

*Studie van CD4+CD25+ regulatoire T-cellen bij  
patiënten met multiple sclerose*

**Kathleen DOUMEN**

promotor:

**Prof. dr. Pieter STINISSEN**

co-promotor:

**dr. Niels HELLINGS, Drs. Koen VENKEN**

**Academiejaar: 2004-2005**

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

## Inhoudsopgave

Lijst met afkortingen .....	I
Lijst met tabellen .....	III
Lijst met figuren .....	III
Voorwoord .....	V
Samenvatting .....	VII
1 Inleiding .....	1
1.1 Multiple sclerose: klinische kenmerken .....	1
1.2 Multiple Sclerose: pathologie .....	1
1.3 Multiple Sclerose: genetische achtergrond en etiologie .....	2
1.4 Immunopathogenese van Multiple Sclerose: huidige hypothese .....	2
1.5 Autoimmunititeit: pathogene immuunreacties tegen lichaamseigen substanties .....	4
1.6 Natuurlijk voorkomende CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatoire T-cellen .....	5
1.7 Het doel van deze thesis .....	14
2 Materiaal en methoden .....	16
2.1. MS-patiënten en gezonde controles .....	16
2.2 Celkweektechnieken .....	17
2.3 Moleculair biologische Technieken: .....	22
2.4 Statistische analyse .....	25
3 Resultaten .....	27
3.1 Isolatie van de CD4 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> en CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-cel populaties .....	27
3.2 De suppressieve capaciteit van CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatoire T-cellen .....	28
3.3 Frequentie en cytokine profiel van antigeen reactieve CD4 <sup>+</sup> T-cellen voor en na depletie van Tregs .....	34
3.4 TCR V $\beta$ -gebruik bij CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> , CD25 <sup>low</sup> en CD25 <sup>high</sup> T-cellen van gezonde controlepersonen en MS-patiënten .....	38
4 Discussie .....	43
5 Referenties .....	51

## Lijst met afkortingen

- <sup>3</sup>H-Thy : tritium thymidine  
7-AAD : 7-amino-actinomycine D  
APC : antigeen presenterende cel  
BFA : brefeldine A  
BSA : bovine serum albumine  
CaI : calciumionomycine  
CD : *cluster of differentiation*  
CD103 : integrine  $\alpha$ E-B7  
CD25 : IL-2 receptor- $\alpha$  keten  
CD45RA : proteïne tyrosine kinase isotype  
CD45RB low : proteïne tyrosine kinase isotype  
CD45RO : proteïne tyrosine kinase isotype  
CD62L : L-selectine  
cDNA : complementair deoxyribonucleïnezuur  
CFS(DA)E : carboxy fluoresceïne succinimidyl (diacetaat) ester  
CP-MS : chronisch progressieve multiple sclerose  
CTLA-4 : *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*  
CZS : centrale zenuwstelsel  
DIG : dioxigenine  
DMSO : dimethyl sulfoxide  
dNTP : deoxynucleoside trifosfaat  
EAE : experimentele autoimmune encefalomyelitis  
EDTA : ethyleen diamine tetra acetaatzuur  
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*  
FACS : *fluorescence activated cell sorter*  
FITC : fluoresceïne isothiocyanaat  
FCS : foetaal kalfs serum  
FOXP3 : Forkhead-Box P3  
GAPDH : glyceraldehyde-3 fosfaat dehydrogenase  
GITR : *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family related-gene*  
HC : gezonde controlepersoon  
HLA : *human leukocyte antigen*  
HPLC : *high liquid pressure chromatography*  
ICAM : *intracellular cell adhesion molecule*  
IFN- $\gamma$  : interferon- $\gamma$   
IL-10 : interleukine  
IPEX : immuundysregulatie, polyendocrinopathie, enteropathie en X-gelinkte overerving  
LFA : *leukocyte function-associated antigen*

MACS : *magnetic cell sorting*  
MBP : *myelin basic protein*  
MHC : *major histocompatibility complex*  
MOG : *myelin oligodendrocyt protein*  
MS : multiple sclerose  
N<sub>2</sub> : vloeibare stikstof  
NK T-cel : *natural killer T-cel*  
OD : optische densiteit  
PBMC : perifere bloed mononucleaire cel  
PBS : fosfaat gebufferde zoutoplossing  
PCR : *polymerase chain reaction*  
PE : phycoerythrine  
PerCP : peridinine- chlorophyll proteïne  
PLP : *proteolipid protein*  
PMA : phorbol 12-myristaat 13-acetaat  
PP-MS : primair progressieve multiple sclerose  
RBC : rode bloedcellen  
RNA : ribonucleïnezuur  
RR-MS : *relapsing-remitting* multiple sclerose  
SP-MS : secundair progressieve multiple sclerose  
TAC : tetrameer antilichaamcomplex  
TAQ : *Thermus aquaticus*  
TCR : T-celreceptor  
TGF- $\beta$  : transforming growth factor- $\beta$   
T<sub>H</sub> : T helper cel  
TMB : tetramethyl butyraat  
TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$   
Tr1 cel : regulatoire T-cel type 1  
Treg : CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cel  
TT : tetanus toxoïd

## Lijst met tabellen

<b>Tabel 1:</b> Overzicht van de verschillende subtypes regulatoire T-cellen .....	5
<b>Tabel 2:</b> Overzicht van de eigenschappen van muis en humane CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatoire T-cellen .....	12
<b>Tabel 3:</b> Karakteristieken van MS-patiënten en gezonde controlepersonen .....	16
<b>Tabel 4:</b> Verloop van de polymerase chain reaction .....	24

## Lijst met figuren

<b>Figuur 1:</b> Isolatie van CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> , CD25 <sup>low</sup> en CD25 <sup>high</sup> T-cellen door middel van high speed sorting met behulp van FACS sorting .....	19
<b>Figuur 2:</b> Schematisch overzicht van de PCR-ELISA methode .....	26
<b>Figuur 3:</b> Zuiverheid van CD4 <sup>+</sup> T-cellen, CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> en CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-cellen .....	27
<b>Figuur 4:</b> Aanrijking van CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T-cellen in de geïsoleerde CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-celpopulatie .....	27
<b>Figuur 5:</b> Gemiddelde frequentie van CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T-cellen in geïsoleerde CD4 <sup>+</sup> T-cellen .....	28
<b>Figuur 6:</b> De suppressieve capaciteit van CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs ten opzichte van CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> responder T-cellen bij gezonde controlepersonen en MS-patiënten .....	29
<b>Figuur 7:</b> De gemiddelde suppressieve capaciteit van CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs van gezonde controlepersonen (n=3), RR- (n=11) en SP-MS-patiënten (n=8) .....	30
<b>Figuur 8:</b> Proliferatie van CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> responder T-cellen in cocultuur met stijgende hoeveelheden CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-cellen bij gezonde controlepersonen en MS-patiënten .....	32
<b>Figuur 9:</b> Percentage relatieve suppressie bij gezonde controlepersonen, RR-MS-patiënten en SP-MS-patiënten .....	33
<b>Figuur 10:</b> Vergelijking van het percentage suppressie van proliferatie van CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> responder T-cellen, in cocultuur met stijgende hoeveelheden Tregs, tussen de [ <sup>3</sup> H] thymidine incorporatie test en de CFSE labelingsmethode.....	34
<b>Figuur 11:</b> Percentage tetanus toxoid reactieve CD4 <sup>+</sup> T-cellen bij verschillende T-cel concentraties op dag 7 en 10 .....	35
<b>Figuur 12:</b> Reactiviteit van CD4 <sup>+</sup> en CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-cellen van gezonde controlepersonen en een MS-patiënt tegen MBP, MOG of tetanus toxoid op dag 10 .....	36

<b>Figuur 13:</b> Cytokine profiel van CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-cellen van gezonde controlepersonen en MS-patiënten .....	37
<b>Figuur 14:</b> Vergelijking van ELISA en Quantity One software met betrekking tot analyse van de Vβ-gen expressie in CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> , CD25 <sup>low</sup> en CD25 <sup>high</sup> T-cellen .....	39
<b>Figuur 15:</b> Gemiddelde Vβ-gen expressie bij gezonde controlepersonen en MS-patiënten .	40
<b>Figuur 16:</b> Vergelijking van het gemiddelde Vβ-gen gebruik in de CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>low</sup> en CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> T-celpopulatie tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten .....	41

## Voorwoord

Op deze bladzijde wil ik even heel subjectief starten met mijn eigen ervaringen en gevoelens van de voorbije maanden waarin ik stage liep aan het Biomedisch onderzoeksinstituut te Diepenbeek, België. Het was een hele openbaring nu dan eindelijk al dat ‘blokken’ in daden te mogen omzetten en werkelijk ook bij te dragen aan wetenschappelijk onderzoek. Ik wil daarom graag een aantal personen van harte danken, zij waren namelijk de steunpilaren die mij al die tijd hebben bijgestaan in zowel het praktische als theoretische aspect van mijn stage.

Allereerst wil ik Prof. Dr. P. Stinissen danken omdat hij mij de mogelijkheid gaf immunologisch onderzoek te doen in zijn laboratoria, alsook daar mijn studie te vervolledigen aan de hand van een eindwerk. Onder zijn supervisie mocht ik maandenlang meedraaien met zijn bekwame staf in het belangrijk onderzoek naar Multiple Sclerose.

Ook Prof. Dr. J. Raus wil ik danken daar hij als mijn tweede beoordelaar de tijd vrijgemaakt heeft om mijn thesis kritisch te evalueren. Ook de reflectie bij aanvang van mijn stageperiode was een goede aanzet tot de eerste begrippen van MS-onderzoek.

Dr. R. Medaer (Biomed, Diepenbeek), Dr. B. D’Hooghe (MS-kliniek, Melsbroek) en Dr. B. Dubois (U.Z. Gasthuisberg, Leuven) wil ik bedanken voor het ter beschikking stellen van bloedstalen van MS-patiënten voor ons onderzoek. Maar natuurlijk ook een welgemeend dankjewel aan alle MS-patiënten die vrijwillig hun bloed hebben afgestaan en alzo een steentje bijdragen tot een beter begrip van MS.

Ik wil zeker mijn persoonlijke begeleider Koen Venken even in de schijnwerpers zetten. Koen, je begeleiding, steun en geduld bij het praktische werk alsook de theoretische ondersteuning zijn onontbeerlijk geweest om dit eindwerk tot een goed eind te brengen. Dank je voor het delen van je omvangrijke wetenschappelijke kennis, het waren soms zware dagen maar je mag jezelf een (bege)leider in hart en nieren noemen.

Mijn tweede begeleider Dr. Niels Hellings verdient ook een welgemeende dankjewel. Als echte ‘T-cel man’ kon ik bij hem steeds terecht wanneer ik twijfels had, op zowel praktisch als theoretisch vlak.

Voorts wil ik Mariëlle, Jerome, Igna, Kurt en mijn medestudenten bedanken voor alle hulp en steun tijdens de voorbije maanden.

Tenslotte wil ik graag de mensen danken die mij hebben zien evolueren in mijn opleiding tot licentiaatsstudent Biomedische Wetenschappen. Al die tijd hebben zij mij gesteund in mijn beslissingen, meegevochten in moeilijke tijden en even hard mee gelachen wanneer het me voor de wind ging. Dank je papa, mama, Souki, Esther, Koen, Kurt, Joren en Axel. Dankzij al deze mensen ben ik in mijn opzet geslaagd, namelijk een universitaire graad behalen waarin ik hoop een mooie toekomst uit te bouwen.



## Samenvatting

Multiple sclerose (MS) wordt gekenmerkt door een immuungemedieerde afbraak van de myelinelaag rondom de zenuwen in het centrale zenuwstelsel (demyelinisatie). Sinds enkele jaren is er vernieuwde aandacht gekomen voor de rol van regulatoire T-cellen in autoimmune ziekten, waarbij een belangrijke subpopulatie van CD4<sup>+</sup> T-cellen met constitutieve CD25 expressie (Tregs) een kritische functie vervult in de perifere immuuntolerantie. Echter zijn de ontwikkeling en functionele eigenschappen van deze cellen nog niet volledig opgehelderd zijn. Om betere inzichten te verkrijgen op vlak van de functionele capaciteiten alsook het TCR profiel van deze cellen in het perifere bloed, werden in deze studie de suppressieve eigenschappen en het V $\beta$ -gebruik van geïsoleerde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen bestudeerd. Er werd daarbij gekeken naar een verschil tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten (RR-MS of SP-MS).

Wat betreft frequentie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatoire T-cellen, werd er geen significant verschil gevonden tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten. In de meerderheid van RR-MS-patiënten werd een gereduceerde suppressorfunctie vastgesteld, dit in tegenstelling tot SP-MS-patiënten waar een suppressieve functie vergelijkbaar met gezonde controlepersonen werd vastgesteld. Twee methoden, [<sup>3</sup>H] thymidine incorporatie en CFSE labeling, werden hiervoor aangewend en beide bleken uiterst efficiënt voor de bepaling van het suppressie patroon van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen (Tregs). Myeline reactieve T-cellen, zijnde antigeen-specifiek voor MBP, MOG of TT als controle antigeen werden zowel in de CD4<sup>+</sup> als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-celpopulatie aangetoond van gezonde controlepersonen en MS-patiënten. De frequentie bij CD4<sup>+</sup> T-cellen was echter lager vergeleken met de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-celfrequentie. Dit is een indirecte indicatie dat Tregs in de CD4<sup>+</sup> T-celpopulatie autoreactieve antigeen responsen onderdrukken. MBP reactieve T-cellen van gezonde controlepersonen vertonen daarbij ook een Th0 cytokine profiel (zowel IFN- $\gamma$  als IL-4) terwijl in het perifer bloed van een MS-patiënt eerder T-cellen met een Th1 cytokine profiel (voornamelijk IFN- $\gamma$ ) voorkomen. V $\beta$ -gen expressie analyse van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD25<sup>low</sup> en CD25<sup>high</sup> T-cellen van enerzijds gezonde controlepersonen of MS-patiënten gaf indicaties dat de T-cellen bij alle donoren zeer divers waren in hun V $\beta$ -gen profielen. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen hadden een meer vergelijkbaar expressie profiel dan CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen wanneer geanalyseerd werd binnen en onderling tussen de studiegroepen. Mogelijk treedt een verstoring ter hoogte van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-celpopulatie op bij MS-patiënten.

Deze experimentele bevindingen geven aan dat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen een belangrijke rol spelen in de T-celgemedieerde responsen bij MS. Verder onderzoek is daarom aangewezen met het oog op de ontwikkeling van therapeutische strategieën voor autoimmune aandoeningen zoals MS.

## 1 Inleiding

Multiple Sclerose (MS) is een chronisch inflammatoire ziekte van het centrale zenuwstelsel (CZS). Het is één van de meest algemeen voorkomende neurologische aandoeningen waarbij vooral jonge volwassenen (20-40 jaar) getroffen worden. De prevalentie in de kaukasische bevolking bedraagt 0,05 – 0,13 % en de ziekte komt doorgaans twee keer zo frequent voor bij vrouwen dan bij mannen (1). MS wordt gekenmerkt door een immuungemedieerde afbraak van de myelinelag rondom de zenuwen in het centrale zenuwstelsel (demyelinisatie).

### 1.1 Multiple sclerose: klinische kenmerken

Klinische manifestaties van MS variëren van individu tot individu wat betreft de neurologische symptomen en de graad van invaliditeit. De meest voorkomende symptomen omvatten visuele en sensorische stoornissen, chronische of terugkerende verlamming, seksuele dyscapaciteit, vermoeidheid en hoofdpijnen en coördinatie- en andere neurologische stoornissen, die gepaard kunnen gaan met een cognitieve dysfunctie (2). MS kan ingedeeld worden in een aantal subtypes, al naargelang het ziektebeeld. Bij aanvang van de ziekte is dit enerzijds *relapsing-remitting* (RR-MS) of anderzijds *primary progressive* (PP-MS). RR-MS wordt gekarakteriseerd door periodes van terugval (*relapse*) die worden veroorzaakt door een actieve aanval, resulterend in een variërende graad van invaliditeit. Deze periodes worden afgewisseld met periodes van gedeeltelijk of volledig herstel (*remission*). Omdat de patiënten niet volledig kunnen herstellen van de aanvallen leidt dit tot accumulerende invaliditeit. Na verloop van tijd zal ongeveer één-derde van de RR-MS patiënten evolueren naar een progressieve vorm, gekend als *secondary-progressive* MS (SP-MS). PP-MS daarentegen gaat gepaard met een graduele verslechtering van de gezondheid van het individu vanaf het begin van de ziekte. Er is hier geen sprake van terugval en herstel (2).

### 1.2 Multiple Sclerose: pathologie

MS wordt gekarakteriseerd door multipele sclerotische lesies of plaques. Deze lesies zijn het resultaat van focaal verlies van myeline in het centrale zenuwstelsel en kunnen verspreid terug gevonden worden, maar bevinden zich hoofdzakelijk in de optische zenuwen en de witte stof van de periventriculaire regio, de hersenstam en het ruggenmerg (3,4). Actieve demyelinisatie gaat gepaard met een infiltratie van B-cellen, macrofagen met expressie van MHC klasse II (*major histocompatibility complex*) en geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-lymfocyten die verschillende pro-inflammatoire cytokines secreteren (5,6). Initieel worden de myelineproducerende

oligodendrocyten grotendeels gespaard, waardoor remyelinisatie kan optreden. In latere stadia worden de oligodendrocyten echter ook beschadigd. Dit leidt tot axonaal verlies en kan de voornaamste oorzaak zijn van aanhoudende neurologische stoornissen (3).

### **1.3 Multiple Sclerose: genetische achtergrond en etiologie**

Gevoeligheid voor MS wordt enerzijds door genetische factoren, en anderzijds door omgevingsfactoren bepaald. Bewijs voor de bijdrage van genetische factoren is afkomstig van familie- en tweelingenstudies. Het risico om MS te ontwikkelen is significant hoger bij eerste-graad familieleden. Aanvullend is er een verschil in klinische concordantie tussen monozygote tweelingen (31%) en dizygote tweelingen (5%) (7). De gedeeltelijke concordantie in monozygote tweelingen geeft aan dat niet één enkel gen maar meerdere genen en/of omgevingsfactoren bijdragen aan de gevoeligheid voor MS. Bij de zoektocht naar kandidaatgenen voor MS werd een associatie gevonden met de HLA-DR2 genen (HLA DRB1\*1501 en HLA DRB5\*0101) en DQA\*0102 en DQB\*0602 (8). Ook andere genetische factoren, die niet immunologisch van aard zijn, kunnen bijdragen.

De epidemiologie van MS gaat gepaard met een verhoogde incidentie van de ziekte naarmate de afstand van de evenaar toeneemt (9). Deze observaties ondersteunen de mogelijkheid van de overdracht van MS door een infectieus agens. Meerdere kandidaat virussen werden geëvalueerd voor een mogelijke causale associatie met MS, maar wegens controverse en tekort aan specificiteit kon tot op heden geen éénduidige correlatie vastgesteld worden (2). Het gebrek aan harde bewijzen geeft echter geen uitsluiting voor het belang van deze virussen bij de MS pathologie.

### **1.4 Immunopathogenese van Multiple Sclerose: huidige hypothese**

Bewijs voor de mogelijke autoimmune aard van MS wordt indirect geleverd door het experimentele autoimmune encefalomyelitis (EAE) diermodel. De T-cel infiltratie die in het CZS bij deze ziekte optreedt, kent vele gelijkenissen met de pathologische observaties van MS (10). In bepaalde diermodellen treedt ook een focale demyelinisatie op, maar dit wordt niet in alle experimentele modellen bevestigd. EAE kan geïnduceerd worden door een injectie van immunodominante epitopen van myeline antigenen, zoals ‘*myelin basic protein*’ (MBP), ‘*myelin oligodendrocyt protein*’ (MOG), ‘*proteolipid protein*’ (PLP) of een adoptieve transfer van myeline reactieve CD4<sup>+</sup> T-cellen naar naïeve recipiënten (4,10,11).

Bij zowel MS-patiënten als gezonde controles kunnen myeline reactieve T-cellen uit het bloed geïsoleerd worden. Dit wijst erop dat autoreactieve T-cellen deel uitmaken van het normale T-

celrepertoire (12,13,14). Deze cellen moeten echter eerst in de periferie geactiveerd worden vooraleer ze naar het CZS kunnen migreren en daar schade kunnen aanrichten. In verschillende studies is reeds aangetoond dat de frequentie van geactiveerde myeline reactieve T-cellen verhoogd is in MS-patiënten (15,16). Hiervoor kunnen verschillende oorzaken aan de basis liggen. Enerzijds kunnen virale epitopen, die homologie vertonen met myeline antigenen van het CZS, leiden tot een ongewenste kruisreactie/-activatie van myeline reactieve T-cellen (*'molecular mimicry'*) (17). Anderszijds is een activatie via bacteriële of virale superantigenen ook mogelijk. Hierbij worden MHC klasse II moleculen gekoppeld aan een specifiek T-cel receptor (TCR) V $\beta$  segment, zodat de T-cel wordt geactiveerd ongeacht zijn antigeen specificiteit (18). Maar ook hoge concentraties van cytokines die gesecreteerd worden bij een immuunrespons na infectie, kunnen op een niet-specifieke manier autoreactieve T-cellen activeren (*'bystander activation'*) (19). Klonale T-cel expansie en transport via de bloedbaan gaan vooraf aan een migratie doorheen het epitheel van de bloedhersenbarrière, bevorderd door de expressie van adhesiemoleculen op het epitheel en geactiveerde T-cellen, alsook de secretie van pro-inflammatoire cytokines door de geactiveerde T-cellen (20). Initieel triggert vaak slechts één myeline antigeen het ontstaan van MS. In het verdere verloop van de ziekte wordt echter ook autoreactiviteit tegen andere myeline antigenen/epitopen aangetoond (21). Dit wordt *'determinant/epitope spreading'* genoemd en wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een aanhoudende demyelinisatie leidende tot het vrijkomen van eerder niet-beschikbare myeline antigenen/epitopen. Zo wordt het inflammatoire proces in stand gehouden terwijl de ziekte progressie aanhoudt. Wanneer de myeline reactieve T-cellen het CZS binnentreden worden zij gereactiveerd zodra zij in contact komen met hun specifieke myeline epitopen gepresenteerd door lokale antigeen presenterende cellen (APC's) zoals microgliacellen of perivasculaire macrofagen (22). Vervolgens ontstaat een productie van inflammatoire cytokines zoals tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), alsook adhesiemoleculen op het epitheel van de bloedhersenbarrière. Hierdoor kunnen T- en B-cellen en macrofagen het CZS verder infiltreren, met andere woorden de inflammatoire respons uitbreiden met extensieve demyelinisatie als eindresultaat. De cytokines die door reactieve T-cellen van MS-patiënten worden gesecreteerd, zijn eerder pro-inflammatoir van aard. IFN- $\gamma$  induceert de opregulatie van MHC klasse II op microglia, leidend tot een verhoogde presentatie van CZS antigenen en heeft directe dodende effecten op myelineproducerende oligodendrocyten (23). Van TNF- $\alpha$  werd aangetoond dat dit cytokine een demyeliniserende capaciteit bezit en in verhoogde concentratie aanwezig is in MS-plaques. Deze cytokines werken inflammatie-bevorderend en dragen daardoor bij aan de

vicieuze cirkel van autoimmune respons (2).

