

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	i
Lijst met afkortingen	iii
Lijst met figuren	v
Lijst met tabellen	vi
Voorwoord	vii
Samenvatting	viii
1. Inleiding.....	1
1.1 Proteomica	1
1.2 Multiple Sclerose (MS).....	2
1.3 Experimentele auto-immune encephalomyelitis (EAE).....	5
1.4 Onderzoeksopzet.....	9
2. Materiaal en methoden	11
2.1 Immunisatie van de Lewis-ratten	11
2.2 Staalvoorbereiding	11
2.3 2-dimensionele gelelektroforese (2-D GE).....	11
2.3.1 Isoelectric focusing (IEF).....	12
2.3.2 SDS-polyacrylamide gelelektroforese (SDS-PAGE)	12
2.3.3 Zilverkleuring	13
2.3.4 Digestie.....	13
2.4 Massaspectrometrie (ESI-LC-MS/MS).....	14
2.5 2-dimensionele vloeistofchromatografie (2-D LC)	17
2.5.1 Staalvoorbereiding	18
2.5.2 2-D LC.....	18
2.6 Western blot.....	20
2.7 Immunohistochemische kleuringen	21
3. Resultaten.....	23
3.1 Proefdieren.....	23
3.2 Hersenproteoom van de Lewis-rat	24
3.2.1 2-D GE van het hersenproteoom.....	24
3.2.2 2-D LC van het hersenproteoom	27
3.2.3 Vergelijking 2-D GE en 2-D LC.....	30

3.3 Differentiële expressie.....	31
3.4 Studie van het eiwit stathmine in het EAE-model	39
3.4.1 Western blot.....	40
3.4.2 Immunohistochemische kleuringen	41
4. Discussie	43
4.1 Proefdieren.....	43
4.2 Hersenproteoom van de Lewis-rat	44
4.3 Differentiële expressie.....	46
4.4 Studie van het eiwit stathmine in het EAE-model	51
Referenties.....	56
Bijlage.....	I

Lijst met afkortingen

2-D GE	2-dimensionele gelelektroforese
2-D LC	2-dimensionele <i>liquid</i> chromatografie
BBB	bloed-hersen-barrière (<i>blood-brain barrier</i>)
BIOMED	Biomedisch Onderzoeksinstituut
BSA	bovien serum albumine
CaM kinase II	Ca ²⁺ /calmoduline kinase II
cFA	compleet Freund's adjuvans
CHAPS	3-[(3-chloramidopropyl)-dimethylammonio]-1-propaansulfonaat
CNS	centrale zenuwstelsel (<i>central nervous system</i>)
CR-EAE	<i>chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
CsA	cyclosporine A
CSF	ruggenmergvocht (<i>cerebrospinal fluid</i>)
Da	dalton
DAB	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
dta	<i>differential thermal analyzer</i>
DTT	dithiotreitol
EAE	experimentele auto-immune encephalomyelitis
EDTA	<i>ethylenediamine tetra acetic acid</i>
E-FABP	<i>fatty acid binding protein epidermal</i>
EGTA	<i>ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ESI-LC-MS/MS	<i>electrospray</i> ionisatie vloeistofchromatografie tandemmassaspectrometrie
FABP	<i>fatty acid binding protein</i>
Hsc70	<i>heat shock cognate protein 70</i>
Hsp	<i>heat shock protein</i>
ID	inwendige diameter
IEF	<i>isoelectric focusing</i>
IgG	immunoglobuline G
IPG	<i>immobilized</i> pH gradiënt
m/z	massa/lading
MAG	<i>myelin-associated glycoprotein</i>

MAP kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MOG	<i>myelin-oligodendrocyte glycoprotein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	multiple sclerose
PBMC	perifere bloed-mononucleaire cel
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PKA	proteïne kinase A
pI	iso-elektrisch punt
PLP	<i>proteolipid protein</i>
PMSF	fenylmethyl sulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylideen-difluoride membraan
rpm	toeren per minuut
Ser	serineresidu
SCX	<i>strong cation exchanger</i>
SDS-PAGE	sodium-dodecyl-sulfaat polyacrylamide gelelektroforese
Tris	tri(hydroxymethyl)aminomethaan
VZ	vetzuren
XCorr	X-correlatiecoëfficiënt

Lijst met figuren

<u>Figuur 1</u> : Model van de immuunprocessen geassocieerd met de MS-pathogenese	4
<u>Figuur 2</u> : Actieve en passieve immunisatie van de Lewis-rat ter inductie van EAE	7
<u>Figuur 3</u> : Samenvatting massaspectrometrie.....	17
<u>Figuur 4</u> : Schematische voorstelling van 2-D LC	20
<u>Figuur 5</u> : Klinische score en gewichtsverloop van EAE- en controle-Lewis-ratten na immunisatie	23
<u>Figuur 6</u> : 2-D electroferogram van de hersenen van de Lewis-rat.....	25
<u>Figuur 7</u> : Massaspectrum van stathmine	26
<u>Figuur 8</u> : Voorbeeld <i>summary rapport</i> van Sequest en Mascot.....	27
<u>Figuur 9</u> : Aantal MS/MS-spectra per fractie.....	28
<u>Figuur 10</u> : Aantal peptiden gebruikt voor de identificatie van eiwitten tijdens 2-D LC analyse van het EAE-staal	28
<u>Figuur 11</u> : Proteïnen aangeboden aan Mascot	29
<u>Figuur 12</u> : Aantal proteïnen geïdentificeerd met 2-D GE en 2-D LC.....	30
<u>Figuur 13</u> : Cellulaire functies van proteïnen geïdentificeerd uit het hersenproteoom van de Lewis-rat door middel van 2-D GE en 2-D LC	31
<u>Figuur 14</u> : Analyse van differentiële expressie van spots in het laag-moleculair gebied van de gel	32
<u>Figuur 15</u> : Differentiële expressie van proteïnen in het hersenproteoom van de EAE-Lewis-rat in het laag-moleculair gebied van de gel	34
<u>Figuur 16</u> : Analyse van differentiële expressie van spots in het hoog-moleculair gebied van de gel	36
<u>Figuur 17</u> : Differentiële expressie van proteïnen in het hersenproteoom van de EAE-Lewis-rat in het hoog-moleculair gebied van de gel.....	39
<u>Figuur 18</u> : Western blot-experiment met het EAE-, controle- en oligodendrocytstaal.....	40
<u>Figuur 19</u> : Immunohistochemische kleuringen van EAE- en controle-hersencoupees	42
<u>Figuur A</u> : Hersenproteoom van de Lewis-rat.....	I

Lijst met tabellen

<u>Tabel 1</u> : Vergelijking tussen EAE en MS	6
<u>Tabel 2</u> : Verloop van de vloeistofchromatografie voorafgaand aan massaspectrometrie.....	15
<u>Tabel 3</u> : Verloop van de vloeistofchromatografie.....	19
<u>Tabel 4</u> : Gemiddelde relatieve expressiewaarde van 25 spots in het laag-moleculair gebied van de gel.....	32
<u>Tabel 5</u> : Vergelijking relatieve expressiewaarde van alfa B crystalline in de EAE- en controle-gel	35
<u>Tabel 6</u> : Gemiddelde relatieve expressiewaarde van 40 spots in het hoog moleculair gebied van de gel.....	36
<u>Tabel A</u> : Identificaties van spots van de mastergel van het hersenproteoom van de Lewis-rat.II	
<u>Tabel B</u> : Identificaties van de eiwitten na 2-D LC van het EAE-staal	VI

Voorwoord

Mijn stage en thesis vormen het einde van vier jaar studeren. Ik zou graag een aantal mensen willen bedanken die geholpen hebben met het voltooien van de stage, de thesis en het tot een goed einde brengen van mijn studie.

In de eerste plaats zou ik prof dr Stinissen willen bedanken om het mogelijk te maken mijn stage te voltooien op het Biomedisch Onderzoeksinstituut. Ook wil ik mijn promotor prof dr Robben bedanken dat ik mijn stage kon volbrengen binnen de proteomica-afdeling en voor het nalezen en beoordelen van mijn thesis. Mijn tweede beoordelaar dr Somers zou ik willen bedanken voor het lezen en beoordelen van mijn thesis.

Verder verdient drs Debora Dumont een woordje van dank. Zij stond altijd klaar met goede raad en heeft me veel bijgeleerd. Bedankt voor de goede begeleiding en de hulp in het labo bij het aanleren van de technieken, voor het kritisch nalezen van mijn thesis en vooral ook voor de fijne samenwerking.

Ik zou graag ook Veronique Haesen willen bedanken voor de hulp in het labo en voor de fijne samenwerking. Erik Royackers zou ik willen bedanken voor de massaspectrometrische analyse van de vele stalen.

Ook een woordje van dank voor dr Noben voor de hulp bij het uitvoeren van de chromatografie.

Drs Kurt Baeten en Wilfried Leyssens zou ik willen bedanken voor de immunisatie en het verzorgen van de ratjes.

Dr Hendriks en dr Vandenabeele wil ik bedanken voor de hulp bij de immunohistochemische kleuringen.

Ik zou ook graag al mijn medestudenten willen bedanken voor de fijne en gezellige uurtjes in het labo en ons lokaaltje.

En tot slot zou ik mijn ouders en broer willen bedanken voor hun steun tijdens mijn stage, maar ook tijdens de voorbije jaren van mijn studie.

Samenvatting

Proteomica is de studie van het proteoom, dus van alle proteïnen die tot expressie worden gebracht door cellen of in weefsels. De proteoomstrategie biedt namelijk een aantal voordelen ten opzichte van de genomica. Zo geeft de gensequentie geen posttranslationele modificaties weer terwijl deze belangrijk kunnen zijn voor de functie van het eiwit. De studie van het genoom geeft ook geen beschrijving van de dynamische cellulaire processen. Daarnaast vertegenwoordigt het expressieniveau van mRNA niet de hoeveelheid actieve proteïnen in de cel omwille van *turnover* processen die kunnen plaatsvinden, zowel bij mRNA als bij proteïnen. In de proteomica wordt er een combinatie van verschillende technieken gebruikt waarmee de eiwitten geïdentificeerd kunnen worden. Deze studie maakte gebruik van twee scheidingstechnieken, 2-dimensionele gelelektroforese (2-D GE) en 2-dimensionele vloeistofchromatografie (2-D LC), beiden gekoppeld aan massaspectrometrie.

De proteomica-strategie werd toegepast in het onderzoek naar multiple sclerosis (MS). MS is een auto-immune inflammatoire aandoening van het centrale zenuwstelsel met als klinische symptomen onder andere coördinatiestoornissen, verlamming en neurologische gebreken. De ziekte wordt gekarakteriseerd door auto-reactieve T-cellen die het myeline rondom de zenuwen afbreekt waardoor de zenuwgeleiding slechter verloopt. Het doel van dit onderzoek is een beter inzicht te verkrijgen in het ziekteproces van MS en het opsporen van nieuwe ziektemerkers door gebruik te maken van het *experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE)-diermodel, een goed gekarakteriseerd diermodel voor MS. Er werd een acute vorm van EAE geïnduceerd door Lewis-ratten te immuniseren met MBP.

In het eerste luik van de stage werd het hersenproteoom van de Lewis-rat in kaart gebracht waarbij 192 verschillende proteïnen geïdentificeerd werden. Het tweede deel van de stage betrof de studie van differentiële expressie door middel van een vergelijking tussen het 2-D GE-patroon van de EAE-stalen en de controlestalen waarbij een aantal proteïnen differentieel tot expressie werden gebracht. Hiertoe behoorde onder andere alfa B crystalline, *heat shock cognate protein 70*, *ubiquitin conjugating enzym E2N*, *proteasome subunit alpha type 5*, cyclofiline A, calcineurine B, *fatty acid binding protein epidermal* en stathmine. Dit laatste proteïne werd verder bestudeerd door middel van de Western blot-techniek en immunohistochemische kleuringen.

1. Inleiding

1.1 Proteomica

Proteomica is de studie van het proteoom, dus van alle proteïnen die tot expressie worden gebracht door cellen of in een weefsel [1]. Er wordt de laatste jaren veel aandacht besteed aan de studie van proteïnen. Ten eerste hebben alle cellen hetzelfde genoom, maar brengen ze verschillende genen tot expressie, afhankelijk van de functie van de cellen, weefsels of organen. De studie van het genoom geeft ook geen beschrijving van de dynamische cellulaire processen. Daarnaast vertegenwoordigt het expressieniveau van mRNA niet de hoeveelheid actieve proteïnen in de cel omwille van *turnover* processen die kunnen plaatsvinden, zowel bij mRNA als bij proteïnen. Bovendien geeft de gensequentie geen posttranslationele modificaties weer terwijl deze belangrijk kunnen zijn voor de functie van het eiwit [2].

In de proteomica wordt er een combinatie van verschillende technieken gebruikt waarmee de eiwitten geïdentificeerd worden. Er wordt traditioneel gebruik gemaakt van een 2-dimensionele gelelektroforese (2-D GE) gevolgd door massaspectrometrie. Door middel van 2-D GE worden de eiwitten gescheiden op basis van het iso-elektrisch punt (pI) van de proteïnen (*isoelectric focusing*, IEF) en op basis van moleculair gewicht (*sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gelelektrophoresis*, SDS-PAGE). Er zijn echter een aantal beperkingen verbonden aan deze techniek. Zo kunnen de hydrofobe proteïnen, waaronder de membraanproteïnen, moeilijk gescheiden worden door middel van 2-D GE en ook de proteïnen die in erg lage concentratie aanwezig zijn, kunnen niet gedetecteerd worden. De proteïnen die veelvuldig aanwezig zijn, kunnen ook voor problemen zorgen aangezien ze grote spots opleveren waardoor de kleinere spots gemaskeerd kunnen worden en niet verder bestudeerd worden. Daarnaast zijn ook de zeer kleine en zeer grote proteïnen evenals de proteïnen met extreme pI waarden moeilijk te scheiden door middel van 2-D GE. De laatste jaren is er daarom een evolutie merkbaar waarbij meer en meer studies gebruik maken van een gel-vrije methode. Eén van de alternatieven voor 2-D GE is 2-dimensionele *liquid chromatography* (2-D LC) aangezien deze techniek de tekortkomingen van 2-D GE gedeeltelijk kan beperken. De 2-D LC-techniek vereist ook veel minder startmateriaal in vergelijking met 2-D GE. Met behulp van de massaspectrometrie kan vervolgens de sequentie van aminozuren geïdentificeerd worden en via de bio-informatica kan het volledige eiwit gekarakteriseerd worden [2].

Er zijn reeds verschillende studies waarbij het gebruik van proteomica-technieken zoals 2-D GE resultaten hebben opgeleverd. Zo zijn er onderzoeken gebeurd naar neurologische aandoeningen zoals multiple sclerose [3,4], Alzheimer en dementie [5,6,7]. Maar ook de proteomica-studies in het onderzoek naar kanker hebben reeds goede resultaten opgeleverd. Zo werd met behulp van een 2-D GE van het proteoom van blaastumoren een kandidaat merker voorgesteld voor *squamous cell carcinoma*, namelijk psoriasine. Dit eiwit zou een mogelijke diagnostische merker kunnen zijn voor *squamous cell carcinoma*. Ook de proteomica-onderzoeken naar borstkanker, renale celcarcinoma's en longkanker hebben reeds bruikbare resultaten opgeleverd [2].

In het Biomedisch Onderzoeksinstituut (BIOMED) gebeurt er onderzoek naar MS, onder andere via de proteomica-technieken. In het onderzoek naar MS wordt proteomica toegepast door een vergelijking te maken tussen ruggenmergvocht (*cerebrospinal fluid*, CSF) van MS-patiënten met controlepatiënten. Op die manier hoopt men verschillen te vinden in de productie van eiwitten en zo dus eiwitten te identificeren die te maken kunnen hebben met het ziektebeeld. Recent werd ook een proteomica-benadering in het *experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE)-onderzoek gestart. Hierbij worden Lewis-ratten geïmmuniseerd waardoor deze EAE krijgen. Er wordt dan met behulp van proteomica-technieken een vergelijking gemaakt tussen EAE-Lewis-ratten en controle-Lewis-ratten om zo een beter inzicht te krijgen in dit ziektebeeld.

1.2 Multiple Sclerose (MS)

MS is een auto-immune inflammatoire aandoening van het centrale zenuwstelsel (*central nervous system*, CNS). De ziekte treft voornamelijk vrouwen en in mindere mate mannen tussen de leeftijd van 20 tot 40 jaar. MS komt voornamelijk voor bij blanken en dan vooral in het noorden van Europa en de Scandinavische populatie. Het treft minder vaak de bevolking in de Aziatische gebieden en in Afrika [8]. Een aantal symptomen van de ziekte zijn coördinatiestoornissen, slecht zien, verlamming en andere neurologische gebreken.

De belangrijkste doelwitten in het ziektebeeld van MS zijn het myeline en de oligodendrocyten. Het myeline bevindt zich rondom de zenuwen en heeft als functie de zenuwgeleiding te verbeteren. Ze wordt gevormd door de oligodendrocyten. Het myeline bestaat voor 75-80% uit lipiden en de overige 20-25% zijn proteïnen. De belangrijkste proteïnen aanwezig in de myelineschede zijn *myelin basic protein* (MBP) en *proteolipid*

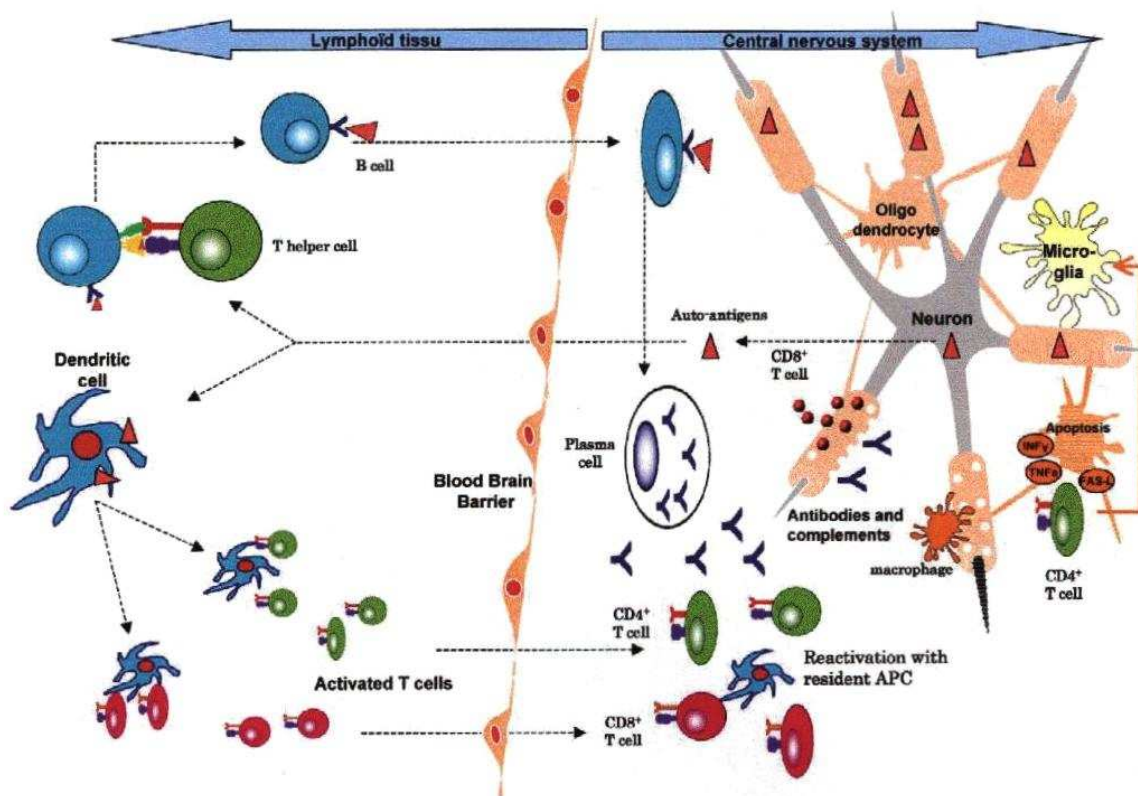
protein (PLP). Deze eiwitten kunnen een doelwit zijn voor het induceren van schade aan de myelineschede [9].

De precieze pathogenese van MS is nog niet volledig begrepen. Het is een auto-immune aandoening waarbij vooral T-helpercellen type 1 (Th₁-cellen) betrokken zijn. Deze worden in de periferie van het lichaam geactiveerd. Over hoe de activatie precies gebeurt, is nog weinig geweten. Eén van de vermoedelijke mechanismen is *molecular mimicry*. In het geval van MS zouden er bepaalde virale peptiden zijn die sequentiële homologie vertonen met MBP, een belangrijke component van het myeline. Wanneer dus een infectie met bepaalde virussen optreedt, die peptiden bevatten gelijkend op MBP, kan er auto-immuniteit optreden. Er wordt namelijk een immuunrespons ontwikkeld tegen de virale peptiden. De geactiveerde Th₁-cellen worden vervolgens ook getransporteerd doorheen de bloed-hersen-barrière (*blood-brain barrier*, BBB). De migratie van deze T-cellen wordt bevorderd door de expressie van adhesiemoleculen en het vrijzetten van pro-inflammatoire cytokines door de T-cellen. In het CNS worden de myeline-reactieve T-cellen opnieuw geactiveerd wanneer ze in contact komen met specifieke myeline-epitopen, waaronder het MBP. Op deze manier wordt een ontstekingsreactie geïnduceerd. De macrofagen en astrocyten in het CNS worden vervolgens geactiveerd en dragen bij aan de immuunrespons. Ook de vrijzetting van cytokines door de Th₁-cellen is betrokken bij de schade in het CNS. Demyelinisatie is het uiteindelijke resultaat van deze gebeurtenissen. De afbraak van het myeline is een gevolg van de effecten van cytotoxische cellen zoals macrofagen, zuurstofradicalen en toxiciteit ten gevolge van de aanwezigheid van cytokines [9,10,11,12]. Door de demyelinisatie verloopt de zenuwgeleiding slechter en kan ook axonaal verlies optreden. Er wordt littekenweefsel gevormd door de astrocyten in het CNS en bijgevolg komen er sclerotische plaques voor. Dit leidt uiteindelijk tot de verschillende neurologische gebreken kenmerkend voor MS.

In figuur 1 wordt een mogelijk model van de immuunprocessen weergegeven die geassocieerd worden met de pathogenese van MS [12].

Er worden twee vormen van MS onderscheiden. Enerzijds is er de *relapsing remitting* vorm. Deze komt in 80 tot 90 % van de gevallen van MS voor. Er is een afwisseling tussen aanval en herstel. De aanval wordt gekenmerkt door demyelinisatie van de zenuwen en er worden gedemyeliniseerde plaques teruggevonden in het CNS. Maar door de aanwezigheid van oligodendrocyten, cellen die verantwoordelijk zijn voor het aanmaken van myeline, kan er gedeeltelijk herstel optreden via remyelinisatie van de zenuwen. Er zijn namelijk vele oligodendrocyten aanwezig in het CNS waardoor er gemakkelijk terug remyelinisatie optreedt

in de beginfase van de ziekte. Wanneer echter in een latere fase van de ziekte de oligodendrocyten zelf beschadigd worden, kan dit leiden tot axonaal verlies en bijgevolg treden er verschillende neurologische gebreken op. De *relapsing remitting* vorm van MS wordt in 80 % van de gevallen secundair progressief 5 à 15 jaar na het begin van de ziekte. In dit geval is er bijna geen herstel meer na een aanval door het verlies van oligodendrocyten en axonaal verlies. De tweede vorm van MS is de primair progressieve vorm. Slechts 10 tot 20% van de patiënten heeft deze vorm van MS waarbij de ziekte steeds verergert en er geen herstel optreedt [9,13,14].



Figuur 1: Model van de immuunprocessen geassocieerd met de MS-pathogenese.

Auto-antigenen worden gepresenteerd door antigen-presenterende cellen (onder andere dendritische cellen) aan de T-cellen in het lymfoïdweefsel. Geactiveerde T-cellen migreren naar het CNS doorheen de BBB via chemo-attractie en worden hier gereactiveerd door lokale of infiltrerende antigen-presenterende cellen. Bijgevolg worden er pro-inflammatoire cytokines en cytotoxische mediators vrijgezet. Dit leidt tot weefschade. De beschermende myelineschede wordt beschadigd ten gevolge van verschillende mechanismen: cytokine-gemedieerde schade, complement-gemedieerde schade, digestie van oppervlakte myeline-antigenen door macrofagen en rechtstreekse schade door T-cellen waardoor er apoptose optreedt van oligodendrocyten en microglia [12].

Deze twee vormen van MS kunnen nog eens onderverdeeld worden in vier patronen van de ziekte. Bij alle patronen treedt er een ontstekingsreactie op veroorzaakt door T-cellen en macrofagen. Bij patroon I en II is de myelineschede het doelwit van de ontstekingsreactie. Patroon I wordt gekenmerkt door demyelinisatie geïnduceerd door macrofagen en vermoedelijk de cytokines tumor necrosis factor-alfa, interferon-gamma en reactieve zuurstofspecies. Bij patroon II zijn er antilichamen aanwezig die gericht zijn tegen myeline-proteïnen. Patroon III en IV lijken sterk op elkaar omdat in beide gevallen er een verlies is van oligodendrocyten. Patroon III wordt echter ook gekenmerkt door het verlies van *myelin-associated glycoprotein* (MAG) in de actieve laesies. Patroon IV tot slot komt slechts zelden voor. Het is een vorm van primair progressieve MS waarbij er niet-apoptotische degeneratie optreedt van de oligodendrocyten [10].

Aangezien er nog verdere onderzoeken nodig zijn omtrent het ontstaan en het verloop van de ziekte, maar ook met betrekking tot het stellen van een diagnose en het toepassen van therapieën, worden er diermodellen gebruikt die het ziektebeeld van MS zo goed mogelijk nabootsen. Er wordt gebruik gemaakt van proefdieren daar de beschikbaarheid van humaan materiaal beperkt is. Zo kan *post mortem* materiaal bestudeerd worden, maar dan stelt zich de vraag of autopsiestalen betrouwbare resultaten opleveren in vergelijking met biopsiestalen. Echter de beschikbaarheid van biopsiestalen is redelijk laag. Vandaar dat het gebruik van proefdieren een goed alternatief is voor de studie naar MS.

