

# ***Neurokine gemedieerde protectie van oligodendrocyten in multiple sclerose***

## ***karakterisatie van het werkingsmechanisme***

**Katrien VANDEBROEK**

promotor :  
dr. Niels HELLINGS

co-promotor :  
Prof. dr. Pieter STINISSEN

## **Inhoudsopgave**

|                                                                                     |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Lijst met afkortingen .....                                                         | II     |
| Lijst met figuren en tabellen.....                                                  | III    |
| Voorwoord .....                                                                     | IV     |
| Samenvatting .....                                                                  | V      |
| 1. Inleiding .....                                                                  | - 1 -  |
| 1.1 Multiple Sclerose.....                                                          | - 1 -  |
| 1.2 Immunopathogenese.....                                                          | - 2 -  |
| 1.2.1 Oligodendrocytschade in MS: rol van TNF-alfa, IFN-gamma en FAS-L .....        | - 2 -  |
| 1.2.2 Heterogeniteit van MS lesies.....                                             | - 4 -  |
| 1.3 De rol van inflammatie: mogelijke positieve effecten .....                      | - 5 -  |
| 1.4 Neurotrofe Factoren .....                                                       | - 5 -  |
| 1.5 Leukemia Inhibitory Factor .....                                                | - 6 -  |
| 1.6 Overlevingspathways aangeschakeld door LIF.....                                 | - 7 -  |
| 1.7 Doel van de studie .....                                                        | - 9 -  |
| 2. Materiaal en Methoden.....                                                       | - 10 - |
| 2.1 Celweek met OLN-93 cellen.....                                                  | - 10 - |
| 2.2 Isolatie van adulte primaire rat oligodendrocyten.....                          | - 10 - |
| 2.2.1 Dag 1 van de isolatie .....                                                   | - 10 - |
| 2.2.2 Dag 2 van de isolatie .....                                                   | - 11 - |
| 2.2.3 Dag 3 van de isolatie .....                                                   | - 11 - |
| 2.3 Viabiliteitsmeting met FACS na Annexine-V-FITC/7-AAD incubatie.....             | - 11 - |
| 2.4 Detectie van gefosforyleerd STAT3, ERK1/2 en Akt en gekleefd PARP.....          | - 12 - |
| 2.4.1 Voorbereiding op de western blot .....                                        | - 12 - |
| 2.4.2 Sodium Dodecyl Sulfaat- polyacrylamide gel elektroforese (SDS-PAGE).....      | - 13 - |
| 2.4.3 Immunoblotten .....                                                           | - 14 - |
| 2.4.4 Detectie door middel van enhanced chemiluminescence (ECL).....                | - 14 - |
| 3. Resultaten .....                                                                 | - 16 - |
| 3.1 Beschermende werking van LIF op verschillende manieren van apoptose-inductie .- | - 16 - |
| 3.1.1 Apoptose-inductie in OLN-93 cellen .....                                      | - 16 - |
| 3.1.2 Apoptose-inductie in primaire rat oligodendrocyten .....                      | - 17 - |
| 3.2 Survival pathways aangeschakeld door LIF in oligodendrocyten.....               | - 22 - |
| 3.2.1 De JAK/STAT pathway .....                                                     | - 23 - |
| 3.2.2 De MAPK pathway .....                                                         | - 24 - |
| 3.2.3 De PI <sub>3</sub> -kinase pathway .....                                      | - 25 - |
| 3.3 Zorgt TNF-alfa voor caspase-afhankelijke celdood? .....                         | - 27 - |
| 4. Discussie.....                                                                   | - 29 - |
| Referenties.....                                                                    | - 36 - |

## **Lijst met afkortingen**

|               |                                                                  |
|---------------|------------------------------------------------------------------|
| 7-AAD         | <i>7-amino actinomycine</i>                                      |
| APS           | <i>ammonium-persulfaat</i>                                       |
| BCA           | <i>bicinchoninic acid</i>                                        |
| BDNF          | <i>brain-derived neutrophic factor</i>                           |
| BSA           | <i>bovine serum albumine</i>                                     |
| CNTF          | <i>ciliary neutrophic factor</i>                                 |
| DMEM          | <i>dulbecco's modified eagle medium</i>                          |
| DMSO          | <i>dimethyl sulfoxide</i>                                        |
| EAE           | <i>experimentele autoimmune encephalomyelitis</i>                |
| ECL           | <i>enhanced chemiluminescence</i>                                |
| ERK1/2        | <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>                 |
| FACS          | <i>fluorescence-activated cell sorting</i>                       |
| FADD          | <i>Fas-associated death domain</i>                               |
| FASL          | <i>Fas ligand</i>                                                |
| FCS           | <i>fetal calf serum</i>                                          |
| GDNF          | <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>               |
| Gp130         | <i>glycoproteïne 130</i>                                         |
| HRP           | <i>horseradish peroxidase</i>                                    |
| IFN           | <i>interferon</i>                                                |
| IkappaB       | <i>inhibitor van NF-<math>\kappa</math>B</i>                     |
| JAK           | <i>janus tyrosine kinases</i>                                    |
| JNK3          | <i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase 3</i>                    |
| LIF           | <i>leukemia inhibitory factor</i>                                |
| LIFR- $\beta$ | <i>leukemia inhibitory factor receptor bèta</i>                  |
| MAPK          | <i>mitogen-activated protein kinase</i>                          |
| MBP           | <i>myelin basic protein</i>                                      |
| MRI           | <i>magnetic resonance imaging</i>                                |
| MS            | <i>multiple sclerose</i>                                         |
| NF-kappaB     | <i>nuclear factor-kappaB</i>                                     |
| NGF           | <i>nerve growth factor</i>                                       |
| NK cellen     | <i>natural killer cellen</i>                                     |
| NT            | <i>neurotrofine</i>                                              |
| OD            | <i>optische densiteit</i>                                        |
| OsM           | <i>oncostatine M</i>                                             |
| PARP          | <i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>                              |
| PBS           | <i>phosphate buffered saline</i>                                 |
| PI3-kinase    | <i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>                             |
| PP            | <i>primair progressieve</i>                                      |
| P/S           | <i>peniciline/streptomycine</i>                                  |
| PVDF          | <i>polyvinylidene difluoride</i>                                 |
| RR            | <i>relapsing remitting</i>                                       |
| SDS-PAGE      | <i>sodium dodecyl sulfaat - polyacrylamide gel elektroforese</i> |
| SOCS          | <i>suppressors of cytokine signalling</i>                        |
| SP            | <i>secundair progressieve</i>                                    |
| STAT          | <i>signal transducer and activator of transcription</i>          |
| TNF           | <i>tumor necrose factor</i>                                      |
| TNFR          | <i>TNF-alfa receptor</i>                                         |
| TRADD         | <i>TNF-receptor-1 associated death domain</i>                    |

## **Lijst met figuren en tabellen**

- Figuur 1: Overlevingspathways aangeschakeld door LIF.
- Figuur 2: OLN-93 cellen behandeld met staurosporine al dan niet in aanwezigheid van LIF.
- Figuur 3: Primaire rat oligodendrocyten behandeld met staurosporine al dan niet in aanwezigheid van LIF.
- Figuur 4: Primaire rat oligodendrocyten behandeld met TNF-alfa en IFN-gamma al dan niet in aanwezigheid van LIF.
- Figuur 5: Primaire rat oligodendrocyten behandeld met TNF-alfa en TNF-alfa in combinatie met IFN-gamma al dan niet in aanwezigheid van LIF.
- Figuur 6: Primaire rat oligodendrocyten behandeld met TNF-alfa, IFN-gamma en LIF in verschillende combinaties.
- Figuur 7: Primaire rat oligodendrocyten behandeld met FASL al dan niet in aanwezigheid van LIF.
- Figuur 8: STAT3 fosforylatie in primaire rat oligodendrocyten.
- Figuur 9: ERK fosforylatie in primaire rat oligodendrocyten.
- Figuur 10: Akt fosforylatie in primaire rat oligodendrocyten.
- Figuur 11: Voorbeeld van de optimalisatie bij de western blot procedure.
- Figuur 12: Klieving van PARP in OLN-93 cellen.
- Figuur 13: Klieving van PARP in primaire rat oligodendrocyten.
- 
- Tabel 1: Samenstelling van de *resolving gel* en de *stacking gel* bij western blot.
- Tabel 2: Primaire antilichamen en hun verdunning gebruikt voor het detecteren van specifieke moleculen tijdens western blotting.

## **Voorwoord**

Het einde van het schooljaar nadert, net als het einde van mijn opleiding tot biomedicus aan de Universiteit van Hasselt. Het waren vier spannende jaren met enkele moeilijke periodes, maar toch veel meer mooie momenten. Als stagiaire aan het Biomedisch Onderzoeksinstituut heb ik kunnen proeven van de wereld van onderzoek en wetenschap. Het is voor mij een tijd met mooie herinneringen, ook al verliepen de experimenten niet altijd zoals gewild. Een zeer waardevolle periode uit mijn leven is nu voorbij, maar hopelijk openen zich nu nieuwe deuren die leiden tot een toekomst vol geluk.

Ik zou van de gelegenheid gebruik willen maken om een woord van dank uit te spreken aan diegene die aan deze fijne tijd hebben meegewerkt. Als eerste wil ik mijn ouders en familie bedanken die mij altijd gesteund hebben, in goede en moeilijke dagen. Ook een woord van dank aan prof. dr. Piet Stinissen, copromotor, die voor de mogelijkheid heeft gezorgd om een stageplaats op Biomed te bemachtigen. Dank aan mijn promotor dr. Niels Hellings voor het snelle leeswerk en de goede raad tijdens mijn stage, en aan mijn tweede beoordelaar prof. dr. Marcel Ameloot voor het nalezen van mijn thesis. Leentje, dank u voor de zeer fijne en leerrijke tijd. Ik heb echt veel hulp van je gekregen. Ik mocht altijd bij je langskomen voor raad en je stond altijd klaar om me te helpen. Niet alleen bij het labowerk, maar ook met het verbeteren van de thesis. Ook je enthousiasme werkte erg aanstekelijk. Wilfried, merci voor de hulp bij de ratjes. Het was een hele geruststelling dat ik hiervoor op u kon rekenen. Dank aan Igna, Christel, Regine, Paul, Agnes, Brigitte en al de andere medewerkers van het instituut waarbij ik altijd kon aankloppen als ik iets nodig had. Ook een woord van dank voor al de doctoraatstudenten die altijd voor me klaarstonden. Kurt, bedankt voor de aanmoedigende gesprekken. Medestudenten, bedankt voor de toffe studententijd. Een speciaal woordje van dank aan mijn beste vriendin, Kim, waarop ik altijd kon steunen. Je was er altijd voor mij, zeker tijdens de moeilijkere dagen, maar ook hebben we samen vele toffe weekends en andere leuke activiteiten gekend tijdens onze jaren aan de Unief. Je blijft een vriendin voor het leven. Johan, dank je voor je geduld en steun tijdens de drukkere periode van mijn stage. Ik wil besluiten met een gezegde waarvan ik hoop dat deze zeker waar zal zijn voor al de personen die ik tijdens mijn vier jaar aan de Universiteit van Hasselt heb leren kennen: Hopelijk tot weerzien, misschien uit het oog, maar zeker niet uit het hart!

## Samenvatting

MS is één van de meest voorkomende neurologische ziekten bij jong volwassenen. Hierbij treedt demyelinisatie en schade aan oligodendrocyten op door een inflammatoir proces in het centrale zenuwstelsel. Bij dit proces spelen pro-inflammatoire cytokines zoals TNF-alfa en IFN-gamma een zeer belangrijke rol. De huidige behandelingswijze richt zich op het onderdrukken van deze inflammatoire respons. Therapieën die de overleving van oligodendrocyten en de remyelinisatie bevorderen, kunnen een goede aanvulling vormen op de bestaande behandelingswijzen. Deze studie gaat het effect van LIF na op de overleving van primaire rat oligodendrocyten. LIF is een pleiotroop cytokine met vele functies over heel het lichaam. Verscheidene studies tonen aan dat LIF neuroprotectieve effecten heeft. Een eerste doel van deze studie was een *in vitro* model te ontwikkelen waarin factoren, zoals LIF, getest kunnen worden die mogelijk protectieve effecten uitoefenen op oligodendrocyten. Voor deze studie werd gebruik gemaakt van FACS om viabiliteit te meten bij primaire rat oligodendrocyten die behandeld werden met staurosporine, TNF-alfa en IFN-gamma. Door co-incubatie met LIF werd de protectieve werking van dit neurokine nagegaan op de verschillende vormen van celdood-inductie. Het lijkt alsof LIF een pathway-onafhankelijke protectie biedt tegen apoptose. Zo zou LIF niet alleen in staat zijn om oligodendrocyten te beschermen tegen het wegnemen van groei- en overlevingsfactoren, maar ook tegen apoptose, veroorzaakt door staurosporine en cytokines zoals TNF-alfa en IFN-gamma, die elk via verschillende signaalwegen tot celdood leiden. Een tweede doel was onderzoeken welke intracellulaire signaalwegen aangeschakeld worden door LIF in oligodendrocyten. Hiervoor werd de fosforylatie van sleutelmoleculen in drie overlevingspathways (de JAK/STAT signaalweg, de MAPK signaalweg en de PI<sub>3</sub>-kinase signaalweg) onderzocht met behulp van western blot waarbij de fosforylatie van de sleutelmoleculen aangetoond werd met specifieke antilichamen. LIF bewerkstelligt zijn protectief effect waarschijnlijk door het evenwicht tussen anti-apoptotische en pro-apoptotische moleculen te doen overhellen naar de anti-apoptotische zijde. Dit kan LIF doen door fosforylatie van STAT3 en ERK1/2. De fosforylatie van Akt is in deze studie niet aangetoond kunnen worden. Diepere inzichten in de wijze waarop LIF zijn protectieve effecten bewerkstelligt kan bijdragen tot de ontwikkeling van meer specifieke therapieën voor MS.

## **1. Inleiding**

### 1.1 Multiple Sclerose

Multiple Sclerose (MS) is een chronisch inflammatoire aandoening van het centrale zenuwstelsel. Het is één van de meest voorkomende neurologische ziekten bij jong volwassenen. MS komt vooral voor in Europa en Noord-Amerika, met twee keer zoveel vrouwen die getroffen worden door de ziekte dan mannen. De klinische symptomen van deze aandoening komen tot uiting in de vroege jaren van de volwassenheid (20-40 jaar). De neurologische symptomen en de graad van onvermogen kunnen erg variëren van patiënt tot patiënt. De meest voorkomende symptomen zijn een aantasting van de visuele en sensorische prikkels, verlamingsverschijnselen en andere neurologische gevolgen zoals cognitieve dysfunctie. Ook kunnen problemen met kracht en coördinatie optreden. Het belangrijkste pathologische kenmerk van de ziekte is de aanwezigheid van sclerotische lesies of plaques in het centrale zenuwstelsel. De plaques kunnen in het hele centrale zenuwstelsel voorkomen, maar worden frequenter aangetroffen in het weefsel dat de ventrikels omringt, in de optische zenuwen, in de hersenstam en in het ruggenmerg. In deze lesies treedt een selectief verlies op van myeline en oligodendrocyten, wat uiteindelijk tot een volledig verlies van axonale conductie kan leiden. Deze demyelinisatie gaat gepaard met een inflammatoire reactie, met infiltratie van T-cellen en macrofagen. Een specifieke diagnostische test voor MS bestaat niet. De diagnose is vooral gebaseerd op de klinische voorgeschiedenis en een neurologisch onderzoek. Door middel van *magnetic resonance imaging* (MRI) kunnen de plaques in het centrale zenuwstelsel aangetoond worden (1,2).