### **1.5 Autoimmunitet: pathogene immuunreacties tegen lichaamseigen substanties**

Autoreactieve T-cellen, specifiek voor verschillende myelinecomponenten, blijken zeer belangrijk in de MS immunopathogenese. Eerdere bevindingen geven aan dat er een verstoring optreedt in de tolerantie voor die bepaalde lichaamseigen substanties. Normaal zijn er een aantal processen actief die de immunologische tolerantie voor lichaamseigen antigenen in stand houden. Tijdens de ontwikkeling van T-cellen in de thymus gebeurt initieel een klonale deletie van autoreactieve T-cellen. In een eerste fase zullen enkel de thymocyten, die lichaamseigen MHC herkennen, kunnen overleven via de TCR-MHC signalisatie (positieve selectie). Vervolgens zullen T-cellen met hoge-affiniteitsreceptoren, voor eigen MHC alleen of eigen antigenen gepresenteerd door eigen MHC, geëlimineerd worden via apoptose (negatieve selectie). Hierdoor worden T-cellen gegenereerd die 'zelf tolerant' zijn, met andere woorden een onderscheid kunnen maken tussen lichaamseigen en lichaamsvreemde antigenen (24).

Deze selectie is echter niet absoluut daar er in de periferie ook autoreactieve T-cellen voorkomen. Ondanks die aanwezigheid komt autoimmunitet slechts zelden voor. Zodoende dragen andere mechanismen verder bij tot de immunologische zelf-tolerantie in de periferie, zoals inductie van anergie en *immunological ignorance*. Daarnaast worden deze vormen van passieve suppressie ook bijgestaan door actieve suppressie, uitgeoefend door regulatoire T-cellen. Er zijn verschillende subtypen regulatoire T-cellen die suppressie op verschillende niveaus uitoefenen (zie tabel 1). De samenwerking en onderlinge verbanden tussen de verschillende natuurlijke en niet-natuurlijke subtypes kunnen daarbij essentieel zijn voor de actieve en dominante controle van autoreactieve T-cellen (25). Indien deze mechanismen suboptimaal functioneren, zou dit kunnen leiden tot een verminderde suppressie van autoreactieve T-cellen en mogelijk autoimmunitet. In deze thesis zal de aandacht uitgaan naar natuurlijk voorkomende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen (Tregs). De eigenschappen die aan deze cellen worden toegekend, en daarmee hun functionele relevantie, kunnen een verder inzicht geven in de rol die deze Tregs spelen in de pathogenese van MS.

**Tabel 1:** Overzicht van de verschillende subtypes regulatoire T-cellen

Subtype Regulatoire T-cel	FOXP3-expressie	Belangrijkste eigenschappen	Cytokine secretie	Referentie
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-cel	+	Van nature anergisch	IL-10, TGF- $\beta$	(26)
T <sub>R</sub> 1 cel	-	Anergie geïnduceerd door IL-10	Vooraf IL-10, minder TGF- $\beta$	(27)
T <sub>H</sub> 3 cel	-	Anergie geïnduceerd door orale administratie van antigeen	TGF- $\beta$	(28)
NK T-cel	-	Invariabele TCR: V $\alpha$ 24JQV $\beta$ 11 MHC restrictie: CD1D	IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$	(29)
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-cel	+	Van nature anergisch	IL-10, TGF- $\beta$	(30)

T<sub>R</sub>1 cel: regulatoire T-cel type 1; T<sub>H</sub>3 cel: T helper type 3 cel; NK T-cel: *natural killer* T-cel; IL-10: interleukine 10; TGF- $\beta$ : *transforming growth factor*  $\beta$ ; IL-4: interleukine 4; IFN- $\gamma$ : interferon  $\gamma$ ; FOXP3: forkhead-box P3; TCR: T-celreceptor; MHC: *major histocompatibility complex*; CD: *cluster of differentiation*

### 1.6 Natuurlijk voorkomende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen

Experimenteel bewijs voor het bestaan van Tregs met autoimmuun-inhibitorische activiteit werd reeds naar voren gebracht in verschillende diermodellen voor autoimmune ziekten. Algemeen werd vastgesteld dat normale gezonde dieren meerdere subpopulaties van CD4<sup>+</sup> T-cellen bezitten. Twee functioneel verschillende populaties zijn echter zeer belangrijk, één populatie kan verantwoordelijk zijn voor de inductie van autoimmune ziekte en de andere populatie staat in voor de dominante inhibitie van autoimmunitet. De regulatoire CD4<sup>+</sup> T-cellen werden geïdentificeerd door hun expressie van de IL-2 receptor- $\alpha$  keten (CD25). In experimentele diermodellen met muizen en ratten werd de thymus van deze proefdieren verwijderd (thymectomie) en ten gevolge hiervan ontwikkelden de dieren systemisch autoimmune aandoeningen op neonatale dag 3. Verschillende experimenten toonden aan dat de depletie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen verantwoordelijk was voor het optreden van ziekte in deze muizen. Ook de transfer van geïsoleerde autoreactieve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen in een 'naakte' muis bleek voldoende voor de inductie van autoimmune ziektes (31). Cotransfer van CD25<sup>+</sup> Tregs met de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen voorkwam de ontwikkeling van experimenteel geïnduceerde autoimmune ziektes zoals colitis, gastritis, insuline-afhankelijke autoimmune

diabetes en thyroiditis (32,33). Dit gaf aan dat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen de responsen van autoreactieve T-cellen *in vivo* onder controle kunnen houden (34). Recent werden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen ook bestudeerd in humaan perifere bloed en werden voor deze T-cellen gelijkaardige eigenschappen beschreven als voor de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen in de muis.

### **1.6.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen vertonen een unieke anergische eigenschap**

Om functioneel actief te zijn, moeten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen antigene stimulatie via de TCR krijgen. Zelf zijn ze echter niet-proliferatief of anergisch en deze anergie is gelinkt aan hun suppressieve functie *in vitro*. TCR stimulatie in aanwezigheid van hoge concentraties IL-2 of CD28 ligatie leidt immers tot het doorbreken van deze anergie met als gevolg verlies aan suppressieve capaciteit (35). Bij *in vivo* diermodellen leidt het verlies van suppressieve capaciteit tot autoimmune aandoeningen. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen bekomen terug hun anergische toestand vanaf het ogenblik dat costimulatie door IL-2 of CD28 opgeheven wordt. Dit onderscheidt hen van andere anergische of regulatoire T-cellen (36,37).

### **1.6.2 Suppressiemechanismen van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen**

Uit verschillende *in vitro* studies werd de suppressieve functie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen afgeleid. Wanneer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen in cocultuur worden gebracht met CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen in aanwezigheid van APC's en na antigene stimulatie, werd de proliferatie/activatie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen dosis-afhankelijk onderdrukt (38). Verdere analyses identificeerden de volgende karakteristieken van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-celgemedieerde suppressie:

- **TCR stimulatie en niet-specifieke suppressie**

TCR stimulatie is voor de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen een vereiste om suppressie te kunnen uitvoeren. Deze stimulatie kan daarbij zowel antigeen specifiek als polykonaal verlopen, maar irrelevante antigenen kunnen geen suppressie mediëren. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen kunnen dus lichaamseigen antigenen herkennen zodat pathogene autoreactieve T-cellen gecontroleerd worden. Deze herkenning door CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen is veel gevoeliger vergeleken met herkenning door naïeve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen met dezelfde antigeen specificiteit. Zeer lage concentraties aan antigeen zijn reeds voldoende om CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen te triggeren tot suppressieve activiteit (35). Vermoedelijk is de hoge expressie van accessoire moleculen en de wijze van signaaltransductie deels verantwoordelijk voor deze sensitiviteit (38). Eénmaal de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen

gestimuleerd werden met een specifiek antigeen, is de suppressor effector functie van deze cellen volledig niet-specifiek. Ook T-cellen, specifiek voor andere antigenen, kunnen dan onderdrukt worden (*bystander suppression*) (39).

**• Noodzaak van cel-celcontact voor suppressie en de mogelijke rol van suppressieve cytokines**

Regulatoire T-celgedieerde *in vitro* suppressie is afhankelijk van direct celcontact tussen de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen en de target T-responder cellen in aanwezigheid van APC's. Uit verschillende experimenten is gebleken dat er geen suppressie van de responder celpopulatie optreedt wanneer de beide populaties gescheiden worden door een semipermeabele membraan (35).

Suppressie door regulatoire T-cellen kan ook gemedieerd worden door op-afstand-werkende cytokines. De rol van deze immunoregulatoire cytokines varieert afhankelijk van het experimentele model (*in vitro* of *in vivo*). De *in vivo* blokkade van IL-10 signalering met een anti-IL-10 receptor monoklonaal antilichaam neutraliseerde de suppressie door regulatoire T-cellen en dit resulteerde in de ontwikkeling van autoimmunitet (40). Tegenstrijdige studies (zowel op diermodel als op humaan niveau) duiden erop dat IL-10 geen essentiële rol speelt in het *in vitro* suppressie mechanisme van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen.

De rol van TGF-β in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cel gemedieerde suppressie is eveneens controversieel (38). *In vivo* blokkade van regulatoire T-celfunctie kan bereikt worden door toediening van anti-TGF-β monoklonale antilichamen. Sommige experimenten wijzen daarbij op een rol voor een membraangebonden TGF-β (41). Deze bevindingen werden echter nog niet bevestigd in onafhankelijke studies. Andere experimenten melden dat suppressie niet doorbroken kan worden door de toediening van anti-TGF-β monoklonale antilichamen. Dit kan een aanduiding zijn voor de samenwerking en dus rol van meerdere oplosbare factoren bij suppressie door CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen (42).

De controverse rond de rol van cel-celcontact en/of suppressieve cytokines kan mogelijk verklaard worden aan de hand van de volgende hypothese: *in vitro* geldt als consensus dat suppressie door natuurlijk voorkomende Tregs een contact-afhankelijk, cytokine-onafhankelijk mechanisme is waarin IL-10 en TGF-β geen essentiële rol spelen. De situatie *in vivo* is echter veel gecompliceerder en immunosuppressieve cytokines zoals IL-10 en TGF-β, geproduceerd door (andere) natuurlijke of geïnduceerde regulatoire T-cellen, kunnen een belangrijke bijdrage hebben in het onderdrukken van potentiële autoreactieve T-cellen.



- **Inhibitie van IL-2 productie**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen zijn in staat om de IL-2 productie door de responder T-cel populatie te inhiberen en zijn zelf niet in de mogelijkheid IL-2 te produceren. Inhibitie van IL-2 in effector cellen zou een mogelijk mechanisme kunnen zijn waarmee CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen hun suppressieve functie ten opzichte van deze cellen uitoefenen. Indicaties hiervoor zijn het waargenomen verlies van suppressie wanneer hoge concentraties IL-2 worden toegevoegd (35,43).

- **Downmodulatie van APC factoren**

Celinteracties met CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen, zoals competitie voor APC's en specifieke MHC/peptide antigeen complexen, kunnen bijdragen aan de suppressie door deze Tregs. APC's zijn daarbij echter niet direct noodzakelijk voor het overbrengen van de suppressie (44,45). Regulatoire T-cellen kunnen eventueel APC functies downmoduleren en op deze manier de activatie van autoreactieve T-cellen inhiberen. Zo werd aangetoond dat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen de expressie niveaus van CD80 en CD86 op dendritische cellen onderdrukken (46). Een andere studie daarentegen demonstreerde dat suppressie niet kon worden teniet gedaan indien pre-geactiveerde APC's werden toegevoegd en dat expressie van CD80 en CD86 op de APC's onveranderd bleef in aanwezigheid van Tregs. Dit zou kunnen betekenen dat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen niet competitief of inhiberend zijn voor co-stimulatie. Verder onderzoek is noodzakelijk om duidelijkheid te leveren over de interactie van Tregs met APC's (39).

### 1.6.3 Belangrijke merkers van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen

- **De specificiteit van CD25 als merker voor natuurlijk voorkomende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen**

CD25 wordt als merker gebruikt voor de identificatie van Tregs maar de analyse van deze T-cellen verloopt niet probleemloos. Er zijn significante verschillen in de expressie van de hoge affiniteit IL-2 receptor  $\alpha$ -keten, CD25, op humane of muis T-cellen. In de naïeve muis vormen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen een distincte cel populatie die goed onderscheiden kan worden van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen en ongeveer 10 % van de CD4<sup>+</sup> T-cel populatie bedraagt. In de muis, die reeds contact heeft gehad met antigeen, en de mens is er daarentegen geen duidelijk te onderscheiden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cel populatie. CD25 wordt namelijk in verschillende

intensiteiten tot expressie gebracht omdat dit geïnduceerd wordt na activatie van conventionele T-cellen. Verschillende studies tonen aan dat enkel de CD4<sup>+</sup> T-cellen met een zeer hoge expressie van CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) een sterke regulatoire functie bezit in de mens (47). Er is nog steeds onzekerheid over het feit of CD25 onmisbaar is voor het behoud van natuurlijk voorkomende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen in het immuunsysteem. Er wordt verondersteld dat IL-2 essentieel is voor ontwikkeling, behoud en functie van natuurlijk voorkomende regulatoire T-cellen, daarin kan CD25 als component van de hoge affiniteit IL-2R dus ook een belangrijke rol spelen. Maar dit betekent niet dat regulatoire T-cellen gebonden zijn aan CD25-expressie, er zijn namelijk bevindingen die aantonen dat ook cellen in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-celpopulatie in normale naïeve dieren zowel *in vivo* als *in vitro* suppressie kunnen uitoefenen (zie tabel 1) (48). Tot heden blijft CD25 de beste merker om CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen te identificeren, maar de zoektocht naar een oppervlakte molecuule dat specifiek regulatoire T-cellen kan onderscheiden van geactiveerde T-cellen gaat onverminderd voort.

- **Foxp3: een gen gelinkt aan de ontwikkeling en functie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen**

Recent werd het belang van de transcriptiefactor forkhead-box P3 (*FOXP3*) voor regulatoire CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen aangetoond. Het wild type *foxP3* proteïne (*scurfin*) bestaat uit een zinkvinger domein, een leucine zipper motief, een DNA bindend *FORKHEAD* domein en functioneert als een transcriptionele repressor in T-cellen (49). In muizen leidden mutaties in het *foxP3* gen tot het 'scurfy' fenotype, een fatale X-gelinkte recessieve ziekte, gekarakteriseerd door hyperactieve T-cellen en multi-orgaan autoimmune manifestaties. Een soortgelijk syndroom werd teruggevonden in IPEX (immuundysregulatie, polyendocrinopathie, enteropathie en X-gelinkte overerving) patiënten die mutaties vertoonden in het humane homologe gen, *FOXP3*. Depletie van Tregs gaf grote gelijkenissen, wat betreft het ziektebeeld, met *foxP3*-mutaties in *scurfy* muizen(42). Verschillende studies toonden aan dat *FOXP3* een essentiële rol speelt in Treg ontwikkeling en functie, en voorzagen zo een directe correlatie tussen een autoimmuun diermodel, een defect van regulatoire T-cellen en een humane autoimmune ziekte (34). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen vertonen een dominante expressie van *FOXP3* mRNA. Niet tegenstaande toonden kleine populaties van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen en CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen een lage *FOXP3*-expressie. Opmerkelijk was dat deze laatste cellen daarbij een regulatoire functie hadden. *FOXP3*-expressie kon niet geïnduceerd worden door polyklonale activatie van conventionele CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen, alhoewel dit recent werd tegengesproken voor humane cellen (50). Retrovirale transductie van *foxP3* in naïeve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen gaf wel oorsprong aan CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoir

gelijkende T-cellen in een diermodel. Deze cellen, die nu zowel CD25 expressie vertonen als in grote aantallen aanwezig waren, bleken ook in staat om *in vitro* andere T-cellen te onderdrukken en *in vivo* de ontwikkeling van autoimmuune ziekte te inhiberen. *FOXP3* blijkt dus een meester controlegen te zijn voor de ontwikkeling en functie van natuurlijk voorkomende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen (42).

- **De rol van CTLA-4 en CD28 in regulatoire T-celactivatie**

Costimulatie via CD28 stimuleert naïeve T-cellen tot IL-2 productie en cexpansie, maar voorkomt ook anergie inductie en celdood. *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4* (CTLA-4) daarentegen komt tot expressie na T-celactivatie en geeft een negatief signaal aan geactiveerde T-cellen zodat T-celresponsen worden afgezwakt.

CD28 signalering aan regulatoire T-cellen is niet vereist voor hun activatie maar zorgt voor het teniet doen van de anergische en suppressieve toestand. CD28 speelt wel een essentiële rol in de productie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen in de thymus en misschien ook in de perifere homeostase, aangezien CD28-deficiënte muizen een gereduceerde frequentie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen in de periferie vertonen (51). In tegenstelling tot naïeve T-cellen hebben CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen een constitutieve expressie van intracellulair en/of extracellulair CTLA-4. Volgens de resultaten van verschillende studies speelt CTLA-4 een cruciale rol in regulatoire T-celmedieerde suppressie. Behandeling met anti-CTLA-4 monoklonale antilichamen inhibeert de functie van regulatoire T-cellen *in vitro*. Andere studies hebben dit echter niet kunnen bevestigen. Er werd eveneens aangetoond dat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen van CTLA-4 deficiënte muizen suppressie kunnen mediëren. De exacte rol van CTLA-4 in T-cel gemedieerde suppressie dient dus nog te worden bepaald (38). De interpretatie van de *in vitro* en *in vivo* effecten van anti-CTLA-4 antilichamen wordt bemoeilijkt omdat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen ook CTLA-4 tot expressie brengen wanneer TCR stimulatie heeft plaatsgevonden (52). Mogelijk bindt CTLA-4 B-7 moleculen op APC's omwille van een hogere affiniteit waardoor CD28-gemedieerde signalen, die normaal suppressie door regulatoire T-cellen inhiberen, nu niet kunnen plaatsvinden (53).

Samenvattend versterken signalen via CD28 aan naïeve T-cellen en regulatoire T-cellen immuunresponsen door de activatie van naïeve T-cellen en een verzwakking van regulatoire T-celgemedieerde suppressie. Signaaltransductie via CTLA-4 induceert een negatief signaal aan geactiveerde T-cellen en mogelijk een activerend signaal aan CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen. Deze synergistische effecten spelen een rol in de suppressie door regulatoire T-cellen (38).

- **De rol van GITR in regulatoire T-celfunctie**

*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene* (GITR) werd geïdentificeerd als een merker die constitutief tot expressie wordt gebracht op natuurlijk voorkomende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen. Maar zoals zovele kandidaatmerkers voor regulatoire T-cellen treedt er ook expressie op bij CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen wanneer deze geactiveerd worden. Verminderde suppressie door Tregs leidde tot een inductie van autoimmune ziekte en een versterkte proliferatie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen. Vooreerst werd verondersteld dat een signaal via GITR de capaciteit tot suppressie door CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen afzwakte, maar additionele studies geven nu aan dat ligatie van GITR op geactiveerde T-cellen hun resistent maakt voor suppressie, met andere woorden de responsiviteit van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> targetcellen verandert (54). De complementaire ligand voor GITR wordt tot expressie gebracht op APC's maar wordt neergereguleerd tijdens APC maturatie zodat interacties geminimaliseerd worden (42).

- **Andere accessoire moleculen op CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen**

Natuurlijk voorkomende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen vertonen een constitutieve expressie van een variëteit aan celoppervlakte moleculen. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen zijn CD45RB<sup>low</sup>, CD44<sup>high</sup>, CD5<sup>high</sup>, CD54<sup>high</sup> (ICAM [*intracellular cell adhesion molecule*]-1), CD11a/CD18<sup>high</sup> (LFA [*leukocyte function-associated antigen*]-1), grotendeels CD62L<sup>low</sup> [L-selectine]. Het merendeel van de cellen vertoont een geheugen fenotype (CD45RO<sup>+</sup> en CD45RA<sup>-</sup>) en toont ook expressie van CD103 (integrine  $\alpha$ E-B7) (38,42,47,52). Dit expressieprofiel suggereert dat regulatoire T-cellen in de normale endogene omgeving een voortdurende stimulatie ondervinden van eigen antigenen. Ook de expressie van chemokine of homing receptoren kunnen een rol spelen bij de migratie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen naar antigeen-presenterende plaatsen of naar plaatsen van inflammatie en weefselschade zodat fysiologische en pathologische immunresponsen effectief gecontroleerd kunnen worden (38).

Omwille van onduidelijkheden in de rol van CTLA-4 en ook andere moleculen of 'pathways' wordt verondersteld dat regulatoire T-cellen multiple protectieve mechanismen gebruiken ter inhibitie van immunactivatie. *In vivo* is de bijdrage van deze verschillende suppressieve mechanismen onderhevig aan de lokale omgeving van het targetorgaan en ook aan de pathologische immunrespons waarvoor inhibitie vereist is (55).

Een overzicht van de eigenschappen van muis en humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen

wordt weergegeven in tabel 2, hierin worden kort alle mogelijke suppressieve mechanismen, alsook merkers voor deze cellen vergeleken tussen de muis en de mens.

**Tabel 2:** Overzicht van de eigenschappen van muis en humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen

<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cel eigenschappen</b>	<b>Muis</b>	<b>Humaan</b>
<b>Algemeen:</b> 5-15% van de CD4 <sup>+</sup> T-cel populatie	+	+
Anergisch	+	+
Suppressief	+	+
<b>Suppressieve Mechanismen:</b> Activatie via TCR	+	+
Antigeen-specifieke suppressie	-	-
Cel-celcontact vereist	+	+
Modulatie van APC's	+/-	-
Inhibitie van IL-2 productie	+	+
CTLA-4	+/-	+/-
Rol van suppressieve cytokines:		
<i>in vitro</i> : IL-10	+/-	+/-
TGF-β	+/-	-
<i>in vivo</i> : IL-10	+	NT
TGF-β	+	NT
<b>Merkers:</b> Foxp3/FOXP3	+	+
Constitutieve expressie van CD25	+	+
CTLA-4	+	+/-
GITR	+	+
CD45RO	+	+
CD45RA	-	-
CD45RB low	+	+

TCR: T cel receptor; APC: antigeen presenterende cel; IL-2: Interleukine-2; CTLA-4: cytotoxic T lymfocyt antigeen; IL-10: Interleukine-10; TGF-β: *transforming growth factor*-β; GITR: *glucocorticoid- induced tumor necrosis factor receptor family-related gene*; NT: niet toepasbaar.

#### 1.6.4 Ontwikkeling en antigeen-specificiteit van regulatoire CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen

Natuurlijk voorkomende Tregs worden door de thymus geproduceerd als een functioneel distincte en mature subpopulatie van T-cellen. Ze verblijven in de periferie waarbij hun functie nauwkeurig wordt uitgevoerd en hun vorming deels tijdens de ontwikkeling wordt

bepaald. De thymische ontwikkeling van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen vereist unieke interacties van de TCR met eigen peptide/MHC complexen gepresenteerd door thymische stromale cellen. De TCR moet daarbij een intermediaire affiniteit hebben voor eigen lichaamssubstanties. De vereiste affiniteit is te laag voor negatieve selectie maar hoger dan deze van conventionele T-cellen met als resultaat de niet-responsieve en suppressieve eigenschappen van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen (56) (57).

De relatief hoge affiniteitsinteractie, samen met het grote aantal antigenen dat gepresenteerd kan worden in de thymus, doet vermoeden dat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen een grote antigeen specificiteit bezitten (58). Zo werd aangetoond dat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen daarbij even divers zijn als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen wat betreft het gebruik van TCR V $\alpha$ - en  $\beta$ -keten gen subfamilies (59). Omwille van de hogere affiniteitsreacties zijn Tregs veel reactiever met de specifieke peptide/MHC complexen zodat zo hun rol ter dominante controle van verschillende reponsen tegen eigen, maar ook vreemde antigenen verzekerd wordt (38).

### **1.6.5 Multiple sclerose en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen**

Recente studies leveren bewijzen dat Tregs betrokken zijn in de suppressie van autoreactieve T-cellen in autoimmunitet. Het is echter belangrijk een onderscheid te maken tussen hetzij een deficiëntie wat betreft het aantal Tregs in de periferie, of eerder een volledig of gedeeltelijk verlies van functie. Recent onderzoek in het LUC-BIOMED toonde aan dat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen een verminderde suppressie capaciteit vertoonden bij *relapsing-remitting* multiple sclerose patiënten in vergelijking met gezonde controles. Deze deficiëntie in functie werd niet teruggevonden in patiënten met chronisch progressieve MS (25). Deze resultaten sloten aan bij een eerder uitgevoerde studie waarin ook een verminderde Treg-functie werd waargenomen bij *relapsing-remitting* MS-patiënten (60). De verminderde suppressie kon daarbij teruggebracht worden op een defect in de Treg-populatie en niet op een niet-responsiviteit van de responder T-cel populatie. Mogelijk verband houdend met de verminderde functie van Tregs, is een significant gereduceerd FOXP3 mRNA-niveau in Tregs van *relapsing-remitting* MS-patiënten (25). Dit zou kunnen aangeven dat een gereduceerde expressie FOXP3 in MS-patiënten de immunoregulatie kan beïnvloeden en dus gecorreleerd is aan de suppressieve functie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen. Verder onderzoek is echter noodzakelijk om de exacte rol van Treg defecten in MS te achterhalen.

### 1.7 Het doel van deze thesis

Deze stage heeft tot doel om na te gaan of Tregs van MS-patiënten en gezonde controles in staat zijn om autoantigeen reactieve T-celresponsen, met name tegen MBP of MOG, te onderdrukken. Deze autoreactieve T-celresponsen vormen mogelijk een belangrijk onderdeel van de huidige hypothese die heerst over de immunopathologie van MS.

Via een negatieve selectiemethode worden CD4<sup>+</sup> T-cellen geïsoleerd uit perifere bloed van gezonde controles en MS-patiënten, waaruit vervolgens CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen met behulp van magnetische beads positief geselecteerd worden. Eerst wordt de functie van Tregs, met name hun suppressieve eigenschap, bepaald aan de hand van cocultuur experimenten. Vaste hoeveelheden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen worden daarbij in cocultuur gebracht met variërende hoeveelheden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen. Proliferatie van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen wordt na 5 dagen gemeten door een klassieke [<sup>3</sup>H] thymidine incorporatie assay. Een alternatieve methode behelst het labelen van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen met CF(DA)SE (carboxy fluoresceïne diacetaat succinimidyl ester). De voordelen van deze techniek ten opzichte van de eerder vermelde [<sup>3</sup>H] thymidine incorporatie assay zijn onder andere, het specifiek bepalen van de proliferatie van Ag-reactieve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen door middel van flowcytometrie zodat ongelabelde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen niet kunnen interfereren in de interpretatie van de resultaten. Een CFSE-gebaseerde assay is ook veel gevoeliger. Responsen tegen lage antigeenconcentraties, die niet door [<sup>3</sup>H] thymidine opname zullen gedetecteerd worden, kunnen nu wel aangetoond worden. In deze thesis worden beide technieken aangewend om de proliferatie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen en daarmee samenhangende de suppressie uitgeoefend door CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen te evalueren.

Voor de detectie van Ag-specifieke T-cellijnen in PBMC, voor en na depletie van Tregs, worden CFSE gelabelde CD4<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen parallel in cultuur gebracht met bestraalde, autologe perifere bloed mononucleaire cellen (PBMC) die vooraf gepulst werden met MPB, MOG of tetanus toxoid (TT) als controle antigeen. Na 7 en 10 dagen cultuur wordt de proliferatie van de responder T-cellen gemeten met behulp van flowcytometrie (FACS). Indien de frequentie van de Ag-specifieke reactieve T-cellijnen hoger is in afwezigheid van Tregs geeft dit een sterke indicatie dat Tregs betrokken zijn bij de suppressie van Ag-specifieke reactieve T-cellijnen.

Voor de analyse van het Vβ-gen profiel van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen (onderverdeeld in CD25<sup>low</sup> en CD25<sup>high</sup>) wordt de expressie van 21 Vβ-genen bepaald door middel van *Polymerase Chain Reaction-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (PCR-ELISA). Indien bepaalde Vβ-genen overgerepresenteerd zijn, kan dit mogelijk een aanwijzing

zijn voor een verstoring van het V $\beta$ -gen gebruik. Een verschil in V $\beta$ -gen expressie profiel van de verschillende celpopulaties intra-individueel of een verschil in V $\beta$ -gen expressie profiel tussen gezonde controles en MS-patiënten zou verdere duidelijkheid kunnen geven over de perifere samenstelling van responder T-cel en Treg populaties in gezonde controles en MS-patiënten.

Bevindingen van verschillen in zowel het aantal natuurlijk voorkomende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen als de functionaliteit van deze cellen tussen gezonde controles en MS-patiënten kan mogelijk bijdragen tot de ontwikkeling van betere behandelingen in de strijd tegen MS.



## 2 Materiaal en methoden

### 2.1. MS-patiënten en gezonde controlepersonen

Perifere bloedstalen werden verzameld van 23 MS-patiënten en 7 gezonde controlepersonen. De karakteristieken van de donoren staan vermeld in tabel 3. Elf patiënten (gemiddelde leeftijd 42, range 24-57) vertoonden een *relapsing-remitting* ziektepatroon (RR-MS; gemiddelde EDSS van 2) en 9 patiënten (gemiddelde leeftijd 54, range 45-62) vertoonden een secundair progressief ziektepatroon (SP-MS; gemiddelde EDSS van 6). MS-patiënten waren ten tijde van bloedafname onbehandeld of behandeld met IFN- $\beta$ , zoals vermeld in tabel 3. Gezonde controlepersonen hadden een gemiddelde leeftijd van 33 jaar (range 24-45). Alle donoren gaven toestemming tot het gebruik van perifeer bloed voor wetenschappelijke doeleinden.

**Tabel 3:** Karakteristieken van MS-patiënten en gezonde controlepersonen

Individu	Geslacht	Leeftijd	MS-type <sup>a</sup>	Ziekte duur (jaar)	EDSS <sup>b</sup>	Behandeling <sup>c</sup>	Relapsen <sup>d</sup>
MS-Patiënten							
MS1	M	38	RR	1	0	-	1
MS2	V	51	RR	3	1,5	-	2
MS3	V	26	RR	6	4	IFN- $\beta$	2
MS4	M	35	RR	7	1,5	-	1
MS5	M	35	RR	2	2	-	2
MS6	V	52	RR	8	2,5	-	2
MS7	V	57	RR	21	2	-	1
MS8	V	57	RR	25	2	-	1
MS9	V	44	RR	6	3,5	-	2
MS10	V	40	RR	10	2,5	IFN- $\beta$	1
MS11	M	44	RR	5	2	-	1
MS12	V	59	SP	14	5	-	0
MS13	V	54	SP	9	6	IFN- $\beta$	0
MS14	V	62	SP	28	7,5	-	1
MS15	M	56	SP	20	6,5	-	1
MS16	V	45	SP	13	2	IFN- $\beta$	0
MS17	V	54	SP	16	2	-	0
MS18	M	50	SP	28	9	-	0
MS19	V	48	SP	16	8,5	-	0
MS20	V	51	RR	11	1	-	3
MS21	M	33	RR	10	1	-	1

MS22	V	24	RR	3	2	-	3
MS23	V	56	SP	25	8	-	0
Gezonde controlepersonen							
HC1	M	29	NT	NT	NT	NT	NT
HC2	V	33	NT	NT	NT	NT	NT
HC3	V	29	NT	NT	NT	NT	NT
HC4	V	24	NT	NT	NT	NT	NT
HC5	V	45	NT	NT	NT	NT	NT
HC6	M	45	NT	NT	NT	NT	NT
HC7	M	24	NT	NT	NT	NT	NT

<sup>a)</sup> MS-type: RR = relapsing-remitting, SP = secondary progressive, NT: niet toepasbaar

<sup>b)</sup> EDSS: Expanded Disability Status Score

<sup>c)</sup> Behandeling tijdens de laatste 3 maanden voorafgaande aan bloedafname: IFN- $\beta$  = interferon- $\beta$  (Rebif<sup>TM</sup>)

<sup>d)</sup> Relapsen: aantal klinische relapsen die in het jaar voorafgaande aan bloedafname voorkwamen

HC: gezonde controle

## 2.2 Celweektechnieken

### 2.2.1 Celcultuur reagens

T-cellen en PBMC (perifere bloed mononucleaire cellen), werden in cultuur gebracht in kweekmedium: RPMI 1640 medium, aangevuld met 1% natrium pyruvaat, 1% niet-essentiële aminozuren (alle van Life Technologies, Paisley, Schotland, Groot-Brittannië) en 10% foetaal kalf serum (FCS; Hyclone Europe, Erembodegem, België). Humaan MBP werd geïsoleerd en opgezuiverd uit de witte stof van humane hersenen (61). Synthetische MOG-peptiden, namelijk MOG (1-22), MOG (34-56), MOG (64-86) en MOG (74-96), werden gesynthetiseerd en opgezuiverd d.m.v. *high pressure liquid chromatography* (HPLC) met een zuiverheid van meer dan 95% (Severn Biotech Ltd., Worcester, Groot-Brittannië). Tetanus toxoid (TT; NVI, Bilthoven, Nederland) werd als controle antigeen gebruikt in de experimenten.

### 2.2.2 Cel isolatie

#### *Isolatie van PBMC*

PBMC werden geïsoleerd uit humaan perifere bloed met behulp van Ficoll dichtheidsgradiënt centrifugatie (Histopaque, Sigma diagnostics, inc. St. Louis, MO 63178, Verenigde Staten). De bekomen celpopulatie werd gewassen met RPMI 1640 en vervolgens geresuspendeerd in kweekmedium.

### *Isolatie van de CD4<sup>+</sup> T-cel populatie*

De isolatie van een zuivere CD4<sup>+</sup> T-celpopulatie uit perifere bloed werd bereikt door de verwijdering van alle ongewenste hemopoïetische cellen. Deze negatieve selectie werd uitgevoerd door een RosetteSep<sup>TM</sup> procedure in combinatie met een Ficoll dichtheidsgradiënt centrifugatie. Humaan perifeer bloed werd gedurende 20 min op kamertemperatuur geïncubeerd met een cocktail van bispecifieke antilichamen (RosetteSep<sup>TM</sup> CD4<sup>+</sup> T cell enrichment, StemCell Technologies, Meylan, Frankrijk), gericht tegen celoppervlaktemarkers op ongewenste cellen (CD8, CD16, CD19, CD36 en CD56) en glycoforine A op rode bloedcellen (RBC). Doordat rosetten van ongewenste cellen en RBC een grotere dichtheid bezitten dan CD4<sup>+</sup> T-cellen zullen deze cellen precipiteren op de bodem na Ficoll dichtheidsgradiënt centrifugatie. De witte ring met CD4<sup>+</sup> T-cellen werd afgenomen en na een aantal wasstappen (PBS, 2% FCS) werden de CD4<sup>+</sup> T-cellen geresuspendeerd in kweekmedium.

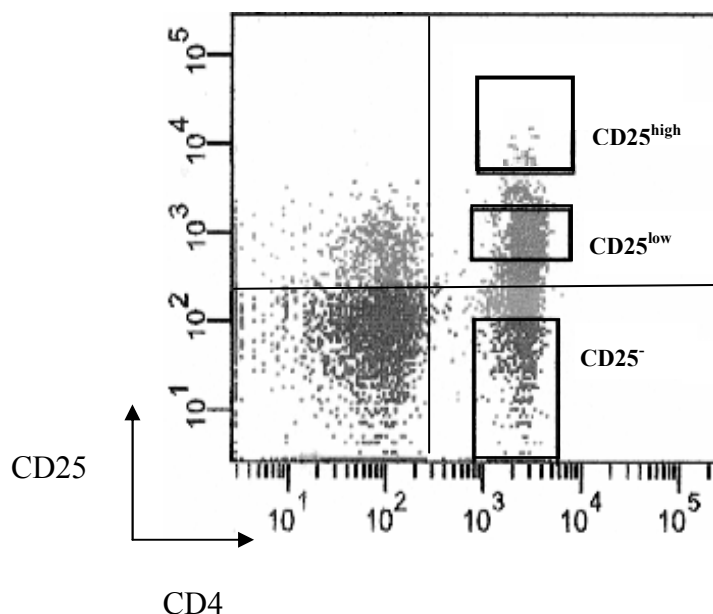
Indien er gewerkt werd met ingevroren PBMC stalen, werd er gebruik gemaakt van een andere negatieve selectiemethode, de CD4<sup>+</sup> T-cel *magnetic cell sorting* (MACS) isolatiekit (Miltenyi Biotec, Senver TECH, Boechout, België). PBMC werden geïncubeerd in de aanwezigheid van een hapteen-antilichaam cocktail (10 µl/10<sup>7</sup> cellen gedurende 10 min bij 4°C). Deze cocktail bevat monoklonale, hapteen-geconjugeerde anti-CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 en CD56 antilichamen. Na een wasstap werden de PBMC geïncubeerd, in aanwezigheid van MACS anti-hapteen microbeads (20 µl/10<sup>7</sup> cellen) gedurende 15 min bij 4°C. Celscheiding werd uitgevoerd met behulp van een LS kolom die in het magnetisch veld van de MACS *separator* (allen van: Miltenyi Biotec, Senver TECH, Boechout, België) de ongewenste magnetisch gelabelde cellen achterhield. De niet-gelabelde CD4<sup>+</sup> T-cellen die door de kolom elueerden, werden opgevangen en geresuspendeerd in kweekmedium.

### *Isolatie van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen*

De positieve selectie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen werd uitgevoerd via een anti-CD25 magnetische bead selectie systeem (EasySep<sup>TM</sup> human CD25<sup>+</sup> selection, StemCell Technologies; Meylan, Frankrijk). CD4<sup>+</sup> T-cellen werden allereerst geresuspendeerd in EasySep buffer (PBS, 2% FCS en 1mM EDTA) en 15 min op kamertemperatuur geïncubeerd met EasySep<sup>TM</sup> positieve selectie cocktail (10 µl/10<sup>7</sup> cellen). Deze cocktail bevat een combinatie van monoklonale antilichamen, gebonden in bispecifieke tetramere

antilichaamcomplexen (TAC), gericht tegen CD25 en dextraan. De targetcellen in de suspensie werden dan specifiek gelabeld met dextraan gecoate magnetische nanopartikels ( $5 \mu\text{l}/10^7$  cellen) tijdens een incubatie van 10 min op kamertemperatuur. De celsuspensie werd in de EasySep magneet geplaatst waardoor er een magnetische scheiding kon optreden tussen gelabelde nanopartikels op  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T-cellen en ongelabelde  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  T-cellen. Door de magneet na 5 min te inverteren werd het supernatans en dus de ongelabelde cellen, overgebracht naar een andere buis en bleven de magnetisch gelabelde  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T-cellen achter in het magnetische veld van de magneet. Een verdere opzuivering van de  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  T-cellen werd bereikt door deze magnetische scheiding 3 keer te herhalen.  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  T-cellen werden eveneens één extra keer opgezuiverd. De celpopulaties werden na een wasstap geresuspendeerd in kweekmedium.

$\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ ,  $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{low}}$  en  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  T-cellen, die gebruikt werden voor  $\text{V}\beta$ -gen analyse, werden geïsoleerd op basis van de sterkte van het fluorescentiesignaal (zie figuur 1) door middel van high speed sorting met behulp van FACSaria<sup>TM</sup> (BD, Erembodegem, België). PBMC werden geresuspendeerd in PBS (2% FCS, 1mM EDTA) aan  $50 \cdot 10^6/\text{ml}$  en gelabeld met CD4-FITC antilichaam ( $12 \mu\text{l}/10 \cdot 10^6$ ) en CD25-PE antilichaam ( $10 \mu\text{l}/10 \cdot 10^6$ ) gedurende 30 min op  $4^\circ\text{C}$ . De cellen werden gewassen in PBS-buffer (2% FCS, 1mM EDTA) en vervolgens geresuspendeerd in kweekmedium aan  $30 \cdot 10^6/\text{ml}$  alvorens te worden gesorteerd.



**Figuur 1 : Isolatie van  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ ,  $\text{CD25}^{\text{low}}$  en  $\text{CD25}^{\text{high}}$  T-cellen door middel van high speed sorting met behulp van FACS sorting.** De T-cel subpopulaties werden gelabeld met CD4-FITC ( $12 \mu\text{l}/10^7$ ) en CD25-PE ( $10 \mu\text{l}/10^7$ ) antilichamen, geïncubeerd gedurende 30 min op  $4^\circ\text{C}$  en gewassen alvorens te worden gesorteerd.

### 2.2.3 Detectie van myeline-reactieve CD4<sup>+</sup> T-cellen voor en na depletie van Tregs

#### *Split well assay*

CD4<sup>+</sup> T-cellen en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen werden in cultuur gebracht met autologe PBMC als APC's in een 96-well rondbodem plaat (Nunc, Roskilde, Denemarken) aan een ratio van 4 .10<sup>4</sup> T-cellen t.o.v. 6 .10<sup>4</sup> autologe APC's per well. De PBMC werden vooraf gepulst met MBP-eiwit (100 µg/ml) of MOG-peptiden (30 µg/ml) gedurende 3u in een CO<sub>2</sub>-incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), vervolgens bestraald en dan toegevoegd als APC's aan de T-cellen. Op dag 7 van de cultuur werden de T-cellen gerestimuleerd met MBP of MOG gepulste APC's. Recombinant IL-2 (2 U/ml) werd toegevoegd als extra groeistimulus (Roche Diagnostics, Brussel, België). Op dag 14 van de cultuur werd een *split well assay* uitgevoerd waarbij de helft van de T-celculturen over 4 wells werd uitverdeeld. Twee wells kregen ongepulste APC's toegevoegd en de andere 2 wells kregen APC's gepulst met MBP of MOG-peptiden, toegevoegd. Na 2 dagen werd 's avonds [<sup>3</sup>H]-thymidine (1µCi) toegevoegd voor de laatste 16u van de kweek (Amersham, Buckinghamshire, Groot-Brittannië). Vervolgens werden de cellen geoogst met een automatische celharvester (Pharmacia, Uppsala, Zweden) en [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporatie werd gemeten in een β-plaat scintillatie teller (Wallac, Turku, Finland).

#### *CFSE labeling*

Een alternatieve methode om myeline-reactieve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen te detecteren gebeurde door middel van een carboxy fluoresceïne succinimidyl ester (CFSE; Invitrogen SA, Molecular Probes<sup>TM</sup>, Merelbeke, België) labeling assay. Gezuiverde T-cellen werden geresuspendeerd in PBS/0.1% BSA aan 2.10<sup>6</sup> cellen/ml met een labelingsconcentratie van 1µM CFSE gedurende 10 min op 37°C. Niet-gebonden CFSE werd verwijderd na centrifugatie, de cellen werden geresuspendeerd in kweekmedium en in cultuur gebracht met bestraalde autologe feeders, vooraf gepulst met MBP-eiwit (100 en 2 µg/ml), MOG-peptiden (30 en 1 µg/ml) of TT (20 LF/ml) gedurende 3u in een CO<sub>2</sub>-incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Na 7 en 10 dagen werden de cellen gecollecteerd, gewassen en vervolgens geïncubeerd in de aanwezigheid van 7-amino-actinomycine D (7-AAD) (viabiliteitsmerker) en anti-CD4 antilichaam (beide van BD Biosciences, Erembodegem, België) gedurende 30 min bij 4°C. 7-AAD is een fluorescent molecule dat in staat is de verstoorde celmembraan van dode cellen te penetreren waardoor via het 7-AAD fluorescentiesignaal een onderscheid kan gemaakt worden tussen levende en dode cellen. Na twee wasstappen werd de specifieke fluorescentie gemeten door middel van een FACS analyse.

## 2.2.4 Flowcytometrische analyse

### *Zuiverheidscontrole*

Geïsoleerde PBMC, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen werden geresuspendeerd in FACS buffer (PBS, 3% FCS, Na Azide) en gedurende 30 min geïncubeerd op 4°C met enerzijds anti-CD4-FITC (fluoresceïne isothiocyanaat), anti-CD25-PE (phycoerythrine), anti-CD3-PerCP (peridinine-chlorofyl-proteïne) antilichamen en anderzijds muis IgG1-FITC/IgG2a-PE als isotype controle (BD, Biosciences, Erembodegem, België). Na twee wasstappen werden de stalen geanalyseerd met een FACS Calibur Flowcytometer (BD, Biosciences), waarbij data gecollecteerd werden van 5 000–10 000 lymfocyten.

### *Intracellulaire cytokinekleuring op CFSE gelabelde cellen*

1-4.10<sup>4</sup> CFSE gelabelde cellen (zie 2.2.3) werden gestimuleerd met phorbol 12-myristate 13-acetaat (PMA) (25 ng/ml) in DMSO, calciumionomycine (CaI) (1µg/ml) (beide van Sigma diagnostics, inc. St. Louis, MO 63178 Verenigde Staten) en brefeldine A (BFA) (10 µg/ml) (Pharmingen, San Diego, CA 92121, Verenigde Staten). De cellen werden hiervoor gedurende 4u geïncubeerd bij 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Om een onderscheid te kunnen maken tussen levende en dode cellen, werden de cellen gedurende 20 min geïncubeerd met 7-AAD (7-amino-actinomycine D) bij 4°C. Na een tweetal wasstappen werden de cellen gefixeerd en gepermeabiliseerd (Cytotfix/cytoperm, Pharmingen, San Diego, CA 92121, Verenigde Staten) en vervolgens intracellulair gekleurd met de volgende antilichamen: muis IgG2a-FITC/IgG1-PE (controle antilichaam), CD69-PE, IFN-γ-PE, IL-4-PE of IL-10-PE gedurende 30 min bij 4°C. De cellen werden uiteindelijk na twee wasstappen (Perm/wash, Pharmingen, San Diego, CA 92121, Verenigde Staten) opgenomen in FACS buffer om vervolgens geanalyseerd te worden op de FACS Calibur Flowcytometer.

## 2.2.5 Cocultuur en proliferatie assay

Een analyse van de suppressieve capaciteit van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen werd uitgevoerd aan de hand van een cocultuur assay, opgezet in een 96-well rondbodem plaat (Nunc, Roskilde, Denemarken). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen (responder T-cellen) werden hiervoor in kweek gebracht aan 2.10<sup>4</sup> cellen/well met 10<sup>5</sup> bestraalde autologe PBMC (feeders) in aanwezigheid van stijgende hoeveelheden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen (Tregs; 1-4.10<sup>4</sup> cellen/well). De T-cellen werden gestimuleerd met anti-humaan muis anti-CD3 antilichaam (2 µg/ml) (Kloon 2G3, Biomed, Diepenbeek, België) als polyklonale T-celstimulus en gedurende 5 dagen geïncubeerd in een CO<sub>2</sub>-incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Na 4 dagen werd 's avonds 120 µl

supernatans verwijderd en nieuw kweekmedium met [<sup>3</sup>H]-thymidine (1μCi) toegevoegd gedurende de laatste 16u cultuur. Vervolgens werden de cellen geoogst met een automatische celharvester en werd de <sup>3</sup>H-thymidine incorporatie gemeten in een β-plaat scintillatie teller.

Een tweede methode om proliferatie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen te meten gebeurde door middel van een CFSE labeling assay. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen werden gelabeld en in duplo in cocultuur gebracht aan verschillende ratio's. T-cel proliferatie werd door middel van flowcytometrie geanalyseerd zoals eerder beschreven (zie 2.2.3.).

## **2.2.6 Celpellets en freezings**

PBMC, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen werden na een wasstap ingevroren in een oplossing van 10 % DMSO (Vel nv, Leuven, België) in foetaal kalf serum (FCS; Hyclone Europe, Erembodegem, België). Een permanente bewaring werd bereikt door de freezing in vloeibare stikstof (N<sub>2</sub>) onder te brengen.

Additioneel werden celpopulaties (1.10<sup>5</sup>- 2.10<sup>6</sup>) ingevroren voor PCR analyses. De cellen werden gewassen in 1x PBS (Biowhittaker<sup>TM</sup>, Cambrex Bio Science, Verviers, België) en vervolgens gecentrifugeerd tot een celpellet. Medium werd verwijderd en deze celpellet werd uiteindelijk ingevroren bij -80°C.

## **2.3 Moleculair biologische Technieken:**

### **2.3.1 RNA isolatie**

Totaal RNA werd geïsoleerd uit celpellets met gebruik van de *high pure RNA isolation kit* (Roche Diagnostics, Brussel, België). De cellen werden geresuspendeerd in 1x PBS en na toevoeging van lysis-/bindingsbuffer met een daarop volgende centrifugatie, bleef het RNA achter op de filtertube. RNA werd gedurende 15 min geïncubeerd met DNase I (in DNase incubatiebuffer) voor verwijdering van achtergebleven genomisch DNA. DNase werd verwijderd na 3 wasstappen en RNA werd doorheen de filtertubes geëluëerd door middel van geautoclaveerd MilliQ water.

### **2.3.2 cDNA synthese**

Het geïsoleerde RNA werd omgezet naar enkelstrengs cDNA met behulp van een cDNA synthese kit (Reverse transcriptase system; Promega, Madison, WI, Verenigde Staten). De cDNA-synthese mix bevatte per staal 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x Reverse transcriptase buffer, 1 mM dNTP's, 2.5 % rRNAse inhibitor, 2.5 % AMV reverse transcriptase en 5 % oligo dT primer. Een fenol/chloroform extractie werd uitgevoerd om het cDNA te scheiden van de reagentia

van de cDNA-mix. Na centrifugatie bevindt het cDNA zich in de bovense fase (H<sub>2</sub>O fase) terwijl de reagentia zich in de organische fase bevinden. cDNA werd overnacht geprecipiteerd in aanwezigheid van natriumacetaat (10 µl, 3M) en 100% ethanol. Na 2 wasstappen met 100 en 70% ethanol werd het cDNA drooggedampt en geresuspendeerd in geautoclaveerd MilliQ water. De kwaliteit van het gesynthetiseerde cDNA werd tenslotte geanalyseerd met behulp van een *polymerase chain reaction* (PCR) waarbij de expressie van een huishoudgen, met name GAPDH (glyceraldehyde-3 fosfaat dehydrogenase) werd gecontroleerd.

### 2.3.3 PCR-ELISA

Vβ-gen specifieke amplificatie van het cDNA werd bekomen door de simultane uitvoering van 22 PCR reacties (Gene Amp PCR system 9600, Perkin Elmer, Norwalk, CT. 06859, Verenigde Staten) met respectievelijk 21 verschillende 5' Vβ-primers en 5'Cβ als forward primer en eenzelfde 3' Cβ DIG gelabelde primer als reverse primer (sequentie 5' CTC-TTG-ACC-ATG-GCC-ATC 3', Eurogentec, Luik; België). Vβ-primer sequenties werden beschreven in Vandevyver et al (1995). De PCR-mix per staal bevatte 68,5 µl 10x PCR buffer, 6,85 µl dNTP's (100 x 20 mM) (beide van Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Duitsland), 13,7 µl 3' Cb DIG (10 pmol/ µl) en 390 µl geautoclaveerd MilliQ water. Dit geheel werd uitverdeeld over 22 FACS tubes (Costar, MA, Verenigde Staten) en hieraan werd 0,6 µl van de specifieke 5' Vβ-primers (10 pmol/ µl) en 0,6 µl van de 5' Cβ forward primer (10 pmol/ µl) toegevoegd. 18 µl van deze mix werd vervolgens samengevoegd met 7 µl cDNA-mix bestaande uit 144,75 µl geautoclaveerd MilliQ water, 5,25 µl TAQ polymerase (5U/ µl) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Duitsland) en 25 µl cDNA per staal zodat een eindvolume van 25 µl bereikt werd per PCR epje na uitverdeling over een PCR plaat. Ook werd voor ieder staal een PCR uitgevoerd met de PCR synthese mix zonder de aanwezigheid van cDNA, dat als blanco kon worden gebruikt bij de expressie analyse. De PCR amplificatie verliep op de volgende manier:



**Tabel 4:** Verloop van de polymerase chain reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR)		
Amplificatieverloop	temperatuur	tijdsduur
Pre-denaturatie	95°C	5 min
Denaturatie	95°C	20 sec
Annealing	55°C	20 sec
Elongatie	72°C	40 sec
Renaturatie	72°C	6 min
Afkoeling	4°C	∞

} 35 cycli

De bekomen PCR producten werden op een 1% agarosegel (Invitrogen SA, Merelbeke, België) met 0,1% Ethyidium Bromide (VWR international BVBA, Leuven, België) gecontroleerd en gevisualiseerd met het GELDOC toestel (BIO-RAD Laboratories, Milaan, Italië).

ELISAplaten (Nunc-Immunoplate™ 96 microwell™ plate, Roskilde, Denemarken) werden gedurende 2u op 37°C gecoat met een anti-FITC monoklonaal antilichaam (kloon 7H10/A7, 2 µg/ml) in coatingsbuffer (1.5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.9 % NaHCO<sub>3</sub> en 0.2 % NaN<sub>3</sub>) en overnacht bij 4°C geblokt met 6% BSA (Immunosource, Halle-Zoersel, België) in PBS. De Vβ-gen specifieke PCR producten werden gedeneureerd bij 95°C en vervolgens gehybridiseerd met een Cβ-FITC probe (sequentie 5' CCG-AGG-TCG-CTG-TGT-TTG-AGC-CAT 3', Eurogentec, Luik, België) in een PCR toestel (Gene Amp PCR system 9600, Perkin Elmer, Norwalk, CT. 06859, Verenigde Staten) (3 min op 95°C, 30 min op 55°C). Gehybridiseerde producten werden in duplo toegevoegd aan anti-FITC gecoate platen gedurende 2u in hybridisatiebuffer (5 % 20x SSC, 2 % 100x Denhardt, 5 % 20 mM EDTA, 10 % 0.1 M TRIS-HCl op pH 7.5 en 78 % Milli Q). Na conjugatie met anti-DIG peroxidase in conjugatiebuffer (1x PBS en 0.0005 % Tween-20) gedurende 1u op 37°C in de schudincubator, werden de immunoplaten 4 keer gewassen in wasbuffer en konden de DNA hybriden gevisualiseerd worden door de toevoeging van gelijke hoeveelheden kleuroplossing A (0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,05M citroenzuur.H<sub>2</sub>O; 0,002% gentamycine en 0,05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; pH 5.0 +/- 0.2) en B (0,05 M citroenzuur.H<sub>2</sub>O; 0.01 M TMB; 0,04% DMSO; pH 2.4 +/- 0.2). Na 15-30 min kleurreactie bij 37°C werd deze stopgezet d.m.v. 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (overzicht zie figuur 2).

Om semikwantitatief de relatieve Vβ-gen expressie te bepalen, werd de optische densiteit (OD) van Vβ-gen specifieke PCR producten gemeten bij 450 nm door middel van een

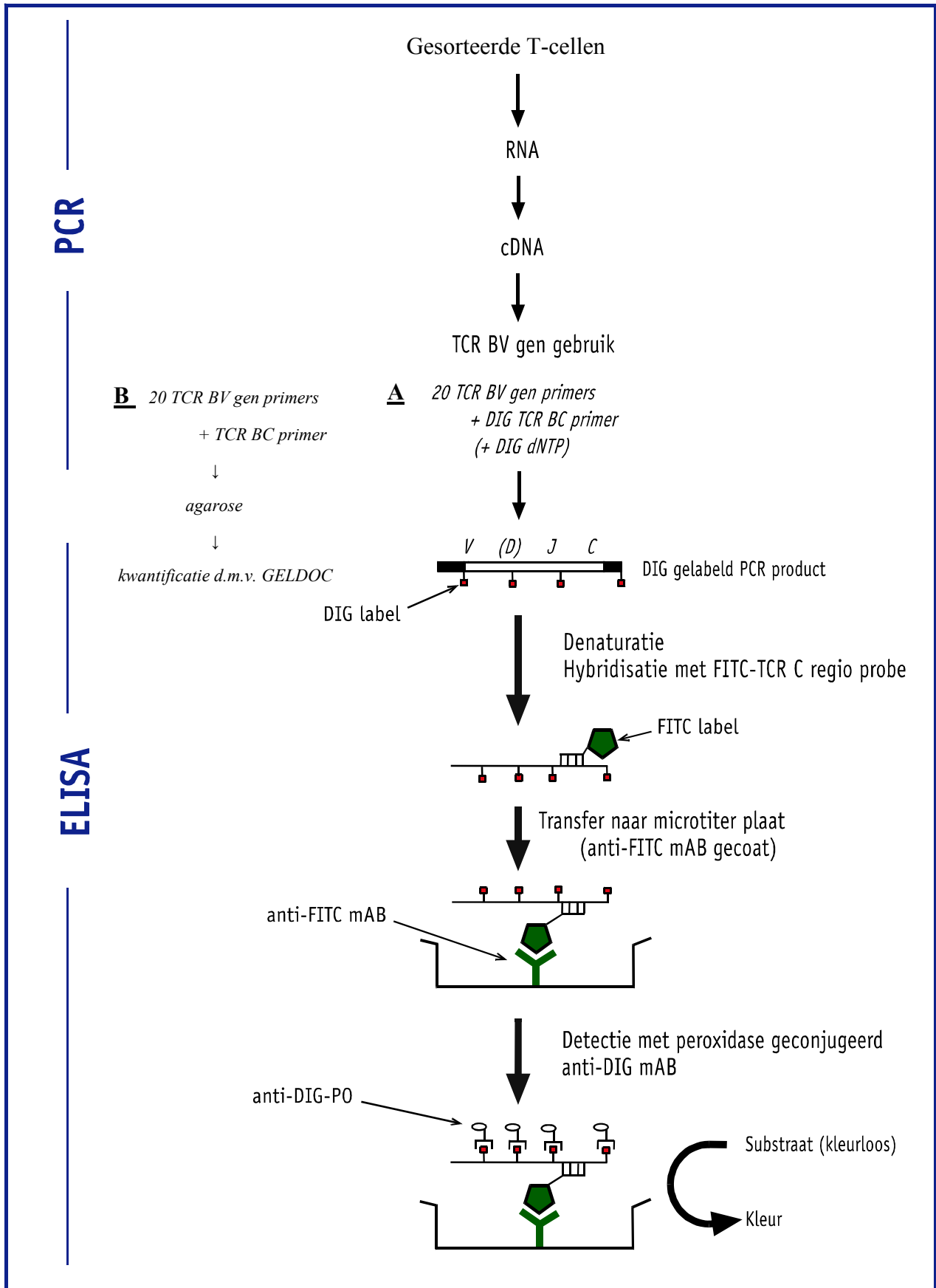
geautomatiseerde ELISA reader (BIORAD-MICROPLATE reader, Benchmark, Hercules, Californië, Verenigde Staten). De achtergrondwaarde (blanco) werd afgetrokken en de stalen werden genormaliseerd ten opzichte van de totale V $\beta$ -gen expressie met behulp van de volgende formule:

$$\text{Formule: } \% V\beta_X = \frac{OD^{A450} \text{ van } V\beta_X}{\Sigma OD^{A450} \text{ van } V\beta_{1, 2, 3, \dots, n}}$$

Een alternatieve methode voor het semikwantitatief meten van de relatieve V $\beta$ -gen expressie werd volbracht met Quantity One software (BIO-RAD Laboratories, Milaan, Italië). Hiervoor werd de densiteit per specifiek V $\beta$ -gen PCR product op de agarosegel relatief berekend ten opzichte van de totale densiteit van alle V $\beta$ -gen specifieke PCR producten.

#### **2.4 Statistische analyse**

Verschillen in percentages van totale CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen, gemiddelde suppressie en gemiddelde myeline reactiviteit tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten werden geanalyseerd met behulp van de student t toets. P-waarden lager dan 0.05 werden hierbij als significant beschouwd.



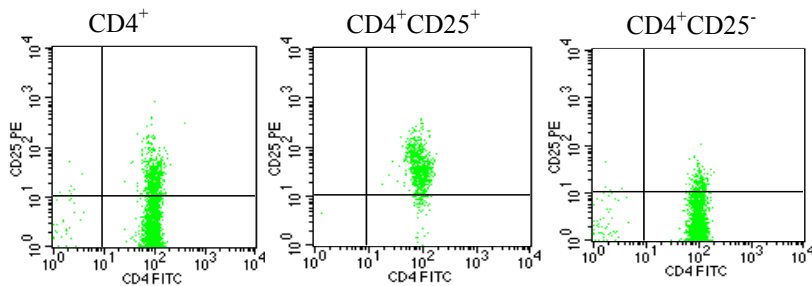
Figuur 2 : Schematisch overzicht van de PCR-ELISA methode.

### 3 Resultaten

#### 3.1 Isolatie van de CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-celpopulaties

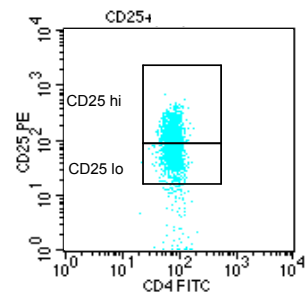
Het isoleren van CD4<sup>+</sup> T-cellen uit humaan perifeer bloed van gezonde personen (n=6) en MS-patiënten (n=21) werd uitgevoerd aan de hand van een negatieve selectiemethode (RosetteSep<sup>TM</sup>) in combinatie met een Ficoll dichtheidsgradiënt centrifugatie. Deze isolatie werd volbracht met een gemiddelde zuiverheid van  $97,8 \pm 0,5\%$ . CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen werden vervolgens geselecteerd met behulp van een positieve selectiemethode (EasySep<sup>TM</sup>). Deze T-celpopulaties werden met een gemiddelde zuiverheid van respectievelijk  $93,5 \pm 3,0\%$  en  $69,7 \pm 3,0\%$  gescheiden (zie figuur 3).

Wanneer vertrokken werd van bevroren PBMC stalen, bleek de zuiverheid van de geïsoleerde T-celpopulaties (ondanks een lagere celopbrengst) vergelijkbaar met die van verse stalen.



**Figuur 3: Zuiverheid van CD4<sup>+</sup> T-cellen, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen.** Met behulp van flowcytometrie en het gebruik van anti-CD3 PerCP, CD4 FITC en CD25 PE monoklonale antilichamen werden Lymfocyten met een hoge expressie van CD4, en al dan niet een hoge expressie van CD25 gedetecteerd via de hoogte van het fluorescentiesignaal (in kanaal FL2). Kwadranten voor positief en negatief CD25 signaal werden bepaald op basis van kleuring met het controle antilichaam IgG1/IgG2a (niet getoond). De FACS dot plots geven data weer van één persoon waarvan de zuiverheid vergelijkbaar is voor alle personen (zowel gezonde controlepersonen als MS-patiënten)

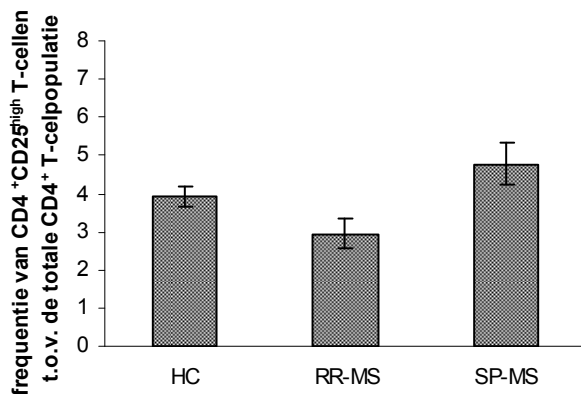
De magnetische bead-gesorteerde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-celpopulatie waren aangerijkt in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen (gemiddeld  $37,0 \pm 3,8\%$ ) ten opzichte van hun aandeel in het totale aantal CD4<sup>+</sup> T-cellen (figuur 4).



**Figuur 4: Aanrijking van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen in de geïsoleerde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-celpopulatie.** Met behulp van flowcytometrie, het gebruik van CD3 PerCP, CD4 FITC en CD25 PE geconjugeerde monoklonale antilichamen en gating op CD4<sup>+</sup> T-cellen werd het percentage CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen in de totale CD4<sup>+</sup> T-celpopulatie bepaald. Kwadranten voor

positief en negatief CD25 signaal werden bepaald op basis van kleuring met het controle antilichaam IgG1/IgG2a. De *cut-off* waarde voor hoge kleuring van CD25 werd vastgesteld op  $10^2$  om de frequenties van  $CD4^+CD25^{high}$  T-cellen in de  $CD4^+$  T-celpopulatie van verschillende personen te meten.

Potentiële verschillen in frequentie van  $CD4^+CD25^+$  T-cellen tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten werden bestudeerd met behulp van flowcytometrie. De experimentele data gaven aan dat er geen significant verschil was in gemiddelde frequentie van  $CD4^+$  T-cellen (gemeten als percentage van de totale lymfocytenpopulatie) tussen gezonde controlepersonen ( $45,0 \pm 5,2\%$ ) en RR-MS-patiënten ( $48,3 \pm 5,6\%$ ;  $p > 0,05$ ) of SP-MS-patiënten ( $54 \pm 6\%$ ;  $p > 0,05$ ). De gemiddelde frequentie van  $CD4^+CD25^{high}$  T-cellen in de totale  $CD4^+$  T-celpopulatie van gezonde controlepersonen bedroeg respectievelijk  $3,9 \pm 0,3\%$ , vergeleken met  $2,9 \pm 0,4\%$  voor RR-MS-patiënten en  $4,8 \pm 0,8\%$  voor SP-MS-patiënten (figuur 5). Deze data tonen aan dat er geen significante verschillen waren in de frequentie van  $CD4^+CD25^{high}$  T-cellen in de totale  $CD4^+$  populatie van gezonde controlepersonen en RR-MS-patiënten ( $p > 0,05$ ) of SP-MS-patiënten ( $p > 0,05$ ).



**Figuur 5: Gemiddelde frequentie van  $CD4^+CD25^{high}$  T-cellen in geïsoleerde  $CD4^+$  T-cellen.** Met behulp van flowcytometrie en het gebruik van CD4 FITC en CD25 PE monoklonale antilichamen konden  $CD4^+$  T-cellen met een hoge expressie van CD25 gedetecteerd worden. De *cut-off* waarde voor hoge kleuring van CD25 werd vastgesteld op  $10^2$  om de frequenties van  $CD4^+CD25^{high}$  T-cellen in de  $CD4^+$  T-celpopulatie van verschillende personen te meten.

### 3.2 De suppressieve capaciteit van $CD4^+CD25^+$ regulatoire T-cellen

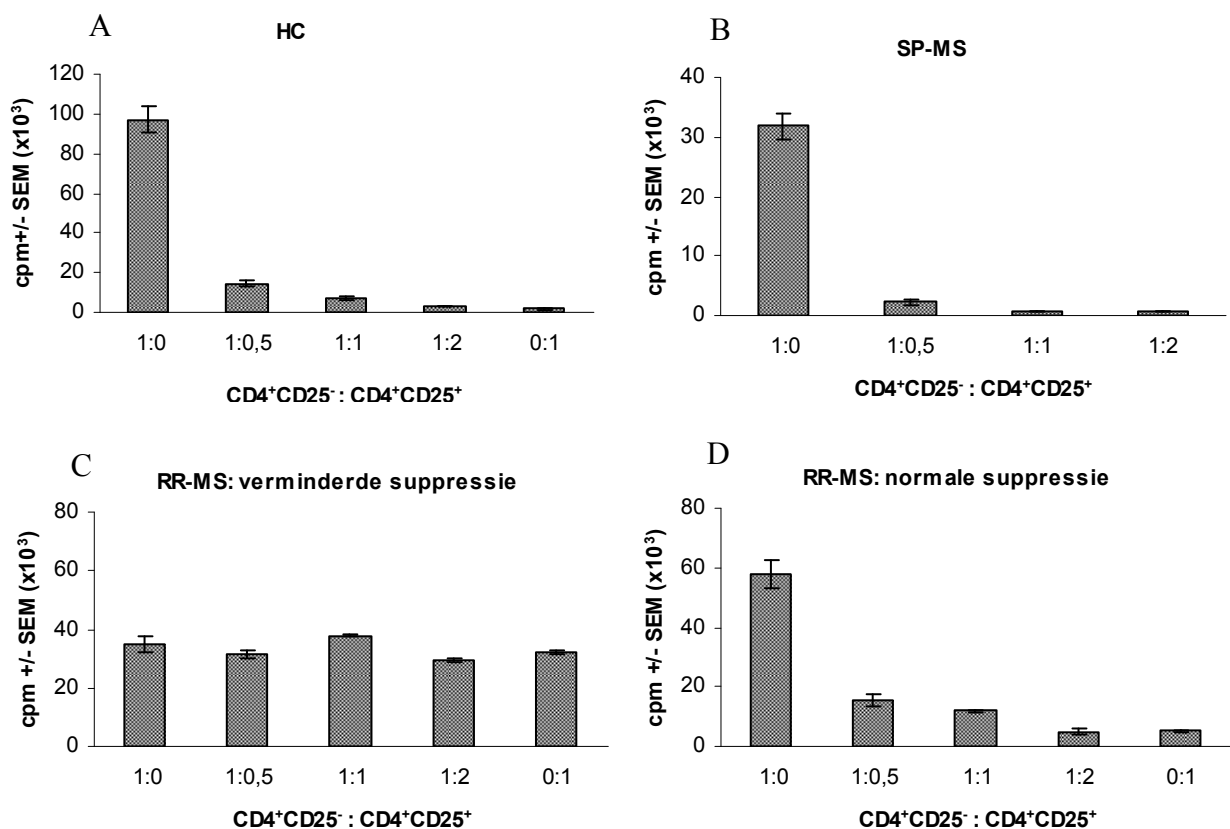
Om de regulatoire functie van  $CD4^+CD25^+$  T-cellen te evalueren, werden *in vitro* suppressieve capaciteit en proliferatie van Tregs geanalyseerd in cocultuur experimenten. Een constante hoeveelheid  $CD4^+CD25^-$  T-cellen (responder cellen,  $2 \cdot 10^4$  cellen/well) werden in cocultuur gebracht met autologe  $CD4^+CD25^+$  T-cellen aan verschillende ratio's. Aan deze coculturen werden  $2 \mu\text{g/ml}$  oplosbaar anti-CD3 antilichaam als polyklonale TCR stimulus en bestraalde autologe PBMC als feederzellen ( $10^5$  cellen/well) toegevoegd. Na 5 dagen werd de proliferatie van de cellen gemeten via de uitvoer van een [ $^3\text{H}$ ] thymidine incorporatie test.

In figuur 6A is een sterke proliferatie van de  $CD4^+CD25^-$  T-cellen van een gezonde controlepersoon zichtbaar na TCR stimulatie met anti-CD3 antilichaam (1:0).  $CD4^+CD25^+$  T-cellen daarentegen vertoonden geen of een zeer lage proliferatie na TCR stimulatie (0:1) en konden dus als anergisch beschouwd worden.

Zoals in figuur 6A duidelijk aangetoond wordt, onderdrukten de Tregs van een gezonde controlepersoon op een dosis-afhankelijke manier de proliferatie van de autologe  $CD4^+CD25^-$  T-cellen en werd bij ratio 1:1 een plateau van suppressie bereikt.

Vervolgens werd de *in vitro* suppressieve capaciteit van Tregs van MS-patiënten (n=19; SP-MS: n=8; RR-MS: n=11) geëvalueerd.

Cocultuur experimenten met perifeer bloed van SP-MS-patiënten (8/8) gaven indicaties dat de suppressieve capaciteit van de Tregs bij deze doelgroep, vergeleken met gezonde controlepersonen, niet verminderd optrad (figuur 6B). Ook kon worden aangetoond dat de  $CD4^+CD25^+$  T-cellen hier eveneens hun anergische eigenschap behielden.

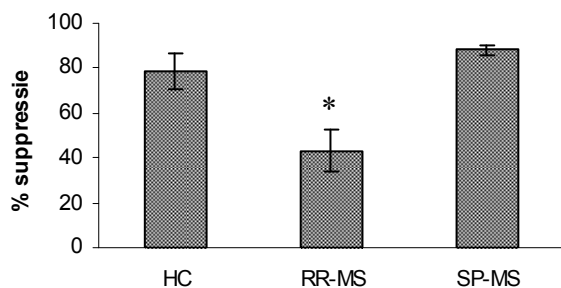


**Figuur 6: De suppressieve capaciteit van  $CD4^+CD25^+$  Tregs ten opzichte van  $CD4^+CD25^-$  responder T-cellen bij gezonde controlepersonen en MS-patiënten.** Bead-gesorteerde  $CD4^+CD25^+$  T-cellen en autologe  $CD4^+CD25^+$  T-cellen ( $2 \cdot 10^4$  cellen/well) werden in aangegeven ratio's in cocultuur gebracht. De cocultuur werd gestimuleerd met  $2 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3 antilichaam in de aanwezigheid van bestraalde autologe PBMC ( $1 \cdot 10^5$  cellen/well). De proliferatie van de cellen werd na 5 dagen cultuur gemeten aan de hand van een [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporatie test. Deze figuur geeft data weer van één gezonde controlepersoon (6A), één SP-MS-patiënt (6B) en twee RR-MS-patiënten (6C en D) die representatief zijn voor

respectievelijk alle gezonde controlepersonen (n=3), SP-MS-patiënten (n=8) en RR-MS-patiënten (n=11).

Bij RR-MS-patiënten (8/11) daarentegen kon worden aangetoond dat de dosis-afhankelijke suppressie van de responder  $CD4^+CD25^-$  T-cellen verminderd optrad of geheel afwezig was ten opzichte van gezonde controlepersonen (figuur 6C). Ook kon duidelijk worden waargenomen dat de  $CD4^+CD25^+$  T-cellen geen anergische eigenschap meer bezaten. Een aantal RR-MS-patiënten (3/11) vertoonden echter een normaal suppressie profiel (figuur 6D).

Uit de experimenten kon worden vastgesteld dat het gemiddelde percentage suppressie bij een responder T-cel:Treg ratio van 1:1 significant lager was in RR-MS-patiënten ( $43,2 \pm 9,2\%$ ; n=11) ten opzichte van gezonde controlepersonen ( $78,4 \pm 8,8\%$ ; n=3) en SP-MS-patiënten ( $88,2 \pm 2,1\%$ ; n=8) (figuur 7;  $p < 0,05$ ). Tussen gezonde controlepersonen en SP-MS-patiënten kon geen significant verschil in gemiddeld percentage suppressie bij ratio 1:1 worden vastgesteld ( $p > 0,05$ ).



**Figuur 7: De gemiddelde suppressieve capaciteit van  $CD4^+CD25^+$  Tregs van gezonde controlepersonen (n=3), RR-MS-patiënten (n=11) en SP-MS-patiënten (n=8).** Het percentage inhibitie van  $CD4^+CD25^-$  responder T-cellen bij een responder T-cel : Treg ratio van 1:1 werd berekend ten opzichte van de maximale proliferatie van responder T-cellen alleen. De gemiddelde suppressie  $\pm$  SEM werd per groep weergegeven; \*  $p < 0,05$  ten opzichte van gezonde controlepersonen.

Bij toenemende aantallen Tregs in deze cocultuur experimenten nam het percentage suppressie voor de 3 bestudeerde groepen toe. Bij de hoogste responder :Treg ratio (1:2) bleef een significant verschil in suppressie bestaan tussen RR-MS-patiënten en gezonde controlepersonen of SP-MS-patiënten (data niet getoond).

Een alternatieve methode om de suppressieve capaciteit van  $CD4^+CD25^+$  regulatoire T-cellen te evalueren werd uitgevoerd met behulp van CFSE labeling. De respondercellen werden geïncubeerd met dit fluorescent molecule vooraleer ze in cultuur gebracht werden met stijgende hoeveelheden  $CD4^+CD25^+$  T-cellen en autologe feederzellen in een rondbodem plaat. Na binnendringen in de cel, wordt CFSE gebonden aan eiwitten met een lange levensduur. Wanneer de cellen mitose ondergaan en delen in dochtercellen, wordt de

hoeveelheid gebonden CFSE verdeeld over de resulterende dochtercellen en resulteert dit in een verminderd fluorescentiesignaal per CFSE gelabelde cel (zie figuur 8A; ratio 1:0 stimulatie met anti-CD3). Na 5 dagen werd met behulp van flowcytometrie bepaald in hoeverre de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen in staat waren de proliferatie van de responder T-cellen te onderdrukken.

Indien enkel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen van gezonde controlepersonen (n=2) in cultuur gebracht werden met autologe feeders zonder T-cel stimulus, kon duidelijk worden waargenomen dat de gelabelde T-celpopulatie weinig tot niet prolifereerde (figuur 8A: ongestimuleerd). Na T-cel stimulus (2µg/ml anti-CD3) kon een sterke proliferatie van de responder T-cellen waargenomen worden (figuur 8A: αCD3). Wanneer constante hoeveelheden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen in cocultuur werden gebracht met stijgende hoeveelheden Tregs in aanwezigheid van anti-CD3 antilichaam, kon worden afgeleid dat bij gezonde controlepersonen de proliferatie van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen afnam in overeenstemming met de hoeveelheid toegevoegde Tregs. Het aantal ongedeelde T-cellen werd groter naarmate grotere hoeveelheden Tregs aan de responder T-cellen werden toegevoegd, dit gaf aan dat de proliferatie van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen Treg dosisafhankelijk afnam (figuur 8A). Voor elk cocultuur experiment werden de ratio's steeds in duplo uitgezet, waarna vastgesteld kon worden dat er weinig variatie was tussen de duplo's.

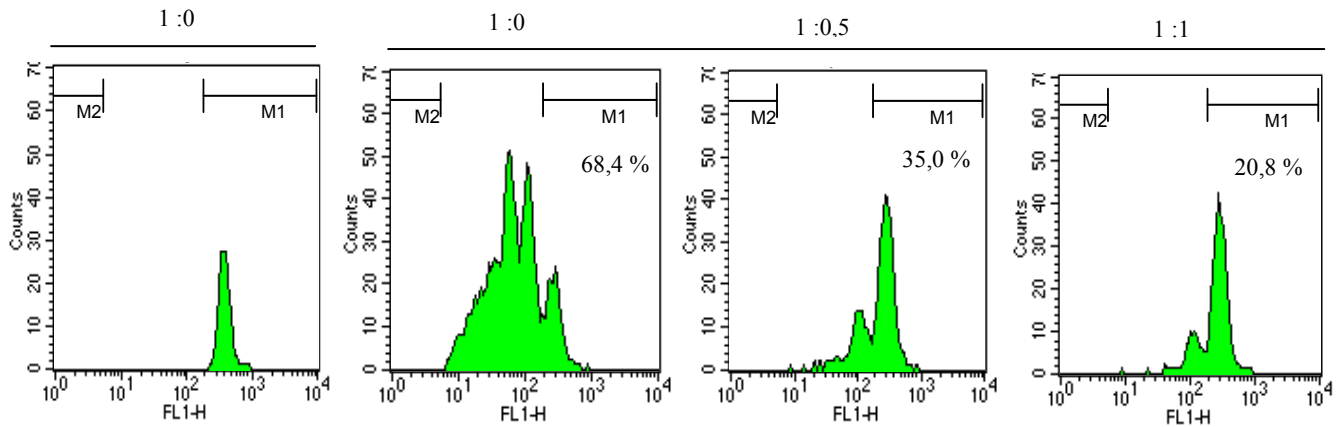
Vervolgens werd ook voor RR-MS-patiënten en SP-MS-patiënten vastgesteld of de proliferatie van de responder T-cellen afnam wanneer deze in cocultuur gebracht werden met stijgende hoeveelheden Tregs (figuur 8B en C). Bij de RR-MS-patiënten werd eveneens afname van proliferatie waargenomen, maar deze afname was niet zo sterk vergeleken met gezonde controlepersonen (figuur 8B). Dit proliferatie profiel van RR-MS-patiënten kwam overeen met de resultaten die bekomen werden met de [<sup>3</sup>H] thymidine incorporatie test (data niet getoond). Wanneer het proliferatie profiel van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen van SP-MS-patiënten geanalyseerd werd, leek dit echter meer vergelijkbaar met dat van een gezonde controlepersoon (figuur 8C). Bij de SP-MS-patiënten werd gedemonstreerd dat voor deze groep van patiënten de bekomen proliferatie profielen van beide technieken goed overeenkwamen (data niet getoond).



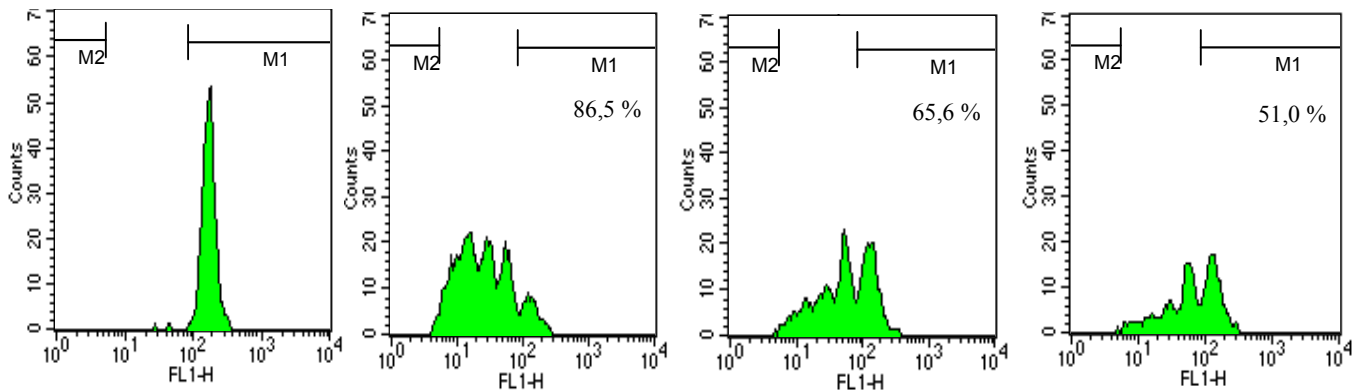
A : HC

Ongestimuleerd

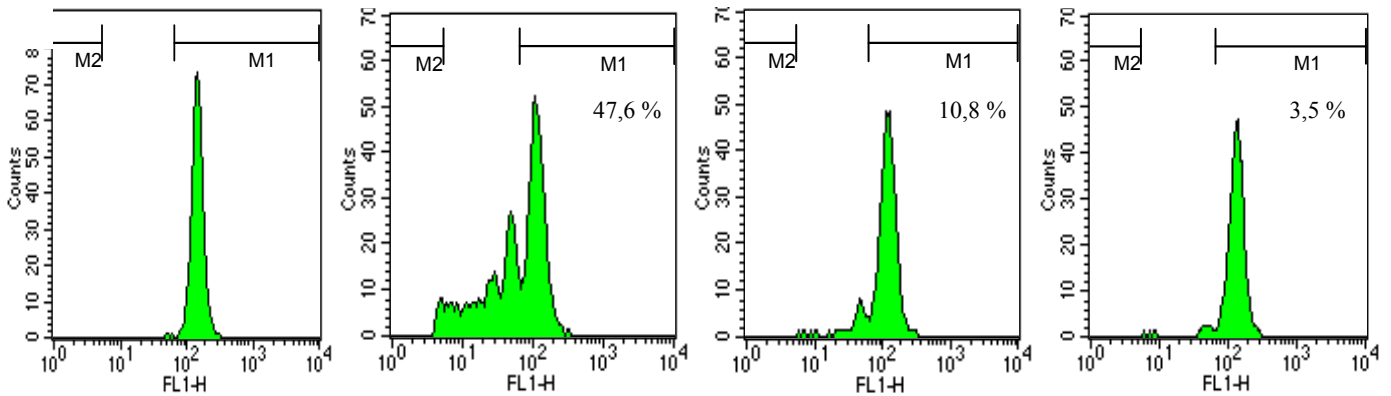
$\alpha$ -CD3



B : RR-MS



C : SP-MS

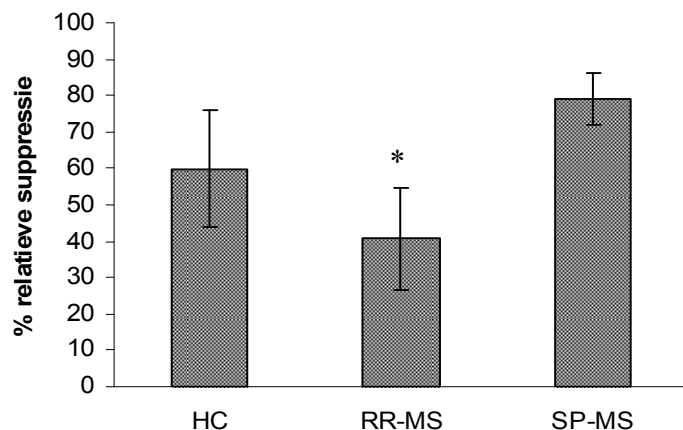


CFSE

**Figuur 8: Proliferatie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen in cocultuur met stijgende hoeveelheden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen bij gezonde controlepersonen en MS-patiënten.** FACS histogrammen van CFSE gelabelde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen in cocultuur met stijgende hoeveelheden Tregs voor en na stimulatie met anti-CD3 (A: HC; B: RR-MS; C: SP-MS). M1: het percentage ongedeelde T-cellen; M2: proliferatie van niet CFSE gelabelde T-cellen (reeds in rekening gebracht). Het percentage proliferatie van de CFSE gelabelde responder T-cellen werd berekend als 100% verminderd met het percentage ongedeelde cellen en de spontane proliferatie (zonder stimulus). Waarden werden berekend als gemiddelde  $\pm$  SEM van een duplo well opzet bij elke ratio. Deze figuur geeft data weer van één gezonde controlepersoon, één RR-MS-patiënt en één SP-MS-patiënt die representatief zijn voor respectievelijk alle gezonde controlepersonen (n=2), RR-MS-patiënten (n=6) en SP-MS-patiënten (n=2).

De experimentele bevindingen toonden aan dat beide technieken even efficiënt en volwaardig functioneel bleken te zijn in het evalueren van de suppressieve capaciteiten van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen bij gezonde controlepersonen, RR-MS-patiënten en SP-MS-patiënten.

Wanneer gekeken werd naar het percentage relatieve suppressie per groep, kon worden waargenomen dat deze suppressie toenam naarmate stijgende hoeveelheden Tregs aan de responder T-cellen werden toegevoegd. De experimentele bevindingen gaven aan dat het gemiddelde percentage suppressie, uitgeoefend bij ratio 1:1 door Tregs van RR-MS-patiënten (40,6 ±14,0%; n=6) lager is dan de suppressie uitgeoefend door Tregs van gezonde controlepersonen (59,9 ± 15,9%; n=2) en SP-MS-patiënten (79,1 ±7,0%; n=3). Dit verschil was echter niet significant ten opzichte van gezonde controlepersonen ( $p > 0,05$ ) maar wel ten opzichte van SP-MS-patiënten ( $p < 0,05$ ) (figuur 9). Daarmee samenhangend hadden de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen van RR-MS-patiënten, vergeleken met gezonde controlepersonen en SP-MS-patiënten een verhoogd prolifererende capaciteit (data niet getoond).

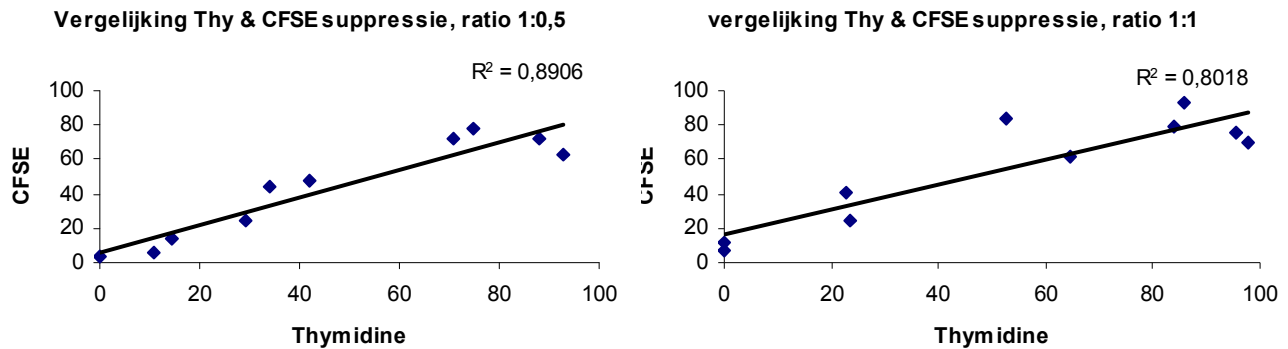


**Figuur 9: Percentage relatieve suppressie bij gezonde controlepersonen, RR-MS-patiënten en SP-MS-patiënten, gemeten door middel van een CFSE labelingsmethode.** Het percentage inhibitie van proliferatie werd berekend ten opzichte van de maximale proliferatie van responder T-cellen bij ratio 1:0. De gemiddelde suppressie ± SEM werd per groep weergegeven; \* $p > 0,05$  ten opzichte van SP-MS-patiënten.

Een vergelijking tussen de [<sup>3</sup>H] thymidine incorporatie test en de CFSE labelingsmethode werd mogelijk gemaakt door de simultane opzet van 2 cocultuur experimenten met cellen van éénzelfde persoon.

In figuur 10 werd het percentage relatieve suppressie van proliferatie van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> responder T-cellen in cocultuur met Tregs, bekomen via de [<sup>3</sup>H] thymidine incorporatie test en de CFSE labelingstechniek, vergeleken tussen ratio 1:0,5 en 1:1. Voor ratio 1:0,5 en ratio

1:1 kon aangetoond worden dat de technieken significant gecorreleerd zijn, aangezien een sterk lineair verband (respectievelijk  $R^2=0,89$  en  $R^2=0,80$ ) werd vastgesteld.



**Figuur 10:** Vergelijking van het percentage suppressie van proliferatie van  $CD4^+CD25^-$  responder T-cellen, in cocultuur met stijgende hoeveelheden Tregs, bekomen via de  $[^3H]$  thymidine incorporatie test en de CFSE labelingsmethode. De suppressiewaarden werden berekend als 100% verminderd met de waarden van relatieve proliferatie. Deze proliferatie werd relatief berekend ten opzichte van de proliferatie bij ratio 1:0 zonder aanwezigheid van Tregs.

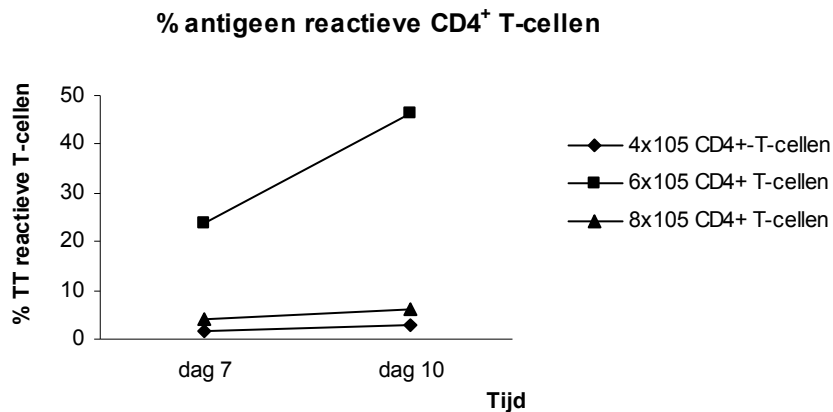
### 3.3 Frequentie en cytokine profiel van antigeen reactieve $CD4^+$ T-cellen voor en na depletie van Tregs

#### 3.3.1 Frequentie van antigeen reactieve T-cellijnen

Antigeen specifieke reactieve T-cellijnen werden gedetecteerd door het in cultuur brengen van  $CD4^+$  en  $CD4^+CD25^-$  T-cellen ( $CD4^+$  T-cellen na depletie van Tregs) met bestraalde, autologe PBMC die vooraf gepulst werden met MBP eiwit, MOG peptiden of tetanus toxoid (TT) als controle antigeen. Voor deze detectie werden 2 technieken aangewend. Een eerste methode is een *split well assay* waarbij de cellen op dag 7 gerestimuleerd en op dag 14 gescreend werden voor antigeen specifieke T-cellen. De responder T-cellen werden daarvoor enerzijds in cultuur gebracht met ongepulste APC's (als controle) en anderzijds met APC's, gepulst met myeline antigenen. Na 3 dagen werd een  $[^3H]$  thymidine incorporatie test uitgevoerd. Met behulp van deze techniek kon een sterke proliferatie van zowel de  $CD4^+$  als  $CD4^+CD25^-$  T-cellen waargenomen worden. Er waren echter geen specifieke myeline reponses van de responder T-cellen aantoonbaar ( $n=3$ ; data niet getoond). Daar er een hoge achtergrondproliferatie waargenomen werd na toevoeging van APC's zonder stimulus, werd op basis van deze bevindingen besloten niet verder te werken met deze *split well assay*.

Een alternatieve methode betrof het labelen van geïsoleerde  $CD4^+$  en  $CD4^+CD25^-$  T-cellen met CFSE, zoals voorheen beschreven. Beide T-celpopulaties werden in cultuur gebracht met autologe, bestraalde MBP, MOG of TT gepulste PBMC, of ongepulste PBMC. Antigeen reactiviteit van de  $CD4^+$  en  $CD4^+CD25^-$  T-cellen werd vervolgens met behulp van

flowcytometrie gemeten. Deze experimentele opzet werd vooreerst geoptimaliseerd. Gezuiverde T-celfracties en feederzellen werden daarbij aan verschillende concentraties ( $4 \cdot 10^5$  cellen/well) in cultuur gebracht om na te gaan bij welke condities de meest optimale antigeen reactiviteit van T-cellen vastgesteld kon worden. Er werd hiervoor vastgesteld dat  $6 \cdot 10^5$  T-cellen de meest optimale antigeen reactiviteit gaf, in combinatie met  $7,5 \cdot 10^5$  feederzellen (figuur 11). Hierbij werd eveneens een zeer lage spontane proliferatie gemeten (data niet getoond). Bovendien leek de hoogste proliferatie meetbaar op dag 10 (figuur 11).



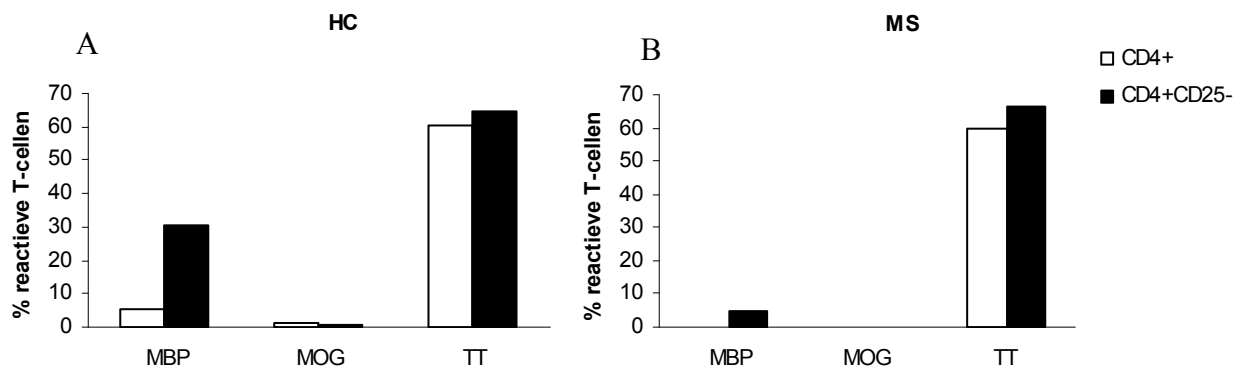
**Figuur 11: Percentage tetanus toxoid reactieve CD4<sup>+</sup> T-cellen bij verschillende T-cel concentraties op dag 7 en 10.** Waarden werden berekend als gemiddelde van het percentage antigeen reactieve cellen ten opzichte van de totale CD4<sup>+</sup> T-celpopulatie, verminderd met de spontane proliferatie. Deze figuur geeft data weer van één gezonde controlepersoon die representatief is voor alle gezonde controlepersonen (n=3).

Wanneer gebruik werd gemaakt van lagere antigeen concentraties voor MBP (2 µg/ml) en MOG (1 µg/ml), om specifiek de CD4<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen met een hoge affiniteit TCR voor MBP of MOG te stimuleren, werd weinig tot geen antigeen respons waargenomen (n=3; data niet getoond).

Verder kon worden vastgesteld dat bij gezonde controlepersonen (n=5) op dag 10 weinig respons tegen MBP gevormd werd in de CD4<sup>+</sup> T-celpopulatie terwijl deze respons wel duidelijk waarneembaar was in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-celpopulatie. Responsen tegen MOG waren in beide T-celpopulaties weinig tot niet aantoonbaar. Voor gezonde controlepersonen konden zowel CD4<sup>+</sup> als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen, reactief tegen TT, gedetecteerd worden en deze responsen waren vergelijkbaar voor beide T-celpopulaties alsook beduidend hoger dan de responsen voor MBP (of MOG) (figuur 12A).

Vervolgens werd ook de antigeen reactiviteit van CD4<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen van één RR-MS-patiënt geëvalueerd. Op dag 10 vertoonde deze patiënt geen proliferatie van CD4<sup>+</sup> T-cellen, reactief tegen MBP of MOG, en ook geen proliferatie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen

reactief tegen MOG. Wel vertoonden de  $CD4^+CD25^-$  T-cellen een lichte reactiviteit tegen MBP. Na TT stimulatie kon voor deze patiënt eveneens vergelijkbare reactiviteit gedetecteerd worden in zowel de  $CD4^+$  als de  $CD4^+CD25^-$  T-celpopulatie, die duidelijk hoger was dan de respons tegen MBP (figuur 12B).



**Figuur 12: Reactiviteit van  $CD4^+$  en  $CD4^+CD25^-$  T-cellen van gezonde controlepersonen en een MS-patiënt tegen MBP, MOG of tetanus toxoid op dag 10.** Waarden werden berekend als gemiddelde van het percentage MBP (100  $\mu\text{g/ml}$ ), MOG (30  $\mu\text{g/ml}$ ) of TT (20 LF/ml) reactieve cellen ten opzichte van de totale  $CD4^+$  T-celpopulatie, verminderd met de spontane proliferatie. Deze figuur geeft data weer van  $CD4^+$  en  $CD4^+CD25^-$  T-cellen van één gezonde controlepersoon (A), representatief voor alle gezonde controlepersonen ( $n=3$ ), en één MS-patiënt (B).

Met deze experimentele bevindingen werd aangetoond dat depletie van Tregs bij gezonde controlepersonen leidde tot een steiging van de myeline reactiviteit, terwijl dit niet werd waargenomen voor de TT reactiviteit. De enige RR-MS-patiënt die in deze experimentele opzet geëvalueerd werd, vertoonde een myeline en TT reactiviteit die vergelijkbaar was met die van gezonde controlepersonen.

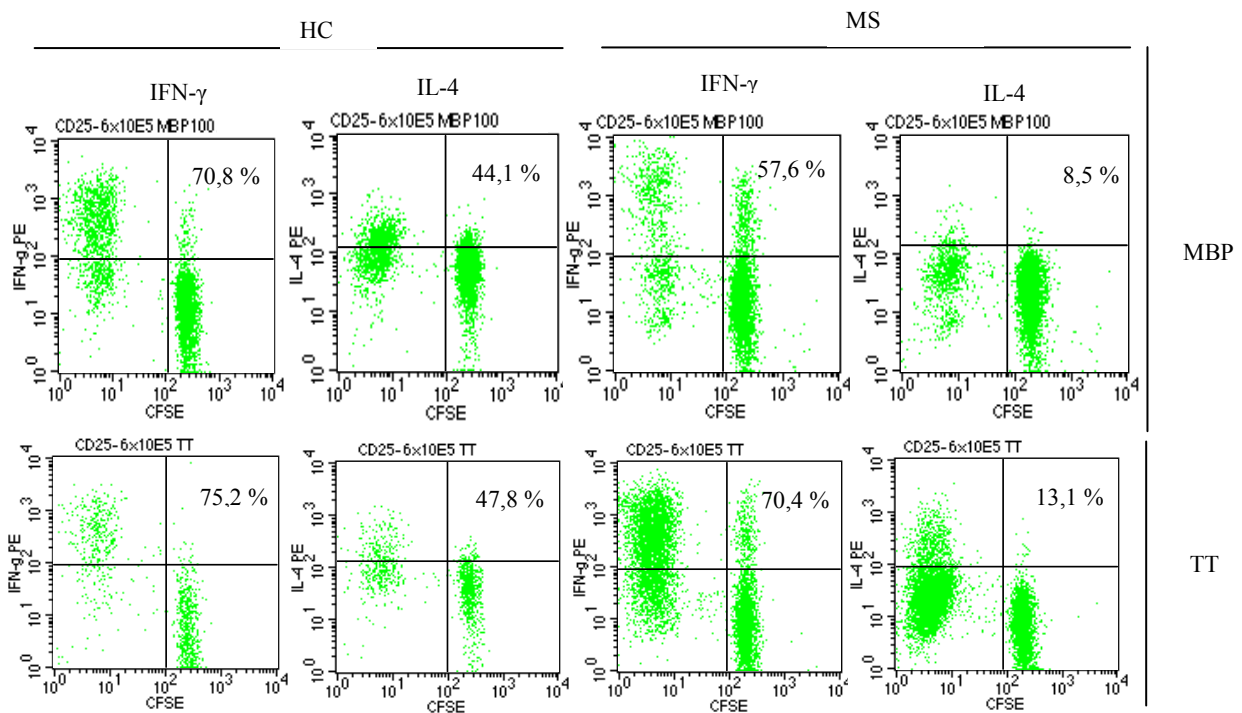
Door middel van CFSE kleuring in combinatie met flowcytometrie kan dus zeer efficiënt de antigeen reactiviteit van  $CD4^+$  en  $CD4^+CD25^-$  T-cellen gemeten worden.

### 3.3.2 Cytokineproductie door antigeen reactieve T-cellen

Om het T-helper profiel van antigeen reactieve T-cellen te bepalen, werd de cytokine productie van deze cellen met behulp van flowcytometrie geanalyseerd. MBP-, MOG- en TT-gestimuleerde T-cellen (als controle) werden voorafgaande aan analyse gedurende 4 u gerestimuleerd met PMA (25  $\text{ng/ml}$ ), CaI (1  $\mu\text{g/ml}$ ) en BFA (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Levende cellen werden gevisualiseerd door een voorafgaande incubatie met 7-AAD, gepermealiseerd, gefixeerd en vervolgens intracellulair gekleurd met antilichamen voor IgG2a/IgG1 (controle), CD69 (activatiemerker), IFN- $\gamma$ , IL-4 of IL-10. Intracellulaire cytokine kleuring in combinatie met voorgaande CFSE labeling van de T-cellen werd geanalyseerd met behulp van

flowcytometrie.

Een kwalitatief beeld wordt weergegeven in figuur 13. Na kleuring met anti-CD69 antilichaam kon vastgesteld worden dat  $\geq 80\%$  van de T-cellen geactiveerd was na restimulatie. Bij MBP reactieve  $CD4^+CD25^-$  T-cellen van gezonde controlepersonen (n=4) konden zowel  $INF-\gamma$  als IL-4 producerende cellen gedetecteerd worden, duidende op een Th0 cytokine profiel. De respons van de  $CD4^+CD25^-$  T-cellen tegen TT bleek bij gezonde controlepersonen voornamelijk uit  $INF-\gamma$  producerende T-cellen te bestaan, met een kleiner aantal IL-4 producerende T-cellen, zodat verondersteld werd dat de T-cellen een Th1 cytokine profiel vertoonden. Het cytokine profiel van de geanalyseerde RR-MS-patiënt daarentegen gaf indicaties dat de MBP reactieve  $CD4^+CD25^-$  T-cellen van deze persoon meer  $INF-\gamma$  producerende dan IL-4 producerende T-cellen waren. Dit bleek ook zo te zijn voor de TT reactieve  $CD4^+CD25^-$  T-cellen van deze patiënt, duidende op een Th1 cytokine profiel van respectievelijk MBP en TT reactieve  $CD4^+CD25^-$  T-cellen van een MS-patiënt.



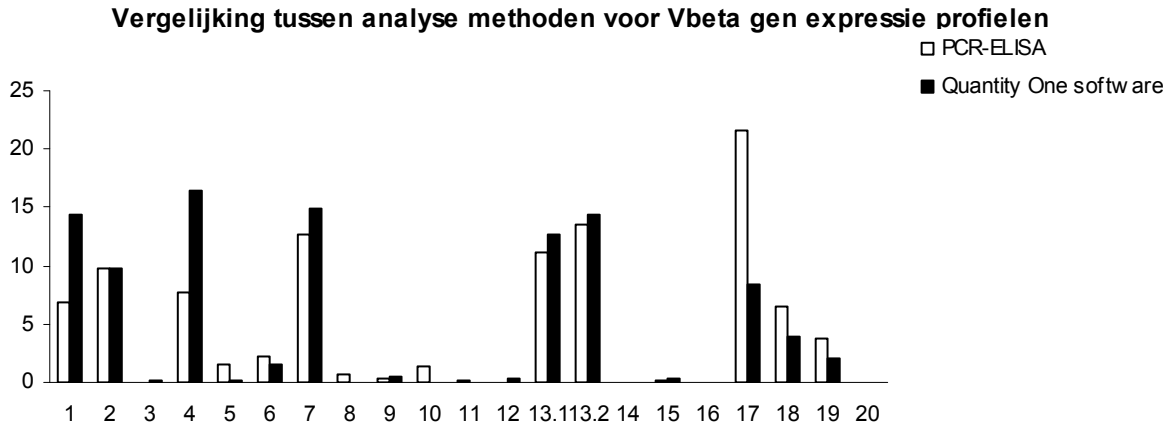
**Figuur 13: Cytokine profiel van  $CD4^+CD25^-$  T-cellen van gezonde controlepersonen en MS-patiënten.**  $CD4^+CD25^-$  responder T-cellen, reactief tegen MBP of TT, werden met 7-AAD geïncubeerd om een onderscheid te kunnen maken tussen levende en dode cellen, gefixeerd, gepermeabiliseerd en gevisualiseerd met behulp van antilichamen tegen intracellulair  $INF-\gamma$  of IL-4. Via flowcytometrie werd het percentage  $INF-\gamma$  of IL-4 producerende cellen bepaald, gemeten als het percentage cytokine producerende antigeen reactieve T-cellen gedeeld door de totale gedeelde T-celpopulatie. Deze figuur geeft data weer van één gezonde controlepersoon die representatief is voor alle gezonde controlepersonen (n=3) en één MS-patiënt.

Deze bevindingen geven aan dat bij MBP reactieve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen in gezonde controlepersonen een respons gevormd wordt die zowel pro- als anti-inflammatoire componenten bevat. In MS-patiënten wordt voornamelijk een pro-inflammatoire respons gezien wanneer MBP reactieve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen in contact komen met hun antigeen.

### **3.4 TCR V $\beta$ -gebruik bij CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD25<sup>low</sup> en CD25<sup>high</sup> T-cellen van gezonde controlepersonen en MS-patiënten**

Het TCR V $\beta$ -gen profiel van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD25<sup>low</sup> en CD25<sup>high</sup> T-cellen in gezonde controlepersonen en MS-patiënten werd geëvalueerd met behulp van PCR-ELISA. Van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen, die geïsoleerd werden door middel van high speed FACSSorting, werd RNA geïsoleerd en cDNA gesynthetiseerd dat fungeerde als template voor een PCR met 21 verschillende V $\beta$ -primers als forward primer en een DIG gelabelde primer als reverse primer. De DIG gelabelde PCR producten werden vervolgens gehybridiseerd met een FITC gelabelde TCR *constant* regio specifieke probe. Kwantificatie met behulp van ELISA werd volbracht door gebruik van anti-FITC gecoat microtiterplaten en anti-DIG geconjugeerd peroxidase. Relatieve expressiepatronen van elke V $\beta$ -gen subfamilie konden zo worden bepaald ten opzichte van de totale V $\beta$ -gen expressie. In een alternatieve analysemethode werd het V $\beta$ -gen specifieke PCR product direct gekwantificeerd via GELDOC Software (Quantity One) na PCR amplificatie en agarose gel elektroforese. Indien V $\beta$ -genen een expressie vertoonden van 15% of meer, ten opzichte van de totale V $\beta$ -gen expressie, werd verondersteld dat deze genen aangerijkt zijn in de totale T-celpopulatie.

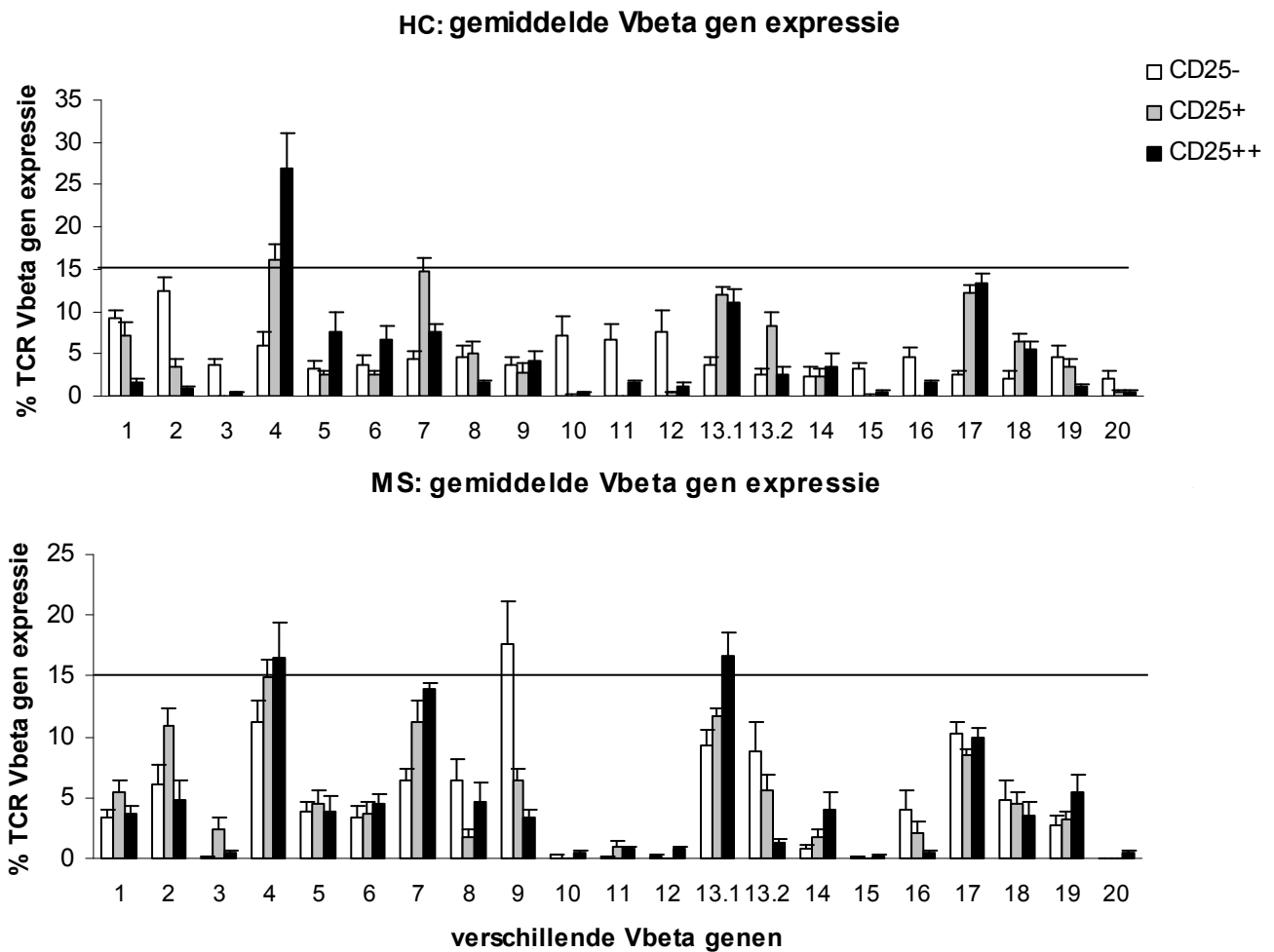
Om te bepalen of de directe kwantificatie van de V $\beta$ -gen specifieke PCR producten met behulp van de Quantity One software hetzelfde V $\beta$ -gen expressie profiel weergaf als de PCR-ELISA, werd een vergelijking toegepast op een CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> T-celpopulatie van eenzelfde gezonde persoon. Deze vergelijking gaf aan dat het V $\beta$ -gen profiel goed overeen kwam en dat analyse met het software programma een goed alternatief kan zijn om de relatieve patronen van V $\beta$ -gen expressie bij gezonde controlepersonen en MS-patiënten te evalueren (figuur 14).



**Figuur 14: Vergelijking van ELISA en Quantity One software met betrekking tot analyse van de Vβ-gen expressie in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD25<sup>low</sup> en CD25<sup>high</sup> T-cellen.** A: Waarden werden berekend als gemiddelde van een duplo well opzet en relatief bepaald ten opzichte van de totale expressie. B: Waarden werden berekend door middel van de uitvoer van een *volume analysis report* (Quantity One software), waarbij de densiteit van Vβ-gen geamplificeerde producten relatief bepaald werd ten opzichte van de totale densiteit van alle Vβ-genen.

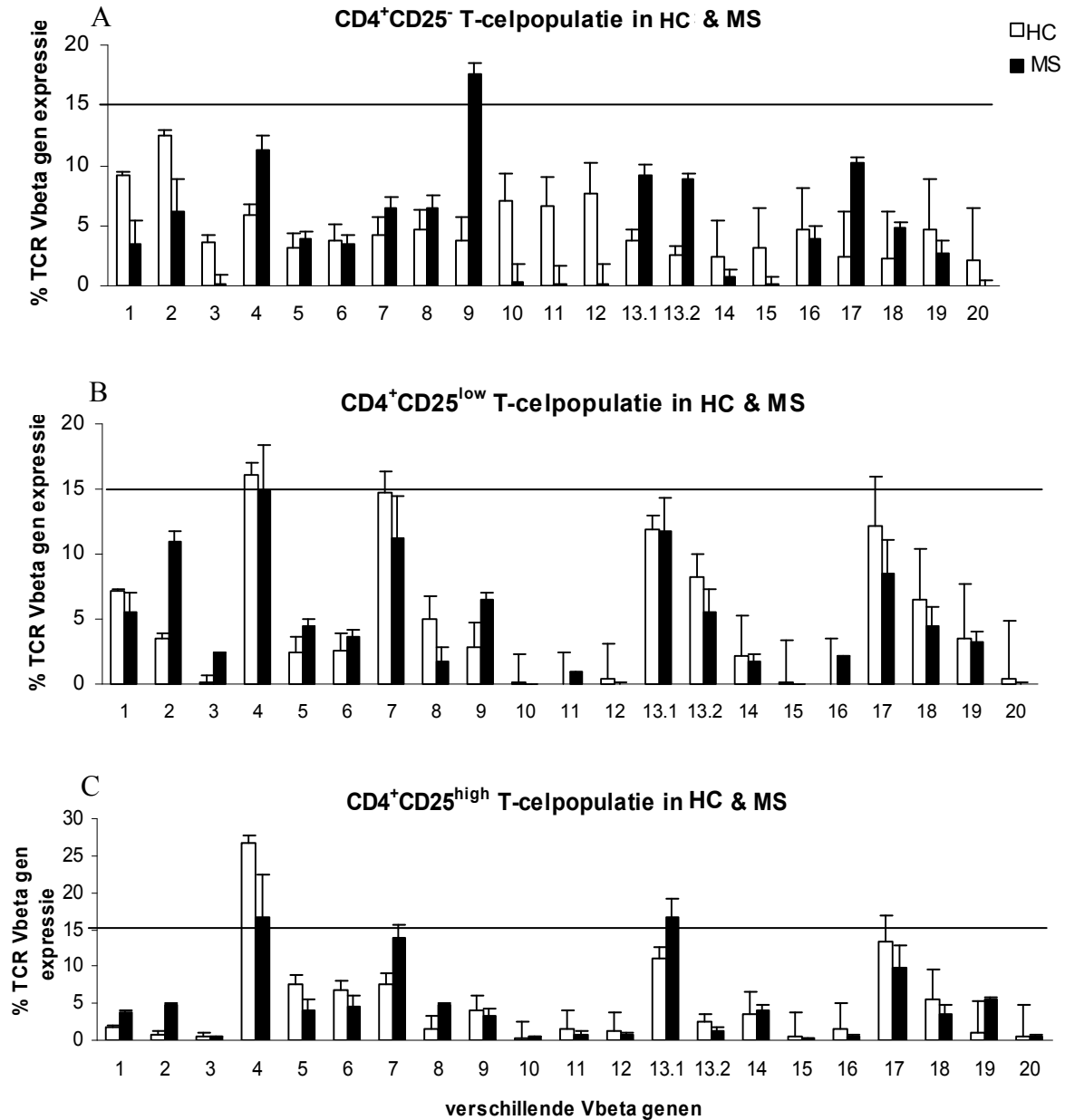
Wanneer bij gezonde controlepersonen (n=4) gekeken werd naar de relatieve Vβ-expressie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD25<sup>low</sup> en CD25<sup>high</sup> T-cellen, werd vastgesteld dat de verschillende T-cel subpopulaties een breed maar divers Vβ-gen profiel vertoonden. Het gemiddelde Vβ-gen expressie patroon van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen van gezonde controlepersonen (n=4) kwam meer overeen dan enerzijds CD25<sup>low</sup> of anderzijds CD25<sup>high</sup> T-cellen in vergelijking met de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cel populatie. Opmerkelijk hierbij was de hoge expressie van Vβ-gen 4 in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cel populatie. Het Vβ-gen expressie patroon van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD25<sup>low</sup> en CD25<sup>high</sup> T-cellen bij MS-patiënten (n=4) was eveneens zeer divers en onderling tussen de T-cel populaties tot op zekere hoogte vergelijkbaar waarbij Vβ-gen 9 in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cel populatie en Vβ-gen 13 in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cel populatie aangerijkt bleken te zijn in de totale T-cel populatie (figuur 15).





**Figuur 15: Gemiddelde V $\beta$ -gen expressie bij gezonde controlepersonen en MS-patiënten.** Waarden werden berekend door middel van de uitvoer van een *volume analysis* report (Quantity One software), waarbij de densiteit van elke V $\beta$ -gen subfamilie relatief bepaald werd ten opzichte van de totale densiteit. Vervolgens werd voor beide groepen (gezonde controlepersonen; n=4 en MS-patiënten, n=4) een gemiddelde expressie  $\pm$  SEM bepaald voor elk V $\beta$ -gen.

Wanneer vervolgens gekeken werd naar mogelijke verschillen in de gemiddelde V $\beta$ -gen expressie binnen de 3 T-celpopulaties tussen gezonde controlepersonen (n=4) en MS-patiënten (n=4), kon worden vastgesteld dat de V $\beta$ -gen expressie profielen van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen van gezonde controlepersonen en MS-patiënten een verschillend V $\beta$ -gen profiel vertoonden. Hoewel het precieze V $\beta$ -gen profiel varieerde tussen de verschillende individuen vertoonde de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-celpopulatie van de gezonde controlepersonen een divers gebruik van de V $\beta$ -gen subfamilies, waarbij er geen overrepresentatie van bepaalde V $\beta$ -genen gedetecteerd kon worden. Bij de MS-patiënten was het V $\beta$ -gen profiel meer gerestrictieerd en was er een opmerkelijke aanrijking van V $\beta$ -gen 9 detecteerbaar (figuur 16A).



**Figuur 16: Vergelijking van het gemiddelde V $\beta$ -gen gebruik in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cel populatie tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten.** Waarden werden berekend door middel van de uitvoer van een *volume analysis report* waarbij de densiteit van elk V $\beta$ -gen relatief bepaald werd ten opzichte van de totale densiteit. Vervolgens werd voor de groep gezonde controlepersonen (n=4) en de groep MS-patiënten (n=4) de gemiddelde expressie  $\pm$  SEM bepaald voor elk V $\beta$ -gen in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (A), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> (B) en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cel populatie (C).

Deze vergelijking tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten werd ook uitgevoerd voor de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cel populatie. Voor de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> T-cel populatie werd vastgesteld dat er een meer vergelijkbaar beeld was tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten. V $\beta$ -4, bij zowel gezonde controlepersonen als MS-patiënten, vertoonde een expressie van ongeveer 15% ten opzichte van de totale V $\beta$ -gen expressie en verder waren er nog enkele V $\beta$ -genen (V $\beta$ -7, 13.1 en 17) aangerijkt (figuur 16B).

Wanneer de V $\beta$ -gen expressie in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cel populatie tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten werd vergeleken, kon ook hier een meer vergelijkbaar beeld worden vastgesteld. Wederom kon een overrepresentatie van V $\beta$ -genen (4;7;13.1;17) vastgesteld worden bij zowel de gezonde controlepersonen als MS-patiënten. V $\beta$ -gen 4 werd tot overexpressie gebracht bij zowel de gezonde controlepersonen als MS-patiënten en V $\beta$ -gen 13.1 enkel bij de MS-patiënten (figuur 16C).

Deze experimentele bevindingen geven aan dat het gemiddelde V $\beta$ -gen expressie profiel voor de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen binnen gezonde controlepersonen en MS-patiënten zeer divers is. Ook wanneer gezonde controlepersonen en MS-patiënten werden vergeleken kon niet eenduidig worden vastgesteld of er grote verschillen waren in V $\beta$ -gen profiel van de T-celpopulaties tussen de 2 groepen. Wel kon worden aangetoond dat het V $\beta$ -gen expressie profiel van gezonde controlepersonen en MS-patiënten voor zowel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen beter overeen kwam dan voor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen.

## 4 Discussie

Het optreden van autoreactieve T-cellen in het normale T-cel repertoire geeft aan dat klonale deletie in de thymus niet absoluut is. De voorbije jaren werd de aandacht gevestigd op  $CD4^+CD25^+$  regulatoire T-cellen in onderzoek van autoimmune ziekten. Zowel op het diermodel als humaan niveau worden deze T-cellen beschouwd als een belangrijk onderdeel van actieve perifere bescherming in de immunologische tolerantie tegen pathogene lichaamseigen responsen. Talrijke aspecten van hun ontwikkeling en werkingsmechanisme zijn nog onduidelijk en onderzoek naar deze karakteristieken is daarvoor aangewezen. In deze studie werd getracht het suppressie profiel van natuurlijk voorkomende  $CD4^+CD25^+$  regulatoire T-cellen, alsook de perifere samenstelling van responder en Treg T-celpopulaties op te helderen. Daarbij werd gekeken naar mogelijke verschillen tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten. Onze resultaten geven aan dat  $CD4^+CD25^-$  en  $CD4^+CD25^+$  regulatoire T-cellen, in zowel gezonde controles als MS-patiënten, met vergelijkbare zuiverheid uit perifere bloed geïsoleerd kunnen worden en dat de frequentie van  $CD4^+CD25^+$  en  $CD4^+CD25^{high}$  T-cellen in geïsoleerde  $CD4^+$  T-cellen eveneens vergelijkbaar was in gezonde controles en MS-patiënten. Tregs van gezonde controlepersonen vertoonden een *in vitro* suppressieve capaciteit die gecorreleerd was aan hun anergisch fenotype. Tregs van het merendeel van de RR-MS-patiënten daarentegen vertoonden een gereduceerde suppressie van proliferatie van  $CD4^+CD25^-$  responder T-cellen en behielden hun anergie niet. Bij alle SP-MS-patiënten kon wel een optimale suppressorfunctie aangetoond worden.

Studie van de *myelin basic protein* (MBP) reactiviteit van  $CD4^+$  en  $CD4^+CD25^-$  T-cellen geïsoleerd uit gezonde controlepersonen gaf aan dat Tregs in de  $CD4^+$  T-celpopulatie in staat zijn de antigeen responsen van de responder T-cellen te onderdrukken. De anti-MBP reactiviteit in gezonde controlepersonen vertoonde een Th0 cytokine profiel (IFN- $\gamma$  en IL-4). De responsen tegen tetanus toxoid (TT) werden niet door Tregs onderdrukt werden en vertoonden een Th1 profiel. De analyse van de MBP reactiviteit van de  $CD4^+$  en  $CD4^+CD25^-$  T-cellen van één MS-patiënt gaf eveneens indicaties voor suppressie van anti-myeline responsen door Tregs. Het cytokine profiel van de MBP-reactieve T-cellen was daarbij meer Th1 (IFN- $\gamma$ ) van aard. De anti-TT T-cel respons in deze MS-patiënt was vergelijkbaar met de reactiviteit en het cytokine profiel aangetoond bij gezonde controlepersonen.

De analyse van de V $\beta$ -genexpressie van  $CD4^+CD25^-$ ,  $CD4^+CD25^{low}$  en  $CD4^+CD25^{high}$  T-cellen van gezonde controlepersonen en MS-patiënten toonde aan dat de verschillende T-cel

populaties een zeer breed en divers TCR V $\beta$ -gen repertoire vertoonden. Het V $\beta$ -genprofiel van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-celpopulaties van de gezonde controlepersonen en MS-patiënten onderling was vergelijkbaar. Er konden geen duidelijke verschillen geobserveerd worden tussen gezonde controlepersonen en MS-patiënten.

Onze experimentele bevindingen geven aan dat in RR-MS-patiënten een verstoorde suppressor functie door CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen uitgeoefend wordt. Dit werd ook vastgesteld in eerder uitgevoerde studies ter analyse van de suppressieve capaciteit van bead-geïsoleerde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen en/of FACS-sort geïsoleerde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatoire T-cellen (25,60). Een aantal RR-MS-patiënten vertoonden echter een suppressie profiel dat vergelijkbaar was met gezonde controlepersonen. SP-MS-patiënten vertoonden algemeen een meer normaal suppressie profiel, vergelijkbaar met gezonde controle personen. Bij RR-MS-patiënten is het optreden van een verstoorde suppressorfunctie mogelijk afhankelijk van het ziektestadium. De ziekteprocessen zijn eerder inflammatoir van aard terwijl in het progressieve stadium van de ziekte neurologische degeneratie een meer dominante rol gaat spelen. Daar SP-MS-patiënten eveneens een RR-voorgeschiedenis hebben is het mogelijk dat de suppressorfunctie van Tregs tijdens de initiële fase van het ziekteproces bij deze SP-MS-patiënten eveneens verstoord was en zich later hersteld heeft. Dit is echter niet te achterhalen uit deze studie. Het uitvoeren van longitudinale studies zou dit kunnen ophelderen.

In deze thesis werd gebruik gemaakt van anti-CD25 gekoppelde magnetische beads waarmee, via een positieve selectie methode, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen met een hoge zuiverheid geïsoleerd konden worden. Flowcytometrische analyse gaf daarbij aan dat de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cel populatie zeer divers was in de intensiteit van CD25 kleuring en dus zowel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatoire T-cellen bevatte. Een kritische factor in deze studie was het uitsluiten dat verstoorde suppressie te wijten kon zijn aan een verminderde frequentie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en/of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen in plaats van aan een functioneel defect van deze T-cellen. Via flowcytometrie kon worden aangetoond dat de frequentie van zowel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatoire T-cellen in geïsoleerde CD4<sup>+</sup> T-cellen vergelijkbaar was voor gezonde controlepersonen, RR-MS-patiënten en SP-MS-patiënten (47). De suppressieve functie van Tregs wordt echter toegeschreven aan CD4<sup>+</sup> T-cellen met een zeer hoge expressie van CD25 (CD25<sup>high</sup>). Ondanks een verrijking in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cel populatie na de magnetische bead selectie methode is er tot heden

onduidelijkheid of  $CD4^+CD25^{low}$  T-cellen zouden kunnen interfereren in het suppressiemechanisme van hun  $CD25^{high}$  analogen (62). Eerdere bevindingen van de onderzoeksgroep tonen echter aan dat FACSgesorteerde  $CD4^+CD25^{high}$  T-cellen van RR-MS-patiënten eveneens een verstoorde suppressie vertoonden (25).

Om de suppressieve capaciteit van  $CD4^+CD25^+$  regulatoire T-cellen bij gezonde controles en MS-patiënten te evalueren werd enerzijds een klassieke [ $^3H$ ] thymidine incorporatie test en anderzijds CFSE labeling van de responder T-cellen uitgevoerd. De methoden geven beide een getrouwe weergave van de suppressieve capaciteiten van Tregs bij gezonde controlepersonen en MS-patiënten. Ze zijn bovendien significant gecorreleerd bij de verschillende responder T-cel : Tregs ratio's. CFSE labeling van de responder T-cellen heeft echter een aantal voordelen. Het specifiek labelen van de target celpopulatie zorgt ervoor dat proliferatie van de Tregs niet kan interfereren in de data. Bij de [ $^3H$ ] thymidine incorporatie test wordt immers de 'bulk' proliferatie van de gehele cultuur geëvalueerd. Indien de Tregs hun anergie niet behouden hebben, zullen de data die bij deze klassieke methode gegenereerd worden geen goede interpretatie zijn van de juiste proliferatie van de responder T-cellen. Ook is een CFSE labeling veel gevoeliger dan [ $^3H$ ] thymidine incorporatie zodat proliferatie van responder T-cellen, die gevoelig zijn voor lagere concentraties antigeen respons, eveneens gedetecteerd kan worden. Een laatste voordeel is de combinatie van CFSE labeling met verdere flowcytometrische analyses. Door gebruik te maken van antilichamen tegen oppervlaktmoleculen, bijvoorbeeld CD25 of een viabiliteitsmerker 7-AAD, kan uitermate efficiënt het fenotype van de cellen geanalyseerd worden. Het specifiek volgen van de proliferatie van de responder T-celpopulatie was belangrijk voor het evalueren van de suppressieve capaciteit van Tregs bij RR-MS-patiënten. In beide analysemethoden werden de coculturen van  $CD4^+CD25^-$  responder T-cellen en  $CD4^+CD25^+$  regulatoire T-cellen gestimuleerd met anti-CD3 antilichaam. Deze polyklonale TCR stimulus veroorzaakt een patiënt-afhankelijke activatie van alle T-cellen. Flowcytometrie toonde aan dat de geactiveerde T-cellen nu ook CD25 tot expressie brachten (data niet getoond). Wanneer gebruik gemaakt wordt van een polyklonale T-cel stimulus is de gevoeligheid van beide methoden vergelijkbaar. Indien  $CD4^+CD25^-$  responder T-cellen prolifereren in respons op een antigeen specifieke T-cel stimulus, zou het gebruik van de CFSE labelingsmethode aangewezen zijn daar deze veel gevoeliger is voor dit type experimenten zodat specifiek de proliferatie van de antigeen reactieve T-cellen opgevolgd kan worden.

Het gemiddelde percentage suppressie bij RR-MS-patiënten, gemeten met behulp van CFSE labeling, was significant verschillend met dat van SP-MS-patiënten. Hoewel de suppressie bij RR-MS-patiënten lager was, kon geen significant verschil in gemiddelde suppressie van RR-MS-patiënten met gezonde controlepersonen aangetoond worden. Dit verschil was wel significant wanneer de suppressor functie van Tregs geëvalueerd werd met behulp van de [<sup>3</sup>H] thymidine incorporatie test. Een verklaring hiervoor is het lage aantal gezonde controlepersonen dat geëvalueerd werd bij CFSE labeling. Eveneens bleek dat voor het bepalen van het percentage gemiddelde suppressie bij de CFSE labelingsmethode 2 van de 6 geanalyseerde RR-MS-patiënten een normaal suppressie patroon vertoonden, zoals aangetoond werd met [<sup>3</sup>H] thymidine incorporatie. Wanneer dit in rekening gebracht wordt, zou eveneens een significant verschil in suppressie tussen RR-MS-patiënten en gezonde controlepersonen aangetoond kunnen worden.

In de huidige hypothese van MS wordt verondersteld dat bepaald kandidaat auto antigenen, zoals *myelin basic protein* (MBP) en *myelin oligodendrocyt protein* (MOG), een belangrijke rol spelen in de T-cel gemedieerde suppressie. Om te bepalen of de verstoorde Treg functie in MS, die optreedt indien de T-cellen polykloonaal gestimuleerd worden, ook aanwezig en aantoonbaar is wanneer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen antigeen specifiek gestimuleerd worden, werd het voorkomen en het cytokine expressie profiel van Ag-specifieke reactieve T-cellen van gezonde controlepersonen en MS-patiënten bestudeerd. Hiervoor werden twee methoden aangewend, namelijk een split well assay en een CFSE labeling. Bij beide methoden werd gekeken naar het optreden van proliferatie van de gezuiverde T-celfracties wanneer deze in cultuur werden gebracht met hetzij autologe, bestraalde, niet gepulste PBMC of hetzij autologe, bestraalde PBMC, gepulst met MBP, MOG of TT als controle antigeen. Met de *split well assay* konden geen specifieke antigeen responsen gedetecteerd worden en op basis hiervan werd besloten verder te werken met CFSE labeling van de responder T-cellen als alternatieve methode. Bij deze labelingsmethode werden de experimenten uitgevoerd in 24 well-platen, dit kan als voordeel geven dat de responder T-cellen en feederzellen in grotere hoeveelheden aanwezig zijn per well en also optimalere antigeen presentatie en respectievelijke antigeen reactiviteit tot gevolg hebben. Via flowcytometrische analyse kon vastgesteld worden dat MBP reactieve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen van gezonde controlepersonen een optimale proliferatie vertoonden op dag 10. Deze anti-MBP responsen waren niet of verminderd aanwezig in de CD4<sup>+</sup> T-cel populatie. Tegen MOG werd op dag 10 weinig tot geen reactiviteit vastgesteld, mogelijk omwille van een te lage frequentie van MOG reactieve

T-cellen in perifeer bloed zodat detectie van deze T-cellen moeilijk is. Hieruit kan geconcludeerd worden dat depletie van Tregs leidt tot een stijging in myeline reactiviteit. Dit geeft een indicatie dat Tregs betrokken zijn bij de onderdrukking van T-celgedemedieerde anti-myeline responsen. Depletie van Tregs leidt niet tot een stijging in anti-TT T-cel respons. Dit past in de hypothese waarin lichaamsvreemde antigenen, zoals TT, niet onderdrukt worden door Tregs.

Anti-myeline responsen van CD4<sup>+</sup> T-cellen van één MS-patiënt konden niet gedetecteerd worden. Er kon geen anti-MOG T-celreactiviteit waargenomen worden in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-celpopulatie terwijl anti-MBP T-cel reactiviteit wel aanwezig was. Deze bevindingen geven aan dat ook in MS-patiënten depletie van Tregs mogelijkwijs leidt tot een stijging van myeline reactiviteit. Responsen tegen TT konden in beide T-celpopulaties met vergelijkbare intensiteit aangetoond worden waardoor deze patiënt hetzelfde reactiviteitsprofiel voor TT bezit als gezonde controlepersonen. Antigeen reactiviteit voor MBP, MOG of TT in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen van MS-patiënten werd slechts in één patiënt geanalyseerd aangezien de antigeen reactiviteit in de MS-patiënten geanalyseerd werd met T-cellen die gedurende korte tijd ingevroren waren in vloeibare stikstof (N<sub>2</sub>). Mogelijk waren de cellen gevoelig voor het invriezen waardoor de respons niet optimaal was. Voorts vertoonde deze patiënt een normaal, maar wel lager suppressie profiel wanneer de functionele capaciteit van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen na polyklonale stimulus geëvalueerd werd door middel van een [<sup>3</sup>H] thymidine incorporatie test. Data van MS-patiënten betreffende antigeen reactiviteit werden mogelijk beïnvloed door deze factoren en om deze resultaten te bevestigen is verder onderzoek aangewezen om na te gaan op welk niveau een verstoring plaatsvindt.

Indien antigeen reactieve CD4<sup>+</sup> en CD25<sup>-</sup> responder T-cellen op dag 10 via flowcytometrische analyses aangetoond konden worden, werd het cytokine profiel van deze T-cellen met behulp van intracellulaire cytokinekleuring bepaald. Op basis van de expressie van IFN- $\gamma$  en IL-4 zou eerder vastgesteld kunnen worden dat de CD4<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen van gezonde controlepersonen een Th0 cytokine profiel vertonen, waarbij zowel IFN- $\gamma$  als IL-4 producerende T-cellen aangetoond kunnen worden. Bij gezonde controlepersonen konden bij MBP reactieve, MOG reactieve en TT reactieve T-cellen geen IL-10 producerende T-cellen vastgesteld worden. In een eerder uitgevoerde studie werd bij MBP reactieve T-cellen eveneens expressie van IFN- $\gamma$ , IL-4 en een beetje IL-10 aangetoond (63). Echter gaat het hier om MBP peptiden terwijl in deze thesis MBP niet in de vorm van peptiden wordt gepresenteerd maar als geheel eiwit. Het ontbreken van IL-10 productie zou eventueel ook te



wijten kunnen zijn aan een suboptimale werking van het antilichaam. Onafhankelijke experimenten met het IL-10 antilichaam geven indicaties dat dit antilichaam voor dit type experimenten niet bruikbaar is. De CD4<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> responder T-cellen van MS-patiënten daarentegen vertonen een Th1 cytokine profiel. Daar het cytokine profiel van slechts één MS-patiënt (RR-MS) geëvalueerd werd, kan deze veronderstelling pas bevestigd worden indien verdere experimenten met antigeen reactieve T-cellen van MS-patiënten plaatsvinden. Een verdere uitbreiding van het concept suppressie door Tregs kan gemaakt worden door het in cultuur brengen van gekloneerde CD4<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen met autologe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T-cellen. In een initieel experiment werden de responder T-cellen daarvoor eerst gesorteerd met een FACS sorter, vervolgens gekloneerd aan 1 en 5 cellen per well met PHA en IL-2 stimuli en uiteindelijk in cultuur gebracht met autologe Tregs en feederzellen. Deze opzet kon voor deze thesis niet volbracht worden omwille van suboptimale groei van de T-cel klonen. Bijgevolg is het aangewezen deze experimentele opzet te herhalen.

In deze studie werd ook het V $\beta$ -gen repertoire van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD25<sup>low</sup> en CD25<sup>high</sup> T-cellen bepaald. Er kon worden aangetoond dat binnen de groep van gezonde controlepersonen alsook MS-patiënten, geen vergelijkbaar V $\beta$ -gen expressie profiel aanwezig was van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-celpopulaties. Een onderlinge vergelijking per T-celpopulatie van gezonde controlepersonen of MS-patiënten gaf wel aanwijzingen dat het V $\beta$ -gen gebruik in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-celpopulatie beter overeenkwam dan het V $\beta$ -gen gebruik in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-celpopulatie. Eveneens werd in het merendeel van MS-patiënten (3/4) vastgesteld dat V $\beta$ -9 verhoogd of tot overrepresentatie kwam in de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-celpopulatie. Voor gezonde controles wordt verondersteld dat het V $\beta$ -gen repertoire van de verschillende subpopulaties T-cellen zeer breed van aard is. Dit suggereert dat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cellen in staat zijn tot herkenning van hetzelfde brede antigeen repertoire. Indien responder T-cellen reactief worden wanneer zij in contact komen met een specifiek antigeen, zou terzelfder tijd een signaal gegeven kunnen worden aan Tregs. De initiatie tot suppressie zou dan gerelateerd kunnen zijn aan de sterkte van het signaal, met andere woorden contact met een lichaamseigen of een lichaamsvreemd antigeen. Lichaamsvreemde antigenen leveren namelijk een sterkere stimulus en dit kan een signaal geven aan Tregs dat zij niet suppressief van aard zijn zodat een effectieve repons tegen het antigeen kan gevormd worden, zoals indirect aangetoond voor TT. Anderzijds kan ook het contact met de antigeen presenterende cel bepalend zijn voor het uitoefenen van suppressieve capaciteit door Tregs.

Op basis van onze bevindingen zou verondersteld kunnen worden dat op klonaal niveau een verstoring in responsiviteit van de responder T-celpopulatie ten opzichte van suppressie door Tregs optreedt. Dit werd echter tegengesproken door eerder uitgevoerde kruisexperimenten waarbij aangetoond werd dat Tregs van gezonde controlepersonen in staat waren de responder T-cellen van MS-patiënten te onderdrukken (25). De overrepresentatie van V $\beta$ -9 bij het merendeel van de MS-patiënten is in lijn met eerdere studies op PBMC niveau (64). De mogelijkheid bestaat dat V $\beta$ -9 in deze T-celpopulatie klonaal geëxpandeerd is maar het is onduidelijk of er reeds een verstoring ter hoogte van de thymus heeft plaatsgevonden.

De overeenkomst in V $\beta$ -gen expressie van de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-celpopulaties van zowel gezonde controlepersonen als MS-patiënten geeft een indicatie dat de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> T-celpopulatie, eerder dan de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen, onderdrukt wordt door de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-celpopulatie. Deze verklaring wordt verder gesteund door de mogelijkheid dat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-cellen na activatie kunnen evolueren naar een CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> fenotype, zijnde een recent geactiveerde responder T-celpopulatie. Een andere verklaring kan gevonden worden in de voorstelling van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen als uniforme T-celpopulatie afgaande op CD25 expressie. Om onduidelijkheden op klonaal niveau op te helderen is het aangewezen CDR3 lengtebepaling (spectratyping) toe te passen op de V $\beta$ -genen subfamilies binnen de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T-cellen van zowel gezonde controlepersonen als MS-patiënten. Zo kan bepaald worden of specifieke V $\beta$ -gen subfamilies van de respectievelijke T-celpopulaties een oligo- of monoklonale samenstelling vertonen. Aangezien onze resultaten niet in overeenstemming zijn met eerdere studies, waarin vastgesteld werd dat alle CD4<sup>+</sup> T-celsubpopulaties met een variërende expressie van CD25 een breed en vergelijkbaar V $\beta$ -gen expressie profiel vertonen, is het mogelijk dat de resultaten die gegenereerd werden in deze thesis niet representatief zijn omwille van PCR artefacten (59,65). Zo werd gezien dat V $\beta$ -4 bij zowel gezonde controlepersonen als MS-patiënten overgerepresenteerd wordt. Ook werd in deze thesis gekeken naar een expressie profiel op transcriptioneel niveau, terwijl andere studies gebruik hebben gemaakt van monoklonale antilichamen tegen V $\beta$ -gen producten. Mogelijk hebben posttranscriptionele en posttranslationele modificaties bijgedragen aan een veranderd V $\beta$ -gen expressie profiel.

Aangezien er nog veel onduidelijkheid heerst over het belang van deze factoren in de functionaliteit van Tregs is verder onderzoek hiervoor aangewezen.

Samengevat geven deze experimentele bevindingen aan dat in RR-MS-patiënten  $CD4^+CD25^+$  regulatoire T-cellen in dezelfde frequentie aanwezig zijn als bij gezonde controlepersonen maar een suboptimale *in vitro* suppressieve functie uitoefenen. In SP-MS-patiënten functioneerde de *in vitro* suppressieve capaciteit optimaal of beter dan bij de meerderheid van RR-MS-patiënten. De data geven aan dat activatie en proliferatie van myeline reactieve T-cellen in zowel gezonde controlepersonen als MS-patiënten gecontroleerd wordt door  $CD4^+CD25^+$  regulatoire T-cellen en dat de inflammatoire cytokineproductie door de respondercellen afgezwakt wordt door de aanwezigheid van Tregs. T-cellen van MS-patiënten vertonen daarbij eerder een Th1 fenotype met pro-inflammatoire cytokine productie ten opzichte van een Th0 fenotype bij gezonde controlepersonen, waarbij zowel pro- als anti-inflammatoire cytokines geproduceerd worden.

De analyse van de V $\beta$ -genen gaf indicaties voor een divers V $\beta$ -gen expressie profiel van  $CD4^+CD25^-$ ,  $CD25^{low}$  en  $CD25^{high}$  T-cellen van enerzijds gezonde controlepersonen en anderzijds MS-patiënten. Voor de  $CD4^+CD25^{low}$  en  $CD4^+CD25^{high}$  T-cellen kon een sterkere vergelijking worden vastgesteld dan voor beide T-celpopulaties met  $CD4^+CD25^-$  T-cellen. Opmerkelijk was wel de overexpressie van V $\beta$ -gen 9 in de  $CD4^+CD25^-$  T-celpopulatie van het merendeel van de MS-patiënten.

Onduidelijkheden over de generatie en de werking van  $CD4^+CD25^+$  regulatoire T-cellen blijven tot heden bestaan maar hun kritische rol in MS werd echter nogmaals bevestigd door de uitgevoerde experimenten en daarom is verder onderzoek naar deze subpopulatie van T-cellen aangewezen.

## 5 Referenties

1. Poser CM. The epidemiology of multiple sclerosis: A general overview. *Ann Neurol* 1994;36(S2):S180-S193.
2. Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis. *Immunologic Research* 2002;25(1):27-51.
3. Raine CS, Scheinberg LC. On the immunopathology of plaque development and repair in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1988;20:189-201.
4. Stinissen P, Raus J, Zhang J. Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: Role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit rev Immunol* 1997;17:33-75.
5. Prineas J. Pathology of the early lesion in multiple sclerosis. *Hum pathology* 1975;6:531-554.
6. Raine CS. Multiple sclerosis: A pivotal role for the T cell in lesion development. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1991;17:265-274.
7. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 1993;33:281-285.
8. Walsh EC, Guschwan-McMahon S, Daly MJ, Hafler DA, Rioux JD. Genetic analysis of multiple sclerosis. *J Autoimmun* 2003;21:111-116.
9. Sadovnick AD, Ebers GC. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can J Neurol Sci* 1993;20:17.
10. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:579-621.
11. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992;10:153-187.
12. Zhang J, Medaer R, Hashim GA, Chin Y, van den Berg-Loonen E, Raus J. Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity. *Ann Neurol* 1992;32:330-338.
13. Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990;346:183-187.
14. Pette M, Fujita K, Wilkinson D, Altmann DM, Trowsdale J, Giegerich G, Hinkkanen A, Epplen JT, Kappos L, Wekerle H. Myelin autoreactivity in multiple sclerosis:

recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7968-7972.

15. Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA. Increased frequency of interleukine 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994;179:973-984.
16. Allegretta M, Nicklas JA, Sriram S, Albertini RJ. T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* 1990;247:718-721.
17. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T-cell mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695-705.
18. Zhang J, Vandevyver C, Stinissen P, Mertens N, Berg-Loonen E, Raus J. Activation and clonal expansion of human myelin basic protein-reactive T cells by bacterial superantigens. *J Autoimmun* 1995;8:615-632.
19. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med* 1998;187:537-546.
20. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-66.
21. Tuohy VK, Yu M, Yin L, Kawczak JA, Johnson JM, Mathisen PM, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP. The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* 1998;164:93-100.
22. Shrikant P, Beneviste EN. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol* 1996;157:1819-1822.
23. Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K. Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1995;1:732-743.
24. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. *Immunology* fifth edition. New York: W.H. Freeman and Company; 2003.
25. Venken K, Hellings N, Hensen K, Rummens JL, Medaer R, Raus J, Stinissen P. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells isolated from patients with relapsing-remitting, but not chronic progressive multiple sclerosis show a reduced suppressive capacity and FOXP3 expression (ingediend ter publicatie).

26. Groux H, et al. A CD4<sup>+</sup> T cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742.
27. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:68-79.
28. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001;3(11):947-54.
29. Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med*. 2001 Sep;7(9):1052-6.
30. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004;114:1198-1208.
31. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* 1996;184:387-396.
32. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunological self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-1164.
33. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998;160:1212-1218.
34. Baecher-Allan C, Hafler DA. Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med* 2004;200(3):273-276.
35. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969-1980.
36. Lombardi G, Sidhu S, Batchelor R, Lechler R. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* 1994;264:1587-1589.
37. Taams LS, van Rensen AJ, Poelen MC, van Els CA, Besseling AC, et al. Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell. *Eur J Immunol* 1998;28:2902-2912.
38. Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance

- and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22(17):1-32.
39. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-190.
  40. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukine 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;190:995-1004.
  41. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependant immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001;194:629-644.
  42. Fehérvári Z, Sakaguchi S. CD4<sup>+</sup> Tregs and immune control. *J Clin Invest* 2004;114(9):1209-1217.
  43. Thornton AE, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukine 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-296.
  44. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8<sup>+</sup> T cells activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001;167:1137-1140.
  45. Ermann J, Szanya V, Ford GS, Paragas V, Fathman CG, Lejon K. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells facilitate the induction of T cell anergy. *J Immunol* 2001;167:4271-4275.
  46. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells downregulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1538-1543.
  47. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-1253.
  48. Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. De novo generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> regulatory T cells from human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells. *PNAS* 2005;102 (11):4103-4108.
  49. Baecher-Allan CA, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Sem Immunol* 2004;16:89-97.
  50. Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J. Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *PNAS* 2005;102 (11):4091-4096.
  51. Tang Q, Hendriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB, Bluestone JA. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2003;171:3348-3352.

52. Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Trends in Immunol* 2004;25(7):374-380.
53. Takahashi T, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192:303-310.
54. Stephens GL, et al. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2004;172:7306-7314.
55. Maloy KI, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001;2(9):816-822.
56. Jordan MS, et al. Thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001;2:301-306.
57. Shevach EM. Certified professionals: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *J Exp Med* 2001;193(11):41-45.
58. Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by natural regulatory T cells. *Adv Immunol* 2003;81:329-369.
59. Kasow KA, Chen X, Knowles J, Wichlan D, Handgretinger R, Riberdy JM. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells share equally complex and comparable repertoires with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> counterparts. *J Immunol* 2004;172:6123-6128.
60. Viglietta V, Baecher-Allan CA, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004;199:971-979.
61. Deibler GE, Martenson RE, Kies MW. Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species. *Prep Biochem* 1972;2:139-165.
62. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Clin immunol* 2005;115:10-18.
63. Tejada-Simon MV, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ. Reactivity pattern and cytokine profile of T cells primed by myelin peptides in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol* 2001;31:907-917.
64. Muraro PA, Bonanni L, Mazzanti B, Pantalone A, Traggiai E, Massacesi L, Vergelli M, Gambi D. Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing-remitting MS. *J Neuroimmunol* 2002;127:149-159.



65. Taams LS, Vukmanovic-Stejic M, Smith J, Dunne PJ, Fletcher JM, Plunkett FJ, Ebeling SB, Lombardi G, Rustin MH, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, Salmon M, Akbar AN. Antigen-specific suppression by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002;32:1621-1630.