1.3 Experimentele auto-immune encefalomyelitis (EAE)

EAE is een goed gekarakteriseerd diermodel voor MS dat reeds sinds 1930 toegepast wordt. Het is een T-cel gemedieerde auto-immune aandoening en het vertoont klinische en histopathologische gelijkenissen met MS (tabel 1) [15].

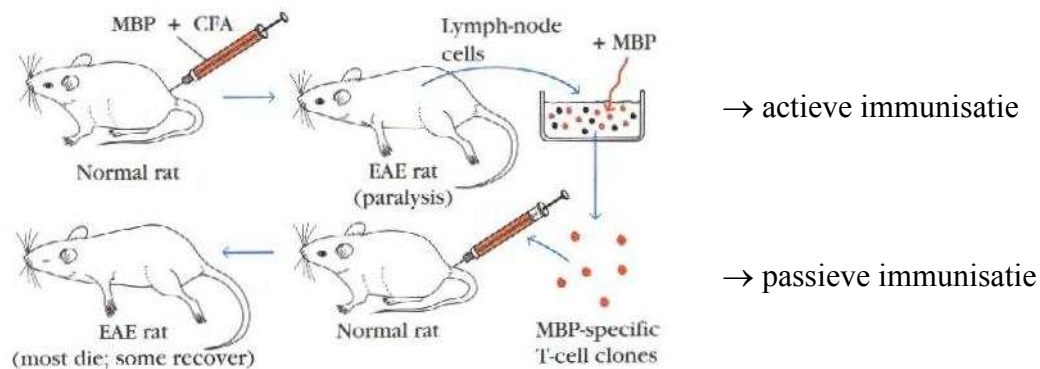
EAE kan geïnduceerd worden in verschillende diersoorten waaronder muizen, ratten, primaten enzovoort. Er zijn een aantal verschillen tussen EAE geïnduceerd bij ratten en muizen. Zo is voor ratten één immunisatie voldoende terwijl muizen tweemaal geïmmuniseerd moeten worden voor de ziekte geïnduceerd wordt. Het blijkt namelijk dat ratten vatbaarder zijn voor het ontwikkelen van EAE dan muizen. Omwille van de species barrière tussen mensen en knaagdieren, werden ook modellen met niet-humane primaten ontwikkeld. Deze benaderen het beeld van MS beter. De ontdekkingen bekomen door

Tabel 1: Vergelijking tussen EAE en MS [15]

	EAE	MS
<i>Etiologie</i>	Myeline auto-antigenen en antigen-specifieke T-cellen	Onbekend
<i>Genetica</i>		
MHC-gekoppelde vatbaarheid	+	+
Vrouwelijke predominantie	+	+
<i>Klinisch</i>		
Ziekteverloop	Monofase of chronische terugval	Terugval en chronisch progressief
Verlamming	+	+
Ataxia	+	+
Visuele schade	+	+
<i>Immunologie</i>		
T-cellen reactief tegen myeline	+	+
Antilichamen tegen myeline	+	+
TNF- α , IFN- γ	↑	↑
Demyelinisatie	+ (in sommige modellen)	+
Axonale schade	+ (in sommige modellen)	+

middel van studies van EAE in muizen en ratten werden toegepast bij de niet-humane primaten en werden zodoende bevestigd. Dit geeft het belang aan van de studie van EAE voor het onderzoek naar MS [16]. Toch zijn er ook een aantal nadelen verbonden aan het EAE-diermodel. Het grootste probleem wordt veroorzaakt doordat EAE niet spontaan ontstaat bij dieren. Daarnaast gebeuren de meeste testen in EAE tijdens de inductie van de ziekte of in het beginstadium. Echter bij de MS-patiënten wordt de diagnose vaak pas gesteld in een verder gevorderd stadium van de ziekte. Een ander nadeel is dat EAE niet alle aspecten van de MS-pathologie aangeeft, voornamelijk met betrekking tot de niet-immunologische componenten van MS. En ondanks het feit dat de bekomen resultaten van de experimenten omtrent EAE bij knaagdieren veelal bevestigd werden in het niet-humane primate diermodel van EAE, blijkt dat de bevindingen niet altijd kunnen toegepast worden op MS [17].

EAE kan geïnduceerd worden via passieve of actieve immunisatie (figuur 2). Passieve immunisatie, ook *adoptive-transfer* genoemd, wordt geïnduceerd door het inspuiten van T-cellen die reactief zijn tegen het myeline. Deze T-cellen kunnen *in vitro* geactiveerd worden ofwel kunnen ze geïsoleerd worden uit onder andere de lymfeknopen van geïmmuniseerde dieren. Bij actieve immunisatie wordt gebruik gemaakt van weefsel uit het CNS of van myeline-antigenen in combinatie met een compleet Freund's adjuvans (cFA).



Figuur 2: Actieve en passieve immunisatie van de Lewis-rat ter inductie van EAE.

Bij actieve immunisatie worden de ratten ingespoten met weefsel uit het CNS (bijvoorbeeld spinal cord homogenaat van de cavia), met MBP, PLP of MOG. Bij passieve immunisatie worden de ratten ingespoten met T-cellen reactief tegen myeline. In deze figuur worden T-cellen die reactief zijn tegen MBP uit de lymfeknoop van een actief geïmmuniseerde rat geïsoleerd en vervolgens ingespoten bij een normale rat. Hierdoor krijgt deze rat ook EAE [11].

Het cFA is een olie-achtig adjuvans dat zorgt voor een vertraagde vrijzetting van het antigen. Hierdoor wordt het immuunsysteem langer gestimuleerd. Daarnaast worden de co-stimulerende signalen versterkt en de lokale ontsteking vergroot. Het cFA bevat additioneel ook nog geïnactiveerd *Mycobacterium* dat de cellen van het immuunsysteem extra activeert [11]. Er worden voornamelijk drie myeline-epitopen als antigen gebruikt om te immuniseren, namelijk MBP, PLP of *myelin-oligodendrocyte glycoprotein* (MOG). Het MBP is één van de belangrijkste proteïnen in het myeline. Het wordt gelokaliseerd in het myelinecytoplasma. Het PLP is ook een belangrijke component dat zich in de membraan van het myeline bevindt. En het MOG tot slot is ook een CNS myeline-specifiek membraanproteïne. Het is voorlopig het enige antigen dat zowel een T-cel inflammatoire respons als een demyeliniserende antilichaam respons kan opwekken in diermodellen [9]. Daarnaast kunnen ook andere epitopen die niet specifiek zijn voor het CNS gebruikt worden, bijvoorbeeld S-100, om EAE te induceren [16]. Afhankelijk van welk antigen gebruikt wordt, kan een acute of chronische vorm van EAE geïnduceerd worden. Immunisatie met MBP leidt tot de acute vorm, waarbij

enkel een ontstekingsreactie optreedt en geen demyelinisatie. Deze vorm van EAE is acuut, ernstig en monofasisch. Er treedt spontaan herstel op waarna de dieren resistent zijn tegen MBP-geïnduceerde EAE. Indien geïmmuniseerd wordt met MOG, wordt de chronische vorm van EAE (*chronic relapsing EAE*, CR-EAE) geïnduceerd. Deze CR-EAE beantwoordt beter aan het beeld van humaan MS aangezien het ook geassocieerd wordt met demyelinisatie en axonale schade [15,16,18].

Er zijn reeds verschillende studies uitgevoerd gebruik makend van het EAE-diermodel voor de studie naar MS. Er worden zowel genomica- als proteomica-technieken toegepast in het onderzoek naar EAE en MS. Zo zijn er verschillende onderzoeksgroepen die een vergelijking hebben gemaakt tussen de aspecten van MS laesies en het diermodel EAE aan de hand van genexpressie en *micro-arrays* [19,20,21,22]. Het EAE-model wordt ook gebruikt om kandidaat-antigenen, die opgelicht werden tijdens een expressiestudie van een MS-bibliotheek, te evalueren en te valideren. Hiertoe behoren onder andere het alfa B crystalline, prostaglandine D synthase en osteopontine. Deze bevindingen werden vervolgens bevestigd door cDNA micro-array studies [19,20].

Naast de techniek met *DNA microarrays*, waarbij de genen bestudeerd worden, is er ook een techniek opgestart waarbij proteïnen bestudeerd worden, de *protein microarrays*. Deze techniek behoort tot de functionele proteomica dat zich concentreert op de beschrijving van het cellulaire netwerk en de interacties tussen proteïnen. *Microarrays* kunnen uitgevoerd worden met *protein chips*. Zo'n *chip* bestaat uit een grote diversiteit aan proteïnen en kan gebruikt worden om immuunresponsen te *screenen* die gericht zijn tegen de proteïnen of peptiden op de *chip*. Ook de interacties tussen proteïnen en enzymen kunnen bestudeerd worden. De *antibody chip* is één van de vormen van *protein chips*. Deze bevat verschillende specifieke bindingsmoleculen en is ontwikkeld om specifieke componenten te detecteren van complexe stalen. De antilichamen, antigenen en andere bindingsmoleculen kunnen *geprint* worden op microscopische objectglasjes, filters of op *chips* met *microwells* [23,24].

Een toepassing van *protein microarrays* in het onderzoek naar EAE en MS is de *myelin array*. Deze kan gebruikt worden voor de studie naar auto-antilichaam-responsen in EAE. Voor deze toepassing wordt een *myelin array* ontwikkeld dat een spectrum van mogelijke myeline-auto-antigenen bevat. Hiervoor werden polypeptiden van onder andere MBP, PLP, MOG, MAG, alfa B crystalline, ... vastgemaakt op poly-L-lysine *gecoat* microscopische objectglasjes. Hierop wordt serum van muizen met EAE aangebracht. Zo kan de auto-

antilichaam-respons aangetoond worden. Deze toepassing wordt uitgebreid beschreven door Robinson en collega's [25].

De *protein microarray* techniek wordt pas recent toegepast in de proteomica en moet bijgevolg nog verder geoptimaliseerd worden. Ondanks dat deze techniek het nieuwe tijdperk vormt in de proteomica, zijn er nog geen uitgebreide studies beschreven in de literatuur waarbij de 'klassieke' technieken in de proteomica, zoals 2-D GE en 2-D LC gekoppeld aan massaspectrometrie, toegepast worden in het onderzoek naar EAE. Dit terwijl deze technieken toch de nadruk leggen op de studie van het volledige proteoom van een cel, weefsel of orgaan [23].

1.4 Onderzoeksopzet

Het doel van de stage is het opsporen van nieuwe ziektemerkers voor multiple sclerose (MS) via een proteoomstrategie.

Allereerst wordt getracht een proteoomkaart op te stellen van de hersenen van de Lewis rat. De kaart wordt bekomen door twee scheidingstechnieken, 2-D GE en 2-D LC, te combineren met proteïnenidentificatie met behulp van massaspectrometrie.

Een tweede doelstelling betreft een vergelijkende analyse van de proteïnen in het hersenweefsel van de gezonde Lewis-rat en de EAE-Lewis-rat. Verschillen in de eiwitexpressie kunnen opgespoord worden door ook weer gebruik te maken van de scheidingstechnieken 2-D GE en 2-D LC. De resultaten bekomen door middel van 2-D GE worden geanalyseerd met behulp van de Z3 computersoftware. Deze softwareanalyse wordt aanvaard als een kwantitatieve techniek en wordt toegepast om de differentiële expressie van proteïnen te onderzoeken. Zo kan nagegaan worden welke proteïnen verhoogd of verlaagd tot expressie komen bij de EAE-Lewis-rat in vergelijking met de controlerat. Zulke proteïnen spelen mogelijk een rol in de MS-pathogenese. De 2-D LC-techniek wordt in dit project slechts kwalitatief toegepast. De scheidingstechnieken worden gevolgd door een massaspectrometrische identificatie van de peptiden. Uit de resultaten kunnen vervolgens proteïnen geselecteerd worden als kandidaat-merkers.

In een laatste fase van het opzet kunnen geselecteerde kandidaat-merkers geëvalueerd worden door middel van immunohistochemische kleuringen op hersencoupees van gezonde en EAE-Lewis-ratten. Op deze manier kan nagegaan worden in welke gebieden en door welke cellen

deze kandidaat-merkers tot expressie gebracht worden. Vervolgens kunnen de gevalideerde merkers uit het EAE-model getoetst worden naar hun toepasbaarheid in MS aan de hand van immunohistochemische analyse op hersencoupees en/of door middel van immunologische testen in serum en ruggenmergvocht van MS-patiënten en controlepersonen.

2. Materiaal en methoden

2.1 Immunisatie van de Lewis-ratten

Voor deze studie werden zes Lewis-ratten gebruikt waarvan er drie geïmmuniseerd werden ter inductie van EAE en drie werden gebruikt als controleratten. De EAE-Lewis-ratten werden geïmmuniseerd met MBP in combinatie met cFA (10% MBP; 12,5% mycobacterium; 17,5% *phosphate buffered saline* (PBS); 60% cFA). De controleratten werden geïnjecteerd met cFA (27,5% PBS; 12,5% mycobacterium; 60% cFA). De immunisatie gebeurde subcutaan in de achterpoot. Het gewicht en de klinische score werden dagelijks opgetekend.

2.2 Staalvoorbereiding

Na 14 dagen werden de ratten geofferd. De hersenen werden gedissecteed en vervolgens gespoeld met PBS (pH 7,2). Hierna werden de hersenen gedisintegreerd en gehomogeniseerd met de rotor-stator mixer in lysisbuffer (7 M ureum, 2 M thio-ureum, 4% CHAPS, protease-inhibitoren, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 40 mM Tris). Vervolgens werd het hersenmengsel gecentrifugeerd (44000 rpm, 4°C, 45 min) en het supernatans werd gefilterd (*shredder* filter). Tot slot werden de eiwitten geprecipiteerd met aceton en methanol (8:1) en minstens 2u geïncubeerd bij -20°C. Hierna werden de stalen 30 min gecentrifugeerd bij 4°C aan 13200 rpm en werd het supernatans afgenomen. De pellet werd gedroogd in de vacuümcentrifuge en vervolgens opgelost in rehydratatiebuffer (7 M ureum, 2 M thio-ureum, 4% CHAPS, ½ tablet protease-inhibitoren, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF). De stalen werden bewaard bij -20°C. De eiwitconcentratie werd bepaald aan de hand van de methode beschreven door Bradford [26].

2.3 2-dimensionele gelelektroforese (2-D GE)

Deze vorm van gelelektroforese bestaat uit 2 dimensies waarbij de eiwitten gescheiden worden aan de hand van verschillen in lading (*isoelectric focusing*, IEF) en moleculaire massa (*sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gelelektrophoresis*, SDS-PAGE). Na de 2-D GE worden de proteïnen gevisualiseerd door middel van zilverkleuring en de spots worden getrypsiniseerd voor verdere analyse met de massaspectrometer [27,28].

2.3.1 Isoelectric focusing (IEF)

De EAE- en controlestalen werden ontdooid en gecentrifugeerd. Vervolgens werd 150 µg proteïnen gesuspenderd in rehydratatiebuffer met 100 mM DTT, 0,5% IPG buffer, 1% bromofenolblauw). De IEF werd uitgevoerd met het *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare, Uppsala, Zweden). Er werd gebruik gemaakt van *immobilized pH gradient* (IPG)-strips van 24 cm met een lineaire pH gradiënt van 3 tot 10 (GE Healthcare). In het midden van elke striphouder werd 450 µl rehydratatiebuffer in combinatie met het staal gepipetteerd en de IPG-strips werden hierop aangebracht. Tot slot werd er *Dry Strip Cover Fluid* (GE Healthcare) over de strip aangebracht om uitdroging en kristallisatie van ureum aan het oppervlak van de strips te voorkomen. Gedurende 12u werden de strips gerehydrateerd bij 20°C. Vervolgens werd er een elektrisch veld aangelegd (500 V gedurende 1u, 1000 V gedurende 1u en tot slot 8000 V gedurende 8u 20min) zodat de eigenlijke scheiding van de proteïnen op basis van hun lading kon gebeuren. Na afloop werden de strips gespoeld in Milli Q en werden ze bewaard bij -70°C tot aan de SDS-PAGE.

2.3.2 SDS-polyacrylamide gelelektroforese (SDS-PAGE)

De scheiding van eiwitten op basis van moleculaire massa gebeurde met het *Ettan Daltsix electrophoresis system* (GE Healthcare). Er werden 6 polyacrylamide gelen (0,1 x 20 x 26 cm; 12,5%) gegoten met behulp van de *gelcaster* (GE Healthcare). Na het gieten van de gelen werd er verzadigde isobutanol in water aangebracht op de gelen om oxidatie te voorkomen. De gelen polymeriseerden gedurende 2u. Na polymerisatie werd een bewaaroplossing (0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS) op de gelen aangebracht.

De IPG-strips werden gedurende een half uur op -20°C gebracht en vervolgens volledig ontdooid. Hierna werden de strips geïncubeerd in 15 ml equilibratiebuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M ureum; 30% glycerol; 2% SDS; bromofenolblauw) met 1% DTT gedurende 20 min. Vervolgens werden de strips 20 min in equilibratiebuffer met 4,25% iodacetamide geïncubeerd. Tot slot werden ze gespoeld met 1x SDS elektroforesebuffer (25 mM Tris; 0,192 M glycine; 0,1% SDS pH 8,3). Hierna werden de strips tussen de glazen platen aangebracht tot tegen het geloppervlak en overgoten met een agarose-oplossing (0,5% agarose; 25 mM Tris-HCl; 192 mM glycine; 0,1% SDS). De onderste bufferkamer werd gevuld met 1x SDS-elektroforesebuffer en hierin werd de cassette met de glazen platen geplaatst. De bovenste bufferkamer werd gevuld met 2x SDS-elektroforesebuffer. Vervolgens werd het elektrisch veld aangelegd. Gedurende 30 min werden de proteïnen overgedragen van de strip naar de gel bij 120 mA. De eigenlijke scheiding van de proteïnen

gebeurde bij 240 mA gedurende ongeveer 6u. De elektroforese *run* werd gestopt wanneer de bromofenolblauw volledig van de gel gemigreerd was.

2.3.3 Zilverkleuring

De zilverkleuring voor polyacrylamide gellen gebeurde volgens de methode van Shevchenko [29]. Na de SDS-PAGE werden de gellen overnacht gefixeerd in een oplossing van 50% methanol, 5% azijnzuur en 45% Milli Q. Vervolgens werden de gellen gedurende 10 min geïncubeerd in 50% methanol en gewassen in Milli Q gedurende 10 min. Hierna werden de gellen 3 min in een oplossing van 0,02% natriumthiosulfaat geïncubeerd en tweemaal gewassen in Milli Q gedurende 2 à 3 min. Vervolgens werden de gellen gekleurd door ze 20 min in een koude 0,1% zilvernitraat kleuroplossing te leggen. Daarna volgden 2 wasstappen met Milli Q gedurende 1 min. Tot slot werden de gellen in de ontwikkelingsoplossing (0,04% formaline in 2% natriumcarbonaat) gelegd totdat de spots een intense kleur hadden en er geen nieuwe spots meer bijkwamen. De ontwikkeling van de gellen werd gestopt door de gellen in een 5% azijnzuuroplossing te leggen. De gellen werden ingescand met een digitale scanner (Image scanner, UTA III, GE Healthcare) en bewaard in Milli Q. De analyse van de gellen gebeurde door middel van de computersoftware Z3 (Compugen, Tel Aviv, Israël).

2.3.4 Digestie

Spots werden manueel uit de gel verwijderd en gedehydrateerd met acetonitrile gedurende 10 min. Hierna werden de spots droog gedampt met de vacuümcentrifuge en bewaard bij -20°C. Na ontdooien werd 10 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3 toegevoegd aan de spots gevolgd door een incubatie gedurende 1u bij 56°C. Hierna werd het supernatans afgenomen en de spots werden gedurende 45 min geïncubeerd in het donker op kamertemperatuur met 55 mM iodacetamide in 100 mM NH_4HCO_3 . Vervolgens werd een wasstap uitgevoerd gedurende 10 min met 100 mM NH_4HCO_3 , waarna het supernatans werd afgenomen en een dehydratatiestap met acetonitrile volgde. Deze was- en dehydratatiestap werden tweemaal uitgevoerd, waarna de gelstukjes droog gedampt werden in de vacuümcentrifuge. Aan de gelstukjes werd trypsine in 133 mM NH_4HCO_3 toegevoegd (12,5 ng trypsine/ μl) en de spots werden in een ijsbad geïncubeerd gedurende 45 min. Vervolgens werd het supernatans afgenomen en werd digestiebuffer (50 mM NH_4HCO_3) aan de spots toegevoegd. Na een incubatie overnacht bij 37°C werd het supernatans afgenomen en bewaard. Aan de spots werd 20 mM NH_4HCO_3 toegevoegd gevolgd door een sonicatie gedurende 20 min. Vervolgens werd het supernatans afgenomen en bewaard. Er werd 5% mierzuur in 50%

acetonitrile aan de gelstukjes toegevoegd gevolgd door een sonicatie gedurende 20 min waarna het supernatans opnieuw afgenomen en bewaard werd. Deze stap werd tweemaal herhaald. Het volledige supernatans werd bewaard bij -20°C tot aan de massaspectrometrische analyse.

2.4 Massaspectrometrie (ESI-LC-MS/MS)

Na digestie van de eiwitten uit de geprikte spots werden de extracten droog gedampt en opgelost in 15 µl cortisone-werkoplossing (0,004 ng/µl cortisone in 100mM azijnzuur (solvent B)) waarbij de cortisone functioneerde als interne standaard. Het staal werd gedurende 5 min gesoniceerd. De vloeistofchromatografie voorafgaand aan massaspectrometrie maakte gebruik van een C18-kolom waarbij de scheiding van de peptiden gebeurde op basis van polariteit. Het is dus een vorm van partitiechromatografie waarbij de meest polaire peptiden het eerst elueren van de kolom onder een stijgende organische gradiënt [27].

Door middel van de *autosampler* werd automatisch 10 µl staal opgenomen en via *tubing* verplaatst naar de prekolom (NS-TC C18, inwendige diameter (ID) = 100 µm, lengte *packing* = 2 cm, Nanoseparations), waar de peptiden geconcentreerd en ontzout werden, en naar de analytische kolom (PepMapTMC18, ID = 50µm, lengte *packing* = 18 cm, Nanoseparations), waar de eigenlijke scheiding van de peptiden op basis van hun polariteit plaats vond. De overdracht van de peptiden gebeurde met een lineair stijgende gradiënt van acetonitrile in azijnzuur (100mM) (5% tot 60%). Het verloop van de vloeistofchromatografie voorafgaand aan massaspectrometrie wordt weergegeven in tabel 2. De analyse duurde 60 min voor stalen afkomstig van 2-D GE-experimenten terwijl de lineaire gradiënt van acetonitrile werd opgebouwd over 120 min bij stalen afkomstig van 2-D LC-experimenten.

Tabel 2: Verloop van de vloeistofchromatografie voorafgaand aan massaspectrometrie

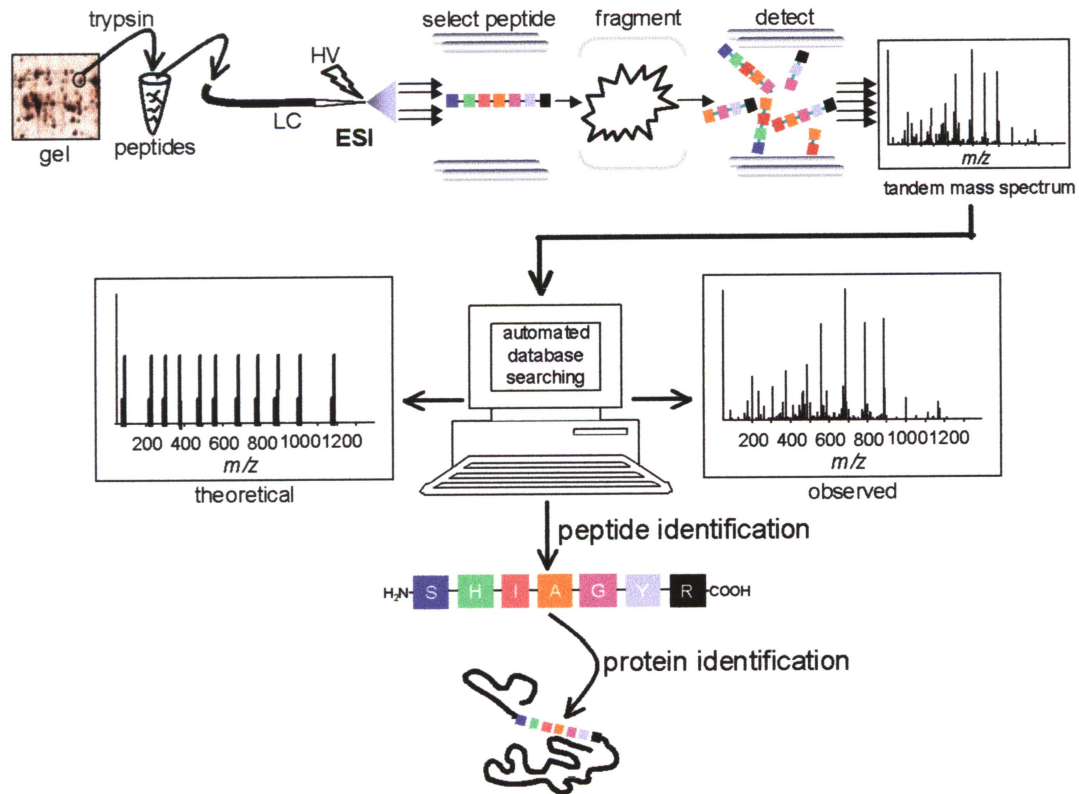
Tijd (min)	Solvent A (acetonitrile in azijnzuur (100mM))	Solvent B (100mM azijnzuur in water)
0 min	0%	100%
5 min	0%	100%
5,1 min	5%	95%
60 min	60%	40%

Door middel van de *electrospray ionisation-liquid chromatography tandem mass spectrometry* (ESI-LC-MS/MS) werden de peptidensequenties geanalyseerd en de proteïnen geïdentificeerd. De analyse gebeurde met een *LCQ Classic* toestel (ThermoFinnigan, San-Jose, VS).

Na de scheiding van de peptiden kwamen deze terecht in de massaspectrometer, die opgebouwd is uit drie delen, namelijk de ionenbron, de massa-analysator en de detector. Bij deze vorm van massaspectrometrie werd gebruik gemaakt van *electrospray ionisation* (ESI). De ionenbron werd gevormd door een capillaire naald die verbonden was met de analytische kolom en waarover een spanning werd aangebracht van 4000V zodat er een fijne *spray* gevormd werd. Hierdoor werd het staal getransformeerd van een vloeibare naar een gasvormige fase. De gevormde peptide-ionen kwamen vervolgens in een verwarmde capillair (150°C) terecht en werden zo naar de massa-analysator geleid die functioneerde als *ion trap*. Hier gebeurde de *trapping* of collectie waarbij alle ionen in de *ion trap* verzameld werden. Dit gebeurde door over het lenzensysteem en de *quadrupoles* een lading aan te leggen zodat enkel de geladen deeltjes doorgelaten werden en deze een ionenbundel vormden. Alle peptiden met een massa gelegen tussen 350 en 1500 Thompson werden geselecteerd, de overigen werden uitgestoten. De ionen beschreven een stabiele baan in een *radio frequency quadrupole* veld. Door de spanningen te veranderen, verkregen de ionen een onstabiele baan en werden ze uitgestoten. De verdreven ionen kwamen vervolgens terecht in de detector die functioneerde als *electron-multiplier*. Hier werd een elektronisch signaal opgewekt dat werd doorgestuurd naar een computer en geregistreerd werd als een piek. Op deze manier ontstond er een chromatogram waarbij de massa/lading (m/z)-verhouding werd uitgezet tegen de intensiteit (aantal *counts*). Zo werd elke seconde een *full scan* bekomen. De peptiden met de drie hoogste pieken uit elke *full scan* werden telkens geïsoleerd in de *ion trap* en gefragmenteerd door botsingen met heliumgas tot dochterionen waarbij elk van deze moleculen geladen werd. Zo ontstonden er b-ionen wanneer de lading zich bevond aan de

amino-terminus van het peptide en y-ionen wanneer de lading zich bevond aan de koolstof-terminus. De m/z-verhouding van de dochterionen werd opnieuw bepaald door de massa-analysator. Het verschil in de m/z-verhouding van twee opeenvolgende peptidefragmenten kwam overeen met 1 aminozuur waardoor de aminozuursequentie van de peptiden achterhaald kon worden.

De bekomen massaspectra werden aangeboden onder de vorm van *differential thermal analyzer (dta)-files*, gecreëerd met behulp van de *computersoftware dta-select*, aan zoekmachines zodat de proteïnen geïdentificeerd konden worden. Er werd gebruik gemaakt van 2 zoekmachines die elk een verschillend logaritme gebruikten om de proteïnen te identificeren. Deze zoekmachines waren Mascot (Matrix Sciences, Londen, VK) en Sequest (ThermoFinnigan) en maakten respectievelijk gebruik van de databanken NCBI nr en Swissprot om de eiwitten te identificeren. Als parameters werden carbamidomethylatie als vaste modificatie en de oxidatie van methionine, histidine en tryptofaan als dynamische modificatie ingevoerd. De proteïnen uit de databank werden *in silico* geknipt met trypsine en de bekomen spectra werden vergeleken met de experimenteel bekomen MS/MS-pieken die werden ingevoerd door middel van de *dta-files*. De correlatiecoëfficiënt (XCorr) geeft aan in welke mate er een overeenkomst is tussen de theoretische en experimentele spectra. Voor Sequest zijn dit de identificaties met een X-correlatie van meer dan 1,8 voor éénwaardig geladen peptiden, meer dan 2,5 voor tweewaardig geladen peptiden en meer dan 3,5 voor driewaardig geladen peptiden. ΔC_n geeft het verschil weer tussen het best fittende theoretische spectrum dat gevonden werd en het tweede theoretische spectrum. Deze parameter moet groter zijn dan 0,1 voor een significante identificatie. Voor Mascot geldt de parameter van $p < 0,05$ omtrent de significantie van peptiden. Een samenvatting van de verschillende stappen van massaspectrometrie wordt weergegeven in figuur 3.



Figuur 3: Samenvatting massaspectrometrie

Er werden manueel spots geprikt uit een 2-D gel. De eiwitten uit deze spots werden getrypsiniseerd en onderworpen aan massaspectrometrische analyse. Hiervoor werden de peptiden eerst gescheiden op basis van polariteit door middel van vloeistofchromatografie. Vervolgens werden de peptiden via electrospray ionisatie (ESI) getransformeerd naar de gasvormige fase. Door de massa-analysator werden de peptide-ionen gescheiden op basis van massa/lading (m/z)-ratio's en uiteindelijk werden ze gedetecteerd door een electron-multiplier detector. Zo werd de full scan bekomen waaruit telkens de peptiden met de drie meest intense pieken geselecteerd werden. Deze peptiden werden gefragmenteerd tot dochterionen waarvan opnieuw de m/z -ratio bepaald werd. Zo werd een tandem-massaspectrum bekomen. Dit werd aangeboden aan een zoekmachine (Mascot of Sequest) waar een eiwitdatabank in silico geknipt werd met trypsine. De experimenteel bekomen massaspectra werden vergeleken met de theoretische spectra waardoor een peptidesequentie en uiteindelijk het proteïne geïdentificeerd kon worden.

2.5 2-dimensionele vloeistofchromatografie (2-D LC)

Tijdens 2-D LC werden peptiden in een eerste dimensie gescheiden op basis van verschil in lading. De tweede dimensie betreft de vloeistofchromatografie voorafgaand aan massaspectrometrie, die de peptiden scheidt op basis van het verschil in polariteit.

2.5.1 Staalvoorbereiding

Er werd een delipidatie uitgevoerd op de EAE- en controlestalen gesuspenderd in rehydratatiebuffer door toevoeging van aceton/methanol (8:1) en een incubatie van 2u bij -20°C. Hierna werden de stalen gedurende 30 min gecentrifugeerd aan 13200 rpm en 4°C. Het supernatans werd afgenomen en de pellet werd gedroogd in de vacuümcentrifuge. De pellet werd vervolgens opgelost in 100 µl denaturatiebuffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 6 M ureum, 5 mM DTT). De stalen werden gedurende 1u geïncubeerd bij 56°C. Na afkoelen van de stalen tot kamertemperatuur werd 33 mM iodacetamide in 50 mM NH₄HCO₃ pH 7,8 toegevoegd en de stalen werden geïncubeerd in het donker bij kamertemperatuur gedurende 45 min. Hierna werd het staal over een *ultrafree MC cut off 5000 Da* filter (Millipore Corporation, Bedford, MA) gebracht en gecentrifugeerd aan 13200 rpm. Daarna werd er viermaal gespoeld met 50 mM NH₄HCO₃ pH 7,8 en gecentrifugeerd aan 13200 rpm. Aan een retendaat dat correspondeert met 40 µg eiwit werd 2 µg trypsine in 100 µl 50 mM NH₄HCO₃ toegevoegd. De stalen werden overnacht geïncubeerd bij 37°C. Tot slot werd 200 µl methanol aan de stalen toegevoegd en het geheel werd droog gedampt in de vacuümcentrifuge. Aan het droog gedampte staal werd 25 µl 0,5% azijnzuur (oplossing A) toegevoegd.

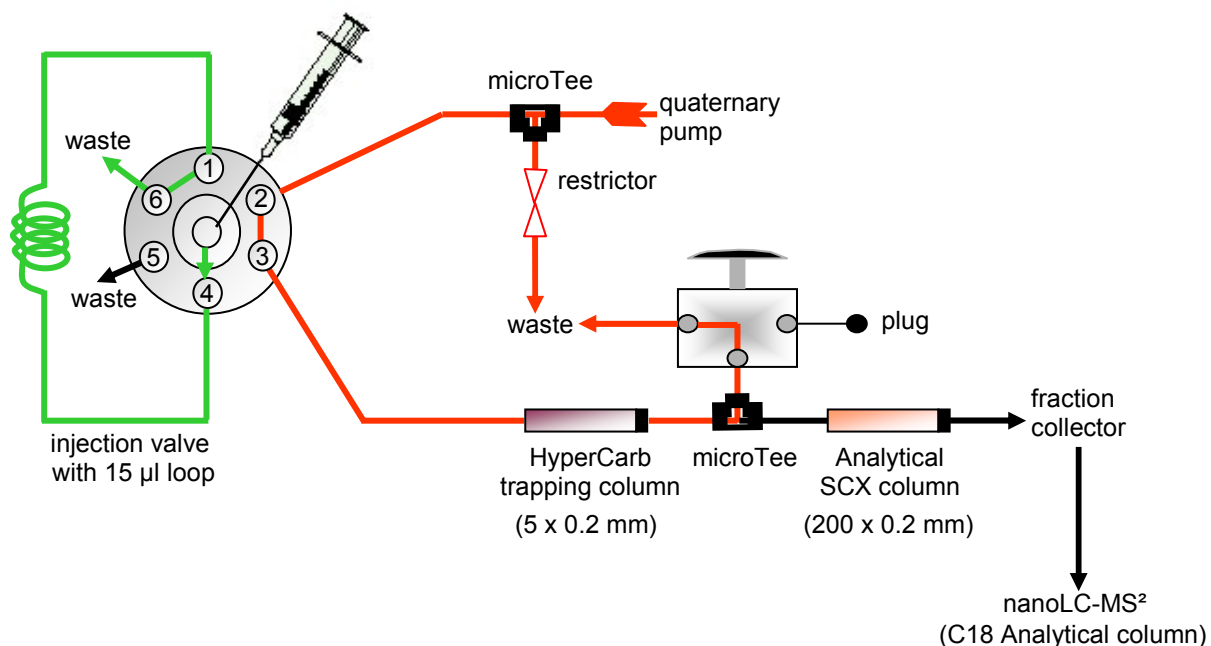
2.5.2 2-D LC

Tijdens de eerste dimensie gebeurde de scheiding van de peptiden op basis van hun lading door middel van kationen-uitwisselingschromatografie (*strong cation exchanger* (SCX)). Er werd 12,5 µl (20 µg eiwit) van het staal opgebracht op de prekolom (*HyperCarb trapping column*, ID = 200 µm, lengte *packing* = 5 cm, Nanoseparations) waar de peptiden geconcentreerd en ontzout werden. Gedurende 5 min, tijdens het laden van het EAE- of controlestaal op de prekolom, werd de verbinding tussen de prekolom en de analytische SCX kolom (PolySULFOETHYL *Aspartamide column*, ID = 200 µm, lengte *packing* = 12 cm, Nanoseparations) afgesloten zodat de vloeistof (100% oplossing A) enkel over de prekolom liep en via een T-stuk naar de *waste*. Hier werd de vloeistof (doorstroom) opgevangen om het verlies aan peptiden te controleren. Na 5 min werd de verbinding tussen de prekolom en de analytische kolom hersteld en werd de transfervloeistof (70% acetonitrile; 0,5% azijnzuur) geïnjecteerd waardoor het staal werd overgedragen naar de analytische SCX kolom. Na 7 min startte de elutie van de peptiden op de analytische SCX kolom. Deze elutie werd bewerkstelligd met een lineair stijgende zoutgradiënt (6%/min), beginnend met 100% oplossing A, overgaand naar 100% oplossing B (250 mM KCl, 35% acetonitrile en 0,5%

azijnzuur) en vervolgens naar 100% oplossing C (500 mM KCl, 35% acetonitrile en 0,5% azijnzuur). De *input flow* bedroeg 0,4 ml/min over het systeem en 0,08 ml/min over de kolom. De scheiding gebeurde op basis van de lading van de peptiden waarbij de minst positief geladen peptiden het eerst elueerden. De SCX-fractionen werden elke minuut manueel gecollecteerd gedurende 55 minuten. Per fractie werd ongeveer 2 µl eluaat opgevangen. Hieraan werd 20 µl 5% acetonitrile in 100 mM azijnzuur met 0,004 ng/µl cortisone als interne standaard toegevoegd. Na de chromatografie werd het systeem achtereenvolgens gespoeld met oplossing A, 0,1M NaCl en EDTA voor het verwijderen van de ionen. Het verloop van de gebeurtenissen wordt voorgesteld in tabel 2. De schematische voorstelling van de opstelling van 2-D LC wordt weergegeven in figuur 4.

Tabel 3: Verloop van de vloeistofchromatografie

Tijdstip (min)	Gebeurtenis
0 min	Injectie van het staal; laden van het staal op de prekolom
5 min	Injectie van de transfervloeistof
6,5 min	Overdracht van peptiden van de prekolom naar de analytische kolom
7 min	100% oplossing A (0,5% azijnzuur in water)
23,6 min	100% oplossing B (250 mM KCl, 35% acetonitrile en 0,5% azijnzuur)
40,2 min	100% oplossing C (500 mM KCl, 35% acetonitrile en 0,5% azijnzuur)
50,1 min	Reconstitutie van de kolom met 100% oplossing A
60 min	einde



Figuur 4: Schematische voorstelling van 2-D LC

Het EAE- of controlestaal werd geïnjecteerd en geladen op de prekolom. Vervolgens werd na 5 min transfervloeistof geïnjecteerd zodat de peptiden van de prekolom naar de analytische kolom werden overgedragen. Door het aanleggen van een lineair stijgende zoutgradiënt kwamen de peptiden los van de kolom afhankelijk van hun lading. De input flow bedroeg 0,4 ml/min over het systeem en 0,08 ml/min over de kolom. Er werd elke minuut gedurende 55 minuten een fractie van het eluaat opgevangen. De peptiden ondergingen vervolgens een tweede scheiding op basis van hun polariteit zoals beschreven bij de ESI-LC-MS/MS (2.4) met als modificatie dat de lineair stijgende gradiënt van acetonitrile opgebouwd werd over 120 min.

Tijdens de tweede dimensie gebeurde de scheiding van de peptiden op basis van hun polariteit. Deze scheiding maakte deel uit van de ESI-LC-MS/MS zoals beschreven onder 2.4 met één modificatie, namelijk de opbouw van de lineaire gradiënt van acetonitrile werd gespreid over 120 minuten in plaats van over 60 minuten.

2.6 Western blot

Western blot verwijst naar de *transfer* van de gescheiden proteïnen van een gelmatrix naar een dun membraan en gebeurt via een elektroforetische *transfer*. De blot kan vervolgens gebruikt worden om specifieke proteïnen te detecteren door middel van antilichamen [27]. In deze studie werd gebruik gemaakt van een antilichaam tegen het proteïne stathmine.

Voor deze experimenten werden een EAE- en controlestaal opgezet, een oligodendrocytstaal van een primaire cultuur, twee stalen perifere bloed-mononucleaire cellen (PBMC's) van MS-patiënten en twee stalen PBMC's van gezonde personen. De oligodendrocyten en PBMC's werden eerst gelyseerd met de rotor-stator mixer in lysisbuffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 6 M

ureum; 5 mM DTT; 4% CHAPS). Vervolgens werden de stalen gecentrifugeerd en werd er een eiwitbepaling volgens Bradford uitgevoerd op het supernatans [26]. De voorbereiding van het EAE- en controlestaal verliep zoals beschreven onder 2.2.

Ter uitvoering van een 1-dimensionele (1-D) SDS-PAGE werd een *resolving* gel van 12% gegoten en gedurende 45 min gepolymeriseerd, waarna een stacking gel van 4% werd gegoten en gepolymeriseerd gedurende 30 min. De stalen werden 1 op 2 verdund in reducerende staalbuffer (13,3% 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 26,6% glycerol; 2% SDS; 1% bromofenolblauw) met 5% β -mercapto-ethanol en gedurende 5 min opgekookt. Vervolgens werd 10 μ g eiwit van elk staal geladen en werd de elektroforese gestart. Er werd een elektrisch veld aangelegd van 200V gedurende 55 min. Na de elektroforese werd de gel samen met de vezeldoekjes en het filtreerpapier geweekt in transferbuffer (25 mM Tris, 192 mM glycine pH 8,3) gedurende 15 min. Voor de *blot* werd gebruik gemaakt van een polyvinylideen-difluoride (PVDF)-membraan dat vooraf geweekt werd in methanol. Vervolgens werd de *gel sandwich* (Bio-Rad, Hercules, CA, VS) gemaakt door achtereenvolgens een vezeldoek, filtreerpapier, de 1-D gel, het PVDF-membraan, filtreerpapier en een vezeldoek te monteren met behulp van een cassette. Er werd gedurende 1u *geblot* bij 100V (*Power Pac* 1000, Bio-Rad, Hercules). Na het *blotten* werd het PVDF-membraan gedurende 2u geïncubeerd in *blocking* buffer (2% melkpoeder (Marvel) in PBS pH 7,2). Hierna werd het membraan 3x gewassen gedurende 15 min met wasbuffer (0,05% Tween-20 in PBS). De incubatie met het primaire antilichaam gericht tegen stathmine (*anti-stathmin*, Calbiochem, Darmstadt, Duitsland) werd uitgevoerd gedurende 1u. Het primaire antilichaam werd 1:5000 verdund in *blocking* buffer. Daarna werd het membraan 3x gewassen gedurende 15 min met wasbuffer gevolgd door een incubatie gedurende 1u met het secundaire antilichaam (*goat anti-rabbit immunoglobulins/horse radish peroxidase*; DakoCytomation, Glostrup, Denemarken) in een 1:2000 verdunning in *blocking* buffer. Na 3x wassen met wasbuffer gedurende 15 min, werd het membraan gekleurd met 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)-kleuroplossing (50 mM natriumacetaat pH 5,0; 0,02% DAB, 0,03% waterstofperoxide). De kleurreactie werd gestopt door het PVDF-membraan te spoelen met Milli Q.

2.7 Immunohistochemische kleuringen

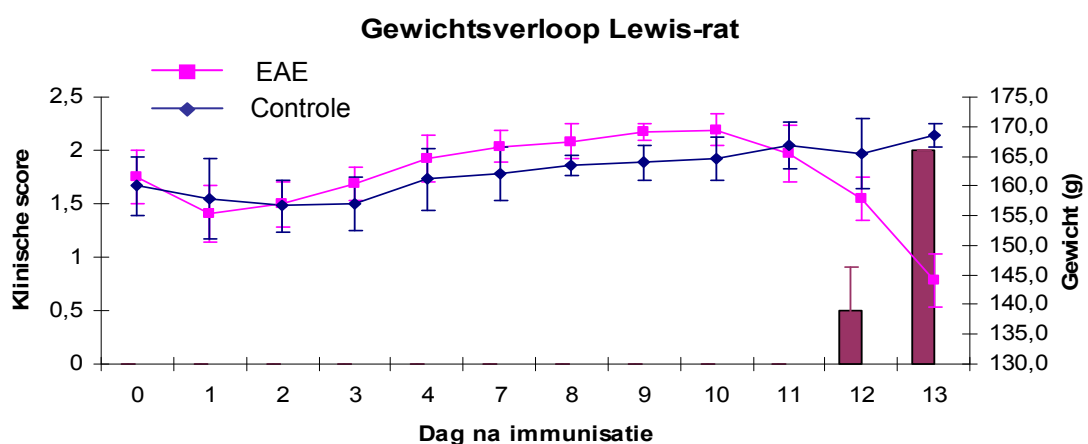
Door middel van immunohistochemische kleuringen op hersencoupees van EAE-Lewis-ratten en gezonde Lewis-ratten kan nagegaan worden in welke gebieden en door welke cellen het proteïne stathmine tot expressie wordt gebracht.

Er werd gebruik gemaakt van hersencoupes van een gezonde en een EAE-Lewis-rat afkomstig uit het gebied in de hersenen net boven de hersenstam. Het hersenmateriaal werd opgesneden met een microtoon met een dikte van 6 μm en de weefsels werden op een objectglaasje aangebracht. De volgende stap was het deparaffineren van de coupes. Dit gebeurde door de objectglaasjes tweemaal gedurende 2 à 3 min onder te dompelen in xyleen. Vervolgens werden de weefsels tweemaal geïncubeerd gedurende 2 à 3 min in 100% ethanol. In een volgende stap werd het peroxidase dat reeds aanwezig was in de coupes geneutraliseerd door de coupes te *blocken* in een oplossing van 0,5% H_2O_2 in methanol gedurende 20 min. Daarna werden de coupes gespoeld in PBS en in een *block*-oplossing van 10% ratserum in PBS geplaatst gedurende 20 min om aspecifieke binding van het primaire antilichaam te voorkomen. Vervolgens gebeurde de incubatie met het primaire antilichaam, anti-stathmine (Calbiochem), gedurende 1u30. Er werden vier verdunningen van het primaire antilichaam uitgetest, namelijk 1:500, 1:1000, 1:2000 en 1:5000. De verdunningen werden gemaakt in 10% ratserum in PBS. Na de incubatie werden de weefsels tweemaal gespoeld met PBS en geïncubeerd met het secundaire antilichaam (*goat anti-rabbit immunoglobulins/horse radish peroxidase*; DakoCytomation) in een verdunning van 1:100 in 0,1% BSA in PBS gedurende 1u. Na de incubatie werden de coupes tweemaal gespoeld in PBS. De kleuring gebeurde met behulp van de *DAB Envision Kit* (Sigma, Bornem, België) gedurende 2 min en werd gestopt in PBS. De tegenkleuring betrof een kernkleuring door middel van hematoxyline gedurende 30 sec. Daarna werden de weefsels gespoeld met kraanwater gedurende 10 min. Het inbedden gebeurde met stijgende alcoholbaden waarbij de objectglaasjes ondergedompeld werden in achtereenvolgens 70% ethanol, 85% ethanol, 95% ethanol (tweemaal), 100% ethanol (tweemaal) en xyleen (tweemaal) gedurende 2 min per bad. De dekglasjes werden gemonteerd met behulp van Entellan (Merck, Darmstadt, Duitsland). Er werd ook een negatieve controle getest tijdens het experiment om een aspecifieke binding van het secundaire antilichaam uit te sluiten. Het weefsel werd op dezelfde manier behandeld als hierboven beschreven met als enige modificatie een incubatie met de *block*-oplossing in plaats van met het primaire antilichaam gedurende 1u30. Vervolgens werden de weefsels bestudeerd door middel van microscopie en gefotografeerd met behulp van de fotomicroscop.

3. Resultaten

3.1 Proefdieren

In het onderzoek naar de pathogenese van MS wordt vaak gebruik gemaakt van het goed gekarakteriseerde diemodel voor MS, namelijk EAE. In deze studie werden drie Lewis-ratten geïmmuniseerd met MBP in combinatie met cFA waardoor de acute vorm van EAE werd geïnduceerd. Er werden ook drie controle-Lewis-ratten gebruikt die enkel geïnjecteerd werden met cFA. Het gewicht en de klinische score werden dagelijks opgetekend (figuur 5).



Figuur 5: Klinische score en gewichtsverloop van EAE- en controle-Lewis-ratten na immunisatie.

Drie Lewis-ratten werden geïmmuniseerd met MBP waardoor de acute vorm van EAE werd geïnduceerd, drie Lewis-ratten functioneerden als controle. Het gemiddelde gewicht van de drie EAE- en drie controle-Lewis-ratten wordt aangeduid met lijnen. De gemiddelde klinische score van de drie EAE-Lewis-ratten wordt weergegeven door middel van balken.

Klinische scores: 0 = geen neurologische verschijnsels; 0,5 = gedeeltelijk verlies van staart-tonus; 1 = volledig verlies van staart-tonus; 2 = paresis (spierzwakte) van de achterpoten; 3 = paralyse van de achterpoten; 4 = stervend; 5 = dood.

De EAE-Lewis-ratten vertoonden een duidelijke gewichtsafname vanaf dag 11 na de immunisatie, terwijl bij de controle-Lewis-ratten het gewicht bleef toenemen. Er werd een gemiddelde klinische score van 0,5 opgetekend op dag 12 voor de EAE-Lewis-ratten. Dit komt overeen met een gedeeltelijk verlies van de staart-tonus als klinisch symptoom. Op dag 13 werd een spier-zwakte van de achterpoten waargenomen overeenkomend met de klinische score 2. Op dag 14 werden de ratten geofferd.

3.2 Hersenproteoom van de Lewis-rat

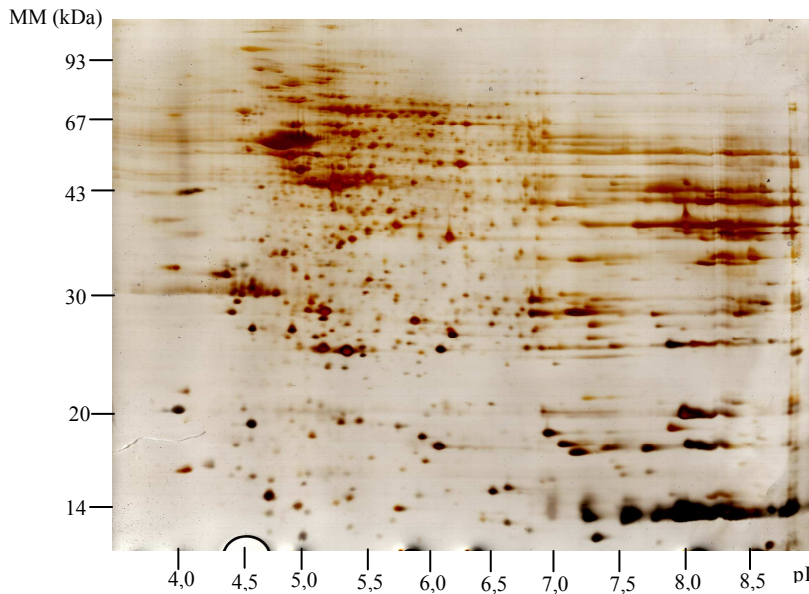
Het eerste doel van de stage is het opstellen van een proteoomkaart van de hersenen van de Lewis-rat. De identificatie van de proteïnen werd bekomen door het toepassen van twee technieken, namelijk 2-D GE en 2-D LC, gekoppeld aan massaspectrometrie. Vervolgens werd de differentiële expressie bestudeerd van het hersenproteoom van de EAE- en controle-Lewis-ratten.

De drie EAE-Lewis-ratten en de drie controle-Lewis-ratten werden 14 dagen na de immunisatie geofferd. De hersenen werden gedissecteerde, gedisintegreerd en gehomogeniseerd. De eiwitten werden geprecipiteerd en er werd een eiwitbepaling uitgevoerd volgens de methode van Bradford [26]. Zo werden er drie EAE-stalen en drie controle-stalen bekomen die gebruikt werden voor de verschillende experimenten.

3.2.1 2-D GE van het hersenproteoom

De eerste techniek die gebruikt werd voor het opstellen van de proteoomkaart is 2-D GE. Deze techniek bestaat uit twee dimensies waarbij in de eerste dimensie, IEF, de scheiding gebeurde op basis van de lading van de eiwitten. Er werd gebruik gemaakt van een lineaire pH-gradiënt van pH 3 tot 10. In de tweede dimensie, SDS-PAGE, werd een polyacrylamide-gel van 12,5% gebruikt voor de scheiding van de proteïnen op basis van moleculaire grootte. Het 2-D GE-experiment werd viermaal herhaald met telkens 150 µg eiwit van het hersenmateriaal van de drie EAE-Lewis-ratten en de drie controle-Lewis-ratten. De gelen werden gekleurd door middel van zilverkleuring volgens de methode van Shevchenko (2.2.3) [29]. In figuur 6 wordt het bekomen 2-D electroferogram weergegeven.

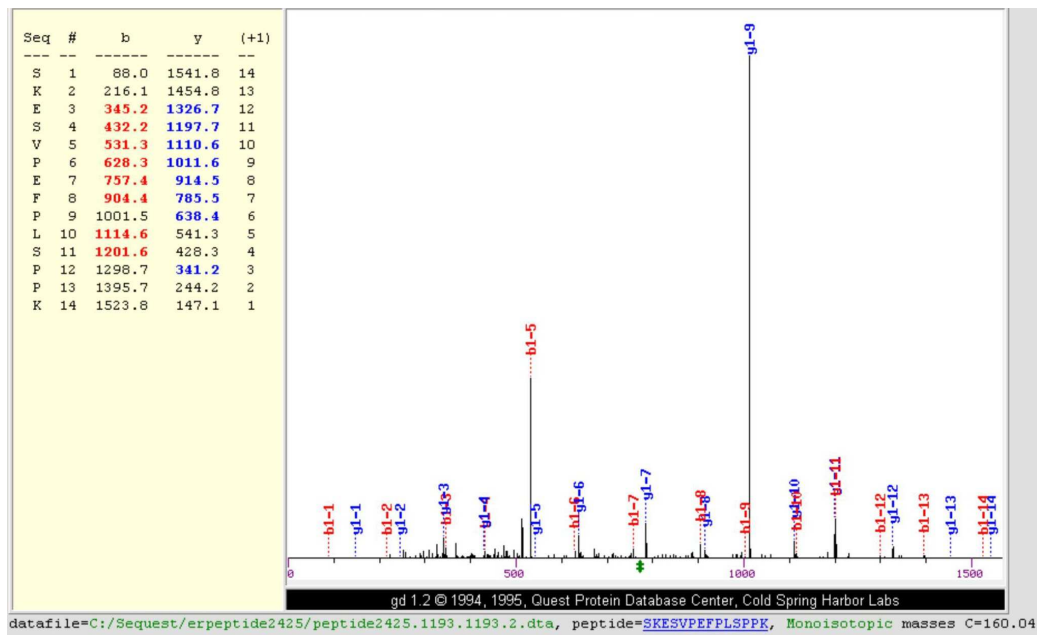
Vervolgens werden er 408 verschillende spots uit de 24 verkregen gelen manueel geprikt. Hiervan werden reeds 205 spots getrypsiniseerd en verder geanalyseerd door middel van massaspectrometrie (zie 2.4). Deze analyse leidde tot de identificatie van 192 verschillende eiwitten. Eenendertig spots konden niet geïdentificeerd worden daar de analyse een negatief resultaat opleverde. De geprikte spots worden weergegeven in figuur A (bijlage). De eiwitidentificaties van de verschillende spots wordt weergegeven in tabel A (bijlage).



Figuur 6: 2-D electroferogram van de hersenen van de Lewis-rat.

Door middel van 2-D GE van het hersenmateriaal van een Lewis-rat werden de eiwitten gescheiden op basis van hun lading en moleculaire massa. Er werd gebruik gemaakt van een lineaire pH-gradiënt van pH 3 tot 10 en een polyacrylamide-gel van 12,5%. Na de scheiding werden de eiwitspots gevisualiseerd door middel van zilverkleuring volgens Shevchenko [29].

De identificatie van de eiwitten gebeurde door middel van *electrospray ionisation-liquid chromatography tandem mass spectrometry* (ESI-LC-MS/MS). De peptiden werden na digestie met trypsine eerst gescheiden met behulp van vloeistofchromatografie waarbij de scheiding gebeurde op basis van de polariteit. Vervolgens werden de peptiden geïoniseerd door middel van *electrospray* ionisatie en werd de m/z verhouding bepaald door de massaspectrometer. Zo werd een *full scan* bekomen. Uit elke *full scan* die gegenereerd werd, werden de drie hoogste pieken geselecteerd voor tandem-massaspectrometrie. Deze peptiden werden gefragmenteerd tot geladen dochtermoleculen. Aan de hand van het tandem-massaspectrum kon de aminozuursequentie bepaald worden. Het verschil in de verhouding m/z van twee opeenvolgende peptidefragmenten komt namelijk overeen met 1 aminozuur. Een voorbeeld van een massaspectrum van stathmine wordt weergegeven in figuur 7.



Figuur 7: Massaspectrum van stathmine

Het massaspectrum werd bekomen door uit de full scan de drie meest intense pieken te selecteren voor tandem-massaspectrometrie. Deze peptiden werden gefragmenteerd tot geladen dochtermoleculen. Aan de hand van het tandem-massaspectrum kon de aminozuursequentie bepaald worden. Het verschil in de verhouding m/z van twee opeenvolgende peptidefragmenten komt namelijk overeen met 1 aminozuur. Dit is een voorbeeld van een massaspectrum van een peptide aanwezig in het eiwit stathmine.

Door het aanbieden van de massapijken aan zoekmachines zoals Mascot en Sequest konden de eiwitten geïdentificeerd worden. Mascot en Sequest maken gebruik van de NCBI- en Swissprot-databank respectievelijk, met *Rodentia* als taxonomie. Als parameters werden carbamidomethylatie als vaste modificatie en de oxidatie van methionine, histidine en tryptofaan als dynamische modificatie ingevoerd. De proteïnen uit de databank werden *in silico* geknipt met trypsine en de bekomen spectra werden vergeleken met de experimenteel bekomen massapijken die werden ingevoerd door middel van de *dta-files*. De correlatiecoëfficiënt (XCorr) geeft aan in welke mate er een overeenkomst is tussen de theoretische en experimentele spectra. ΔC_n geeft het verschil weer tussen het best fittende theoretische spectrum dat gevonden werd en het tweede theoretische spectrum. Enkel de significante identificaties in Sequest en Mascot werden opgenomen in tabel A (bijlage). Voor Sequest zijn dit de identificaties met een X-correlatie van meer dan 1,8 voor éénwaardig geladen peptiden, meer dan 2,5 voor tweewaardig geladen peptiden en meer dan 3,5 voor driewaardig geladen peptiden en de identificaties met $\Delta C_n > 0,1$. Voor Mascot geldt de parameter van $p < 0,05$ omtrent de significantie van peptiden. Een voorbeeld van een Mascot- en Sequest rapport van het eiwit stathmine worden weergegeven in figuur 8.

A

A IPI:IP100231697.3 SWISS-PROT:P1366*										150 39 E:2.9e8 9% avg:7.4e6 39.4,1.0,0.0				
826	5.1e6	1193	2	-2.0	1543.8	3.44	0.18	433	1	16/26	--	ipi:ipi00231697	--	(R)SKESVPEFPLSPPK
1117	9.8e6	1417	2	-2.1	1390.9	3.36	0.32	608	7	13/24	--	ipi:ipi00231697	+1	(R)ASGQAFELILSPR
192	3.1e6	0693	2	-1.0	1549.7	3.36	0.42	794	1	17/26	--	ipi:ipi00231697	+1	(K)NKEKDPADETAD
373	2.4e7	0825	2	-1.1	1166.6	3.32	0.27	1066	1	16/18	--	ipi:ipi00231697	+1	(K)AIEENNNFSK
1123	7.4e6	1421	2	-0.6	1389.4	3.29	0.25	637	3	14/24	--	ipi:ipi00231697	+1	(R)ASGQAFELILSPR
1094	1.5e7	1398	2	-0.7	1389.4	3.29	0.22	691	2	15/24	--	ipi:ipi00231697	+1	(R)ASGQAFELILSPR
820	3.8e6	1189	2	-1.1	1542.9	3.23	0.17	277	1	14/26	--	ipi:ipi00231697	--	(R)SKESVPEFPLSPPK
			↓			↓	↓							↓
			z			XCorr	ΔCn							Sequentie

B

8. [gi|8393696](#) Mass: 17278 Score: **278** Queries matched: 38
 stathmin 1 [Rattus norvegicus]

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
312	385.27	768.53	767.39	1.14	0	33	0.89	1	HVEEVR
313	385.72	769.42	767.39	2.03	0	(31)	1.5	1	HVEEVR
344	817.62	816.61	816.40	0.22	0	(11)	1.8e+002	10	LEAAEER
345	409.61	817.20	816.40	0.81	0	(31)	1.9	1	LEAAEER
346	409.70	817.38	816.40	0.99	0	32	1.5	1	LEAAEER

Figuur 8: Voorbeeld summary rapport van Sequest en Mascot

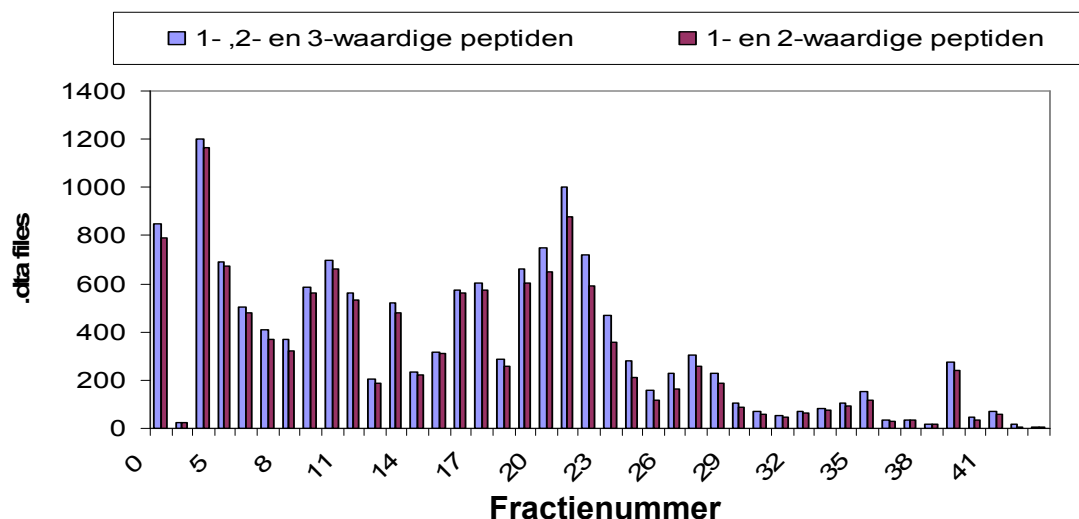
Deel A geeft een stuk uit het summary rapport weer van Sequest voor de identificatie van het eiwit stathmine. De cijfers in vet weergegeven zijn significante waarden. Identificaties met een X-correlatie (XCorr) van meer dan 1,8 voor éénwaardig geladen peptiden, meer dan 2,5 voor tweewaardig geladen peptiden en meer dan 3,5 voor driewaardig geladen peptiden en identificaties met $\Delta C_n > 0,1$ worden als significant beschouwd.

Deel B geeft een stuk uit het summary rapport van Mascot weer.

z: lading; XCorr: geeft aan in welke mate er een overeenkomst is tussen de theoretische en experimentele spectra; ΔC_n : geeft het verschil tussen het best fittende theoretische spectrum en het tweede theoretische spectrum; Sequence: peptidensequentie van de primaire overeenkomst.

3.2.2 2-D LC van het hersenproteoom

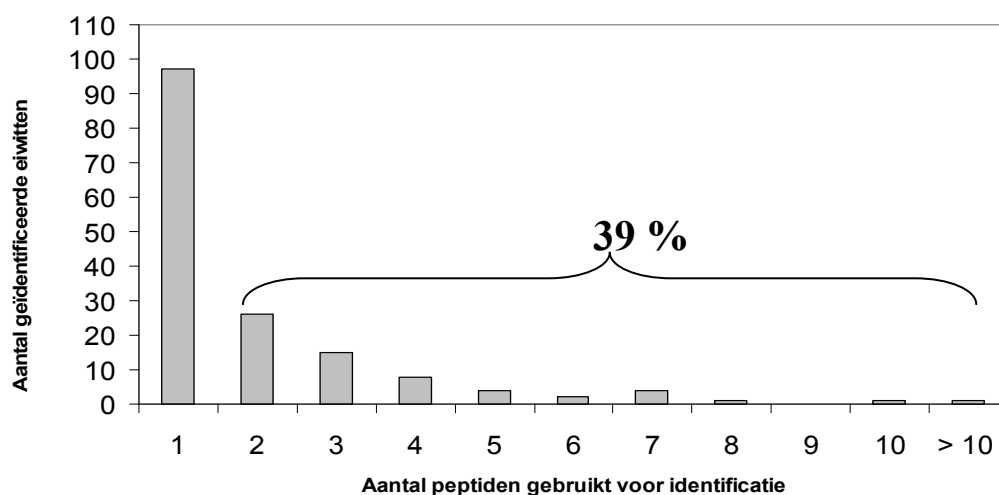
De tweede techniek die gebruikt werd voor het opstellen van de proteoomkaart is 2-D LC. Er werd gebruik gemaakt van een kwalitatieve vorm van vloeistofchromatografie waarbij de scheiding van de peptiden gebeurde op basis van lading in de eerste dimensie en op basis van polariteit in de tweede dimensie. Deze techniek werd tweemaal uitgevoerd met 20 µg eiwit van het EAE- en controle-staal. Tijdens de eerste dimensie werden de SCX-fracties elke minuut manueel gecollecteerd gedurende 55 min. Van deze 55 fracties werden er 45 geanalyseerd door middel van massaspectrometrie. In figuur 9 wordt het aantal *dta-files* uitgezet die per fractie gegenereerd werden. Het aantal *dta-files* komt overeen met het aantal MS/MS spectra die gegenereerd werden. Fractie nul komt overeen met de doorstroom die werd opgevangen tijdens het laden van de prekolom.



Figuur 9: Aantal MS/MS-spectra per fractie

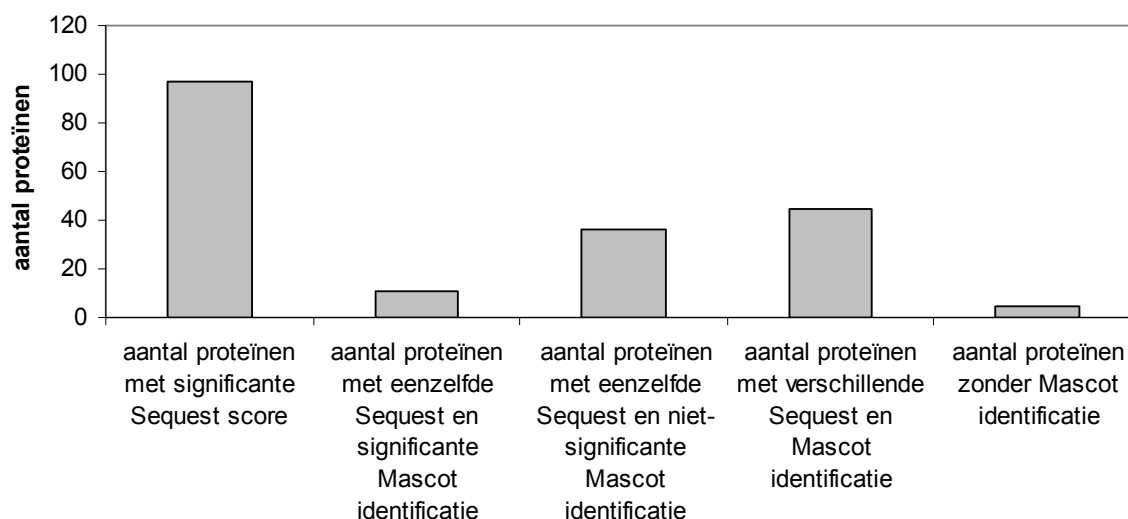
Er werd 20 µg eiwit van het EAE-staal geanalyseerd door middel van 2-D LC. Elke minuut werden manueel SCX-fracties gecollecteerd gedurende 55 minuten. Van deze 55 fracties werden 45 fracties geanalyseerd door middel van massaspectrometrie. Fractie nul komt overeen met de doorstroom.

De 2-D LC-analyse van het EAE-staal leverde 159 verschillende significante eiwitidentificaties op met behulp van de zoekmachine Sequest. De resultaten van het 2-D LC experiment van het controlestaal konden nog niet verwerkt worden. Figuur 10 geeft het aantal geïdentificeerde proteïnen weer ten opzichte van het aantal peptiden die gebruikt werden voor de identificatie. Voor 61% van de proteïnen gebeurde de identificatie op basis van 1 peptide.



Figuur 10: Aantal peptiden gebruikt voor de identificatie van eiwitten tijdens 2-D LC analyse van het EAE-staal
 Zevenennegentig proteïnen (61%) werden geïdentificeerd op basis van 1 peptide.

De proteïnen die geïdentificeerd werden op basis van 1 peptide, werden aangeboden aan de zoekmachine Mascot. Van de 97 proteïnen werden er 47 gemeenschappelijk gevonden door zowel Sequest als Mascot waarvan er aan 11 identificaties een significante Mascotscore toegekend werd (figuur 11).



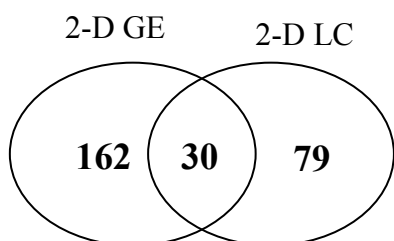
Figuur 11: Proteïnen aangeboden aan Mascot

Proteïnen met een significante Sequest score die geïdentificeerd werden op basis van 1 peptide werden aangeboden aan Mascot. Van deze 97 proteïnen werden 47 identificaties gemeenschappelijk gevonden met de identificaties van Sequest. Van deze 47 proteïnen hadden 11 identificaties een significante Mascotscore. Van de overige 50 proteïnen konden 5 proteïnen niet geïdentificeerd worden na het aanbieden van de dta-file aan Mascot.

Vijfenveertig proteïnen leverden een verschillende Mascot en Sequest identificatie op en vijf proteïnen konden niet geïdentificeerd worden door Mascot. Uiteindelijk werden in tabel B (bijlage) enkel de eiwitten opgenomen die voldeden aan de parameters van Sequest en Mascot zoals eerder beschreven. De analyse van het EAE-staal leverde dus de identificatie op van 109 verschillende proteïnen.

3.2.3 Vergelijking 2-D GE en 2-D LC

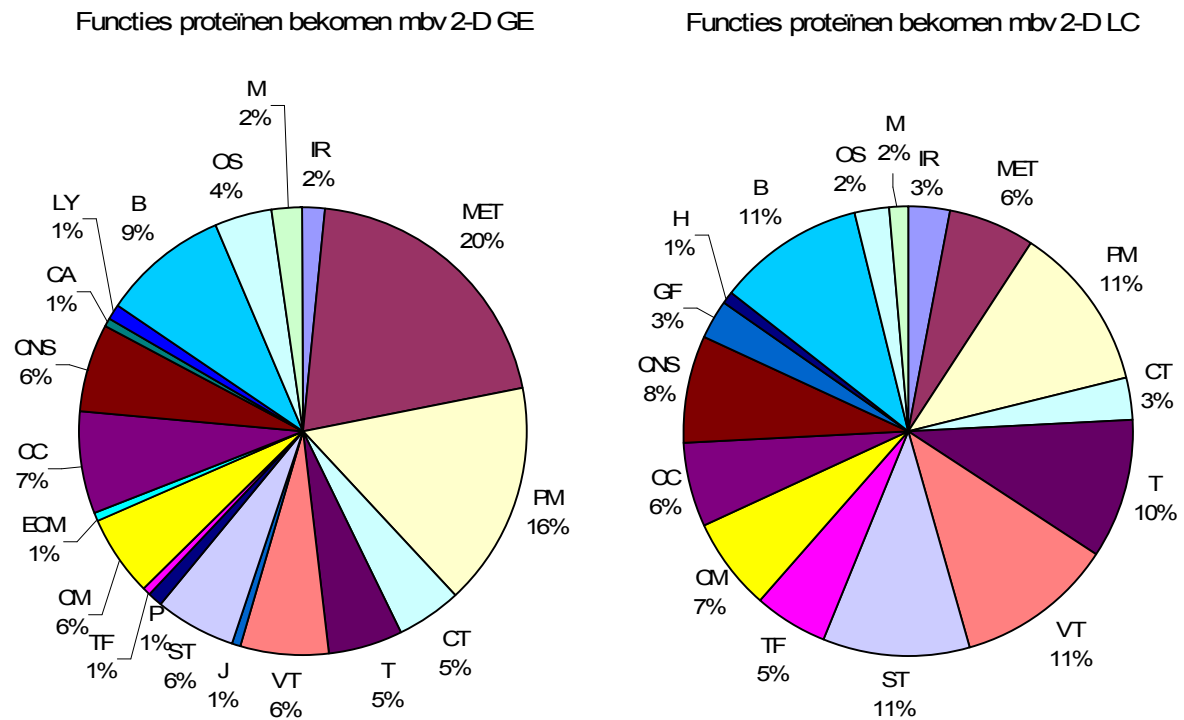
Een vergelijking tussen de resultaten van 2-D GE- en 2-D LC-experimenten van het EAE staal toonde aan dat er 30 proteïnen gemeenschappelijk geïdentificeerd werden (figuur 12).



Figuur 12: Aantal proteïnen geïdentificeerd met 2-D GE en 2-D LC

Met behulp van de 2-D GE techniek werden 188 verschillende proteïnen geïdentificeerd. De 2-D LC techniek kon 109 verschillende proteïnen identificeren. Er werden 30 gemeenschappelijke proteïnen geïdentificeerd.

De functie van de geïdentificeerde proteïnen werd bepaald en de proteïnen werden vervolgens in verschillende categorieën ingedeeld (figuur 13). Hieruit blijkt dat de twee technieken verschillen vertonen in de categorieën eiwitten die teruggevonden werden. Zo werden met het 2-D GE-experiment vooral proteïnen betrokken bij het metabolisme (lipiden, koolhydraten en proteïnen) geïdentificeerd. Deze categorieën zijn minder vertegenwoordigd in het 2-D LC-experiment. Door middel van de 2-D LC-techniek werden vooral proteïnen geïdentificeerd die betrokken zijn bij de signaaltransductie, bij het vesiculair en membranair transport en proteïnen die functioneren als transporters doorheen het lichaam. Deze categorieën proteïnen werden in mindere mate geïdentificeerd door middel van de 2-D GE-techniek. De overige categorieën zijn ongeveer gelijk vertegenwoordigd bij beide experimenten.



Figuur 13: Cellulaire functies van proteïnen geïdentificeerd uit het hersenproteoom van de Lewis-rat door middel van 2-D GE en 2-D LC.

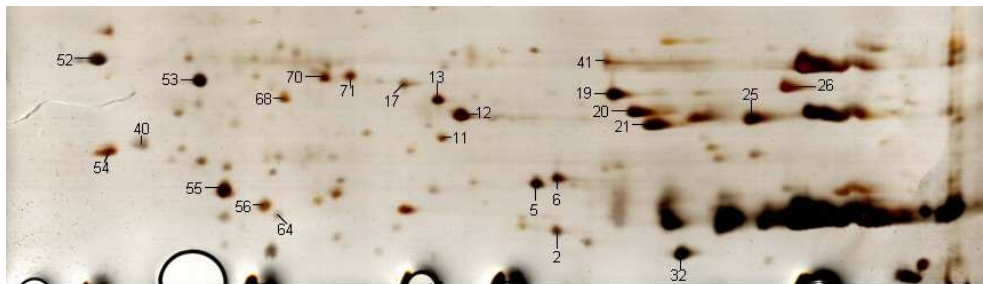
De vergelijking tussen de twee verschillende technieken toont aan dat er verschillende klassen proteïnen geïdentificeerd werden. Zo werden de geïdentificeerde proteïnen binnen de categorie van het metabolisme sterk vertegenwoordigd bij de 2-D GE techniek in vergelijking met 2-D LC. Omgekeerd waren de geïdentificeerde proteïnen uit de categorieën vesiculair transport en transporters prominenter aanwezig bij het 2-D LC experiment.

Legende: IR = immuunrespons; MET = metabolisme (lipiden en koolhydraten); PM = proteïnenmetabolisme; CT = kanalen; T = transporters in het lichaam; VT = vesiculair transport, secretiewegen en membraantransport; J = juncties en cel-cel contactmoleculen; ST = signaaltransductie; P = fosfatasen; TF = transcriptiefactoren en nucleaire proteïnen; CM = cytoskeletmoleculen; ECM = extracellulaire matrix; CC = celcyclus; CNS = CNS gerelateerde moleculen; CA = coagulatie moleculen; LY = lysosomale proteïnen; GF = groeifactoren en -receptoren; H = hormonen en receptoren; B = bindingsproteïnen; OS = stressproteïnen; M = andere.

3.3 Differentiële expressie

Het tweede doel van de stage betreft de studie van de differentiële expressie door middel van een vergelijking tussen het 2-D GE-patroon van een EAE-staal en een controlestaal. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de computersoftware Z3. Dit software-programma vergelijkt een EAE-gel met een controle-gel en geeft aan welke spots verhoogd of verlaagd tot expressie komen door aan elke spot een relatieve expressiewaarde toe te kennen. Er werden vier 2-D

GE-experimenten uitgevoerd waarbij telkens drie EAE-stalen van de drie EAE-Lewis-ratten en drie controlestalen van de drie controle-Lewis-ratten gebruikt werden. Er werd van elk staal 150 µg eiwit opgebracht. Van de op deze manier gecreëerde 24 gelen werden 20 gelen gebruikt voor de software-analyse. Vier gelen (2 EAE en 2 controle) werden niet weerhouden omwille van een lage kwaliteit. Voor 25 spots uit de onderste regio van de gel werd de relatieve expressiewaarde bepaald in de EAE-gel en in de controle-gel (figuur 14). De gemiddelden van deze waarden worden vergeleken in tabel 4.



Figuur 14: Analyse van differentiële expressie van spots in het laag-moleculair gebied van de gel

Er werden 4 2-D GE-experimenten uitgevoerd waarbij telkens drie EAE-stalen en drie controlestalen werden gebruikt. Van de 24 gecreëerde gelen werden er 20 gebruikt voor de software-matige analyse van het laag-moleculair gebied van de gel. Het software-programma Z3 vergelijkt een EAE-gel met een controlegel door aan elke spot een relatieve expressiewaarde toe te kennen. Van de genummerde spots werd de relatieve expressiewaarde verder bestudeerd (een controlegel werd gebruikt als voorbeeldgel).

Tabel 4 : Gemiddelde relatieve expressiewaarde van 25 spots in het laag-moleculair gebied van de gel

Spot nummer	Identificatie	EAE Gemiddelde	EAE/C	Controle Gemiddelde	C/EAE
2	NADH ubiquinone oxidoreductase 13kDa B subunit	1687,14	1,02	1646,86	0,98
5	histidine triad nucleotide-binding protein 1, B actin	4063,80	1,26	3219,90	0,79
6	fatty acid binding protein epidermal; histidine triad nucleotide binding protein 1	2464,30	2,01	1225,20	0,50
11	ubiquitin conjugating enzym E2N	1844,50	2,38	774,10	0,42
12	Cu-Zn superoxide dismutase	5918,30	1,02	5788,40	0,98
13	Cu-Zn superoxide dismutase; nucleoside diphosphate kinase A	2940,20	1,43	2053,10	0,70
17	stathmin	2760,00	3,87	712,80	0,26
19	nucleoside diphosphate kinase B	3837,40	0,98	3932,20	1,02
20	peroxiredoxin 5	3583,60	0,87	4120,70	1,15
21	peroxiredoxin 5	4326,20	1,07	4048,00	0,94
25	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	2206,40	0,53	4189,20	1,90

Spot nummer	Identificatie	EAE Gemiddelde	EAE/C	Controle Gemiddelde	C/EAE
26	destrin	3294,40	1,09	3032,10	0,92
32	macrophage migration inhibitory factor	5752,50	1,09	5286,63	0,92
40	protein phosphatase 3 regulatory subunit B	2503,40	1,97	1271,10	0,51
41	cofilin 2	1473,30	1,52	968,70	0,66
52	beta synuclein; chaperonin 10	8203,50	1,24	6618,50	0,81
53	alpha synuclein; lysozyme C, type P	6182,30	0,93	6650,30	1,08
54	ATP synthase delta chain	5258,80	1,46	3595,60	0,68
55	parvalbumin alpha	6257,70	1,40	4464,80	0,71
56	cytochrome c oxidase subunit Va; alpha synuclein	3193,80	1,36	2342,80	0,73
64	IgG Fc binding protein	918,00	1,60	572,44	0,62
68	dermcidin	1949,10	1,30	1499,80	0,77
70	glia maturation factor B	1706,90	0,95	1794,20	1,05
71	nucleoside difosfatase kinase B; stathmin	2403,20	1,47	1637,20	0,68
94	alpha B crystallin	1104,40	2,61	423,70	0,38

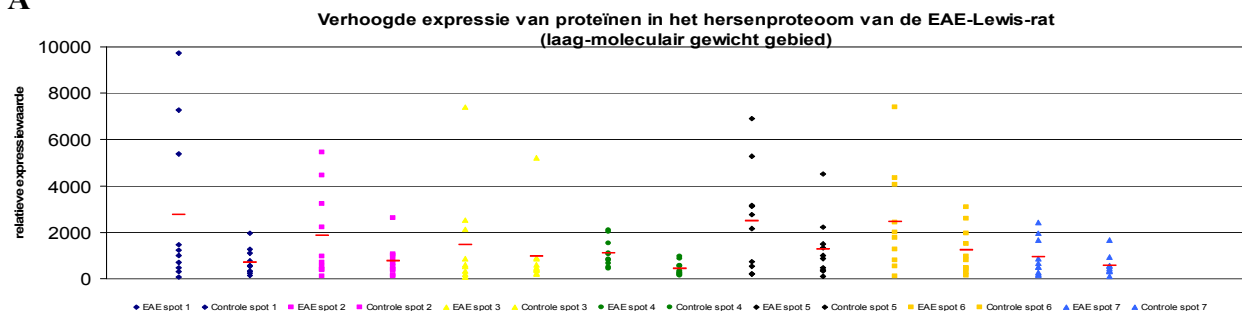
In deze tabel wordt de gemiddelde relatieve expressiewaarde weergegeven van 25 spots in het laag-moleculair gebied van de EAE-gel en de controlegel.

 *De gemiddelde relatieve expressiewaarde in de EAE-gel is 1,5 keer groter dan de gemiddelde relatieve expressiewaarde in de controlegel*

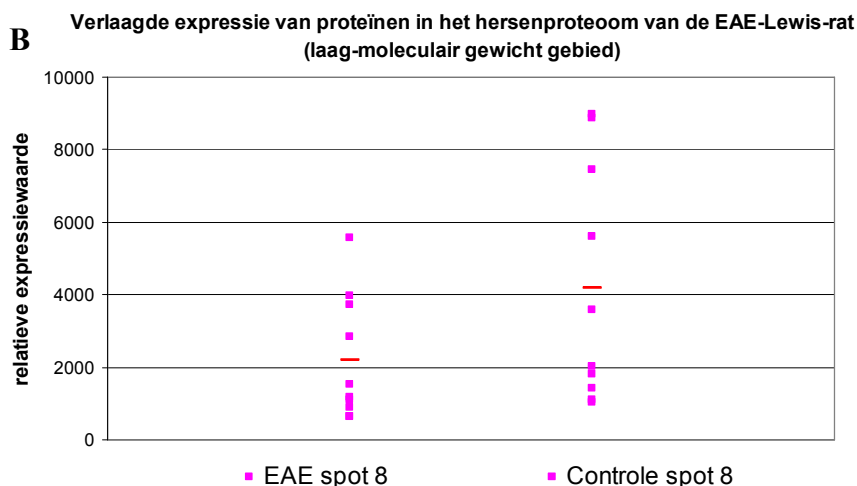
 *De gemiddelde relatieve expressiewaarde in de controlegel is 1,5 keer groter dan de gemiddelde relatieve expressiewaarde in de EAE-gel*

Er is sprake van een verhoogde of verlaagde expressie van een eiwit indien de verhouding van de gemiddelde expressiewaarde groter of kleiner is dan 1 respectievelijk. Van de 25 spots uit het laag-moleculair gebied kwamen 19 eiwitten verhoogd tot expressie in het EAE-model daar de gemiddelde expressiewaarde groter was dan 1. De overige 6 proteïnen werden verlaagd tot expressie gebracht in het EAE-model. Als drempelwaarde werd er in deze studie gekozen voor 1,5 om te bepalen welke proteïnen verder bestudeerd dienden te worden. Wanneer 1,5 als drempelwaarde gehanteerd werd, vertoonden 7 eiwitten een verhoogde expressie in het EAE-model en één eiwit kwam verlaagd tot expressie (figuur 15).

A



B



Figuur 15: Differentiële expressie van proteïnen in het hersenproteoom van de EAE-Lewis-rat in het laag-moleculair gebied van de gel

Grafiek A toont de 7 proteïnen die verhoogd tot expressie worden gebracht in de hersenen van de EAE-Lewis-rat indien de drempelwaarde van 1,5 werd gehanteerd.

Grafiek B toont het proteïne, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1, waarvan de gemiddelde relatieve expressiewaarde 1,5 maal kleiner is in de EAE-gel in vergelijking met de controle-gel.

Spot 1 = stathmine; spot 2 = ubiquitin conjugating enzym E2N; spot 3 = cofiline 2; spot 4 = alfa B crystalline; spot 5 = protein phosphatase 3 regulatory subunit B; spot 6 = fatty acid binding protein epidermal, histidine triad nucleotide binding protein 1; spot 7 = IgG Fc binding protein; spot 8 = peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A.

Voor deze eiwitten werd er een tweede vergelijking uitgevoerd met behulp van matrices. Hierbij werd de relatieve expressiewaarde van een spot uit elke EAE-gel vergeleken met de relatieve expressiewaarde van een spot uit elke controlegel. Zo werden in totaal honderd vergelijkingen gemaakt waarbij werd nagegaan of de relatieve expressiewaarde in de EAE-gel 1 keer groter was dan in de controlegel en omgekeerd. Als *proof of principle* werd alfa B crystalline gebruikt. De relatieve expressiewaarde van dit eiwit uit elke EAE-gel werd gedeeld door de relatieve expressiewaarde van dit eiwit uit elke controlegel. Alfa B

crystalline kwam verhoogd tot expressie in de EAE-gel in 86 van de 100 vergelijkingen. De matrix wordt weergegeven in tabel 5.

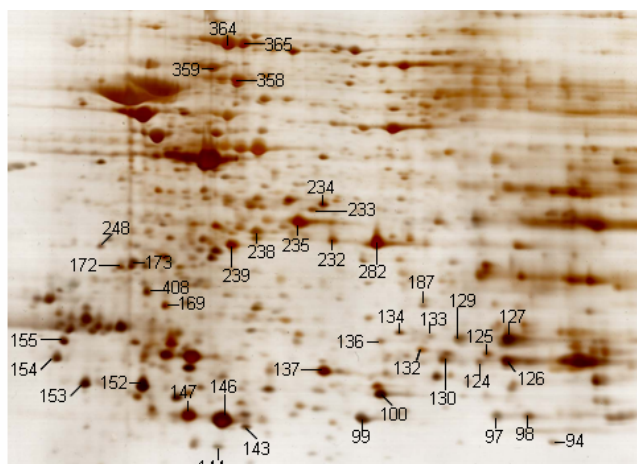
Tabel 5: Vergelijking relatieve expressiewaarde van alfa B crystalline in de EAE- en controle-gel

EAE/C	EAE gel	gel RE	1 679	2 817	3 793	4 1098	5 2106	6 502	7 427	8 1527	9 1076	10 2019
CONTROLE	gel	RE										
	1	330	2,06	2,48	2,40	3,33	6,38	1,52	1,29	4,63	3,26	6,12
	2	252	2,69	3,24	3,15	4,36	8,36	1,99	1,69	6,06	4,27	8,01
	3	957	0,71	0,85	0,83	1,15	2,20	0,52	0,45	1,60	1,12	2,11
	4	210	3,23	3,89	3,78	5,23	10,03	2,39	2,03	7,27	5,12	9,61
	5	164	4,14	4,98	4,84	6,70	12,84	3,06	2,60	9,31	6,56	12,31
	6	139	4,88	5,88	5,71	7,90	15,15	3,61	3,07	10,99	7,74	14,53
	7	544	1,25	1,50	1,46	2,02	3,87	0,92	0,78	2,81	1,98	3,71
	8	849	0,80	0,96	0,93	1,29	2,48	0,59	0,50	1,80	1,27	2,38
	9	554	1,23	1,47	1,43	1,98	3,80	0,91	0,77	2,76	1,94	3,64
	10	238	2,85	3,43	3,33	4,61	8,85	2,11	1,79	6,42	4,52	8,48

De relatieve expressiewaarde (RE) van alfa B crystalline in de EAE-gel werd vergeleken met de relatieve expressiewaarde in de controle-gel (relatieve expressie EAE / relatieve expressie controle). In 86 van de 100 vergelijkingen was de relatieve expressiewaarde in de EAE-gel 1 keer groter.

Voor de overige proteïnen waarvan de gemiddelde relatieve expressiewaarde 1,5 maal groter was in de EAE-gel in vergelijking met de controle-gel werden gelijkaardige matrices opgesteld. Voor stathmine was de relatieve expressie-waarde in de EAE-gel 1 keer groter dan in de controle-gel voor 67 van de 100 vergelijkingen. Voor het *ubiquitin conjugating enzym E2N* was de gemiddelde expressiewaarde éénmaal groter in het EAE-model in 64 van de 100 vergelijkingen. Het *epidermal fatty acid binding protein* werd samen met *histidine triad nucleotide binding protein 1* geïdentificeerd uit dezelfde spot. Deze spot vertoonde een relatieve expressiewaarde groter dan 1 in de EAE-gel in 67% van de vergelijkingen. In 51 op 100 vergelijkingen vertoonde cofiline 2 een verhoogde expressie in het EAE-model. *Protein phosphatase 3 regulatory subunit B* vertoonde een éénmaal hogere expressie in de EAE-gel in 65 van de 100 vergelijkingen. En *immunoglobulin G (IgG) Fc binding protein* tot slot had een relatieve expressiewaarde die één keer groter was in de EAE-gel in 59% van de gevallen. Het *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A* vertoonde een éénmaal hogere expressie in de controle-gel voor 70 van de 100 vergelijkingen.

Voor 40 spots uit de hoog-moleculair regio van de gel werden 7 EAE-gelen met 9 controlegelen vergeleken. De overige 5 EAE-gelen en 3 controlegelen die bekomen werden door de vier 2-D GE-experimenten konden niet gebruikt worden voor een vergelijkende studie van de hoog-moleculaire regio omwille van een mindere kwaliteit van dit gebied in deze gelen. Met behulp van het Z3 computerprogramma werd de relatieve expressiewaarde bepaald uit de EAE-gel en de controlegel (figuur 16). De gemiddelden van deze waarden worden vergeleken in tabel 6.



Figuur 16: Analyse van differentiële expressie van spots in het hoog-moleculair gebied van de gel

Er werden 4 2-D GE-experimenten uitgevoerd waarbij telkens drie EAE-stalen en drie controlestalen werden gebruikt. Van de 24 gecreëerde gelen werden er 16 gebruikt voor de software-matige analyse van de hoog-moleculaire regio. Het software-programma Z3 vergelijkt een EAE-gel met een controlegel door aan elke spot een relatieve expressiewaarde toe te kennen. De relatieve expressiewaarde van de genummerde spots werd verder bestudeerd (een EAE-gel werd gebruikt als voorbeeldgel).

Tabel 6 : Gemiddelde relatieve expressiewaarde van 40 spots in het hoog-moleculair gebied van de gel

Spot nummer	Identificatie	EAE Gemiddelde	EAE/C	Controle Gemiddelde	C/EAE
97	neuronal protein NP 25; transferrin	2531,33	1,17	2167,22	0,86
98	transferrin; adenylate kinase isoenzyme 1	2196,11	1,26	1740,00	0,79
99	serotransferrin precursor	4853,71	0,65	7476,44	1,54
100	DJ-1 protein	4709,43	0,68	6883,78	1,46
124	triose phosphate isomerase 1	895,86	0,91	979,44	1,09
125	similar to biliverdin reductase B	985,57	1,78	553,11	0,56
126	triose phosphate isomerase	3882,89	0,76	5103,67	1,31
127	phosphoglycerate mutase 1	4406,56	1,11	3970,78	0,90
129	phosphoglycerate mutase 1	1702,00	1,01	1691,33	0,99
130	triose phosphate isomerase 1, serum albumin	1615,75	0,80	2016,44	1,25
132	proteasome subunit alpha type 6	700,25	0,78	894,67	1,28

Spot nummer	Identificatie	EAE Gemiddelde	EAE/C	Controle Gemiddelde	C/EAE
133	phosphoglycerate mutase 1	674,13	0,70	960,78	1,43
134	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase	1010,63	0,99	1022,33	1,01
136	endoplasmic reticulum protein ERp29	955,13	0,78	1222,67	1,28
137	peroxiredoxin 6	5361,43	1,01	5320,67	0,99
143	similar to dynactin 3 isoform 1	1187,43	0,84	1415,33	1,19
144	sorcin	569,86	0,72	786,67	1,38
146	phosphatidylethanolamine binding protein	6995,71	0,78	8935,44	1,28
147	peroxiredoxin 2; phosphatidylethanolamine binding protein	5115,57	0,76	6715,89	1,31
152	glyoxylase 1; NADH dehydrogenase	2464,29	1,26	1952,44	0,79
153	translationally controlled tumor protein	1788,57	1,15	1549,78	0,87
154	calbindin	1622,71	1,28	1270,22	0,78
155	proteasome subunit alpha type 5	1480,29	1,85	801,89	0,54
169	inositol 1 monofosfatase	664,14	1,21	548,44	0,83
172	annexin 5	576,86	1,09	528,67	0,92
173	annexin 5	844,00	1,20	705,44	0,84
187	glutathione transferase omega 1	865,13	0,56	1548,00	1,79
232	similar to Riken cDNA 27000085E05	1128,17	0,51	2216,00	1,96
233	dimethylarginine demethyl aminohydrolase 1	580,60	0,79	735,63	1,27
234	NAD ⁺ specific isocitrate dehydrogenase alfa subunit	1007,60	0,76	1326,13	1,32
235	lactate dehydrogenase B	3227,80	0,86	3733,38	1,16
238	guanine nucleotide binding protein	1230,20	0,49	2511,50	2,04
239	pyruvaat dehydrogenase beta	2479,40	0,93	2679,13	1,08
248	Otub 1 protein	498,29	1,44	346,44	0,70
282	malate dehydrogenase	6288,20	0,95	6617,63	1,05
358	T-complex protein 1, theta subunit; hsp 60 kDa; dihydropyrimidinase related protein 2	4034,71	1,14	3525,00	0,87
359	alpha internexin, dihydropyrimidinase related protein 2, HSP-60, heterogenous nuclear ribonucleoprotein K, Ca/calmodulin depedent protein kinase	2775,86	1,27	2193,75	0,79
364	Hsc70 protein	4994,71	1,53	3257,63	0,65
365	ATP synthase catalytic subunit A, annexin, latctate dehydrogenase B, dihydropyrimidinase related protein 2	2530,43	1,26	2000,50	0,79
408	Toll interacting protein	863,14	1,67	518,22	0,60

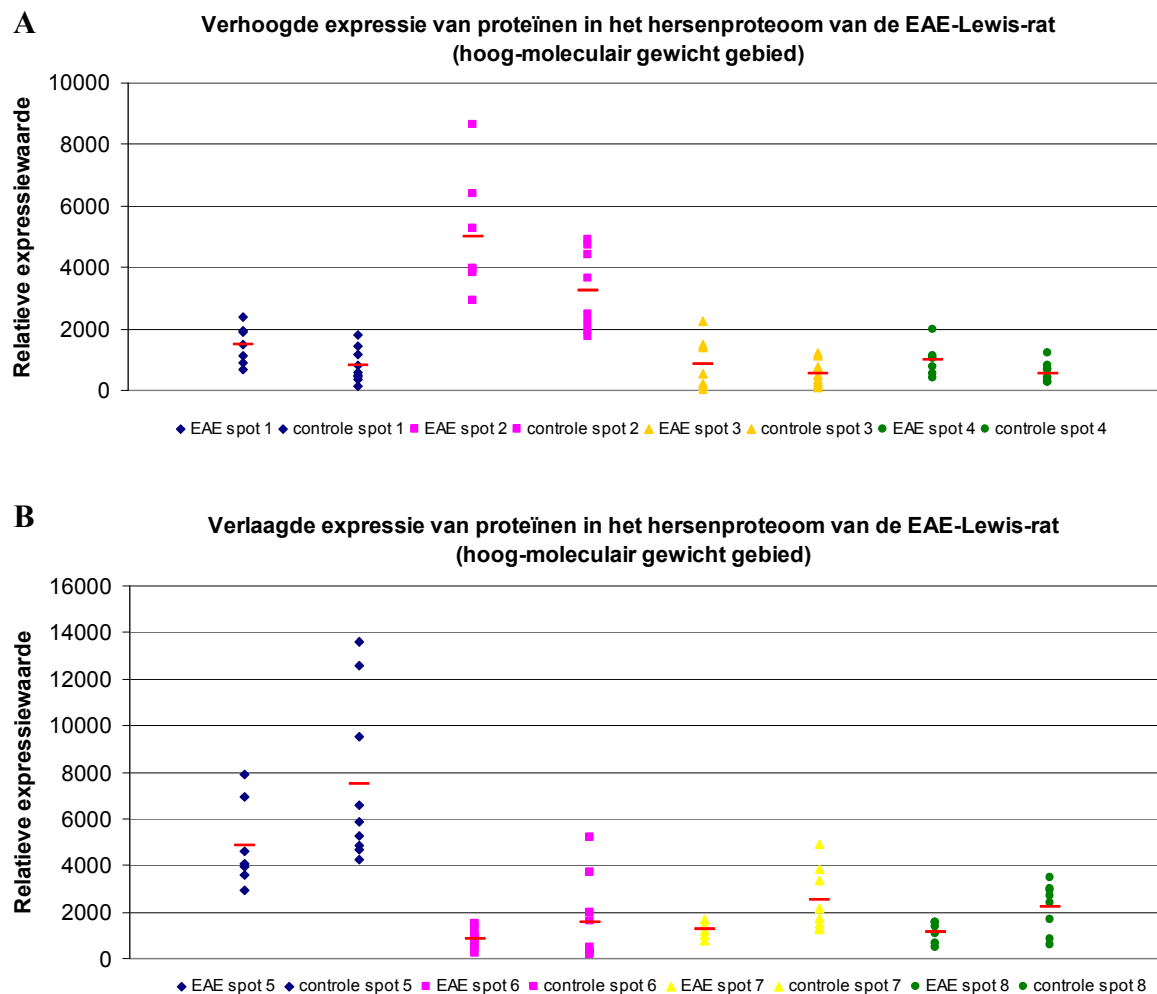
In deze tabel wordt de gemiddelde relatieve expressiewaarde weergegeven van 40 spots in het hoog-moleculair gebied van de EAE-gel en de controle-gel.

 *De gemiddelde relatieve expressiewaarde in de EAE-gel is 1,5 keer groter dan de gemiddelde relatieve expressiewaarde in de controle-gel*

 *De gemiddelde relatieve expressiewaarde in de controle-gel is 1,5 keer groter dan de gemiddelde relatieve expressiewaarde in de EAE-gel*

Voor de analyse van de spots uit het hoog-moleculair gebied werden dezelfde normen gebruikt als voor de analyse van de spots uit het laag-moleculair gebied van de gel. Een eiwit vertoont een verhoogde of verlaagde expressie indien de gemiddelde relatieve expressiewaarde groter of kleiner is dan 1 respectievelijk. Negentien spots kwamen verhoogd tot expressie in het EAE-model daar de gemiddelde relatieve expressiewaarde groter was dan 1. De overige 21 spots werden verlaagd tot expressie gebracht in het EAE-model. Voor deze studie werd 1,5 als drempelwaarde genomen voor de keuze van de eiwitten die verder bestudeerd worden. In de hoog-moleculaire regio betreft dit *proteasome subunit alpha type 5*, *heat shock cognate proteïn 70* (Hsc70), *toll interacting protein* en *protein similar to biliverdin reductase B*. Deze eiwitten vertoonden een 1,5 maal verhoogde expressie in het EAE-model (figuur 17A). De proteïnen serotransferrine precursor, glutathion transferase omega 1 en guanine nucleotide bindingproteïne kwamen verlaagd tot expressie in het EAE-model volgens de drempelwaarde 1,5 (figuur 17B). Voor deze eiwitten werden matrices opgesteld gelijkaardig aan de matrix voor alfa B crystalline (tabel 5).

Met behulp van de matrices werd de relatieve expressiewaarde van een spot uit elke EAE-gel vergeleken met de relatieve expressiewaarde van dezelfde spot uit elke controle-gel. Vervolgens werd nagegaan of de relatieve expressiewaarde in de EAE-gel één keer groter was dan in de controle-gel of omgekeerd. Volgens de matrices is de relatieve expressiewaarde van *proteasome subunit alpha type 5* in 82,5% van de vergelijkingen éénmaal groter in het EAE-model. Hsc70 vertoont een éénmaal hogere expressie in het EAE-model in 77% van de gevallen. Voor *toll interacting protein* ligt de relatieve expressiewaarde in 60% van de vergelijkingen hoger dan één in het EAE-model. In 78 op 100 gevallen vertoont het proteïne *similar to biliverdin reductase B* een éénmaal verhoogde expressie in het EAE-gel. De serotransferrine precursor vertoont in 79% van de vergelijkingen een relatieve expressiewaarde kleiner dan 1 in het EAE-model. Voor glutathione transferase omega 1 ligt de relatieve expressiewaarde in de EAE-gel lager dan één in 50% van de gevallen. En in 87,5% van de gevallen vertoont guanine nucleotide bindingproteïne een éénmaal lagere expressie in het EAE-model.



Figuur 17: Differentiële expressie van proteïnen in het hersenproteoom van de EAE-Lewis-rat in het hoog-moleculair gebied van de gel

Grafiek A toont 4 proteïnen die verhoogd tot expressie worden gebracht in de hersenen van de EAE-Lewis-rat indien de drempelwaarde van 1,5 wordt gehanteerd.

Grafiek B toont 4 proteïnen die verlaagd tot expressie worden gebracht in de hersenen van de EAE-Lewis-rat indien de drempelwaarde van 1,5 wordt gehanteerd.

Spot 1 = proteasome subunit alpha type 5; spot 2 = heat shock cognate protein 70; spot 3 = toll interacting protein; spot 4 = protein similar to biliverdin reductase B; spot 5 = serotransferrine precursor; spot 6 = glutathione transferase omega 1; spot 7 = guanine nucleotide binding protein; spot 8 = similar to Riken cDNA 27000085E05

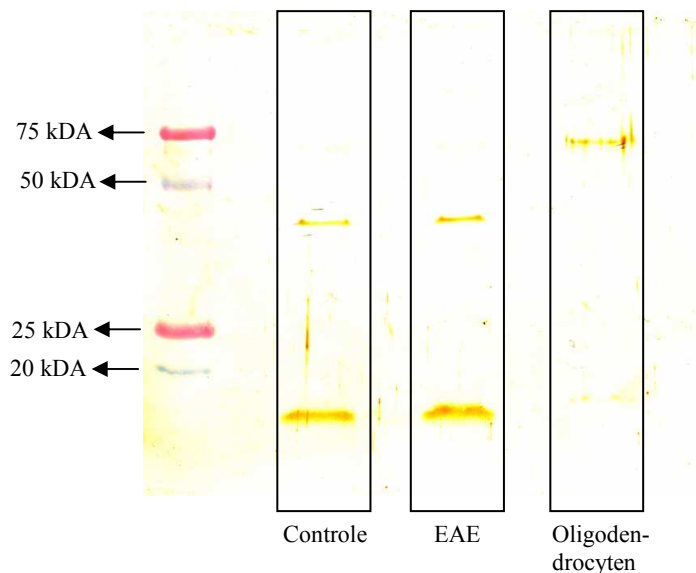
3.4 Studie van het eiwit stathmine in het EAE-model

Het eiwit stathmine werd gekozen uit de verschillende proteïnen die verhoogd of verlaagd tot expressie werden gebracht in het EAE-diermodel. Stathmine vertoonde een verhoogde expressie in de hersenen van de EAE-Lewis-rat in vergelijking met de controle-Lewis-rat. Dit

eiwit werd verder bestudeerd door middel van Western blot-experimenten en immunohistochemische kleuringen van hersencoupees van een EAE- en controle-Lewis-rat.

3.4.1 Western blot

Voor het Western blot-experiment werden verschillende stalen gebruikt, één EAE-staal, één controle-staal, één oligodendrocytstaal van een primaire cultuur van oligodendrocyten van de Wistar-rat, twee stalen PBMC's van MS-patiënten en twee stalen PBMC's van gezonde controles. Er werd telkens 10 µg eiwit aan Western blot onderworpen. De eiwitten werden gescheiden door middel van 1D SDS-PAGE. Na de *transfer* van de eiwitten naar het PVDF-membraan werd dit geïncubeerd met een antilichaam gericht tegen stathmine. Na kleuring met een DAB-oplossing werden er stathminereactiviteit waargenomen ter hoogte van moleculaire gewicht 17 kDa in het EAE-staal en het controlestaal waarbij de reactiviteit in het EAE-staal groter is. Er werd ook een heel lichte stathminereactiviteit waargenomen bij het staal van de oligodendrocyten. Verder werden er ook reactiviteit waargenomen rond het moleculaire gewicht 40 kDa in het EAE-staal en het controlestaal en reactiviteit ter hoogte van 75 kDa in het oligodendrocytstaal. Deze reactiviteit werd ook waargenomen in het EAE- en controlestaal, maar minder duidelijk (figuur 18).



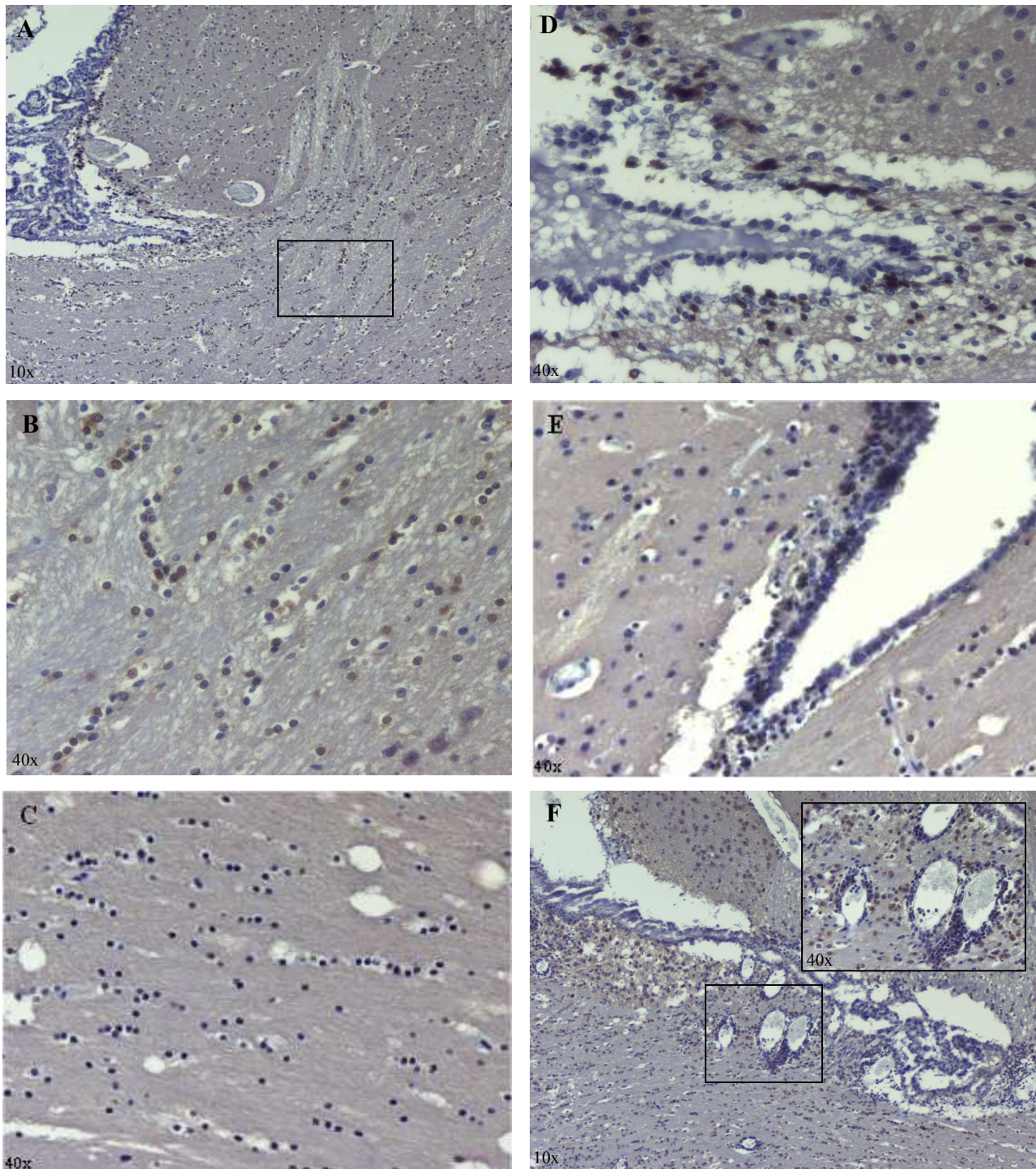
Figuur 18: Western blot-experiment met het EAE-, controle- en oligodendrocytstaal

Er werd van elk staal 10 µg eiwit geladen. Er is duidelijk stathminereactiviteit ter hoogte van +/- 17 kDa voor het EAE- en controlestaal. Er werd lichte stathminereactiviteit waargenomen ter hoogte van 17 kDa voor het oligodendrocytstaal. Verder vertonen het EAE- en controlestaal ook reactiviteit ter hoogte van +/- 40 kDa terwijl het oligodendrocytstaal nog reactiviteit vertoont ter hoogte van +/- 70 kDa. Op deze hoogte is er ook heel lichte reactiviteit te zien bij het EAE- en controlestaal.

De Western blot uitgevoerd met de PBMC-stalen leverde lichte stathminereactiviteit op ter hoogte van +/- 17 kDa voor de beide MS- en controlestalen (resultaat niet weergegeven).

3.4.2 Immunohistochemische kleuringen

De immunohistochemische kleuringen werden uitgevoerd op hersencoupes van een EAE-Lewis-rat en een gezonde Lewis-rat. De hersencoupes waren afkomstig van het hersengebied net boven de hersenstam. De kleuringen gebeurden met een primair antilichaam gericht tegen stathmine. Er werd ook een negatieve controle-kleuring uitgevoerd waarbij enkel incubatie met het secundaire antilichaam gebeurde. Verder werden er vier verdunningen van het primaire antilichaam uitgetest, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000. Hiervan leverde de 1:2000 verdunning de beste resultaten op. In de witte stof van de EAE-rat werd stathminereactiviteit waargenomen ter hoogte van de oligodendrocyten (fig 19A en B). Daarentegen werd er slechts occasioneel een stathmine-positieve oligodendrocyt waargenomen in de witte stof van de controlerat (fig 19C). De subependymale regio in de hersencoupes van beide dieren vertoont stathmine-expressie (fig 19D en E). In de coupe van de EAE-rat wordt supplementaire kleuring in het infiltraat van de cuff waargenomen (fig 19F).



Figuur 19: Immunohistochemische kleuringen van EAE- en controle-hersencoupees

Er werden immunohistochemische kleuringen uitgevoerd met een antilichaam tegen stathmine (verdunding 1:2000). De witte stof is duidelijk stathmine-reactief ten opzichte van de grijze stof (A). De selectie uit figuur A werd 40x uitvergroot in figuur B. De oligodendrocyten uit het EAE-hersenweefsel vertonen een duidelijke stathmine-reactiviteit (B) in tegenstelling tot de oligodendrocyten uit het controle-hersenweefsel (C). De subependymale cellen vertonen in zowel de EAE- als de controle-hersencoupee duidelijke stathminereactiviteit (D,E). Het infiltraat aanwezig in de hersenen van de EAE-Lewis-ratten vertoont ook stathmine-expressie (F).

4. Discussie

Het doel van deze studie is het opsporen van nieuwe ziektemerkers voor MS via een proteoomstrategie. Er wordt getracht een beter inzicht te verkrijgen in de pathogenese van MS door gebruik te maken van een goed gekarakteriseerd diermodel voor MS, namelijk EAE. In dit onderzoek werd de acute vorm van EAE geïnduceerd waardoor er enkel inflammatie optrad in de hersenen van de Lewis-rat. Het eerste deel van de studie betrof het opstellen van een proteoomkaart van de hersenen van de Lewis-rat. In een tweede luik werd er een vergelijkende analyse uitgevoerd van de proteïnen in het hersenweefsel van de EAE- en controle-Lewis-ratten. In een laatste fase werd het eiwit stathmine geselecteerd voor verdere evaluatie en validatie door middel van de Western blot-techniek en immunohistochemische kleuringen op hersencoupees van controle- en EAE-Lewis-ratten.

4.1 Proefdieren

In deze studie werd gebruik gemaakt van 6 Lewis-ratten waarvan er drie geïmmuniseerd werden met MBP ter inductie van EAE terwijl de overige drie als controle-Lewis-ratten functioneerden. De drie controle-Lewis-ratten werden geïnjecteerd met cFA. Hierdoor kon bevestigd worden dat de klinische symptomen bij de EAE-Lewis-ratten enkel te wijten waren aan de immunisatie met MBP en de inductie van acute EAE. Klinische symptomen ten gevolge van cFA konden uitgeschakeld worden aangezien de controle-Lewis-ratten geen ziekteverschijnselen vertoonden. Het gewicht en de klinische score werden dagelijks opgetekend (figuur 5). Er werd een duidelijke gewichtsafname waargenomen bij de EAE-Lewis-ratten in tegenstelling tot de controle-Lewis-ratten waar het gewicht bleef toenemen. Dit is één van de klinische symptomen die verwijzen naar het ziektebeeld. Verder werd ook verlies van de staart-tonus en spierzwakte aan de achterpoten waargenomen. Deze symptomen tonen aan dat de ratten de top van de acute vorm van EAE bereikt hebben aangezien ze na deze symptomen spontaan herstellen van de ziekte. In de studie werden de ratten op dit ziektestadium geofferd.

4.2 Hersenproteoom van de Lewis-rat

Het eerste doel van de studie was het opstellen van een proteoomkaart van de hersenen van de Lewis-rat. Hiervoor werden er twee technieken gecombineerd, namelijk 2-D GE en 2-D LC, beiden gekoppeld aan massaspectrometrie.

Met behulp van 2-D GE werden de eiwitten, geïsoleerd uit de hersenen, gescheiden op basis van hun lading (IEF) en moleculaire massa (SDS-PAGE). De experimenten werden in viervoud uitgevoerd waarbij er telkens 150 µg eiwit van de drie EAE-stalen en de drie controlestalen aan 2-D GE werd onderworpen. Zo werd het hersenproteoom van de Lewis-rat in kaart gebracht (fig 6). Er werden 408 verschillende spots geprikt waarvan reeds 205 spots getrypsiniseerd werden voor massaspectrometrische analyse en identificatie van de eiwitten (figuur A, bijlage). Uit deze 205 spots werden er 192 verschillende eiwitten geïdentificeerd (tabel A bijlage). Enkel de proteïnen met een significante Mascot-score ($p < 0,05$) en significante Sequest-identificaties ($XCorr > 1,8$ voor éénwaardig geladen peptiden, $XCorr > 2,5$ voor tweewaardig geladen peptiden, $XCorr > 3,5$ voor driewaardig geladen peptiden en $\Delta C_n > 0,1$) werden opgenomen in deze tabel. Een aantal spots leverden dezelfde proteïnenidentificaties op en een aantal konden niet geïdentificeerd worden. Een te lage concentratie aan eiwit voor detectie door de massaspectrometer is een mogelijke verklaring hiervoor.

De tweede techniek die gebruikt werd voor het opstellen van de proteoomkaart was 2-D LC. Deze techniek zorgt voor een scheiding van de peptiden op basis van lading en polariteit. Zowel het proteïnendigest van een EAE-rat als een controlerat werd onderworpen aan SCX-vloeistofchromatografie. Twintig µg eiwit werd geladen van elk staal en tijdens de eerste dimensie werden elke minuut manueel fracties opgevangen gedurende 55 min. Van deze 55 fracties werden 45 fracties geanalyseerd door middel van massaspectrometrie. De resultaten van het experiment met het controlestaal konden nog niet verwerkt worden. Het aantal *data-files*, overeenkomend met het aantal MS/MS-spectra, werd uitgezet per fractie voor het EAE-staal (figuur 9). Er is een goede spreiding met in de laatste fracties relatief minder MS/MS-spectra in vergelijking met de fracties in het begin en het midden. De meeste peptiden zijn geëluëerd in de middenfracties. Tijdens het laden van de prekolom werd de doorstroom opgevangen ter controle. De massaspectrometrische analyse heeft vele MS/MS-spectra gevonden, maar er werden geen proteïnen geïdentificeerd. Dit toont aan dat er geen verlies was aan peptiden tijdens het laden van het staal. Door middel van de zoekmachine Sequest konden 159 verschillende proteïnen die voldoen aan de parameters voor $XCorr$ en ΔC_n

geïdentificeerd worden. Zevenennegentig (61%) van de eiwitidentificaties gebeurde op basis van 1 peptide. Slechts één proteïne kon geïdentificeerd worden op basis van meer dan 10 peptiden (figuur 10). Omdat de identificatie van proteïnen op basis van 1 peptide een lagere betrouwbaarheid vertoont, werden deze 97 geïdentificeerde eiwitten aangeboden aan de zoekmachine Mascot. Mascot leverde in 47 van de gevallen eenzelfde identificatie op als Sequest waarvan er 11 een significante Mascotscore vertoonden. Vijf proteïnen konden niet geïdentificeerd worden na het aanbieden van de *dta-files* aan Mascot. De overige 45 proteïnen leverden een andere identificatie op in Mascot vergeleken met de Sequest-identificatie (figuur 11). Bijgevolg is de identificatie van deze proteïnen onbetrouwbaar. De analyse van het EAE-staal door middel van het 2-D LC-experiment leverde uiteindelijk de identificatie op van 109 verschillende proteïnen die voldoen aan de parameters van Sequest en Mascot (tabel B, bijlage).

Er werden met behulp van 2-D GE reeds 192 verschillende proteïnen geïdentificeerd. Door middel van 2-D LC werden 109 verschillende proteïnen geïdentificeerd. Van deze identificaties werden 30 proteïnen door beide technieken teruggevonden (figuur 12). Er zijn dus proteïnen die wel geïdentificeerd worden uit het 2-D GE-experiment maar niet worden teruggevonden bij de 2-D LC-techniek en visa versa. De twee technieken kunnen bijgevolg als complementair beschouwd worden. Er zijn bepaalde klassen eiwitten die niet gedetecteerd kunnen worden via 2-D GE. Hiertoe behoren onder andere de erg zure of erg basische proteïnen, de hydrofobe proteïnen waaronder de membraaneiwitten en de proteïnen in erg lage concentratie. Met de 2-D LC-techniek is het mogelijk om deze tekortkomingen te beperken. Deze gel-vrije methode heeft als voordeel dat de trypsinisatie niet verstoord wordt door de aanwezigheid van een gelmatrix en er is ook geen extractie nodig van de peptiden uit de gelmatrix, de eiwitten worden rechtstreeks getrypsiniseerd. Zo is er minder verlies van peptiden en is er meer kans op detectie van eiwitten die in lagere concentratie aanwezig zijn. Verder speelt de complexiteit van de fracties bekomen via 2-D LC ook een rol. De peptiden afkomstig uit eenzelfde eiwit kunnen verspreid voorkomen over verschillende fracties waardoor er meerdere analyses nodig zijn voor de identificatie van één eiwit. De computersoftware *dta-select* is dan een onmisbaar hulpmiddel voor het samenstellen van de informatie in de vorm van *dta-files* die aangeboden worden aan zoekmachines zoals Mascot en Sequest. Verder is het mogelijk dat bepaalde proteïnen die in hoge concentratie aanwezig zijn in de 2-D GE-experimenten toch niet gedetecteerd worden in een 2-D LC-experiment. Een mogelijke verklaring is dat een spot van een gel één, twee of maximaal drie proteïnen

bevat. Uit de gegenereerde *full scan* worden de drie hoogste pieken geïsoleerd voor tandem-massaspectrometrie. Hierdoor kunnen deze proteïnen gemakkelijk geïdentificeerd worden aan de hand van de opgestelde MS/MS-spectra. Maar bij de analyse van een fractie opgevangen na de vloeistofchromatografie, kunnen in zo'n fractie vele peptiden zitten afkomstig van vele eiwitten. Ook hier worden uit elke *full scan* de drie meest intense pieken geselecteerd voor tandem-massaspectrometrie. Maar omdat er meerdere peptiden van meerdere eiwitten aanwezig zijn in één fractie, kunnen ze niet allemaal gedetecteerd worden.

Er werd ook een vergelijking gemaakt tussen de functies van de eiwitten geïdentificeerd met 2-D GE en 2-D LC (figuur 13) en daarbij werd duidelijk dat er andere categorieën eiwitten primeren bij beide technieken. Zo werden met de 2-D GE-techniek vooral proteïnen geïdentificeerd die betrokken zijn bij metabolisme en signaaltransductie. De 2-D LC-techniek identificeerde vooral eiwitten betrokken bij vesiculair transport en proteïnen die functioneren als transporters doorheen het lichaam. Met de 2-D GE-techniek kunnen moeilijk membraanproteïnen gedetecteerd worden. Vandaar dat deze categorie eiwitten minder vertegenwoordigd wordt bij de eiwitten uit het 2-D GE-experiment in vergelijking met de eiwitten uit het 2-D LC-experiment.

Beide technieken, 2-D LC en 2-D GE, kunnen best complementair gebruikt worden voor de identificatie van een zo breed mogelijk gamma aan eiwitten en het opstellen van een proteoomkaart.

4.3 Differentiële expressie

Het tweede doel van het onderzoek betrof een vergelijkende analyse van de proteïnen in het hersenweefsel van een gezonde Lewis-rat en een EAE-Lewis-rat. Hiervoor werden vier 2-D GE-experimenten uitgevoerd met telkens drie EAE-stalen en drie controlestalen. Twintig van de bekomen gelen werden door middel van de computersoftware Z3 vergeleken. Dit computerprogramma kent aan elke spot een relatieve expressiewaarde toe en houdt hierbij rekening met de achtergrond van de gel en de intensiteit van de overige spots. Wanneer de verhouding van de relatieve expressiewaarde van een spot uit de EAE-gel ten opzichte van de controlegel groter of kleiner is dan 1 komt deze spot respectievelijk verhoogd of verlaagd tot expressie in de EAE-gel.

Uit de vergelijkende analyse van 25 spots uit het laag-moleculair gewicht gebied van de gel bleek dat er 19 en 6 eiwitten respectievelijk verhoogd en verlaagd tot expressie gebracht

werden in het EAE-model (figuur 14, tabel 4). De eiwitten waarvan de verhouding van de gemiddelde expressiewaarde in de EAE-gel in vergelijking met de controlegel groter of kleiner was dan 1,5 werden verder bestudeerd. Er werd gekozen voor deze drempelwaarde om enkel de relevante eiwitten te selecteren. Het betrof zeven eiwitten die een verhoogde expressie vertoonden in het EAE-model en één eiwit met een verlaagde expressie in EAE (figuur 15). Deze 8 proteïnen werden verder vergeleken door het opstellen van een matrix (tabel 5). Hierbij werd de relatieve expressiewaarde van een spot uit elke EAE-gel vergeleken met de relatieve expressiewaarde van dezelfde spot uit elke controlegel. Vervolgens werd er nagegaan of de relatieve expressiewaarde in de EAE-gel 1 keer groter was dan in de controlegel en omgekeerd. Enkel de eiwitten waarvan de relatieve expressiewaarde in 60 van de 100 gevallen verhoogd of verlaagd was, werden als relevant beschouwd. Een aantal van deze eiwitten worden besproken in de volgende alinea's. Hetzelfde principe werd toegepast voor 40 spots uit het hoog-moleculair gebied van de gel. Hier kwamen 19 van de 40 spots verhoogd tot expressie in het EAE-model. De overige 21 spots werden verlaagd tot expressie gebracht (figuur 16, tabel 6). De eiwitten waarvan de verhouding van de gemiddelde expressiewaarde in de EAE-gel in vergelijking met de controlegel groter of kleiner was dan 1,5 werden verder bestudeerd. Voor de 40 spots uit deze regio kwamen er 4 verhoogd en 4 verlaagd tot expressie indien deze drempelwaarde gehanteerd werd (figuur 17). Deze 8 eiwitten werden verder vergeleken door het opstellen van een matrix waarbij de relatieve expressiewaarde van een spot uit elke EAE-gel vergeleken werd met de relatieve expressiewaarde van dezelfde spot uit elke controlegel. Wanneer deze verhouding groter of kleiner was dan 1 kwam het eiwit respectievelijk verhoogd of verlaagd tot expressie. Enkel de eiwitten waarvan de relatieve expressiewaarde in 60% van de gevallen verhoogd of verlaagd was, werden als relevant beschouwd. In de volgende alinea's worden enkelen van deze eiwitten kort besproken.

Een analyse van de differentiële expressie van de resultaten bekomen via de 2-D LC-techniek is niet mogelijk aangezien geen kwantitatieve 2-D LC-experimenten werden uitgevoerd zoals bijvoorbeeld ICAT. Bovendien zijn de resultaten van het 2-D LC-experiment met het controlestaal nog niet verwerkt. Hierdoor was het niet mogelijk een vergelijking te maken omtrent welke eiwitten aanwezig zijn in het EAE- en controlestaal.

Alfa B crystalline

Alfa B crystalline is een klein heat shock proteïne (hsp) of stressproteïne. Het komt enkel voor in het oog, hart-en skeletspierweefsel en in de astrocyten en oligodendrocyten in het CNS. Het komt niet voor in humaan lymfoïd weefsel en organen [30].

Alfa B crystalline speelt een rol binnen de pathogenese van MS. Verhoogde concentratie van alfa B crystalline is aanwezig in de cytosol van oligodendrocyten en astrocyten in MS-laesies en deze verhoogde expressie start reeds in de vroege fase van de laesie-vorming. Na de fagocytose van myeline in MS-laesies wordt alfa B crystalline beschikbaar voor T-cellen. Dit wijst erop dat alfa B crystalline mogelijk een belangrijke rol speelt als auto-antigen in de pathogenese van MS [30,31].

De vergelijking door middel van matrices toonde aan dat in 86 van de 100 vergelijkingen het eiwit verhoogd tot expressie komt in de hersenen van de EAE-Lewis-rat (tabel 5).

Fatty acid binding protein epidermal

Er bestaan 8 types *fatty acid binding proteins* (FABP) waarvan er drie tot expressie komen in de hersenen, namelijk *fatty acid binding protein heart, brain* en *epidermal* (E-FABP). E-FABP is een 15 kDa cytosolisch proteïne dat voorkomt in de gliale cellen en neuronen van het CNS. FABP's zijn betrokken bij de intracellulaire opname, binding en transport van vetzuren (VZ) [32,33,34]. Op die manier kunnen ze de concentratie aan VZ moduleren en zo onrechtstreeks een invloed uitoefenen op functies van enzymen, membranen, ionkanalen, genexpressie, cellulaire groei en differentiatie [32]. Er werd ook aangetoond dat E-FABP een belangrijke rol speelt in het CNS bij axongroei in ontwikkelende en regenererende neuronen. E-FABP werd geïnduceerd in neuronen tijdens regeneratie van de zenuwen en er werd ook een hoge concentratie aan E-FABP teruggevonden in neuronen tijdens de neurale migratie en ontwikkeling [35].

E-FABP werd geïdentificeerd uit één spot waarin ook histidine triad nucleotide bindingproteïne 1, een eiwit betrokken bij de signaaltransductie, aanwezig was. De studie toonde aan dat deze spot verhoogd tot expressie kwam in de hersenen van de EAE-rat. Aangezien er twee eiwitten uit eenzelfde spot geïdentificeerd werden, kan niet met zekerheid bepaald worden welke van de twee eiwitten een verhoogde expressie vertoont.

Calcineurine B = proteïne fosfatase 3 regulatoire subeenheid B

Proteïne fosfatase 3 regulatoire subeenheid B wordt ook calcineurine B genoemd. Calcineurine B maakt deel uit van het heterodimeer calcineurine en vormt hierin de

regulatorische subeenheid dat Ca^{2+} bindt. Daarnaast bestaat calcineurine ook nog uit een katalytische subeenheid, calcineurine A, dat calmoduline kan binden. Calcineurine is dan ook een Ca^{2+} /calmoduline-afhankelijk serine/threonine fosfatase [36,37,38,39]. De activiteit van calcineurine is noodzakelijk voor de T-cel activatie. Na ligatie van de T-cel receptor volgt er een Ca^{2+} influx waardoor calcineurine geactiveerd wordt aangezien Ca^{2+} gebonden wordt aan calcineurine B. Dit defosforyleert vervolgens de transcriptiefactor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) dat op die manier geactiveerd wordt. Deze activatie zorgt voor de transcriptie en productie van cytokines zoals interleukine 2, interleukine 4, tumor necrosis factor alfa, enzovoort [36,40]. De functie van calcineurine kan geïnhibeed worden door het immuunonderdrukkende geneesmiddel cyclosporine A (CsA). CsA vormt een complex met cyclofiline A en bindt vervolgens aan calcineurine. Dit heterotrimeer complex inhibeert de serine/threonine fosfatase-activiteit van calcineurine en inhibeert bijgevolg ook de T-cel activatie en voorkomt de transcriptie en productie van cytokines [37,38,41]. Uit de vergelijkende analyse met behulp van Z3 bleek dat calcineurine B verhoogd tot expressie werd gebracht in het EAE-diermodel.

Cyclofiline A = peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A

Cyclofiline A is een klein oplosbaar proteïne dat in vele weefsels voorkomt, maar de hoogste concentratie is aanwezig in de hersenen. Het komt vooral in de neuronen voor in zowel het cytosol, de nucleus als de axonen. Als peptidyl-prolyl isomerase speelt het mogelijk een rol bij de maturatie en het vouwen van neuronspecifieke membraanproteïnen. Het katalyseert de cis-trans isomerisatie van peptidebindingen tussen het carboxyluiteinde van een willekeurig aminozuur en het aminouiteinde van een proline in een polypeptideketen [42,43]. Cyclofiline A behoort tot de familie van de immunofilines. Dit zijn proteïnen die binden aan immuunonderdrukkende geneesmiddelen. Zo is cyclofiline A de belangrijkste intracellulaire receptor voor CsA. Het CsA-cyclofiline complex interageert met calcineurine en inhibeert zo de functie van deze laatste [44,45]. In deze studie werd er een verlaagde expressie waargenomen van cyclofiline A in de hersenen van de EAE-Lewis-rat.

Ubiquitin conjugating enzyme E2N en proteasome subunit alfa type 5

Ubiquitin conjugating enzyme E2N en proteasome subunit alfa type 5 zijn beide proteïnen waarvoor er in deze studie een verhoogde expressie in het EAE-model werd waargenomen. Beide proteïnen maken deel uit van de *ubiquitin-proteasome pathway*. Deze speelt een centrale rol bij de degradatie van intracellulaire proteïnen. Het *ubiquitin conjugating enzyme*

E2N is verantwoordelijk voor het merken van de proteïnen die afgebroken moeten worden. Het enzyme bindt een aantal ubiquitine-moleculen aan een eiwit waardoor dit herkend wordt door het proteasoom-complex en hierin wordt afgebroken. Het *proteasome subunit alpha type 5* maakt deel uit van dit complex. De *ubiquitin-proteasome pathway* heeft als belangrijkste functie de afbraak van proteïnen, maar is ook verantwoordelijk voor de modulatie van regulatoire proteïnen betrokken bij de inflammatoire processen, celcyclus, celgroei en differentiatie [46].

Een studie van Giordana en collega's trachtte een verband aan te tonen tussen abnormale ubiquitinisatie en MS. Deze studie kon aantonen dat ubiquitine aanwezig was in de MS-plaques, maar ook buiten de plaques in de normaal gemyeliniseerde witte stof. Er werd aangetoond dat er geubiquitineerde gebieden algemeen teruggevonden werden in neurologische aandoeningen. Maar er is verder nog weinig geweten over de rol van ubiquitine en de *proteasome pathway* in demyeliniserende aandoeningen [47].

Heat shock cognate protein 70 (Hsc70)

Heat shock cognate protein 70 (hsc70) behoort tot de familie van het *heat shock* proteïne 70 (*hsp70*). Het wordt constitutief tot expressie gebracht, maar de expressie kan verhoogd worden onder invloed van stress. Hsc70 vervult 'huishoud'-functies waaronder het vouwen van proteïnen en het transport ervan naar subcellulaire organellen, maar het is ook betrokken bij antigenpresentatie en apoptose. Onder invloed van stress kan hsc70 ook verhinderen dat proteïnen denatureren en zo de kans op het overleven van de cel vergroten [48,49].

Na een vergelijkende analyse kon in deze studie een verhoogde expressie aangetoond worden van hsc70 in het EAE-diermodel. Deze bevindingen zijn in overeenstemming met een aantal experimenten uitgevoerd door Aquino en collega's. Vooreerst hebben zij ook de expressie bestudeerd van hsc70 in het acute EAE-diermodel. Hun bevindingen toonden een verhoogde mRNA concentratie van hsc70 in het EAE-diermodel. Deze expressie was predominant in de neuronen en in mindere mate aanwezig in de inflammatoire cellen die het CNS binnendringen. Hun proteomica-studie vertoonde een licht verhoogde expressie van het proteïne hsc70 in overeenstemming met de resultaten in deze studie [50]. Aquino en collega's hebben eveneens studies uitgevoerd omtrent de hsc70-expressie in multiple sclerose. Zij konden een verhoogde expressie aantonen van hsc70. Initieel zorgde dit voor een bescherming van de myeline tegen verdere beschadiging en hielp dit bij het herstel van de myeline. Maar een verhoogde expressie van hsc70 vormde additioneel een doelwit voor het immuunsysteem en droeg bij aan de progressie van de ziekte [51]. Een andere studie

uitgevoerd door Aquino en collega's voorzag een rol voor hsc70 als *chaperone* voor MBP. Hsc70 bond MBP waardoor dit complex immunogeen werd en gemakkelijker werd opgenomen door antigen presenterende cellen [52].

De vergelijkende analyse van de proteïnen in het hersenweefsel van de EAE- en controle-Lewis-ratten heeft een aantal proteïnen opgeleverd die verhoogd of verlaagd tot expressie werden gebracht. Onder deze proteïnen werden een aantal reeds in verband gebracht met EAE en/of MS door andere studies. Hiertoe behoren onder andere alfa B crystalline en hsc70. Deze eiwitten kunnen daarom beschouwd worden als *proof of principle* van deze studie. Ook van calcineurine kon reeds een rol binnen auto-immuniteit bewezen worden. In combinatie met cyclofiline A vormt calcineurine een doelwit voor het immuunonderdrukkende medicijn cyclosporine A, dat vaak als behandeling wordt gegeven bij auto-immune aandoeningen zoals MS. Verdere studies zullen uitwijzen of en op welke manier de geïdentificeerde kandidaatproteïnen betrokken zijn in de pathogenese van EAE en MS.

4.4 Studie van het eiwit stathmine in het EAE-model

Stathmine is een klein, regulerend proteïne dat zich in het cytosol bevindt. Synoniemen voor stathmine zijn oncoproteïne 18, p19, 19K, pp17, prosoline en p18. Er zijn 14 isovormen van stathmine bestaande uit 12 gefosforyleerde en 2 niet-gefosforyleerde vormen. Het komt voor in verschillende cellen waaronder neuronen, spiercellen en lymfocyten [53,54]. De expressie van stathmine is hoog in niet-gedifferentieerde cellen van het embryo en ook nog in de meeste weefsels in de neonatale periode. Verder is er ook een hoge expressie in niet-gedifferentieerde cellen bij volwassenen, maar deze expressie daalt sterk wanneer differentiatie wordt geïnduceerd. De uitzondering hierop wordt gevormd door de hersenen waar de expressie relatief hoog blijft [53].

Stathmine kan op vier verschillende plaatsen gefosforyleerd worden, namelijk op serineresidu (Ser)16, Ser25, Ser38 en Ser64. Deze fosforylaties gebeuren respectievelijk door Ca^{2+} /calmoduline (CaM) kinase II, *mitogen-activated protein* (MAP) kinase, *cyclin dependent* cdc2 en proteïne kinase A (PKA). Er zijn bovendien verschillende combinaties mogelijk van gefosforyleerde serineresidu's [53,54,55]. Stathmine speelt een belangrijke rol binnen de celcyclus. De niet-gefosforyleerde vorm van stathmine bindt aan twee $\alpha\beta$ -tubuline heterodimeren die microtubuli vormen en inhibeert zo de polymerisatie van de microtubuli. Bijgevolg kan er geen spoelfiguur gevormd worden en wordt de celcyclus geïnhibeed. Het

niet-gefosforyleerde stathmine bevordert ook de depolymerisatie van de microtubuli zodat de mitose makkelijker beëindigd wordt. Het is dus belangrijk dat stathmine gefosforyleerd wordt bij het begin van de mitose waardoor het niet meer kan binden aan de microtubuli en deze laatste vervolgens de spoelfiguur kunnen vormen en mitose induceren. Defosforylatie van stathmine is belangrijk voor het beëindigen van de mitose [53,56].

Naast de functie in de celcyclus speelt stathmine ook nog een rol bij andere cellulaire functies. Zo heeft het een invloed op het intracellulaire transport, de celmotiliteit en de celmorfologie aangezien de microtubuli hierin ook een rol vervullen [56]. Verder werd aangetoond dat er ook een hoge concentratie is aan stathmine in post-mitotische neuronen. Zo werd de expressie van stathmine sterk verhoogd tijdens de uitgroei van neurieten en de vorming van synapsen. Vandaar de veronderstelling dat stathmine een rol speelt tijdens neuronale differentiatie [57].

Er zijn reeds studies uitgevoerd omtrent stathmine en MS. Zo hebben Liu en collega's aangetoond dat stathmine verhoogd tot expressie werd gebracht in de hersenen van MS-patiënten, voornamelijk in de oligodendrocyten [58]. De stathmine-positieve cellen bevonden zich vooral in gebieden met significante inflammatie. *In vitro* studies toonden een dubbelrol aan voor stathmine. Enerzijds bevordert een verhoogde stathmine-expressie in progenitorcellen de migratie van deze cellen en draagt zo bij aan het herstel van myeline. Door de stathmine-expressie behouden de progenitorcellen hun eenvoudige morfologie en vertonen ze geen complexe morfologische veranderingen die gepaard gaan met oligodendrocyt-progenitor-differentiatie. Anderzijds zorgt een verhoogde stathmine-expressie in mature oligodendrocyten voor celstress. De hoge stathmine-concentratie interfereert namelijk met de functie van het microtubuli-netwerk waardoor er een verhoogde vatbaarheid is voor apoptose [58]. Het belang van de stabiliteit van het microtubuli-netwerk voor het behoud en de functie van myeline werd ook aangetoond in een studie van Cao en collega's. Zij induceerden EAE in muizen en behandelden hen met een microtubuli stabiliserend geneesmiddel (paclitaxel). De behandelde muizen vertoonden een opmerkelijke verbetering van de neuropathologie en klinische score [59].

Tijdens deze studie werd stathmine geïdentificeerd in een spot die verhoogd tot expressie kwam na 2-D GE-experimenten met eiwitten geïsoleerd uit rathersenen. Er werd getracht de isovorm van stathmine te achterhalen met behulp van massaspectrometrische analyse van de spot waaruit stathmine gedetecteerd werd in de 2-D GE-gel. Deze analyse toonde aan dat het

om de niet-gefosforyleerde vorm van stathmine ging. De pI van de niet-gefosforyleerde vorm van stathmine betreft pI 6,2 [54,60]. Dit kwam echter niet overeen met de pI waargenomen uit de 2-D GE-gel die ongeveer 5,7 betrof. Hierdoor was er geen zekerheid betreffende de fosforylatiestatus van stathmine.

Er zijn studies die een verhoogde expressie van stathmine aantonen in oligodendrocyten van MS-patiënten en in een demyeliniserende diermodel geïnduceerd met ethidiumbromide in muizen [58]. Een verband tussen EAE en een verhoogde stathmine-expressie werd in de literatuur echter nog niet beschreven. In onze studie werd de acute vorm van EAE geïnduceerd waardoor er geen demyelinisatie optrad maar enkel inflammatie. In een eerdere proteomica-studie uitgevoerd op BIOMED werd stathmine waargenomen in PBMC's van MS-patiënten en gezonde controles. Deze bevindingen leiden tot de hypothese dat de verhoogde expressie waargenomen in de EAE-rat veroorzaakt wordt door de infiltrerende cellen in de *cuffs*.

Er werd reeds aangetoond door Liu en collega's dat de stathmine-positieve cellen zich vooral bevonden in gebieden met een significante inflammatie. Zij konden door middel van *in vitro* studies met primaire culturen van oligodendrocyten ook aantonen dat de expressie van stathmine verhoogd werd door inflammatie en meer bepaald door de aanwezigheid van de cytokines tumor necrosis factor alfa en *transforming growth factor* beta [58].

Om onze bevindingen te staven en na te gaan door welke cellen stathmine tot expressie wordt gebracht, werden Western blot-experimenten en immunohistochemische kleuringen uitgevoerd. De resultaten van het Western blot-experiment bevestigen de aanwezigheid van stathmine in de hersenen van zowel de EAE- als de controlerat. Hierbij werd er een licht verhoogde stathminereactiviteit waargenomen in het EAE-model. Uit een parallelle proteomica-studie uitgevoerd op BIOMED werd stathmine-expressie waargenomen in mature ratoligodendrocyten van een primaire cultuur. Vandaar dat dit staal ook geanalyseerd werd door middel van Western blot. Ook hier is er lichte stathminereactiviteit te zien (figuur 18). Er werd ook reactiviteit waargenomen ter hoogte van 40 kDa en 70 kDa. Deze reactiviteit zou te wijten zijn aan een te hoge verdunning (1:5000) van het primaire antilichaam tegen stathmine. Er werden ook PBMC-stalen van gezonde personen en MS-patiënten onderworpen aan Western blot. Hier werd er stathminereactiviteit waargenomen bij zowel de gezonde als de MS-stalen maar er was geen duidelijk onderscheid in reactiviteit tussen beide stalen. Mogelijk treedt er geen verhoogde expressie op van stathmine maar zijn er enkel veranderingen in de fosforylatiestatus van dit proteïne.

In de literatuur zijn er studies die een mogelijk verband beschrijven tussen de activatie van T-cellen en een veranderde fosforylatie van stathmine. Zo hebben Marklund en collega's in hun studies aangetoond dat na de stimulatie van T-cellen via hun antigenreceptor er een cascade van fosforylaties wordt geïnduceerd die uiteindelijk zorgen voor de inactivatie van stathmine en de activatie van de T-cel [55,60]. Door de fosforylatie van stathmine wordt dit proteïne inactief en worden belangrijke functies van dit proteïne gehinderd. Daarnaast leidt de inhibitie van stathmine tot mitose van de T-cellen aangezien het gefosforyleerde stathmine niet bindt aan de $\alpha\beta$ -tubuline heterodimeren en bijgevolg de spoelfiguur gevormd kan worden zodat de celdeling kan plaatsvinden. De studies van Marklund en collega's kunnen de stelling dat er geen verhoogde stathmine-expressie maar wel een veranderde fosforylatiestatus optreedt in PBMC's mogelijk bevestigen.

Immunohistochemische kleuringen werden uitgevoerd op hersencoupees van EAE- en controle-Lewis-ratten om aan te tonen in welke gebieden en door welke cellen stathmine tot expressie gebracht wordt. Er werden vier verdunningen van het primaire antilichaam uitgetest, namelijk 1:500, 1:1000, 1:2000 en 1:5000. De verdunning 1:2000 leverde de beste resultaten op (figuur 19). De negatieve controle vertoonde geen reactiviteit waardoor er geen specifieke binding heeft plaatsgevonden van het secundaire antilichaam. Het parenchym van de hersenen was ook reactief aangezien stathmine een abundant eiwit is in de hersenen [61]. De kleuringen toonden aan dat er duidelijke stathminereactiviteit was in de oligodendrocyten in het EAE-hersenweefsel in tegenstelling tot het controle-hersenweefsel waar de oligodendrocyten slechts een occasionele kleuring vertoonden (figuur 19). Dit is in overeenstemming met de bevindingen van een verhoogde stathmine-expressie in oligodendrocyten van MS-patiënten [58]. De witte stof was ook duidelijk stathminereactief in tegenstelling tot de grijze stof waar de neuronen zich bevinden. Slechts enkele neuronen aanwezig in neuronale nucleï vertoonden stathmine-activiteit. Daarnaast vertoonde het subependym in zowel de EAE-hersencoupe als de controle-hersencoupe positieve subependymale cellen in overeenstemming met de bevindingen uit de studie van Amat en collega's [61]. Dit komt overeen met de verhoogde expressie van stathmine waargenomen in niet-gedifferentieerde cellen bij volwassenen [53]. Het infiltraat in de cuff in de EAE-hersencoupe vertoonde duidelijk cellen met stathminereactiviteit. Morfologische kenmerken wijzen in de richting van macrofagen maar om uitsluitsel te krijgen over de cellen aanwezig in het infiltraat is een dubbelkleuring noodzakelijk met CD68 voor de identificatie van macrofagen en/of CD3 voor de identificatie van lymfocyten. Opvallend is wel dat de bloedmonocyten

geen reactiviteit vertoonden. Mogelijk wordt de stathmine-expressie pas geïnduceerd wanneer de macrofagen de hersenen binnendringen. Hierbij zou dan eventueel de lokale productie van factoren in de BBB of in de hersenen een invloed kunnen hebben op de verhoogde expressie van stathmine. Dit fenomeen dient nog verder bestudeerd te worden.

Onze resultaten toonden een verhoogde expressie van stathmine in het EAE-diermodel. Dit is in overeenstemming met andere studies waarbij verhoogde stathmine-expressie werd waargenomen in oligodendrocyten van MS-patiënten en in demyeliniserende diermodellen. Echter in onze studie werd enkel inflammatie en geen demyelinisatie geïnduceerd onder de vorm van acute EAE. Onze bevindingen konden de hypothese van andere studies bevestigen, namelijk dat de inflammatoire component ook belangrijk is. Zo werd in deze studie stathmine-expressie aangetoond in het infiltraat van de EAE-Lewis-ratten.

In de toekomst zijn er verdere experimenten en studies nodig omtrent de verhoogde expressie van stathmine in de acute vorm van EAE. Deze kandidaat-merker dient ook nog getoetst te worden naar de toepasbaarheid in MS aan de hand van immunohistochemische analyses op hersencoupees en/of door middel van immunologische testen in serum en ruggenmergvocht van MS-patiënten en controlepersonen.

Referenties

1. Lubec G, Krapfenbauer K, Fountoulakis M. Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Prog Neurobiol* 2003;61:1-19
2. Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol* 2000;192:280-8
3. Dumont D, Noben JP, Raus J, Stinissen P, Robben J. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Proteomics* 2004;4:2117-24
4. Hammack BN, Fung KYC, Hunsucker SW, Duncan MW, Burgoon MP, Owens GP, Gilden DH. Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 2004;10:245-60
5. Puchades M, Folkesson-Hansson S, Nilsson CL, Andreassen N, Blennow K, Davidsson P. Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;118:140-6
6. Davidsson P, Sjögren M, Andreassen N, Lindbjör M, Nilsson CL, Westman-Brinkmalm A, Blennow K. Studies of the pathophysiological mechanisms in frontotemporal dementia by proteome analysis of CSF proteins. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;109:128-33
7. Edgar PF, Schonberger SJ, Dean B, Faull RLM, Kydd R, Cooper GJ. A comparative proteome analysis of hippocampal tissue from schizophrenic and Alzheimer's disease individuals. *Mol Psychiatry* 1999;4:173-8
8. Coyle PK. Multiple Sclerosis. In: Lahita RG, Chiorazzi N, Reeves WH. *Textbook of the autoimmune diseases*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2000. p. 595-609
9. Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res* 2002;25:27-51
10. Kornek B, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis – New concepts. *Brain Res Bull* 2003;61:321-6
11. Goldsby, RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. *Immunology*. 5th edition. New York: W.H. Freeman and Company; 2003.
12. Behi ME, Dubucquoi S, Lefranc D, Zéphir H, De Seze J, Vermersch P, Prin L. New insights into cell responses involved in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Lett* 2005;96:11-26

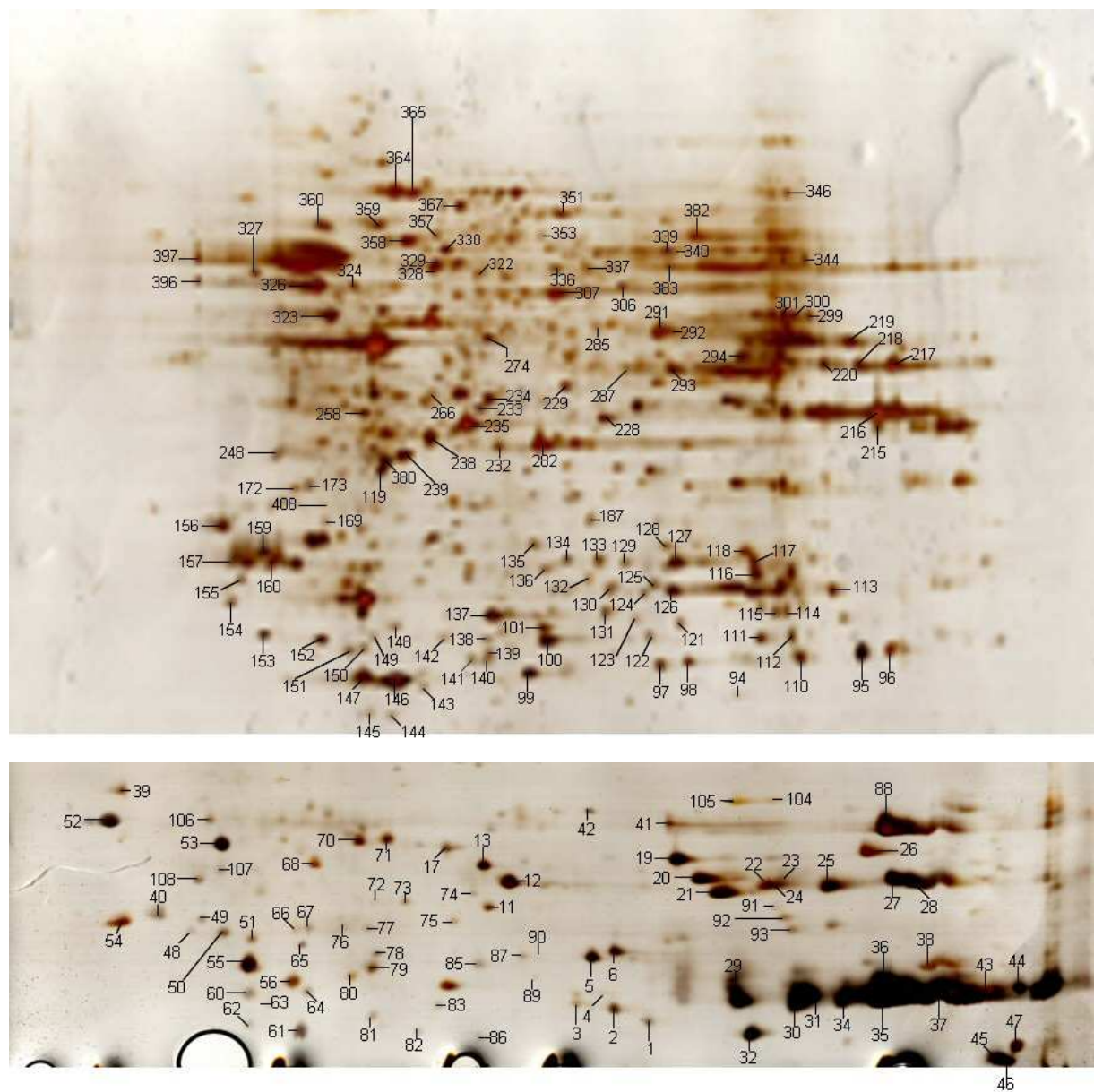
13. Bar-Or A, Oliveira EM, Anderson DE, Hafler DA. Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999;100:252-9
14. Bartlett PF, Mackay IR. The oligodendroglial cell: biology and immunology and relationship to multiple sclerosis. *J Clin Lab Immunol* 1983;11:1-7
15. Link H, Xiao BG. Rat models as tool to develop new immunotherapies. *Immunol Rev* 2001;184:117-28
16. Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 2000;6:88-91
17. Altmann DM, Boyton RJ. Models of multiple sclerosis. *Drug Discov Today* 2004;1:405-10
18. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 2001;81:871-927
19. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002;8:500-8
20. Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munson PJ, Prabhu VV, Trent JM, McFarland HF, Biddison WE. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* 1999;46:425-8
21. Ibrahim SM, Mix E, Bottcher T, Koczan D, Gold R, Rolfs A, Thiesen HJ. Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2001;124:1927-38
22. Nicot A, Ratnakar PV, ron Y, Chen CC, Elkabes S. Regulation of gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis indicates early neuronal dysfunction. *Brain* 2003;126:398-412
23. Glökler J, Angenendt P. Protein and antibody microarray technology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;797:229-40
24. Lopez MF, Pluskal MG. Protein micro- and macroarray: digitizing the proteome. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;787:19-27
25. Robinson WH, Fontoura P, Lee BJ, Beuman de Vegvar HE, Tom J, Pedotti R, Digennaro C, Mitchell D, Fong D, Ho PP, Ruiz PJ, Maverakis E, Stevens DB, Bernard CC, Martin R, Kuchroo VK, van Noort JM, Genain CP, Amor S, Olsson T, Utz P, Garren H, Steinman L. Protein microarrays guide tolerizing DNA vaccine treatment of autoimmune encephalomyelitis. *Nat Biotechnol* 2003;2:1033-9

26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54
27. Reed R, Holmes D, Weyers J, Jones A. Practical skills in biomolecular sciences. Essex: Pearson Education Limited; 1998
28. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004;4:3665-85
29. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850-8
30. Chou YK, Burrows GG, LaTocha D, Wang C, Subramanian S, Bourdette DN, Vandenbark AA. CD4 T-cell epitopes of human alpha B crystallin. *J Neurosci Res* 2004;75:516-23
31. Vojdani A, Vojdani E, Cooper E. Antibodies to myelin basic protein, myelin oligodendrocytes peptides, alpha-beta-crystallin, lymphocyte activation and cytokine production in patients with multiple sclerosis. *J Intern Med* 2003;254:363-74
32. Zimmerman AW, Veerkamp JH. Members of the fatty acid-binding protein family inhibit cell-free protein synthesis. *FEBS Lett* 1998;437:183-6
33. Veerkamp JH, Zimmerman AW. Fatty acid-binding proteins of nervous system. *J Mol Neurosci* 2001;16:133-57
34. Cheon MS, Kim SH, Fountoulakis M, Lubec G. Heart fatty acid binding protein (H-FABP) is decreased in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 2003;67:225-34
35. Allen GW, Liu J, Kirby MA, De Leon M. Induction and axonal localization of epithelial/epidermal fatty acid-binding protein in retinal ganglion cells are associated with axon development and regeneration. *J Neurosci Res* 2001;66:396-405
36. Hayden-Martinez K, Kane LP, Hedrick SM. Effects of a constitutively active form of calcineurin on T-cell activation and thymic selection. *J Immunol* 2000;165:3713-21
37. Husi H, Luyten MA, Zurini MG. Mapping of the immunophilin-immunosuppressant site of interaction on calcineurin. *J Biol Chem* 1994;269:14199-204
38. Kung L, Batiuk TD, Palomo-Pinon S, Noujaim J, Helms LMH, Halloran PF. Tissue distribution of calcineurin and its sensitivity to inhibition by cyclosporine. *Am J Transplant* 2001;1:325-33
39. Manalan AS, Klee CB. Activation of calcineurin by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:4291-5

40. Conboy IM, Manoli D, Mhaikar V, Jones PP. Calcineurin and vacuolar-type H⁺-ATPase modulate macrophage effector functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6324-9
41. Williams JP, McKenna MA, Thames AM, McDonald JM. Effects of cyclosporine on osteoclast activity: inhibition of calcineurin activity with minimal effects on bone resorption and acid transport activity. *J Bone Miner Res* 2003;18:451-7
42. Goldner FM, Patrick JW. Neuronal localization of the cyclophilin A protein in the adult rat brain. *J Comp Neurol* 1996;372:283-93
43. Piotukh K, Gu W, Kofler M, Helms V, Freund C. Cyclophilin A binds to linear peptide motifs containing a consensus that is present in many human proteins. *J Biol Chem* 2005; *in press*
44. Avramut M, Achim CL. Immunophilins in nervous system degeneration and regeneration. *Curr Top Med Chem* 2003;3:1376-82
45. Hovland AR, La Rosa FG, Hovland PG, Cole WC, Kumar A, Prasad JE, Prasad KN. Cyclosporin A regulates the levels of cyclophilin A in neuroblastoma cells in culture. *Neurochem Int* 1999;35:229-35
46. Elliot PJ, Zollner TM, Boehncke WH. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *J Mol Med* 2003;81:235-45
47. Giordana MT, Richiardi P, Trevisan E, Boghi A, Palmucci L. Abnormal ubiquitination of axons in normally myelinated white matter in multiple sclerosis brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002;28:35-41
48. Yenari MA, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol Med Today* 1999;5:525-31
49. Egerton M, Moritz RL, Druker B, Kelso A, Simpson RJ. Identification of the 70kDa heat shock cognate protein (hsc70) and alpha-actinin-1 as novel phosphotyrosine-containing proteins in T-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;224:666-74
50. Aquino DA, Klipfel AA, Brosnan CF, Norton WT. The 70-kDa heat shock cognate protein (HSC70) is a major constituent of the central nervous system and is up-regulated only at the mRNA level in acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurochem* 1993;61:1340-8
51. Aquino DA, Capello E, Weisstein J, Sanders V, Lopez C, Tourtellotte WW, Brosnan CF, Raine CS, Norton WT. Multiple sclerosis: altered expression of 70- and 27-kDa heat shock proteins in lesions and myelin. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:664-72

52. Aquino DA, Lopez C, Farooq M. Antisense oligonucleotide to the 70-kDa heat shock cognate protein inhibits synthesis of myelin basic protein. *Neurochem Res* 1996;21:417-22
53. Curmi PA, Gavet O, Charbaut E, Ozon S, Lachkar-Colmerauer S, Manceau V, Siavoshian S, Maucuer A, Sobel A. Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. *Cell Struct Funct* 1999;24:345-57
54. Zugaro LM, Reid GE, Ji H, Eddes JS, Murphy AC, Burgess AW, Simpson RJ. Characterization of rat brain stathmin isoforms by two-dimensional gel electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-trap mass spectrometry. *Electrophoresis* 1998;19:867-76
55. Marklund U, Brattsand G, Osterman O, Ohlsson PI, Gullberg M. Multiple signal transduction pathways induce phosphorylation of serines 16, 25 and 38 of oncoprotein 18 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1993;268:25671-80
56. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 2004;93:242-50
57. Di Paolo G, Lutjens R, Osen-Sand A, Sobel A, Catsicas S, Grenningloh G. Differential distribution of stathmin and SCG10 in developing neurons in culture. *J Neurosci Res* 1997;50:1000-9
58. Liu A, Stadelmann C, Moscarello M, Bruck W, Sobel A, Mastronardi FG, Casaccia-Bonnel P. Expression of stathmin, a developmentally controlled cytoskeleton-regulating molecule, in demyelinating disorders. *J Neurosci* 2005;25:737-47
59. Cao L, Sun D, Cruz T, Moscarello MA, Ludwin SK, Whitaker JN. Inhibition of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat by paclitaxel. *J Neuroimmunol* 2000;108:103-11
60. Le Gouvello S, Manceau V, Sobel A. Serine 16 of stathmin as a cytosolic target for Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II after CD2 triggering of human lymphocytes. *J Immunol* 1998;161:1113-22
61. Amat JA, Fields KL, Schubart UK. Distribution of phosphoprotein p19 in rat brain during ontogeny: stage-specific expression in neurons and glia. *Brain Res Dev Brain Res* 1991;60:205-18

Bijlage



Figuur A : Hersenproteoom van de Lewis-rat.

Er werden 408 verschillende spots geprikt uit de 24 verkregen gelen. De eiwitten uit 205 van deze spots (aangeduid op gel) werden getrypsiniseerd en vervolgens geanalyseerd door middel van massaspectrometrie. Hieruit konden er 192 verschillende eiwitten geïdentificeerd worden.

Tabel A: Identificaties van spots van de mastergel van het hersenproteoom van de Lewis-rat

Spot-nummer	Identificatie	Spot-nummer	Identificatie
spot 1	serum albumin	spot 32	macrophage migration inhibitory factor
spot 2	NADH-ubiquinone oxidoreductase 13 kDa - B subunit	spot 34	serum albumin
spot 3	D-dopachrome tautomerase	spot 35	hemoglobin beta, alpha1 and 2 chain
spot 4	14,5 kDa translational inhibitor protein	spot 36	hemoglobin beta, alpha1 and 2 chain
spot 5	histidine triad nucleotide binding protein 1	spot 37	hemoglobin beta, alpha1 and 2 chain
spot 5	B actin	spot 37	FK506-binding protein A1
spot 6	fatty acid binding protein,epidermal	spot 38	profilin 1
spot 6	histidine triad nucleotide binding protein 1	spot 39	similar to S phase kinase associated protein 1A isoform B
spot 7	B actin	spot 40	protein phosphatase 3 regulatory subunit B
spot 8	actin	spot 41	cofilin 2
spot 10	actin	spot 42	annexin 1 and 2
spot 10	14-3-3 protein sigma	spot 42	lysozyme C, type P
spot 10	histone H4	spot 42	actin, muscle A2
spot 10	CG 31613-PA	spot 43	hemoglobin alpha1 and 2 chain
spot 10	Calgranulin A	spot 44	hemoglobin beta chain
spot 11	ubiquitin conjugating enzyme E2N	spot 45	serum albumin
spot 12	Cu-Zn superoxide dismutase	spot 45	cytochrome C oxidase
spot 13	Nucleoside diphosphate kinase A	spot 46	cytochrome C oxidase
spot 13	Cu-Zn superoxide dismutase	spot 46	acyl-CoA-binding protein
spot 14	profilin 2	spot 47	chaperonin 10
spot 14	HSA	spot 48	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
spot 15A	fatty acid binding protein, heart	spot 50	phosphoprotein enriched in astrocytes 15
spot 15A	HSA	spot 50	Myelin basic protein
spot 15B	actin	spot 51	phosphoprotein enriched in astrocytes 15
spot 15B	alpha-fetoprotein	spot 52	synuclein beta
spot 15B	cystatine B	spot 52	chaperonin 10
spot 16	SH3 binding glutamic acid-rich like protein 2	spot 53	synuclein alpha
spot 16	alpha-fetoprotein	spot 53	lysozym C, type P
spot 17	stathmin 1	spot 54	ATP synthase delta chain
spot 19	nucleoside diphosphate kinase B	spot 55	parvalbumin alpha
spot 20	peroxiredoxin 5	spot 56	cytochrome C oxidase, subunit Va
spot 21	peroxiredoxin 5	spot 56	synuclein alpha
spot 21	serum albumin	spot 57	synuclein beta
spot 22	peroxiredoxin 5	spot 57	ubiquitin
spot 22	serum albumin	spot 60	thioredoxin 1
spot 23	peptidylprolyl cis-trans isomerase A	spot 60	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM 8A
spot 24	peroxiredoxin 5	spot 61	myotrophin
spot 25	peptidylprolyl cis-trans isomerase A	spot 61	3-mono oxygenase tryptophan 5 monooxygenase activation protein
spot 26	destrin	spot 64	IgG Fc binding protein
spot 26	serum albumin	spot 68	dermcidin
spot 27	peptidylprolyl cis-trans isomerase A	spot 70	glia maturation factor B
spot 27	cofilin 1	spot 71	stathmin 1
spot 28	peptidylprolyl cis-trans isomerase A	spot 71	nucleoside diphosphate kinase B
spot 29	peptidylprolyl isomerase A	spot 71	myelin basic protein
spot 30	hemoglobin alpha chain		
spot 31	hemoglobin beta chain		

Spot-nummer	Identificatie
spot 77	calmodulin 3
spot 78	keratines
spot 79	cytochrome C oxidase polypeptide Vb
spot 85	profilin 2
spot 88	cofilin 1
spot 88	transferrin
spot 91	myristylated alanine-rich protein kinase C substrate
spot 92	ubiquitin conjugating enzyme E2D3
spot 94	alpha B crystallin
spot 95	superoxide dismutase
spot 96	peroxiredoxin 1
spot 97	transferrin
spot 97	neural protein Np25
spot 98	adenylate kinase isoenzym 1
spot 98	transferrin
spot 99	serotransferrin precursor
spot 100	DJ-1 protein
spot 101	transferrin
spot 102	hemiferrin
spot 102	chain A, Fab fragment from murine Ascites
spot 103	serotransferrin
spot 104	Ab2-417
spot 104	unnamed protein
spot 105	serum albumin
spot 105	ubiquitin
spot 106	myosin regulatory light chain
spot 106	alpha synuclein
spot 107	alpha1 tubulin
spot 108	gamma synuclein
spot 108	alpha1 tubulin
spot 108	vesicle associated membrane protein 2
spot 110	glutathione S-transferase
spot 111	transferrin
spot 112	transferrin
spot 113	serotransferrin
spot 115	liver regeneration related protein = serotransferrin
spot 115	isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase
spot 115	similar to myeloid/lymphoid
spot 115	GDP-D mannose dehydratase
spot 115	veratrol
spot 116	serotransferrin
spot 116	quinoid dihydropteridine reductase
spot 116	veratrol
spot 118	serotransferrin
spot 118	carbonic anhydrase 2
spot 118	GDP-D mannose dehydratase
spot 118	veratrol
spot 118	ribosome biogenesis regulatory protein
spot 119	alpha soluble NSF attachment protein

Spot-nummer	Identificatie
spot 120	vdac 1 protein (voltage-dependent anion selective channel)
spot 124	triose phosphate isomerase 1
spot 125	similar to biliverdin reductase B
spot 126	triose phosphate isomerase
spot 127	pgam 1 (phosphoglycerate mutase 1)
spot 128	syntaxin binding protein 1
spot 129	pgma 1 (phosphoglycerate mutase 1)
spot 130	triose phosphate isomerase 1
spot 132	proteasome subunit alpha type 6
spot 133	phosphoglycerate mutase 1 (pgma1)
spot 134	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
spot 136	endoplasmic reticulum protein ERp29
spot 137	peroxiredoxin 6
spot 139	serum albumin
spot 139	Hsc 70 ps1
spot 143	similar to dynactin 3 isoform 1
spot 144	sorcin
spot 146	phosphatidylethanolamine binding protein
spot 147	peroxiredoxin 2
spot 147	phosphatidylethanolamine binding protein
spot 148	inosine triphosphatase
spot 149	huntingtin interacting protein 2
spot 150	similar to heme-binding protein
spot 150	similar to NADH dehydrogenase:ubiquinone
spot 151	NADH dehydrogenase
spot 152	glyoxylase 1
spot 152	NADH dehydrogenase
spot 153	translationally controlled tumor protein
spot 154	calbindin
spot 155	proteasome subunit alpha type 5
spot 156	14-3-3 epsilon
spot 157	14-3-3 zeta
spot 159	14-3-3 gamma and beta
spot 160	14-3-3 beta and zeta
spot 169	inositol 1 monophosphatase
spot 172	annexin 5
spot 173	annexin 5
spot 187	glutathione transferase omega 1
spot 215	malate dehydrogenase
spot 215	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
spot 216	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
spot 217	aldolase A
spot 218	fructose-biphosphate aldolase A
spot 219	phosphoglycerate kinase
spot 220	fructose-biphosphate aldolase A
spot 220	asparaginase-like sperm autoantigen
spot 228	aldehyde reductase 1

Spot-nummer	Identificatie
spot 229	malate dehydrogenase
spot 232	similar to Riken cDNA 27000085E05
spot 233	dimethylarginine demethylaminohydrolase 1
spot 234	NAD ⁺ specific isocitrate dehydrogenase alpha subunit
spot 235	lactate dehydrogenase B
spot 238	guanine nucleotide-binding protein
spot 239	pyruvate dehydrogenase beta
spot 248	otub 1 protein
spot 258	alpha tubulin
spot 266	isocitrate dehydrogenase
spot 274	succinyl-Co A ligase
spot 282	malate dehydrogenase
spot 285	alpha centractin
spot 287	fructose biphosphate aldolase C
spot 291	glutamine synthetase
spot 292	glutamine synthetase
spot 292	lysozyme C, type P precursor
spot 293	fructose biphosphate aldolase
spot 293	poly(rC)-binding protein 1
spot 294	aspartate transaminase
spot 299	fumarate hydratase
spot 300	fumarate hydratase
spot 301	fumarate hydratase
spot 301	alpha-1-collageen
spot 306	beta enolase
spot 306	succinate semialdehyde dehydrogenase
spot 307	alpha enolase
spot 323	alpha enolase
spot 323	gamma enolase
spot 324	dynactin complex 50 kDa subunit
spot 324	gamma enolase
spot 324	glial fibrillary acidic protein,astrocyte
spot 324	alpha enolase
spot 324	ATP synthase beta chain
spot 324	Myc box dependent interacting protein 1
spot 326	ATP synthase beta chain
spot 327	secernin 1
spot 327	ATP synthase beta chain
spot 327	chromatin assembly factor 1 subunit C
spot 327	heterogenous nuclear ribonucleoprotein H
spot 327	dipeptidyl-peptidase 2 precursor
spot 327	beta tubulin
spot 328	cytosolic nonspecific dipeptidase
spot 328	vacuolar ATP synthase beta subunit
spot 330	dihydropyrimidinase related protein 2
spot 330	tubulin-alpha 1 chain
spot 330	heterogenous nuclear ribonucleoprotein K
spot 336	T-complex protein 1, beta subunit

Spot-nummer	Identificatie
spot 336	tryptophanyl-tRNA synthetase
spot 336	dihydropyrimidinase related protein 2
spot 337	fascin
spot 337	aspartyl-tRNA synthetase
spot 337	vacuolar ATP synthase beta subunit
spot 339	synapsin 2
spot 339	dihydrolipoamide dehydrogenase
spot 339	adenyl cyclase-associated protein 1
spot 340	synapsin 2
spot 340	dihydrolipoamide dehydrogenase
spot 340	succinyl-Co A
spot 340	SNAP-29 protein
spot 344	methylmalonate- semialdehyde dehydrogenase
spot 344	ATP synthase alpha chain
spot 346	transketolase
spot 346	neurofilament L
spot 346	dihydropyrimidinase related protein 2
spot 351	dihydropyrimidinase related protein 2
spot 351	phosphoglucomutase 1
spot 357	dihydropyrimidinase related protein 2
spot 357	T-complex protein 1, epsilon subunit
spot 357	serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit
spot 358	T-complex protein 1, theta subunit
spot 358	heat shock protein 60kDa
spot 358	dihydropyrimidinase related protein 2
spot 359	alpha internexin
spot 359	dihydropyrimidinase related protein 2
spot 359	HSP-60
spot 359	heterogenous nuclear ribonucleoprotein K
spot 359	calcium / calmodulin dependent protein kinase
spot 359	copine 6
spot 360	Rab GDP dissociation inhibitor alpha
spot 360	alpha tubulin
spot 360	protein phosphatase 2, alpha isoform
spot 364	Hsc 70 protein
spot 365	ATP synthase catalytic subunit A
spot 365	Annexin
spot 365	lactate dehydrogenase B
spot 365	dihydropyrimidinase related protein 2
spot 367	dihydropyrimidinase related protein 2
spot 367	dihydrolipoamide acetyltransferase
spot 367	oocyte maturation factor
spot 380	beta soluble NSF attachment protein (SNAP-beta)
spot 380	alpha internexin
spot 380	dihydrolipoamide acetyltransferase
spot 380	pyruvate dehydrogenase
spot 380	glycogen phosphorylase

Spot- nummer	Identificatie
spot 382	pyruvate kinase
spot 382	alpha internexin
spot 383	alpha internexin
spot 383	glutamate dehydrogenase
spot 383	ATP synthase alpha chain
spot 396	ATP synthase beta chain
spot 396	histone lysine-N methyltransferase
spot 397	alpha tubulin
spot 397	beta tubulin
spot 408	toll interacting protein

Tabel B: Identificatie van de eiwitten na 2-D LC van het EAE-staal

Identificatie	Accessie nummer	Moleculair gewicht	pI	Aantal peptiden	Coverage %	Mascot score *
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	P30009	29663	4,3	7	51,9	
60S acidic ribosomal protein P2	P02401	11692	4,5	3	46,1	
Neuromodulin	P07936	23603	4,7	10	45,6	
Beta-synuclein	Q63754	14504	4,5	4	40,9	
Brain abundant, membrane attached signal protein 1	Q05175	21790	4,5	6	40,5	
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	P26772	11001	8,9	4	39,8	
Similar to ubiquinol-cytochrome C reductase complex 11 kDa protein, mitochondrial precursor (mitochondrial hinge protein) (cytochrome C1, nonheme 11 kDa protein) (complex III subunit VIII)	XP_345569	10424	5,0	2	37,1	
Hemoglobin beta chain complex	P02091	15979	8,1	5	32,7	
ATP synthase coupling factor 6, mitochondrial precursor	P21571	12494	9,4	3	32,4	
Hemoglobin beta chain, minor-form	P11517	15851	8,8	5	30,1	
Calmodulin 3	P62161	16838	4,2	7	28,2	
Diazepam binding inhibitor	P11030	10027	8,8	2	27,6	
Splice isoform 7 of tropomyosin 1 alpha chain	P04692-7	28579	4,8	8	26,2	
Parvalbumin	P02625	11926	5,2	2	24,5	
Tropomyosin	Q63600	28720	4,7	7	24,2	
Tropomyosin	Q63610	29007	4,8	7	23,8	
Myelin basic protein S	P02688	18356	11,1	4	23,8	
Superoxide dismutase 1	P07632	15912	6,4	4	21,4	
Myotrophin	P62775	12861	5,5	2	21,2	
Thioredoxin	P11232	11673	4,9	3	21,0	
ProSAAS precursor	Q9QXU9	27414	5,8	3	20,8	
24-kDa subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase	P19234	27378	6,7	4	20,6	
NSFL1 cofactor p47	O35987	40680	5,1	5	18,6	
Nucleoside diphosphate kinase A	Q05982	17193	6,3	2	17,8	
Splice isoform 2 of clathrin light chain B	P08082-2	23120	4,7	4	17,5	
Microtubule associated protein 2	Q64715	198602	4,8	24	17,4	
Tropomyosin alpha 4 chain	P09495	28510	4,7	6	17,3	
Heart fatty acid binding protein	P07483	14775	6,3	3	17,3	
Phosphatidylethanolamine-binding protein	P31044	21609	6,3	2	16,8	

* Een significante Mascot identificatie staat in vet gedrukt

Identificatie	Accessie nummer	Moleculair gewicht	pI	Aantal peptiden	Coverage %	Mascot score *
FXVD domain-containing ion transport regulator	P59649	8487	7,8	1	16,3	40
Phosphoglycerate mutase 1 (Pgam1 protein)	P25113	28646	6,7	2	15,4	
Zero beta-1 globin	Q62670	16022	8,2	3	15,0	
SCIRP10-related protein	Q6IUR5	18992	5,4	2	12,3	
Similar to S-phase kinase-associated protein 1A isoform b	Q6PEC4	18672	4,5	2	12,3	
Aldolase A	P05065	39352	8,1	3	12,1	
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Q00981	24782	5,2	2	11,7	
MGC105579 protein	Q5RJL0	32455	4,7	2	11,6	
Hypothetical protein	Q5XIF3	19741	10,1	2	10,9	
Parathymosin	P04550	11559	4,2	1	10,8	47
14-3-3 protein epsilon	P62260	29174	4,7	3	10,6	
Stathmin 2	P21818	20756	8,6	2	10,6	
Similar to swiprosin 1	XP_216579	26759	5,1	3	10,5	
Actin cytoplasmic 1	P60711	41737	5,5	3	10,4	
Dermcidin	Q71DI1	11284	6,5	1	10,0	20
Splice isoform 1 of clathrin light chain A	P08081-1	26980	4,5	3	9,7	
Splice isoform 1 of synaptosomal-associated protein 25	P60881-1	23315	4,8	2	9,7	
Cytochrome c oxidase polypeptide Vb, mitochondrial precursor	P12075	13915	7,8	1	9,3	34
Similar to MHR23B	Q6IRD5	43497	4,8	4	8,7	
ATP synthase delta chain, mitochondrial precursor	P35434	17595	5,2	1	8,3	46
Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	XP_343581	24676	4,7	1	8,0	66
60S ribosomal protein L31	P62902	14463	10,5	1	8,0	24
Cytochrome C, somatic	P62898	11605	9,6	1	7,6	22
Gamma-synuclein	Q63544	12920	4,6	1	7,3	27
Complement component 1, q subcomponent binding protein	O35796	30997	4,9	1	7,2	70
Transthyretin precursor	P02767	15720	6,2	1	6,8	28
Similar to ribosomal protein S27a	XP_229338	55286	9,0	2	6,4	
Ywhaz protein	P63102	30058	4,9	2	6,0	
Thioredoxin, mitochondrial precursor	P97615	18232	7,9	1	6,0	19
Similar to 17,000 dalton myosin light chain	Q64119-2	16961	4,6	1	6,0	22
Neurofilament triplet M protein	P12839	95660	4,8	5	5,6	
Ckb protein	P07335	45248	5,7	1	5,6	47
Peptidylprolyl isomerase A	P10111	17874	8,2	1	5,5	24

* Een significante Mascot identificatie staat in vet gedrukt

Identificatie	Accessie nummer	Moleculair gewicht	pI	Aantal peptiden	Coverage %	Mascot score *
Sulfated glycoprotein 1 precursor	P10960	61124	5,2	3	5,4	
Similar to biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	XP_214823	22181	6,8	1	5,3	24
Similar to NADH dehydrogenase:ubiquinone Fe-S protein 8	XP_215197	23970	6,2	1	5,2	31
Bendless protein	Q9EQX9	17809	6,6	1	5,0	36
Lens epithelium-derived growth factor a	Q7TNY0	59639	9,1	2	4,9	
Ribosomal protein s3a	P49242	29945	9,7	1	4,5	26
Glyoxylase 1	Q6P7Q4	20820	5,3	1	4,9	23
37 kDa protein	ENSRNOP00000008972	37064	4,7	2	4,8	
Secretogranin II precursor	P10362	71031	4,8	2	4,7	
ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P10719	56503	5,3	3	4,7	
Dynactin 2	Q6AYH5	44148	5,3	1	4,7	54
Neurosecretory protein VGF precursor	P20156	68193	4,7	1	4,2	30
Vimentin	P31000	53733	5,1	2	4,1	
Mitochondrial H ⁺ -ATP synthase alpha subunit	P15999	59754	9,2	2	4,0	
Hepatoma-derived growth factor-related protein HRP3	Q923W4	22447	8,4	1	4,0	27
Similar to phosphoprotein enriched in astrocytes 15	Q5U318	29499	8,2	1	3,9	34
Cerebellar Ca-binding protein, spot 35 protein	P07171	29994	4,8	1	3,8	38
Similar to acyl carrier protein, mitochondrial precursor (ACP) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 9.6 kDa subunit) (CI-SDAP)	XP_215044	17514	5,1	1	3,8	40
High molecular-weight neurofilament	O35482	115349	5,9	4	3,7	
Calreticulin precursor	P18418	47996	4,5	2	3,6	
Nucleolin	P13383	77277	4,7	3	3,5	
Hepatoma-derived growth factor	Q8VHK7	26488	4,8	1	3,4	21
Similar to RIKEN cDNA 1200016B17	XP_232389	29792	6,4	1	3,2	17
78 kDa glucose-regulated protein precursor	P06761	72347	5,2	2	3,1	
Protein disulfide-isomerase precursor	P04785	56951	4,9	2	3,1	
Similar to hypothetical protein KIAA0586	XP_343079	39911	8,3	1	3,0	9
Similar to transcriptional activator protein pur-alpha (purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha)	XP_226016	34884	6,4	1	2,8	32
Rac/cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6	Q5XXR3	87013	5,8	1	2,6	10
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1	Q9Z0W5	50449	5,2	1	2,3	25
Paralemmin	Q920Q0	41927	4,9	1	2,3	7
Glial fibrillary acidic protein, astrocyte	P47819	49943	5,4	1	2,1	24

* Een significante Mascot identificatie staat in vet gedrukt

Identificatie	Accessie nummer	Moleculair gewicht	pI	Aantal peptiden	Coverage %	Mascot score *
Similar to hypothetical protein FLJ10290	XP_225902	46864	8,5	1	2,1	14
Similar to 60S ribosomal protein L5	XP_224593	46518	7,1	1	2,1	18
Asparaginase-like sperm autoantigen	Q8CG44	34410	7,9	1	2,1	16
Enolase 1 alpha	P04764	47116	6,6	1	1,6	35
Dihydropyrimidinase related protein-2	P47942	62278	6,4	1	1,9	30
Transforming growth factor beta 1 induced transcript 4 protein	P62501	15583	5,2	2	13,3	
Synaptotagmin-2	P29101	47210	8,0	1	1,7	44
Similar to RIKEN cDNA 1300013D05	XP_340891	57950	10,2	1	1,6	15
Similar to Microtubule-associated protein 1B (MAP 1B) (Neuraxin)	P15205	269640	4,8	2	1,5	
Similar to frataxin	XP_345013	69360	8,3	1	1,5	34
Spectrin alpha chain, brain	Q63363	284636	5,3	3	1,1	
Similar to RIKEN cDNA 5730454B08	XP_341122	87013	8,3	1	1,0	26
Microtubule-associated protein 1A	P34926	299529	4,9	1	0,9	44
Similar to ephrin type-B receptor 2 precursor (Tyrosine-protein kinase receptor EPH-3) (NUK) (SEK-3)	XP_233574	108553	5,7	1	0,9	17
Myosin IXb	Q63358	241146	8,6	1	0,5	11
Similar to KIAA1074 protein	XP_232319	212077	5,9	1	0,4	22

* Een significante Mascot identificatie staat in vet gedrukt