

Morfologische en CNP-gerelateerde effecten van simvastatine op OLN-93 cellen

Kim RUBENS

promotor :
Prof. dr. Marcel AMELOOT

co-promotor :
Prof. Dr. Paul STEELS

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	I
Voorwoord	II
Figurenlijst	III
Tabellenlijst.....	IV
Samenvatting.....	V
Afkortingen	VI
Inleiding	1
1. Oligodendrocyten	1
1.1 Maturatie	1
2. Myeline en myelinisatieproces.....	2
2.1 Het myelineproteïne CNP	3
2.1.1 Structuur	3
2.1.2 Lokalisatie	4
2.1.3 Functie.....	5
2.1.4 Interactie CNP-cytoskelet	5
3. Multiple Sclerose.....	7
3.1 Statines	8
3.1.1 Positieve effecten van statines op oligodendrocyten.....	10
3.1.2 Negatieve effecten van statines op oligodendrocyten	10
Hypothese.....	11
Materialen en methoden	12
1. Celkweek.....	12
2. Behandeling met simvastatine.....	12
3. Morfologische studie.....	14
4. Immunofluorescentie.....	14
5. Western blotting	15
5.1 Lyseren van OLN-93 cellen	16
5.2 Bradford assay ter bepaling van het proteïnegehalte	16
5.2.1 Methode.....	16
5.3 Scheiding membranaire/cytosolaire fractie	17
5.4 SDS-PAGE.....	17
5.5 Elektroblootting en kleuring met antilichamen	18
6. Coomassieblauw-kleuring.....	19
6.1 Geldigestie.....	19
7. Statistische verwerking van data	20
Resultaten	21
1. Morfologische karakterisatie.....	21
1.1 Bodipy FL-C5	21
1.2 Bepaling van het gemiddeld oppervlak van OLN-93 cellen	22
1.3 Morfologische classificatie	24
2. Immunofluorescentie.....	26
2.1 Expressie van tubuline	26
2.2 Expressie van CNP.....	28
3. Optimalisatie van de Western blotting	29
Discussie.....	35
Bijlage	40
Referentielijst	42

Voorwoord

Nu ik na vier jaar hard werken op het punt sta af te studeren, wil ik graag iedereen bedanken die mij geholpen heeft bij de verwezenlijking van mijn thesis.

Allereerst wil ik mijn begeleidster Dra. Inge Smolders extra in de bloemetjes zetten voor de praktische begeleiding in een uitermate toffe sfeer, de bemoedigende schouderklopjes tijdens het verloop van de stageperiode, de bereidwilligheid om mijn probleempjes en vraagjes op te lossen, en het lezen en verbeteren van mijn thesis.

Ook mijn promotor Prof. Dr. Marcel Ameloot wil ik danken voor het mogelijk maken van mijn stage, en voor het nalezen, verbeteren en beoordelen van mijn thesis.

Mijn copromotor Prof. Dr. Paul Steels zou ik eveneens graag willen bedanken voor het nalezen van mijn thesis.

Dr. Ilse Smets wil ik graag bedanken voor de beoordeling van mijn thesis.

Tot slot wil ik alle andere leden van de afdeling fysiologie danken voor de toffe opvang, de fijne momenten en de altijd lachende gezichten.

Verder nog dank aan Debbie en de overige medewerkers van BIOMED voor hun hulp in het labo en het beantwoorden van al mijn vragen.

Natuurlijk mag ik ook mijn medestudenten Ann, Debby, Mieke en Nick niet vergeten te vermelden voor de supertoffe tijd in het labo en op ons bureautje.

Ook mijn beste vriendinnetje Katrien wil ik bedanken voor de toffe gesprekjes tijdens de middag die een sombere dag weer deden opfleuren.

Heel in het bijzonder wil ik mijn familie bedanken voor de steun en het luisterend oor wanneer alles een beetje tegen zat. Ook mijn vriend Bjorn wil ik even speciaal vermelden voor de ontspannende momenten wanneer de examenstress naar bovenkwam.

Kortom bedankt iedereen !!!!!

Figurenlijst

Figuur 1.	Schematische voorstelling van de ontwikkeling van de oligodendrocyt.	2
Figuur 2.	Schematische weergave van een oligodendrocyt.	3
Figuur 3.	Structuur van farnesyl en geranylgeranyl.	4
Figuur 4.	Lokalisatie van het myelineproteïne CNP in de oligodendrocyten.	5
Figuur 5.	Blokkering van de cholesterolbiosynthese en synthese van isoprenoïdintermediären door statines.	8
Figuur 6.	Helder-veld-beeld van OLN-93 cellen gekweekt onder controle-omstandigheden.	13
Figuur 7.	Schematische voorstelling van indirecte immunokleuring van CNP.	15
Figuur 8.	Gebruik van Bodipy FL-C5 om de fijnste vertakkingen zichtbaar te maken.	22
Figuur 9.	De invloed van simvastatine op het gemiddeld celoppervlak van OLN-93 cellen.	23
Figuur 10.	Morfologische classificatie van controlecellen en behandelde cellen.	25
Figuur 11.	Indirecte immunokleuring van controlecellen en behandelde cellen met anti-tubuline.	27
Figuur 12.	Indirecte immunokleuring van controlecellen en behandelde cellen met anti-CNP.	28
Figuur 13.	Expressie van CNP en de isoprenylatiestatus van CNP in controlecellen en in cellen behandeld met 1 μ M 48h.	30
Figuur 14.	Expressie van tubuline, CNP en de isoprenylatiestatus van CNP in controlecellen en behandelde cellen.	31
Figuur 15.	Expressie van tubuline, CNP en de isoprenylatiestatus van CNP in controlecellen en behandelde cellen na scheiding in membraanire en cytosolaire fractie.	33

Tabellenlijst

Tabel 1.	Overzicht van de simvastatinebehandelingen.	13
Tabel 2.	Standaard BSA-oplossingen.	17
Tabel 3.	Primaire (Ab ₁) en secundaire (Ab ₂) antilichamen gebruikt bij Western blotting.	18

Samenvatting

In de demyeliniserende aandoening Multiple Sclerose (MS) worden de oligodendrocyten aangetast. Eerder recent worden statines naar voren geschoven als mogelijke behandeling voor MS. Statines inhiberen de cholesterolsynthese alsook de aanmaak van isoprenoïdintermediären die gebruikt worden voor de post-translationele modificatie van proteïnen. CNP is een geïsooprenyleerd myelineproteïne dat een rol speelt bij de vorming van uitlopers tijdens het myelinisatieproces. Dit zou te wijten kunnen zijn aan de interactie met het cytoskelet (microtubuli) wat leidt tot de reorganisatie ervan dat nodig is om veranderingen in de celmorfologie te garanderen. Het doel van deze studie is het bestuderen van de morfologische en CNP-gerelateerde effecten van simvastatine op oligodendrocyten. De interferentie met de isoprenylatie van CNP door simvastatine zou een nefast effect kunnen hebben op de vorming van uitlopers door oligodendrocyten wat essentieel is voor het (re)myelinisatieproces. Voor dit onderzoek wordt de OLN-93 cellijn blootgesteld aan submicromolaire concentraties simvastatine (0.1 μM en 1 μM) en dit gedurende een tijdsperiode van 24 en 48 uur. Deze cellijn wordt beschouwd als een bruikbaar modelsysteem voor oligodendrocyten omwille van de expressie van GalC, NG₂, MBP, MAG, PLP en CNP. Simvastatine wordt met het oog op behandeling van MS gekozen omwille van het lipofiel karakter waardoor migratie doorheen de bloedhersenbarrière mogelijk is. Op morfologisch vlak zorgt de behandeling met simvastatine voor een afname van het gemiddeld celoppervlak die concentratie-afhankelijk is. Een significant verschil tussen 24 uur en 48 uur simvastatinebehandeling kan niet worden waargenomen. Hierbij wordt vastgesteld dat behandeling zorgt voor een afname van het aantal cellen met een vertakte morfologie en vele uitlopers, en een toename van cellen met een meer bi-/tripolair karakter. Hoe zwaarder de behandeling, hoe lager de vertakkingsgraad. Immunofluorescentie duidt zowel in de controlecellen als in de behandelde cellen de aanwezigheid van CNP aan. De gedane experimenten om de isoprenylatiestatus van CNP na simvastatinebehandeling na te gaan, leveren geen bewijs voor eventuele wijzigingen op dit niveau. Ook onder controle-omstandigheden kan dit niet worden aangetoond. Concluderend kan worden gesteld dat behandeling met simvastatine wel degelijk een negatieve invloed heeft op de vorming van uitlopers door oligodendrocyten. Of dit te wijten is aan de inhibitie van de isoprenylatie is nog niet helemaal duidelijk.

Afkortingen

APC:	antigen-presenterende cellen
BHB:	bloedhersenbarrière
BSA:	bovine serum albumine
CNP:	<i>2',3'-Cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase</i>
COP-1:	copolymeer-1
Cys:	cysteïne
CZS:	centraal zenuwstelsel
DAB:	3,3'-diaminobenzidine
DIV:	dagen <i>in vitro</i>
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagles medium</i>
EAE:	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EDTA:	ethyleendiaminetetra-azijnzuur
EGTA:	ethyleen glycol-bis (beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetra-azijnzuur
FCS:	<i>fetal calf serum</i>
FPP:	<i>farnesylpyrophosphate</i>
GalC:	<i>galactosylceramide</i>
GGPP:	<i>geranylgeranylpyrophosphate</i>
GLP:	<i>glucagon-like peptide</i>
GPP:	<i>geranylpyrophosphate</i>
GTP:	<i>guanine triphosphate</i>
HMG-CoA:	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HRP:	<i>horse radish peroxidase</i>
Hsp:	<i>heat shock protein</i>
Ile:	isoleucine
IL:	interleukine
IFN:	interferon
LFA-1:	<i>leukocyte function antigen-1</i>
MAG:	<i>myelin associated glycoprotein</i>
MBP:	<i>myelin basic protein</i>
MCP-1:	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MHC II:	<i>major histocompatibility complex class II</i>

MMP:	matrix metalloproteïnase
MOG:	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
MRI:	<i>molecular resonance imaging</i>
MS:	multiple sclerose
NP-40:	nonidet P40
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i>
PGA:	<i>prolong gold antifade</i>
PLL:	poly-L-lysine
PLP:	<i>proteolipid protein</i>
P/S:	penicilline/streptomycine
PVDF:	polyvinylidifluoride
PZS:	perifeer zenuwstelsel
ROI:	<i>region of interest</i>
RR-MS:	<i>relapsing-remitting</i> multiple sclerose
SDS-PAGE:	sodiumdodecylsulfaat-polyacrylamide gel elektroforese
SVZ:	subventriculaire zone
Thr:	threonine
T_{h1}-cellen:	T-helper 1 cellen
T_{h2}-cellen:	T-helper 2 cellen
TIMP:	<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>

Inleiding

1. Oligodendrocyten

Oligodendrocyten zijn verantwoordelijk voor de productie van het myeline rond de axonen in de hersenen.¹ Eén enkele oligodendrocyt kan meerdere axonen met segmenten van myeline omgeven en op hetzelfde axon kunnen opeenvolgende myelinesegmenten tot verschillende oligodendrocyten behoren. Deze segmenten hebben een lengte van 150 tot 200 μm .² Oligodendrocyten vormen een dikkere myelineschede rond axonen met een grotere diameter. Hierdoor wordt gesuggereerd dat de axonen het aantal myelinelagen, gevormd door één enkele oligodendrocytuitloper, kunnen bepalen door middel van het uitsturen van signalen.² Dit is belangrijk omdat één enkele oligodendrocyt meerdere axonen met verschillende diameters moet kunnen myeliniseren. De oligodendrocyten vertonen eveneens flexibiliteit in de aanmaak van het myeline waardoor een afname van het aantal oligodendrocyten niet noodzakelijk aanleiding geeft tot een reductie van de hoeveelheid myeline.²

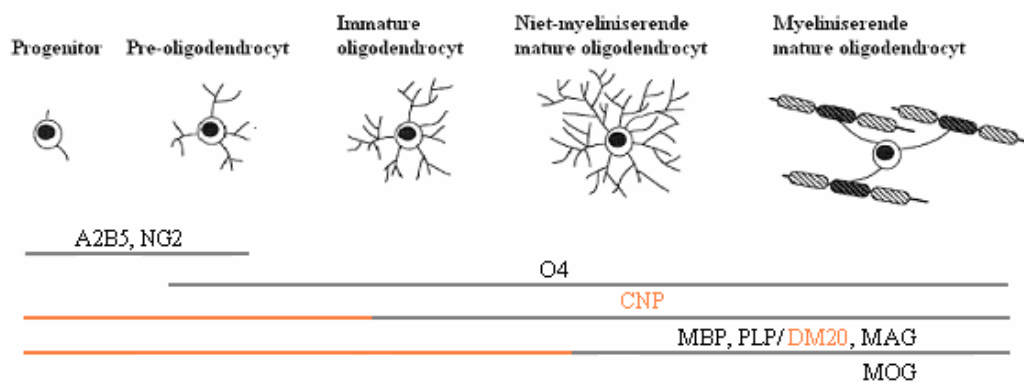
Om de myelineschede te vormen, ontwikkelen de oligodendrocyten in de vroege fase van het myelinisatieproces sterk vertakte uitlopers ondersteund door een uitgebreid cytoskeletnetwerk (microtubuli/microfilamenten).^{3,4}

1.1 Maturatie

Oligodendrocytprecursoren ontstaan zeer vroeg in het leven van het embryo uit neuro-epitheliale cellen van de ventriculaire zones. Deze precursoren groeien in de subventriculaire zone (SVZ) verder uit tot oligodendrocytprogenitoren met een bipolaire morfologie (Figuur 1).² Vervolgens migreren deze progenitoren weg van de SVZ om in de ontwikkelende hersenen het myeline te vormen. In het centraal zenuwstelsel (CZS) zullen de progenitoren differentiëren tot myelinevormende oligodendrocyten. Differentiatie houdt niet alleen morfologische veranderingen in maar ook een wijziging in proteïne-expressie.²

De karakterisatie van een aantal specifieke merkers heeft de kennis over de maturatiestadia van de oligodendrocyten zowel *in vivo* als *in vitro* doen toenemen (Figuur 1). De bipolaire progenitor brengt glycolipiden tot expressie waaraan de monoklonale antilichamen A₂B₅ en NG₂ kunnen binden. Progenitorcellen transformeren tot pre-oligodendrocyten, cellen met een vertakte morfologie die sulfatiden en glycolipiden tot expressie brengen die herkend worden door het monoklonaal antilichaam O₄.² De cellen worden immature oligodendrocyten

genoemd wanneer het sfgolipide *GalactosylCeramide* (GalC) en het eerste myelineproteïne *2',3'-Cyclic Nucleotide-3'-Phosphodiesterase* (CNP) tot expressie gebracht worden. *Myelin Basic Protein* (MBP), *ProteoLipid Protein* (PLP), *Myelin Associated Glycoprotein* (MAG) verschijnen achtereenvolgens en markeren een niet-myeliniserende oligodendrocyt. *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* (MOG) wordt geassocieerd met de laatste fase van het maturatieproces.²

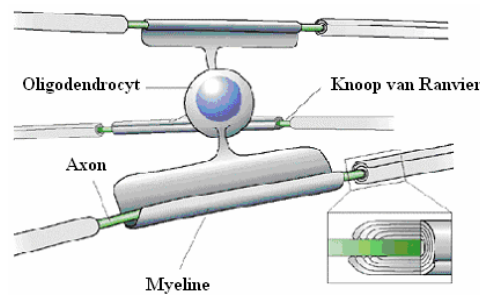


Figuur 1. Schematische voorstelling van de ontwikkeling van de oligodendrocyt. De in het oranje aangeduide merkers komen reeds van in het begin tot expressie op mRNA niveau, expressie op proteïneniveau volgt later (in het zwart aangeduid) (Aangepast uit Baumann et al. 2001).² CNP, *2',3'-Cyclic Nucleotide-3'-Phosphodiesterase*; MBP, *Myelin Basic Protein*; PLP, *Proteolipid Protein*; MAG, *Myelin Associated Glycoprotein*; MOG, *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*.