MS kan opgedeeld worden in drie verschillende vormen: *relapsing remitting* (RR) MS, secundair progressieve (SP) MS en primair progressieve (PP) MS. RR-MS is de meest voorkomende vorm, met een frequentie van 80 tot 90 procent. Kenmerkend voor deze vorm zijn episodes van neurologische dysfunctie van enkele weken, gevolgd door een gedeeltelijk of volledig herstel. Dit proces kan vele jaren aanhouden, waarna er vaak een overgang volgt naar een secundair progressieve vorm. Ongeveer 15 procent van de MS-patiënten ontwikkelt de primair progressieve vorm, die gekarakteriseerd wordt door een graduele verslechtering van neurologische functies en minder duidelijke plaques op MRI beelden (1,2,3).

## 1.2 Immuunpathogenese

MS wordt gezien als een auto-immune aandoening gemedieerd door myeline reactieve T-cellen. Volgens de meest gangbare hypothese is de perifere activatie van deze autoreactieve T-cellen één van de eerste stappen in de immuunpathogenese. De oorzaak van deze activatie is nog niet gekend (4). De geactiveerde autoreactieve T-cellen ondergaan expansie en migreren naar het centrale zenuwstelsel. Door de expressie van adhesiemoleculen, chemokines, chemokinereceptoren en de vrijzetting van pro-inflammatoire cytokines en matrix metalloproteases kunnen de T-cellen immers door de bloedschermbarrière dringen. Eénmaal in het centrale zenuwstelsel kunnen de autoreactieve T-cellen geheractiveerd worden wanneer ze in contact komen met myeline-epitopen op antigen presenterende cellen. Hierdoor gaan ze pro-inflammatoire cytokines produceren die een cascade aan immuunreacties uitlokken, waardoor andere immuuncellen zoals monocytën, T-cellen, mestcellen en B-cellen hun weg vinden naar de plaats van inflammatie. Vrijgezette cytokines, auto-antilichamen, complement-activatie en cytotoxische cellen beschadigen oligodendrocyten en neuronen en er treedt demyelinisatie op (1,2).

### 1.2.1 Oligodendrocytschade in MS: rol van TNF-alfa, IFN-gamma en FAS-L

MS is geassocieerd met een opregulatie van pro-inflammatoire cytokines waaronder Interferon-gamma (IFN-gamma) en Tumor Necrose Factor-alfa (TNF-alfa): verhoogde concentraties van beide cytokines zijn teruggevonden in het bloed en cerebrospinaal vocht van MS-patiënten en komen vaak overeen met de ernst van de ziekte (5).

*In vitro* blootstelling aan TNF-alfa leidt na 72-96 uur tot myeline-afbraak en beschadiging van oligodendrocyten. TNF-alfa geïnduceerde nucleaire fragmentatie treedt op bij humane oligodendrocyten *in vitro* (6). In transgene muizen veroorzaakt een verhoogde TNF-alfa expressie demyelinisatie (7). De TNF-alfa-receptor en het mRNA van TNF-alfa worden in verhoogde concentraties teruggevonden in MS-lesies (8). TNF-alfa is een pleiotroop cytokine dat onder andere betrokken is bij inflammatie en immuunregulatie. Het draagt bij tot de proliferatie, activatie en chemotaxis van ontstekingscellen (9). In het centrale zenuwstelsel wordt tijdens inflammatie het cytokine voornamelijk geproduceerd door geactiveerde macrofagen, maar ook door geactiveerde T-cellen en residente microglia en astrocyten (10). Binding van TNF-alfa aan zijn receptor resulteert in een trimerisatie van de receptoren. De cytoplasmatische domeinen van deze receptoren bezitten “*death domains*”. Op deze domeinen binden adaptor-eiwitten *FAS-associated death domain* (FADD) en *TNF-receptor-1 associated*

*death domain* (TRADD). Deze eiwitten gaan vervolgens caspase-8 activeren wat leidt tot het aanschakelen van de caspase-cascade. In deze cascade wordt het DNA gekleefd, wat kenmerkend is voor apoptose (11). De activatie van caspase-8 zorgt niet enkel voor de activatie van de caspase-cascade, het klieft ook een lid van de Bcl-2 familie, Bid. Dit molecuul bevindt zich in inactieve vorm in het cytoplasma en wordt geactiveerd na klieving. Geactiveerd Bid verplaatst zich naar de mitochondriën waar het de integriteit van de membraan zal verstoren zodat cytochrome C in het cytosol vrij komt (12). Anderzijds kan TNF- $\alpha$  ook zorgen voor activatie van de transcriptiefactor *Nuclear Factor-kappaB* (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B wordt in zijn inactieve staat gehouden door het inhibiti-eiwit inhibitor van NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), dat aan NF- $\kappa$ B-dimeren bindt in het cytoplasma. Na interactie van TNF- $\alpha$  met zijn receptor kan I $\kappa$ B gefosforyleerd worden. Hierdoor komen de NF- $\kappa$ B moleculen vrij en migreren ze naar de nucleus waar ze de transcriptie van specifieke genen stimuleren. De genen die aangeschakeld worden hebben een beschermende werking tegen apoptose en staan in voor celgroei (13). Er zijn twee TNF- $\alpha$  receptoren gekend, TNFR1 en TNFR2. Algemeen werd aangenomen dat TNFR1 tot apoptose leidt, via bovenvermelde caspase-cascade. TNFR2 zou voor celgroei en overleving zorgen. Deze indeling bleek echter te zwart-wit: ook via TNFR1 kan NF- $\kappa$ B geactiveerd worden, en naast de caspase-cascade blijken andere moleculen, zoals *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase 3* (JNK3), tot apoptose te leiden via signaalwegen die nog opgehelderd moeten worden (11). In cultuur werd aangetoond dat TNF- $\alpha$  en IFN-gamma een synergistische werking hebben op oligodendrocyt-apoptose (14).

IFN-gamma wordt gesecreteerd door geactiveerde T-cellen en *Natural Killer* (NK) cellen in actieve MS-lesies. IFN-gamma heeft verscheidene immuunmodulatoire effecten, zoals activatie van macrofagen, inductie van MHC-antigenen en promoten van de aantrekking van T-cellen. Oligodendrocyten in cultuur vertonen apoptose en necrose na behandeling met IFN-gamma (15). IFN-gamma is een ligand voor de CDw119 receptor die *in vitro* teruggevonden is op oligodendrocyten. Activatie van de receptor leidt tot *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) fosforylatie. Gefosforyleerd STAT1 dimeriseert en migreert naar de nucleus waar het de expressie van IFN-gamma-induceerbare genen zoals caspases en FAS-ligand (FAS-L) reguleert. (16, 17). Myeline reactieve T-cellen produceren *in vitro* IFN-gamma na contact met hun antigen. Het is aangetoond dat het aantal van deze cellen duidelijk stijgt in MS-patiënten (14).

FAS-FAS-L interacties spelen een belangrijke rol in de apoptose van oligodendrocyten tijdens MS. FAS is een oppervlaktereceptor die behoort tot de TNF-receptor superfamilie. De receptor induceert apoptose na binding aan zijn ligand of aan antilichamen (18). In normale omstandigheden is er geen expressie van FAS aan de oppervlakte van oligodendrocyten, maar bij de ontstekingsreactie tijdens MS is er een opregulatie van FAS. CD8+ T-cellen functioneren via twee mechanismen die tot cytotoxiciteit leiden: door cytokine-productie en vrijzetting van perforine-bevattende granules of via cel-cel contact. Dit cel-cel contact ontstaat tussen FAS op de doelwitcel en FAS-L op de geactiveerde T-cellen, waardoor celdood van de doelwitcel optreedt (19,20). Ook CD4+ T-cellen en microglia zijn in het bezit van FAS-L op hun oppervlak (18).

### 1.2.2 Heterogeniteit van MS lesies

MS is een ziekte met heterogeniteit in het klinisch verloop, en de respons op therapie. Deze heterogeniteit vertaalt zich ook in het uitzicht van de lesies. Er bestaat een classificatie die de lesies in vier verschillende patronen verdeelt, gebaseerd op myeline verlies, de plaats en extensie van de plaques, het patroon van oligodendrocyt destructie en bewijs van complement activatie (21). Patroon I en II vertonen overeenkomsten met T-cel gemedieerde autoimmune encephalomyelitis, respectievelijk zonder en met betrokkenheid van antilichamen. Patronen III en IV vertonen primaire oligodendrocyt dystrofie. Patroon III MS-lesies vertonen distale oligodendrogliopathie-geassocieerde demyelinisatie. Dit patroon wordt vaak teruggevonden in viraal of toxine-geïnduceerde aandoeningen van de witte massa bij mensen. In deze lesies treedt er een degeneratie op van distale oligodendrocyt uitlopers, gevolgd door oligodendrocyt apoptose en demyelinisatie. Patroon IV vertoont primaire oligodendrocyt degeneratie waarvan de achterliggende mechanismen nog niet gekend zijn (21). De patronen van demyelinisatie zijn zeer heterogeen tussen verschillende patiënten, maar de lesies van dezelfde persoon zijn homogeen. Dit leidde tot de hypothese dat MS een ziekte is met heterogeniteit in de pathogene mechanismen (21,22,23). Zolang deze pathogene mechanismen niet gekend zijn, is het niet mogelijk een therapie te ontwikkelen die de oorzaak van de ziekte wegneemt. De huidige behandelingswijze richt zich op het onderdrukken van de inflammatoire respons. Therapieën die de overleving van oligodendrocyten en de remyelinisatie bevorderen, vormen een goede aanvulling op de bestaande behandelingswijze. Onderzoek naar dergelijke therapie is noodzakelijk om irreversibele axonale schade te voorkomen.

### 1.3 De rol van inflammatie: mogelijke positieve effecten

De ontstekingsreactie in het centrale zenuwstelsel bij MS is op de eerste plaats neurotoxisch van aard. Toch zijn er data bekend die aantonen dat deze definitie te simplistisch is. De complexe inflammatoire responsen in MS zouden ook positieve en neuroprotectieve effecten hebben.

Macrofagen hebben naast een destructief effect ook positieve gevolgen, ze ruimen het debris op door fagocytose en promoten daardoor de remyelinisatie, en ze produceren neurotrofe factoren waaronder *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) en *leukemia inhibitory factor* (LIF) (24,25).

Autoreactieve T-cellen bezitten ook beschermende effecten doordat ze LIF kunnen produceren. LIF-producerende T-cellen en macrofagen zijn teruggevonden in zowel actieve als chronische MS-lesies (25). In ratten is aangetoond dat een systemische injectie met *myelin basic protein* (MBP)-reactieve T-cellen het herstel bevorderde van een aangebrachte beschadiging aan het ruggenmerg, waarschijnlijk door de productie van neurotrofe factoren (25). De beschermende werking van autoreactieve T-cellen wordt protectieve auto-immuniteit genoemd (26,27).

### 1.4 Neurotrofe Factoren

Neurotrofe factoren zijn moleculen die betrokken zijn bij de ontwikkeling, de overleving en de functie van het centrale zenuwstelsel. Deze factoren kunnen onderverdeeld worden in drie families: de *nerve growth factor* (NGF)/ neurotrofine (NT) familie, de GDNF-familie en de neurokines.

Vier leden van de NGF/NT neurotrofine familie komen voor in de hersenen van zoogdieren: NGF, BDNF, neurotrofine-3 (NT-3) en neurotrofine-4 (NT-4) (28). Binding van deze familie neurotrofe factoren aan tyrosine kinase receptoren resulteert in protectieve effecten: verbetering van de overleving van neuronen (29) en oligodendrocyten (30), reductie van de antigen presentatie (31), en promotie van een milieu waarbij het Th2-type de overhand heeft (32).

De tweede familie van de neurotrofe factoren is de GDNF familie waartoe GDNF, neurturine, artemine en persefine behoren (33). Neurturine wordt door humane T cellen, monocyten en B cellen geproduceerd en zou mogelijk protectieve effecten hebben (34).

De derde familie van neurotrofe factoren bestaat uit neuropoietische cytokines of neurokines waaronder LIF, *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), cardiotrofine (CT-1), *cardiotrophine-like-cytokine* (CLC), oncostatine M (OsM) en neuropoietine. Deze factoren, behalve OsM, binden een receptor die bestaat uit twee subunits, *Leukemia Inhibitory Factor Receptor bèta* (LIFR- $\beta$ ) en glycoproteïne 130 (gp130) (35). LIF en CNTF bevorderen de overleving en de ontwikkeling van neuronen en oligodendrocyten en induceren de ontwikkeling van precursor oligodendrocyten zowel *in vitro* (36, 37) als *in vivo* (38, 39).

### 1.5 Leukemia Inhibitory Factor

LIF is een pleiotroop cytokine: het speelt een rol bij de implantatie van embryo's en het behoud van de functies van de placenta (40), reguleert de botresorptie door de activatie van osteoclasten en is een overlevingsfactor voor en onderdrukt de differentiatie van embryonale stamcellen. LIF stimuleert ook de productie van megakaryocyten en bloedplaatjes tijdens de hematopoïese (41). Het cytokine staat tevens in voor de maturatie van T-cellen (41,42) en zorgt voor een proliferatie van macrofagen en hun differentiatie (43). Dit cytokine heeft naast bovenstaande nog andere uiteenlopende effecten in heel het lichaam.

In het centrale zenuwstelsel is er constitutief een lage LIF-expressie. LIF kan er gesecreteerd worden door astrocyten en adulte neuronen (44). De LIF-expressie is verhoogd na schade aan het perifere of het centrale zenuwstelsel en bij bepaalde neurologische aandoeningen (42). Een verhoogde LIF-expressie werd *in vivo* vastgesteld in Schwann cellen na schade aan perifere zenuwen (44). Ook zijn er verhoogde LIF concentraties teruggevonden bij verschillende inflammatoire condities zoals rheumatoïde arthritis en septische shock (42).

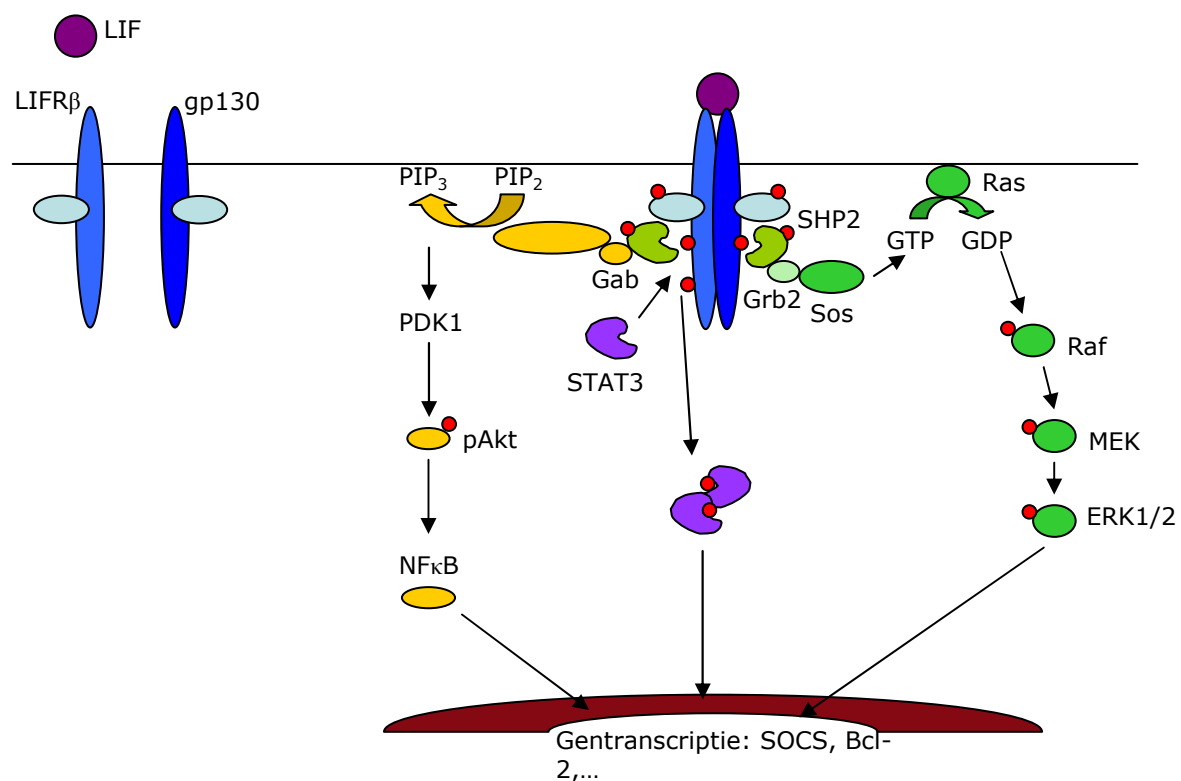
Verscheidene bevindingen tonen aan dat LIF neuroprotectieve effecten heeft. In het diermodel experimentele autoimmune encephalomyelitis (EAE) is aangetoond dat de endogene LIF productie stijgt, vooral in astrocyten. In dit model werd aangetoond dat anti-LIF antilichamen het ziekteverloop verergeren. Oligodendrocyt-celdood verdubbelt na toediening van deze antilichamen en de demyelinisatie verhoogt significant. LIF heeft dus een beschermende werking op mature oligodendrocyten in een EAE muis model (45). De toediening van LIF heeft in EAE zijn therapeutische kracht bewezen. De ernst van de ziekte neemt af na

inspuiting van LIF in zieke dieren (46,47). *In vitro* studies tonen aan dat LIF zorgt voor de generatie, de maturatie en de overleving van oligodendrocyten. LIF remt *in vitro* IFN-gamma en TNF-alfa gemedieerde celdood en apoptose door verwijdering van groeifactoren van rat oligodendrocyten (48,49). LIF is een overlevingsfactor voor sympatische en sensorische neuronen en bepaalt het fenotype van deze cellen (44): LIF-receptor knock-out muizen sterven binnen de eerste 24 uur na de geboorte. Deze muizen vertonen een reductie van astrocyten en verschillende types neuronen in de hersenen, en andere defecten, zoals ter hoogte van de placenta, de botopbouw, en de hematopoiese (41). Er is ook een belangrijke rol weggelegd voor het cytokine in de regeneratie, de groei en de overleving van perifere axonen *in vitro* en *in vivo* bij ratten (50). De effecten van LIF zijn echter dosis-afhankelijk. Overexpressie van LIF in het centrale zenuwstelsel van muizen, gemedieerd door een adenovirale vector, resulteert in een inflammatoire respons, waarbij microglia en macrofagen cytotoxisch worden (48). Ook bij mensen werden de effecten van LIF nagegaan. Een farmacologische vorm van LIF, AM424 (AMRAD<sup>®</sup>, Richmond, Victoria, Australië), werd reeds getest in een fase I klinische studie. In deze studie werd LIF gebruikt tegen de neveneffecten van chemotherapie bij kankerpatiënten. AM424 zou de bloedingen en zenuwpijnen ten gevolge van chemotherapie gedeeltelijk opheffen (51). Het probleem met dit molecule is dat het niet of nauwelijks door de bloed-hersenbarrière dringt na systemische toediening en een kort halfleven heeft. Omwille van de verstoorde bloed-hersenbarrière zou de beschikbaarheid in het centrale zenuwstelsel bij MS-patiënten beter kunnen zijn, zodat de neveneffecten van hoge dosissen LIF misschien vermeden kunnen worden. Anderzijds zou men de positieve effecten van LIF kunnen bekomen met therapeutica die ingrijpen op de intracellulaire signaalwegen die door LIF geactiveerd worden. Hoe LIF zijn verschillende effecten uitoefent op verschillende celtypes is echter nog niet volledig opgehelderd (52).

### 1.6 Overlevingspathways aangeschakeld door LIF

De LIF receptor bestaat uit twee subunits, LIFR- $\beta$  en gp130, die zullen heterodimerizeren na interactie met hun ligand. Hierdoor komen de met de receptor geassocieerde janus tyrosine kinases (JAK) in elkaars nabijheid en kunnen ze elkaar fosforyleren. De gefosforyleerde en daardoor geactiveerde JAK's gaan op hun beurt verschillende tyrosine residuen op het cytoplasmatische uiteinde van de receptor fosforyleren. Gefosforyleerde tyrosine-residuen vormen *docking sites* voor eiwitten die een *Src homology 2* (SH2) domein bevatten. Er

kunnen drie verschillende signaalwegen geactiveerd worden afhankelijk van het celtype en het maturatie-niveau van de cel: de Janus Tyrosine Kinase (JAK)/ *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) signaalweg, de *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) signaalweg en de *phosphatidylinositol-3 kinase* (PI<sub>3</sub>K) signaalweg (zie fig. 1.). Activatie van de PI3-kinase pathway door LIF leidt tot een activatie van NF-κB. De JAK/STAT cascade met activatie van STAT3 kan anti-apoptotische effecten hebben door de inductie van Bcl-2, Bcl-x of *suppressors of cytokine signalling* (SOCS). De MAPK-sigtaalweg kan zijn positieve effecten uitoefenen door de activatie van enkele anti-apoptotische eiwitten. Op welke manier LIF zorgt voor zijn beschermend effect bij oligodendrocyten wordt nog onderzocht (53).



**Figuur 1: Overlevingspathways aangeschakeld door LIF.** Wanneer de LIF-receptor, die bestaat uit twee subeenheden LIFRβ en gp130, geactiveerd wordt kunnen drie verschillende signaalwegen worden aangeschakeld: de JAK/STAT signaalweg, de MAPK signaalweg en de PI3-kinase signaalweg.

### 1.7 Doel van de studie

Deze studie heeft als doel een *in vitro* model te ontwerpen waarin factoren kunnen getest worden die mogelijk protectieve effecten op oligodendrocyten hebben. Hiervoor worden primaire rat oligodendrocyten in cultuur gebracht in de aanwezigheid van pro-inflammatoire cytokines (IFN-gamma, TNF-alfa), anti-FAS antilichamen, staurosporine en andere apoptose-inducerende stoffen. De mate van celdood bij verschillende concentraties en op verschillende tijdstippen zal worden nagegaan met behulp van FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). De cellen worden hiervoor behandeld met Annexine V-FITC en 7AAD. Annexine V is een eiwit dat fosfatidylserine bindt dat aan de extracellulaire zijde van de celmembraan geëxposeerd wordt tijdens apoptose. 7AAD is een DNA-intercalator die aan DNA kan binden wanneer er disruptie van de celmembraan optreedt bij necrose. Ook andere methoden voor de detectie van celdood kunnen in dit model uitgetest en vergeleken worden.

In dit *in vitro* model zullen neurokines, waaronder *Leukemia Inhibitory Factor*, getest en vergeleken worden op basis van hun anti-apoptotische werking. LIF is een neurokine waarvan geweten is dat het de TNF-alfa en IFN-gamma gemedieerde celdood van oligodendrocyten zowel *in vitro* als *in vivo* beperkt. In deze studie kan onderzocht worden of LIF ook in staat is om oligodendrocyten te beschermen tegen andere apoptose-inductoren.

Verder zal gekeken worden naar de intracellulaire signaalwegen die geactiveerd worden in de oligodendrocyten na stimulatie met neurokines. Er zijn drie signaalwegen beschreven waarlangs LIF zijn protectieve effecten uitoefent in andere celtypes: de JAK/STAT signaalweg, de MAPK signaalweg en de PI<sub>3</sub>-kinase signaalweg. Door middel van western blotting wordt gekeken naar de fosforylatie en dus activatie van enkele sleuteleiwitten in deze intracellulaire pathways respectievelijk: gefosforyleerd *signal transducer and activator of transcription 3* (pSTAT3), gefosforyleerd *extracellular signal-regulated kinase* 1/2 (pERK<sub>1/2</sub>) en gefosforyleerd Akt (pAkt). Activatie van deze signaalwegen zorgt voor transcriptionele regulatie waarbij anti-apoptotische eiwitten, zoals Bcl-2, kunnen worden aangemaakt. Inzichten in de mechanismen waarlangs LIF zijn protectieve effecten medieert kan bijdragen tot de ontwikkeling van meer specifieke therapieën voor MS.

## **2. Materiaal en Methoden**

### 2.1 Celkweek met OLN-93 cellen

De OLN-93 cellijn is afkomstig van primaire rat oligodendrocyten en werd verkregen via dr. C. Richter Landsberg van de Universiteit van Oldenburg in Duitsland (54). De cellen werden gekweekt in *dulbecco's modified eagle medium* zonder pyruvaat (DMEM, GIBCO Invitrogen, Grand Island, USA) met 0,5% peniciline/streptomycine (P/S, Invitrogen Corporation, Grand Island, USA) en 10% geïnactiveerd *Fetal Calf Serum* (FCS, Hyclone Europe, Erembodegem, Belgium) (= kweekmedium) bij 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. De adherente cellen werden 1/10 gesplitst wanneer een confluente van 90% werd bereikt. Hiervoor werden de cellen gespoeld met PBS en getrypsiniseerd met 0,25% trypsine (Gibco, Ontario, Canada). De trypsinisatie werd gestopt met FCS. Na 10 min centrifugeren op 1300 rpm werden de cellen geresuspendeerd in kweekmedium. De cellen konden op lange termijn bewaard worden door de pellet op te lossen in 10% *dimethyl sulfoxide* (DMSO, Acros Organics, Geel, Belgium) in FCS en deze in vloeibare stikstof in te vriezen.

### 2.2 Isolatie van adulte primaire rat oligodendrocyten

#### 2.2.1 Dag 1 van de isolatie

Na decapitatie werden de koppen van 6 Wistar ratten (Harlan, Nederland) in 70% ethanol opgevangen en drie maal gespoeld met 1x *phosphate buffered saline* (PBS, Cambrex Bioscience, Verviers, Belgium). Vervolgens werden de hersenen steriel uitgeprepareerd en opgevangen in DMEM (GIBCO Invitrogen, Grand Island, USA) samen met 0,5% P/S en 5% FCS (= kweekmedium). Na het fijnsnijden van de hersenen tot een homogeen mengsel werd het medium vervangen door PBS en 30 min gedissocieerd (PBS + 13% trypsine + 5mg/ml DNase (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium) op 37°C, waarna de enzymatische reactie gestopt werd met FCS. De suspensie werd door een 132 µm mesh gehaald en aangelengd tot 400 ml met PBS zodat een homogene oplossing bekomen werd. Deze oplossing werd 10 min gecentrifugeerd op 1200 rpm bij kamertemperatuur. De gliale cellen werden door middel van een densiteitsgradiëntcentrifugatie (16000 g, 35 min bij 4°C) met 30% percoll (GE healthcare

Biosciences, Uppsala, Sweden) gescheiden van rode bloedcellen en het myeline. De myelinelaag werd verwijderd en er werd verder gewerkt met de gliale celfractie. Percoll-resten werden weggewassen met PBS. De celpellets werden opgelost in kweekmedium en in kweek gebracht met 10 miljoen cellen per kweekflesje van 50 ml (Greiner, Frickenhause, Germany).

### 2.2.2 Dag 2 van de isolatie

De aanrijking van oligodendrocyten in de cultuur werd bekomen door middel van hun verschillende adhesie aan plastic. Hierbij blijven de contaminerende cellen, zoals astrocyten, aan de bodem van het kweekflesje hangen, terwijl de oligodendrocyten in suspensie blijven. Deze celsuspensie werd 10 min op 1200 rpm gecentrifugeerd en de bekomen pellet werd heropgelost in kweekmedium en verdeeld over de helft van het aantal kweekflesjes op dag 1 van de isolatie.

### 2.2.3 Dag 3 van de isolatie

Opnieuw werden oligodendrocyten verder aangerijkt zoals op dag 2. De culturen bevatten nu 90% primaire oligodendrocyten, en minder dan 5% contaminerende cellen zoals astrocyten, fibroblasten en endotheelcellen. Vervolgens werden de cellen uitgeplaat op poly-L-lysine (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gecoate recipiënten. De cellen bleven 10-14 dagen in kweek op 37°C en 5% CO<sub>2</sub> vooraleer ze gebruikt werden voor verdere experimenten.

## 2.3 Viabiliteitsmeting met FACS na Annexine-V-FITC/7-AAD incubatie

Om de viabiliteit van primaire rat oligodendrocyten en OLN-93 cellen te bestuderen na incubatie met apoptose-inducerende moleculen (staurosporine, TNF-alfa, IFN-gamma, en FASL) en LIF werd een Fluorescence-Activated cell sorting (FACS) analyse uitgevoerd. Bij deze methode werd gekeken naar een aantal kenmerkende eigenschappen van apoptose en necrose om een onderscheid te maken tussen levende cellen en cellen in apoptose en/of necrose. Voor detectie van apoptose werd gebruik gemaakt van Annexine-V-FITC/7-AAD (Annexine-V-FITC kit, Bender Med Systems, Vienna, Austria). Annexine V bindt aan de

fosfatidylserine-residuen aan het oppervlak van de celmembraan. Deze residuen komen enkel tot uiting aan de buitenkant van de cel wanneer de cel in apoptose gaat. Bij necrotische cellen is de celmembraan permeabel en kan 7-AAD aan het vrijgekomen DNA binden. De uitgezaaide cellen werden geoogst door middel van trypsinisatie met 0,25% trypsine en vervolgens gewassen met bindingsbuffer (5 min, 2000 rpm, 4°C). Na een incubatie van 10 min met 2,5 µl Annexine V bij 4°C werden de cellen gewassen met bindingsbuffer. De cellen werden vervolgens geïncubeerd met 5 µl 7-amino actinomycine D (7-AAD, BD Biosciences, San Jose, CA USA). Na een incubatietijd van 20 min werd er nog een wasstap uitgevoerd en de pellet werd opnieuw opgelost in bindingsbuffer. Hierna werden de stalen geanalyseerd met de FACS Calibur flowcytometer (BD Biosciences, San Jose, CA USA), waarbij data geïncubateerd werden van 2000 oligodendrocyten.

## 2.4 Detectie van gefosforyleerd STAT3, ERK1/2 en Akt en gekleefd PARP

### 2.4.1 Voorbereiding op de western blot

#### *Eiwitextractie uit oligodendrocyten*

Primaire rat oligodendrocyten werden 2 maal op ijs gewassen in 1x PBS met 1mM natrium orthovanadaat (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) als fosfatase inhibitor en vervolgens gelyseerd met lysisbuffer (50 mM Tris (Amersham, Uppsala, Sweden) pH 7,5, 2mM EDTA (Sigma, Steinheim, Germany), 10 mM EGTA (Acros Organics, Geel, Belgium), 1% NP-40 (Sigma, Steinheim, Germany), 1mM natrium orthovanadaat en protease inhibitoren (Complete Mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Het cellysaat werd onmiddellijk ingevroren bij -70°C.

#### *Eiwitconcentratiebepaling*

De eiwitconcentratie van de stalen werd bepaald door middel van de BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA). Deze assay meet de totale eiwitconcentratie in een staal op basis van een colorimetrische detectie. De paarse kleurreactie wordt gevormd door de chelatie van twee moleculen *bicinchoninic acid* (BCA) met een gereduceerd koper-ion ( $\text{Cu}^{1+}$ ). Dit  $\text{Cu}^{1+}$ -ion ontstaat door de reductie van  $\text{Cu}^{2+}$  in aanwezigheid van de eiwitten in een alkalisch

medium. Dit is gekend als de biureet reactie. Het  $\text{BCA}/\text{Cu}^{1+}$  complex vertoont een sterke absorptie bij 562 nm, die lineair toeneemt met stijgende eiwitconcentraties.

Er werd een standaard concentratiereeks gemaakt met gekende bovine serum albumine (BSA)-concentraties, opgelost in Tris-buffer. Vervolgens werden twee verdunningsreeksen gemaakt van de stalen (10x en 20x verdund in Tris-buffer). Reagens A en B werden toegevoegd (1/50) en hiervan werd telkens 100  $\mu\text{l}$  bij de standaardreeks en stalen gevoegd (1/2). Na 1 uur incuberen bij 37°C werd de optische densiteit (OD) van de stalen afgelezen in een spectrofotometer (Biorad, Hercules, CA) bij 562 nm. Via lineaire regressie konden de eiwitconcentraties van de stalen berekend worden.

#### 2.4.2 Sodium Dodecyl Sulfaat- polyacrylamide gel elektroforese (SDS-PAGE)

Sodium Dodecyl Sulfaat - Polyacrylamide gel elektroforese (SDS-PAGE) is een techniek die gebruikt wordt om eiwitten te scheiden op basis van hun grootte. Dankzij de SDS krijgen alle eiwitten éénzelfde negatieve lading en gebeurt de scheiding enkel op basis van hun moleculair gewicht. De producten die gebruikt werden voor deze procedure zijn afkomstig van Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden tenzij anders vermeld.

Als eerste werden de *resolving gel* (8%) en de *stacking gel* (4%) gegoten (samenstelling zie tabel 1).

**Tabel 1: Samenstelling van de *resolving gel* en de *stacking gel* bij western blot.**

| <i>Resolving gel</i> (8%)                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <i>Stacking gel</i> (4%)                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- 4,7 ml MilliQ</li> <li>- 2,7 ml 30% acrylamide, 0,8% bis-acrylamide (Biorad, Hercules, CA)</li> <li>- 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8</li> <li>- 0,1 ml 10% SDS</li> <li>- 50 <math>\mu\text{l}</math> 10% APS (ammonium-persulfaat)</li> <li>- 5 <math>\mu\text{l}</math> TEMED</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 6,1 ml MilliQ</li> <li>- 1,3 ml 30% acrylamide, 0,8% bis-acrylamide</li> <li>- 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8</li> <li>- 0,1 ml 10% SDS</li> <li>- 50 <math>\mu\text{l}</math> 10% APS</li> <li>- 10 <math>\mu\text{l}</math> TEMED</li> </ul> |

De gel werd vervolgens in een electrode assembly geplaatst en in de minitank gezet. De binnenste en onderste buffer kamer werd gevuld met 1x SDS elektroforese buffer (25 mM Tris, 0,192 M glycine, 0,1% SDS pH  $\pm$  8.3).

De stalen werden 2x verdund in reducerende staalbuffer (MilliQ, 0,06 M Tris-HCl pH 6,8, 25% glycerol, 2% SDS, 0,01% bromophenolblauw en 5%  $\beta$ -mercapto-ethanol (Fluka Chemie, Bucks, Switzerland)) en gedurende 4 min verwarmd bij 95 °C alvorens de stalen en de massaladder te laden. De elektroferese gebeurde bij een constante voltage van 200 V.

#### 2.4.3 Immunoblotten

Na elektroforese werd de gel in een gel sandwich geplaatst die bestond uit twee vezeldoeken , twee filtreerpapieren (Biorad, Hercules, CA), een polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore Corp., Burlington, MA) membraan en de gel. De PVDF-membraan werd 45 sec geactiveerd in 100% methanol (Merck, Darmstadt, Germany). De sandwich werd in een minitank geplaatst, gevuld met transferbuffer (25 mM Tris pH 8,3 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) , 192 mM glycine (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)). Het blotten gebeurde overnacht bij een constante stroomsterkte van 90 mA.

#### 2.4.4 Detectie door middel van enhanced chemiluminescence (ECL)

*Enhanced Chemiluminescence* (ECL) steunt op de oxidatie van luminol: er wordt een acridiumester gevormd dat in licht alkalisch milieu reageert met peroxide tot een geëxciteerd product. Dit geeft gedurende een lange periode energie af in de vorm van licht. De ECL detectiemethode biedt een hogere gevoeligheid en langdurige lichtemissie voor de detectie van eiwitten die in lage concentraties aanwezig zijn. De luminescentie kan gedetecteerd worden door autoradiografie.

De PVDF-membraan werd gedurende twee uur geblokt in blokkingsbuffer (1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) en  $15 \cdot 10^{-3}$  g/ml melkpoeder in 1x PBS). De membraan werd hierna drie maal 5 min gespoeld met wasbuffer (1x PBS, 0,1% Tween 20 en  $1 \cdot 10^{-3}$  g/ml melkpoeder). Primaire antilichamen gericht tegen sleuteleiwitten uit de JAK/STAT, de

MAPK en de PI<sub>3</sub>-kinase pathway (zie tabel 2) werden met een welbepaalde verdunning in PBS aangebracht op het membraan en gedurende 1 uur geïncubeerd.

**Tabel 2: Primaire antilichamen en hun verdunning gebruikt voor het detecteren van specifieke moleculen tijdens western blotting.**

| <u>Primair Antilichaam</u>                                           | <u>Verdunning</u> |
|----------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Anti-pSTAT3 (BD Biosciences, Erenbodegem, Belgium)                   | 1:500             |
| Anti-pERK1/2 (BD Biosciences, Erenbodegem, Belgium)                  | 1:1000            |
| Anti-pAkt (BD Biosciences, Erenbodegem, Belgium)                     | 1:500             |
| Anti-PARP (gekliefd en ongekliefd) (Immuno Source, Zoersel, Belgium) | 1:10000           |

Na de incubatie werd de membraan drie maal 5 min gewassen in wasbuffer en vervolgens werd het secundair antilichaam toegevoegd dat rechtstreeks gelabeld kon zijn aan HRP of dat biotine gelabeld was. Het biotine kon in een volgende stap binden aan meerdere streptavidine-moleculen gekoppeld aan HRP. De membraan werd voor een laatste keer gewassen met wasbuffer gedurende 1 maal 15 min en 3 maal 5 min. Hierna werd ECL-oplossing (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) op de membraan gedruppeld en een *High performance chemiluminescence* film (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) werd voor een bepaalde duur tegen de blot gehouden. De *Hyperfilm* werd ontwikkeld door de Gevamic 60 van Agfa-Gevaert.

De antilichamen konden terug van de membraan verwijderd worden. Hiervoor werd de membraan ondergedompeld in stripping buffer (100 mM  $\beta$ -mercapto-ethanol (Fluka Chemie, Bucks, Switzerland), 2% SDS (Amersham, Uppsala, Sweden), 62,5 mM Tris-HCl (Amersham, Uppsala, Sweden) pH 6,7) en 30 min geïncubeerd op 50 °C. Daarna werd de membraan twee keer vijf min gewassen in wasbuffer.

### **3. Resultaten**

Deze studie gaat het effect van LIF na op de overleving van primaire rat oligodendrocyten na behandeling met pro-apoptotische moleculen. Verder wordt de aanschakeling van intracellulaire signaalwegen door LIF bestudeerd, wat kan leiden tot bescherming van de cellen. In een eerste deel wordt de protectieve werking van LIF op geïnduceerde celdood door verscheidene pro-apoptotische moleculen (staurosporine, TNF-alfa, IFN-gamma en FASL) onderzocht met behulp van FACS. In een tweede deel wordt gekeken naar de fosforylatie, dus activatie van enkele sleuteleiwitten (STAT3, ERK1/2 en Akt) in drie overlevingspathways (de JAK/STAT pathway, de MAPK pathway en de PI<sub>3</sub>-kinase pathway). Deze worden mogelijk aangeschakeld door LIF in primaire rat oligodendrocyten. In een laatste deel wordt gekeken naar de klieving van poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) als maat voor caspase-activatie ten gevolge van TNF-alfa geïnduceerde celdood.

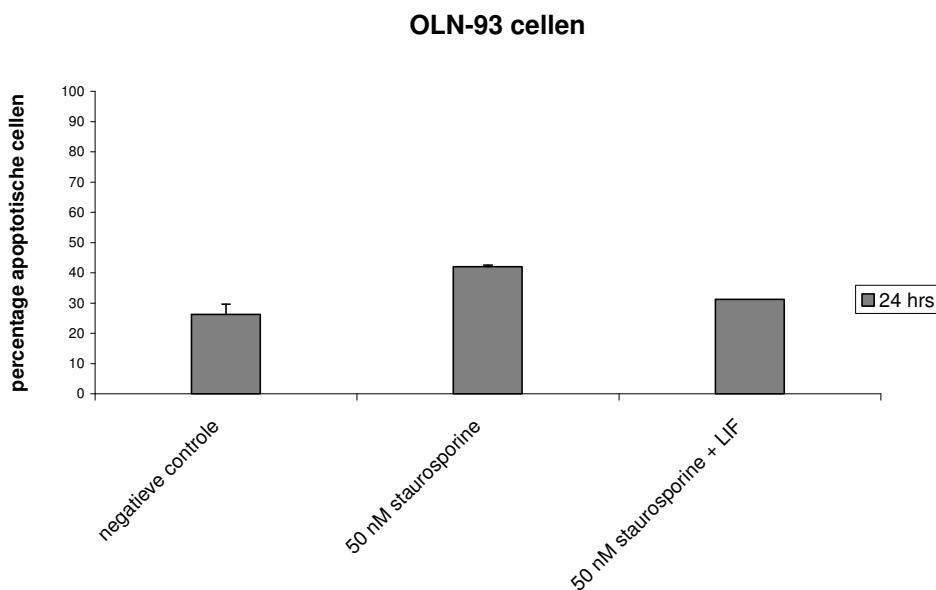
#### **3.1 Beschermende werking van LIF op verschillende manieren van apoptose-inductie**

Om te bepalen of LIF een protectieve werking heeft op verschillende manieren van apoptose-inductie werd de viabiliteit van OLN-93 cellen en primaire oligodendrocyten nagegaan na behandeling met staurosporine, TNF-alfa, IFN-gamma en Fas-ligand. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een Annexine-V/7-AAD viabiliteitsassay. Enkel het percentage Annexine-V-positieve en 7-AAD-negatieve cellen, dus apoptotische cellen, werd verwerkt in onderstaande grafieken omdat er geen significante toename was in het aantal necrotische cellen voor alle condities.

##### **3.1.1 Apoptose-inductie in OLN-93 cellen**

Voor de optimalisatie van de viabiliteitsmeting werd gebruik gemaakt van de OLN-93 cellijn. Vooreerst werd gekeken of bij de OLN-93 cellen celdood als gevolg van staurosporine kon gedetecteerd worden. Hiervoor werden OLN-93 cellen uitgezaaid in een 96-well plaat aan een densiteit van 75.000 cellen/well. Na 3 dagen werden de cellen behandeld met 50 nM staurosporine, zonder en met 15 ng/ml LIF. Na een incubatie van 24 uur werden de cellen aangekleurd met Annexine-V-FITC en 7-AAD. In dit experiment was het percentage

Annexine-V-positieve/7-AAD-negatieve cellen in kweekmedium  $26,3 \pm 3,4\%$  (zie figuur 2). Bij stimulatie met 50 nM staurosporine steeg het percentage apoptotische cellen tot  $42,1 \pm 0,5\%$  en daalde terug tot een percentage van 31,3% bij co-incubatie van 50 nM staurosporine met LIF. De resultaten wijzen op een mogelijke bescherming van LIF tegen staurosporine-gemedieerde apoptose. Dit zijn resultaten van 1 experiment uitgevoerd in duplo. Deze test zal in de toekomst herhaald moeten worden om dit resultaat te bevestigen.



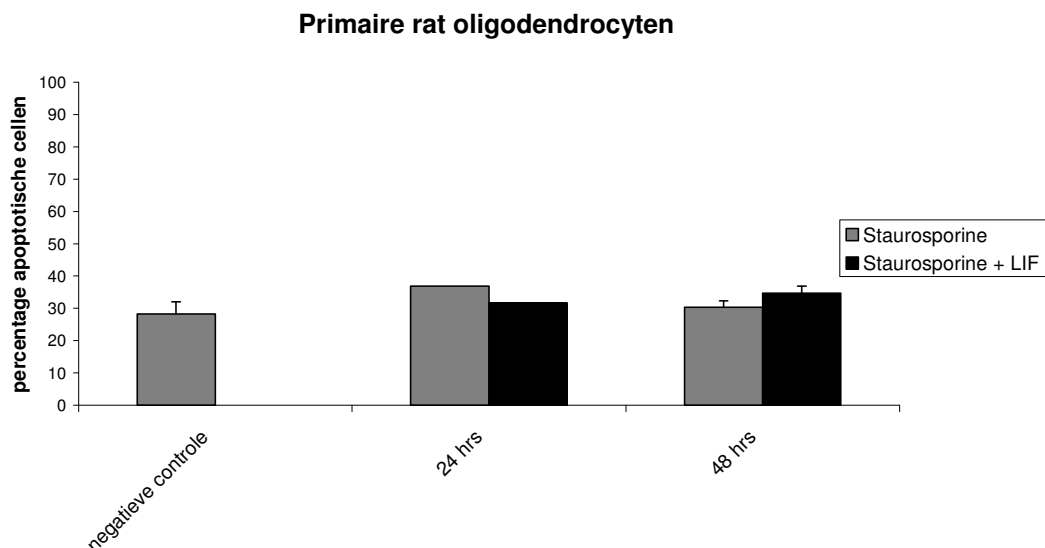
**Figuur 2: OLN-93 cellen behandeld met staurosporine al dan niet in aanwezigheid van LIF.**

OLN-93 cellen werden gedurende 24 uur behandeld met 50 nM staurosporine al dan niet met 15 ng/ml LIF en vervolgens gemerkt met Annexine-V/7-AAD. De y-as geeft het percentage Annexine-V-positieve/7-AAD-negatieve (= apoptotische) cellen weer. In de x-as zijn de condities terug te vinden waarmee de cellen behandeld werden.

### 3.1.2 Apoptose-inductie in primaire rat oligodendrocyten

Vervolgens werd overgegaan op primaire rat oligodendrocyten. Om de protectie van LIF na te gaan op verschillende manieren van geïnduceerde celdood door verscheidene pro-apoptotische moleculen werden primaire oligodendrocyten, afkomstig van Wistar ratten, uitgezaaid aan een densiteit van 175.000 cellen per well. Na 10-14 dagen werden ze geïncubeerd met verschillende condities (staurosporine, TNF-alfa, IFN-gamma en FASL, met en zonder toevoeging van LIF). Hierbij werd de viabiliteit van de cellen nagegaan op basis van hun Annexine-V-FITC/7-AAD fluorescentie met behulp van FACS en bij de verschillende condities vergeleken.

In een eerste experiment werden primaire rat oligodendrocyten behandeld gedurende 24 en 48 uur met 50 nM staurosporine al dan niet in combinatie met 15 ng/ml LIF. Het aantal apoptotische cellen in kweekmedium bedraagt  $28,3 \pm 3,7\%$  (zie figuur 3). Na blootstelling aan 50 nM staurosporine gedurende 24 uur bedraagt het aantal Annexine-V-positieve/7-AAD-negatieve cellen 36,9% (geen standaardafwijking, enkel staal), terwijl dit percentage afneemt tot 31,7% (geen standaardafwijking, enkel staal) bij co-incubatie met 15 ng/ml LIF. Na 48 uur incubatie met 50 nM staurosporine is er geen beschermend effect van LIF meer te zien. Enkel de eerste 24 uur lijkt er een beschermende werking van LIF plaats te vinden. Ook dit experiment is slechts 1 maal uitgevoerd met metingen in duplo en moet in de toekomst herhaald worden.

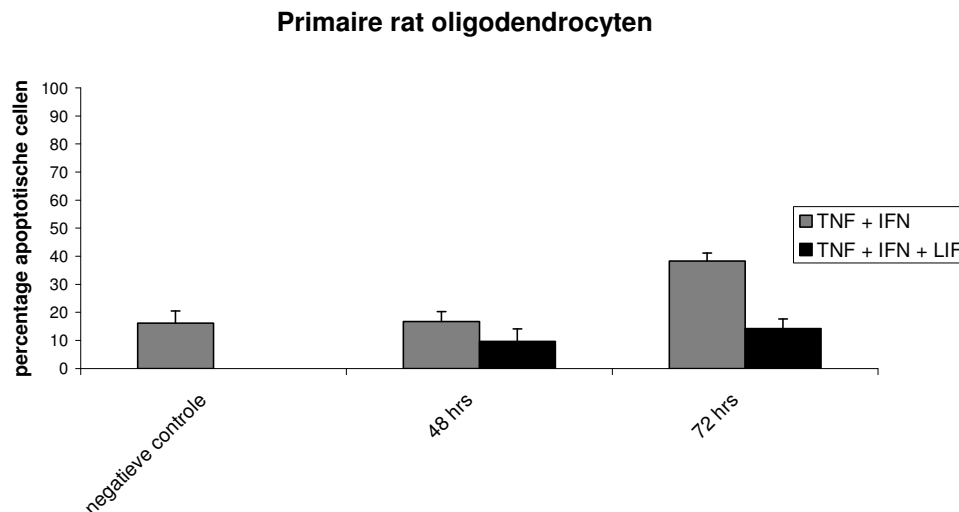


**Figuur 3: Primaire rat oligodendrocyten behandeld met staurosporine al dan niet in aanwezigheid van LIF.**

Primaire rat oligodendrocyten werden gedurende 24 en 48 uur behandeld met 50 nM staurosporine al dan niet met 15 ng/ml LIF en vervolgens gemerkt met Annexine-V/7-AAD. De y-as geeft het percentage Annexine-V-positieve/7-AAD-negatieve (= apoptotische) cellen weer. In de x-as zijn de condities terug te vinden waarmee de cellen behandeld werden.

Bij een tweede experiment werden primaire rat oligodendrocyten gedurende 48 uur en 72 uur behandeld met 100 ng/ml TNF-alfa samen met 100 ng/ml IFN-gamma, met en zonder 15 ng/ml LIF. Het percentage apoptotische cellen bij co-incubatie van TNF-alfa met IFN-gamma stijgt na 72 uur tot  $38,2 \pm 2,9\%$  ten opzichte van de negatieve controle ( $16,2 \pm 4,4\%$ ) (zie figuur 4). Incubatie samen met LIF zorgde na 48 uur voor 7% minder apoptotische cellen, en na 72

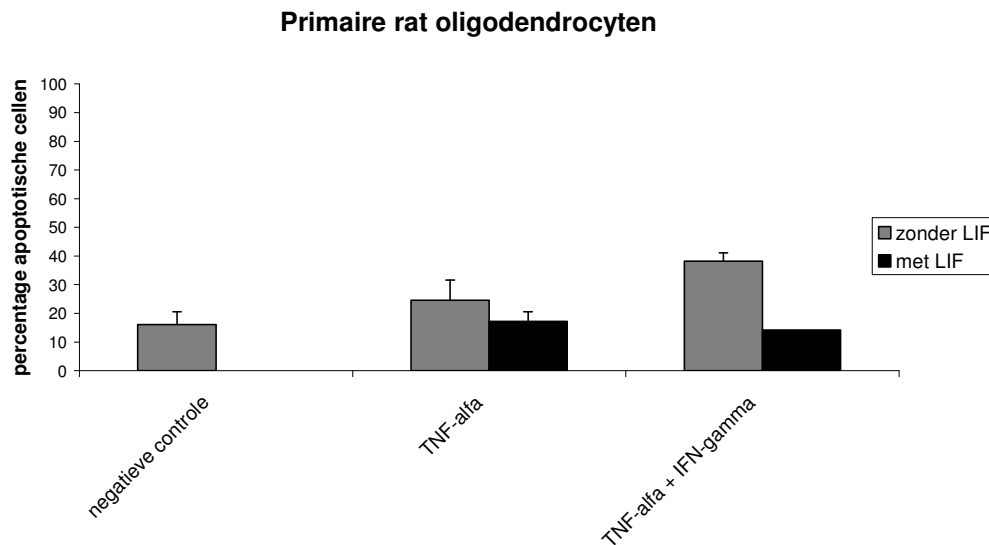
uur voor 25% minder. Ook bij behandeling van primaire rat oligodendrocyten met TNF-alfa en IFN-gamma lijkt LIF protectief te werken na 48 en 72 uur. Dit was een éénmalig experiment met metingen in triplo en dient herhaald te worden in de toekomst.



**Figuur 4: Primaire rat oligodendrocyten behandeld met TNF-alfa en IFN-gamma al dan niet in aanwezigheid van LIF.**

Primaire rat oligodendrocyten werden gedurende 48 en 72 uur behandeld met 100 ng/ml TNF-alfa en 100 ng/ml IFN-gamma al dan niet met 15 ng/ml LIF en vervolgens gemerkt met Annexine-V/7-AAD. De y-as geeft het percentage Annexine-V-positieve/7-AAD-negatieve (= apoptotische) cellen weer. In de x-as zijn de condities terug te vinden waarmee de cellen behandeld werden.

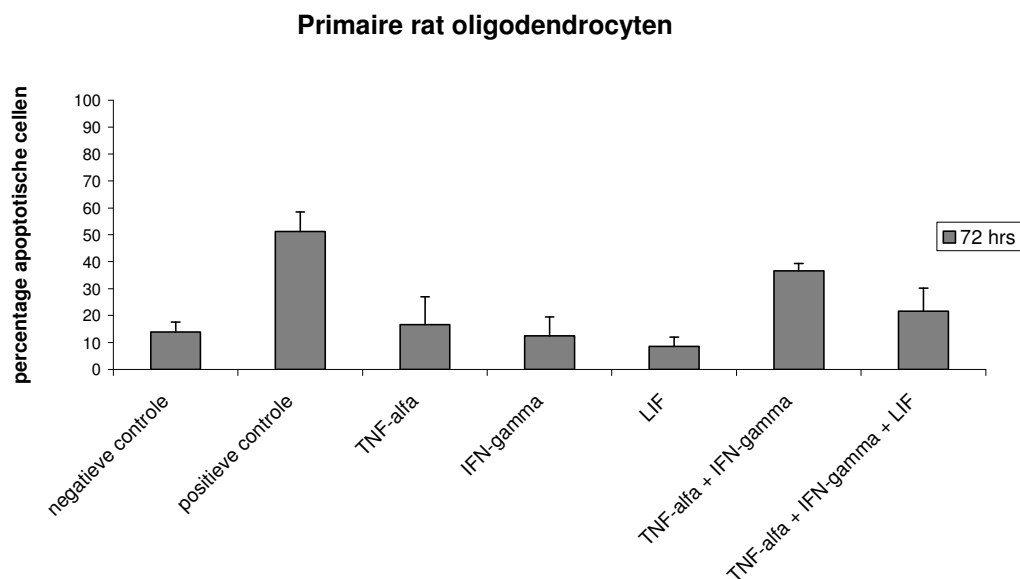
Bij een volgend experiment werd vergeleken of LIF oligodendrocyten in dezelfde mate beschermt tegen TNF-alfa en IFN-gamma gemedieerde celdood als tegen TNF-alfa alleen. Hiervoor werden primaire rat oligodendrocyten behandeld met 100 ng/ml TNF-alfa met en zonder 15 ng/ml LIF en 100 ng/ml TNF-alfa +100 ng/ml IFN-gamma met en zonder 15 ng/ml LIF gedurende 72 uur. Wanneer primaire oligodendrocyten gedurende 72 uur geïncubeerd werden in kweekmedium bedroeg het aantal apoptotische cellen  $16,2 \pm 4,4\%$  (zie figuur 5). Na incubatie met TNF-alfa steeg het aantal apoptotische cellen tot  $24,6 \pm 7,1\%$ . Ook hier reduceert LIF het aantal cellen in apoptose tot  $17,2 \pm 0,1\%$ . Bij stimulatie met TNF-alfa en IFN-gamma steeg het percentage tot  $38,2 \pm 2,9\%$ . Deze toename in celdood kon volledig verhinderd worden door toediening van LIF ( $14,2 \pm 3,4\%$ ). Ook tegen geïnduceerde celdood met TNF-alfa alleen biedt LIF bescherming, hoewel in mindere mate dan tegen celdood geïnduceerd door TNF-alfa in combinatie met IFN-gamma. Dit experiment is slechts één maal in triplo uitgevoerd. In de toekomst zal dit experiment herhaald worden om significantie te bekomen.



**Figuur 5: Primaire rat oligodendrocyten behandeld met TNF-alfa en TNF-alfa in combinatie met IFN-gamma al dan niet in aanwezigheid van LIF.**

Primaire rat oligodendrocyten werden gedurende 72 uur behandeld met 100 ng/ml TNF-alfa, alleen of samen met 100 ng/ml IFN-gamma al dan niet met 15 ng/ml LIF en vervolgens gemerkt met Annexine-V/7-AAD. De y-as geeft het percentage Annexine-V-positieve/7-AAD-negatieve (= apoptotische) cellen weer. In de x-as zijn de condities terug te vinden waarmee de cellen behandeld werden.

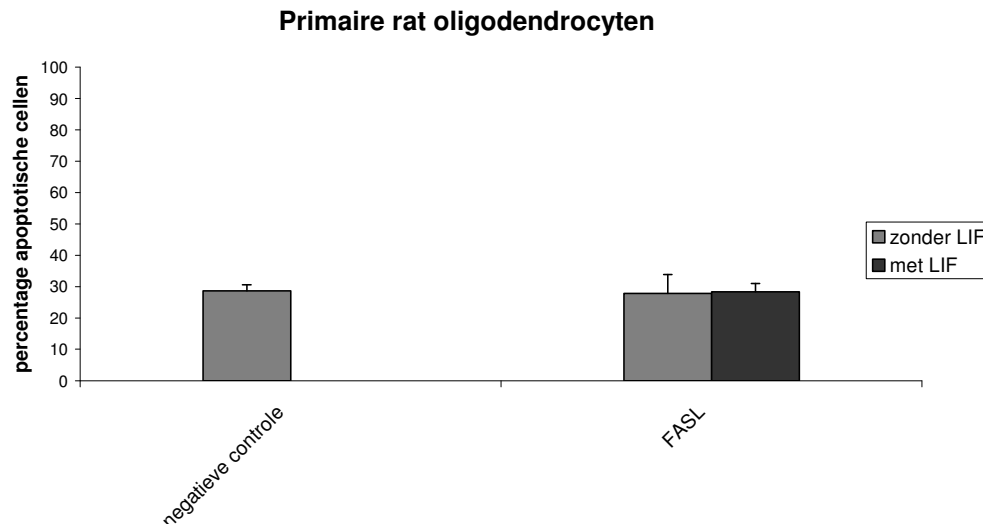
Bij een volgend experiment werden dezelfde condities genomen als hierboven beschreven, en bijkomend een positieve controle (1 $\mu$ M staurosporine), 15 ng/ml LIF en 100 ng/ml IFN-gamma voor een tijdsspanne van 72 uur. Deze test werd twee maal uitgevoerd met metingen in triplo en dient in de toekomst herhaald te worden om een significante uitspraak te kunnen doen. Het aantal Annexine-V-positieve/7-AAD-negatieve cellen bedroeg bij de negatieve controle  $13,9 \pm 3,7\%$  en was 4x hoger bij de positieve controle staurosporine ( $51,3 \pm 7,2\%$ ) (figuur 6). Bij TNF-alfa samen met IFN-gamma steeg het percentage Annexine-V-positieve cellen tot  $36,7 \pm 2,7\%$ . Dit percentage werd gereduceerd tot  $21,7 \pm 8,5\%$  met LIF. Bij de behandeling met TNF-alfa, IFN-gamma en LIF was er geen bijkomend effect te zien op apoptose in dit experiment ( $16,7 \pm 7\%$ ,  $12,4 \pm 7\%$  en  $8,6 \pm 3,4\%$  respectievelijk). LIF werkt ook hier protectief tegen de schadelijke effecten van TNF-alfa en IFN-gamma.



**Figuur 6: Primaire rat oligodendrocyten behandeld met TNF-alfa, IFN-gamma en LIF in verschillende combinaties.**

Primaire rat oligodendrocyten werden gedurende 72 uur behandeld met 100 ng/ml TNF-alfa, 100 ng/ml IFN-gamma, 15 ng/ml LIF alleen en TNF-alfa in combinatie met IFN-gamma al dan niet met 15 ng/ml LIF. Ook werd in dit experiment een positieve controle meegenomen waarbij de cellen behandeld werden met 1  $\mu$ M staurosporine. De oligodendrocyten werden vervolgens gemerkt met Annexine-V/7-AAD. De y-as geeft het percentage Annexine-V-positieve/7-AAD-negatieve (= apoptotische) cellen weer. In de x-as zijn de condities terug te vinden waarmee de cellen behandeld werden.

Om na te gaan of LIF ook bescherming biedt tegen de celdood geïnduceerd door FASL werden primaire rat oligodendrocyten gedurende 72 uur geïncubeerd met 100 ng/ml FASL met en zonder 15 ng/ml LIF. Om gebruik te kunnen maken van humaan Fas-ligand moet de homologie tussen humaan Fas-ligand en Fas-ligand van de rat zeer hoog zijn. Daarvoor werd een alignering uitgevoerd met behulp van het programma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) en SIM (<http://www.expasy.ch/tools/sim-prot.html>). De twee nucleotidesequenties vertonen een homologie van 87% en de aminozuursequenties hebben een similariteit van 77,7% in het functioneel gebied, wat toeliet om de humane Fas-ligand te gebruiken in het experiment met primaire rat oligodendrocyten. Na een incubatietijd van 72 uur bedroeg het percentage apoptotische cellen  $28,7 \pm 1,9\%$  voor de negatieve controle. Er was geen verschil vast te stellen met incubatie van FASL met en zonder LIF ten opzichte van de controle ( $28,4 \pm 2,6\%$  en  $27,9 \pm 5,9\%$ ) (zie figuur 7). Dit is een enkel experiment in quatro gemeten en zal in de toekomst herhaald moeten worden.



**Figuur 7: Primaire rat oligodendrocyten behandeld met FASL al dan niet in aanwezigheid van LIF.**

Primaire rat oligodendrocyten werden gedurende 72 uur behandeld met 15 ng/ml FASL al dan niet met 15 ng/ml LIF en vervolgens gemerkt met Annexine-V/7-AAD. De y-as geeft het percentage Annexine-V-positieve/7-AAD-negatieve (= apoptotische) cellen weer. In de x-as zijn de condities terug te vinden waarmee de cellen behandeld werden.

In conclusie kan gezegd worden dat een protectieve werking van LIF is vastgesteld in primaire oligodendrocyten na geïnduceerde celdood met de verschillende pro-apoptotische moleculen staurosporine, TNF-alfa en IFN-gamma, maar niet bij FASL.

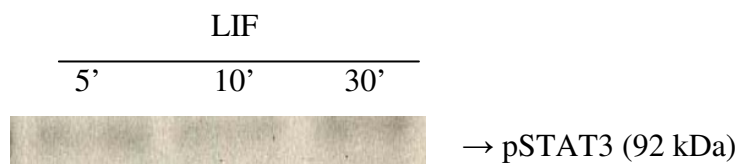
### 3.2 Survival pathways aangeschakeld door LIF in oligodendrocyten

Een tweede doelstelling van dit onderzoek was kijken naar de aanschakeling van enkele survivalpathways (de JAK/STAT signaalweg, de MAPK signaalweg en de PI<sub>3</sub>-kinase signaalweg) door LIF om na te gaan via welke pathways LIF zijn protectief effect kan bewerkstelligen. Hiervoor werden primaire rat oligodendrocyten uitgezaaid in een 24-well plaat met  $1,5 \cdot 10^6$  cellen per well. Na 10-14 dagen werden de cellen behandeld met verschillende condities (100 ng/ml TNF-alfa, 15 ng/ml LIF en beiden) gedurende 5 minuten, 10 minuten en 30 minuten. Van de cellysaten werd de eiwitconcentratie bepaald om éénzelfde hoeveelheid eiwit te laden tijdens de western blot procedure. In deze experimenten werden telkens dezelfde stalen gebruikt. In de toekomst zal er moeten gekeken worden naar meerdere stalen om significantie te bekomen.

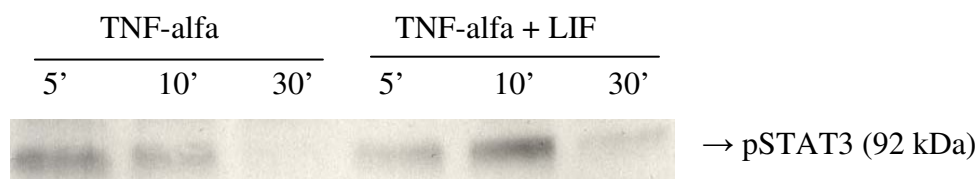
### 3.2.1 De JAK/STAT pathway

Om te bestuderen welke signaalwegen aangeschakeld worden door LIF en wat er gebeurt met deze aanschakeling na inductie van celdood door TNF-alfa werd van de lysaten van primaire rat oligodendrocyten 75 µg eiwit geladen en gescheiden door SDS-PAGE met behulp van een 8% gel op basis van hun grootte. In een eerste analyse werd fosforylatie van STAT3 (activatie van de JAK/STAT pathway) nagegaan met behulp van immunoblotting. Bij LIF-behandelde oligodendrocyten werd gefosforyleerd STAT3 gedetecteerd, zowel na een incubatietijd van 5 minuten, 10 minuten, als 30 minuten (figuur 8 A). Ook bij incubatie van de primaire oligodendrocyten met TNF-alfa is het STAT3-molecuul gefosforyleerd na 5 en 10 minuten, maar deze activatie verdwijnt na 30 minuten (figuur 8 B). Dit scenario is ook te zien wanneer de oligodendrocyten geïncubeerd zijn met TNF-alfa en LIF samen. Onverwacht werd ook activatie van de JAK/STAT signaalweg teruggevonden in de negatieve controle (data niet getoond). De JAK/STAT pathway wordt dus aangeschakeld zowel door LIF als door TNF-alfa en in combinatie.

A



B



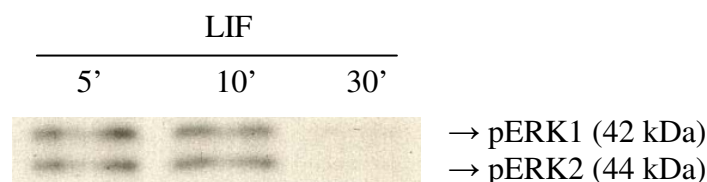
**Figuur 8: STAT3 fosforylatie in primaire rat oligodendrocyten.**

Primaire rat oligodendrocyten werden behandeld met 15 ng/ml LIF, 100 ng/ml TNF-alfa of beiden gedurende 5, 10 en 30 minuten. Vervolgens werden de cellen gelyseerd en werd hun eiwitextractie gescheiden met behulp van SDS-PAGE. Gefosforyleerd STAT3 werd door primaire antilichamen tegen pSTAT3 gebonden en aangetoond via secundaire antilichamen gekoppeld aan HRP. In deel A is het gefosforyleerd STAT3 in primaire rat oligodendrocyten getoond na incubatie met LIF gedurende 5, 10 en 30 min. Deel B toont de fosforylatie van STAT3 in primaire rat oligodendrocyten na behandeling met TNF-alfa in aan- en afwezigheid van LIF na 5, 10 en 30 min.

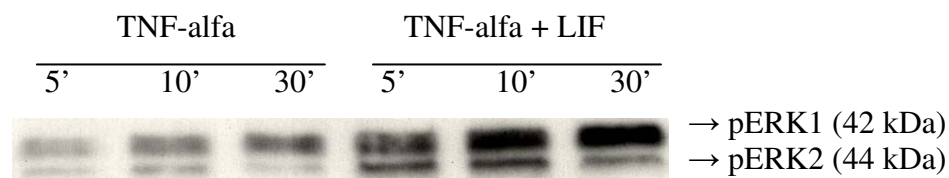
### 3.2.2 De MAPK pathway

Vervolgens werd nagegaan of ERK1/2-fosforylatie plaatsvindt in de verschillende condities. Na LIF-behandeling werden de eiwitten ERK1 en 2 gefosforyleerd na 5 minuten en 10 minuten. Deze fosforylatie verdwijnt na 30 minuten (figuur 9 A). De MAPK-pathway wordt geactiveerd waargenomen na 5, 10 en 30 minuten in cultuur met TNF-alfa, vooral door fosforylatie van het ERK1 eiwit. De fosforylatie van het ERK1 molecule stijgt naarmate de tijd toeneemt waardoor bij 30 minuten de meest intense band zichtbaar is. De fosforylatie van het ERK2 eiwit is het sterkst na 10 minuten en neemt terug of na 30 minuten (figuur 9 B). Dit patroon is meer uitgesproken terug te vinden bij stimulatie met TNF-alfa en LIF. Ook de MAPK pathway wordt dus aangeschakeld door LIF, TNF-alfa en in combinatie.

A



B



**Figuur 9: ERK fosforylatie in primaire rat oligodendrocyten.**

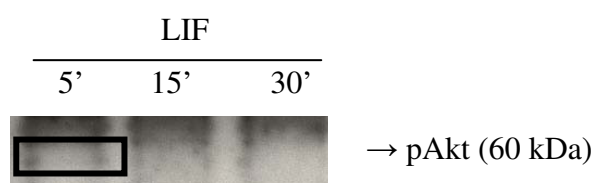
Primaire rat oligodendrocyten werden behandeld met 15 ng/ml LIF, 100 ng/ml TNF-alfa of beiden gedurende 5, 10 en 30 minuten. Vervolgens werden de cellen gelyseerd en werd hun eiwitextractie gescheiden met behulp van SDS-PAGE. Gefosforyleerd ERK 1 en 2 werden door primaire antilichamen tegen pERK1/2 gebonden en aangetoond via secundaire antilichamen gekoppeld aan HRP. In deel A is het gefosforyleerd ERK1/2 in primaire rat oligodendrocyten getoond na incubatie met LIF gedurende 5, 10 en 30 min. Deel B toont de fosforylatie van ERK 1 en 2 in primaire rat oligodendrocyten na behandeling met TNF-alfa in aan- en afwezigheid van LIF na 5, 10 en 30 min.

### 3.2.3 De $PI_3$ -kinase pathway

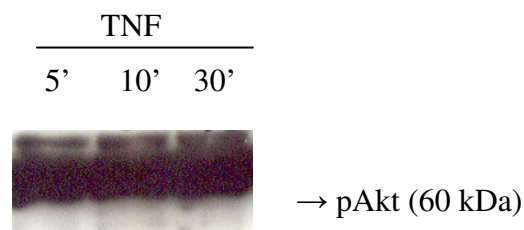
Een laatste pathway die bestudeerd werd is de  $PI_3$ -kinase pathway. Hiervoor werd Akt-fosforylatie gemeten met behulp van immunoblotting. Zoals te zien is in figuur 10 is gefosforyleerd Akt niet duidelijk detecteerbaar in dit experiment. De dikke aspecifieke band is vermoedelijk afkomstig van albumine en ligt ter hoogte van het gefosforyleerd Akt molecule. Hierdoor was de mogelijke activatie van de  $PI_3$ -kinase signaalweg niet te detecteren. Er werd getracht om de banden beter te scheiden door het polyacrylamide-percentage van de gel aan te passen, maar met weinig resultaat.

Vervolgens werd geprobeerd om de aspecifieke signalen te minimaliseren. Eerst werd de melkpoederconcentratie aangepast. In een eerste test werd gebruik gemaakt van  $1.10^{-2}$  g/ml melkpoeder in de blockingbuffer. Deze werd daarna verhoogd tot  $1,5.10^{-2}$  g/ml om achtergrondkleuring te minimaliseren. Ook de concentratie van het melkpoeder in de wasbuffer werd verhoogd van 0,75 g/l naar 1 g/l, ook weer om aspecifieke binding van de antilichamen zoveel mogelijk te beperken. Een volgende stap in de optimalisatie was het testen van verschillende detectiesystemen. Er werd in eerste instantie gebruik gemaakt van secundaire antilichamen gekoppeld aan biotine (1:4000, BD Biosciences, Erenbodegem, Belgium) verdund in wasbuffer in aan- of afwezigheid van 2% melkpoeder. Streptavidine-HRP (BD Biosciences, Erenbodegem, Belgium) werd vervolgens toegevoegd met een verdunning van 1:4000 in wasbuffer (zonder of met 2% melkpoeder). Een tweede detectiemethode dat getest werd bestaat uit secundaire antilichamen rechtstreeks gekoppeld aan HRP (1:1000, DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Deze laatste methode gaf het beste resultaat in aanwezigheid van 2% melkpoeder. De aspecifieke bindingen waren nagenoeg volledig verdwenen. De resultaten van dit experiment geven geen uitsluitsel over al dan niet activering van de  $PI_3$ -kinase pathway. De geoptimaliseerde procedure (zie voorbeeld in figuur 11) zal in de toekomst duidelijkheid verschaffen over fosforylatie van Akt door LIF met of zonder TNF-alfa.

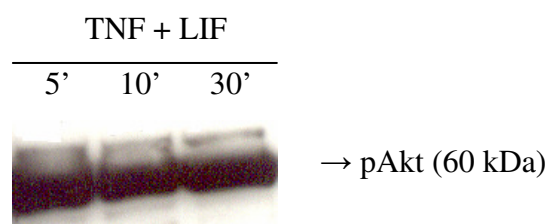
A



B

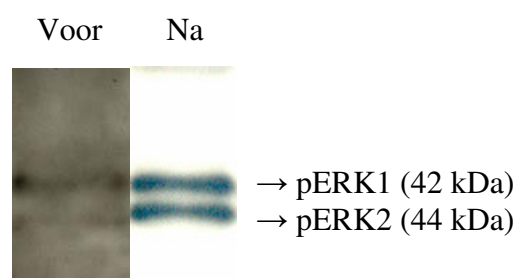


C



**Figuur 10: Akt fosforylatie in primaire rat oligodendrocyten.**

Primaire rat oligodendrocyten werden behandeld met 15 ng/ml LIF, 100 ng/ml TNF-alfa of beiden gedurende 5, 10 en 30 minuten. Vervolgens werden de cellen gelyseerd en werd hun eiwitextractie gescheiden met behulp van SDS-PAGE. Gefosforyleerd Akt werd door primaire antilichamen tegen pAkt gebonden en aangetoond via secundaire antilichamen gekoppeld aan HRP. In deel A is het gefosforyleerd Akt in primaire rat oligodendrocyten getoond na incubatie met LIF gedurende 5, 10 en 30 min. Deel B toont de fosforylatie van Akt in primaire rat oligodendrocyten na behandeling met TNF-alfa na 5, 10 en 30 min. Deel C geeft de fosforylatie van Akt weer na behandeling van TNF-alfa in aanwezigheid van LIF na 5, 10 en 30 min. In deel A, B en C werd de fosforylatie van Akt overschaduwd door de aanwezigheid van een dikke aspecifieke band, afkomstig van serumalbumine.

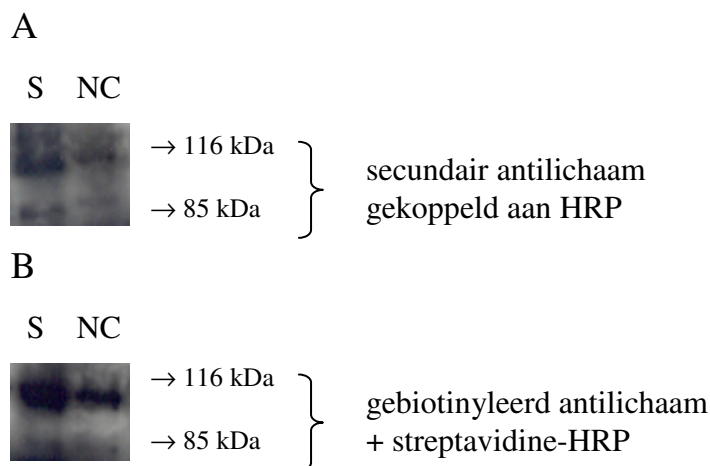


**Figuur 11: Voorbeeld van de optimalisatie bij de western blot procedure.**

De blots werden eerst geïncubeerd in blockingbuffer met  $1 \cdot 10^{-2}$  g/ml melkpoeder en werden ze gewassen in wasbuffer met 0,75 g/l melkpoeder. Een secundair gebiotinyleerd antilichaam werd gebruikt gevolgd door toevoeging van streptavidine-HRP. De bekomen banden op de blot waren niet scherp zichtbaar en er was veel achtergrondsignaal (zie "Voor"). Tijdens de optimalisatie werd meer melkpoeder toegevoegd aan de blockingbuffer ( $1,5 \cdot 10^{-2}$  g/ml) en aan de wasbuffer (1 g/l) en er werd gebruik gemaakt van een secundair antilichaam gekoppeld aan HRP met 2% melkpoeder. Hierdoor verdwenen nagenoeg alle aspecifieke bindingen en waren de banden duidelijk waar te nemen (zie "Na").

### 3.3 Zorgt TNF-alfa voor caspase-afhankelijke celdood?

In dit laatste deel werd een pilootexperiment uitgevoerd om in de toekomst te kunnen bestuderen of TNF-alfa zorgt voor apoptose via caspase-afhankelijke wegen. Hiervoor werden OLN-93 cellen uitgezaaid in een 24-well plaat met een densiteit van  $3 \cdot 10^5$  cellen per well. Na 3 dagen werden de cellen behandeld met 500 nM staurosporine. Na een incubatie van 36 uur werden de cellen gelyseerd. Het ongekliefd en gekliefd PARP is zowel terug te vinden bij de negatieve controle als bij 500 nM staurosporine (zie figuur 12). Bij het gebruik van secundaire antilichamen gekoppeld aan biotine (figuur 12 B) zijn er meer aspecifieke banden waarneembaar zodat in een volgende stap van het experiment enkel gewerkt werd met het secundaire antilichaam gekoppeld aan HRP.

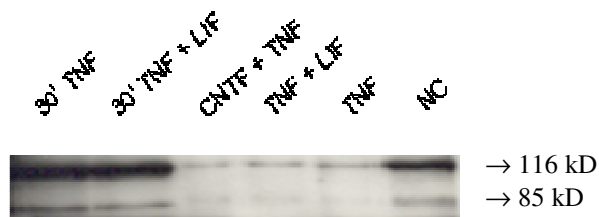


**Figuur 12: Klieving van PARP in OLN-93 cellen.**

OLN-93 cellen werden gedurende 36 uur behandeld met 500 nM staurosporine (= S) of bleven in kweekmedium (= NC). De lysaten van de cellen werden gescheiden met behulp van SDS-PAGE. Vervolgens werd gekliefd (85 kDa) en ongekliefd (116 kDa) PARP gebonden door een primair antilichaam tegen PARP en aangetoond via een secundair antilichaam rechtstreeks gekoppeld aan HRP (deel A). In deel B is de detectie weergegeven na binding van een gebiotinyleerd secundair antilichaam gevolg door toevoeging van streptavidine-HRP.

Vervolgens werd gekeken naar het PARP molecule in primaire rat oligodendrocyten. De cellen werden gedurende 48 uur geïncubeerd met 100 ng/ml TNF-alfa al dan niet in combinatie met 15 ng/ml LIF of 15 ng/ml CNTF. Er werden ook oligodendrocyt stalen meegenomen die slechts 30 minuten behandeld waren met TNF-alfa met en zonder LIF. Het ongekliefd en gekliefd PARP was in alle stalen detecteerbaar (figuur 13). Het lijkt alsof er geen verandering in de hoeveelheid gekliefd PARP waargenomen kan worden, maar dit kan

niet met zekerheid gezegd worden omdat niet éénzelfde  $\mu\text{g}$  eiwit van elke conditie werd geladen.



**Figuur 13: Klieving van PARP in primaire rat oligodendrocyten.**

Primaire rat oligodendrocyten werden behandeld met 100 ng/ml TNF-alfa al dan niet in aanwezigheid van 15 ng/ml LIF of 15 ng/ml CNTF gedurende 30 min of 48 uur. De cellen werden gelyseerd in reducerend staalbuffer. De eiwitten werden gescheiden door SDS-PAGE en gekliefd en ongekliefd PARP werden gebonden door primaire antilichamen en aangetoond via secundaire antilichamen gekoppeld aan HRP.

Dit pilootexperiment werd slechts één maal uitgevoerd. Om meer inzichten te verwerven in deze materie moet dit herhaald worden in de toekomst met stalen waarvan éénzelfde hoeveelheid eiwit wordt geladen en op verschillende tijdstippen.

#### **4. Discussie**

MS is één van de meest voorkomende neurologische ziekten bij jong volwassenen. Hierbij treedt demyelinisatie en schade aan oligodendrocyten op door een inflammatoir proces in het centrale zenuwstelsel. Bij dit proces spelen pro-inflammatoire cytokines zoals TNF-alfa en IFN-gamma een zeer belangrijke rol. Bij MS-patiënten zijn verhoogde concentraties van deze cytokines teruggevonden in het bloed en cerebrospinaal vocht (5). De huidige behandelingswijze richt zich op het onderdrukken van deze inflammatoire respons. Therapieën die de overleving van oligodendrocyten en de remyelinisatie bevorderen, kunnen een goede aanvulling vormen op de bestaande behandelingswijzen. Deze studie gaat het effect van LIF na op de overleving van primaire rat oligodendrocyten. LIF is een pleiotroop cytokine met vele functies over heel het lichaam. Verscheidene experimenten tonen aan dat LIF neuroprotectieve effecten heeft. Zo remt LIF *in vitro* IFN-gamma en TNF-alfa gemedieerde celdood in oligodendrocyten (48,49).

Deze studie had als eerste doel een *in vitro* model te ontwerpen waarin factoren getest konden worden die mogelijk protectieve effecten uitoefenen op oligodendrocyten, zoals LIF. Hiervoor werden OLN-93 cellen en primaire rat oligodendrocyten in cultuur gebracht in de aanwezigheid van pro-apoptotische moleculen: IFN-gamma, TNF-alfa, FASL en staurosporine. De protectieve werking van LIF werd getest door de mate van celdood bij verschillende concentraties en op verschillende tijdstippen na te gaan met behulp van FACS-analyse.

Alvorens te starten met primaire rat oligodendrocyten was het de bedoeling om de procedure van de viabiliteitsmeting te optimaliseren met behulp van de OLN-93 cellijn. Er werd vooreerst nagegaan of OLN-93 cellen gevoelig waren voor de effecten van staurosporine. Dit is een algemene inhibitor van proteïne kinasen die zorgt voor apoptose. In dit experiment werd in de controle conditie reeds 25% apoptotische cellen waargenomen. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat het groeimedium waarin de cellen gedurende drie dagen geprolifereerd hadden volledig afgenomen werd om staurosporine toe te voegen. De autocriene en paracriene groei- en overlevingsfactoren die de cellen aanmaken werden op die manier weggenomen.

Bij incubatie met staurosporine verdubbelde het percentage apoptotische cellen ten opzichte van de negatieve controle. Er werd ook gekeken naar het protectief effect van LIF op de geïnduceerde celdood van staurosporine. LIF slaagt erin om de celdood te verminderen tot hetzelfde niveau als in kweekmedium. Dit experiment is éénmalig gebeurd en de resultaten dienen in de toekomst bevestigd te worden. Vanderlocht et al hebben aangetoond dat deze concentratie beschermende effecten heeft op TNF-gemedieerde celdood van oligodendrocyten (25). De beschermende effecten van LIF lijken ook op te gaan voor geïnduceerde celdood met staurosporine.

Na de initiële experimenten op OLN-93 cellen werd de protectieve werking van LIF op staurosporine-geïnduceerde celdood nagegaan bij primaire rat oligodendrocyten. Na 24 uur incubatie is beperkte afname in apoptose waarneembaar bij incubatie met staurosporine samen met LIF in vergelijking met staurosporine alleen. Ook bij primaire oligodendrocyten is dus een trend naar de beschermende werking van LIF op staurosporine-geïnduceerde celdood terug te vinden, hetzij minimaal. Na een incubatietijd van 48 uur is deze observatie niet meer te zien en is er geen protectieve werking meer. De mogelijkheid bestaat dat LIF slechts tijdelijk in staat is om oligodendrocyten te beschermen tegen staurosporine en dat de effecten van staurosporine na 48 uur niet meer te voorkomen zijn.

Vervolgens werd bestudeerd of LIF ook een protectieve werking heeft tegen de inductie van apoptose door andere pro-apoptotische moleculen zoals TNF-alfa en IFN-gamma, beschreven door Buntinx et al (55). In tegenstelling tot de algemene apoptotische werking van de proteïne kinase inhibitor staurosporine, werken IFN-gamma en TNF-alfa via specifieke signaalwegen. IFN-gamma leidt tot apoptose door fosforylatie van STAT1, dat op zijn beurt voor de transcriptie van pro-apoptotische moleculen zorgt. TNF-alfa kan via caspase-afhankelijke en caspase-onafhankelijke routes apoptose induceren (11). Voor deze experimenten werden oligodendrocyten geïncubeerd met TNF-alfa of TNF-alfa en IFN-gamma al dan niet in de aanwezigheid van LIF. In deze studie werd gekeken naar de effecten van TNF-alfa en IFN-gamma samen, omdat *in vivo* ook meerdere moleculen een invloed uitoefenen in het ziekteproces van MS. De concentraties die in deze testen gebruikt werden zijn beschreven door Buntinx et al (55). De lange incubatietijd (72 uur) werd hier genomen omdat TNF-alfa gemedieerde apoptose pas duidelijk waarneembaar is na 72-96 uur (25). In kweekmedium is er in deze experimenten een algemeen lager percentage apoptotische cellen dan in de voorgaande experimenten. Er werd dan ook slechts de helft van het medium verwijderd wat

resulteerde in minder apoptotische cellen bij de negatieve controle. In deze studie werd de beschermende werking van LIF op apoptose-inductie door TNF-alfa samen met IFN-gamma onderzocht. Er werd na 72 uur een verdubbeling van de apoptose waargenomen bij incubatie met TNF-alfa en IFN-gamma ten opzichte van kweekmedium. LIF lijkt reeds protectief te werken na 48 uur tegen TNF-alfa en IFN-gamma geïnduceerde celdood, en kan apoptose zelfs reduceren met ongeveer 60% na 72 uur. Bij een incubatie met TNF-alfa bedroeg het percentage apoptose 33% meer dan bij incubatie met TNF-alfa samen met LIF na 72 uur. Ook hier is het beschermende effect van LIF aanwezig zoals beschreven door Vanderlocht et al (25). Een stimulatie met TNF-alfa samen met IFN-gamma heeft na 72 uur incubatie een hoger percentage apoptotische cellen dan met TNF-alfa alleen. Dit kan liggen aan het synergistisch effect van IFN-gamma en TNF-alfa (14, 55). IFN-gamma afzonderlijk lijkt nagenoeg geen bijkomstig effect te hebben op de apoptose van de primaire oligodendrocyten na 72 uur incubatie. Deze test is slechts twee maal uitgevoerd waardoor dit resultaat mogelijk afwijken van de gekende gegevens beschreven in de literatuur (55).

Om de protectieve werking van LIF na te gaan op nog andere manieren van celdood, werd het effect van FASL en FASL samen met LIF bestudeerd op primaire rat oligodendrocyten. Bij de ontstekingsreactie tijdens MS is er een opregulatie van FAS aan het oppervlak van oligodendrocyten, die in normale omstandigheden deze receptor niet tot expressie brengen. Door binding van FASL, aanwezig op geactiveerde T-cellen en microglia (20), met zijn receptor kunnen twee intracellulaire routes aangeschakeld worden die leiden tot apoptose: caspase-afhankelijke apoptose en caspase-onafhankelijke celdood via het *receptor-interacting-protein* (RIP)-molecule (56,57). Voor dit experiment werd eerst een alignering uitgevoerd van het humaan en rat FASL waaruit een homologie tussen de nucleotidesequentie van 87% en tussen de aminozuursequenties van 77,7% (deel verantwoordelijk voor biologische activiteit) kon worden vastgesteld. Na 72 uur incubatie kon geen verschil in apoptose worden vastgesteld tussen de negatieve controle, incubatie met FASL en incubatie met FASL samen met LIF. Dit resultaat kan mogelijk te verklaren zijn doordat de homologie tussen de twee sequenties niet voldoende was. Het verschil tussen de sequenties in het functioneel gebied van het molecule is misschien te groot, waardoor het zijn werking niet meer kan uitvoeren, ondanks de aanwezigheid van de juiste aminozuren verantwoordelijk voor binding aan de receptor (C-terminaal einde (65)). Het is ook mogelijk dat de incubatietijd te kort was om enig effect vast te stellen. Bij vervolgonderzoek zou zeker

geopteerd moeten worden voor rat FASL en zou gekeken moeten worden op verschillende tijdstippen. Eventueel kan ook het FASL aan verschillende concentraties gebruikt worden.

De viabiliteitsmetingen in deze studie dienden als pilootexperiment. De resultaten bekomen tijdens deze proeven kunnen niet als significant worden beschouwd. Om statistische significantie te bekomen zullen deze experimenten in de toekomst herhaald moeten worden.

Een tweede doel van deze studie was het bestuderen van de intracellulaire signaalwegen die geactiveerd worden in de oligodendrocyten na stimulatie met LIF. Betere inzichten in de wijze waarop LIF zijn protectieve effecten bewerkstelligt kan bijdragen tot de ontwikkeling van meer specifieke therapieën voor MS. Een farmacologische vorm van LIF, AM424 (AMRAD®, Richmond, Victoria, Australië), werd reeds getest in een fase I klinische studie. In deze studie werd LIF gebruikt tegen de neveneffecten van chemotherapie bij kankerpatiënten. Het probleem met dit molecuul is dat het niet of nauwelijks door de bloed-hersenbarrière dringt na systemische toediening en een kort halfleven heeft. Omwille van de verstoorde bloed-hersenbarrière zou de beschikbaarheid in het centrale zenuwstelsel bij MS-patiënten beter kunnen zijn, zodat de systemische neveneffecten door hoge dosissen LIF misschien vermeden kunnen worden. Anderzijds zou men de positieve effecten van LIF kunnen bekomen met therapeutica die ingrijpen op de intracellulaire signaalwegen die door LIF geactiveerd worden (51,52). In deze studie is daarom onderzocht via welke intracellulaire signaalwegen LIF zijn beschermende werking uitvoert op primaire oligodendrocyten. Van LIF is geweten dat het ten minste drie verschillende overlevingspathways kan aanschakelen in andere celtypes (53). De fosforylatie van sleuteleiwitten in deze signaalwegen werd bestudeerd wat duidt op de activatie van deze moleculen. Activatie van deze signaalwegen kan zorgen voor transcriptionele regulatie van onder andere het anti-apoptotische eiwit Bcl-2. Er werd gekeken naar de gefosforyleerde vorm van STAT3, sleutelmolecuul in de JAK/STAT signaalweg. Er werd vastgesteld dat LIF zorgt voor een fosforylatie van het STAT3 molecuul vanaf 5 minuten na stimulatie. Deze resultaten komen overeen met die van onderzoeken naar LIF in andere celtypes. Zo werd door Keita et al aangetoond dat LIF in cardiale myocyten van de rat zorgt voor de fosforylatie van STAT3 binnen de eerste 5 minuten na stimulatie. Deze activatie van STAT3 verdwijnt na 30 minuten en is volledig verdwenen na 1 uur (58). Ook is er in deze studie activatie van dit molecuul terug te vinden na incubatie met 5 en 10 minuten TNF-alfa, maar deze fosforylatie lijkt weg te vallen na 30 minuten. Bij stimulatie met TNF-alfa samen met LIF werd hetzelfde patroon teruggevonden als bij TNF-alfa alleen. Van TNF-

alfa is geweten dat het kan zorgen voor de activatie van de JAK/STAT-pathway via fosforylatie van STAT3 in pancreas cellen van de rat en in humane B-cellen (59, 60).

In een volgende stap werd de fosforylatie van ERK1/2 bestudeerd in de MAPK pathway. LIF alleen leidt tot fosforylatie van ERK1 en 2 na 5 en 10 minuten, en valt weg na 30 minuten. Bij stimulatie met TNF-alfa is de fosforylatie van ERK 1 en 2 het grootst na 10 min. Bij ERK 2 neemt deze terug af na 30 min, terwijl ERK 1 hoog gefosforyleerd blijft. Hetzelfde patroon is weer te zien bij stimulatie met TNF-alfa samen met LIF, maar de fosforylatie van de ERK-moleculen is hier sterker. Als apoptose geïnduceerd wordt door TNF-alfa kan het zijn dat de MAPK-siginaalweg aangeschakeld blijft waarbij de mate van activatie belangrijk is voor de protectieve effecten van LIF. Deze data komen grotendeels overeen met een studie van Keita et al (58) met cardiale rat myocyten.

Vervolgens werd de fosforylatie van Akt bestudeerd, sleuteleiwit in de PI<sub>3</sub>-siginaalweg. In een studie van Paling et al werd aangetoond dat LIF in embryonale stamcellen zorgt voor de activatie van deze siginaalweg (61). Of de PI<sub>3</sub>-kinase pathway daadwerkelijk aangeschakeld wordt in oligodendrocyten kon niet aangetoond worden in deze studie. Bij het bestuderen van de aanschakeling van deze pathway, werd er hinder ondervonden van een aspecifieke band ter hoogte van de plaats waar het gefosforyleerd Akt zich bevindt op de blot. Deze aspecifieke band is vermoedelijk afkomstig van het serumalbumine dat gebruikt wordt bij de celkweek. Albumine wordt ook wel het “*sticky protein*” genoemd omwille van het feit dat zeer veel antilichamen aspecifiek binden aan dit eiwit. Om dit probleem op te lossen werden verschillende parameters gevarieerd om dit effect te reduceren. Door gebrek aan tijd is dit experiment niet afgerond en moeten er in de toekomst vervolgexperimenten komen om de blotting voor gefosforyleerd Akt te optimaliseren. Bij de negatieve controle is ook activatie waar te nemen van de drie sleutelmoleculen, hoewel dit in normale omstandigheden niet zou mogen (58-61). Dit duidt erop dat de cellen waarschijnlijk onder stress gestaan hebben tijdens de lysis. Om dit te controleren moet het experiment opnieuw uitgevoerd worden op meerdere staaltjes in parallel. Door tijdsgebrek kon dit experiment niet meer herhaald worden.

Om te bestuderen of TNF-alfa via de caspase-cascade apoptose veroorzaakt in primaire oligodendrocyten en of LIF activatie van de caspasen kan verhinderen werd de klieving van poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) nagegaan. Het was hierbij de bedoeling om in een eerste fase gekliefd en ongekliefd PARP aan te treffen. PARP is betrokken bij DNA-herstel. TNF-alfa kan na binding met zijn receptor via caspase-afhankelijke of onafhankelijke wegen tot celdood leiden (62). Bij de caspase-afhankelijke siginaalweg klieft caspase-3 PARP van

zijn 116 kDa-vorm naar 85 kDa, waardoor de twee vormen te onderscheiden zijn via western blot. De klieving van het PARP molecule werd nagegaan op OLN-93 cellen en primaire rat oligodendrocyten.

Op de OLN-93 cellijn werd getest of het ongekliefd en gekliefd PARP te detecteren waren in eiwitextracties van deze cellen zodat de procedure geoptimaliseerd kon worden. Het ongekliefd en gekliefd PARP waren in beide stalen (negatieve controle en 500 nM staurosporine) aanwezig. Dit zou te wijten kunnen zijn aan het feit dat er altijd wel een klein percentage cellen in apoptose gaat in cultuur.

Primaire rat oligodendrocyten werden gedurende 48 uur geïncubeerd met TNF-alfa al dan niet in aanwezigheid van LIF of CNTF of bleven in kweekmedium. Er werd geen verandering waargenomen in de hoeveelheid ongekliefd en gekliefd PARP. Er werden ook twee staaltjes meegenomen, 30 minuten TNF-alfa en 30 minuten TNF-alfa en LIF. Ook bij deze stalen werd geen verschil waargenomen in de hoeveelheid gekliefd en ongekliefd PARP. Li et al zagen klieving van PARP in humane promyelocytische leukemische HL-60 cellen na behandeling met TNF-alfa al na 30 minuten (63), terwijl Utaisincharoen et al de gekliefde vorm van PARP na 6 uur incubatie met TNF-alfa aantreffen in humane cholangiocarcinoma cellen (64). Dit was een pilootexperiment waarbij het vooral de bedoeling was om PARP in zijn twee vormen te kunnen detecteren. In de toekomst moet het experiment herhaald worden op stalen waarvan de eiwitconcentraties gemeten worden en hiervoor gecorrigeerd wordt. Ook kan er gekeken worden naar gekliefd PARP op meerdere tijdstippen. In deze fase van de studie kunnen er geen besluiten getrokken worden omtrent de caspase-afhankelijkheid van TNF-alfa geïnduceerde celdood.

In conclusie kan gezegd worden dat het lijkt alsof LIF een pathway-onafhankelijke protectie biedt tegen apoptose. Zo zou LIF niet alleen in staat zijn om oligodendrocyten te beschermen tegen het wegnemen van groei- en overlevingsfactoren, maar ook tegen apoptose, veroorzaakt door staurosporine en cytokines zoals TNF-alfa en IFN-gamma (48,49), die elk via verschillende signaalwegen tot celdood leiden. LIF bewerkstelligt zijn protectief effect waarschijnlijk door het evenwicht tussen anti-apoptotische en pro-apoptotische moleculen te doen overhellen naar de anti-apoptotische zijde. Dit kan LIF doen door activatie van drie overlevingspaways: de JAK/STAT pathway, de MAPK pathway en de PI<sub>3</sub>-kinase pathway. Het belang van dit onderzoek is het vinden van gerichte therapieën die het verlies van oligodendrocyten tegengaan tijdens het ziekteproces van MS. LIF of een *downstream* molecule zou mogelijk kunnen gebruikt worden als therapie bij MS om zo op een

doelgerichte manier de overleving van oligodendrocyten te verbeteren zodat de catastrofale gevolgen van MS tot een minimum gereduceerd kunnen worden.

## **Referenties**

- 1) Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis. *Immunol. Res.* 2002;25:27-51.
- 2) Buntinx M, Stinissen P, Steels P, Ameloot M, Raus J. Immune-Mediated Oligodendrocyte Injury in Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Interventions. *Crit. Rev. Immunol.* 2002;22:391-424.
- 3) Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi MM et al. Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1997;120:1085-96.
- 4) Wehman-Tubbs K, Yale SH, Rolak LA. Insights into Multiple Sclerosis. *Clin. Med. Res.* 2005;3:41-4.
- 5) Debruyne J, Philippe J, Dereuck J, Willems A, Leroux-Roels G. Relapse markers in multiple sclerosis: are in vitro cytokine production changes reflected by circulatory T-cell phenotype alterations? *Mult. Scler.* 1998;4:193-7.
- 6) Hisahara S, Shoji S, Okano H, Miura M. ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor. *J. Neurochem.* 1997;69:10-20.
- 7) Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:11294-8.
- 8) Bitsch A, Kuhlmann T, Da Costa C, Bunkowski S, Polak T, Bruck W. Tumour necrosis factor alpha mRNA expression in early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. *Glia* 2000;29:366-75.
- 9) Baron P, Constantin G, D'Andrea A, Ponzin D, Scarpini E, Scarlato G. Production of tumor necrosis factor and other proinflammatory cytokines by human mononuclear phagocytes stimulated with myelin P2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:4414-8.
- 10) Thompson A. *The Cytokine Handbook*, 2<sup>nd</sup> edition. London:Academic Press;1994.
- 11) Eureka Bioscience database. Eureka Bioscience Collection. Apoptosis: The Role of caspases in Modulation of Cytokines and other Molecules in Apoptosis and Inflammation. Landes Bioscience;2003.
- 12) Cooper GM. *The Cell – A Molecular Approach* 2<sup>nd</sup> ed. Sunderland (MA):Sinauer Associates, Inc.;2000.

- 13) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell 4<sup>th</sup> ed. New York:Garland Publishing;2002.
- 14) Ledeen RW, Chakraborty G. Cytokines, Signal Transduction, and Inflammatory Demyelination: Review and Hypothesis. *Neurochem. Res.* 1998;23:277-89.
- 15) Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Guaza C. LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur. J. Neurosci.* 2001;13:493-502.
- 16) Eureka Bioscience database. Eureka Bioscience Collection. Apoptosis: Apoptosis Dependent and Independent Functions of Caspases. Landes Bioscience;2003.
- 17) Pouly S, Becher B, Blain M, Antel JP. Interferon-gamma modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000;59:280-6.
- 18) D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB et al. Multiple Sclerosis: Fas Signaling in Oligodendrocyte Cell Death. *J. Exp. Med.* 1996;184:2361-70.
- 19) Suvannavejh GC, Dal Canto MC, Matis LA, Miller SD. Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Inv.* 2000;105:223-31.
- 20) Parra B, Lin MT, Stohlman SA, Bergmann CC, Atkinson R, Hinton DR. Contributions of Fas-Fas Interactions to the Pathogenesis of Mouse Hepatitis Virus in the Central Nervous System. *J. Virol.* 2000;74:2447-50.
- 21) Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Mol. Med.* 2001;7:115-20.
- 22) Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Brain* 1999;122:2279-95.
- 23) Gay FW, Drye TJ, Dick WA, Esiri MM. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. *Brain* 1997;120:1461-83.
- 24) Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2000;107:161-6.
- 25) Vanderlocht J, Hellings N, Hendriks J, Vandenabeele F, Moreels M, Buntinx M et al. Leukemia Inhibitory Factor Is Produced by Myelin-Reactive T Cells From Multiple Sclerosis

Patients and Protects Against Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Oligodendrocyte Apoptosis. *J. Neurosci. Res.* 2006;83:763-74.

26) Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M. Neuroprotective autoimmunity: Naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002;99:15620-5.

27) Barouch R, Schwartz M. Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *Faseb J.* 2002;16:1304-6.

28) Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 1996;19:289-317.

29) Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implication for neurological diseases. *Ann. Neurol.* 2003;53:292-304.

30) Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 200;107:161-6.

31) Neumann H, Misgeld T, Matsumuro K, Wekerle H. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:5779-84.

32) Villoslada P, Hauser SL, Bartke I, Unger J, Heald N, Rosenberg D et al. Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of T helper cell type 1 and 2 cytokines within the central nervous system. *J. Exp. Med.* 2000;191:1799-806.

33) Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors – implications for neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000;10:103-10.

34) Vargas-Leal V, Bruno r, Derfuss T, Krumbholz M, Hohlfeld R, Meinl E. Expression and function of glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their receptors on human immune cells. *J. Immunol.* 2005;175:2301-8.

35) Gearing DP, Thut CJ, VandeBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J et al. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J.* 1991;10:2839-48.

36) Mayer M, Bhakoo K, Noble M. Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro. *Development* 1994;120:143-53.

- 37) Martinou JC, Martinou I, Kato AC. Cholinergic Differentiation Factor (Cdf/Lif) Promotes Survival of Isolated Rat Embryonic Motoneurons In Vitro. *Neuron* 1992;8:737-44.
- 38) Azari MF, Galle A, Lopes EC, Kurek J, Cheema SS. Leukemia inhibitory factor by systemic administration rescues spinal motor neurons in the SOD1 G93A murine model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res.* 2001;922:144-7.
- 39) Kerr BJ, Patterson PH. Leukemia inhibitory factor promotes oligodendrocyte survival after spinal cord injury. *Glia* 2005;51:73-9.
- 40) Sawai K, Matsuzaki N, Kameda T, Hashimoto K, Okada T, Shimoya K et al. Leukemia inhibitory factor produced at the fetomaternal interface stimulates chorionic gonadotropin production: its possible implication during pregnancy, including implantation period. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995;80:1449-56.
- 41) Turnley AM, Bartlett PF. Cytokines that Signal Through the Leukemia Inhibitory Factor Receptor- $\beta$  Complex in the Nervous System. *J. Neurochem.* 2000;74:889-96.
- 42) Patterson PH. Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface between neurobiology and immunology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:7833-5.
- 43) Moon C, Yoo JY, Matarazzo V, Kwan Sung Y, Kim EJ, Ronnett GV. Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002;99:9015-20.
- 44) Bugge L, Gadiant RA, Kwan K, Stewart CL, Patterson PH. Analysis of Neuronal and Glial Phenotypes in Brains of Mice Deficient in Leukemia Inhibitory Factor. *J. Neurobiol.* 1998;36:509-24.
- 45) Butzkueven H, Emery B, Cipriani T, Marriott MP, Kilpatrick TJ. Endogenous leukemia inhibitory factor production limits autoimmune demyelination and oligodendrocyte loss. *Glia* 2006;23:696-703 (ahead of print).
- 46) Butzkueven H, Zhang JG, Soilu-Hanninen M, Hochrein H, Chionh F, Shiphams KA et al. LIF receptor signalling limits immune-mediated demyelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Nature med.* 8:613-9.
- 47) Ransohoff RM, Howe CL, Rodriguez M. Growth factor treatment of demyelinating disease: at last, a leap into the light. *TRENDS in Immunol.* 2002;23:512-5.
- 48) Kerr BJ, Patterson PH. Leukemia Inhibitory Factor Promotes Oligodendrocyte Survival After Spinal Cord Injury. *Glia* 2005;51:73-9.
- 49) Barres BA, Schmid R, Sendtner M, Raff MC. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 1993;118:283-95.

- 50) Tham S, Dowsing B, Finkelstein D, Donato R, Cheema SS, Bartlett PF et al. Leukemia Inhibitory Factor Enhances the Regeneration of Transected Rat Sciatic Nerve and the Function of Reinnervated Muscle. *J. Neurosci.* 1997;47:208-15.
- 51) Kurek J. AM424: history of a novel drug candidate. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2000;27:553-7.
- 52) Kilpatrick TJ, Butzkueven H, Emery B, Marriott M, Taylor BV, Tubridy N. Neuroglial responses to CNS injury: prospects for novel therapeutics. *Exp. Rev. Neurotherapeutics* 2004;4:869-78.
- 53) Turnley AM, Bartlett PF. Cytokines that signal Through the Leukemia Inhibitory Factor Receptor- $\beta$  Complex in the Nervous System. *J. Neurochem.* 2000;74:889-99.
- 54) Richter-Landsberg C, Heinrich M. OLN-93: A new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures. *J. Neurosci. Res.* 1996;45:161-73.
- 55) Buntinx M, Moreels M, Vandenabeele F, Lambrechts I, Raus J, Steels P et al. Cytokine-Induced Cell Death in Human Oligodendroglial Cell Lines: I. Synergistic Effects of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  on Apoptosis. *J. Neurosci. Res.* 2004;76:834-45.
- 56) Li W, Maeda Y, Ming X, Cook S, Chapin J, Husar W et al. Apoptotic death following Fas activation in human oligodendrocyte hybrid cultures. *J. Neurosci. Res.* 2002;69:189-96.
- 57) Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP, a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 1995;81:513-23.
- 58) Keita K, Hisao H, Yasushi F, Hideo M, Yoshihiko T, Keiko YT et al. Activation of JAK/STAT and MAPK Kinases by leukemia Inhibitory Factor Through gp130 in Cardiac Myocytes. *Circulation* 1996;94:2626-32.
- 59) Robinson K, Vona-Davis I, Riggs D, Jackson B, McFadden D. Peptide YY attenuates STAT1 and STAT3 activation induced by TNF-alpha in acinar cell line AR42J. *J. Am. Coll. Surg.* 2006;202:788-96.
- 60) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signalling through TNFR-1 in human B cells. *Cell Growth Differ.* 2002;13:13-8.
- 61) Paling NR, Wheadon H, Bone HK, Welham MJ. Regulation of Embryonic Stem Cell Self-renewal by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling. *J. Biol. Chem.* 2004;279:48063-70.
- 62) Bajaj G, Sharma RK. TNF-alpha-mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006 (ahead of print).

- 63) Li X, Darzynkiewicz Z. Cleavage of Poly(ADP-ribose) polymerase measured in situ in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis. *Exp. Cell Res.* 2000;255:125-32.
- 64) Utaisincharoen P, Ubol S, Tangthawornchaikul N, Chaisuriya P, Sirisinha S. Binding of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) to TNF-RI induces caspase(s)-dependent apoptosis in human cholangiocarcinoma cell lines. *Clin. Exp. Immunol.* 1999;116:41-7.
- 65) Orlinick JR, Elkon KB, Chao MV. Separate Domains of the Human Fas Ligand Dictate Self-association and Receptor Binding. *J. Biol. Chem.* 1997;272:32221-9.

# 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:

**Neurokine gemedieerde protectie van oligodendrocyten in multiple sclerose: karakterisatie van het werkingsmechanisme**

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,

**Katrien VANDEBROEK**

Datum: