit eiwit in het proteoom van de oligodendrocyt gestimuleerd met LIF respectievelijk. Omdat echter veel eiwitten aan deze criteria voldoen, werd er gekozen voor een drempelwaarde van 1,5. Op deze manier werden er 14 eiwitspots geselecteerd, waarvan 5 verhoogd tot expressie kwamen (donkergrijs weergegeven in tabel 2) en 9 verlaagd tot expressie kwamen (lichtgrijs weergegeven in tabel 2) in het proteoom van de oligodendrocyt gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF.

*Resultaten*

**Tabel 2: Gemiddelde relatieve expressiewaarden van een aantal spots in de verschillende gelen**

Spot nr	Naam eiwit	Gem RE	Gem RE	Gem	Gem
		GM-gelen	LIF-gelen	GM/LIF	LIF/GM
112	14-3-3 epsilon	3421	3483	0,982	1,018
111	14-3-3 sigma	663	579,7	1,144	0,874
110	14-3-3 tau	1033	805	1,284	0,779
109	14-3-3 zeta/delta	2391	1845	1,296	0,772
107	14-3-3 gamma	842,1	760	1,108	0,902
24	peroxiredoxin 2	1318	1002	1,315	0,76
22	translationally controlled tumor protein	2843	3236	0,878	1,138
52	tubulin alpha 1 chain	7290	4388	1,662	0,602
13	nucleoside diphosphate kinase B	2995	3060	0,979	1,022
8	cyclophilin A	4841	6359	0,761	1,314
28	alpha crystallin B keten ! twijfelgeval	4661	4628	1,007	0,993
121	40S ribosomal protein SA	1521	1299	1,171	0,854
105	annexin A5	761,7	60,67	12,56	0,08
62	protasome activator complex subunit 2	2948	738	3,995	0,25
73	annexin A3	6209	7238	0,858	1,166
127	hemiferrin	1680	1104	1,521	0,657
148	glucose-related protein 78	3436	3790	0,907	1,103
134	endoplasmin	660,6	302,3	2,185	0,458
141	creatine kinase, cytoplasmatic actin 1	3701	3275	1,13	0,885
143	protein disulfide isomerase A3, GRP58	1832	711	2,577	0,388
147	dihydropyrimidinase related protein 2	1180	344	3,431	0,291
84	glutamine synthetase	2144	2620	0,818	1,222
80	annexin A1	1156	1349	0,857	1,167
87	actin-like protein 2	2063	1045	1,975	0,506
89	isocitrate dehydrogenase 3	966,6	255,3	3,786	0,264
18	stathmine	299,9	696	0,172	2,321
20	collagen alpha 1	191	751,7	0,106	3,935
21	beta hemoglobin	1387	2340	0,264	1,687
16	SOD Cu, Zn	1386	1883	0,439	1,358
12	peroxiredoxin 5	5255	5786	0,503	1,101
29	SOD Mn	6466	3608	1,157	0,558
9	cyclophilin A	4525	4513	0,635	0,997
10	destrin	3341	2935	0,647	0,879
11	cofilin 1	10158	7339	1,394	0,722
7	profilin 1	1466	3330	0,221	2,271
298	Cofilin 1	369,4	1776	0,763	4,808

De nummers van de *spots* komen overeen met de *spotnummers* in figuur A van de bijlage. In de tabel zijn de gemiddelden van de relatieve expressiewaarden (RE), bekomen door middel van een *spotdata*-tabel in Z3, van de GM- en LIF-gelen weergegeven voor de verschillende *spots*. Ook werden de verhoudingen van de gemiddelde waarden berekend. Wanneer de verhouding van het gemiddelde van de GM-gelen tot het gemiddelde van de LIF-gelen  $>1,5$  was er sprake van een verlaagde expressie van het eiwit in de LIF-gelen. Wanneer de verhouding van het gemiddelde van de LIF-gelen tot het gemiddelde van de GM-gelen  $>1,5$ , was er sprake van een verhoogde expressie van het eiwit in de LIF-gelen. Vijf eiwitten kwamen verhoogd tot expressie (donkergrijs weergegeven) en 9 eiwitten kwamen verlaagd tot expressie (lichtgrijs weergegeven) in het proteoom van de oligodendrocyt gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF.

Voor de selectie van 14 eiwitten, die verhoogd of verlaagd tot expressie kwamen op basis van tabel 2, werden vervolgens matrices berekend met 1 als drempelwaarde voor de verhoudingen van de relatieve expressiewaarden. Wanneer 60% van de verhoudingen groter dan of gelijk aan 1 waren, werd aangenomen dat het proteïne effectief verhoogd of verlaagd tot expressie kwam. Een voorbeeld van een matrix van het proteïne cofiline 1 bevindt zich in tabel 3. In deze matrix werden de verhoudingen berekend van de relatieve expressiewaarden van de spot cofiline 1 in de LIF-gelen tot de relatieve expressiewaarden van deze spot in de GM-gelen. In deze matrix waren 18 van de 21 verhoudingen groter dan of gelijk aan 1. Er kan dus aangenomen worden dat het proteïne cofiline 1 verhoogd tot expressie kwam in het proteoom van de oligodendrocyt gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF.

**Tabel 3: Voorbeeldmatrix van het proteïne cofiline 1**

LIF/GM								
GM	gel	1	2	3	4	5	6	7
LIF	RE	1	1	834	1	1	476	2105
Gel	RE							
1	484	484	484	0,58	484	484	1,02	0,23
2	3396	3396	3396	4,07	3396	3396	7,13	1,61
3	1449	1449	1449	1,74	1449	1449	3,05	0,69

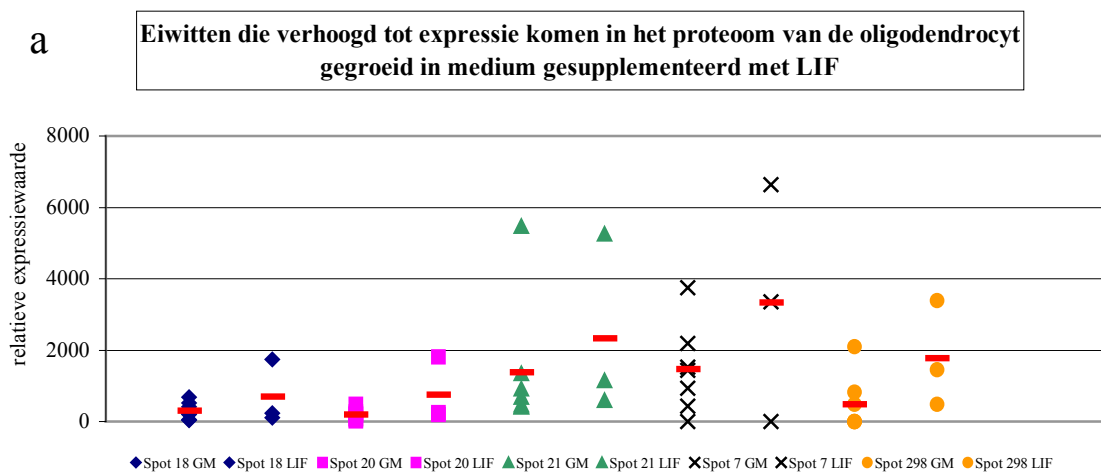
De verhoudingen van de relatieve expressiewaarden van de 3 LIF-gelen tot de relatieve expressiewaarden van de 7 GM-gelen voor eenzelfde spot, werden berekend. Als drempelwaarde voor deze verhoudingen werd 1 gekozen. Wanneer de spot niet aanwezig was in de gel, werd de waarde 1 als relatieve expressiewaarde genomen.

Deze methodologie werd aangehouden voor de andere spots. Voor collageen alpha waren 15 van de 21 (71%) verhoudingen groter dan 1, terwijl voor beta hemoglobine, proteasoom

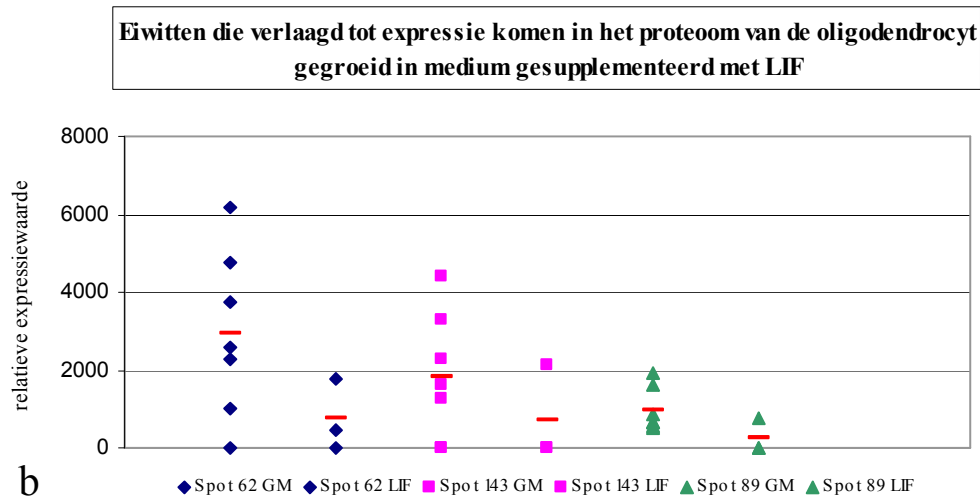
activator complex subeenheid 2 en isocitraat dehydrogenase er 14 van de 21 (67%) verhoudingen groter waren dan 1. Ook voor profiline 1, stathmine, proteïne disulfide isomerase A3 waren meer dan 60% van de verhoudingen groter dan 1, namelijk 13 van de 21 (62%) van de verhoudingen waren groter dan 1.

Tubuline alpha chain, annexine A5, actine-like proteïne 2, hemiferrin, endoplasmine en dihydropyrimidinase-related protein 2 voldeden echter niet aan de drempelwaarde van 60% van de verhoudingen groter dan 1 en werden niet als significant beschouwd.

Op basis van deze matrices werden er uiteindelijk 8 proteïnen geselecteerd die differentieel tot expressie kwamen. De relatieve expressiewaarden en de gemiddelden van de relatieve expressiewaarden van deze 8 spots worden grafisch weergegeven in figuur 10. De proteïnen die verhoogd tot expressie komen in het proteoom van de oligodendrocyt gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF werden geïdentificeerd als stathmine, collageen alpha, beta hemoglobine, profiline 1, cofiline 1. De proteïnen die verlaagd tot expressie kwamen, werden geïdentificeerd als proteasoom activator complex subeenheid 2, proteïne disulfide isomerase A3 en isocitraat dehydrogenase.







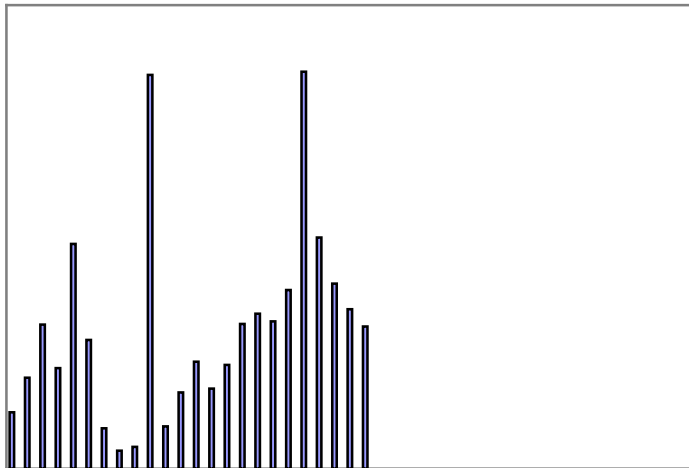
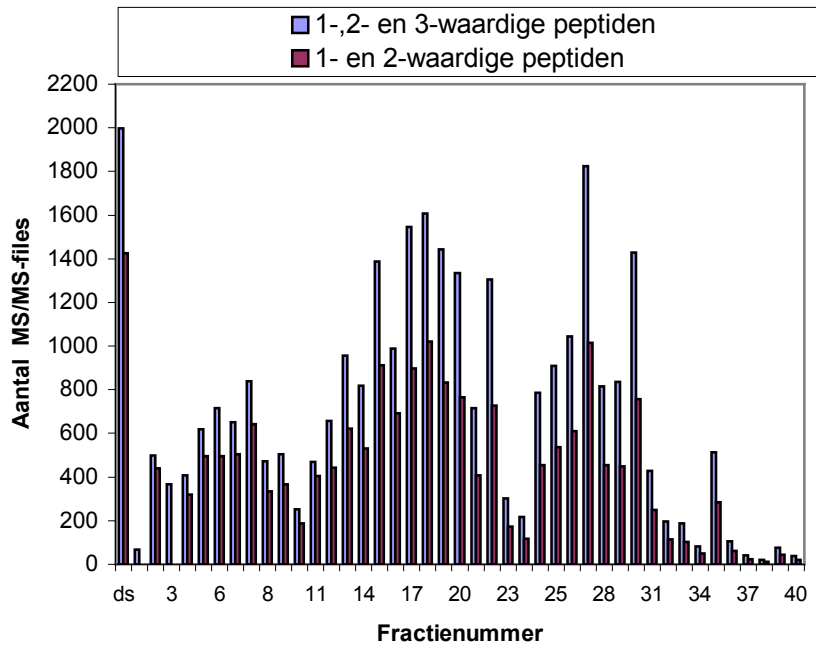
**Figuur 10: Relatieve expressiewaarden van 8 spots**

Honderd  $\mu\text{g}$  eiwit van het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium (aangeduid door GM) en het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF (aangeduid door LIF) werd respectievelijk 7 en 3 keer onderworpen aan 2D-GE gevolgd door zilverkleuring. De eiwitpatronen werden geanalyseerd met behulp van de Z3-software. De relatieve expressiewaarden van een aantal spots werden bepaald in de 7 GM-gelen en in de 3 LIF-gelen. De verhoudingen van de relatieve expressiewaarden voor eenzelfde spot tussen de GM-gelen en LIF-gelen werden berekend, en de eiwitten waarvoor de verhouding groter was dan 1,5 werden geselecteerd. Voor deze selectie eiwitten werden matrices berekend. Wanneer 60% van de verhoudingen in de matrix groter dan of gelijk aan 1 waren, werden de eiwitten geselecteerd. Op deze manier werd een selectie van 8 spots bekomen, waarvan de relatieve expressiewaarden en de gemiddelde expressiewaarde van elke groep weergegeven staan (aangeduid door '—'). Voor 6 spots waren 60% van de verhoudingen in de matrix echter niet groter dan of gelijk aan 1. In (a) worden de spots weergegeven van de eiwitten die verhoogd tot expressie komen in het proteoom van de oligodendrocyt gestimuleerd met LIF, terwijl in (b) zich de eiwitten bevinden die verlaagd tot expressie komen. De identificaties van spot 18, 20, 21, 7, 298, 62, 143 en 89 waren stathmine, collageen alpha, beta hemoglobine, profiline 1, cofiline 1, proteasoom activator complex subeenheid 2, proteïne disulfide isomerase A3 en isocitraat dehydrogenase, respectievelijk.

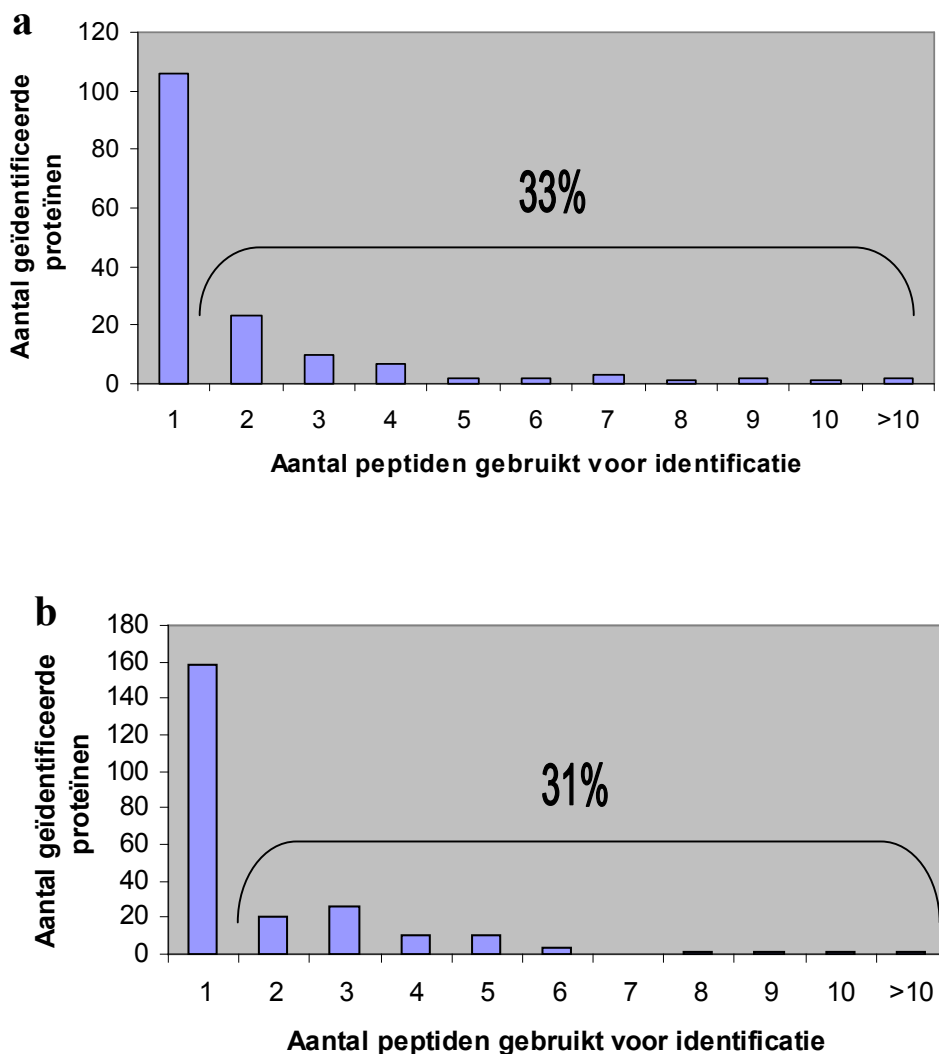
### 3.2 2D-LC gevolgd door massaspectrometrische analyse

Rat-oligodendrocyten werden in cultuur gebracht zoals beschreven in materiaal en methoden (2.1). Zowel oligodendrocyten gekweekt in enkel groeimedium als oligodendrocyten gestimuleerd met LIF werden onderworpen aan 2D-LC. Een eiwithoeveelheid corresponderend met 40  $\mu\text{g}$  eiwit werd gedigereerd (zie 2.6.1), waarvan vervolgens de helft gebruikt werd voor het uitvoeren van de vloeistofchromatografie. De fracties werden om de minuut opgevangen en nadien geanalyseerd met behulp van massaspectrometrie, zoals voorheen beschreven (zie 2.6). Elke fractie leverde een aantal MS/MS-spectra op (figuur 11a en b).

## Resultaten



oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF geïdentificeerd. Drieënvijftig (33%) en drieënzeventig (31%) van de proteïnen van het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium en het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF, respectievelijk, werden geïdentificeerd op basis van minstens twee peptiden. Het merendeel van de proteïnen, 106 (67%) eiwitten en 158 (68%) eiwitten voor respectievelijk het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium en het oligodendrocytstaal gestimuleerd met LIF, werden echter geïdentificeerd aan de hand van één enkele peptidensequentie (figuur 12).

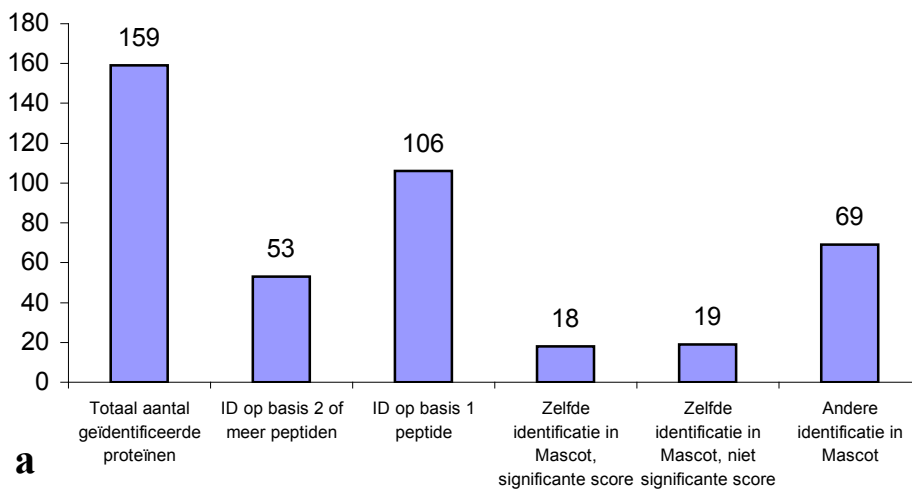


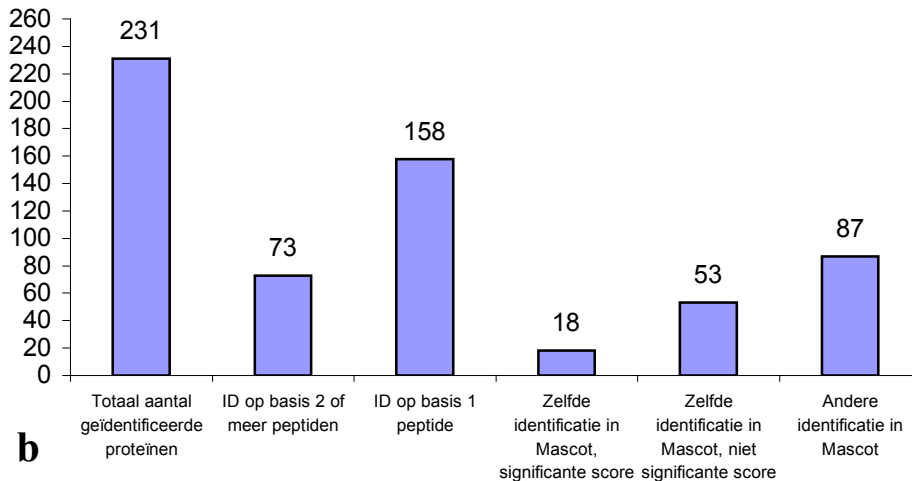
**Figuur 12: Overzicht van het aantal peptiden gebruikt voor de identificatie van de oligodendrocytproteïnen**

Bij de massaspectrometrische analyse van de opgevangen fracties afkomstig van de vloeistofchromatografie van het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium (a) en het oligodendrocytstaal gestimuleerd met LIF (b),

werden 33% en 31% van de proteïnen respectievelijk geïdentificeerd op basis van meer dan één peptide. De meeste proteïnen werden echter geïdentificeerd aan de hand van één enkele peptidensequentie.

De proteïnen, die op basis van één peptide geïdentificeerd werden, werden ter bevestiging aangeboden aan de NCBI-databank met behulp van het softwareprogramma Mascot. In figuur 13 wordt het resultaat schematisch weergegeven. Van de 158 proteïnen aangeboden aan Mascot voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF leverden 71 proteïnen (45%) eenzelfde identificatie op met Mascot, terwijl van de 106 proteïnen aangeboden aan Mascot voor het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium er slechts 37 (35%) proteïnen eenzelfde identificatie opleverden met beide programma's. Het merendeel van de proteïnen 69 (65%) en 87 (55%) voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium en het oligodendrocystaal gestimuleerd met LIF respectievelijk) leverden echter een andere identificatie op met Mascot dan met het programma Sequest.

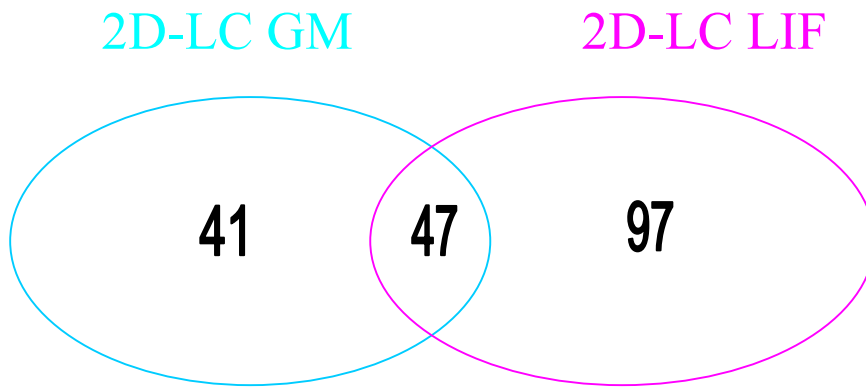




### **Figuur 13: Overzicht van de identificaties van de proteïnen**

In totaal werden er met behulp van het programma Sequest 158 proteïnen en 231 proteïnen geïdentificeerd voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium en het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF respectievelijk. Deze identificaties voldeden aan bovenstaande criteria voor Xcorr en dCN. Van de 158 geïdentificeerde proteïnen van het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gebeurden 53 (33%) identificaties op basis van 2 of meer peptiden, terwijl dit voor de 231 geïdentificeerde proteïnen van het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF er 73 (31%) waren. De proteïnen geïdentificeerd op basis van één peptidensequentie werden door het softwareprogramma Mascot aangeboden aan de NCBI-databank op het internet. Van de 158 proteïnen aangeboden aan Mascot voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF leverden 71 proteïnen (45%) eenzelfde identificatie op met Mascot, terwijl van de 106 proteïnen aangeboden aan Mascot voor het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium er slechts 37 (35%) proteïnen eenzelfde identificatie opleverden met beide programma's. In beide gevallen leverden slechts 18 van de proteïnen met eenzelfde identificatie met beide programma's een significante score op met Mascot. Het merendeel van de proteïnen 69 (65%) en 87 (55%) voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium en het oligodendrocytstaal gestimuleerd met LIF respectievelijk leverden echter een andere identificatie op met Mascot dan met het programma Sequest.

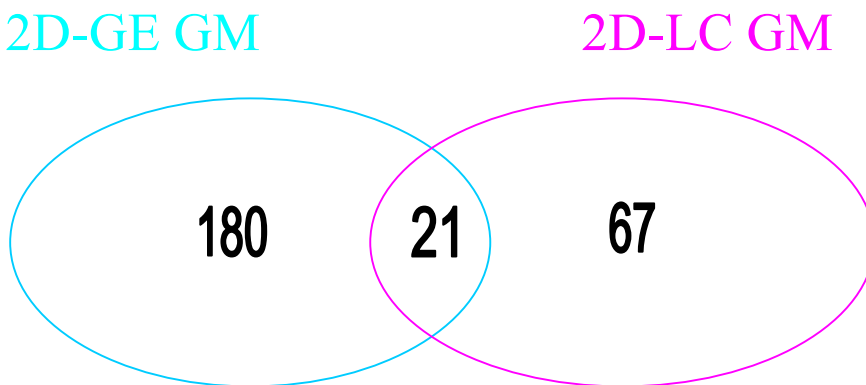
Enkel de proteïnen geïdentificeerd werden aan de hand van 2 of meerdere peptidensequenties met behulp van Sequest en de proteïnen geïdentificeerd aan de hand van 1 peptidensequentie en die eenzelfde identificatie opleverden met Mascot in vergelijking met Sequest, werden vermeld in tabel A en B van de bijlage. Deze proteïnen voldoen aan bovenstaande Sequest criteria voor de parameters Xcorr en  $\Delta$ CN. Vervolgens werden de identificaties van het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium (tabel B van de bijlage) vergeleken met de identificaties van het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF (tabel C van de bijlage) (figuur 14).



**Figuur 14: Proteïne-aantallen geïdentificeerd in het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium enerzijds en in het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF anderzijds**

Eenenvertig en zevenennegentig proteïnen werden uitsluitend teruggevonden met behulp van 2D-LC in het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium en in het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF. Slechts 47 proteïnen werden in beide stalen teruggevonden.

In figuur 15 werden beide technieken, enerzijds 2D-GE en anderzijds 2D-LC, met elkaar vergeleken voor het oligodendrocytstaal opgekweekt in enkel groeimedium. Honderdtachtig en zevenenzestig proteïnen werden uitsluitend geïdentificeerd met respectievelijkde 2D-GE en 2D-LC methode.

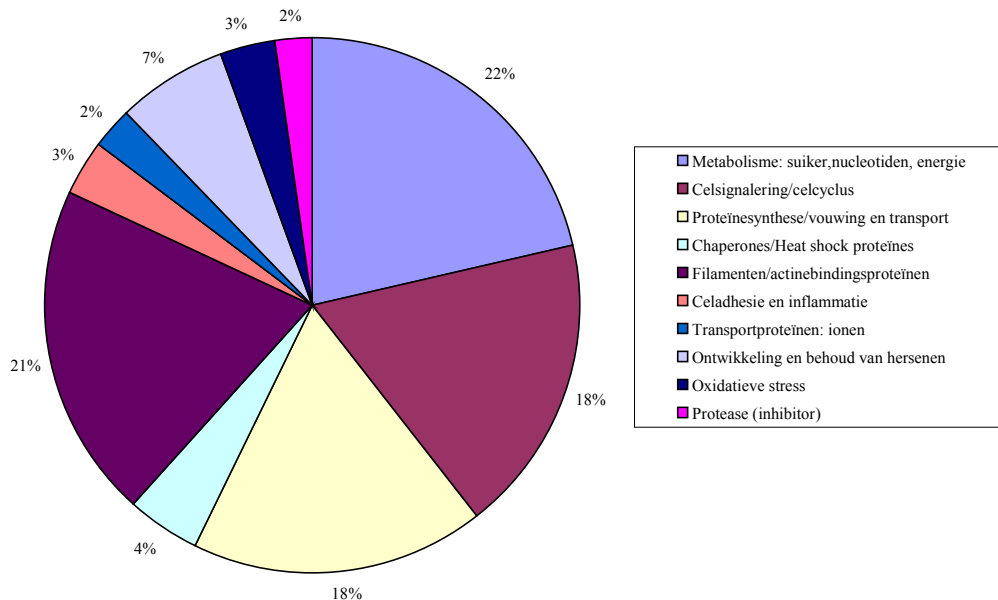


**Figuur 15: Proteïne-aantallen geïdentificeerd in het ratoligodendrocytstaal, gekweekt in groeimeidum, met behulp van 2D-GE en 2D-LC**

Honderdtachtig proteïnen zijn uniek voor de 2D-GE-methode en zevenenzestig proteïnen zijn uniek voor de 2D-LC-methode. Slechts 21 proteïnen konden met beide technieken geïdentificeerd worden.

Vervolgens werden de proteïnen van het oligodendrocytstaal geïdentificeerd met behulp van 2D-LC en 2D-GE, ingedeeld naargelang hun cellulaire functie (figuur 16). Hiervoor werden de proteïnen met behulp van hun accesienummer aangeboden aan de databank Swissprot via

de website van ExPasy. Bijkomende informatie werd verkregen via Pubmed op NCBI. De meeste proteïnen spelen een rol in het celmetabolisme. Ook filamentproteïnen, celsignaleringsproteïnen en de proteïnen betrokken in proteïnesynthese, vouwing en transport zijn in grote aantallen vertegenwoordigd.



**Figuur 16: Indeling van de proteïnen geïdentificeerd met behulp van 2D-GE en 2D-LC van het oligodendrocytstaal opgekweekt in enkel groeimedium naargelang hun functie in de cel**

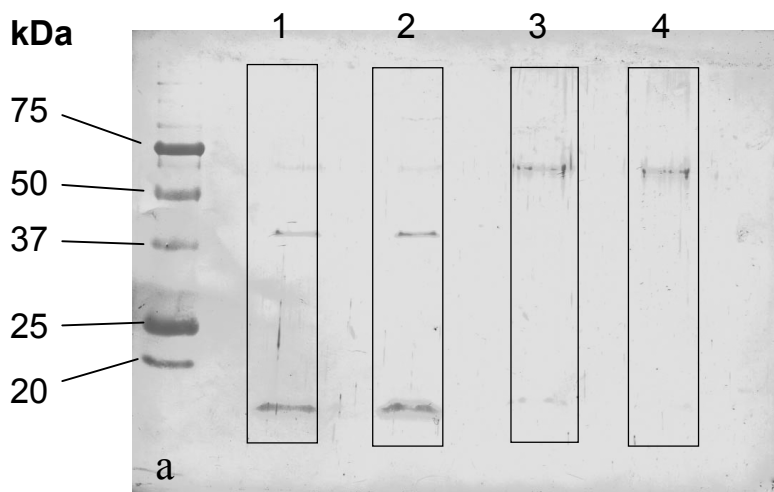
De proteïnen geïdentificeerd met behulp van 2D-LC en 2D-GE gevolgd door massaspectrometrische analyse, werden ingedeeld naargelang hun cellulaire functie. De proteïnen betrokken in het metabolisme van de cel waren het sterkst vertegenwoordigd (22%).

### 3.3 Western blot

Om de geobserveerde verhoogde expressie van stathmine in het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF verder te staven, werden het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium en het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF onderworpen aan Western blot. Ook werd er hersenmateriaal van een controle- en een EAE-rat opgezet. Voor elk van deze stalen werd een volume overeenkomend met 10 µg eiwit gescheiden met behulp van 1D-SDS-PAGE. Vervolgens werden de eiwitten getransfereerd naar een PVDF-membraan door middel van elektroblotting. Deze blot werd na anderhalf uur blokken geïncubeerd met het primaire antilichaam, anti-

stathmine, 1/5000 verdund in *blocking* buffer. Hierna volgde een incubatieperiode met het secundair antilichaam, konijn-anti-humaan-IgG's, 1/2000 verdund. De kleuring werd uitgevoerd met behulp van DAB.

In figuur 17 wordt het resultaat van de Western blot weergegeven. Zowel in het hersenmateriaal van de controlerat (laan 1) als van de EAE-rat (laan 2) zien we een reactiviteit ter hoogte van 17kDa, wat overeenkomt met stathmine. Ook in beide oligodendrocytstalen (laan 3 en 4) is er stathmine-activiteit zichtbaar ter hoogte van 17kDa. In alle lanen zien we echter ook reactiviteit tussen 75 en 50 kDa, wat kan wijzen op aspecifieke binding. In het hersenmateriaal van de rat wordt er nog bijkomende reactiviteit gezien ter hoogte van 40 kDa.



**Figuur 17: Western blot met het stathmine-antilichaam**

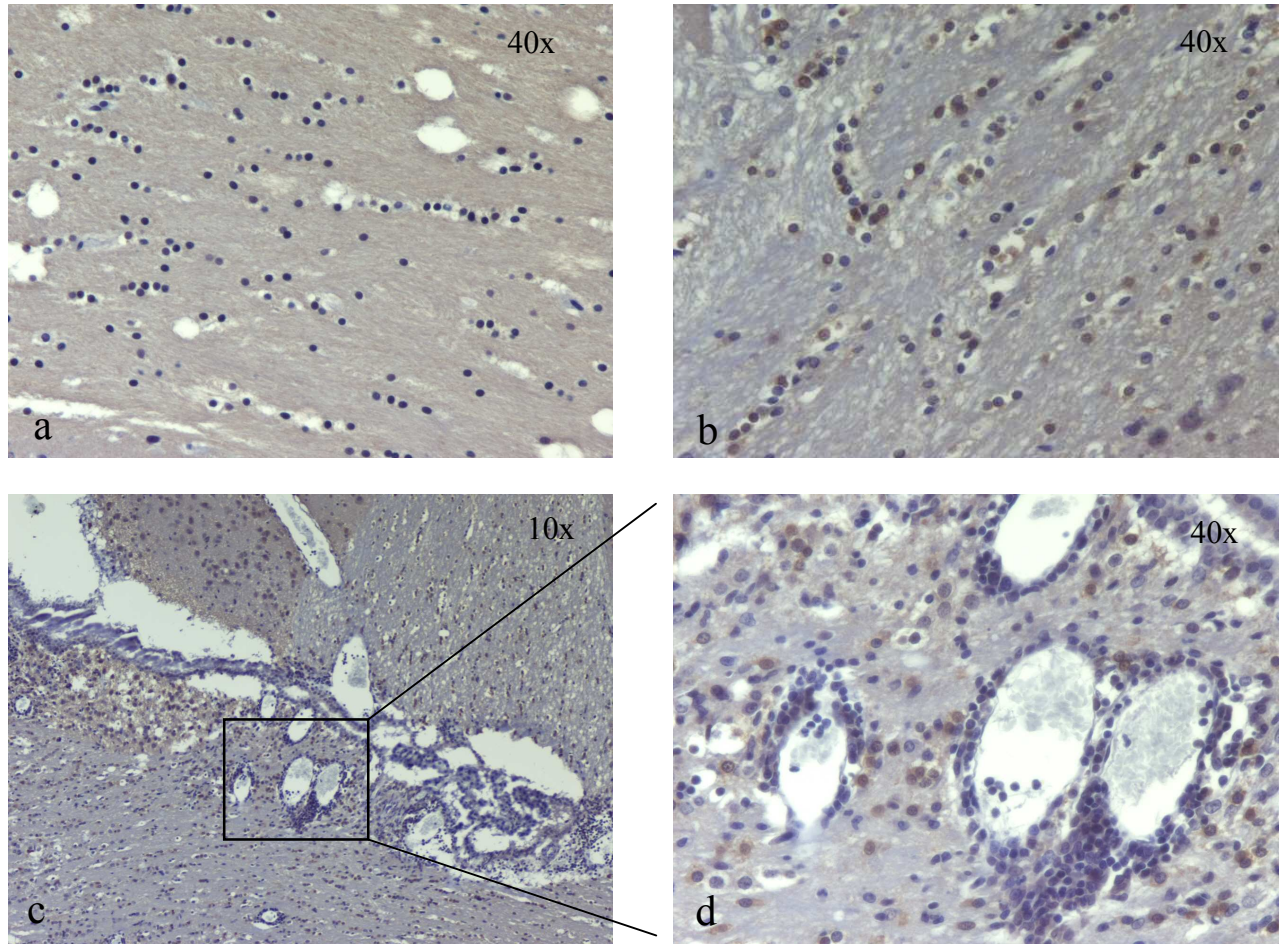
In laan 1a werd het hersenmateriaal van de controlerat geladen, in laan 2a het hersenmateriaal van de EAE-rat, in laan 3a het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium en in laan 4a het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF. In alle vier stalen werd binding met stathmine (17 kDa) vastgesteld. Ook werd er aspecifieke binding vastgesteld in het hersenmateriaal van de rat ter hoogte van 40 kDa en in alle vier stalen ter hoogte van 60 kDa.

### 3.4 Immunokleuring

Een immunokleuring werd uitgevoerd op paraffinecoupes van hersenen van zowel een controlerat als een EAE-rat. Het gebruikte hersenmateriaal was afkomstig uit het hersengebied net boven de hersenstam. De immunokleuring werd uitgevoerd zoals beschreven in materialen en methoden (2.9), met stathmine als primair antilichaam in een 1/500, 1/1000, 1/2000 en 1/5000 verdunding. Deze immunokleurin had tot doel de gebieden te lokaliseren waar stathmine tot expressie gebracht wordt. Na kleuring van de coupes,



werden de coupes microscopische geanalyseerd. Figuur 18 toont het resultaat van de immunokleuring.



**Figuur 18: Immunokleuring met het stathmine-antilichaam op paraffine-coupes van hersenmateriaal van controle en EAE-rat.**

In de witte stof van de hersenen van de controlerat (a) worden oligodendrocyten gezien. Deze vertonen echter geen reactiviteit voor het stathmine-antilichaam. In de witte stof van de hersenen van de EAE-rat (b) daarentegen wordt er wel stathmine-activiteit vastgesteld in de oligodendrocyten. In het hersenmateriaal van de EAE-rat wordt in het infiltraat in de cuffs (c en d) ook stathmine-activiteit vastgesteld.

Er kan geconcludeerd worden dat de oligodendrocyten aanwezig in de hersenen van de EAE-rat stathmine tot expressie brengen, in tegenstelling tot de oligodendrocyten aanwezig in het hersenmateriaal van de controlerat. In het infiltraat in de cuffs werd ook stathmine-activiteit vastgesteld.

## 4 Discussie

Multiple sclerose is een chronische inflammatoire, demyeliniserende ziekte van het centrale zenuwstelsel (10). MS wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van meerdere sclerotische laesies of plaques, die gevonden worden in de witte stof van het CZS (12). Deze plaques ontstaan doordat het myeline en/of oligodendrocyten aangevallen worden tijdens een inflammatoire respons, resulterend in demyelinisatie (13). Omdat het myeline van cruciaal belang is voor de impulsgeleiding in zenuwbanen, zal beschadiging ervan leiden tot een verstoorde zenuwfunctie (14). Het bestuderen van de oligodendrocyten en de mechanismen van beschadiging en bescherming van deze oligodendrocyten vormt dan ook een belangrijk onderdeel binnen het onderzoek naar multiple sclerose.

Een eerste doelstelling van dit thesisonderzoek was de inventarisatie van het oligodendrocytproteoom van de rat. Oligodendrocyten werden hiervoor geanalyseerd met behulp van twee-dimensionele gelelektroforese (2D-GE) en twee-dimensionele vloeistofchromatografie (2D-LC), beide gekoppeld aan massaspectrometrie. In een tweede luik werd LIF toegevoegd aan het groeimedium voor oligodendrocyten, waarna het proteoom werd geanalyseerd met hogervermelde technieken. Verschillen in eiwitexpressie in de culturen opgekweekt in enkel groeimedium of in groeimedium gesupplementeerd met LIF, werden opgespoord en kunnen leiden tot de identificatie van proteïnen, betrokken bij de protectieve mechanismen van LIF in oligodendrocyten.

### 4.1 Inventarisatie oligodendrocytproteoom

Oligodendrocyten werden uit de hersenen van 6 volwassen ratten geïsoleerd en in kweek gebracht (2.1). Na 8 dagen in cultuur werd aan het groeimedium van een deel van de oligodendrocyten LIF toegevoegd (2.2). Op dag tien van de kweek werden de oligodendrocyten geogst en de eiwitten geëxtraheerd. Deze eiwitten werden vervolgens geanalyseerd met behulp van 2D-GE en 2D-LC, gevolgd door massaspectrometrische analyse. Voor 2D-GE werd honderd µg eiwit onderworpen aan IEF (2.5.2). Om een zo globaal mogelijk patroon te bestuderen werd er geopteerd voor het gebruik van een lineaire pH-gradiënt van 3 tot 10. IEF werd gevolgd door SDS-PAGE (2.5.4) en zilverkleuring (2.5.5). De resulterende proteoomkaart van de volwassen ratoligodendrocyt wordt weergegeven in figuur 19 van de bijlage. Er werden reeds 300 spots uit de gel verwijderd en onderworpen aan trypsinisatie (2.5.7). Deze spots werden geïdentificeerd met behulp van LC-

ESI-MS/MS (2.6), leidend tot de identificatie van reeds meer dan 200 verschillende proteïnen. De geïdentificeerde proteïnen die voldeden aan hogervermelde eisen betreffende de Sequest-parameters Xcorr en  $\Delta$ CN worden weergegeven in tabel A van de bijlage.

De 2D-GE techniek is tot heden de meest gebruikte techniek voor het uitvoeren van proteomica-studies. Het is een zeer krachtige techniek die vooral geschikt is voor de globale analyse van metabole processen zoals proteïnesynthese, glycolyse, gluconeogenese, nucleotide biosynthese, lipidenmetabolisme en stress respons. Een belangrijke kracht van deze techniek is de mogelijkheid om posttranslationele modificaties zichtbaar te maken (70). Recente ontwikkelingen hebben ervoor gezorgd dat tot 10000 individuele proteïnespots gedetecteerd kunnen worden op één enkele 2D-GE-gel van groot formaat (71). Deze methode werd dan ook reeds in vele studies toegepast. Zo werden proteïnestalen afkomstig van de hersenen van patiënten met de ziekte van Alzheimer vergeleken met proteïnestalen afkomstig van hersenen van controlepatiënten met behulp van 2D-GE gekoppeld aan Q-TOF MS/MS (9). Ook werd er met behulp van 2D-GE gezocht naar ziektemerkers voor multiple sclerose in het CSF van MS-patiënten (7). Zelfs nucleaire proteïnen van humane bloedlymfocyten werden reeds geïdentificeerd met deze methode (72). 2D-GE kan dus toegepast worden op elk weefsel (71). De 2D-GE-methode heeft echter ook enkele beperkingen. Zo worden bepaalde klassen van proteïnen, zoals proteïnen die in zeer kleine hoeveelheden tot expressie komen, membraanproteïnen, proteïnen die zeer zuur of basisch zijn en zeer kleine en zeer grote proteïnen, niet duidelijk voorgesteld op 2D-GE-gelen (4). Vandaar ook dat er de laatste jaren een evolutie gezien wordt naar gel-vrije methoden om deze tekortkomingen te omzeilen. Eén voorbeeld van een gelvrije techniek is de kation-uitwisselingschromatografie gekoppeld aan LC-MS/MS. Deze methode werd reeds gebruikt in een studie omtrent de kwantitatieve bepaling van metformine in humaan plasma (73).

Om dus de tekortkomingen van 2D-GE te omzeilen werd in onze studie het proteoom van de rat-oligodendrocyt gekweekt in groeimedium en gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF ook bestudeerd met behulp van 2D-LC. De eiwitten geëxtraheerd uit de in kweek gebrachte oligodendrocyten werden eerst onderworpen aan trypsinisatie (2.7.1) en vervolgens werd een hoeveelheid corresponderend met 20  $\mu$ g eiwit gescheiden op basis van lading met behulp van vloeistofchromatografie gebruik makend van een SCX-kolom (2.7.2). De opgevangen fracties werden nadien geanalyseerd met behulp van LC-ESI-MS/MS. Elke fractie leverde een aantal MS/MS-spectra op (figuur 11). Deze MS/MS-spectra werden door het softwareprogramma Sequest aangeboden aan de Swissprot-databank op het internet, leidend tot de identificatie van 159 proteïnen voor het oligodendrocytstaal gekweekt in

groeimeidium en 231 proteïnen voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimeidium gesupplementeerd met LIF. Het merendeel van de proteïnen, 106 (67%) eiwitten en 158 (68%) eiwitten voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimeidium en het oligodendrocytstaal gestimuleerd met LIF respectievelijk, werden echter geïdentificeerd aan de hand van één enkele peptidensequentie (figuur 12). De zekerheid van een identificatie hangt af van verschillende factoren, zoals de sequentie *coverage* en de strengheid van validatie. Deze laatste is van uiterst belang wanneer de identificatie gebaseerd is op één enkel peptide. Daarom worden de proteïnen die geïdentificeerd werden op basis van één enkel peptide ter bevestiging aangeboden aan de NCBI-databank door middel van het programma Mascot. Van de 158 proteïnen aangeboden aan Mascot voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimeidium gesupplementeerd met LIF leverden 71 proteïnen (45%) eenzelfde identificatie op met Mascot, terwijl van de 106 proteïnen aangeboden aan Mascot voor het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimeidium er slechts 37 (35%) proteïnen eenzelfde identificatie opleverden met beide programma's. De tegenstrijdigheden in identificaties door Mascot en Sequest kunnen toegewezen worden aan het gebrek aan overereenstemming in de Swissprot- en NCBI-databanken. Enkel de proteïnen die geïdentificeerd werden aan de hand van 2 of meerdere peptidensequenties, en de proteïnen die geïdentificeerd werden aan de hand van 1 peptidensequentie en eenzelfde identificatie opleverden met Mascot in vergelijking met Sequest worden weergegeven in tabel B en C

Wanneer beide technieken, enerzijds de 2D-GE-methode en anderzijds de 2D-LC-methode, met elkaar vergeleken worden voor het oligodendrocytstaal opgekweekt in enkel groeimeidium, kan er duidelijk aangetoond worden dat beide technieken complementair zijn (figuur 15). Honderdtachtig van de geïdentificeerde proteïnen waren namelijk uniek voor de 2D-GE-methode en zevenenzestig proteïnen waren uniek voor de 2D-LC-methode, terwijl slechts eenentwintig proteïnen door beide methoden geïdentificeerd werden. Deze complementariteit kan enerzijds verklaard worden door het feit dat bepaalde klassen van proteïnen niet duidelijk voorgesteld worden op 2D-GE-gelen. Dit geldt namelijk voor proteïnen die slechts in zeer kleine hoeveelheden tot expressie komen, voor proteïnen die zeer zuur of zeer basisch zijn, en voor zeer kleine of zeer grote proteïnen (4). Deze klassen van proteïnen worden daarentegen wel gedetecteerd door middel van twee-dimensionele vloeistofchromatografie. Bij 2D-LC wordt de trypsinisatie niet gehinderd door de aanwezigheid van een gelmatrix en is er bovendien geen extractie van de resulterende getrypsiniseerde peptiden nodig. Hierdoor stijgt de detectie van proteïnen die in kleinere

hoeveelheden aanwezig zijn. Anderzijds kunnen we ook stellen dat bij 2D-LC verwante peptiden verspreid worden over een aantal verschillende vloeistoffracties, waardoor de complexiteit van de analyse toeneemt. Er zijn dan ook meerdere analyses nodig om alle peptiden te detecteren in de opgevangen fracties. Daarom is de beschikbaarheid van software, zoals DTASelect om informatie te extraheren en samen te voegen van groot belang. Dit kan een verklaring zijn voor het feit dat een aantal proteïnen wel met de 2D-GE-methode gedetecteerd worden, maar niet met de 2D-LC-methode. Bij twee-dimensionele gelelektroforese worden namelijk proteïnen gescheiden in een eerste dimensie op basis van lading en in een tweede dimensie op basis van moleculaire grootte. Als resultaat levert dit een twee-dimensionele gel op, waarbij iedere spot overeenkomt met een specifiek eiwit. In zo een eiwitspot zitten maximaal drie verschillende eiwitten. Wanneer een eiwitspot onderworpen wordt aan trypsinisatie en vervolgens geanalyseerd wordt met behulp van massaspectrometrie, zullen de peptidensequenties afkomstig zijn van hoogstens drie verschillende eiwitten. Bij vloeistofchromatografie wordt er echter betrokken van een mengsel van peptiden. Het exacte aantal peptiden is niet gekend en men kan dan ook niet op voorhand weten in welke fractie de meeste peptidenfragmenten zullen terecht komen. Deze fracties worden vervolgens geanalyseerd met behulp van massaspectrometrie, waarbij softwarematig automatisch de drie meest intense precursorionen geselecteerd worden. Het is dus makkelijker om alle drie de eiwitten uit een eiwitspot te detecteren, dan alle 50 eiwitten uit een vloeistoffractie te detecteren. We kunnen dus besluiten dat beide technieken complementair zijn en dat het belangrijk is om het proteoom van de oligodendrocyt te bestuderen met beide methoden om zoveel mogelijk verschillende eiwitten te identificeren.

Na een literatuurstudie werden de proteïnen, geïdentificeerd met behulp van 2D-GE en 2D-LC, ingedeeld naargelang hun cellulaire functie (figuur 17). De grootste groep van proteïnen, namelijk 22% van alle geïdentificeerde proteïnen, zijn betrokken in het metabolisme van de cel. Tot deze groep van proteïnen behoort bijvoorbeeld aldolase A, dat betrokken is in de glycolyse. Een tweede grote groep van proteïnen zijn de filamentproteïnen, waartoe actine en tubuline behoren. Ook de proteïnen betrokken bij de proteïnesynthese zijn sterk vertegenwoordigd (18%), net zoals de proteïnen betrokken in de celsignalering. Tot deze laatste groep van proteïnen behoren het 14-3-3 proteïne Tau en annexine III. De 14-3-3 proteïnen zijn betrokken in de controle van de celcyclus, transcriptie en apoptose. Ze kunnen met meer dan 100 verschillende partners interageren, waaronder verschillende kinases, receptoren, enzymen, structurele en cytoskeletproteïnen (74). Ook is hun aanwezigheid reeds

aangetoond in het hersenvocht van patiënten met verschillende neurologische ziekten, zoals MS en de ziekte van Creutzfeldt-Jakob (75). Onlangs werd aangetoond dat de 14-3-3 proteïnen verhoogd tot expressie komen in de gliale cellen, voornamelijk in de astrocyten en oligodendrocyten, van MS-patiënten. De ophoping van de 14-3-3 proteïnen in deze gliale elementen kan mogelijk geassocieerd worden met de pathogenese van deze demyeliniserende ziekte en kunnen dus mogelijk als ziektemarkers gebruikt worden in de toekomst (76). Een kleinere groep van proteïnen (4%) wordt vertegenwoordigd door *heat shock proteins* (Hsp's), waartoe ook het HSP70 behoort. *Heat shock* proteïnen zijn stress-proteïnen en worden door een reeks van stresssituaties, zoals hyperthermia, een virale infectie, ischemie of oxidatieve stress, geïnduceerd (77). Er werd reeds aangetoond dat Hsp's verhoogd tot expressie komen in MS-laesies. Een nieuw concept van Hsp's in de pathogenese van MS veronderstelt dat hun overexpressie in MS-laesies werkt als een chaperone voor myelineproteïnen, zo bijdragend aan een verhoging of inductie van de immuunrespons tegen myeline-antigenen (78). Een andere kleine groep van proteïnen (3%) wordt ingenomen door oxidatieve stressproteïnen, zoals het glutathion S-transferase P, (GSTP). GST lijkt een rol te spelen in de etiologie van MS en astma (79). Een laatste kleine groep die hier besproken wordt, zijn de proteïnen betrokken in de ontwikkeling en behoud van de hersenen, waaronder het *dihydropyrimidinase-related* proteïne 2 (DRP-2) hoort. DRP-2 is betrokken in de axonale groei en geleiding en speelt mogelijk een rol bij het ontregelde mechanisme van de vorming van neurale netwerken in de ziekte van Alzheimer (80).

#### 4.2 Differentiële expressie

Een ultieme doelstelling van dit onderzoek was een vergelijkende analyse van het proteoom van oligodendrocyten, gekweekt in enkel groeimedium en gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF (2.2). Op deze manier werd getracht kandidaat-proteïnen betrokken in de beschermende werking van LIF op te sporen. Omdat de oligodendrocyt-isolaties echter telkens maar  $7 \cdot 10^6$  cellen opleverden, overeenkomend met 150-200  $\mu\text{g}$  eiwit, en er voor 2D-GE telkens een eiwithoeveelheid van 100  $\mu\text{g}$  eiwit per gel vereist is, konden er slechts weinig gelen gelopen worden. In totaal werden er 7 gelen geproduceerd van de oligodendrocytstalen gekweekt in enkel groeimedium en 3 gelen werden gelopen met de oligodendrocytstalen gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF. Deze gelen werden met behulp van het softwareprogramma Z3 met elkaar vergeleken. Z3 berekent voor elke spot een relatieve expressiewaarde, hierbij rekening houdend met de achtergrondkleuring

van de gel en de intensiteit van de andere spots. Voor een selectie van 25 spots (tabel 2) werden de relatieve expressiewaarden van de verschillende gelen met elkaar vergeleken. Wanneer de gemiddelde relatieve expressiewaarde van de GM-gelen 1 keer groter was dan de gemiddelde relatieve expressiewaarde van de LIF-gelen, werd er gesproken van een verlaagde expressie van het eiwit in het proteoom van de oligodendrocyt gestimuleerd met LIF. Wanneer nu de gemiddelde relatieve expressiewaarde van de LIF-gelen 1 keer groter was dan de gemiddelde relatieve expressiewaarde van de GM-gelen, werd er gesproken van een verhoogde expressie van het eiwit in het proteoom van de oligodendrocyt gestimuleerd met LIF. Omdat echter op deze manier zeer veel eiwitten verhoogd of verlaagd tot expressie kwamen, werd een drempelwaarde van 1,5 ingevoerd. Op deze manier werd een selectie van 14 eiwitten bekomen, waarvan 9 eiwitten verhoogd en 5 eiwitten verlaagd tot expressie kwamen in de LIF-gelen. Voor deze selectie werden matrices berekend. Wanneer 60% van deze verhoudingen groter dan of gelijk aan 1 waren, werd aangenomen dat het proteïne effectief verhoogd of verlaagd tot expressie kwam. Op deze manier werden er uiteindelijk 8 spots geselecteerd (figuur 10) die differentieel tot expressie kwamen. De proteïnen die verhoogd tot expressie kwamen in het proteoom van de oligodendrocyt gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF waren stathmine, collageen alfa, beta hemoglobine, profiline 1, cofiline 1, de proteïnen die verlaagd tot expressie kwamen waren proteasoom activator complex subeenheid 2, proteïne disulfide isomerase A3 en isocitraat dehydrogenase. Een aantal van deze eiwitten zullen in volgende paragraaf kort besproken worden.

Uit deze studie bleek dat het isocitraat dehydrogenase (ICDH) verlaagd tot expressie kwam in het proteoom van de oligodendrocyt gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF.

Een recente studie toonde aan dat overexpressie van ofwel cICDH of mICDH de weerstand van cellen tegen oxidatieve stress verbeterde, terwijl cellen met een verminderde activiteit van één van de twee ICDH-isovormen kwetsbaarder waren voor oxidatieve stress. De aanwezigheid van mICDH en cICDH in de hersenen werd reeds aangetoond. Zowel cICDH als mICDH komen tot expressie in in cultuur gebrachte neuronen, astrocyten, microgiale cellen en oligodendrocyten. De hoge activiteit van ICDH's in neurale cellen veronderstelt dat deze enzymen kunnen bijdragen aan de NADPH-voorraad voor anabole reacties, als ook aan de cellulaire glutathion-redoxcyclus. In culturen van neuronen en oligodendrocyten werd 75% van de totale ICDH-activiteit gevonden in de fractie van het cytosol (81).

Beta hemoglobine is het zuurstoftransporterend proteïne van het bloed en is zichtbaar op de gelen in de onderste regio, ondanks dat het niet in de hersenen voorkomt. De reden waarom het proteïne op de gelen zichtbaar is, is omdat na de dissectie van de hersenen enkel de

zichtbare bloedvaten verwijderd kunnen worden. Zelfs na een aantal zuiveringsstappen en percoll-dichtheidsgradiëntcentrifugatie blijven er een aantal rode bloedcellen in de stalen aanwezig. Deze rode bloedcellen worden samen met de oligodendrocyten in kweek gebracht en een aantal van deze rode bloedcellen zullen samen met de oligodendrocyten gelyseerd worden. Vandaar dus de aanwezigheid van dit proteïne in de oligodendrocytstalen. Er kan dus in dit geval ook geen sprake zijn van een verhoogde expressie.

Profiline 1 kwam in deze studie verhoogd tot expressie in het proteoom van de oligodendrocyt gekweekt in groeimedium met LIF. Profilines zijn kleine actine-bindende proteïnen die essentieel zijn voor alle organismen. *In vitro* reguleren profilines de dynamica van actine-polymerisatie, wat hun belangrijkste rol is *in vivo* gedurende celmotiliteit. Maar men veronderstelt dat naast het binden van actine, profilines ook werken als moleculaire schakels die een complex netwerk van moleculaire interacties controleren. Profilines reageren met een brede waaier van proteïnen en de belangrijkheid van dit aspect van hun functie is nog niet volledig begrepen (82).

Proteïne disulfide isomerase A3 (PDA3) is een lid van de proteïne disulfide isomerase (PDI) familie en is een belangrijk proteïne aanwezig in het lumen van het endoplasmatisch reticulum. Het PDA3 is een enzym dat de vorming en herschikking van disulfide-bindingen gedurende oxidatieve proteïnevouwing in het ER katalyseert. Bovendien functioneert het ook als chaperone, die de aggregatie van gedatureerde proteïnen verhindert (83). In deze huidige studie kwam het PDA3 verlaagd tot expressie in het proteoom van de oligodendrocyt gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF, terwijl het proteïne stathmine verhoogd tot expressie kwam. Stathmine zal verderop besproken worden

Omdat de differentiële analyses echter gebaseerd zijn op basis van maar 3 LIF-gelen, kan er echter niet gesproken worden over statisch relevante resultaten. Er moet enige voorzichtigheid geboden worden bij de interpretatie van de resultaten. Daar er geen optimale reproduceerbaarheid is tussen de 2D-GE-gelen, is het zeer moeilijk om een onderscheid te maken tussen variatie in het systeem en biologisch geïnduceerde veranderingen (84). Dankzij de methode van twee-dimensionele differentiële gelelektroforese (DIGE), is het tegenwoordig mogelijk om meer dan één staal te scheiden op slechts één enkele 2D-polyacrylamide gel. De techniek omvat het vooraf labellen van twee proteïne-extracten, gebruik makende van twee fluorescente cyanine kleurstoffen, namelijk Cy3 en Cy5. De gelabelde stalen worden vervolgens gemengd en gelijktijdig gescheiden op één 2D-gel. De verschillende proteïne-extracten gelabeld met de verschillende CyDye DIGE fluors kunnen vervolgens afzonderlijk



gevisualiseerd worden door excitatie van de verschillende kleurstoffen bij hun specifieke golflengtes. Zo zal iedere kleurstof een digitaal beeld genereren van elke individueel staal. Deze beelden kunnen vervolgens softwarematig geanalyseerd en vergeleken worden (85). Het belangrijkste voordeel is dat deze techniek de mogelijkheid biedt om de effecten van gel tot gel variatie te reduceren, waardoor de techniek statistisch significante data kan bekomen, gebruik makende van minder 2D-gelen. De grotere kwantitatieve nauwkeurigheid van 2D-DIGE is mogelijk door het feit dat meerdere stalen op één gel gelopen kunnen worden en door het feit dat een interne standaard meegenomen kan worden (84). Deze interne standaard wordt gevormd door het samenvoegen van gelijke hoeveelheden van beide proteïne-extracten, waarna het mengsel gelabeld wordt met een derde CyDye DIGE fluor, namelijk Cy2. Dit betekent dat elk proteïne van alle stalen vertegenwoordigd zal zijn in de interne standaard. De interne standaard wordt op elke gel gelopen samen met elk individueel staal en hierdoor kan elk staal binnen de gel genormaliseerd worden naar de interne standaard aanwezig in dezelfde gel (86). De aanwezigheid van elke proteïnespot in een biologisch staal kan vervolgens gemeten worden als de ratio tot zijn overeenkomstige spot aanwezig in de interne standaard. Dit maakt het mogelijk om overeenkomstige spots tussen verschillende gelen op een statistisch nauwkeurige manier met elkaar te vergelijken. Hieronder worden de voordelen van 2D-DIGE nog eens kort opgesomd. Door het lopen van meerdere gelabelde stalen op dezelfde 2D-gel wordt de integrale variabiliteit, vaak gezien bij 2D-GE, vermindert, waardoor de reproduceerbaarheid en de nauwkeurigheid van de resultaten verhoogd worden. Er zijn bovendien minder gelen nodig voor nauwkeurige resultaten en de hoeveelheid eiwit vereist voor deze techniek is tien keer zo klein als deze bij 2D-GE. Bovendien is twee-dimensionele DIGE volledig compatibel met massaspectrometrie (84). 2D-DIGE was echter tijdens deze studie niet voorhanden in ons onderzoekscentrum. Er werden reeds stappen ondernomen om de stalen te laten analyseren met behulp van 2D-DIGE in Leuven.

Naast het gebruik van 2D-GE werd er ook getracht om mogelijke kandidaat-proteïnen betrokken in de beschermende werking van LIF op te sporen met behulp van de 2D-LC-methode. Een eiwithoeveelheid corresponderend met 40 µg eiwit afkomstig van zowel het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium als het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF, werd gedigereerd en vervolgens werd de helft van de eiwithoeveelheid onderworpen aan 2D-LC. De opgevangen fracties werden geanalyseerd met behulp van LC-ESI-MS/MS. De verkregen MS/MS-spectra werden door het programma Sequest aangeboden aan de Swissprot-databank, leidend tot 159 identificaties voor het

oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium en 231 identificaties voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF. Het merendeel van de proteïnen, 106 (67%) eiwitten en 158 (68%) eiwitten voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium en het oligodendrocytstaal gestimuleerd met LIF respectievelijk, werden echter geïdentificeerd aan de hand van één enkele peptidensequentie (figuur 12). De proteïnen geïdentificeerd op basis van één enkel peptide werden ter bevestiging aangeboden aan de NCBI-databank door middel van het programma Mascot. Van de 158 proteïnen aangeboden aan Mascot voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF leverden 71 proteïnen (45%) eenzelfde identificatie op met Mascot, terwijl van de 106 proteïnen aangeboden aan Mascot voor het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium er slechts 37 (35%) proteïnen eenzelfde identificatie opleverden met beide programma's. Enkel de proteïnen die geïdentificeerd werden aan de hand van 2 of meerdere peptidensequenties en de proteïnen die geïdentificeerd werden aan de hand van 1 peptidensequentie en eenzelfde identificatie opleverden met Mascot in vergelijking met Sequest werden voor verdere analyse meegenomen. Na deze evaluatie van identificaties werden de 87 identificaties voor het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium vergeleken met de 143 identificaties voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF. Zesenvestig proteïnen werden teruggevonden in beide chromatografieën, terwijl 97 en 41 proteïnen uniek waren voor het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF en het oligodendrocytstaal gekweekt in enkel groeimedium, respectievelijk. In de groep van proteïnen uniek voor de chromatografie van het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF worden een aantal interessante proteïnen teruggevonden, zoals de annexines 3, 5 en 6, het S100 calcium-bindend proteïne A10, stathmine en het *fatty acid binding protein* (E-FABP). Een aantal van deze proteïnen zullen in volgende paragraaf kort besproken worden.

Annexines zijn een familie van structureel gerelateerde proteïnen, die fosfolipiden binden op een calcium-afhankelijke manier. De precieze functies van deze annexines zijn nog niet volledig begrepen, maar er wordt verondersteld dat ze functioneren in een brede reeks van intracellulaire processen, waaronder signaaltransductie, DNA-replicatie, celtransformatie, de vorming van ionenkanalen en apoptose (87). Elderfield en collega's toonden reeds een verhoogde expressie van annexine V aan in post-mortem stalen van de witte stof van MS-patiënten (88). Een recente studie toonde aan dat annexine V essentieel is voor de overleving en uitgroei van ontwikkelende corticale neuronen, de overleving van gliale cellen, en voor de bescherming van neuronen en gliacellen tegen peroxide en schade door hypoxie (89).

FABP's zijn 15 kDa cytosolische proteïnen die betrokken zijn in de intracellulaire binding van vetzuren. Epitheliaal/epidermaal FABP (E-FABP) wordt geïnduceerd in perifere neuronen gedurende de regeneratie van zenuwen en wordt in hoge concentraties teruggevonden in centrale neuronen gedurende neuronale migratie en ontwikkeling (90).

Deze data kunnen echter beïnvloed zijn door concentratieverschillen tussen beide stalen, en mogen enkel kwalitatief en niet kwantitatief gezien worden. Het is echter tegenwoordig mogelijk, dankzij de ontwikkeling van nieuwe methoden zoals ICAT (*isotope coded affinity tagging*), kwantitatieve data te bekomen.

De ICAT peptide-labelingstechniek maakt een onderscheid tussen twee populaties van proteïnen gebruik makende van reactieve *probes* die verschillen in isotoopsamenstelling. ICAT-reagentia bestaan uit een proteïne-reactieve groep, een *linker*- of verbindings-gebied en een biotine-label. Het commercieel beschikbaar ICAT reagens bevat een reactieve groep die gericht is naar cysteïneresidu's in proteïnen en peptiden. De twee verschillende isotooplabele worden gevormd door gebruik te maken van *linkers* bestaande uit ofwel 8 deuteriumatomen (d8, zwaar reagens) ofwel uit 8 waterstofatomen (d0, licht reagens). Een gereduceerd proteïnemengsel van het ene staal wordt gekoppeld met de isotoop zware versie van het ICAT-reagens, terwijl het proteïnemengsel van het andere staal gekoppeld wordt met de isotoop lichte versie van het ICAT reagens. De twee stalen worden samengevoegd en gedigereerd door middel van een protease, bijvoorbeeld trypsine, om peptidefragmenten te genereren. Vervolgens wordt het gemengde staal onderworpen aan avidine-affiniteitschromatografie, waardoor enkel de cysteïne-bevattende peptiden behouden worden (70). Deze stap resulteert in een tien keer kleiner aantal peptiden dan in het oorspronkelijke mengsel. Op deze manier wordt de verdere analyse vereenvoudigt (71). De resulterende fracties kunnen vervolgens geanalyseerd worden met behulp van LC-MS/MS. De fragmenten afkomstig van proteïnen die in gelijke hoeveelheden aanwezig zijn in beide stalen zullen enkel negen massa-eenheden van elkaar verwijderd zijn en dezelfde hoogte hebben in de massaspectrometer. Fragmenten afkomstig van proteïnen die differentieel tot expressie komen zullen ofwel hoger ofwel lager liggen dan hun overeenkomstige partners. Deze fragmenten kunnen vervolgens onderworpen worden aan *MS-sequencing* en op deze manier kunnen we de identiteit van het *parent*-ion achterhalen. Deze methode is dus uitstekend voor het bepalen van hoeveelheden van proteïnen in relatie tot een behandeling of ziekte en levert op deze manier niet enkel kwalitatieve, maar ook kwantitatieve data (91). De huidige ICAT-methode heeft echter één groot nadeel. Het vereist namelijk de aanwezigheid van cysteïneresidu's, die geflankeerd worden door gepaste protease-knipplaatsen, in proteïnen. Cysteïneresidu's zijn

echter relatief zeldzaam in proteïnen. Andere methoden die gebruikt kunnen worden voor kwantitatieve analyses zijn onder andere MCAT en COFRADIC (*combined fractional diagonal chromatography*) (92). Voornamelijk deze laatste lijkt een veel belovende techniek te zijn.

### 4.3 Stathmine

Stathmine is een proteïne dat een belangrijke rol speelt in de regulatie van het microtubuli cytoskelet. De stabiliteit van het microtubuli netwerk is zeer belangrijk voor de cel, zo ook voor de oligodendrocyten, die op hun beurt weer belangrijk zijn voor de vorming en het behoud van myeline. De stabiliteit van het microtubuli netwerk hangt af van het evenwicht tussen polymerisatie en depolymerisatie en het is dit evenwicht dat door stathmine gereguleerd wordt. Stathmine bevordert namelijk de depolymerisatie van microtubuli en/of verhindert polymerisatie van tubuline heterodimeren. Net voor de start van de mitose, polymeriseren microtubuli om een mitotische spoel te vormen, een cellulaire structuur die vereist is voor de correcte segregatie van chromosomen en celdeling. De microtubuli-depolymeriserende activiteit van stathmine wordt uitgeschakeld bij het begin van mitose door fosforylatie, waardoor de microtubuli kunnen polymeriseren en zo een mitotische spoel kunnen vormen. Gefosforyleerd stathmine moet terug gereactiveerd worden door defosforylatie vooraleer de cellen de mitose kunnen beëindigen en een nieuwe interfase kunnen binnengaan. Een verhoogde expressie van stathmine leidt tot abnormaliteiten in of zelfs een totaal gebrek van de mitotische spoel, waardoor de cellen gestopt worden in een vroeg stadium van de mitose. Aan de andere kant zorgt de inhibitie van stathmine-expressie voor accumulatie van cellen in G2/M-fases en wordt geassocieerd met ernstige mitotische spoelabnormaliteiten en moeilijkheden bij het beëindigen van de mitose. Stathmine is dus zeer belangrijk niet enkel voor de vorming van een normale mitotische spoel bij de start van de mitose, maar ook voor de regulatie van de werking van de mitotische spoel in latere stadia van de mitose en voor het beëindigen van de mitose (93).

In fysiologische condities werd vastgesteld dat stathmine verhoogd tot expressie kwam in progenitors afkomstig uit de subventriculaire zone van mature hersenen. Deze verhoogde expressie van stathmine in progenitorcellen favoriseert het bipolaire, migrerende fenotype. Tijdens de differentiatie van de progenitorcellen daalde de expressieniveaus van stathmine, wat cruciaal is voor de complexe morfologische veranderingen tot oligodendrocyten. In biopten genomen van hersenmateriaal van MS-patiënten werd een verhoogde expressie gezien

van stathmine in de oligodendrocyt populatie, net zoals in de diermodellen van demyelinisatie. Door deze verhoogde expressie van stathmine wordt de migratie van progenitorcellen bevordert, waardoor de progenitorcellen snel kunnen migreren naar de gedemyeliniseerde gebieden in de hersenen. Maar er werd echter ook vastgesteld in *in vitro* studies dat deze verhoogde stathmineniveaus in mature oligodendrocyten, de cellen gevoeliger maken voor apoptotische stimuli (94).

Uit de differentiële analyse van de 2D-GE-gelen in deze studie werd een verhoogde expressie vastgesteld van het eiwit stathmine in het proteoom van de oligodendrocyt gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF. Bovendien werd het eiwit stathmine enkel bij het 2D-LC-experiment van het oligodendrocytstaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF geïdentificeerd. In een parallellopende studie werd het hersenproteoom van een EAE-rat vergeleken met het hersenproteoom van een gezonde controlerat met behulp van de 2D-GE-methode. Uit deze studie bleek een verhoogde expressie van het stathmine in het hersenproteoom van de EAE-rat. Om deze bevindingen betreffende de verhoogde expressie van stathmine in de oligodendrocyten gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF en in de hersenen van de EAE-rat verder te staven werden zowel Western blot-experimenten als immunohistochemische kleuringen uitgevoerd.

Western blot-experimenten werden uitgevoerd voor zowel de oligodendrocytstalen gekweekt in groeimedium en gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF, als voor de hersenstalen afkomstig van een EAE- en controlerat. Deze experimenten toonden stathmine-activiteit aan in zowel de hersenen van de EAE-rat als de hersenen van de controlerat. Ook is er lichte stathmine-activiteit zichtbaar in beide oligodendrocytstalen. Omwille van achtergrondkleuring kan er echter geen conclusie genomen worden betreffende verschillen in intensiteit tussen beide stalen. Bovendien werd er ook bijkomende activiteit waargenomen ter hoogte van 40 en 68 kDa. Deze activiteit is mogelijk te wijten aan een te hoge verdunning (1/5000) van het primaire stathmine-antilichaam.

Immunohistochemische kleuringen werden uitgevoerd op hersencoupees van een EAE-en controlerat, aangezien er geen coupees van primaire oligodendrocytculturen beschikbaar waren. Deze immunohistochemische kleuringen hadden tot de doel de hersengebieden en celtypen met stathmine-expressie te lokaliseren. Na het uittesten van vier verschillende verdunningen: 1/500, 1/1000, 1/2000 en 1/5000, bleek de verdunning van 1/2000 het beste resultaat te leveren (figuur 18). De kleuringen toonden aan dat er een duidelijke stathmine-

reactiviteit was in de oligodendrocyten aanwezig in de hersencoupe van de EAE-rat in tegenstelling tot de enkele sporadische oligodendrocyten met stathmine-reactiviteit gezien in de hersencoupe van de controlerat. Deze bevindingen stemmen overeen met deze in de literatuur. Liu en collega's toonden reeds een verhoogde expressie aan van stathmine in de oligodendrocyten in de hersenen van patiënten met MS. Zij maakten gebruik van paraffine-coupees van biopten van 10 MS-patiënten en 8 controlepersonen. Zij detecteerden slechts enkele occasionele immunoreactieve cellen in de hersenen van de controlepersonen, terwijl er meerdere immunoreactieve oligodendrocyten geobserveerd werden in alle 10 biopten van MS-patiënten. Deze data tonen aan dat stathmine in hogere niveaus tot expressie komt in de hersenen van MS-patiënten in vergelijking met controlepersonen. Ook vonden zij gelijkaardige resultaten in het transgene muismodel van spontane demyelinisatie, de ND4 muis. In deze muizen werd stathmine-immunoreactiviteit geobserveerd in beschadigde oligodendrocyten in het corpus callosum. Zij veronderstellen dan ook dat in fysiologische toestand en gedurende de ontwikkeling, stathmine tot expressie wordt gebracht in progenitorcellen van de subventriculair zone en dat deze expressie snel daalt na differentiatie van de cellen. In inflammatoire demyelinisatie, zoals in de hersenen van MS-patiënten, wordt stathmine echter tot expressie gebracht door mature oligodendrocyten (94).

In onze studies werd er echter niet gebruik gemaakt van een demyelinisatiemodel van MS, maar van het acute EAE-model, geïnduceerd door injectie van MBP. In dit model van experimentele auto-immune encephalomyelitis is er enkel sprake van inflammatie. We vermoeden dan ook dat de inflammatoire component de hoofdrol speelt bij de waargenomen verhoogde stathmine-expressie in EAE (deze studie) en MS (94). Dit werd reeds vermoed door Liu en collega's. Zij observeerden namelijk dat de stathmine-positieve cellen in de biopten van de MS-patiënten voornamelijk gelokaliseerd waren in gebieden met een sterke inflammatoire component. Om de invloed van cytokines op het expressieniveau van stathmine te bepalen, werden in deze studie primaire culturen van oligodendrocyten behandeld met ofwel TNF- $\alpha$  of TGF- $\beta$  gedurende 24 uren. Vervolgens werden de niveaus van stathmine vergeleken met deze in onbehandelde culturen. Er werd vastgesteld dat beide cytokine behandelingen resulteerden in verhoogde mRNA en proteïne niveaus van stathmine in vergelijking met onbehandelde controles. Deze data veronderstellen dan ook dat stathmine-expressie bevordert wordt door inflammatie (94).

Bovendien werd er in onze kleuringen stathmine-reactiviteit gedetecteerd in het infiltraat in de cuffs in de EAE-hersencoupe. Morfologische kenmerken wijzen in de richting van macrofagen. Om uitsluitsel te krijgen over het type celen aanwezig in het infiltraat is een

dubbelkleuring met CD68 noodzakelijk. Verdere studies zijn noodzakelijk om de rol van stathmine in de pathologie van EAE en MS te ontrafelen. Zo kunnen immunohistochemische studies op het hersenmateriaal van MS-patiënten uitwijzen of ook hier stathmine-activiteit ter hoogte van de perivasculaire cuffs aanwezig is. Indien bovendien aangetoond kan worden dat de macrofagen de stathmine-positieve populatie vormen in het infiltraat, kunnen *in vitro* studies bepalen welke factoren de statmine-expressie induceren. Daar de verhoogde expressie van stathmine in het infiltraat niet eerder werd aangetoond, blijft een intrigerende vraag wat de rol van deze verhoogde expressie in macrofagen is.

**Literatuurlijst**

1. Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray G. Proteomics: a new approach to the study of disease. *Journal of pathology* 2000;192:280-8.
2. Williams KL. Genomes and proteome: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis* 1999;20:678-88.
3. Lubec G, Krapfenbauer K, Fountoulakis M. Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Progress in neurobiology* 2003;611:1-19.
4. Harry JL, Wilkins MR, Herbert BR, Packer NH, Gooley AA, Williams KL. Proteomics: capacity versus utility. *Electrophoresis* 2000;21:1071-81.
5. Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001;36:1083-91.
6. Mitulović G, Stingl C, Smoluch M, Swart R, Chervet JP, Steinmacher I, Gerner C, Mechtler K. Automated, on-line two-dimensional nano liquid chromatography tandem mass spectrometry for rapid analysis of complex protein digests. *Proteomics* 2004;4:2545-57.
7. Dumont D, Noben J, Raus J, Stinissen P, Robben J. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Proteomics* 2004;4:2117-2124.
8. Zangar RC, Varnum SM, Covington CY, Smith RD. A rational approach for discovering and validating cancer markers in very small samples using mass spectrometry and ELISA microarrays. *Dis markers* 2004;20(3):135-48.
9. Puchades M, Hansson S, Nilsson C, Andreasen N, Blennow K, Davidsson P. Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Molecular brain research* 2003;118:140-146.
10. Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunologic Research* 2002;25/1:27-51.
11. Bar-Or A, Oliviera M, Anderson D, Hafler D. Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 199;100:252-9.
12. Raine C, Scheinberg L. On the immunopathology of plaque development and repair in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 1988;20:189-201.
13. Bonetti B, Stegagno C, Cannella B, Rizzuto N, Moretto G, Raine S. Short communication, Activation of NF- $\kappa$ B and c-jun transcription factors in multiple sclerosis lesions, implications for oligodendrocyte pathology. *American journal of pathology*, 1999;155(5):1433-8.
14. Van Noort H, Gerritse K, Claassen E. Multiple sclerose: een ontspoorde afweer? *Natuur en Techniek* 1992;60(12):939- 49.
15. O'Connor K, Bar-Or A, Hafler D. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *Journal of clinical immunology* 2001;21(2),81-90.
16. Hafler D. Multiple sclerosis. *The journal of clinical investigation* 2004;113(6):788-94.
17. Butcher E, Picker L. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272(5258): 60-6.
18. Shrikant P, Benveniste E. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol.* 1996;157(5):1819-22.
19. Freedman S, Ruijs T, Selin L, Antel J. Peripheral blood  $\gamma$ - $\delta$  T cells lyse fresh human brain-Derived oligodendrocytes. *Ann Neurol.* 1991;30(6):794-800.
20. Levine S. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 1992;39(3):271-4.

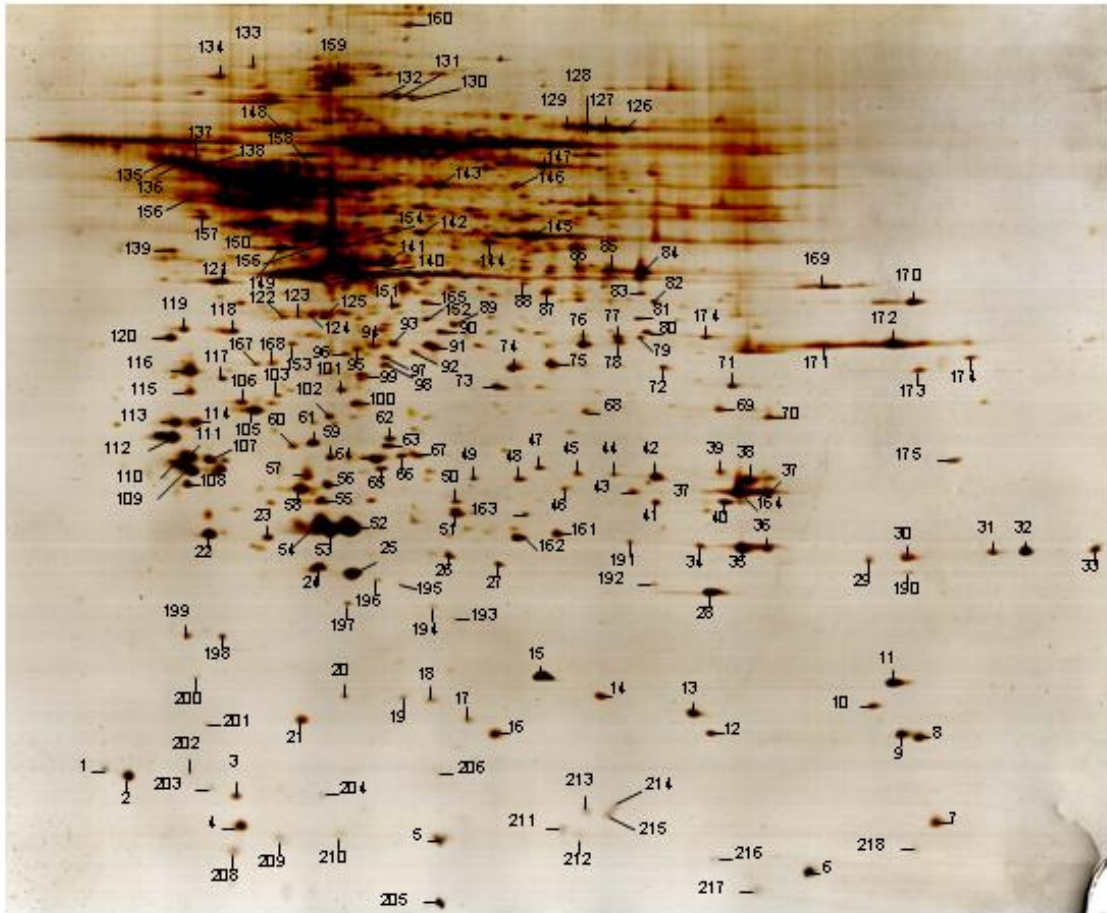


21. Xiao B, Linington C, Link H. Antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls. *J Neuroimmunol* 1991;31(2):91-6.
22. Martin R, Stürzebecher CS, McFarland HF. Immunotherapy of multiple sclerosis: Where are we? Where should we go? *Nature immunology* 2001;2(9):785-9.
23. Selmaj K, Raine C. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 1988;23(4):339-46.
24. Opdenakker G, Van Damme J. Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunol Today* 1994;15(3):103-7.
25. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47(6):707-17.
26. O'Connor KC, Bar-Or A, Hafler A. The neurimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 2001;21:81-92.
27. Cross AH. MS: the return of the B cell. *Neurology* 2000;54:73-6.
28. Genain CP, Canella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 1999;5:170-5.
29. Buntinx M, Stinissen P, Steels P, Ameloot M, Raus J. Immune-mediated oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Critical reviews in Immunology* 2002;22(5&6):391-424.
30. Buntinx M, Ameloot M, Steels P, Janssen P, Medaer R, Geusens P, Raus J, Stinissen P. Interferon-gamma-induced calcium influx in T lymphocytes of multiple sclerosis and rheumatoid arthritis patients: a complementary mechanism for T cell activation? *J Neuroimmunol* 2002;124:70-82.
31. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 1998;4:781-5.
32. Carrizosa AM, Nicholson LB, Farzan M, Southwood S, Sette A, Sobel RA, Kuchroo VK. Expansion by self antigen is necessary for the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells primed with a cross-reactive environmental antigen. *J Immunol* 1998;161:3307-14.
33. Benoist C, Mathis D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2001;2:797-801.
34. Zhang J, Vandevyver C, Stinissen P, Mertens N, Berg-Loonen E, Raus J. Activation and clonal expansion of human myelin basic protein-reactive T cells by bacterial superantigens. *J Autoimmun* 1995;8:615-32.
35. Ebers GC, Koopman WJ, Hader W, Sadovnick AD, Kremenchutzky M, Mandalfino P, Wingerchulk DM, Baskerville J, Rice GP. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study: 8: familial multiple sclerosis. *Brain* 2000;123:641-9.
36. Dalton CM, Brex PA, Miszkiel KA, Hickman SJ, MacManus DG, Plant GT, Thompson AJ, Miller DH. Application of the new McDonald criteria to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2002;52:47-53.
37. Sorensen PS. Biological markers in body fluids for activity and progression in multiple sclerosis. *Mult Scler* 1999;5:287-90.
38. Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996;45:322-33.
39. Dhib-Jalbut S. Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology* 2002;58:S3-S9.

40. Van Der Aa A, Hellings N, Medaer 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. *Clin Exp Immunol* 2003;131:155-68.
41. Vandebark AA, Chou YK, Whitham R, Mass M, Buenafe A, Liefeld D, Kavanagh D, Cooper S, Hashim GA, Offner H. Treatment of multiple sclerosis with T-cell receptor peptides: results of a double-blind pilot trial. *Nat Med* 1996;2:1109-15.
42. Weinshenker BG, Bass B, Karlik S, Ebers GC, Rice GP. An open trial of OKT3 in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1991;41:1047-52.
43. Racadot E, Rumbach L, Bataillard M, Galmiche J, Henlin JL, Truttmann M, Herve P, Wijdenes J. Treatment of multiple sclerosis with anti-CD4 monoclonal antibody. A preliminary report on B-F5 in 21 patients. *J Autoimmun* 1993;6:771-86.
44. Feldmann M, Maini RN, Bondeson J, Taylor P, Foxwell BM, Brennan FM. Cytokine blockade in rheumatoid arthritis. *Adv Exp Med Biol* 2001;490:119-27.
45. Hardy R, Reynolds R. Neuron-oligodendroglial interactions during central nervous system development. *J Neurosci Res* 1993;36:121-6.
46. De Vries H, Hoekstra D. On the biogenesis of the myelin sheath: cognate polarized trafficking pathways in oligodendrocytes. *Glycoconjugate journal* 2000;17:181-90.
47. Lubetzki C, Demerens C, Anglade P, Villarroya H, Frankfurter A, Lee VM-Y, Zalc B. Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;19:7913-24.
48. Morell P, Ousley AH. Metabolic turnover of myelin glycerophospholipids. *Neurochem Res* 1994;19(8):967-74.
49. Trapp BD, Bernier L, Andrews SB, Colman DR. Cellular and subcellular distribution of 2'3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase and its mRNA in the rat nervous system. *J Neurochem* 1988;51:859-68.
50. Schachner M, Bartsch U. Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia* 2000;29:154-65.
51. Braun PE, Sandillon F, Edwards A, Matthieu JM, Privat A. Immunohistochemical localization by electron microscopy of 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain. *J Neurosci* 1988;8:3057-66.
52. De Angelis DA, Braun PE. Isoprenylation of brain 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase modulates cell morphology. *J Neurosci Res* 1994;39:386-97.
53. Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 2001;24:39-47.
54. Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Van Evercooren AB. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 1999;11:4357-66.
55. Compston A. Remyelination of the central nervous system. *Mult Scler* 1996;1:388-92.
56. Raine CS. The norton lecture: a review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol* 1997;77:135-52.
57. Wolswijk G. Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci* 1998;18:601-9.
58. Keirstead HS, Blakemore WF. Identification of post-mitotic oligodendrocytes incapable of remyelination within the demyelinated adult spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:1191-1201.
59. Lassmann H, Vass K. Are current immunological concepts of multiple sclerosis reflected by the immunopathology of its lesions? *Springer Semin Immunopathol* 1995;17:77-87.

60. Kornek B, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis - new concepts. *Brain research bulletin* 2003;61:321-6.
61. Soldan M, Rodriguez M. Heterogeneity of pathogenesis in multiple sclerosis: implications for promotion of remyelination. *JID* 2002;186: 248-53.
62. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *TRENDS in molecular medicine* 2001;7(3):115-21.
63. Arnett HA, Wang Y, Matsushima GK, Suzuki K, Ting JPY. Functional genomic analysis of remyelination reveals importance of inflammation in oligodendrocyte regeneration. *The journal of neuroscience*, 2003;23(30):9824-32.
64. Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassman H, Kollias G, Probert L. Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signalling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *PNAS*, 2003;100(2):709-14.
65. DrØjdahl N, Fenger C, Nielsen HH, Owens T, Finsen B. Dynamics of oligodendrocyte responses to anterograde axonal (wallerian) and terminal degeneration in normal and TNF-transgenic mice. *Journal of neuroscience Research* 2004;75:203-17.
66. Butzkueven H, Zhang JG, Soilu-hanninen M, Hochrein H, Chionh F, Shipham KA, Emery B, Turnley AM, Petratos S, Ernst M, Bartlett P, Kilpatrick T. LIF receptor signalling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nat Med* 2002;8(6):613-19.
67. Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Gies R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* 2002;8(6):620-4.
68. Moon C, Yoo JY, Matarazzo V, Sung YK, Kim EJ, Ronnett GV. Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. *PNAS* 2002;99(13):9015-20.
69. Kerr BJ, Patterson PH. Leukemia inhibitory factor promotes oligodendrocyte survival after spinal cord injury. *Glia* 2005;51(1):73-9.
70. Patton WF, Schulenberg B, Steinberg TH. Two-dimensional gel electrophoresis; better than a poke in the ICAT?
71. Wilson KE, Ryan MM, Prime JE, Pashbly DP, Orange PR, O'Beirne G, Whateley JG, Bahn S, Morris CM. Functional genomics and proteomics: application in neurosciences. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:529-38.
72. Bergquist J, Gobom J, Blomberg A, et al. Identification of nuclei associated proteins by 2D-gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Neurosci Methods* 2001;109:3-11.
73. Koseki N, Kawashita H, Niina M, Nagae Y, Masuda N. Development and validation for high selective quantitative determination of metformin in human plasma by cation exchanging with normal-phase LC/MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2005;36:1063-72.
74. Berg D, Holzmann C, Ries O. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nature reviews neuroscience* 2003;4:752-62.
75. Satoh JI, Ykitake M, Kurohara K, Takashima H, Kuroda Y. Detection of the 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of Japanese multiple sclerosis patients presenting with severe myelitis. *Journal of neurological sciences* 2003;212:11-20.
76. Kawamoto Y, Akiguchi I, Kovacs GG, Flicker H, Budka H. Increased 14-3-3 immunoreactivity in glial elements in patients with multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 2004;107(2):137-43.
77. Goldbaum O, Richter-Landsberg C. Stress proteins in oligodendrocytes: differential effects of heat shock and oxidative stress. *Journal of neurochemistry* 2001;78:1233-42.

78. Cwiklinska H, Mycko MP, Luvsannorov O, Walkowiak B, Brosnan CF, Raine CS, Selmaj KW. Heat shock protein 70 associations with myelin basic protein and proteolipid protein in multiple sclerosis brains. *International Immunology* 2003;15(2):241-9.
79. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7369-75.
80. Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2,  $\alpha$ -enolase and heat shock cognate 71. *Journal of neurochemistry* 2002;82:1524-32.
81. Minich T, Yokota S, Dringen R. Cytosolic and mitochondrial isoforms of NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenases are expressed in cultured rat neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells. *Journal of neurochemistry* 2003;86:605-14.
82. Witke W. The role of profiling complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends in Cell Biology* 2004;14(8):461-9.
83. Sakai J, Ishikawa H, Kojima S, Satoh H, Yamamoto S, Kanaoka M. Proteomic analysis of rat heart in ischemia and ischemia-reperfusion using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* 2003;3:1318-24.
84. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology.
85. Hunter TC, Andon NL, Koller A, Yates III JR, Haynes PA. The functional proteomics toolbox: methods and applications. *Journal of chromatography B* 2002;782:165-181.
86. Karp NA, Griffin JL, Lilley KS. Application of partial least squares discriminant analysis to two-dimensional difference gel studies in expression proteomics. *Proteomics* 2005;5:81-90.
87. Diakonova M, Gerke V, Ernst J, Liutard JP, Vusse van der G, Griffiths G. Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *Journal of cell science* 1997;110:1199-1213.
88. Elderfield AJ, Newcombe J, Bolton C, Flower RJ. Lipocortins (annexins) 1,2,4 and 5 are increased in the central nervous system in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992;39(1-2):91-100.
89. Han S, Zhang KH, Lu PH, Xu XM. Effects of annexins II and V on survival of neurons and astrocytes in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25(5):602-10.
90. Allen G., Liu JW, Kirby MA, Leon De M. Induction and axonal localization of epithelial/epidermal fatty acid-binding protein in retinal ganglion cells are associated with axon development and regeneration. *Journal of neuroscience research* 2001;66:396-405.
91. Denslow N, Michel ME, Temple MD, Hsu CY, Saatman K, Hayes RL. Application of proteomics technology to the field of neurotrauma.
92. Gevaert K, Van Damme J, Goethals M, Thomas GR, Hoorelbeke B, Demol H, Martens L, Puype M, Staes A, Vandenderckhove J. Chromatographic isolation of methionine-containing peptides for gel-free proteome analysis. *Molecular & cellular proteomics*
93. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 2004;93(2):242-50.
94. Liu A, Stadelmann C, Moscarello W, Sobel A, Mastronardi FG, Casaccia-Bonnet P. Expression of stathmin, a developmentally controlled cytoskeleton-regulating molecule, in demyelinating disorders. *J Neurosci* 2005;25(3):737-747.

**Bijlage**

**Figuur 19: Proteoomkaart van de oligodendrocyt van de volwassen rat**

Volwassen Wistar ratten werden gedecapiteerd en hersenen werden geïsoleerd. Uit deze hersenen werden vervolgens de oligodendrocyten geïsoleerd en in cultuur gebracht gedurende 10 dagen. Nadien werden de proteïnen geëxtraheerd, gevolgd door een eiwitbepaling. Honderd  $\mu$ g eiwit werd onderworpen aan IEF, gebruik makend van lineaire IPG-strips met een pH-gebied van 3 tot 10, gevolgd door SDS-PAGE en zilverkleuring.

**Tabel A: Proteïnen van de oligodendrocyt geïdentificeerd met behulp van 2D-GE gekoppeld aan LC-MS/MS**

Spot nr	Accessienummer	Proteïne	Massa
1	Q64119	myosin light chain	16950
2	Q64119	myosin light chain	16950
6	P01941	hemoglobin alpha chain	14945
7	P10924	profilin 1	14817
8	P10111	cyclophilin A	17732
9	P10111	cyclophilin A	17732
10	Q9R0P5	destrin	18510
11	P18760	cofilin1	18548
12	Q9RO63	peroxiredoxin 5	22165
13	Q01768	nucleoside diphosphate kinase B	17352
14	Q9R0P5	destrin	18510
15	P18760	cofilin	18548
16	AAA40996	superoxide dismutase Cu, Zn	15670
17	Q01768	nucleoside diphosphate kinase B	17352
19		actin related protein 2/3 complex subunit 5	34808
21		beta hemoglobin	15783
22	P14701	translationally controlled tumor protein	19450
23b		collagen alpha 1	139704
24	Q61171	peroxiredoxin 2	21765
25	P31044	phosphatidylethanol-binding protein	20657
		dermicidin	11391
26	P36972	adenine phosphoribosyltransferase	19533
27	P31399	ADP synthase D chain	18621
28	P23928	alpha crystallin B keten	20076
29	P09671	superoxide dismutase Mn	24588
30	Q63716	peroxiredoxin	22095
32	P31232	transgelin	22457
33	P31232	transgelin	22457
34	P04906	glutathione S transferase	23293
35	P04906	glutathione S transferase	23293
36	P04906	glutathione S tranferase	23293
37	P11348	dihydropterine reductase	25536
38	P16015	carbonic anhydrase III	29217
40	P48500	triose phosphate isomerase	26773
41 b	P48500	triose phosphate isomerase	27417
42	AAH62302	phosphoglycerate mutase 1	28801
43	P11348	dihydropterine reductase	25536
46	P60901	proteasome subunit alpha type 6	27382
47	P27605	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	24462
48	P52555	endoplasmic reticulum protein 29	28557
49b		collagen alpha 1	139704
50	P42930	heat shock protein 27	22879

*Bijlage*

<b>Spot nr</b>	<b>Accessienummer</b>	<b>Proteïne</b>	<b>Massa</b>
51	O35244	perroxioredoxin 6	24672
52	P02551	tubulin alpha 1 chain	50104
53		tubulin alpha 3 chain	50748
54	P60710	beta actin	41710
56	Q64537	calpain smal subunit 1	28062
57	P00787	cathepsin B	37446
58	Q99PT1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	23393
59	Q99PT1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	23393
	O70435	proteasome subunit alpha type3-like	28256
60	P97697	inositol-1-monophosphatase	30491
	Q9Z1Q5	chloride intracellular channel protein 1	26996
61	Q9Z1Q5	chloride intracellular channel protein 1	26996
62	Q63798	protasome activator complex subunit 2	26840
63	P24142	proinhibitin	29802
64	Q9QYB1	chloride intracellular channel protein 4	28711
65		6-phosphogluconolactonase	31144
65b	Q9ROP9	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isoenzyle L1	25096
66	P97371	proteasome activator complex subunit 1	28655
67	Q61206	platelet-activating factor acetylhydrolase 1 beta subunit	25476
68	P23492	purine nucleoside phosphorylase	32256
69	Q99LC5	electron tranfer flavoprotein alpha sunubit	35018
	Q60930	voltage-dependent anion-selective channel protein 2	31713
70		guanine nucleotide-binding protein	31398
71	Q08093	calponin H2	33134
	O70433	skeletal muscle LIM-3 protein 3	32051
	P12843	insulin-like growth factor binding protein 2	32861
72	P52944	LIM protein	35503
73	P14669	annexin A3	36300
74	P14152	malate dehydrogenase	36323
	P13707	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	37417
		proteasome 26S subunit	28868
75	P13707	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	37417
76	P13707	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	37417
	P07943	aldolase reductase	35643
77	Q8VDQ8	NAD-dependent deacetylase sirtuin 2	43228
	P13707	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	37417
78	Q61792	LIM and SH3 domain protein	29975
	P16858	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35656
	Q8VDQ8	NAD-dependent deacetylase sirtuin 2	43228
79	Q9EQS0	transaldolase	37453
80	P07150	annexin A1	38674
82	P60335	poly(rc)-binding protein 1	37474
83	P25093	fumarylacetoactate hydrolase	45946
84	P09606	glutamine synthetase	42240
85	P09606	glutamine synthetase	42240
86	P61164	alpha-centractin	42587

*Bijlage*

<b>Spot nr</b>	<b>Accessionnummer</b>	<b>Proteïne</b>	<b>Massa</b>
87	P61161	actin-like protein 2	44732
	Q99KV1	DnaJ (HSP40) homolog subfamily B member 11	40530
88	P24452	macrophage capping protein	39216
	P42208	septin 2	41499
89	P50213	isocitrate dehydrogenase 3	39566
90	Q9CWS0	dimethylarginase 1	31230
	P42123	L-lactate dehydrogenase B chain	36458
91	P19945	60S acidic ribosomal protein P0	34194
92	P47754	F-actin capping protein alpha-2 subunit	32816
93	P07724	serum albumin	68648
93b		collagen alpha 1	139704
94	P47753	F-actin capping protein alpha-1 subunit	32919
95	P13353	protein phosphatase type 2A catalytic subunit alpha	35585
96	Q9QYU4	Mu-crystallin homolog	33533
97	P54311	guanine nucleotide-binding protein	37369
98	P54311	guanine nucleotide-binding protein	37369
99	P49432	pyruvate dehydrogenase E1	38823
100	P55260	annexin A4	35695
101	Q9DB05	alpha-soluble NSF attachment protein	33168
102		microtubule-associated protein	30168
103		similar to nonclathrin coat protein epsilon-cop	34860
104	Q9D8Y0	EF-hand domain-containing protein 2	26775
105	P14668	annexin A5	35591
107	P61982	14-3-3 protein gamma	28154
108	Q9Z2U1	proteasome unit alpha type 5	26394
109	P35215	14-3-3 protein zeta/delta	27754
110	P35216	14-3-3 protein tau	27761
111	Q70456	14-3-3 sigma	27696
112	P62259	14-3-3 protein epsilon	29155
113	P09495	tropomyosin alpha4 chain	28493
114	AAA21801	tropomyosin alpha	32675
		Ig light chain	25886
115	BAD 18535	tropomyosin 3 fibroblast	37453
116	AAA21801	tropomyosin alpha	32675
117b	Q7TQI3	ubiquitin thiolesterase protein	31250
118	P51863	vacuolar ATP synthase subunit d	40275
119	BAD18535	similar to tropomyosin fibroblast isoform 2	37430
120	P09495	tropomyosin alpha4 chain	28493
121	P38983	40S ribosomal protein SA	32803
122	Q9Z1Z2	serine-threonine kinase receptor-associated protein	38489
124	Q9R0N0	galactokinase 1	42149
125	P08752	guanine nucleotide-binding protein G	40314
126		hemiferrin	24874
127		hemiferrin	24874
128		hemiferrin	24874
129		hemiferrin	24874
130	P13020	gelsolin	85888
131	P13020	gelsolin	85888



*Bijlage*

<b>Spot nr</b>	<b>Accessionnummer</b>	<b>Proteïne</b>	<b>Massa</b>
132b		collagen alpha 1	139704
134	P08113	endoplasmin	92418
139	P29315	ribonuclease inhibitor	49873
140	P60710	cytoplasmic actin 1	41710
141	P07335	creatine kinase	42685
	P60710	cytoplasmic actin 1	41710
142	P07335	creatine kinase	42685
143	P11598	protein disulfide isomerase A3 GRP58	56588
144b	Q61598	GDP dissociation inhibitor beta 2	50537
145	P04764	alpha enolase	47040
	Q62465	synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	15193
146	P04764	alpha enolase	47040
147	P47942	dihydropyrimidinase related protein 2	62239
148	P20029	glucose-regulated protein 78	72378
149	P07323	enolase 2	46980
150	P10719	ATP synthase beta chain 1	56319
	P17183	enolase gamma	47136
151	P10719	ATP synthase beta chain	56319
153		sec 1311 protein	36014
154	Q9CZ13	ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein I	52735
155	Q9DCH4	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 5	37976
156	Q05306	collagen alpha chain 1	66775
157	Q9CZC8	secernin	46297
159	P46462	transitional endoplasmic reticulum ATPase	89349
160	Q61937	nucleophosmin	32560
161	P08122	collagen alph 2	167392
163	Q9R1P1	proteasome beta 3 subunit	22965
164	P11348	dihydropteridine reductase	25536
165	P11348	dihydropteridine reductase	25536
		collagen alpha 1	139704
166	P51635	alcohol dehydrogenase	36352
167		collagen alpha 1	139704
168		collagen alpha 1	139704
		thioredoxin like 1	32630
169	AAH63161	phosphoglycerate kinase	44510
170	P05064	fructose biphosphate aldolase A	39200
171	P16858	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35656
172	P04797	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35682
173	P04642	lactate dehydrogenase A chain	36427
174	P04636	malate dehydrogenase mitochondrial	35633
176		collagen alpha 1	139704
177		collagen alpha 1	139704
178	Q60930	voltage dependent anion selective channel protein 2	31713
179	Q60605	myosin light polypeptide 6	16788
180		collagen alpha 1	139704
181		collagen alpha 1	139704
182	P13668	stathmin	17147

*Bijlage*

<b>Spot nr</b>	<b>Accessionnummer</b>	<b>Proteïne</b>	<b>Massa</b>
183		collagen alpha 1	139704
184	P60710	beta actin	41709
185	P60710	beta actin	41709
186	P55053	fatty acid binding protein (epidermal)	15049
	P04906	glutathione S-transferase P	23293
187		statherin	5204
188		collagen alpha 1	139704
189		nonclathrin coat protein	34860
190	Q9WVA4	transgelin 2	23582
191	P04906	glutathione S-transferase P	23293
192	Q9JL62	glycolipid transfer protein	23543
		collagen alpha 1	139704
195	Q01149	collagen alpha 2	129478
196		collagen alpha 1	139704
197		gorcin	20568
198	Q9C6I8	probable nucleolar GTP binding protein 1	76800
199	P13832	myosin regulatory light chain 2-A	19752
201		collagen alpha 1	139704
202		collagen alpha 1	139704
203		collagen alpha 1	139704
204		collagen alpha 1	139704
206		collagen alpha 1	139704
208	P10639	thioredoxin	11537
209		collagen alpha 1	139704
210	P51880	fatty acid binding protein	14752
211		collagen alpha 1	139704
213		collagen-alpha 1	139704
216	P02088	hemoglobin beta chain	15699
217		collagen apha 1	139704
218		collagen alpha 1	139704
219+244	P60710	beta actin	41710
219+245	P08113	endoplasmin precursor	92418
219+246		desmoplakin	329870
219+247		histone	15043
219+248		endothelial monocyte activating polypeptide	16185
219+249		14-3-3 protein sigma	28584
219+250	P63102	14-3-3 protein zeta	30039
219+251	P62260	14-3-3 protein epsilon	29155
219+252	P04906	glutathione-S-transferase	24324
224	P60710	beta actin	41710
235	P60710	beta actin	41710
235	P08113	endoplasmin	92418
220+246	Q64599	hemiferrin	24076
220+247	P07724	serum albumin	68648
221+247	Q64599	hemiferrin	24076
222+248	Q64599	hemiferrin	24076
243+258	P21107	tropomyosin 3	32843
240	XP_214309	similar nonclathrin coat protein epsilon-COP	34632

*Bijlage*

<b>Spot nr</b>	<b>Accessionnummer</b>	<b>Proteïne</b>	<b>Massa</b>
237+255	Q5XFW8	sec 13 like 1 protein	35525
237+256	Q68FR9	similar eukaryotic translation factor 1 delta	72083
238+256	Q920J4	thioredoxin-related protein	32229
238+257	Q68FR9	eukaryotic translation initiation factor -1-delta	72083
239+257	Q68FR9	eukaryotic translation initiation factor -1-delta	72083
239+257	P02650	apolipoprotein E	35731
242+286	XP_223189	similar to Riken cDNA 2310057D15	28857
242+287	P68136	actin	42024
228	P15999	H <sup>+</sup> transporting two sector ATPase	59717
228		alfa tubulin	50748
229	XP_344977	similar to 26S proteasome subunit p40.5	42790
229	Q921N4	3(2),5-biphosphate nucleotidase	33153
230+250	Q6PCV2	malate dehydrogenase 1,NAD	36460
230+250	035077	glycerophosphate dehydrogenase	38686
230+250	XP_215745	26S proteasome associated pad1 homolog	41099
236+282	Q66HR2	hypothetical protein	29985
225		similar to hypothetical protein ORF-1137	28802
231	P63245	guanine nucleotide-binding protein beta polypeptide 2-like 1	
232	P08699	galectin-3	27212
245	Q64599	hemiferrin	24076
	P60711	actin, cytoplasmic 1	41710
249	P07335	creatine kinase	44782
	XP_216398	N-acetyl neuraminic acid synthase	40025
251	XP_344977	proteasome 26S subunit p40.5	42790
		electron transfer flavoprotein alfa subunit	31442
252	XP_344977	similar to proteasome 26S subunit p40.5	42790
252		(2),5-biphosphate nucleosidase	33153
253	Q5XFW8	sac 13 like-1	35525
254	P47819	glial fibrillary acidic protein	49913
259	Q6P7Q4	glyoxylase 1	20806
260	P22734	catechol O-methyltransferase	29578
261	P60711	actin, cytoplasmic 1	41710
262	Q6PEDO	polyubiquitin	17940
266		membrane protein, palmitoylated 3	
267+296	P04906	glutathione -S-transferase	24324
267+296	P07724	serum albumin	68648
274	XP_216398	N-acetyl neuraminic acid synthase	40025
275	P08699	galectin-3	27212
276	P27139	carbonic anhydrase 2	29096
276		Ig heavy chain	52112
268	P02650	apolipoprotein E	35731
268	P52555	endoplasmic reticulum protein 29	28557
269	P10868	guanidinoacetate methyltransferase	26390
277	P48500	triosephosphate isomerase I	26904
279	P10868	guanidinoacetate methyltransferase	26390
280	Q63228	glia maturation factor, beta	16726

*Bijlage*

<b>Spot nr</b>	<b>Accessionnummer</b>	<b>Proteïne</b>	<b>Massa</b>
281	P97697	inositol-1	30491
270	XP_213793	glycolipid transfer protein	38311
271	P01041	cystatin B	11189
273	P11762	beta galactoside binding lectin	14847
272	Q5V318	similar to phosphoprotein enriched in astrocytes 15	29481
283	Q6PCV2	malate dehydrogenase	36460
283	XP_215745	similar to 26S proteasome associated pad1 homolog	41099
284	XP_214296	6-phosphogluconolactonase	30802
285	XP_215403	myristolated alanine rich C kinase substrate	29767
287	P13832	myosin RLC-A	19883
288	Q64122	myosin regulatory light chain-2	19585
291+292	P61980	heterogenous nuclear ribonucleoprotein K	50944
293	P02688-4	myelin basic protein	14202
293	P60711	actin	41710
293	P68370	tubulin alfa 1 chain	50104
294+295	088767	DJ-1 protein	19961
294+295	P08699	galectin-3	19961
297	P30033	guanine nucleotide binding protein, alfa subunit 2	39924
298		cofilin 1	

De nummers van de spots komen overeen met de respectievelijke spotnummers in figuur 1 van de bijlage. Massa slaat op het theoretisch molecuulgewicht van het proteïne en werd teruggevonden met behulp van de Swissprot-databank.

**Tabel B: Overzicht van de geïdentificeerde proteïnen van het oligodendrocytaal gekweekt in enkel groeimedium door middel van 2D-LC**

Proteïne	Accessie-nummer	Massa	pI	Aantal peptiden	AZ coverage	Mascot score
Aldolase A	P05065	39352	8.1	1	6.3%	59
14-3-3 protein epsilon	P62260	29174	4.7	9	46.3%	-
14-3-3 protein tau	P68255	27778	4.8	2	11.0%	-
60S acidic ribosomal protein P1	P19944	11498	4.3	1	14.0%	54
60S acidic ribosomal protein P2	P02401	11692	4.5	3	50.4%	-
78 kDa glucose-regulated protein precursor	P06761	72347	5.2	9	18.3%	-
Actin, alpha skeletal muscle	P68136	42051	5.4	8	19.6%	-
Actin, cytoplasmic 1	P60711	41737	5.5	12	33.1%	-
AHNAK-related protein	Q8VHJ0	10355	4.8	1	12.5%	59
ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial precursor	P21571	12494	9.4	1	17.6%	70
Beta-galactoside-Binding lectin	P11762	14857	5.3	1	5.9%	23
Calnexin precursor	P35565	67255	4.6	1	2.0%	42
Calreticulin precursor	P18418	47996	4.5	6	18.8%	-
Ckb protein	P07335	45248	5.7	4	15.0%	-
Cofilin 1	P45592	18533	8.1	5	30.7%	-
Diazepam binding inhibitor	P11030	10027	8.8	2	27.6%	-
Dihydropyrimidinase related protein-2	P47942	62278	6.4	1	2.6%	40
Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	P52555	28575	6.6	1	4.6%	34
Galectin-3	P08699	27230	8.9	4	13.7%	-
Gelsolin	Q68FP1	86585	7.4	1	2.2%	39
Glutamine synthetase	P09606	42268	7.1	2	6.4%	-
Glutathione S-transferase P	P04906	24339	7.4	1	7.3%	111
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	Q07439	70185	5.8	1	2.0%	53
Heat shock protein 86	Q91XW0	84815	5.0	2	4.1%	-
Hemiferrin	Q64599	24091	7.7	4	20.8%	-
High mobility group box 1	P63159	24894	5.7	1	6.0%	30
Hypothetical protein	Q6AYC4	38799	6.5	2	10.3%	-
Hypothetical protein	Q5U206	16803	4.3	2	7.4%	-
Hypothetical protein						
MGC73008	Q6P9T8	49801	4.9	4	14.2%	-
Lamin C2	P70482	52636	6.6	1	3.5%	37
Mitochondrial H <sup>+</sup> -ATP synthase alpha subunit	P15999	59754	9.2	1	2.9%	52
Myelin basic protein	P02688-4	14211	11.8	2	9.4%	-
Nestin	Q8CJ14	208795	4.3	1	1.0%	42
Non-muscle caldesmon	Q62736	60584	6.6	3	8.1%	-

*Bijlage*

<b>Proteïne</b>	<b>Accessie- nummer</b>	<b>Massa</b>	<b>pI</b>	<b>Aantal peptiden</b>	<b>AZ coverage</b>	<b>Mascot score</b>
NSFL1 cofactor p47	O35987	40680	5.1	2	8.6%	-
Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate	Q9EPJ0	27140	5.1	1	7.8%	40
Nuclease sensitive element binding protein 1	P62961	35730	9.9	3	17.4%	-
Nucleoside diphosphate kinase A	Q05982	17193	6.3	2	20.4%	-
PAM COOH-terminal interactor protein 1	O88869	49545	5.3	1	1.6%	16
PeptidylProlyl isomerase A	P10111	17874	8.2	1	5.5%	17
Peroxiredoxin 1	Q63716	22109	8.1	2	8.0%	-
Pgam1 protein	Q6P0K6	28832	7.2	2	10.6%	-
Phosphatidylethanolamine- binding protein	P31044	21609	6.3	4	35.2%	-
Protein disulfide isomerase- related protein	Q63081	48760	5.2	2	7.9%	-
Protein disulfide-isomerase precursor	P04785	56951	4.9	7	12.8%	-
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	Q5XI73	23407	5.2	7	29.9%	-
Ribonuclease inhibitor	P29315	49905	4.8	1	3.3%	37
S100 protein, beta polypeptide	P04631	10744	4.5	1	16.3%	31
Similar to 17,000 dalton myoSin light chain	Q64119-2	16961	4.6	3	23.2%	-
Similar to 40S ribosomal protein S20	XP_233378	13377	9.9	1	10.1%	37
Similar to Alpha enolase (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Non-neural enolase) (NNE) (Enolase 1)	XP_214456	39351	6.6	2	5.3%	-
Similar to beta-2- Syntrophin	XP_344765	54988	8.9	1	2.0%	29
Similar to CG31613-PA	XP_344596	101534	10.6	2	2.4%	-
Similar to deStrin - rat	XP_345074	20133	8.3	1	7.3%	66
Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	XP_343581	24676	4.7	2	14.7%	-
Similar to glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) (EC 1.2.1.12) - mouse	XP_224464	35258	8.7	2	7.4%	-

Proteïne	Accessie-nummer	Massa	pI	Aantal peptiden	AZ coverage	Mascot score
Similar to KIAA1074 protprotein	XP_232319	212077	5.9	1	0.4%	22
Similar to MyriStoylated alanine-rich C-kinaSe SubStrate (MARCKS)	XP_215403	29784	4.3	1	7.1%	48
Similar to non-POU-domain-containing, octamer binding protein	XP_228554	54925	8.9	1	2.1%	14
Similar to RiboSome-binding protein 1 (RiboSome receptor protein) (mRRp)	XP_230637	144411	9.0	1	1.3%	65
Similar to Serine (or cySteine) proteinaSe inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinaSe, antitrypSin), member 9	XP_234518	46841	9.6	1	2.4%	21
Similar to TranSlationally controlled tumor protein (TCTP) (p23) (21 kDa polypeptide) (p21) (LenS epithelial protein)	XP_344073	55883	6.8	1	2.7%	91
Similar to Ubiquinol-cytochrome C reductaSe complex 11 kDa protein, mitochondrial precuSor (Mitochondrial hinge protein) (Cytochrome C1, nonheme 11 kDa protein) (Complex III Subunit VIII)	XP_345569	10424	5.0	1	16.9%	45
Similar to ZO-1	XP_218747	215530	6.4	1	0.7%	29
Splice Isoform 1 Of Nucleophosmin	P13084-1	32560	4.8	3	11.6%	-
Splice Isoform 1 Of SET protein	Q63945-1	33406	4.3	2	11.1%	-
Splice Isoform 2 Of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	Q6AXS5-2	42984	8.4	1	4.1%	65
Splice Isoform 2 Of Reticulon 4	Q9JK11-2	38822	4.8	2	15.3%	-
Sulfated glycoprotein 1 precursor	P10960	61124	5.2	10	13.9%	-
Superoxide diSmutaSe 1	P07632	15912	6.4	3	16.2%	49
Sushi repeat-containing protein SRPX precursor	Q63769	51560	8.6	1	2.6%	17
Thioredoxin	P11232	11673	4.9	2	12.4%	-

Proteïne	Accessie-nummer	Massa	pI	Aantal peptiden	AZ coverage	Mascot score
Transgelin	P31232	22603	8.8	1	4.5%	66
Tropomyosin	Q63610	29007	4.8	7	18.5%	-
Tropomyosin alpha 4 chain	P09495	28510	4.7	6	11.7%	-
Trypsin I, anionic precursor	P00762	25959	4.9	2	8.1%	-
Tubulin alpha-1 chain	P68370	50136	5.1	5	16.6%	-
Tubulin beta-5 chain	P69897	49671	4.9	4	14.2%	-
Vimentin	P31000	53733	5.1	24	34.1%	-
lysine 3-monooxygenase/Tryptophan 5-monooxygenase						
actin						
gamma polypeptide	P61983	28303	4.9	2	10.9%	-
Ywhaz protein	P63102	30058	4.9	3	17.0%	-

Massa slaat op het theoretisch molecuulgewicht en pI op het theoretisch isoelektrisch punt. Beide waarden werden teruggevonden met behulp van de Swissprot-databank. Coverage staat voor de aminozuurovereenkomst die werd teruggevonden met behulp van massaspectrometrie en het softwareprogramma Sequest, waarbij er gekeken werd naar Xcorr en dCN. Het aantal peptiden staat voor het aantal verschillende peptiden gebruikt voor de identificatie van het overeenkomstige eiwit. De Mascot-score werd teruggevonden met behulp van het softwareprogramma Mascot en de NCBI-nr-databank en slaat ook op de overeenkomst in aminozuren.



**Tabel C: Overzicht van de geïdentificeerde proteïnen van het oligodendrocytaal gekweekt in groeimedium gesupplementeerd met LIF door middel van 2D-LC**

Proteïne	Accessienummer	Massa	pI	Aantal peptiden	AZ coverage	Mascot Score
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	P26772	11001	8.9	4	34.0%	-
14-3-3 protein epsilon	P62260	29174	4.7	5	18.4%	-
24-kDa subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase	P19234	27378	6.7	1	4.0%	30
26S protease regulatory subunit 4	P62193	49185	6.2	1	4.5%	50
60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	P63039	61068	6.7	1	1.6%	34
60S acidic ribosomal protein P0	P19945	34215	6.2	1	9.8%	56
60S acidic ribosomal protein P2	P02401	11692	4.5	4	62.6%	-
78 kDa glucose-regulated protein precursor	P06761	72347	5.2	5	9.3%	-
Actin, cytoplasmic 1	P60711	41737	5.5	10	29.6%	-
AHNAK-related protein	Q8VHJ0	10355	4.8	2	21.9%	-
Aldolase A	P05065	39352	8.1	4	15.1%	-
Allograft inflammatory factor-1	P55009	16827	8.3	1	6.8%	21
Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	P24090	37982	6.5	1	2.0%	24
Alpha-actinin 4	Q9QXQ0	104786	5.4	1	1.2%	32
Annexin 5	P14668	35773	5.0	1	3.4%	42
Annexin III	P14669	36363	6.4	2	6.8%	-
Anxa6 protein	P48037	75756	5.6	3	7.4%	-
ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P10719	56503	5.3	2	5.5%	-
ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial precursor	P21571	12494	9.4	1	17.6%	56
Beta-galactoside-Binding lectin	P11762	14857	5.3	1	5.9%	29
Beta-synuclein	Q63754	14504	4.5	1	18.2%	66
Brain abundant, membrane attached signal protein 1	Q05175	21790	4.5	1	10.5%	46
Calmodulin 3	P62161	16838	4.2	4	22.1%	-
Calnexin precursor	P35565	67255	4.6	2	4.7%	-
Calpastatin	Q99MG2;O55153	64446	4.9	1	3.0%	78
Calreticulin precursor	P18418	47996	4.5	5	10.3%	-

*Bijlage*

<b>Proteine</b>	<b>Accessienummer</b>	<b>Massa</b>	<b>pI</b>	<b>Aantal peptiden</b>	<b>AZ coverage</b>	<b>Mascot Score</b>
CAP, adenylate cyclase-associated protein 1	Q08163	51547	7.5	1	3.8%	64
Cathepsin D precursor	P24268	44681	7.1	3	8.8%	-
CD63 antigen	P28648	25699	7.6	1	2.9%	40
CD9 antigen (p24)	P40241	25215	7.3	1	3.1%	19
Ckb protein	P07335	45248	5.7	2	10.8%	-
Cofilin 1	P45592	18533	8.1	3	11.4%	-
Collagen alpha 1	P02454	60615	9.8	1	1.3%	29
Complement component 1, q subcomponent binding protein	O35796	30997	4.9	1	7.2%	30
Cystatin B	P01041	11196	6.3	1	21.4%	30
Dermcidin	Q71DI1	11284	6.5	1	10.0%	31
Diazepam binding inhibitor	P11030	10027	8.8	1	20.7%	47
Dihydropteridine reductase	P11348	25552	7.8	3	20.7%	-
Dihydropyrimidinase related protein-2	P47942	62278	6.4	1	1.9%	26
DJ-1 protein	O88767	19974	6.8	1	14.3%	59
Elongation factor 1-alpha 1	P62630	50114	9.0	1	1.7%	22
Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	P52555	28575	6.6	1	3.1%	18
Enolase 1, alpha	P04764	47116	6.6	5	11.1%	-
Epoxide hydrolase 1	P07687	52582	8.5	1	2.0%	16
Fatty acid-binding protein, epidermal	P55053	15059	7.2	2	13.3%	-
Fucinin 3	P80349	4480	4.2	1	46.2%	50
Galectin-3	P08699	27230	8.9	3	13.7%	-
Glucosidase, alpha; acid	Q6P7A9	106207	5.7	1	1.9%	31
Glutamine synthetase	P09606	42268	7.1	3	11.5%	-
GM2 activator protein	Q6IN37	21521	6.5	1	11.1%	67
GTP-binding nuclear protein Ran, testis-specific isoform	Q8K586	24451	7.1	1	4.6%	19
Heat shock 90kDa protein 1, beta	P34058	83341	5.0	5	7.6%	-
Heat shock cognate 71 kDa protein	P63018	70871	5.5	4	7.7%	-
Heat shock protein 86	Q91XW0;Q6B437	84815	5.0	5	7.1%	-
Hemiferrin	Q64599	24091	7.7	3	15.3%	-
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61980	50976	5.5	3	11.0%	-
High mobility group box 1	P63159	24894	5.7	1	2.8%	22
Histone H2a	Q6I8Q6	14188	10.7	1	14.6%	65
Hypothetical protein	Q6AYC4	38799	6.5	3	13.8%	-

*Bijlage*

<b>Proteine</b>	<b>Accessienummer</b>	<b>Massa</b>	<b>pI</b>	<b>Aantal peptiden</b>	<b>AZ coverage</b>	<b>Mascot Score</b>
Keratin K6	Q63282	3107	5.9	1	38.5%	21
Lamin C2	P70482	52636	6.6	6	12.8%	-
L-lactate dehydrogenase A chain	P04642	36451	8.3	3	9.0%	-
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 precursor	P14562	43969	8.1	1	2.9%	22
Myelin basic protein	P02688-4	14211	11.8	2	15.6%	-
Myosin heavy chain, nonmuscle type A	Q62812	226336	5.6	1	1.1%	63
Nestin	Q8CJ14	208795	4.3	3	2.9%	-
NSFL1 cofactor p47	O35987	40680	5.1	1	4.6%	61
Nucleolin	P13383	77277	4.7	3	3.5%	-
Parathymosin	P04550	11559	4.2	1	10.8%	34
Parvalbumin	P02625	11926	5.2	1	11.8%	22
PePtidylProlyl isomerase A	P10111	17874	8.2	4	20.7%	-
Peroxiredoxin 1	Q63716	22109	8.1	3	13.1%	-
Peroxiredoxin 5, mitochondrial precursor	Q9R063	22179	8.7	2	9.9%	-
Phosphatidylethanolamine- binding protein	P31044	21609	6.3	2	16.8%	-
PhosPhoglycerate kinase 1	P16617	44538	7.9	4	8.4%	-
Profilin 1	P62963	14957	8.3	1	8.6%	31
Protein disulfide isomerase-related protein	Q63081	48760	5.2	1	4.9%	40
Protein disulfide- isomerase A3 precursor	P11598	57079	6.2	5	10.2%	-
Protein disulfide- isomerase A4 precursor	P38659	72806	5.1	2	3.1%	-
Protein disulfide- isomerase precursor	P04785	56951	4.9	9	17.5%	-
Rab GDP dissociation inhibitor beta-2	P50399	50685	5.9	1	2.0%	31
Ras-related protein Rab- 11B	O35509	24488	5.9	1	4.1%	32
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	Q5XI73	23407	5.2	2	8.3%	-
Ribonuclease inhibitor	P29315	49905	4.8	2	9.4%	-
Ribonucleoprotein F	Q794E4	45730	5.5	1	1.4%	26
Ribosomal protein S27a	Q6PED0	17951	9.6	2	16.0%	-
S100 calcium binding protein A10	P05943	11075	6.8	1	17.9%	18
S100 calcium-binding protein A4	P05942	11776	5.1	1	7.9%	36
Similar to 17,000 dalton myoSin light chain	Q64119-2	16961	4.6	2	11.3%	-

*Bijlage*

<b>Proteine</b>	<b>Accessienummer</b>	<b>Massa</b>	<b>pI</b>	<b>Aantal peptiden</b>	<b>AZ coverage</b>	<b>Mascot Score</b>
Similar to calcyclin binding protein	Q6AYK6	28107	8.2	1	2.4%	28
Similar to Coatomer zeta-1 Subunit (Zeta-1 coat protein) (Zeta-1 COP) (CGI-120) (HSPC181)	XP_235705	23836	5.7	1	9.1%	48
Similar to Endoplasmin precursor (Endoplasmic reticulum protein 99) (94 kDa glucose-regulated protein) (GRP94) (ERP99) (Polymorphic tumor rejection antigen 1) (Tumor rejection antigen gp96)	Q7M079;Q66HD0	92771	4.8	3	5.6%	-
Similar to endothelial monocyte-activating polypeptide	Q6B345	16835	6.5	1	7.3%	18
Similar to Fc fragment of IgG binding protein	XP_214835	583427	5.7	1	0.2%	23
Similar to FKSG27	XP_218444	71821	5.1	1	1.4%	27
Similar to FLJ00343 protein	XP_238167	279439	6.0	4	3.0%	-
Similar to GDP-dissociation inhibitor	XP_342778	22884	5.1	1	10.5%	51
Similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) (EC 1.2.1.12) - mouse	XP_224464	35258	8.7	2	5.0%	-
Similar to grp75	P48721	82365	6.3	1	1.1%	25
Similar to heat-shock protein hSp84	XP_229096	76632	4.7	3	4.2%	-
Similar to macroSialin	XP_213372	34057	9.6	1	2.8%	32
Similar to MHR23B	Q6IRD5	43497	4.8	1	2.4%	19
Similar to Myristoylated alanine-rich C-kinase Substrate (MARCKS)	XP_215403	29784	4.3	3	20.1%	-
Similar to RIKEN cDNA 1110005A23	XP_343148	23605	6.7	1	2.9%	39
Similar to RIKEN cDNA 2410004J23	XP_213506	26783	7.3	1	4.2%	14

*Bijlage*

<b>Proteine</b>	<b>Accessienummer</b>	<b>Massa</b>	<b>pI</b>	<b>Aantal peptiden</b>	<b>AZ coverage</b>	<b>Mascot Score</b>
Similar to Serine (or cySteine) proteinaSe inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinaSe, antitrypSin), member 9	XP_234518	46841	9.6	1	2.4%	19
Similar to Sid23p	XP_218399	31093	5.9	1	3.9%	24
Similar to talin	XP_242982	271038	6.3	1	1.0%	66
Similar to TranScription factor BTF3 (RNA polymeraSe B tranScription factor 3)	XP_220529	19059	7.4	1	14.3%	63
Similar to tubulin, alpha 6	Q6AYZ1	63064	6.3	6	14.0%	-
Similar to Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolaSe 5 (Ubiquitin thioleSteraSe 5) (Ubiquitin-Specific proceSSing proteaSe 5) (Deubiquitinating enzyme 5) (ISopeptidaSe T)	XP_238380	95779	5.0	1	2.9%	29
Similar to Voltage- dependent anion-Selective channel protein 1 (VDAC- 1) (mVDAC1) (mVDAC5) (Outer mitochondrial membrane protein porin 1) (PlaSmalemmal porin)	XP_212893	34025	8.4	1	3.2%	22
Solute carrier family 25, member 4	Q05962	32904	9.7	1	4.4%	32
Solute carrier family 25, member 5	Q09073	32901	9.7	3	10.7%	-
Splice Isoform 1 Of Reticulon 4	Q9JK11-1	126388	4.5	2	3.7%	-
Splice Isoform 2 Of Annexin A2	Q07936-2	38762	7.7	3	9.1%	-
Splice Isoform 2 Of Pyruvate kinase, isozymes M1/M2	P11980-2	61035	7.6	8	18.5%	-
Splice Isoform 6 Of Tropomyosin 1 alpha chain	P04692-6	32731	4.8	4	12.3%	67
Stathmin 1	P13668	17288	6.0	1	6.0%	23
Stress-induced- phosphoprotein 1	O35814	62570	6.8	1	3.5%	29

Proteine	Accessienummer	Massa	pI	Aantal peptiden	AZ coverage	Mascot Score
Sulfated glycoprotein 1 precursor	P10960	61124	5.2	5	9.9%	-
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	P07895	24674	8.8	2	9.5%	-
Superoxide diSmutaSe 1	P07632	19059	7.4	2	14.3%	-
Tcirg1 protein	Q6P735	93211	6.4	1	2.5%	21
Thioredoxin	P11232	11673	4.9	3	29.5%	-
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P46462	89349	5.3	4	5.8%	-
TranskeTolase	P50137	71187	7.6	3	5.5%	-
Tropomyosin alpha 4 chain	P09495	28510	4.7	5	22.6%	-
Tubulin alpha-1 chain	P68370	50136	5.1	6	17.5%	-
Tubulin beta-5 chain	P69897	49671	4.9	1	2.7%	43
Type I keratin KA17	Q6IFU8	48123	5.0	1	1.6%	19
Type II keratin Kb1	Q63115;Q6IMF3	64831	7.9	1	1.4%	43
Type II keratin Kb4	Q6IG00	57667	7.6	1	1.7%	37
Tyrosine 3/TrypTophan 5 - monooxygenase						
acTivaTion proTein, eTa polypepTide	P68511	28212	4.9	3	10.6%	-
Vimentin	P31000	53733	5.1	16	31.1%	-
Ywhaz protein	P63102	30058	4.9	3	10.6%	-

Massa slaat op het theoretisch molecuulgewicht en pI op het theoretisch isoelektrisch punt. Beide waarden werden teruggevonden met behulp van de Swissprot-databank. Coverage staat voor de aminozuurovereenkomst die werd teruggevonden met behulp van massaspectrometrie en het softwareprogramma Sequest, waarbij er gekeken werd naar Xcorr en dCN. Het aantal peptiden staat voor het aantal verschillende peptiden gebruikt voor de identificatie van het overeenkomstige eiwit. De Mascot-score werd teruggevonden met behulp van het softwareprogramma Mascot en de NCBIInr-databank en slaat ook op de overeenkomst in aminozuren.