2. Myeline en myelinisatieproces

De myelineschede is een spiraalvormige, multilamellaire structuur gevormd door de extensie van het plasmamembraan, afkomstig van oligodendrocyten, die zich concentrisch rond de axonen wikkelt (Figuur 2). Op deze wijze worden de axonen in het CZS afgeschermd en geïsoleerd.⁵

Op regelmatige intervallen komen op de axonen niet-gemyeliniseerde segmenten voor, knopen van Ranvier genoemd (Figuur 2). Zenuwimpulsen worden via deze knopen op een snelle en efficiënte manier saltatorisch voortgeleid.⁶



Figuur 2. Schematische weergave van een oligodendrocyt waarvan de uitlopers verschillende axonen omgeven met myeline. De knopen van Ranvier zijn de niet-gemyeliniseerde tussensegmenten.⁷

Het myeline wordt zowel uit lipiden (70%) als uit myelineproteïnen (30%) opgebouwd.⁵ De myelineproteïnen MAG en CNP vertolken een belangrijke rol in het myelinisatieproces.^{3,8}

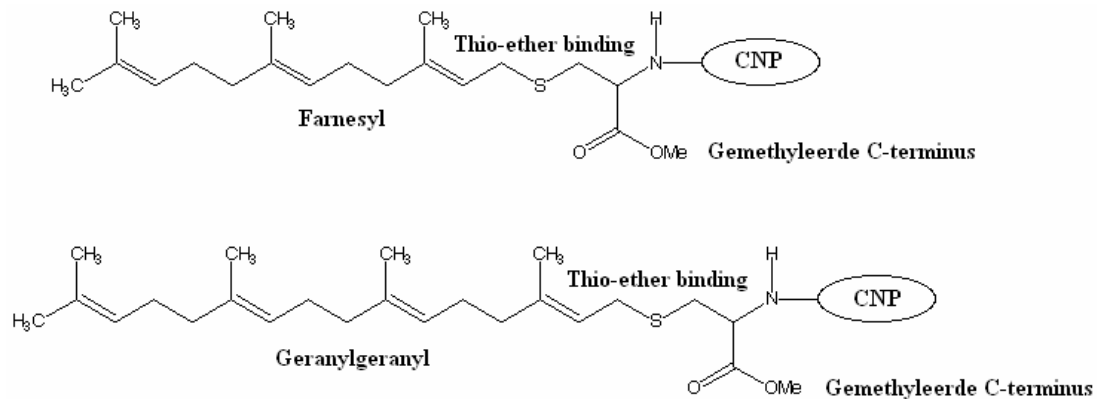
2.1 Het myelineproteïne CNP

CNP is een geïsooprenyleerd proteïne dat essentieel is voor het myelinisatieproces in het CZS.³ Hieronder zal de aandacht gevestigd worden op de structuur, lokalisatie en functie van dit myelineproteïne. Eveneens zullen enkele experimentele bevindingen worden aangehaald met betrekking tot de interactie van CNP met het cytoskelet.

2.1.1 Structuur

CNP komt voor in twee isovormen, CNP1 (46 kDa) en CNP2 (48 kDa), die tot stand komen door *alternative splicing*.^{1,2} CNP2 verschilt van CNP1 door een extensie van 20 aminozuren aan de N-terminus.^{1,9} Bij de mens en de rat wordt het CNP-gen respectievelijk op chromosoom 17 en chromosoom 10 teruggevonden.² Het COOH-uiteinde van CNP kan post-translationele modificaties ondergaan waaronder isoprenylatie (farnesylatie en geranylgeranylactie) (Figuur 3). In geval van het klassieke isoprenylatiemotief CAAX waarbij X overeenkomt met het aminozuur leucine wordt het proteïne gegeranylgeranyleerd; in de gevallen waar X een methionine, serine, alanine, cysteïne of een *Glucagon-Like Peptide (GLP)* voorstelt, wordt het proteïne gefarnesyleerd.¹⁰ CNP eindigt met een cysteïne gevolgd door drie aminozuren: threonine, isoleucine, isoleucine (Cys-Thr-Ile-Ile). Dit stemt niet overeen met het klassieke motief maar toch wordt het cysteïneresidu door middel van farnesyl of geranylgeranyl post-translationeel gemodificeerd door isoprenylatie via een thio-ether

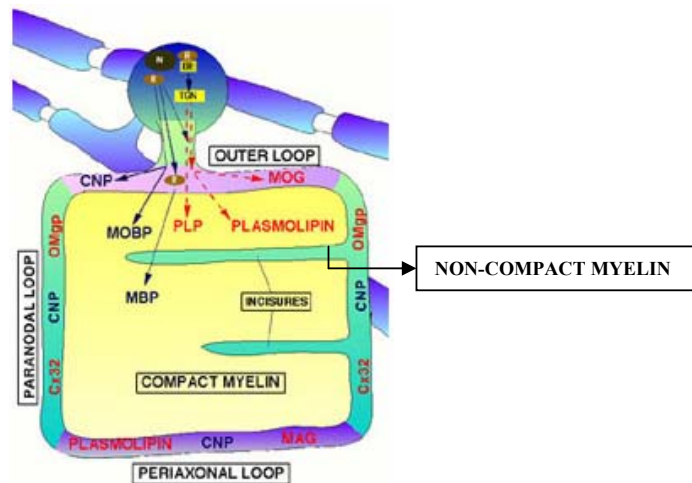
binding (Figuur 3).^{10,11} Door de isoprenylatie kan CNP in de afwezigheid van een uitgesproken hydrofoob domein toch met een hoge affiniteit aan membranen binden.^{9,12} In het geval van farnesylatie is een bijkomende methylatie van belang voor het verkrijgen van een meer hydrofoob karakter om associatie met membranen mogelijk te maken, terwijl bij geranylgeranylatie de methylatie minder belangrijk is voor membraanbinding (Figuur 3).¹³



Figuur 3. Structuur van farnesyl en geranylgeranyl. Farnesylatie en geranylatie leiden tot de post-translationele modificatie van CNP door isoprenylatie via een thio-etherbinding. Dit vergroot het hydrofoob karakter van CNP waardoor vasthechting aan membranen mogelijk wordt. Methylatie neutraliseert het negatief geladen carboxylaat.^{9,11,13} CNP, 2',3'-Cyclic Nucleotide-3'-Phosphodiesterase.

2.1.2 Lokalisatie

CNP wordt gesynthetiseerd op de vrije ribosomen in het cellichaam van de oligodendrocyten.^{1,14} Dit proteïne maakt 4 tot 5% uit van de totale hoeveelheid myelinecomponenten en is aanwezig in het niet-compacte myeline (Figuur 4).^{1,14,15} CNP wordt teruggevonden in het cellichaam van de oligodendrocyten, vooral nabij het plasmamembraan en in de oligodendrogliale uitlopers ter hoogte van de paranodale, peri-axonale en *outer loops* (Figuur 4).^{14,15} Er bestaat eveneens een cytoplasmatische pool van CNP in het niet-compacte myeline.^{2,10} Tevens is dit proteïne aanwezig, maar dan in mindere mate, in het myeline van het perifeer zenuwstelsel (PZS) en in een aantal andere weefsels zoals bloedplaatjes, lymfocyten, de milt en de thymus. CNP is het eerste myelineproteïne dat tot expressie gebracht wordt door de ontwikkelende oligodendrocyt.^{9,10}



Figuur 4. Lokalisatie van het myelineproteïne CNP in de oligodendrocyten.¹⁵

2.1.3 *Functie*

CNP kan de hydrolyse van 2',3'-cyclische nucleotiden tot 2'-nucleotiden eindproducten katalyseren.⁵ Tot op heden wordt de relevantie van de *in vitro* katalytische activiteit van CNP in vraag gesteld omdat noch 2',3'-cyclische nucleotiden noch 2'-nucleotiden in gemyeliniseerde weefsels gedetecteerd kunnen worden.^{9,10}

Vóór het begin van de myelinisatie wordt CNP opgereguleerd in pre-myeliniserende oligodendrocyten en blijft nadien behouden. Dit expressiepatroon suggereert dat CNP een rol speelt bij het myelinisatieproces alsook bij het behoud van de myelineschede.³

2.1.4 *Interactie CNP-cytoskelet*

Braun et al. (1991) hebben aangetoond dat CNP geisoprenyleerd wordt in rat C6 glioma cellen en dat deze modificatie belangrijk is voor de binding van dit proteïne aan membranen.¹¹ Aanvullend op deze bevinding hebben De Angelis et al. (1994) vastgesteld dat de isoprenylatiestatus van CNP veranderingen in de celmorfologie teweegbrengt: de uitlopers verlengen en nemen toe in aantal.¹⁰ Deze morfologische veranderingen kunnen te wijten zijn aan het feit dat CNP een rol speelt bij de regulatie van het cytoskelet van de oligodendrocyten die leidt tot het proces van de myelinogenese. Het onderliggende mechanisme was toen nog niet bekend maar de hypothese werd geformuleerd dat CNP het cytoskelet op een indirecte manier kan beïnvloeden.¹⁰ Dat CNP inderdaad het cytoskelet kan beïnvloeden werd gerapporteerd door De Angelis et al. (1996). De Angelis et al. (1996) hebben in

getransfecteerde L-cellen (fibroblasten) vastgesteld dat CNP zich via een hoge affiniteitsbinding kan vasthechten aan het membraan en de mogelijkheid heeft om zich te associëren met het cytoskelet.⁹ Deze associatie tussen CNP en het cytoskelet kan te wijten zijn aan de directe interactie met actine of de indirecte interacties met een proteïne of een complex van proteïnen verbonden met actinefilamenten in de cel.⁹

Bifulco et al. (2002) hebben CNP als een mogelijk linkerproteïne geïdentificeerd dat zorgt voor de interactie van de microtubuli met het plasmamembraan.¹⁶ Aangezien zowel in rat FRTL-5 thyroïde cellen als in hersenweefsel een stabiele associatie werd vastgesteld tussen CNP en tubuline werd gesuggereerd dat CNP kan dienen als een regulator van de tubulinepolymerisatie en/of de distributie van de microtubuli. CNP doet dienst als een membraananker voor microtubuli omdat een fractie van dit proteïne stevig in het membraan is vastgehecht.¹⁶

Lee et al. (2005) hebben waargenomen dat CNP betrokken kan zijn bij het coördineren van de reorganisatie van het cytoskelet (microtubuli) dat noodzakelijk is om de vorming van uitlopers te garanderen.³ Initieel veroorzaakt CNP een destabilisatie van de microtubuli die nodig is om de reorganisatie van het cytoskelet in gang te zetten om op die manier de extensie van de uitlopers te bekomen. De gereorganiseerde microtubuli worden op latere fasen terug gestabiliseerd.³ Ook het F-actine cytoskelet wordt gewijzigd. Normaal vormt het actine cytoskelet een barrière dat ervoor zorgt dat de celvorm intact blijft. Om uitlopers te kunnen vormen, is het eveneens nodig dat deze actine-barrière verstoord wordt.³ Dit werd nagegaan in CNP-getransfecteerde COS-7 cellen, een cellijn op basis van niercellen afkomstig van de *African Green Monkey*. Deze cellen vertonen in hun normale morfologie geen uitlopers maar gaan door transfectie met CNP een meer vertakte morfologie aannemen.³ Vervolgens werden zowel COS-7 cellen als OLN-93 cellen getransfecteerd met K379 en G380 mutante vormen van CNP. OLN-93 cellen zijn afkomstig van spontaan getransformeerde cellen van primaire culturen van rattenhersenen en vertonen in hun normale morfologie een vertakte vorm. Transfectie met K379 en G380 mutaties zorgt voor een inhibitie van de CNP-gemedieerde uitlopervorming.³

De Angelis et al. (1994) en Lee et al. (2005) hebben, respectievelijk, in HeLa-cellen (humane cervicale kankercellen) en in OLN-93 cellen vastgesteld dat de niet-geïso-prenyleerde C397S mutant van CNP willekeurig verspreid wordt doorheen het cytoplasma en dat de cellulaire morfologie door veranderingen in het cytoskelet aangetast wordt.^{3,10}

3. Multiple Sclerose

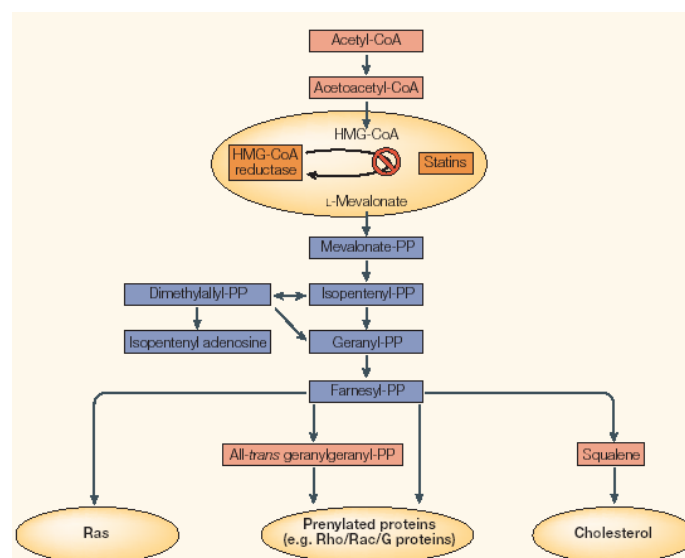
Het belang van het myeline wordt vooral duidelijk door zijn betrokkenheid in een reeks van neurologische ziekten in het CZS zoals Multiple Sclerose (MS). MS is een chronische inflammatoire auto-immuunziekte gekarakteriseerd door demyelinisatie, inflammatie, en verlies van axonen en oligodendrocyten.¹⁷ Hier speelt de demyelinisatie een belangrijke rol waarbij de myelinescheden rond de axonen beschadigd worden en waardoor myelineproteïnen zoals CNP verloren kunnen gaan.¹⁸ Veel voorkomende symptomen zijn visuele (blindheid) en sensorische (spierzwakte) beschadigingen, paralyse en andere neurologische deficiënties soms gepaard gaand met cognitieve dysfunctie.¹⁷

De mogelijke behandelingen voor MS zijn zeer beperkt. Nieuwe inzichten in de pathogenese van MS hebben geleid tot de ontwikkeling van allerlei nieuwe immunotherapeutische behandelingsmethoden. Twee therapieën die goed bevonden zijn en veel gebruikt worden voor de behandeling van MS zijn de immunomodulatoire drugs interferon- β (IFN- β) (Avonex[®]) en glatirameer acetaat/copolymeer-1 (COP-1) (Copaxone[®]).¹⁷ IFN- β reduceert de T-cel activatie en de daaropvolgende transmigratie doorheen de bloedhersenbarrière (BHB), verlaagt de secretie en/of effecten van pro-inflammatoire cytokines, en schaadt de antigen presentatie en macrofaagfunctie hoofdzakelijk door de verminderde expressie van *Major Histocompatibility Complex class II* (MHC II) moleculen op antigen-presenterende cellen (APC's).^{19,20} IFN- β verandert eveneens de balans tussen *Matrix MetalloProteïnase-9* (MMP-9) en de natuurlijke inhibitor van MMP-9, *Tissue Inhibitor of Matrix MetalloProteinase-1* (TIMP-1) waardoor de BHB gestabiliseerd wordt.²¹ Het is namelijk zo dat matrix metalloproteïnasen (MMP's), en vooral MMP-9, de T-cel migratie naar het CZS vergemakkelijken. Hierdoor spelen deze MMP's een belangrijke rol bij het verstoren van de BHB en dus in de pathogenese van MS.²¹ Het werkingsmechanisme van COP-1 is nog niet volledig bekend.¹⁷ Doch is er een hypothese dat COP-1 met een sterke affiniteit bindt aan MHC II moleculen, en zo via competitief antagonisme, de antigen-presentatie inhibeert.²² COP-1 is eveneens betrokken bij de inductie van glatirameer-reactieve regulatoire cellen (CD4⁺ en CD8⁺ T-cellen). Glatirameer-reactieve T-helper 2 (T_{h2}) cellen migreren naar de hersenen en brengen door cross-activiteit met myeline-antigenen anti-inflammatoire cytokines tot expressie.²² Subcutane administratie van COP-1 (Copaxone[®]) leidt tot een daling van de klinische activiteit van de ziekte bij patiënten met *Relapsing-Remitting MS* (RR-MS).¹⁷ Interferon- β daarentegen wordt zowel intramusculair als subcutaan geïnjecteerd.²⁰

Eerder recent zijn klinische studies opgestart om de werking van statines in het ziektebeeld van MS te bestuderen.

3.1 Statines

Statines, ook 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA) inhibitoren genoemd, zijn cholesterolverlagende drugs die gebruikt worden voor de behandeling van cardiovasculaire ziekten zoals hypercholesterolemie.^{23,24} Een belangrijke taak van deze drugs is het blokkeren van de cholesterolbiosynthese door het inhiberen van HMG-CoA reductase, het snelheidsbepalend enzyme dat zorgt voor de omzetting van HMG-CoA naar L-mevalonaat (Figuur 5). Het is algemeen aangenomen dat deze drugs ook andere effecten hebben naast hun cholesterol-verlagende eigenschappen.^{25,26} De inhibitie van HMG-CoA reductase blokkeert niet alleen de cholesterolbiosynthese, maar ook de synthese van een aantal isoprenoïd intermediären zoals *GeranylPyroPhosphate* (GPP), *FarnesylPyroPhosphate* (FPP) en *GeranylGeranylPyroPhosphate* (GGPP) (Figuur 5).^{27,28} Vooral FPP en GGPP doen dienst als belangrijke vetzuuraanhechtingen voor de post-translationele modificatie van proteïnen zoals G-proteïnen en *Guanine TriPhosphate* (GTP)-bindende proteïnen (Rho, Ras,...).^{27,28} Isoprenylatie laat toe dat deze proteïnen geactiveerd worden en getransloceerd worden naar het membraan. Dit is van belang bij de signaaltransductie en bij vitale functies zoals het behoud van de celvorm, celproliferatie, differentiatie en migratie.^{27,28}



Figuur 5. Blokkering van de cholesterolbiosynthese en synthese van isoprenoïdintermediären door statines.²⁶

Recent is op overtuigende wijze aangetoond dat statines de klinische symptomen van *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (EAE) zichtbaar verbeteren.²⁶ Statines inhiberen de migratie van T-cellen naar het CZS door te binden aan en te interfereren met de functie van het adhesiemolecuul *Leukocyte Function Antigen 1* (LFA1), door het downreguleren van de expressie van het chemokine *Monocyte Chemotactic Protein 1* (MCP1) en door het verlagen van de expressie van MMP's.^{26,29} Statines inhiberen de activatie van T-cellen door de expressie van MHC II en costimulatoire moleculen op het oppervlak van de APC's te verlagen.³⁰ Tenslotte induceren statines een verschuiving in de productie van pro-inflammatoire cytokines door T-helper 1 (T_{h1})-cellen naar anti-inflammatoire cytokines aangemaakt door T_{h2} cellen.^{26,29} Lovastatine zorgt voor een verbetering van de klinische en histologische symptomen in het EAE diermodel van Lewis ratten.³¹ Om het mechanisme hierachter te bepalen, hebben Stanislaus et al. (2002) het cytokineprofiel van gestimuleerde splenocyten van controle, EAE en lovastatine-behandelde ratten bestudeerd. De splenocyten afkomstig van lovastatine-behandelde EAE ratten vertoonden een verminderd interferon- γ (IFN- γ) gehalte (T_{h1}-type cytokine), terwijl het IL-10 gehalte (T_{h2}-type cytokine) opmerkelijk toegenomen was in vergelijking met onbehandelde EAE dieren.³¹ Deze studie heeft voor het eerst aangetoond dat lovastatine *ex vivo* een verschuiving induceert naar Th2 cytokines. Dit suggereert een therapeutische waarde voor inflammatoire ziekten zoals MS.³¹

Statines hebben slechts beperkte neveneffecten. De meerderheid van de ongunstige effecten zoals gastro-intestinale symptomen, hoofdpijn en uitslag zijn relatief mild en transiënt.²⁴ Soms kunnen statines leiden tot hepatotoxiciteit (< 3% van de patiënten) en myopathie (< 0.2%). Een neveneffect dat zelden voorkomt, slechts in 0.05% van de gevallen, is rhabdomyolyse.³² Rhabdomyolyse, een progressieve vorm van myopathie, veroorzaakt de afbraak van de skeletspier waardoor myoglobinuria ontstaat met mogelijk nierfalen tot gevolg. Dit komt vooral voor wanneer statines in combinatie met andere cholesterolverlagende drugs zoals fibraten gebruikt worden.^{24,32} Musculaire toxiciteit zoals myalgie, krampen en vermoeidheid komt voor in 1-7% van de met statines behandelde patiënten.²³ Belangrijke voordelen van statines boven andere reeds bestaande therapieën (Avonex[®] en Copaxone[®]) zijn dat deze drugs via de orale weg toegediend kunnen worden en gebruikt kunnen worden als een monotherapie of een "add-on".³³

3.1.1 Positieve effecten van statines op oligodendrocyten

Recent hebben Paintlia et al. (2005) aangetoond dat het lipofiele lovastatine zowel *in vivo* als *in vitro* zorgt voor een betere overleving en differentiatie van oligodendrocytprogenitoren nadat deze cellen blootgesteld werden aan cytokines.³⁴ Dit zou een afzwakking van de demyelinisatie en het bevorderen van de remyelinisatie betekenen. Met het bevorderen van de remyelinisatie wordt bedoeld dat een omgeving gecreëerd wordt waar myelinisatie kan plaatsvinden.³⁴ Lovastatine vermindert de myeline-afbraak en vergemakkelijkt het herstel, vermindert de progressie van MS, herstelt de myelineproteïnen, vermindert het cytokine-gemedieerde verlies van oligodendrocytprogenitoren en verbetert de vrijlating van neurotrofische factoren.³⁴ Dit zijn mogelijke mechanismen waarbij statines de remyelinisatie in MS kunnen promoten. Hierbij mag niet uit het oog verloren worden dat statines immunomodulatoire drugs zijn waardoor het bevorderen van een remyeliniserende omgeving een gunstig gevolg kan zijn van de reductie van de inflammatie. Paintlia et al. (2005) hebben met Vollmer et al. (2004) samengewerkt om het gebruik van een dagelijkse orale simvastatine (lipofiel) behandeling (80 mg) te testen in 30 individuen met RR-MS.²⁹ *Magnetic Resonance Imaging* (MRI)-scans werden genomen op 4, 5 en 6 maanden tijdens de behandeling. Op 4 en 5 maanden werd, respectievelijk, een reductie van 44% en 41% vastgesteld in het aantal en volume van lesies. Op 6 maanden werd er geen reductie geconstateerd.²⁹ Er werden geen nadelige effecten en klinische veranderingen waargenomen. Deze studie kan bekritiseerd worden omwille van het klein aantal patiënten, het ontbreken van een placebogroep en de korte termijn waarin de patiënten opgevolgd werden.²⁹

3.1.2 Negatieve effecten van statines op oligodendrocyten

Sepp-Lorenzino et al. (1994) hebben in hersenstam coupes van ratten aangetoond dat hoge concentraties (100 μ M en 400 μ M) van lovastatine de lokalisatie van CNP naar het myeline inhiberen.³⁵ Braun et al. (1991) stelden in C6 glioma cellen vast dat lovastatine de isoprenoïdsynthese inhibeert waardoor de isoprenylatie van CNP uitblijft.¹¹ De isoprenylatie kan terug hersteld worden door het toevoegen van mevalonaat aan het cultuurmedium.¹¹ Deze twee vaststellingen leveren het bewijs dat isoprenylatie van groot belang is bij de aanhechting van CNP aan het celmembraan.^{11,35}

Hypothese

Voor dit onderzoek werd beroep gedaan op de oligodendrogliale OLN-93 cellijn. Deze cellijn werd bekomen van Dr. C. Richter-Landsberg (Department of Biology, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany). De OLN-93 cellen worden beschouwd als een bruikbaar modelsysteem voor oligodendrocyten omwille van de expressie van, GalC, NG₂, MBP, MAG, PLP en CNP. In deze studie werd simvastatine (0.1 μ M en 1 μ M) gebruikt als behandeling (gedurende 24 en 48 uur) omdat deze drug lipofiele eigenschappen vertoont waardoor migratie doorheen de bloedhersenbarrière mogelijk is. Dit is belangrijk met het oog op de behandeling van MS.

De hypothese stelt dat simvastatine de isoprenylatie van CNP zou kunnen inhiberen waardoor dit myelineproteïne zich niet meer aan membranen zou kunnen vasthechten. Op deze manier zou zowel de reorganisatie van de microtubuli alsook de sturing van de uitlopers verhinderd kunnen worden. De interferentie met de isoprenylatie van CNP door simvastatine zou met andere woorden een nefast effect kunnen hebben op de vorming van uitlopers door oligodendrocyten wat essentieel is voor de (re)myelinisatie.

Voor het verwerpen/aanvaarden van deze hypothese werden drie verschillende experimentele benaderingen gebruikt: (1) helder-veld-beelden en kleuringen met Bodipy FL-C5 (morfologie), (2) immunofluorescentie met Alexa 555 gelabelde antilichamen (CNP-expressie) en (3) Western blotting (isoprenylatiestatus van CNP).

Materialen en methoden

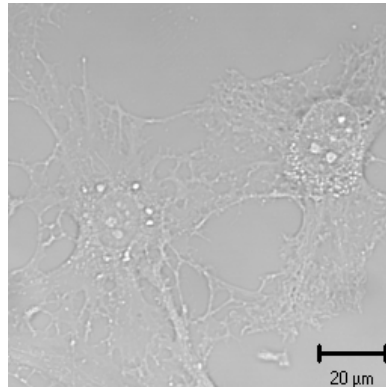
1. Celkweek

De OLN-93 cellen werden geënt in groeimedium samengesteld uit *Dulbecco's Modified Eagles Medium* met L-glutamine en pyruvaat (DMEM) (Gibco, Paisley, UK; W/4500 mg/l glucose zonder sodium), 10% hitte-geïnactiveerd en niet-gefiltreerd *Fetal Calf Serum* (FCS) (HyClone Europe S.A., Erembodegem-Aalst, België) aangevuld met de antibiotica Penicilline/Streptomycine (P/S) (Life Technologies, Paisley, UK). De cellen werden bij een temperatuur van 37°C en 10% CO₂ geïncubeerd. Wanneer een subconfluente cellaag bekomen was, volgde een trypsinisatiestap door het toevoegen van 0.25% trypsin (Molecular Probes, Merelbeke, België). Na 1 tot 2 minuten in de incubator werd de trypsinisatie geïnactiveerd door toevoeging van FCS. Vervolgens werden de cellen gedurende 10 minuten op 1300 rpm gecentrifugeerd (Eppendorf Centrifuge 5804 R) waarna de celpellet geresuspendeerd werd in groeimedium. Om de cellen te tellen, werd na toevoeging van trypaanblauw (Gibco, Paisley, Schotland) aan de celsuspensie, gebruik gemaakt van een Fuchs-Rosenthal telkamer. De cellen werden vervolgens al naargelang de aard van de geplande experimenten aan de gewenste celdensiteit uitgezet op met poly-L-lysine (PLL) (Sigma, Bornem, België) gecoate 12 mm of 24 mm glaasjes (morfologiebepaling en CNP-expressie) of plasticen cultuurflesjes (Western blotting). Na een incubatieperiode van 24 uur in groeimedium werd het medium vervangen door DMEM met 0.5% FCS (differentiatiedium) om de morfologische differentiatie van de OLN-93 cellen te bevorderen. Na een 2 dagen durende kweek in differentiatiedium zagen de OLN-93 cellen er morfologisch gedifferentieerd uit. Deze cellen lijken dan op immature oligodendrocyten met een gearboriseerde celmorfologie.³⁶

2. Behandeling met simvastatine

Met uitzondering van de controlecellen die op 0.5% FCS bleven staan, werden de OLN-93 cellen met twee verschillende concentraties (0.1 µM en 1µM) simvastatine (Calbiochem[®], Darmstadt, Duitsland) behandeld en dit voor een tijdsperiode van 24 en 48 uur. Zowel de behandelde als de controlecellen werden op hetzelfde eindpunt geïncubeerd. Op dit eindpunt zijn de cellen 3 dagen *in vitro* (DIV) gekweekt waarvan 1 dag in groeimedium en 2 dagen in differentiatiedium waaraan in het geval van de behandelde

cellen simvastatine werd toegevoegd. Controlecellen hebben op dit eindpunt een sterk vertakte morfologie (Figuur 6).



Figuur 6. Helder-veld-beeld van OLN-93 cellen gekweekt onder controle-omstandigheden (1 dag in groeimedium en vervolgens 2 dagen in differentiatiedium). Het resultaat toont cellen met een sterk vertakte morfologie.

Tabel 1 geeft een overzicht van de behandelingen van OLN-93 cellen met simvastatine (0.1 μM en 1 μM gedurende 24u en 48u).

Tabel 1: Overzicht van de simvastatinebehandelingen.

	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4
Behandeling van de cellen	Uitzaaien van de cellen in groeimedium	Omschakeling naar differentiatiedium + Toevoegen van simvastatine (0.1 μM en 1 μM)	Toevoegen van simvastatine (0.1 μM en 1 μM)	Collectie van data
Aantal dagen in differentiatie-medium			Dag 1 in differentiatie-medium	Dag 2 in differentiatie-medium
Aantal dagen <i>in vitro</i>	0 DIV	1 DIV	2 DIV	3 DIV

3. Morfologische studie

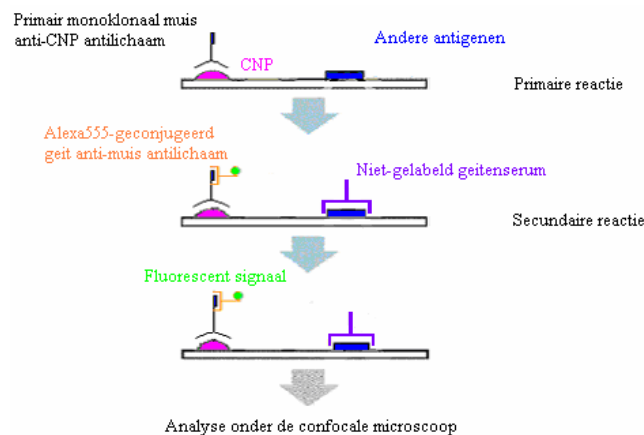
Om de morfologische veranderingen van OLN-93 cellen te bestuderen, werden met behulp van de LSM 510 META confocale microscoop helder-veld-beelden van de cellen genomen. Ook werd gebruik gemaakt van Bodipy FL-C5 (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA), een fluorescent gelabeld s'fingomyeline dat zich specifiek in de membranen van de cellen gaat nestelen en vervolgens aankleurt.³⁷ Hierdoor werden de membranen van de oligodendrogliale cellen goed zichtbaar afgelijnd. Door het aanbrengen van deze fluorescente dye ($\lambda_{\text{Ex}} = 505 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 511 \text{ nm}$) opgelost in medium konden de eventuele verschillen in morfologie als gevolg van behandeling met verschillende concentraties (0.1 μM en 1 μM) simvastatine gemakkelijk worden aangetoond. Om de morfologische veranderingen te kwantificeren, werd de software van het programma LSM Image Browser gebruikt. Met dit programma is het mogelijk om het gebied van de cellen met de uitlopers aan te duiden voor de berekeningen van het gemiddeld celoppervlak van de OLN-93 cellen. Voor de bepaling van het gemiddeld oppervlak werd getracht om volledige cellen (cellichaam en vertakkingen) af te bakenen. Zelfs de allerfijnste vertakkingen die verweven zaten tussen de andere uitlopers en niet duidelijk waarneembaar waren met de helder-veld-beelden werden hierin opgenomen. Hierbij was het mogelijk dat bepaalde delen van de cel buiten de omlijning lagen wat gecompenseerd werd door gebieden die wel binnen de afbakening terug te vinden waren maar geen deel uitmaakten van de cel. Op deze manier werd getracht een representatieve benadering van het volledige celoppervlak te bekomen.

4. Immunofluorescentie

Immunocytochemische kleuringen met behulp van fluorescent gelabelde antilichamen werden gebruikt om de expressie van CNP zowel in de controlecellen als in de cellen blootgesteld aan simvastatine na te gaan. Tubuline werd gebruikt als positieve controle.

De op glaasjes uitgezaaide OLN-93 cellen werden gedurende 12 minuten gefixeerd met 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany). Na fixatie volgde gedurende 10 minuten een permeabilisatiestap met 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) om intracellulaire kleuring mogelijk te maken. Vervolgens werd gedurende 30 minuten *signal enhancer* (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) toegevoegd om het fluorescent signaal te versterken (verbetering van de signaal-ruis verhouding). Daarna werd er voor 20 minuten geblockt met 3% geitenserum om specifieke

binding tegen te gaan (Figuur 7). Hierna werden de cellen, met uitzondering van de blanco, 1 uur geïncubeerd met het primaire muis anti-CNP monoklonaal antilichaam (1:200) (Sternberger Monoclonals Incorporation, Maryland, USA) om CNP aan te kleuren (Figuur 7) of met het primaire muis anti-tubuline monoklonaal antilichaam (1:100) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Duitsland) voor het aankleuren van tubuline. Vervolgens werd het secundaire geit anti-muis antilichaam geconjugeerd met Alexa 555 (1:200) (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA) gedurende 30 minuten aan de cellen, inclusief de blanco, toegevoegd (Figuur 7). Voor het monteren van de glaasjes werd beroep gedaan op *Prolong Gold Antifade* (PGA) (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA). Na overnacht drogen konden de stalen geanalyseerd worden. Tussen elke stap werden de cellen gespoeld met *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Cambrex Bioscience, Verviers, België).



Figuur 7. Schematische voorstelling van indirecte immunokleuring van CNP met behulp van een primair monoklonaal muis anti-CNP antilichaam en een secundair geit anti-muis antilichaam geconjugeerd met Alexa 555.

5. Western blotting

Met immunofluorescentie kan enkel worden vastgesteld of CNP tot expressie wordt gebracht. Om de isoprenylatiestatus van CNP na te gaan, werd een Western blotting uitgevoerd. Hierbij werd gebruik gemaakt van een anti-farnesyl antilichaam dat kan binden aan farnesyl en eveneens in staat is te reageren met geranylgeranyl. Tubuline werd gebruikt als positieve controle om na te gaan of er evenveel celmateriaal op de gelen werd aangebracht.

De Western blotting kan tevens gezien worden als een aanvulling van de immunocytochemische kleuring van CNP doordat met deze techniek eveneens de proteïne-expressie kan worden nagegaan.

5.1 Lyseren van OLN-93 cellen

Om de proteïnen uit de cellen te isoleren, werden de in cultuurflesjes uitgezaaide cellen verzameld en gelyseerd. Hiervoor werden zowel de controlecellen als de behandelde cellen in eerste instantie gespoeld met PBS, getrypsiniseerd en overgebracht in een falcon met FCS. Deze falcon werd vervolgens gedurende 10 minuten op 1300 rpm gecentrifugeerd (Eppendorf Centrifuge 5804 R). Deze stap werd herhaald na een tweede wasstap met PBS. Daarna werd lysisbuffer (50 mM Tris (Acros Organics, Geel, Belgium), EthyleenDiamineTetra-Azijnzuur (EDTA) (UCB, Leuven, Belgium), Ethyleen Glycol-bis (beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-Tetra-Azijnzuur (EGTA) (Acros Organics, Geel, Belgium), 1% Nonidet P40 (NP-40) (Sigma Chemical Company, St-Louis, USA)), aangevuld met protease-inhibitoren (Complete mini, Mannheim, Duitsland), aan de stalen toegevoegd. De suspensie werd vervolgens op en neer door een spuit met een 26 G naald (BD Spinal Needle, Madrid, Spain) gehaald om de lysering te vervolledigen.

5.2 Bradford assay ter bepaling van het proteïnegehalte

Deze methode is gebaseerd op de binding van een kleurstof met negatieve lading, Coomassie Brilliant Blue B-250, aan de positieve ladingen op proteïnen. Hoe meer proteïnen in het staal aanwezig, hoe meer Coomassie gebonden wordt. Deze assay is colorimetrisch. Het absorptiemaximum van Coomassie Brilliant Blue verschuift van 465 nm naar 595 nm bij proteïnebinding. De ongekende proteïneconcentraties van de stalen kunnen aan de hand van de lineaire standaardijlijn berekend worden. Deze lineaire standaardijlijn wordt tot stand gebracht door het bepalen van de absorpties van een *Bovine Serum Albumine* (BSA) standaardreeks met gekende proteïneconcentraties.

5.2.1 Methode

Hiervoor werd een bepaalde hoeveelheid (20 µl) van elk staal/standaardoplossingen (Tabel 2) in een plasticen cuvet gepipetteerd waaraan vervolgens 1 ml kleurreagens (Serva Blauw G (Serva, Heidelberg, Germany), ethanol 95% (VWR Prolabo, Fontenay sous bois, France), fosforzuur (VWR Prolabo, Leuven, Belgium)) werd toegevoegd. Aangezien de stalen in lysisbuffer werden opgelost, werd lysisbuffer gebruikt als blanco. Na een 10 tot 20 minuten

durende incubatie bij kamertemperatuur en in het donker werd de optische densiteit afgelezen bij 595 nm met behulp van een spectrofotometer (LKB biochrom Novaspec II).

Tabel 2: Standaard BSA-oplossingen

	BSA	Lysisbuffer
10 mg/ml	10 mg	1000 µl
1 mg/ml	100 µl van 10 mg/ml	900 µl
0.75 mg/ml	150 µl van 1 mg/ml	50 µl
0.5 mg/ml	200 µl van 1 mg/ml	200 µl
0.25 mg/ml	200 µl van 0.5 mg/ml	200 µl
0.125 mg/ml	200 µl van 0.25 mg/ml	200 µl

5.3 Scheiding membraire/cytosolaire fractie

Om een eventuele herverdeling van CNP (verschuiving van membraire naar cytosolaire fractie) door simvastatinebehandeling na te gaan, werden de in lysisbuffer opgeloste cellen gedurende 20 minuten op 13200 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804 R) gecentrifugeerd. Op deze manier werd een membraire (pellet) en cytosolaire (supernatans) fractie bekomen. Het supernatans van de stalen werd naar een nieuw epje overgebracht, terwijl de pellet geresuspendeerd en bewaard (-20°C) werd in 1x staalbuffer (MilliQ, 0.5 mM Tris-HCl pH 6.8, glycerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Duitsland), 10% *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Zweden), 1% bromophenolblauw (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Zweden)). Het met aceton-methanol (overnacht) neergeslagen supernatans van ieder staal werd geresuspendeerd in 1x staalbuffer en werd eveneens bij -20°C bewaard.

5.4 SDS-PAGE

Vóór het laden werden de stalen verdund met 2x staalbuffer. Dit was niet het geval indien de stalen reeds in staalbuffer waren opgelost (zie 5.3). Hieraan werd vervolgens β -mercapto-ethanol (1:20) (Fluka Chimie, Buchs) toegevoegd. Dit geheel werd gedurende 4 minuten bij 95°C verwarmd om de proteïnen te denatureren. Vervolgens werden de stalen geladen (concentratie van 10µg proteïne per baan) op 6% of 10% polyacrylamide gellen en werd met een stroombron (EC 250-90 Apparatus Corporation) van 200 V een Sodium Dodecyl Sulfaat Polyacrylamide Gel Elektroforese (SDS-PAGE) uitgevoerd waarbij de proteïnen op basis van hun moleculair gewicht elektroforetisch worden gescheiden.

5.5 Elektroblotting en kleuring met antilichamen

Na de elektroforese werden de proteïnen met behulp van elektroblotting (overnacht bij 90 mA en 30 V (EC 250-90 Apparatus Corporation)) van de polyacrylamide gelen overgebracht naar een proteïnegevoelige PolyVinylDiFluoride (PVDF) membraan geweekt in methanol (Merck, Darmstadt, Duitsland). De te bepalen proteïnen werden vervolgens zichtbaar gemaakt met behulp van immunologische kleuring via een specifiek antilichaam. Hiervoor werd het membraan allereerst gedurende 1 tot 2 uur in blocking buffer (2% melkpoeder, 1% gelatine (Merck, Darmstadt, Duitsland) in PBS pH 7.2) geplaatst om aspecifieke binding te voorkomen. Vervolgens werd gedurende 1 uur geïncubeerd met de primaire antilichamen (Ab_1) (muis anti-CNP (Sternberger Monoclonals Incorporation, Maryland, USA), konijn anti-farnesyl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Duitsland), muis anti-tubuline (Sigma-Aldrich, Steinheim, Duitsland)) (Tabel 3) opgelost in blocking buffer gevolgd door een tweede incubatieperiode van 1 uur met de *Horse Radish Peroxidase* (HRP)-geconjugeerde secundaire antilichamen (Ab_2) (DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Denemarken) (Tabel 3) eveneens opgelost in blocking buffer.

Tabel 3: Primaire (Ab_1) en secundaire antilichamen (Ab_2) gebruikt bij Western blotting.

Merker	Ab_1	Verdunning	Ab_2	Verdunning
CNP	Muis anti-CNP	1:250	Konijn anti-muis	1:1000
Farnesyl	Konijn anti-farnesyl	1:1000	Geit anti-konijn	1:2000
Tubuline	Muis anti-tubuline	1:1000	Konijn anti-muis	1:1000

Vervolgens werden de membranen in een kleuroplossing van 50 mM natriumacetaat (Merck, Darmstadt, Duitsland), 0.2% 3,3'-DiAminoBenzidine (DAB) (Janssen Chimica, Geel, Belgium) en 0.03% H_2O_2 (Merck, Darmstadt, Duitsland) geplaatst totdat de gebonden antilichamen zichtbaar werden. DAB staat in voor de omzetting van peroxidase waardoor een bruine kleur ontstaat. Deze kleurreactie werd stopgezet in MilliQ water. Tussen elke kleuringsstap werden de membranen gespoeld met wasbuffer (PBS pH 7.2 en 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Duitsland)). Na kleuring werden de membranen met behulp van een scanner (Imagescanner, Umax Powerlook III, Amersham) en een softwareprogramma (Magic scan32 V4,5) gedigitaliseerd.

6. Coomassieblauw-kleuring

Om de proteïnespots zichtbaar te maken, werden de gelen gekleurd met Coomassieblauw. Hiervoor werden de gelen gedurende 1 uur aan een werkoplossing van Coomassieblauw 0.1% blootgesteld. Hierop volgden twee ontkleuringsstappen van 30 minuten: 1 stap met 40% methanol/7% azijnzuur en de andere met 7% azijnzuur/5% methanol tot de proteïnespots mooi zichtbaar werden. De gelen werden na kleuring ingescand en de spots werden geprikt.

6.1 Geldigstie

Om het detecteren van proteïnen mogelijk te maken met massaspectrometrie was het noodzakelijk om de proteïnen met behulp van een enzyme te splitsen tot peptiden. Vervolgens werden de proteïnen uit de polyacrylamide gelen geëxtraheerd. De uitgeprikte spots werden hiervoor gedehydrateerd met acetonitrile (Merck, Fontenay sous bois, France) en gedroogd in een vacuümcentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301). Vervolgens werd gedurende 1 uur bij 56°C 10 mM DiThioThreitol (DTT) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) in 100 mM NH_4HCO_3 (Merck, Darmstadt, Germany) aan de spots toegevoegd. Na koeling tot kamertemperatuur werd gedurende 45 minuten (bij kT in het donker) met 55 mM iodoacetamide (Merck, Darmstadt, Germany) in 100 mM NH_4HCO_3 geïncubeerd. Hierna werden de spots gedurende 10 minuten gespoeld met 100 mM NH_4HCO_3 en werd een dehydratatiestap met acetonitrile uitgevoerd. Deze was- en dehydratatiestap werd 2 maal herhaald. Na het drogen in een vacuümcentrifuge werden de spots gedurende 45 minuten in digestiebuffer met trypsine (Promega, Madison, USA) opgelost (ijsbad). Vervolgens werden de spots overnacht bij 37°C in 50 mM NH_4HCO_3 geplaatst en werd het supernatans bewaard. Hierna werd 20mM NH_4HCO_3 toegevoegd waarna een sonicatiestap van 20 minuten volgde. Het supernatans werd bewaard. Daarna werd 2 keer 5% mierenzuur (Vel, Leuven, Belgium) in 50 % acetonitrile toegevoegd waarop een sonicatiestap van 20 minuten volgde. Het supernatans werd wederom bewaard. Het volledige supernatans werd tot de massaspectrometrie bewaard bij -18°C. Vóór de massaspectrometrie werd het extract eerst drooggedampt en vervolgens opgelost in cortisone.

7. Statistische verwerking van data

De resultaten werden statistisch verwerkt met het programma Graph Pad Instant en werden weergegeven als het gemiddelde \pm de standaardfout (SEM) van “n” metingen. Om de gemiddelde waarden op significantie te controleren, werd een one-way ANOVA uitgevoerd. Met een daaropvolgende Dunn’s Multiple comparisons post-test konden de groepen onderling op significantieniveau vergeleken worden. Waarden van $p < 0.05$ werden beschouwd als zijnde significant.

Resultaten

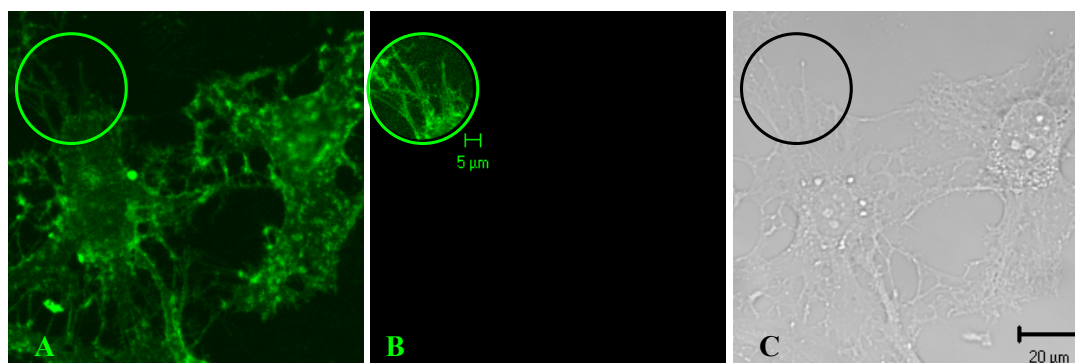
1. **Morfologische karakterisatie**

Een belangrijke doelstelling van de morfologische karakterisatie is het bestuderen van de invloed van de simvastatinebehandeling (0.1 μM en 1 μM) toegediend op verschillende tijdstippen (24h en 48h) op de morfologie van de OLN-93 cellen. Met behulp van confocale microscopie werden Bodipy FL-C5 kleuringen en helder-veld-beelden van de verschillende condities gemaakt.

1.1 **Bodipy FL-C5**

Door het gebruik van Bodipy FL-C5 (Figuur 8A), een fluorescent gelabeld sfigomyeline dat zich specifiek in de membranen van de cellen gaat nestelen en vervolgens aankleurt, kunnen de vertakkingen van de oligodendrogliale cellen goed zichtbaar worden afgelijnd.³⁷ Door in het beeld een *region of interest* (ROI) te selecteren, is het mogelijk om zelfs de allerfijnste vertakkingen met fluorescentie zichtbaar te maken (Figuur 8B). De fijnste uitlopers zijn immers te dun om met doorvallend licht opgemeten te worden. In iedere cel kunnen ter hoogte van de uitlopers verschillende ROI's aangeduid worden om een volledig beeld te verkrijgen van de fijnste vertakkingen rondom de cel. Door het volledig beeld zonder de ROI's te herbeschouwen, is het fluorescent signaal uitgaande van het cellichaam zeer hoog.

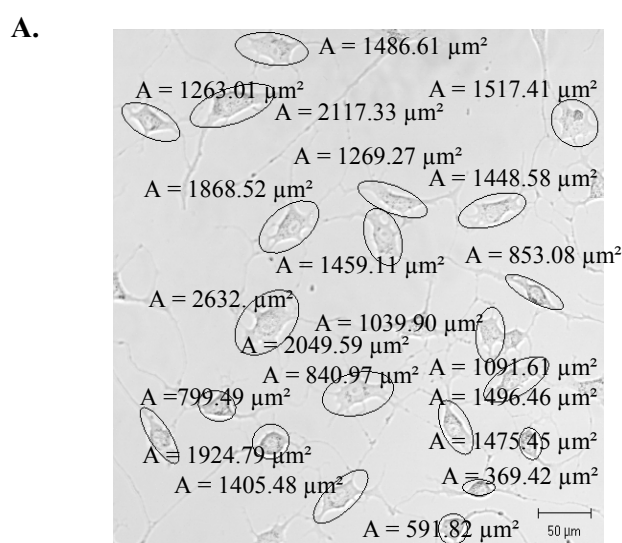
Om de vertakkinggraad van de cellen statistisch te kunnen beoordelen, diende een groot aantal cellen gekwantificeerd te worden. Omwille van de intensiviteit van deze methode (aanduiding van verschillende ROI's per cel) werd geopteerd voor het gebruik van de helder-veld-beelden (Figuur 8C) om het gemiddeld celoppervlak te berekenen.

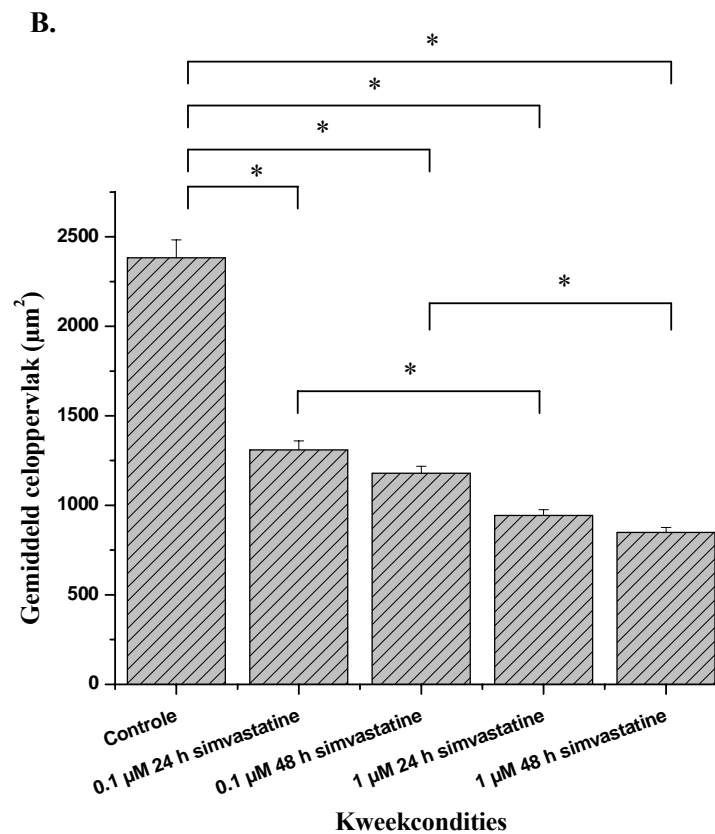


Figuur 8. Gebruik van Bodipy FL-C5 om de fijnste vertakkingen zichtbaar te maken. Om de morfologie van de cellen te bepalen, werden zowel Bodipy FL-C5 beelden (A + B) als helder-veld-beelden (C) gemaakt met behulp van de LSM 510 META confocale microscoop. (A en B) Fluorescentiebeelden van OLN-93 cellen waarvan de membranen aangekleurd werden met Bodipy FL-C5. (B) Focus op de allerfijnste vertakkingen via aanduiding van een ROI. (C) Overeenkomstig helder-veld-beeld van de OLN-93 cellen.

1.2 Bepaling van het gemiddeld oppervlak van OLN-93 cellen

Om het gemiddeld celoppervlak van de OLN-93 cellen na behandeling met simvastatine te kwantificeren, werd beroep gedaan op het programma LSM Image Browser. Met dit programma is het mogelijk om op de helder-veld-beelden het oppervlak ingenomen door de cellen aan te duiden (Figuur 9A). De bekomen waarden voor celoppervlakte werden vervolgens verwerkt en de gemiddelde waarden werden uitgezet in figuur 9B. Deze methode geeft een goede benadering van het celoppervlak en werkt sneller in vergelijking met de aanduiding van verschillende ROI's bij cellen aangekleurd met Bodipy FL-C5 waardoor meer cellen in de studie betrokken kunnen worden. Een alternatieve maar ook intensievere methode is het aanduiden van de exacte contouren van iedere cel met de hand.





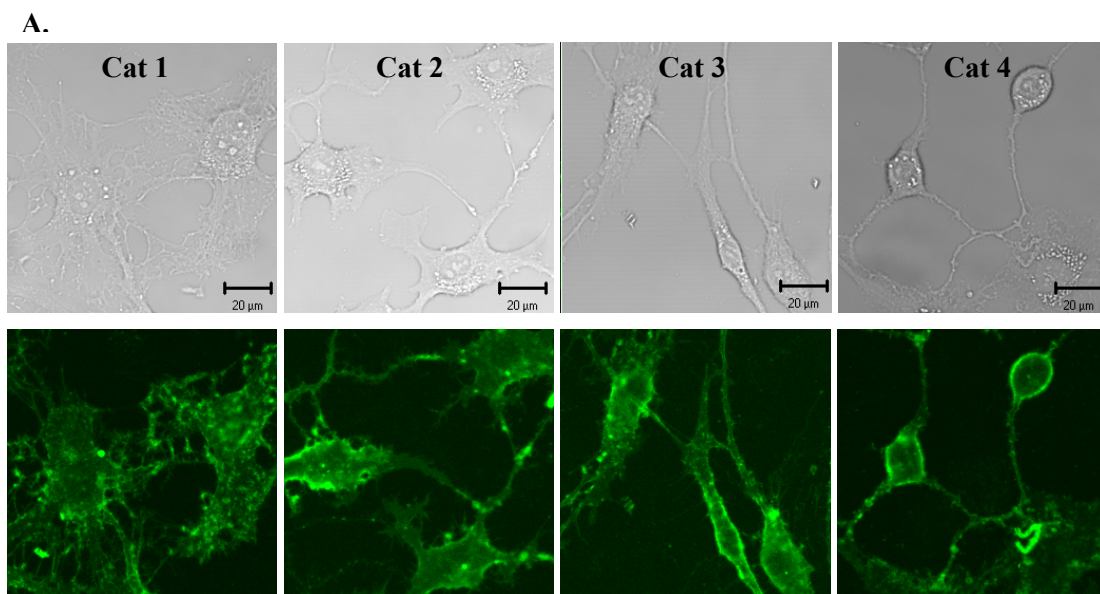
Figuur 9. De invloed van simvastatine op het gemiddeld celoppervlak van OLN-93 cellen. Om de veranderingen in celoppervlak per kweekconditie te bestuderen, werden helder-veld-beelden (A) gemaakt met behulp van de LSM 510 META confocale microscoop. Voor de kwantificatie van het celoppervlak werd gebruik gemaakt van het programma LSM Image Browser waarmee het oppervlak van de cellen op de helder-veld-beelden aangeduid kan worden (A=celoppervlak). In figuur (B) wordt het gemiddeld celoppervlak per kweekconditie in een grafiek weergegeven. Bij elke kweekconditie wordt de standaardfout van de gemiddelde waarden (SEM) met behulp van foutbalken weergegeven (* $p < 0.001$).

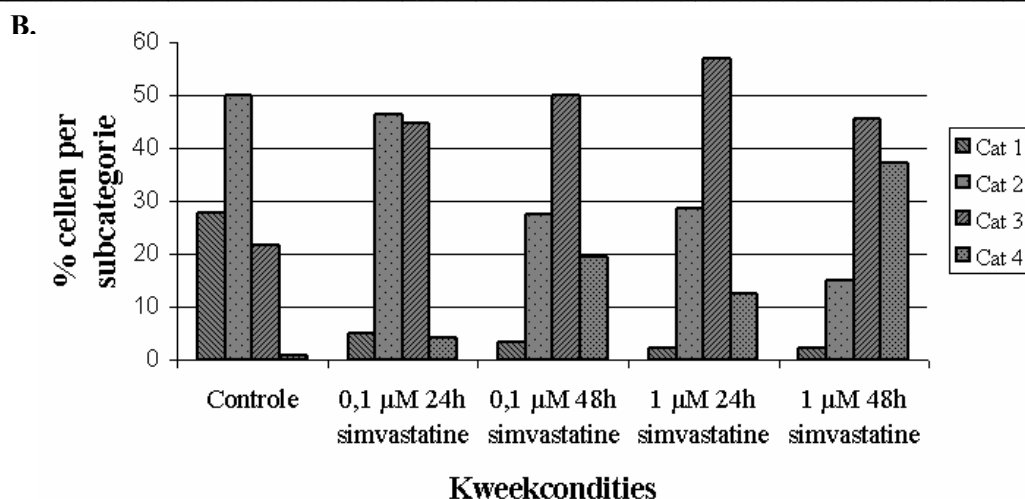
In figuur 9A ligt het gemiddeld celoppervlak voor de cellen behandeld met simvastatine in het algemeen significant lager in tegenstelling tot de controle ($n=132$) die een gemiddeld celoppervlak van $2383 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM}=100$) vertoont ($p < 0.001$). De behandeling van de OLN-93 cellen met $0.1 \mu\text{M}$ 24h ($n=120$) en $0.1 \mu\text{M}$ 48h ($n=171$) reduceert het gemiddeld celoppervlak tot waarden van $1309 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM}=50$) en $1179 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM}=39$), respectievelijk. Na de post-test blijken deze waarden niet significant verschillend te zijn van elkaar ($p > 0.05$). Behandeling met $1 \mu\text{M}$ 24h ($n=181$) geeft een gemiddeld celoppervlak van $943 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM}=33$), terwijl een incubatie van 48h met $1 \mu\text{M}$ ($n=230$) een gemiddeld celoppervlak van $849 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM}=28$) vertoont. Deze waarden vertonen onderling eveneens geen significant verschil ($p > 0.05$). Wanneer gekeken wordt naar de tijdstippen onderling, $0.1 \mu\text{M}$ 24h versus $1 \mu\text{M}$ 24h en $0.1 \mu\text{M}$ 48h versus $1 \mu\text{M}$ 48h, kan waargenomen worden dat deze resultaten significant

verschillend zijn van elkaar ($p < 0.001$). Deze experimentele bevindingen tonen aan dat de behandeling met simvastatine zorgt voor een afname van het gemiddeld celoppervlak van OLN-93 cellen die concentratie-afhankelijk is.

1.3 Morfologische classificatie

Om de morfologische verschillen tussen controlecellen en behandelde cellen duidelijk te kunnen onderscheiden, werden de OLN-93 cellen onderverdeeld in vier categorieën (Figuur 10A en B): (1) vlakke cellen met vele uitlopers verdeeld over de cel en een uitgebreid netwerk van fijne vertakkingen, (2) vlakke cellen met vertakte hoofduitlopers maar geen uitgebreid netwerk van fijne vertakkingen, (3) cellen lijken nog vlak met enkele hoofduitlopers en eventueel enkele kleinere vertakkingen (\pm bi- of tripolair), (4) bi-/tripolaire cellen waarvan het cellichaam begint op te ronden. Voor deze vier basiscategorieën werd gekozen om de resultaten op een overzichtelijke manier voor te stellen.





C.

Percentage cellen van iedere kweekconditie ingedeeld per subcategorie				
	Categorie 1	Categorie 2	Categorie 3	Categorie 4
Controle	27.6%	50%	21.6%	0.8%
0.1 µM 24h	4.9%	46.3%	44.7%	4.1%
0.1 µM 48h	3.2%	27.4%	50%	19.4%
1 µM 24h	2.2%	28.5%	57%	12.3%
1 µM 48h	2.1%	15.1%	45.6%	37.2%

Figuur 10. Morfologische classificatie van controlecellen en behandelde cellen. (A) Om de morfologische verschillen tussen controlecellen en behandelde cellen te kunnen detecteren, werden zowel helder-veld (grijze beelden) als Bodipy FL-C5 (fluorescentiebeelden) beelden gemaakt met behulp van de LSM 510 META confocale microscoop. De morfologie werd ondergebracht in vier categorieën: (Cat 1) vlakke cellen met vele uitlopers verdeeld over de cel en een uitgebreid netwerk van fijne vertakkingen, (Cat 2) vlakke cellen met vertakte hoofduitlopers maar geen uitgebreid netwerk van fijne vertakkingen, (Cat 3) cellen lijken nog vlak met enkele hoofduitlopers en eventueel enkele kleinere vertakkingen (\pm bi- of tripolair), (Cat 4) bi-/tripolair met opronding van de cel. In figuur (B) wordt het percentage cellen dat zich in elke categorie bevindt per kweekconditie in een grafiek weergegeven. In figuur (C) worden de bekomen percentages cellen in elke subcategorie per kweekconditie in tabelvorm voorgesteld.

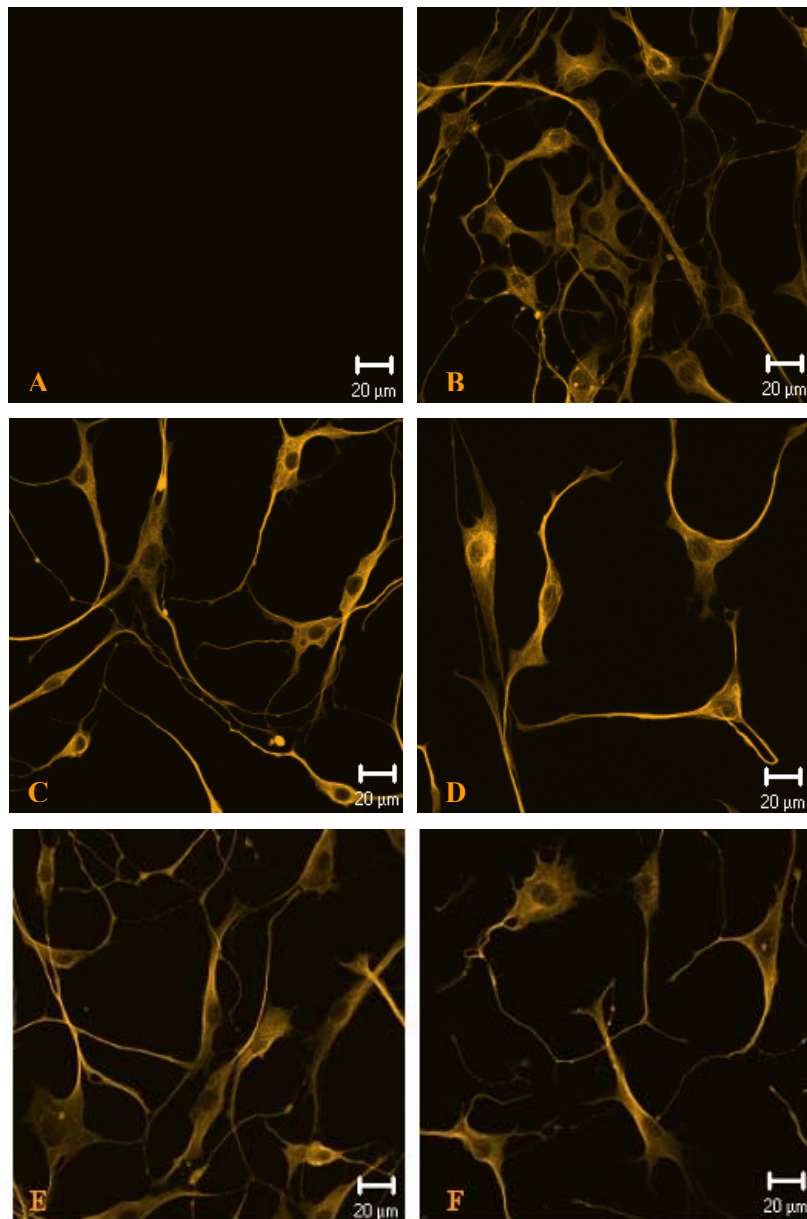
Beschrijving van de resultaten in figuur 10B en C kan wanneer gesteld wordt dat de controlecellen behoren tot categorie 1 en 2. De lichtste behandeling (0.1 µM simvastatine 24h) zorgt voor een verschuiving naar categorie 2 en 3. De behandelingen 0.1 µM simvastatine 48h en 1 µM 24h zijn vergelijkbaar en kunnen beschreven worden als behorende tot categorie 2, 3 en 4 waarbij vooral categorie 3 aan bod komt. De zwaarste behandeling (1 µM simvastatine 48h) geeft een morfologie die geklasseerd kan worden onder categorie 3 en 4. Opmerkelijk is ook dat in figuur 10A het aantal cellen op het glaasje afnemen naarmate de behandeling met simvastatine zwaarder wordt.

2. Immunofluorescentie

De doelstelling van de indirecte immunokleuringen is het nagaan van de expressie van tubuline en CNP onder controle kweekomstandigheden en na behandeling met simvastatine (0.1 μ M en 1 μ M gedurende 24h en 48h). Tubuline werd gebruikt als positieve controle.

2.1 Expressie van tubuline

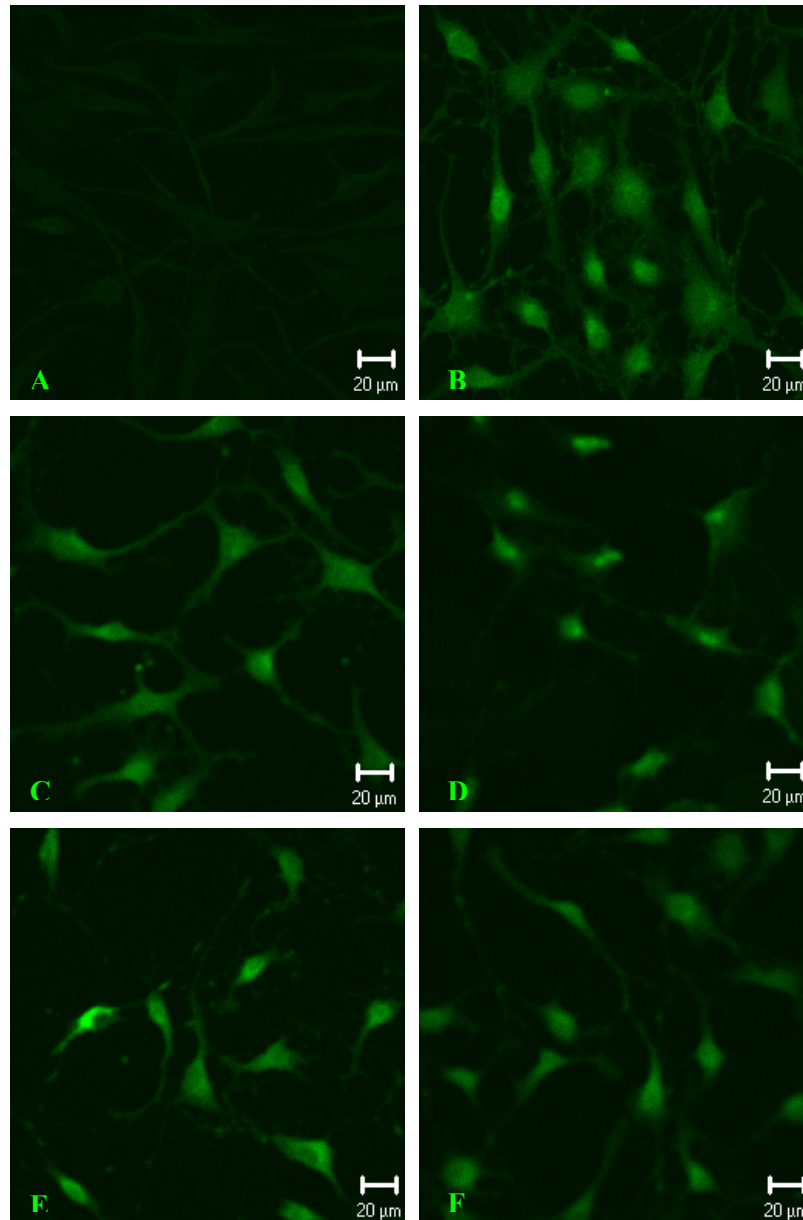
Om de expressie van tubuline door de OLN-93 cellen na te gaan, werd gebruik gemaakt van immunokleuring met Alexa 555 gelabelde antilichamen. In figuur 11 valt duidelijk waar te nemen dat de controlecellen en de behandelde cellen immunopositief zijn voor tubuline in vergelijking met de blanco. Bij deze cellen licht het fluorescent signaal van anti-tubuline vooral op in het cellichaam en de primaire en secundaire vertakkingen van de OLN-93 cellen.



Figuur 11. Indirecte immunokleuring van controlecellen en behandelde cellen met anti-tubuline. (A) Blanco: een negatieve controle waarbij enkel geïncubeerd werd met het secundair geit anti-muis antilichaam geconjugeerd met Alexa 555. De controle (B) en de simvastatinebehandelingen (0.1 μM 24h (C), 0.1 μM 48h (D), 1 μM 24h (E), 1 μM 48h (F)) werden zowel met het primaire anti-tubuline antilichaam als met het secundaire antilichaam geïncubeerd. Alle kweekcondities vertonen expressie van tubuline in primaire en secundaire uitlopers.

2.2 Expressie van CNP

Om de expressie van CNP door de OLN-93 cellen na behandeling met simvastatine te bepalen, werd gebruik gemaakt van immunokleuring met Alexa 555 gelabelde antilichamen.



Figuur 12. Indirecte immunokleuring van controlecellen en behandelde cellen met anti-CNP. (A) Blanco: een negatieve controle waarbij enkel geïncubeerd werd met het secundair geit anti-muis antilichaam geconjugeerd met Alexa 555. De controle (B) en de simvastatinebehandelingen (0.1 μM 24h (C), 0.1 μM 48h (D), 1 μM 24h (E), 1 μM 48h (F)) werden zowel met het primaire anti-CNP antilichaam als met het secundaire antilichaam geïncubeerd. CNP komt in iedere kweekconditie tot expressie en is uniform verdeeld over de cellen.

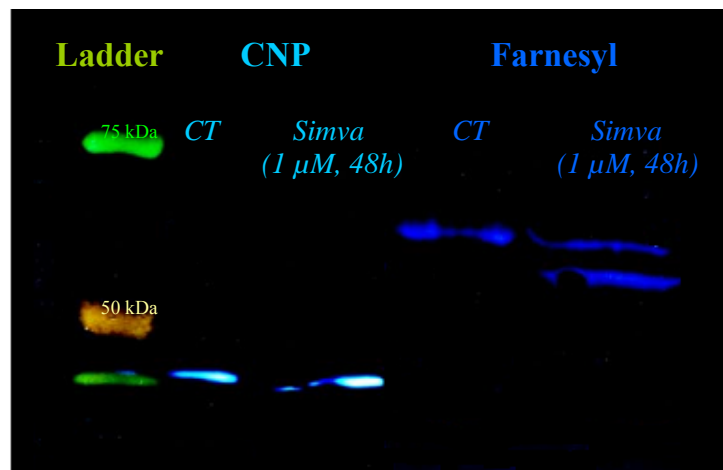
In figuur 12 valt duidelijk waar te nemen dat bij de blanco geen fluorescentiesignaal zichtbaar is, terwijl zowel bij de controlecellen als bij de behandelde cellen wel een fluorescentiesignaal gedetecteerd wordt. Doordat het fluorescent signaal van anti-CNP zich over de gehele cel verspreidt en niet ter hoogte van het celmembraan geconcentreerd is, ontstaat een uniforme kleuring van de cellen. Deze experimentele bevindingen tonen aan dat de OLN-93 cellen na behandeling met simvastatine nog steeds CNP tot expressie brengen vergelijkbaar met cellen gekweekt onder controle-omstandigheden.

3. Optimalisatie van de Western blotting

Een volgende doelstelling is het bestuderen van de invloed van de simvastatinebehandeling (0.1 μM en 1 μM) toegediend op verschillende tijdstippen (24h en 48h) op de isoprenylatiestatus van CNP in OLN-93 cellen. Met een anti-farnesyl antilichaam wordt getracht de isoprenoïdgroepen aan te kleuren en eventuele veranderingen na behandeling met simvastatine vast te stellen. De verschillende behandelingen werden onderverdeeld in vier categorieën: (1) 0.1 μM 24h, (2) 0.1 μM 48h, (3) 1 μM 24h en (4) 1 μM 48h.

Met behulp van de Bradfordmethode werd de proteïneconcentratie per staal bepaald en gelijkgesteld aan elkaar zodat in elk slotje evenveel proteïnen geladen werden. Dit is noodzakelijk voor het onderling vergelijken van de bekomen resultaten. Tubuline werd wederom gebruikt als positieve controle.

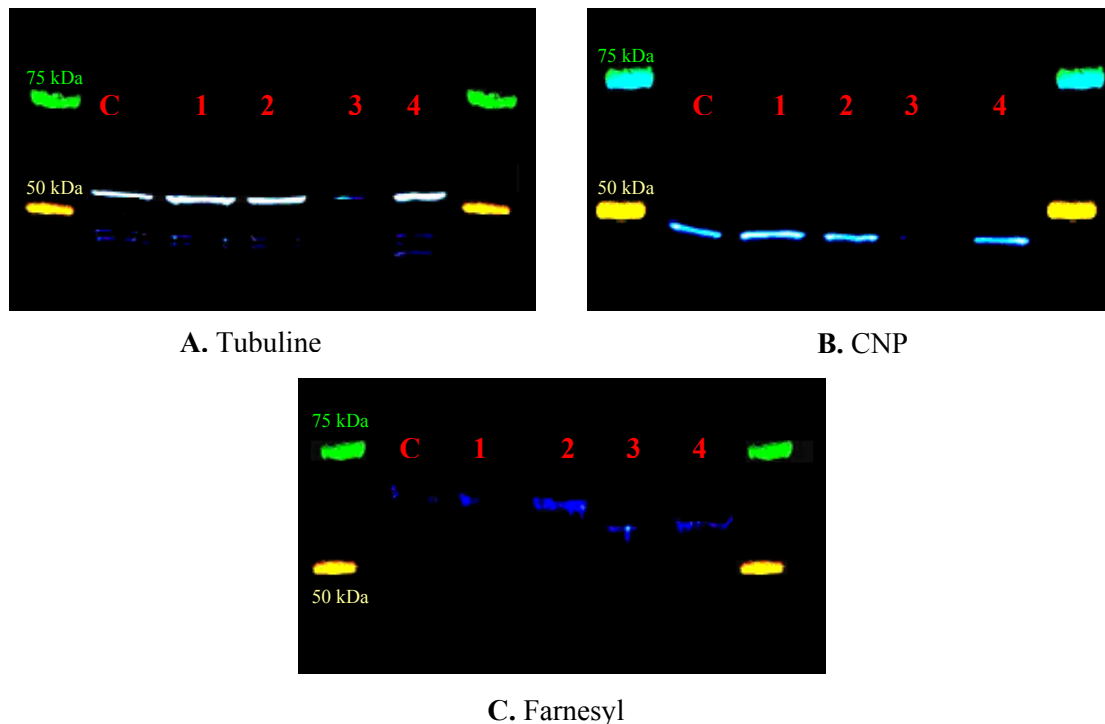
In een eerste fase van de optimalisatieprocedure werden enkel de controle en de zwaarste behandeling (1 μM simvastatine 48h) geladen op een *resolving* gel van 6% om proteïnen met een moleculair gewicht van ongeveer 50 kDa duidelijk te scheiden.



Figuur 13. Expressie van CNP en de isoprenylatiestatus van CNP in controlecellen en in cellen behandeld met 1 μM 48h. De controlecellen (CT) werden 1 dag in groeimedium geplaatst om vervolgens 2 dagen te differentiëren in cultuurmedium met 0.5% FCS. Voor de behandeling werden de cellen gedurende 48h blootgesteld aan een concentratie van 1 μM simvastatine (1 μM 48h). De cellen werden gelabeld met het anti-CNP antilichaam om het myelineproteïne CNP zichtbaar te maken en met het anti-farnesyl antilichaam werd getracht de isoprenylatiestatus van CNP na te gaan.

In figuur 13 is voor CNP op een hoogte van 46-48 kDa zowel in de controle als in de behandeling een bandje te zien wat duidt op de aanwezigheid van CNP onder deze kweekcondities. Labeling met het anti-farnesyl antilichaam geeft geen bandje op de hoogte van CNP. Bij de controle is wel een bandje zichtbaar op een hoogte tussen 60 en 70 kDa. De 1 μM 48h behandeling vertoont twee bandjes: één op een hoogte tussen 60 en 70 kDa en een ander tussen 50 en 60 kDa. Aangezien kleuring met anti-farnesyl met een verdunning van 1:1000 geen resultaat gaf, werd er overgeschakeld naar een verdunning van 1:500 maar de data bleven vergelijkbaar (data niet weergegeven). Deze experimentele bevindingen tonen aan dat de OLN-93 cellen na behandeling met simvastatine nog steeds CNP tot expressie brengen op het proteïneniveau. Western blotting kan naast de immunocytochemische kleuringen gezien worden als een alternatieve methode voor het aantonen van de expressie van CNP. De isoprenylatiestatus van CNP kan niet worden aangetoond. Er is wel reactie van het anti-farnesyl antilichaam met andere onbekende proteïnen met een hoger moleculair gewicht dan dat van CNP (46-48 kDa).

In een tweede fase van de optimalisatieprocedure werden zowel de controlecellen als de vier behandelingen geladen op een gel van 10% om een betere scheiding van de proteïnen met een moleculair gewicht van rond de 50 kDa te bekomen. In deze fase werd ook de expressie van tubuline in OLN-93 cellen behandeld met simvastatine nagegaan als controle. Tubuline is vergelijkbaar met het alom gebruikte actine dat fungeert als een positieve controle bij Western blotting experimenten om na te gaan of er evenveel materiaal op de gellen geladen wordt.



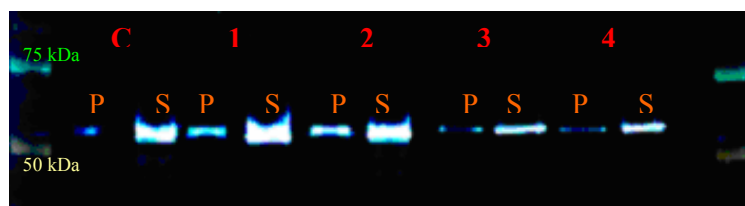
Figuur 14. Expressie van tubuline, CNP en de isoprenylatiestatus van CNP in controlecellen en behandelde cellen. De verschillende behandelingen werden onderverdeeld in vier categorieën: (1) 0.1 μM 24h, (2) 0.1 μM 48h, (3) 1 μM 24h en (4) 1 μM 48h. In figuur (A) wordt de expressie van tubuline weergegeven als controle. Hiervoor werden de cellen aangekleurd met het anti-tubuline antilichaam. Figuur (B) toont de expressie van het myelineproteïne CNP door labeling met het anti-CNP antilichaam. In figuur (C) werd getracht de isoprenylatiestatus van CNP weer te geven. Isoprenoïdgroepen werden gelabeld met het anti-farnesyl antilichaam.

In figuur 14A wordt zowel bij de controle als bij behandelingen 1, 2 en 4 een bandje teruggevonden voor tubuline ter hoogte van 55 kDa. In deze stalen worden ook lichtere bandjes waargenomen op een hoogte van 46 en 48 kDa. In geval van behandeling 3 is dit niet waar te nemen. Deze experimentele bevindingen tonen aan dat overall evenveel staal op gel gebracht werd behalve bij behandeling 3. De bandjes ter hoogte van 46-48 kDa kunnen wijzen op de migratie van tubuline met het CNP proteïne wat duidt op interactie van tubuline met CNP.

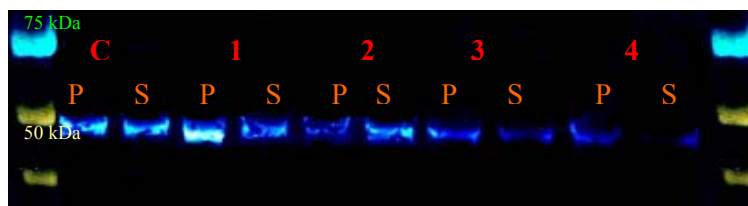
In figuur 14B wordt zowel bij de controle als bij de behandelingen 1, 2 en 4 op een hoogte van 46-48 kDa een duidelijk bandje voor CNP waargenomen. Enkel bij behandeling 3 is er geen bandje voor CNP zichtbaar. Hier mag echter niet uit geconcludeerd worden dat deze behandeling leidt tot een verminderde CNP-expressie aangezien er bij het blotje gekleurd met het anti-tubuline antilichaam (Figuur 14A) als controle ook geen expressie te zien is. Deze experimentele bevindingen tonen aan dat de OLN-93 cellen na behandeling met simvastatine nog steeds CNP tot expressie brengen op het proteïneniveau vergelijkbaar met de controle kweekomstandigheden.

In figuur 14C worden geen bandjes waargenomen ter hoogte van CNP (46-48 kDa) waardoor de isoprenylatiestatus van dit proteïne niet aangetoond kan worden, ook niet onder controle omstandigheden. Wel wordt zowel bij de controle als bij de behandelingen een kleuring waargenomen dat hoger ligt. De controle en de behandelingen 1 en 2 vertonen een bandje tussen de 60 en 70 kDa zoals ook het geval was in figuur 13. Bij de behandelingen 3 en 4 wordt een bandje waargenomen dat tussen de 50 en 60 kDa gelegen is. In tegenstelling tot de vaststelling in figuur 13 waarbij de 1 μ M 48h simvastatinebehandeling twee bandjes waargenomen kunnen worden, wordt in figuur 14C slechts één bandje vastgesteld op een hoogte tussen de 50 en 60 kDa. Deze experimentele bevindingen tonen de isoprenylatiestatus van CNP in OLN-93 cellen behandeld met simvastatine en controlecellen niet aan. De bandjes stellen andere onbekende geïsooprenyleerde proteïnen voor.

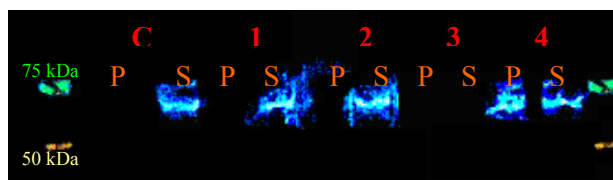
In een derde fase van de optimalisatieprocedure werd een onderscheid gemaakt tussen membraire en cytosolaire fractie met als doel de eventuele verschuiving van CNP naar de cytosolaire fractie te kunnen vaststellen wanneer CNP niet meer geïsooprenyleerd wordt. Met behulp van de Bradfordmethode werd de proteïneconcentratie per staal bepaald. Een nadeel is dat dit gebeurde vóór de splitsing in membraire (pellet) en cytosolaire (supernatans) fractie. Op deze manier is het onmogelijk te weten of er inderdaad in elk slotje evenveel proteïnen geladen worden.



A. Tubuline



B. CNP



C. Farnesyl

Figuur 15. Expressie van tubuline, CNP en de isoprenylatiestatus van CNP in controlecellen en behandelde cellen na scheiding in membraniere en cytosolaire fractie. De verschillende simvastatinebehandelingen werden wederom onderverdeeld in vier categorieën: (1) 0.1 μM 24h, (2) 0.1 μM 48h, (3) 1 μM 24h en (4) 1 μM 48h. Elk staal werd opgesplitst in een membraniere en een cytosolaire fractie. In de figuur wordt dit weergegeven als pellet (P) en supernatans (S), respectievelijk. In figuur (A) wordt de expressie van tubuline weergegeven door labeling met het anti-tubuline antilichaam. Tubuline wordt gebruikt als een controle om na te gaan of er evenveel materiaal werd geladen op de gelen. In figuur (B) wordt gebruik gemaakt van het anti-CNP antilichaam om de expressie van het myelineproteïne CNP te kunnen waarnemen. In figuur (C) werd getracht de isoprenylatiestatus van CNP weer te geven. De isoprenoïdgroepen werden hiervoor gelabeld met het anti-farnesyl antilichaam.

In figuur 15A wordt waargenomen dat zowel in de controle als in de behandelingen 1 en 2 een dikker bandje zichtbaar is voor tubuline (55 kDa) in het supernatans dan in de pellet. Bij behandeling 3 en 4 zijn de bandjes lichter maar de bandjes van het supernatans zijn nog steeds dikker dan die van de pellet. Deze experimentele bevindingen tonen aan dat deze scheidingsmethode blijkbaar zorgt voor een grotere hoeveelheid proteïne in het supernatans dan in de pelletfractie.

In figuur 15B wordt vastgesteld dat zowel in de controle als in de behandelde cellen een bandje zichtbaar is voor CNP (46-48 kDa) in de pellet en in het supernatans. Bij behandelingen 3 en 4 zijn de bandjes in beide fracties kleiner dan bij de overige stalen. Hieruit kan echter niets geconcludeerd worden aangezien de kleuring met tubuline ook duidt

op minder aangebracht proteïne in deze laantjes. Deze experimentele bevindingen tonen aan dat CNP zowel in het cytosol als in het membraan teruggevonden wordt. Om echter vast te stellen of er een verschuiving is van CNP van membraan naar cytosolaire fractie is onduidelijk. Het lijkt erop dat de membraan fractie (P) afneemt maar er kan geen overeenkomstige stijging waargenomen worden in de cytosolaire fractie die wijst op een verschuiving van CNP.

In figuur 15C worden wederom bandjes gezien die duiden op reactie van het antilichaam tegen farnesyl met proteïnen. Het gaat echter niet om reactie met CNP (idem figuur 13 en 14). Wat opvalt is dat er telkens reactie is met proteïnen die in het supernatans (cytosol) aanwezig zijn behalve bij behandeling 3. Behandeling 4 vertoont zowel in het supernatans als in de pellet een bandje. Deze experimentele bevindingen tonen aan dat de isoprenylatiestatus van CNP zowel in OLN-93 cellen behandeld met simvastatine als in de controlecellen niet nagegaan kon worden aangezien er geen bandjes te zien waren op de hoogte van CNP (46-48 kDa) indien gekleurd met het antilichaam gericht tegen isoprenoïdgroepen. Omdat labeling met anti-farnesyl wel kleuring vertoonde van andere proteïnen werd een Coomassie-kleuring uitgevoerd. Vervolgens werden de bandjes op een hoogte van CNP en ter hoogte van de ongekende geïsooprenyleerde proteïnen gedigesteerd en werd met behulp van de massaspectrometer de identiteit van deze proteïnen nagegaan. Een interessante bevinding is dat in het bandje ter hoogte van CNP het proteïne tubuline teruggevonden kan worden. Dit stemt overeen met de bevindingen van figuur 14A. De proteïnen waarmee het anti-farnesyl antilichaam reageerde, zouden de volgende kunnen zijn: *heat shock proteïn 70* (Hsp70) (70 kDa), enolase (67 kDa) en albumine (66 kDa).

Discussie

Volgens de gestelde hypothese zou simvastatine, door het inhiberen van de isoprenylatie van CNP, de reorganisatie van de microtubuli alsmede de sturing van de uitlopervorming kunnen verhinderen. Dit zou een nefast effect kunnen betekenen indien de functie van oligodendrocyten beschouwd wordt, namelijk het (re)myeliniseren van axonen.

Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van de oligodendrogliale OLN-93 cellijn. Deze cellijn werd gekozen omwille van het feit dat de OLN-93 cellen worden beschouwd als een bruikbaar modelsysteem van oligodendrocyten omwille van de expressie van NG₂, GalC, MBP, MAG, PLP en CNP. De OLN-93 cellijn kent tevens enkele voordelen die het gebruik ten opzichte van primaire celculturen aantrekkelijker maakt: de cellen zijn altijd beschikbaar en relatief makkelijk te onderhouden. De controlecellen werden gedurende 1 dag in groeimedium (DMEM met 10% FCS) geplaatst om vervolgens 2 dagen te differentiëren in differentiatiedium met een laag serumgehalte (0.5% FCS).

In deze studie werd simvastatine gebruikt als behandeling omdat deze drug lipofiele eigenschappen vertoont waardoor migratie doorheen de BHB mogelijk is, wat relevant is in het onderzoek waar MS centraal staat. De behandelde cellen werden op verschillende tijdstippen (gedurende 24h en 48h) blootgesteld aan verschillende concentraties simvastatine (0.1 μ M en 1 μ M) die aan het differentiatiedium werden toegevoegd. Eerdere experimenten hebben reeds uitgewezen dat behandeling met hoge concentraties simvastatine (50 μ M) lethaal is voor de cellen, vandaar de keuze voor (sub)micromolaire concentraties.³⁸ Het vastleggen van de behandelingstijden op 24 en 48 uur is gebaseerd op literatuur.³⁹ Ook het feit dat na 48h in differentiatiedium de OLN-93 cellen een sterk vertakte morfologie vertonen en een goede controle vormen, leidt tot deze keuze. Vervolgens werden verschillende experimenten uitgevoerd om de morfologische en CNP-gerelateerde effecten van simvastatine op de OLN-93 cellijn te achterhalen.

Een eerste benadering om de effecten van simvastatinebehandeling op de morfologie van de cellen te bestuderen, was het gebruik van Bodipy FL-C5. Deze fluorescente dye is een goede merker voor membranen om ook de allerfijnste vertakkingen van de cellen zichtbaar te maken. Door het selecteren van verschillende ROI's is het mogelijk om een volledig detailbeeld te verkrijgen van het vertakkingennetwerk rondom iedere cel. Er werd echter gekozen om een groot aantal cellen in de studie op te nemen om een duidelijk beeld te krijgen van de vertakkinggraad van de cellen. Daarom werd omwille van het intensievere karakter

van deze methode voor de bepaling van eventuele morfologische veranderingen geopteerd voor het gebruik van helder-veld-beelden, ook al zijn dan de allerfijnste vertakkingen niet duidelijk zichtbaar. Uit de resultaten blijkt dat het gemiddeld celoppervlak van de cellen gekweekt onder controle-omstandigheden significant verschilt van de behandelde cellen. De controlecellen vertonen een vlakke vertakte morfologie, vele uitlopers en een uitgebreid netwerk van fijnere uitlopers. De cellen behandeld met simvastatine vertonen duidelijk een kleiner gemiddeld celoppervlak dan de controlecellen. OLN-93 cellen behandeld met 1 μM simvastatine verschillen significant van cellen behandeld met 0.1 μM . De cellen behandeld met 1 μM hebben een kleiner gemiddeld celoppervlak dan cellen behandeld met 0.1 μM . Hieruit kan worden afgeleid dat de invloed van simvastatine concentratie-afhankelijk is. Het tijdsafhankelijke effect van simvastatinebehandeling is niet significant maar er kan wel een trend vastgesteld worden: de cellen behandeld met 0.1 μM 24h hebben een groter gemiddeld celoppervlak dan cellen behandeld met 0.1 μM 48h. Dit geldt eveneens voor de behandeling met 1 μM 24h en 1 μM 48h.

Ook de morfologische veranderingen die de cellen ondergaan na behandeling zijn duidelijk: gaande van nog sterk vertakte cellen naar cellen met een tri- of bipolaire morfologie. De cellen die de lichtste behandeling (0.1 μM 24h) ondergingen leunen qua morfologie het dichtst aan bij de controlecellen. De zwaarste behandeling (1 μM 48h) levert de minst vertakte morfologie op zijnde voornamelijk bi-/tripolaire cellen waarvan het cellichaam begint op te ronden. De behandelingen 0.1 μM simvastatine 48h en 1 μM 24h liggen tussen deze twee uitersten in en zijn vergelijkbaar qua morfologie.

De bekomen data tonen aan dat de behandeling met simvastatine zorgt voor een afname van het gemiddeld celoppervlak van OLN-93 cellen die concentratie-afhankelijk is en waarbij de morfologie duidelijk verandert naar cellen met een lagere vertakingsgraad. Deze resultaten zouden kunnen wijzen op het remmend effect van simvastatine op de uitlopervorming zoals in de hypothese wordt aangegeven. Door het feit dat CNP niet geïsooprenyleerd zou worden, zou dit myelineproteïne niet functioneel zijn waardoor reorganisatie van de microtubuli belemmerd zou kunnen worden. Eerdere experimenten van Lee et al. (2005) hebben reeds de betrokkenheid van CNP aangetoond bij het coördineren van de microtubuli en de sturing van uitlopers in COS-7 en OLN-93 cellen.³ Op deze manier zou de uitlopervorming geïnhibeerd worden en zou het celoppervlak van de behandelde cellen kwantitatief afnemen gepaard gaand met een afname van het aantal vertakkingen.

Opgemerkt dient te worden dat het aantal cellen per oppervlak afneemt. Dit is vooral zo in het geval van de zwaarste behandeling (1 μM simvastatine gedurende 48h). De verklaring kan

gezocht worden in het feit dat, door de drastische afname van het aantal vertakkingen en opronding van het cellichaam, de OLN-93 cellen hun grip verliezen en loskomen van het oppervlak.

De invloed van simvastatine op de expressie van CNP in OLN-93 cellen werd onderzocht op basis van immunocytochemische kleuringen met behulp van Alexa 555 gelabelde antilichamen. Tubuline en CNP worden zowel in de controle als in de vier behandelingen tot expressie gebracht. Het fluorescentiesignaal van het anti-tubuline antilichaam is in deze cellen vooral waarneembaar in het cellichaam en de primaire en secundaire vertakkingen van de OLN-93 cellen. De bekomen resultaten tonen aan dat de OLN-93 cellen na behandeling met simvastatine nog steeds CNP tot expressie brengen. Dit wordt verwacht aangezien ervan uitgegaan wordt dat simvastatine een negatief effect heeft op de post-translationele modificatie van proteïnen maar niet op de expressie ervan.

Aangezien aangenomen wordt dat minder CNP met membranen geassocieerd zou zijn, omwille van de inhibitie van de isoprenylatie door behandeling met simvastatine, zou een eventuele verschuiving van CNP naar het cytosol vastgesteld kunnen worden. Met deze immunokleuring wordt echter een uniforme verdeling van CNP waargenomen en kan de eventuele verschuiving niet waargenomen worden.

Zowel de tubuline- als de CNP-kleuring worden teruggevonden in het cellichaam en de vertakkingen van de OLN-93 cellen. Eerdere experimenten van Richter-Landsberg (2001) hebben eveneens met behulp van een immunocytochemische kleuring met het anti-tubuline antilichaam kunnen aantonen dat microtubuli verspreid liggen over het cellichaam en de grotere en kleinere vertakkingen van de oligodendrocyten.⁴ In de toekomst kan het de moeite waard zijn om een cokleuring uit te voeren met de anti-tubuline en anti-CNP antilichamen om de colokalisatie van tubuline en CNP beter in beeld te kunnen brengen. Tot op heden was dit geen optie doordat beide primaire antilichamen van het muis-type waren waardoor cokleuring onmogelijk was.

De invloed van simvastatine op de expressie van CNP en op de isoprenylatiestatus van CNP in de OLN-93 cellen werd onderzocht met behulp van Western blotting. Bij een eerste benadering werd een overschakeling gemaakt van een 6% naar een 10% *resolving gel* met het oog op een betere scheiding van de proteïnen met een moleculair gewicht van rond de 50 kDa. Aangezien het gewenste proteïne CNP een moleculair gewicht heeft van 46-48 kDa kan op deze manier een beter onderscheid gemaakt worden tussen CNP en andere nabijgelegen

proteïnen. Tubuline en CNP worden zowel in de controlecellen als in de behandelde cellen nog steeds tot expressie gebracht op proteïneniveau zoals ook geleerd werd uit de immunocytochemische kleuringen. Het anti-farnesyl antilichaam reageert met andere (onbekende) proteïnen met een moleculair gewicht dat hoger ligt dan dat voor CNP. Kleuring met een meer geconcentreerd anti-farnesyl antilichaam gaf eveneens hetzelfde resultaat. Geldigestie na Coomassiekleuring en daaropvolgende massaspectrometrie duiden op de aanwezigheid van onder andere *heat shock proteïn 70* (Hsp70) (70 kDa), enolase (67 kDa) en albumine (66 kDa). De aanwezigheid van albumine (66 kDa) kan echter een aanwijzing zijn dat het gaat om aspecifieke binding van het anti-farnesyl antilichaam met dit proteïne. In het bandje ter hoogte van CNP werd het proteïne tubuline waargenomen wat zou kunnen wijzen op de interactie van CNP met tubuline.

Verdere optimalisatie van de Western blotting techniek waarbij evenveel materiaal geladen wordt op de gelen zodat de controle met tubuline bij alle stalen hetzelfde resultaat geeft, is noodzakelijk. Pas dan kan er kwantitatief gewerkt worden en kunnen conclusies getrokken worden uit de kleuringen met de anti-CNP en anti-farnesyl antilichamen. Bij het scheiden van een membraanire (P) en een cytosolaire (S) fractie is het echter moeilijk om in elk slotje dezelfde proteïneconcentratie te laden omdat een Bradford assay enkel uitgevoerd kan worden vóór de scheiding aangezien de stalen na de scheiding opgelost worden in een (blauwkleurige) staalbuffer. Hierdoor is niet exact geweten hoeveel proteïnen aanwezig zijn in de membraanire en de cytosolaire fractie afzonderlijk en verschillen de bandjes van dikte. Deze scheidingstechniek lijkt wel te leiden tot een hogere proteïneconcentratie in het supernatans dan in de pellet.

In de toekomst zou nog kunnen nagegaan worden of het toevoegen van mevalonaat aan het medium kan leiden tot het belemmeren van de werking van statines aangezien mevalonaat de bron is voor de aanmaak van de isoprenoïdmediatoren. Braun et al. (1991) hebben reeds in rat C6 glioma cellen aangetoond dat toevoeging van mevalonaat aan het cultuurmedium de binding van CNP aan membranen, die door inhibitie van de isoprenoïdsynthese door lovastatine tenietgedaan zou worden, hersteld.¹¹

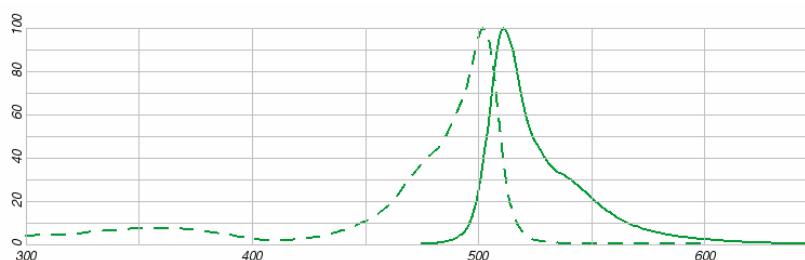
In de nabije toekomst zou een *microtubule binding assay* uitgevoerd kunnen worden met als bedoeling het isoleren van stabiele microtubuli en vrij tubuline uit de OLN-93 cellen. Via deze techniek kunnen de met microtubuli of tubuline interagerende proteïnen worden aangetoond. Een eventuele verandering van de interactie tussen CNP en microtubuli door behandeling met simvastatine kan dan met deze techniek nagegaan worden.

Wanneer deze experimenten geoptimaliseerd zijn, kunnen ze herhaald worden op primaire culturen van oligodendrocyten omdat deze celculturen nauwer aansluiten met de *in vivo* situatie in vergelijking met een cellijn.

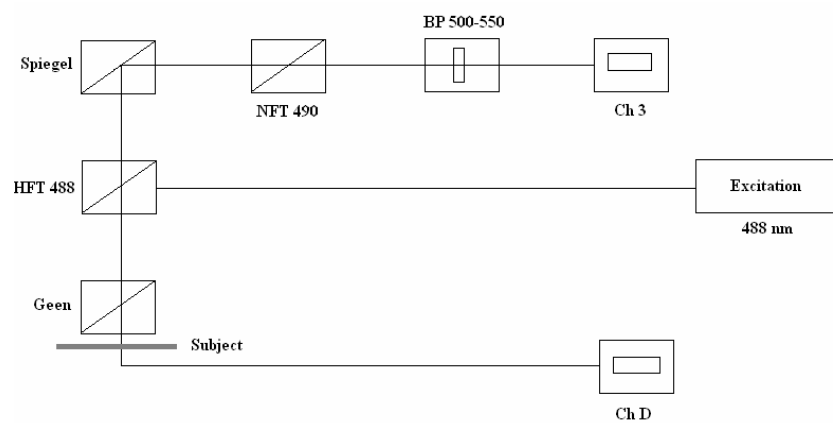
In het algemeen kan geconcludeerd worden dat simvastatine leidt tot een concentratie-afhankelijke afname van het gemiddeld celoppervlak van OLN-93 cellen waarbij duidelijke veranderingen in de morfologie waargenomen kunnen worden door een verlaging in vertakingsgraad. Simvastatine heeft geen effect op de expressie van CNP. Of simvastatine een nefaste invloed heeft op de isoprenylatiestatus van CNP is nog niet aangetoond.

Bijlage

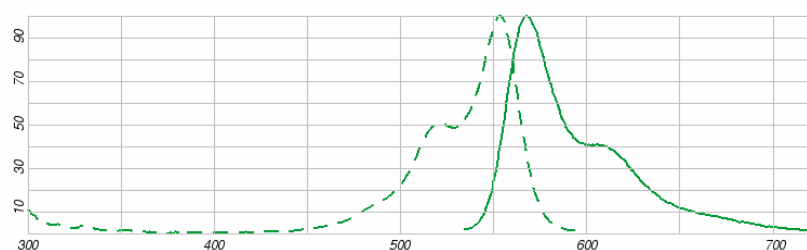
Excitatie- ($\lambda=505\text{nm}$) (---) en emissiespectrum ($\lambda=511\text{nm}$) (___) van Bodipy FL-C5.



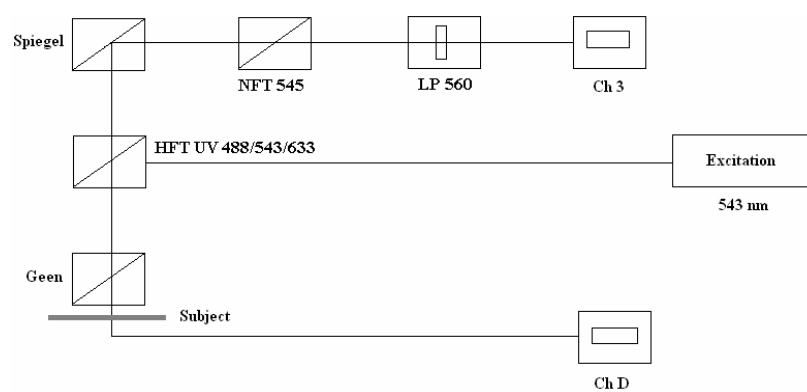
Confocale setup voor de detectie van Bodipy FL-C5.



Excitatie- ($\lambda=555\text{nm}$) (---) en emissiespectrum ($\lambda=568\text{nm}$) (___) van Alexa 555.



Confocale setup voor de detectie van Alexa 555.



Referentielijst

1. O'Neill RC, Braun PE. Selective synthesis of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase isoform 2 and identification of specifically phosphorylated serine residues. *J Neurochem* 2000; 74(2):540-6.
2. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 2001; 81(2):871-927. Review.
3. Lee J, Gravel M, Zhang R, Thibault P, Braun PE. Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *J Cell Biol* 2005; 170(4):661-73.
4. Richter-Landsberg C. Organization and functional roles of the cytoskeleton in oligodendrocytes. *Microsc Res Tech* 2001; 52(6):628-36. Review.
5. Tzakos AG, Troganis A, Theodorou V *et al.* Structure and function of the myelin proteins: current status and perspectives in relation to multiple sclerosis. *Curr Med Chem* 2005; 12(13):1569-87. Review.
6. Sherman DL, Brophy PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(9):683-90. Review.
7. Popko B. Myelin: not just a conduit for conduction. *Nat Genet* 2003; 33(3):327-8.
8. Vinson M, Rausch O, Maycox PR *et al.* Lipid rafts mediate the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons. *Mol Cell Neurosci* 2003; 22(3):344-52.
9. De Angelis DA, Braun PE. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase binds to actin-based cytoskeletal elements in an isoprenylation-independent manner. *J Neurochem* 1996; 67(3):943-51.
10. De Angelis DA, Braun PE. Isoprenylation of brain 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase modulates cell morphology. *J Neurosci Res* 1994; 39(4):386-97.

11. Braun PE, De Angelis D, Shtybel WW, Bernier L. Isoprenoid modification permits 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase to bind to membranes. *J Neurosci Res* 1991; 30(3):540-4.
12. Laezza C, Wolff J, Bifulco M. Identification of a 48-kDa prenylated protein that associates with microtubules as 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in FRTL-5 cells. *FEBS Lett* 1997; 413(2):260-4.
13. Rando RR. Chemical biology of isoprenylation/methylation. *Biochem Soc Trans* 1996; 24(3):682-87.
14. De Angelis DA, Braun PE. Binding of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase to myelin: an in vitro study. *J Neurochem* 1996; 66(6):2523-31.
15. Kim T, Pfeiffer SE. Myelin glycosphingolipid/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP and MOG. *J Neurocytol* 1999; 28(4-5):281-93.
16. Bifulco M, Laezza C, Stingo S, Wolff J. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(4):1807-12.
17. Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res* 2002; 25(1):27-51. Review.
18. Lassmann H. Hypoxia-like tissue injury as a component of multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 2003; 206(2):187-91. Review.
19. Goeb JL, Even C, Nicolas G, Gohier B, Dubas F, Garre JB. Psychiatric side effects of interferon-beta in multiple sclerosis. *Eur Psychiatry* 2006; 21(3):186-93.
20. Lim ET, Giovannoni G. Immunopathogenesis and immunotherapeutic approaches in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 2005; 5(3):379-90. Review.
21. Boz C, Ozmenoglu M, Velioglu S *et al.* Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon beta. *Clin Neurol Neurosurg* 2006; 108(2):124-8.

22. Vallittu AM, Peltoniemi J, Elovaara I *et al.* The efficacy of glatiramer acetate in beta-interferon-intolerant MS patients. *Acta Neurol Scand* 2005; 112(4):234-7.
23. Sirvent P, Mercier J, Vassort G, Lacampagne A. Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca²⁺ signaling alteration in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329(3):1067-75.
24. Bellosta S, Paoletti R, Corsini A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Circulation* 2004; 109(23 Suppl 1):III50-7. Review.
25. Liao JK. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 2005; 96(5A):24F-33F. Review.
26. Menge T, Hartung HP, Stuve O. Statins--a cure-all for the brain? *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(4):325-31. Review.
27. Endres M. Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25(9):1093-110. Review.
28. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(11):1712-9. Review.
29. Vollmer T, Key L, Durkalski V *et al.* Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2004; 363(9421):1607-8.
30. Dunn SE, Youssef S, Goldstein MJ *et al.* Isoprenoids determine Th1/Th2 fate in pathogenic T cells, providing a mechanism of modulation of autoimmunity by atorvastatin. *J Exp Med* 2006; 203(2):401-12.
31. Stanislaus R, Pahan K, Singh AK, Singh I. Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin. *Neurosci Lett* 1999; 269(2):71-4.
32. Graham DJ, Staffa JA, Shatin D *et al.* Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *JAMA* 2004; 292(21):2585-90.
33. Neuhaus O, Stuve O, Zamvil SS, Hartung HP. Are statins a treatment option for multiple sclerosis? *Lancet Neurol* 2004; 3(6):369-71. Review.

-
34. Paintlia AS, Paintlia MK, Khan M, Vollmer T, Singh AK, Singh I. HMG-CoA reductase inhibitor augments survival and differentiation of oligodendrocyte progenitors in animal model of multiple sclerosis. *FASEB J* 2005; 19(11):1407-21.
 35. Sepp-Lorenzino L, Coleman PS, Larocca JN. Isoprenylated proteins in myelin. *J Neurochem* 1994; 62(4):1539-45.
 36. Richter-Landsberg C, Heinrich M. OLN-93: a new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. *J Neurosci Res* 1996; 45(2):161-73.
 37. Gielen E, Vercammen J, Sykora J *et al.* Diffusion of sphingomyelin and myelin oligodendrocyte glycoprotein in the membrane of OLN-93 oligodendroglial cells studied by fluorescence correlation spectroscopy. *C R Biol* 2005; 328(12):1057-64.
 38. Ellen Loyens. De invloed van simvastatine op oxidatieve stress in OLN-93 cellen. 2004-2005.
 39. Miron VE, Rajasekharan S, Jarjour AA, Zamvil SS, Kennedy TE, Antel JP. The effect of simvastatin on human and rodent oligodendrocyte progenitor cells. 2005.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen en uw akkoord te verlenen.

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Morfologische en CNP-gerelateerde effecten van simvastatine op OLN-93 cellen

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt houdt in dat ik/wij als auteur de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij kan reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

U bevestigt dat de eindverhandeling uw origineel werk is, en dat u het recht heeft om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. U verklaart tevens dat de eindverhandeling, naar uw weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

U verklaart tevens dat u voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen hebt verkregen zodat u deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal u als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze licentie

Ik ga akkoord,

Kim RUBENS

Datum: