

## 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, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

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

Titel: Onderzoek naar de immuunomgeving in het centraal zenuwstelsel tijdens de herstelfase van experimentele auto-immune encephalomyelitis.

Richting: master in de biomedische wetenschappen - klinische moleculaire wetenschappen

Jaar: 2008

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

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik 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 mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

VANDEPUT, Sebastian

Datum: 5.11.2008

# *Onderzoek naar de immuunomgeving in het centraal zenuwstelsel tijdens de herstelfase van experimentele auto-immune encephalomyelitis*

**Sebastian Vandeput**

promotor :

Prof. dr. Pieter STINISSEN

co-promotor :

Prof. dr. Peter ADRIAENSENS

Eindverhandeling voorgedragen tot het bekomen van de graad  
master in de biomedische wetenschappen klinische en  
moleculaire wetenschappen



# Inhoudsopgave

|  |     |
|--|-----|
| Inhoudsopgave .....  | i   |
| Lijst met afkortingen .....  | ii  |
| Voorwoord .....  | iii |
| Samenvatting .....   | iv  |
| 1. Inleiding .....   | 1   |
| 1.1 Wat is multiple sclerose .....   | 1   |
| 1.2 De incidentie en prevalentie van MS in Europa .....  | 1   |
| 1.3 Vormen van MS .....  | 1   |
| 1.4 Pathogenese van MS .....   | 2   |
| 1.5 Demyelinisatie bij MS: het heterogene ziektebeeld .....  | 4   |
| 1.6 Experimentele auto-immune encephalomyelitis .....  | 5   |
| 1.7 Herstelmechanismen .....   | 6   |
| 1.8 Celtracering .....   | 7   |
| 1.8.1 Fluorescentie .....  | 7   |
| 1.8.1.1 Green fluorescent protein .....  | 7   |
| 1.8.1.2 5,6-carboxy-succinimidyl-fluorescein-ester .....   | 8   |
| 1.8.1.3 7-ami actinomycin .....  | 8   |
| 1.8.2 Bioluminescente beeldvorming .....   | 8   |
| 1.8.3 Magnetische Resonantie Beeldvorming .....  | 9   |
| 1.8.3.1 Principe .....   | 9   |
| 1.8.3.2 Eigenschappen van het weefsel gebruikt voor detectie .....   | 9   |
| 1.8.3.3 Beeldvorming .....   | 10  |
| 1.9 Het gebruik van MRI in MS .....  | 10  |
| 1.10 Doel van het project .....  | 11  |
| 2. Materialen en methoden .....  | 12  |
| 2.1 Proefdieren .....  | 12  |
| 2.2 Bereiding ratserum .....   | 12  |
| 2.3 Medium samenstellingen .....   | 12  |
| 2.4 Thymus isolatie .....  | 13  |
| 2.5 Interleukine –2 productie .....  | 13  |
| 2.6 Immunisatie .....  | 13  |
| 2.7 Kweek van rustende T-lymfocyten .....  | 14  |
| 2.8 CFSE labeling .....  | 14  |
| 2.9 Proliferatie-assays .....  | 15  |
| 2.9.1 Nul stimulatie .....   | 15  |
| 2.9.2 Eerste stimulatie .....  | 15  |
| 2.10 Flowcytometrische analyse .....   | 15  |
| 2.11 Cellen fixeren .....  | 16  |
| 2.12 IJzerkleuring volgens Perls .....   | 17  |
| 2.13 SPIO – labeling en transfer .....   | 17  |
| 3. Resultaten .....  | 18  |
| 3.1 Karakterisatie van rustende myeline-reactieve T-cellen .....   | 18  |
| 3.2 De bepaling van celinfiltratie in de organen van de getransfereerde cellen .....   | 19  |
| 3.3 Distributie en infiltratiebepaling van SPIO-gelabelde myeline-reactieve T-cellen .....                                       | 21  |
| 3.4 Proliferatie bepaling in de organen van de getransfereerde cellen 3 dagen na transfer .....                                  | 24  |
| 3.5 Determinatie celdood in getransfereerde cellen in de organen drie dagen na transfer .....                                    | 26  |
| 3.6 Bepaling celdood in “host derived” T – cellen in de organen 3 dagen na transfer .....  | 27  |
| 3.7 Het verloop van ziekte-inductie door de transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen in EAE ratten tijdens herstel ..... | 28  |
| 4. Discussie .....   | 31  |
| 5. Literatuurlijst .....   | 37  |

## Lijst met afkortingen

|  |   |
|--|---|
| 7-AAD: 7-amoni actinomycine                                | MHC: major histocompatibiliteitscomplex           |
| ADC: analoog naar digitaal converter                       | MOG: myeline oligodendrocyt glycoproteïne         |
| ADCC: antilichaam afhankelijke celgedieerde cytotoxiciteit | MRI: magnetische resonantie beeldvorming          |
| BHB: bloed hersenbarrière                                  | MS: multiple sclerose                             |
| BLI: bioluminescente beeldvorming                          | NaPyr: Natriumpyruvaat                            |
| BSA: <i>Bovine Serum Albumin</i>                           | NAZ: niet-essentiële aminozuren                   |
| CD8 <sup>+</sup> : cytotoxische T-cellen                   | NO: stikstofoxide                                 |
| CFSE: 5,6-carboxy-succinimidyl-fluoresceïn-ester           | OVA: ovalbumen                                    |
| Con A: Concanavalin A                                      | PBS: fosfaatgebufferde zoutoplossing              |
| CZS: centraal zenuwstelsel                                 | PFA: Paraformaldehyde                             |
| EAE: experimentele auto-immune encephalomyelitis           | PLL: poly-L-lysine                                |
| EBV: Epstein Barr virus                                    | PLP: proteolipide proteïne                        |
| FACS: fluorescent geactiveerde celsorteerder               | PPMS: primaire progressieve MS                    |
| FCS: foetaal kalfserum                                     | rpm: rotaties per minuut                          |
| FE-TA: ferumoxide-getransfecteerde stoffen                 | RRMS: relapsing/remitting MS                      |
| FT: Fourier transformatie                                  | RS: ratserum                                      |
| GFP: <i>green fluorescent protein</i>                      | SPIO: <i>small particles of iron oxide</i>        |
| h $\nu$ : radiofrequentie energiepakketten                 | SPMS: secundaire progressieve MS                  |
| HLA: humaan leukocyt antigen                               | T1: longitudinale relaxatie, spinrelaxatie        |
| IFN- $\beta$ : interferon- $\beta$                         | T2: transversale relaxatie, spin – spin relaxatie |
| IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$                       | TCR: T-celreceptor                                |
| IL: interleukine   | TGF- $\beta$ : tumorgroefactor- $\beta$           |
| I: spinqantumgetal   | Th1: T-helper 1                                   |
| LN cv diep: diepe cervicale lymfeknopen                    | Th2: T-helper 2                                   |
| LN cv opp: oppervlakkige cervicale lymfeknopen             | TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alfa        |
| MBP: <i>myelin basic protein</i>                           | TNF- $\beta$ : tumor necrosis factor- $\beta$     |
|  | qPCR: kwantitatieve polymerase kettingreactie     |

## Voorwoord

Het einde van mijn verhandeling is al in zicht. Verschillende mensen hebben hun steentje bijgedragen. Bij deze zou ik ze graag willen bedanken.

Als eerste zou ik mijn promotor, Prof. dr. Piet Stinissen, bedanken. Hij heeft mij de keuze om deze leerrijke stage te doen toegestaan. Ook wil ik hem bedanken voor het nalezen van mijn thesis.

Als tweede wil ik mijn co-promotor, Prof. dr. Peter Adriaensens, bedanken omdat hij die functie op zich wil nemen, geholpen heeft met het MRI werk en omdat hij mijn verhandeling heeft nagelezen.

Als derde wil ik mijn begeleider, dhr. Kurt Baeten, willen bedanken. Hij heeft mij de voorbije half jaar uitstekend begeleid in en buiten het labo. Hij heeft mij op het juiste pad gehouden gedurende die 6 maanden.

Vervolgens wil ik nog dhr. Wilfried Leysens bedanken voor de hulp bij de handelingen met proefdieren.

Tenslotte mag ik de mensen van BIOMED zelf ook niet vergeten. Het was me een waar genoegen om naast hen te werken in het labo.

## Samenvatting

Multiple Sclerose (MS) is een chronische inflammatoire aandoening van het centraal zenuwstelsel (CZS). De oligodendrocyten en het myeline worden aangetast rond neuronen door geactiveerde autoreactieve T-cellen, waardoor neurongeleiding vermindert. MS initieert zich meestal in een relapsing vorm, uitzonderlijk in een progressieve vorm. Na enkele jaren kan de relapsing vorm verergeren in een progressieve vorm. Het is algemeen geweten dat schade aan het CZS bij volwassen MS-patiënten onomkeerbaar is. De omgeving rond de neuronen is geconcentreerd met proinflammatoire mediators die genezing niet toelaat. Het herstelmechanisme dat geactiveerd wordt is de vorming van littekenweefsels. Zo hoopt het CZS zich te beschermen tegen verdere schade. Een andere mogelijkheid is de migratie van oligodendrocyt precursor cellen, neurale precursor cellen of stamcellen die kunnen matureren in myeliniserende oligodendrocyten of functionele axonen. Het experimentele auto-immune encephalomyelitis (EAE) Lewis ratmodel is een goed gekarakteriseerd diermodel voor MS. Hierbij ontstaat er volledig herstel van de rat. Dit herstelmechanisme is echter nog niet eenduidig. EAE wordt geïnduceerd door een injectie in de achterpoot van de rat met *myelin basic protein* (MBP). Hierdoor wordt een auto-immune T-celactivatie geïnduceerd. Die geactiveerde cellen kunnen migreren naar het ruggenmerg en de hersenen. Daardoor ontstaat er gewichtsafname, gevolgd door neurologische gebreken waarna in dit model spontaan herstel optreedt. Het doel van deze stage is verder onderzoek te verrichten naar de mechanismen betrokken bij de herstelfase in het diermodel. Daarbij zal nagegaan worden of tijdens herstel rustende myeline-actieve T-cellen het CZS kunnen infiltreren, of ze kunnen prolifereren en of ze kunnen overleven. Uit de resultaten blijkt dat infiltratie in het CZS geïnduceerd wordt na transfer van rustende myeline-actieve T-cellen tijdens de herstelfase in een EAE rat. Infiltratie en distributie na een transfer van *small particles of iron oxide* (SPIO) – gelabelde rustende myeline-actieve T-cellen tijdens herstel vindt plaats in de witte stof van de hersenen. Drie dagen na transfer wordt er proliferatie van getransfereerde rustende myeline-actieve T-cellen in het CZS waargenomen. De getransfereerde cellen worden slechts in geringe mate in celdood gedwongen drie dagen na transfer. Ook is een transfer van rustende myeline-actieve T-cellen tijdens herstel van een EAE rat nog in staat een relaps te induceren. Algemeen kan er geconcludeerd worden dat het CZS vatbaar is voor infiltratie en proliferatie van getransfereerde rustende myeline-actieve T-cellen tijdens herstel. Een laag aantal van deze getransfereerde cellen wordt in celdood gedwongen.

# 1. Inleiding

## 1.1 *Wat is multiple sclerose*

MS is een chronische inflammatoire aandoening van het CZS [1]. Daarbij worden oligodendrocyten en het myeline aangetast rond neuronen door geactiveerde autoreactieve T-cellen, waardoor neurongeleiding vermindert. Demyelinisatie kan gedeeltelijk hersteld worden door remyelinisatie. Axonschade is niet herstelbaar en is de voornaamste oorzaak van neurologische gebreken [2 – 4]. Klinische manifestaties van MS zijn: vermoeidheid, verminderde beweeglijkheid, mentale depressie, spierzwakte, psychische problemen en acute optische zenuwontsteking [5, 6].

## 1.2 *De incidentie en prevalentie van MS in Europa*

In Europa is MS de grootste oorzaak van niet-traumatische handicaps bij jonge volwassenen [7]. De totale prevalentie van MS voor de laatste dertig jaar is 83 personen per 100.000 personen, met een hogere schatting in noordelijk gelegen landen. De vrouw/man-ratio is nagenoeg 2,0 [7]. De hoogst geschatte prevalentie ratio's zijn voor mensen die zich bevinden in de leeftijdsgroep tussen 35 en 64 jaar. De incidentie wordt gemiddeld geschat op 4,3 personen per 100.000 personen per jaar [8].

## 1.3 *Vormen van MS*

Het ziektepatroon van MS is onderverdeeld in verschillende vormen. Bij 80% tot 85% van de MS-patiënten start de ziekte in een relapsing vorm, ook wel relapsing/remitting MS (RRMS) genoemd. Bij de overige 15 % tot 20% van de patiënten initieert de ziekte in een progressieve vorm, ook wel primaire progressieve MS genoemd (PPMS). In RRMS is de klinische uitkomst verschillend van patiënt tot patiënt, alsook de frequentie van herval en de snelheid van ziektevoortgang. De patiënten genezen gedeeltelijk tot volledig na iedere incidentie. Na enkele jaren kan RRMS verergeren in het progressieve patroon, ook wel secundaire progressieve MS (SPMS) genoemd. De tijd die nodig is om van RRMS naar SPMS over te gaan hangt af van de graad en het aantal hervallen. Bij RRMS is inflammatie de drijvende

kracht voor neuronaantasting, maar in de progressieve fase is er meer sprake van neurondegeneratieve processen [2, 9 – 12].

## **1.4 Pathogenese van MS**

MS is een chronische auto-immune aandoening waarbij autoreactieve T-cellen de bloed hersenbarrière (BHB) passeren, de myelineschede rond neuronen vernietigen en zo het CZS aantasten. De T-cellen en antilichamen richten zich specifiek tot het myeline dat zich rond neuronen bevindt, gepresenteerd door humaan leukocyt antigen (HLA) klasse II. MBP, myeline oligodendrocyt glycoproteïne (MOG) en proteolipide proteïne (PLP) zijn de voornaamste MS-antigenen [2, 13, 14].

De vermoedelijke oorzaak van deze ziekte valt mogelijk te verklaren door moleculaire mimicry. Moleculaire mimicry is een hypothese die de diverse pathologie en etiologie van MS kan verklaren. Er wordt van moleculaire mimicry gesproken als er peptides van virussen of bacteriën dezelfde sequentiële of structurele kenmerken vertonen met antigenen van het lichaam zelf [15]. Anders gezegd biedt moleculaire mimicry een kader over hoe kruisreactiviteit tussen antigenen van een virus of bacterie met een lichaamseigen T-celreceptor een auto-immune ziekte zou kunnen induceren [16]. Er is echter nog geen enkel bewijs dat één enkel virus of bacterie de oorzaak is van moleculaire mimicry [17]. Wucherpfenning en Strominger hebben aangetoond dat het CZS van MS-patiënten peptides van enkele virussen (het Epstein-Barr virus (EBV), herpes simplex virus, het cytomegalovirus, influenza virussen en papillomavirussen) en MBP dezelfde structuur vertonen zodat ze door dezelfde T-celreceptor herkend worden [18]. In 2002 toonde Lang en anderen aan dat peptides van het EBV en MBP, gepresenteerd door HLA moleculen, effectief herkend worden door eenzelfde T-celreceptor (TCR) [17].

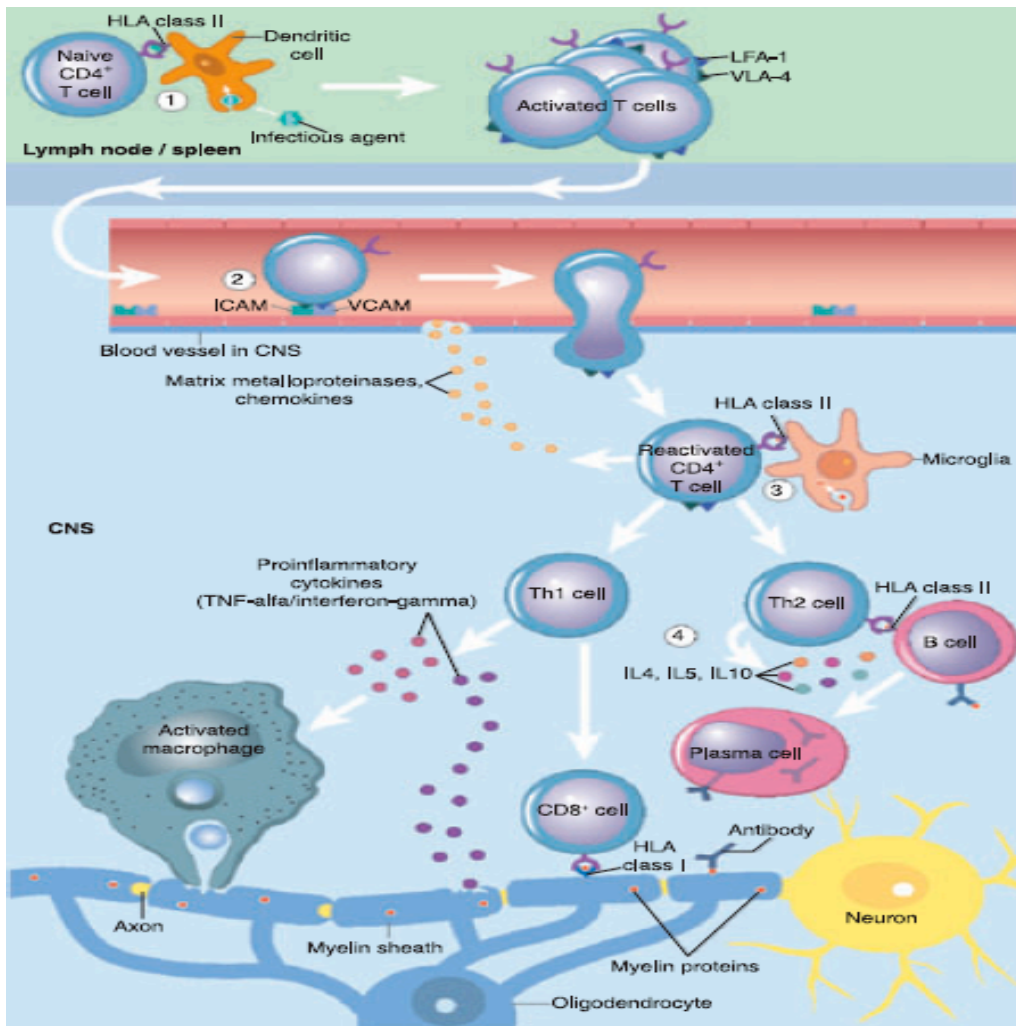
Antigenherkenning van het major histocompatibiliteitscomplex (MHC) II door een TCR leidt tot de vorming van een geactiveerde T-cel. Als de antigeenherkenning lichaamsspecifiek is spreekt men van een autoreactieve T-cel. De expressie van adhesiemoleculen en de vorming van matrix metalloproteïnases laat infiltratie van de hersenen toe door de BHB. Dat kan leiden tot een pro-inflammatoire immunerespons door antigenherkenning door een TCR. We spreken hier dan van een T-helper 1-reactie (Th1). De expressie van pro-inflammatoire cytokines (interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-2 en tumor necrose factor-bèta (TNF- $\beta$ )) wordt gepromoot. In MS overheerst de Th1-reactie. De pro-inflammatoire cytokines induceren een



proliferatie van de  $CD4^+$  Th1-cellen, die myeline kunnen aantasten samen met oligodendrocyten [9, 19 – 23].

In MS-laesies zijn alle cellen van het CZS een doel voor MHC I ( $CD8^+$ ) cytotoxische T-cellen. De hoeveelheid schade die ze induceren tegen het myeline, oligodendrocyten of axonen in MS-laesies is variabel. Dit hangt af van hoeveel en hoe goed de door MHC gepresenteerde peptiden herkend worden door de T-cellen, zodat celdood geïnduceerd kan worden. De  $CD8^+$  T-cellen domineren de laesies, ongeacht de activatie of het ziektestadium in verhouding met de  $CD4^+$  T-cellen [3, 10, 24].

De voornaamste factoren in de inductie en een overzicht van myelineschade worden weergegeven in figuur 1.



**Figuur 1.1:** Een overzicht van de inductie van myelineschade in MS. MHC II expressie, van een lichaamseigen myeline-proteïne, leidt tot de activatie van autoreactieve T-cellen. De expressie van adhesiemoleculen en de vorming van matrix metalloproteinases induceren infiltratie in de hersenen van autoreactieve T-cellen door de BHB. Hier matureren de cellen tot Th1 T-cellen. De gevormde Th1 cytokines induceren schade aan het myeline van oligodendrocyten [19].

Door de actief geïnduceerde demyelinisatie vermindert de zenuwgeleiding en wordt er een infiltratie met B-cellen opgewekt. De CD4<sup>+</sup> T-cellen induceren verder ook de expressie van macrofagen en microgiale cellen. Die cellen produceren vervolgens pro-inflammatoire cytokines zoals tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) en IFN- $\gamma$  [3, 14, 20].

De secundaire gevolgen van de productie van pro-inflammatoire cytokines zijn de vorming van reactieve zuurstofvormen en stikstofvormen, die op hun beurt geactiveerde complementcomponenten of proteolytische en lypolytische enzymen vrijzetten [9]. De activatie van het complementsysteem is echter niet specifiek voor enkel MS-patiënten [25]. Ook kunnen antilichamen, aan het oppervlak van de myelinelaag van neuronen of oligodendrocyten, demyelinisatie tegen antigenen induceren. Dat doen ze door complement-activatie waardoor meteen complement-gemedieerde cytolyse geïnduceerd wordt (= antilichaam afhankelijke celgemedieerde cytotoxiciteit (ADCC)).

Aangezien er verschillende mogelijke wegen zijn voor de degradatie van het myeline en de beschadiging van neuronen spreekt men van het heterogene ziektebeeld van MS [10, 22].

### **1.5 Demyelinisatie bij MS: het heterogene ziektebeeld**

H. Lassmann heeft het heterogene ziektebeeld van demyelinisatie in MS onderverdeeld in 4 patronen op basis van pathologie. Deze 4 patronen zijn (a) macrofaaggeassocieerde demyelinisatie, (b) antilichaam gemedieerde demyelinisatie, (c) distale oligodendrogliopathy en (d) de primaire oligodendrocytschade met secundaire demyelinisatie. In patroon (a) is demyelinisatie geïnduceerd door macrofaaggeassocieerde demyelinisatie. Voorbeelden van toxische macrofaagsecreten zijn TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , stikstofoxide (NO) en reactieve zuurstofvormen. Patroon (b), antilichaam gemedieerde demyelinisatie, ontstaat als er antilichamen tegen myeline proteïnen zoals MOG of MBP gevonden worden in MS-patiënten. Demyelinisatie wordt geïnduceerd door de interactie tussen encephalitogene T-cellen, verantwoordelijk voor inflammatie, en demyeliniserende anti-MOG antilichamen. Patroon (c), distale oligodendrogliopathy geassocieerde demyelinisatie, wordt gevonden in virusgeïnduceerde witte-stofziekten van zenuwen en hersenen. Het mechanisme van laesieformatie in dat patroon is vermoedelijk een T-celgemedieerde ontsteking van kleine bloedvaten met als gevolg ischemische schade aan de witte stof van axonen. Het laatste patroon (d), primaire oligodendrocytschade met secundaire demyelinisatie, is enkel vastgesteld geworden in PPMS. Het mechanisme van primaire oligodendrocytschade met secundaire demyelinisatie is niet bekend, maar het is vermoedelijk te wijten aan de

gevoeligheid van oligodendrocyten tegen inflammatoire mediators. Deze is ook het minst frequent voorkomend in MS-patiënten [2, 25].

Er is echter ook een tegenpool van demyelinisatie, remyelinisatie genaamd. De cytokines gesecreteerd door de Th2-cellen promoten remyelinisatie [26]. Dat doen ze door overleving, proliferatie en maturatie van oligodendrocyten te promoten [27]. Oligodendrocyt precursorcellen zijn ook in staat functionele neuronen en nieuwe myeline producerende oligodendrocyten aan te maken [12]. Het myeline rond de neuronen dient als bescherming van de neuronen [28]. Geremyeliniseerde plaques vertonen geen axonale vernietiging meer [2].

Als gevolg van gedemyeliniseerde plaques ontstaat er een verandering in de permeabiliteit van ion-kanalen waardoor de calciumhomeostase verstoord wordt in de axonen. Dat kan leiden tot de activatie van calciumafhankelijke proteasen, plaatselijke degradatie van het cytoskeletale elementen, blokkade van axonaal transport en uiteindelijk axonverstoring. De hoeveelheid axonale schade in MS-laesies is verschillend en afhankelijk van de graad van het inflammatoire proces tijdens het actieve demyeliniserende stadium [2, 29].

Om tot een beter inzicht te komen van MS wordt er onderzoek verricht op proefdieren. De meest geschikte proefdieren zijn muizen, ratten en apen. Die ontwikkelen echter niet spontaan MS. Daarom ondergaan ze enkele handelingen, die zorgen dat ze een gelijkaardig ziektepatroon vertonen als dat van MS-patiënten (= EAE).

## **1.6 Experimentele auto-immune encephalomyelitis**

Voor MS-onderzoek bestaan er een groot aantal EAE-modellen. De ziekte is zo divers dat er tot op heden nog geen enkel diermodel bestaat dat de complexiteit van MS volledig kan representeren. De ontwikkeling van MS komt bij proefdieren niet spontaan voor, daarom wordt EAE geïnduceerd door immunisatie met MBP, PLP of MOG. In deze stage wordt het Lewis ratmodel gebruikt waarbij immunisatie met MBP plaatsvindt. Niet alle proefdieren zijn even onderhevig aan EAE ontwikkeling door MBP immunisatie. BN ratten, C57BL/6 en BALB/C muizen dienen geïmmuniseerd te worden met MOG om EAE te ontwikkelen, omdat ze niet gevoelig zijn aan MBP. Muizen vereisen meerdere injecties om EAE te induceren [30]. EAE is een T-cel gemedieerde inflammatoire ziekte van het CZS met een variabele graad van demyelinatie en axonschade [31 – 33]. EAE inductie bij Lewis ratten geeft een acute paralytische ziekte. Een groot aantal mononucleaire cellen infiltreert het ruggenmerg, de hersenstam en de kleine hersenen. Een CD4<sup>+</sup> Th1 reactie wordt geïnduceerd [31]. Vanaf 10 dagen na immunisatie ontstaat er gewichtsafname gevolgd door een accumulatie van

neurologische afwijkingen [33]. De meeste dieren herstellen spontaan vanaf 15 dagen na immunisatie. Dit heeft als gevolg dat er resistentieontwikkeling optreedt tegen een volgende immunisatie [30].

## **1.7 Herstelmechanismen**

Het is algemeen geweten dat schade aan het CZS bij volwassen MS-patiënten onomkeerbaar is. De reden dat herstel onmogelijk is, is niet te wijten aan het feit dat ze niet de capaciteit hebben om schade aan hun CZS te genezen maar wel aan de omgeving, doordat die geconcentreerd is met pro-inflammatoire mediators. Het herstelmechanisme dat geactiveerd wordt is de vorming van littekenweefsels. Zo hoopt het CZS zich te beschermen tegen verdere schade. Een andere mogelijkheid is de migratie van oligodendrocyt precursor cellen, neurale precursor cellen of stamcellen die kunnen matureren in myeliniserende oligodendrocyten of functionele axonen [12].

Bij mensen initieert MS zich vaak in een relapsing/remitting vorm. Wanneer de graad van de symptomen in functie van de tijd uitgezet worden in een grafiek dan zou er een fluctuerend patroon waarneembaar zijn. De oorzaak van deze fluctuaties zijn nog niet bekend [9]. Bij acute EAE-proefdieren is er wel een volledig herstel. Dat herstelmechanisme is echter nog niet eenduidig. Cellen die T-cellen onderdrukken zijn aangetoond in spontaan herstellende ratten. Die cellen bleken CD4<sup>+</sup> T-cellen te zijn en werden aangetoond in de milt. Daar produceren ze anti-inflammatoire cytokines, zoals tumor groei factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-4 en IL-10. De productie van die cytokines leidt tot een reactie tegen de effector T-cellen die EAE induceren. CD8<sup>+</sup> T-cellen produceren ook TGF- $\beta$  in EAE. TGF- $\beta$  inhibeert de productie van IFN- $\gamma$  [34, 35].

Interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) wordt geproduceerd door dendritische cellen of microgliale cellen en macrofagen in de hersenen [36]. Het specifieke werkingsmechanisme is echter nog niet bekend. Men weet wel dat het verwerkingsmechanisme tijdens herstel in te delen is in drie functies. Ten eerste onderdrukt IFN- $\beta$  de expressie van pro-inflammatoire cytokines zoals TNF en IFN- $\gamma$ . Ten tweede induceert IFN- $\beta$  een Th2 promotie en ten derde vermindert IFN- $\beta$  de BHB permeabiliteit. De productie van die cytokines duidt op een initiatie van een Th2-reactie. Hierdoor wordt de mogelijkheid om een pro-inflammatoire (Th1) reactie te induceren onderdrukt en wordt herstel van MS geïnduceerd. Een defect in de Th2 respons kan daardoor ook leiden tot relaps. Een andere hypothese is dat effector cellen door apoptose geëlimineerd worden van het CZS of door de expressie van caspase 3 [37]. Celdood wordt

ook geïnduceerd in oligodendrocyten. Bij MS hebben die cellen een verhoogde fas-expressie. Als die in contact komt met zijn fas-ligand wordt apoptose geïnduceerd. Daardoor wordt oligodendrocytschade en demyelinisatie van neuronen gepromoot [38]. Inhibitie van die mechanismen kan zo herstel verwezenlijken in het ziektepatroon [34, 35].

## 1.8 Celtracering

Er worden nu enkele methodes uitgelegd die het terug opsporen van getransfereerde cellen mogelijk maken.

### 1.8.1 Fluorescentie

Fluorescentie is een veel gebruikte methode om cellen op te sporen in EAE na transfer. Er is een heel gamma van celmerkers op de markt met elk hun eigenschappen. In EAE infiltreren de getransfereerde cellen het CZS en de immunologische organen. Die organen worden onderzocht om de getransfereerde cellen terug op te sporen met behulp van een fluorescent geactiveerde celsorteerder (FACS).

#### 1.8.1.1 Green fluorescent protein

Flügel et al. en F. Odoardi et al. onderzochten de migratie en de functie van intra-peritoneaal getransfereerde auto-immune CD4<sup>+</sup> T-cellen tijdens EAE [39, 40]. Daarvoor gebruikten ze geen fluorescente merker, maar een gen dat bij transgene expressie *green fluorescent protein* (GFP) vrijzet. GFP interfereert niet met de encephalitogene functie van de T-cellen. De hoeveelheid geproduceerd GFP is direct gerelateerd aan de activatiegraad. Dat heeft wel als nadeel dat celdood niet te onderscheiden is van de T-cellen die naar een rustend stadium overgaan. Daarvoor werd een T-cel populatie geanalyseerd met behulp van kwantitatieve polymerase kettingreactie (qPCR). Het retrovirale T-cel transgen in genomisch DNA van verschillende organen werd onderzocht. De resultaten van de PCR en FACS gaven vergelijkbare resultaten [39, 40].

GFP is dus een geschikt gen om de migratie en functie van getransfereerde T-cellen te onderzoeken. Een nadeel van die techniek is de controle die uitgevoerd moet worden met qPCR [39].

### 1.8.1.2 5,6-carboxy-succinimidyl-fluorescein-ester

Met behulp van 5,6-carboxy-succinimidyl-fluorescein-ester (CFSE) kan celvisualisatie verwezenlijkt worden. Oudere studies gebruiken radioactief gemerkte cellen (de  $^{51}\text{Cr}$  vrijzetting assay), maar omwille van de risico's voor besmetting van de onderzoeker en het milieu zijn die gedaald in gebruik. Andere voordelen van CFSE zijn: de mogelijkheid om alle populaties van cellen te merken; de celbinding is stabiel zodat langdurige experimenten ook uitgevoerd kunnen worden; en het is een niet-toxische stof die niet interfereert met de intracellulaire cascade. Die eigenschappen maken van CFSE een uitstekende merker die na celdeling nog detecteerbaar blijft [41]. Er kan dus in het algemeen gesteld worden dat CFSE een geschikte merker is om T-cellen te merken en ze vervolgens terug op te sporen [42]. Daardoor kan de aanwezigheid en de celdeling achterhaald worden. Visualisatie van intraveneus getransfereerde T-cellen is een methode die Song et al. gebruikt hebben en is ook interessant in MS-onderzoek [43]. De cellulaire concentratie van CFSE wordt gehalveerd na iedere deling tot acht à tien delingen. De cellen worden dan gemeten door een flowcytometrische bepaling, genaamd FACS [44].

### 1.8.1.3 7-amoni actinomycin

Lecoeur et al. gebruiken in combinatie met CFSE ook nog een apoptose-merker, 7-amoni actinomycine (7-AAD), om de viabiliteit te bepalen van de cellen [41]. Die merker kan ook weer bepaald worden door FACS omdat ze aan het desoxyribose nucleïne zuur van de cel bindt. Daardoor kunnen ook langdurige experimenten uitgevoerd worden. De merker wordt uitgesloten in intacte cellen. Echter, in apoptotische cellen kan ze wel in de celkern geraken en binden aan het DNA. Dat komt doordat het celmembraan meer permeabel is geworden [45, 46].

## 1.8.2 Bioluminescente beeldvorming

Bioluminescente beeldvorming (BLI) is een techniek die specifiek gebruikt wordt voor het bestuderen van kleine proefdieren die licht uitzenden. BLI laat toe cellen direct op te sporen in levende proefdieren, ook  $\text{CD4}^+$  T-cellen [47]. Het emissielicht van de merker wordt door het weefsel waargenomen omdat het proefdier klein is. De intensiteit van het emissielicht van BLI is echter aanzienlijk lager dan dat van fluorescentie technieken, zoals hierboven vermeld.

Daarvoor wordt gebruikgemaakt van een speciale camera en een enzym-indicator. Een voorbeeld daarvan is luciferase. Luciferase zendt enkel licht uit als deze contact maakt met luciferine. Het grote voordeel van de vorming van een emissielicht met een lage intensiteit is dat hierdoor geen achtergrondfluorescentie waargenomen kan worden, omdat enkel de luciferase-emissie gedetecteerd wordt [48].

### **1.8.3 Magnetische Resonantie Beeldvorming**

Magnetische Resonantie Beeldvorming (MRI) is een beeldvormingstechniek die het onderscheid tussen de verschillende weefsels weergeeft en onderzoek van zachte en harde weefsels te verrichten zonder stralingsgevaar. Het migratiepatroon van met SPIO-gemerkte T-lymfocyten kan op die manier achterhaald worden [49].

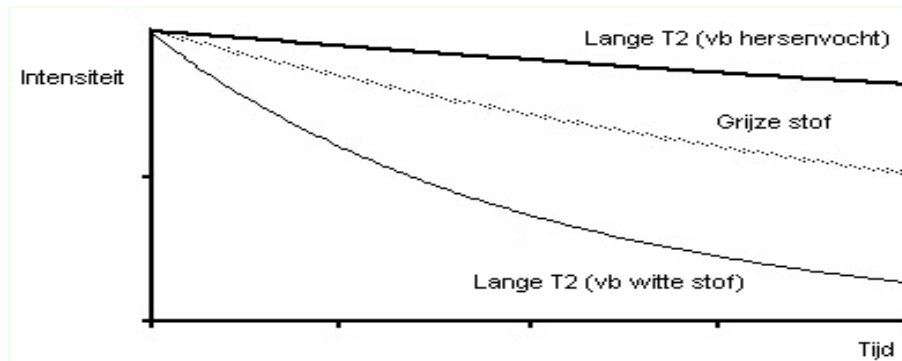
#### **1.8.3.1 Principe**

MRI is gebaseerd op de magnetische eigenschappen van waterstof-atoomkernen die in staat zijn kleine radiofrequentie energiepakketten (hv) op te nemen en af te geven. Dat proces heet magnetische weefselresonantie. De straling van de radiozender wordt opgenomen door de weefsels in de MRI, die vervolgens terug afgegeven wordt gedurende magnetische relaxatieprocessen. Er wordt een uitwisseling van kleine hv geïnduceerd, die verschillende energietoestanden kunnen innemen. Voor MRI worden enkel de magnetische eigenschappen van de kern van het waterstofatoom gebruikt. De kern kan met zijn magnetisch spinquantumgetal ( $I = \frac{1}{2}$ ) slechts twee energietoestanden aannemen. Het zijn voornamelijk de fysisch gerichte interacties die bepalen hoeveel en hoe gestructureerd het water in de weefsels ingebouwd is zoals waterbruggen, elektrostatische ionaire en dipolaire interacties, de elektrodynamische Van der Waals interacties en de hydrofobe interacties [49].

#### **1.8.3.2 Eigenschappen van het weefsel gebruikt voor detectie**

Het soort magnetisch relaxatieproces van weefsels dat veel gebruikt wordt voor MS-onderzoek is de transversale relaxatie of T<sub>2</sub>- of spin-spin relaxatie. Die relaxatie is een gevolg van de uitwisseling van spinquanta tussen naburige atoomdeeltjes. Er wordt geen verandering van het totale aantal “up”- en “down”- spins geïnduceerd. Die relaxatie is eveneens afhankelijk van de snelheid van de naburige magneetdipolen. Hoe sneller ze

bewegen, hoe minder snel de transversale relaxatie vermindert. De magneetdipolen van sterk gestructureerde weefsels hebben een kleinere snelheid. De transversale relaxatie vermindert dus aanzienlijk. Mobiel water heeft een lange T<sub>2</sub>-relaxatie. Een grafiek die de intensiteit in functie van de tijd van een T<sub>2</sub>-relaxatie weergeeft staat gerepresenteerd in figuur 2 [49].



Figuur 1.2: De intensiteit in functie van tijd van een T<sub>2</sub>-relaxatie [50].

### 1.8.3.3 Beeldvorming

Het elektromagnetische signaal van het weefsel wordt omgezet in de ontvanger en in functie van de tijd opgeslagen door middel van een ADC (Analoog naar Digitaal Converter). Na Fourier Transformatie (FT) wordt het signaal omgezet in een twee-dimensioneel of drie-dimensioneel morfologisch beeld [49].

## 1.9 Het gebruik van MRI in MS.

Het passeren van T-cellen langs de BHB is een cruciale stap in de ontwikkeling van MS. Daardoor wordt het inflammatoire proces opgestart in het CZS. Daarom is het voor wetenschappelijk onderzoek interessant om die migratie te detecteren.

Anderson et al. gebruiken lymfeknoop celculturen die gevoelig gemaakt zijn met het antigeen PLP 139-151. Die werden geïncubeerd met ferumoxide: SPIO nanopartikels, omgeven door een dextroselaag. Alvorens de SPIO-partikels echter in de cel kunnen geraken, dient eerst gezorgd te worden dat de negatieve lading van de partikels en die van het celmembraan veranderen. Daarvoor voegen ze poly-L-lysine (PLL) toe aan de SPIO-partikels [13]. De SPIO partikels vormen complexen van ferumoxide-getransfekteerde stoffen (FE-TA). Die complexen worden geïnternaliseerd in de cellen door endocytose en getransporteerd naar de endosomen of lysosomen in de cel [51]. Vervolgens worden de cellen door adoptieve transfer naar een gezonde muis getransfereerd om EAE te induceren. De SPIO-partikels worden op het MRI-beeld waargenomen als zeer donkere vlekken. Deze verkleuring is een resultaat van een verkorting van de T<sub>2</sub> [13].



Om te controleren of de SPIO partikels in de cellen aanwezig zijn kan een Prussian Blue kleuring gedaan worden. De kleurstof bindt op de ijzer (Fe)-partikels in de cellen. De SPIO-lading van de cellen is gelukt als de cellen een blauw uitzicht vertonen [51].

### **1.10 Doel van het project**

Het doel van dit project was het verkrijgen van een beter inzicht in de status en de eigenschappen van rustende myeline-reactieve T-cellen tijdens de herstelfase in EAE.

Eerst werd het infiltratiepatroon in het CZS tijdens herstel bij een EAE rat van rustende myeline-reactieve T-cellen bepaald. De infiltratiebepaling werd onderzocht door de getransfereerde cellen te merken met CFSE, zodat ze gedetecteerd konden worden met behulp van flowcytometrische analyse. Als controle hierop werd ook een transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen uitgevoerd op een gezond dier. Een tweede benadering voor de bepaling van infiltratie, alsook een bepaling voor de distributie, was de analyse door middel van MRI. Hierbij werden de te transfereren cellen gelabeld met SPIO, in plaats van met CFSE. Als er eenmaal voldoende bewijs van infiltratie was, werd er nagegaan of de getransfereerde cellen konden prolifereren in de organen. De proliferatiebepaling gebeurde door middel van een CFSE-concentratiebepaling die vergeleken werd met het totale aantal orgaancellen. Wanneer proliferatie van de cellen in de organen bevestigd was, kon er onderzocht worden of de getransfereerde cellen in de organen in leven bleven. Dat werd verwezenlijkt door een flowcytometrische analyse van de doelorganen, die gemerkt waren met een celdood-merker, 7-AAD genaamd. De bepaling werd drie dagen na transfer uitgevoerd. Indien de cellen wel degelijk in leven bleven werd er ook tevens onderzoek gedaan naar het effect van de transfer op de “*host derived*” T-lymfocyten. Daarbij werd een flowcytometrische analyse uitgevoerd op de niet CFSE-positieve T-lymfocyten in de organen. Om het immuunsysteem van de rat de tijd te geven om eventueel te reageren werd de analyse pas 3 dagen na transfer uitgevoerd. Als laatste werd er bepaald wat het ziektepatroon was van de transfer op het gewicht en de neurologische defecten van drie ratten.

Als algemeen doel van dit onderzoek kan gesteld worden dat deze verhandeling fundamentele inzichten over de immunologische mechanismen betrokken bij het herstelmecanisme in EAE kan bekendmaken.

## **2. Materialen en methoden**

### **2.1 Proefdieren**

De gebruikte Lewis ratten waren aangekocht bij de firma Harlan Nederland B.V. (Horst). In deze experimenten werden enkel de vrouwelijke ratten van 6 tot 8 weken oud gebruikt.

### **2.2 Bereiding ratserum**

Rattenbloed werd opgevangen in een stollingsbuis (Greiner bio – one GmbH, Duitsland) na decapitatie. Dat werd 2 uur geïncubeerd op kamertemperatuur zodat het bloed kon stollen. Na stolling werd het bloed 10 minuten gecentrifugeerd op 3000 rotaties per minuut (rpm), zodat het ratserum (RS) afgenomen kon worden en gedurende 30 minuten op 56 graden Celsius (°C) kon incuberen. Die incubatie is nodig om een inactivatie van de eiwitten in het serum te verwezenlijken. Na die stappen werd het RS gefilterd (VWR™, België of MILLEX® GS, Ierland) en ingevroren op -20°C.

### **2.3 Medium samenstellingen**

Het compleet medium bestond uit RPMI-medium (Invitrogen™, België), dat werd aangelengd met 50 µM mercaptoethanol (Sigma®, USA), 100 units/ml penicilline (Gibco/BRL, USA) en 100 µg/ml streptomycine (Gibco/BRL, USA).

Het groeimedium werd bereid met compleet medium, 10% feutaal kalfserum (FCS) (Hyclone, USA), 1% natriumpyruvaat (NaPyr) (Invitrogen™, België) en 1% niet-essentiële aminozuren (NAZ) (Invitrogen™, België).

Het stimulatiemedium bestond uit compleet medium met 1% NaPyr, 1% NAZ en 2% RS. Indien nodig werd hieraan nog 0,03 mg/ml ovalbumen (OVA) (Sigma®, USA) of MBP aan toegevoegd tijdens de protocoluitvoering, indien nodig.

De exacte eiwitconcentratie werd bepaald volgens de BCA™ protein assay kit van Pierce, USA.

## **2.4 Thymus isolatie**

Na steriele isolatie van de thymus werd die door een zeef gehaald met PBS. Na centrifugatie, gedurende 10 minuten op 1400 rpm, werden de cellen opgelost in compleet medium.

## **2.5 Interleukine –2 productie**

Na isolatie van de milt werd die door een zeef gehaald met PBS. Na 10 minuten op 1400 rpm centrifugeren werd de pellet opgelost in 6 ml compleet medium en op 5 ml Ficoll (Sigma<sup>®</sup>, USA) gebracht. Na 20 minuten warme centrifugatie zonder rem op 1800 rpm werden de witte bloedcellen, die zich als een ring op de Ficoll bevonden, geïsoleerd. De geïsoleerde cellen werden aangelengd met compleet medium en gecentrifugeerd gedurende 10 minuten op 1400 rpm. De bekomen pellet werd opgelost in 12 ml compleet medium, voor telling met behulp van een telraam (Marienfeld, Duitsland) en trypaan blauw (Biochrom AG, Duitsland). Wanneer het aantal cellen gekend was werden ze geresuspendeerd in groeimedium, zodat de concentratie aan miltcellen  $2 \cdot 10^6$  per ml bedroeg. Daarbij werd nog 1/2000 Concanavalin A (Con A) (SIGMA<sup>®</sup>, USA) toegevoegd. Na 48u incubatie op 37°C in een broedstov kon het IL-2 geïsoleerd worden door de celoplossing 10 minuten te centrifugeren op 3000 rpm en door te filteren. Het filtraat werd gealiquoteerd in 15 ml falconbuizen (Greiner Bio – one GmbH, Duitsland), gevuld met 10 ml filtraat en ingevroren op -20°C.

## **2.6 Immunisatie**

Voor immunisatie van een rat werd een injectievloeistof bereid. 100 à 130 µl van de MBP–injectievloeistof werd in iedere achterpoot subcutaan ingespoten. De samenstelling bestond uit 17,5 µl PBS, 12,5 µl mycobacteriën (BD Biosciences, Zweden), 10 µl MBP en 60 µl compleet adjuvants (Sigma<sup>®</sup>, USA). Voor OVA–immunisatie werd dezelfde hoeveelheid genomen als voor MBP immunisatie.

Om de graad van de neurologische afwijkingen te weten werd er een score (van 0 tot en met 5) toegekend aan de graad van verlamming. Score 0 werd gegeven aan gezonde dieren, score 1 betekende dat het dier staartverlamming had, score 2 stond voor staartverlamming en achterpoot verstoring, score 3 stond voor volledige verlamming van de staart en achterpoten,

score 4 stond voor verlamming van staart en alle ledematen en score 5 stond tenslotte voor sterfte van het proefdier [40].

## **2.7 Kweek van rustende T-lymfocyten**

9 dagen na immunisatie werd gestart met het opofferen van de rat zodat beide inguinale en popluteale lymfeknopen geëxtraheerd konden worden. De geïsoleerde lymfeknopen werden in een 15 ml falconbuis gebracht met een hoeveelheid PBS. Het overtollige vet dat nog aan de lymfeknopen hing werd zo goed mogelijk verwijderd. Vervolgens werden de lymfeknopen door een zeef gehaald. De bekomen celsuspensie werd éénmaal gewassen met compleet medium.

Er werden  $2,8 \cdot 10^6$  cellen apart gehouden voor de proliferatie-assay.

De cellen werden opgelost in stimulatiemedium aan een dichtheid van  $40 \cdot 10^6$  cellen per 6 ml. Het totale volume werd in kleine petrischaaltjes (Nunclan<sup>TM</sup>, Denemarken) van 6 milliliter gedaan.

Na 48 uur incubatie op 37°C werden de cellen losgeschraapt uit de petrischaal. Na centrifugatie werd de celpellet opgelost in groeimedium aan een dichtheid van  $1,5 \cdot 10^6$  per ml met nog 6,5 % CAS. Daarna werd het medium onderverdeeld in grote petrischalen (Nunclan<sup>TM</sup>, Denemarken), telkens 10 ml celsuspensie per schaal.

Na 24 uur incubatie op 37°C werd het supernatants verwijderd. Het nieuwe groeimedium werd op 37°C gebracht. Vervolgens werd het oude groeimedium uit de grote petrischalen gezogen en 10 minuten gecentrifugeerd op 1400 rpm. De celpellets werden opgelost in het nieuwe warm medium en onderverdeeld in de reeds gebruikte petrischalen.

## **2.8 CFSE labeling**

Na 3 dagen incubatie op 37°C werden rustende cellen 10 minuten gecentrifugeerd op 1400 rpm. Het medium werd afgenomen en de cellen opgelost in 15 ml PBS zodat ze geteld konden worden.

Dertig µl van de 15 ml werd apart gehouden voor CD3 PE (BD Biosciences, Zweden) en CD25 FITC (BD Biosciences, Zweden) bepaling met behulp van flowcytometrische analyse (Caliber BD Bioscience, Zweden). Daarmee werd de activatiegraad bepaald.

Na centrifugatie werden de cellen, bij een dichtheid van  $20 \cdot 10^6$  cellen per ml, opgelost en dit in een 0,1% *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Biological, USA) – PBS oplossing. Een gelijke

hoeveelheid PBS werd op een concentratie gebracht van 6,5  $\mu\text{M}$  CFSE (Invitrogen<sup>TM</sup>, België), voor een flowcytometrische analyse na één dag. Om een flowcytometrische analyse uit te kunnen voeren na drie dagen, werd het PBS op een concentratie van 8  $\mu\text{M}$  CFSE gebracht. De celoplossing en de PBS met CFSE werden samengevoegd en 7 minuten op 37°C in de broedstoof geplaatst. Na centrifugatie werd de celpellet opgelost in 1 ml 2 % RS in PBS en voor 15 minuten in de broedstoof geplaatst op 37 °C. Vervolgens werd de oplossing aangelengd met PBS en 2 maal gewassen. Uiteindelijk dienen de cellen op een concentratie gebracht te worden van  $120 \cdot 10^6$  cellen per ml. Daarvan werd nog een fractie genomen voor de proliferatie-assay.  $100 \cdot 10^6$  cellen werden intraveneus ingespoten in de staart van een geïmmuniseerde rat. De ratten werd 11 of 16 dagen voordien geïmmuniseerd zodat ze zich op het moment van transfer respectievelijk in de onset of herstelfase bevonden.

## **2.9 Proliferatie-assays**

### **2.9.1 Nul stimulatie**

Bij de nul stimulatie (= lymfeknoop isolatie) werden vierhonderdduizend lymfocytcellen in een well van een 96-wellplaat gebracht met stimulatiedium. MBP of OVA werd enkel toegevoegd aan 3 van de 6 welltjes. Ze waren de gestimuleerde celsamples. De welltjes waar geen antigeen aan toegevoegd was fungeerden als niet-gestimuleerde celsamples. Na 2 dagen incubatie op 37°C werd 1  $\mu\text{Ci}$  / well methyl  $\text{H}^3$ -thymidine (GE Healthcare, Amersham) toegevoegd. Na 16 uur incubatie werden de welltjes geoogst met behulp van een harvester (Wallac, Engeland) en een bètaplate suit teller (Wallac, Engeland).

### **2.9.2 Eerste stimulatie**

Bij de eerste stimulatie (= transfer) werden vierhonderdduizend thymocyten en  $1,5 \cdot 10^5$  rustende T-lymfocyten in een well van een 96-wellplaat gebracht met stimulatiedium. Vervolgens werd er analoog gewerkt als in de nul stimulatie.

## **2.10 Flowcytometrische analyse**

Na het wegen en het scoren van de rat(ten) werd een overmaat nembutal (Ceva, België) intra peritoneaal toegediend voor perfusie met PBS. Tijdens de perfusie werd bloed met een spuit

opgevangen en in een anti-stollingsbuis (Venglet<sup>®</sup>; VT – 1005H2 lithium – heparin, België) gebracht. Eenmaal wanneer het dier geperfuseerd was konden de organen (hersenen, ruggenmerg, milt, oppervlakkige cervicale lymfeknopen (LN cv opp), diepe cervicale lymfeknopen (LN cv diep) en de perifere lymfeknopen) uit het dier gehaald worden en in een kleine falconbuis gevuld met PBS gebracht worden. De organen werden door een zeef gehaald met een weinig PBS. De bekomen cellen van de lymfeknopen werden in een kleine hoeveelheid opgelost met PBS en overgebracht in een facs-plaat (Greiner Bio-one GmbH, Duitsland). De andere celpellets werden opgelost in PBS. Van het staal van de hersenen, ruggenmerg, milt en bloed werd een hoeveelheid opgevangen voor directe flowcytometrische analyse. Na centrifugatie van de orgaanstalen werd de miltpellet opgelost in 6 ml PBS evenals het bloed. Dit geheel werd elk op 5 ml ficoll gebracht. De celpellet van de hersenen en ruggenmerg werden toegevoegd aan een 37% percoll-oplossing (Amersham Biosciences, Zweden). Die 3 stalen werden op 70% percoll gebracht en 27 minuten gecentrifugeerd op 600 *relative centrifugal force*. De celring gelegen op de ficoll en 70% percoll werden geïsoleerd en terug opgelost in 14 ml PBS. Na 10 minuten centrifugatie op 1400 rpm werden de celpellets met een kleine hoeveelheid PBS in een facs-plaat gebracht en aangelengd met facs-buffer zodat de celsuspensie minimum 100 µl bedroeg. De facs-plaat werd tweemaal gewassen met 120 µl FACS-buffer en 5 minuten centrifugeerd op 4 °C op 2000 rpm. Om 1 dag na transfer te kunnen analyseren werd TCR Per CP en CD25 PE of CD3 PE en CD25 FITC toegevoegd na het wassen. Of 7-AAD en Anti-CD3 werden toegevoegd voor analyse 3 dagen na transfer. De plaat werd op 4°C in het donker geplaatst en dit gedurende 20 minuten. Vervolgens werden de welletjes tweemaal gewassen met 120 µl PBS en 5 minuten centrifugeerd op 2000 rpm om daarna overgebracht te worden in een facs-buisje voor analyse in het facs-apparaat. De vier stalen die zich al in een facs-buisje bevonden dienden eerst door een zeef gehaald te worden, om verstopping van het facs-apparaat te voorkomen.

### **2.11 Cellen fixeren**

Als eerste werden de cellen 2 à 3 maal gewassen met PBS. Vervolgens werden glaasjes gecoat met PLL (Sigma<sup>®</sup>, USA) die 1/10 verdund was met H<sub>2</sub>O. Na 30 minuten wachten werden de glaasjes afgespoeld met water. Als de glaasjes droog waren werden er op ieder glaasje  $2 \cdot 10^6$  cellen gebracht die zich bevonden in een druppel met een volume van 100 µl. Na 60 minuten drogen werd er 300 µl 4% Paraformaldehyde (PFA) aangebracht. Na 5 à 15 minuten incuberen van dit geheel werd de PFA afgespoeld met PBS.

## **2.12 IJzerkleuring volgens Perls**

Voor de ijzerkleuring volgens Perls werd 5 gram aluminiumsulfaat 5% vijf minuten gekookt. Vervolgens werd 100 mg kernechtrood (Sigma<sup>®</sup>, USA) toegevoegd. Na afkoeling werd de oplossing gefilterd. Het paraffine dat op de celglasjes lag werd weggespoeld door vijfmaal te spoelen met gedestilleerd water gedurende vijf minuten. Tijdens het wassen werd in een zuurkast een oplossing van 4% HCl en een oplossing van 4% kalium ferrocyanide in gelijke delen gemaakt. Die oplossing werd gedruppeld op de coupe en gedurende 60 minuten geïncubeerd. Na driemaal te spoelen met gedestilleerd water gedurende twee minuten werd het bereide kernechtrood op de coupe gebracht. Na vijf minuten incubatie werd weer gespoeld met gedestilleerd water, gedehydrateerd met xyleen zodat het ingesloten wordt. De bekomen coupe kon bekeken worden onder een lichtmicroscop.

## **2.13 SPIO – labeling en transfer**

Na drie dagen incubatie op 37°C werden de cellen van de petrischalen geschraapt en in een 50 ml falconbuis gebracht. Na 10 minuten centrifugatie op 1400 rpm werd het medium afgenomen en werden de cellen opgelost in 15 ml PBS zodat ze geteld konden worden. Vervolgens werden de cellen opgelost in groeimedium (met 10 % extra FCS) aan een dichtheid van  $4 \cdot 10^6$  cellen per ml. In iedere gebruikte petrischaal werd vervolgens 5 ml van deze oplossing gebracht. De andere 5 ml die in de petrischaal gebracht werd bevatte goed opgelost groeimedium zonder FCS, maar wel met 56 µl SPIO per ml en 2 µl PLL per ml oplossing. Na toevoeging van deze oplossing werden de petrischalen overnacht gehouden op 37°C.

De transfer van SPIO-gemerkte cellen gebeurde analoog als voorheen beschreven stond voor rustende T-lymfocyten. Het enige verschil is dat hier geen CFSE-merking uitgevoerd diende te worden. Ze werden enkel geteld en tweemaal gewassen in PBS.

### 3. Resultaten

De bekomen resultaten van het onderzoek worden ingedeeld in 6 verschillende punten. In die 6 punten wordt er getracht het herstelmechanisme bij EAE ratten te verduidelijken. Als eerste wordt een transfer uitgevoerd in EAE ratten en een gezonde rat met CFSE-gelabelde myeline-actieve T-cellen tijdens herstel. Hierdoor kan het infiltratiepatroon van de getransfereerde cellen bepaald worden in een EAE en een gezonde rat. Één dag na transfer wordt vervolgens de infiltratie van de getransfereerde cellen bepaald, alsook de distributie, bepaald met behulp van MRI en dit tijdens herstel en bij onset. Daarvoor worden de te transfereren myeline-actieve T-cellen gelabeld met SPIO. Eenmaal er voldoende bewijs is van infiltratie van myeline-actieve T-cellen, wordt van die cellen de proliferatie bepaald. Een transfer van CFSE-gelabelde myeline-actieve T-cellen wordt uitgevoerd in een EAE rat tijdens herstel of bij onset. Drie dagen later worden deze CFSE-gelabelde cellen terug opgespoord en geanalyseerd met behulp van een flowcytometrische analyse. Daarna wordt nog onderzoek gedaan of de getransfereerde en de “*host derived*” T-cellen 3 dagen na transfer in celdood gedwongen worden in de organen. Als laatste wordt er bepaald of een transfer van myeline-actieve T-cellen leidt tot een nieuwe ziekte-inductie bij een EAE rat tijdens herstel.

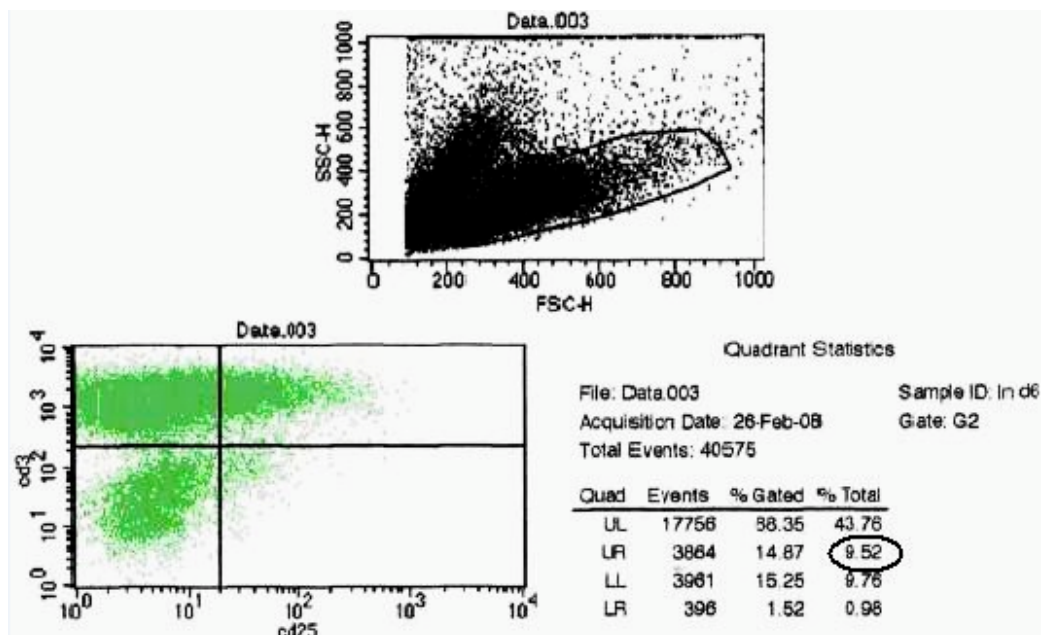
#### 3.1 Karakterisatie van rustende myeline-actieve T-cellen

Voor elke transfer wordt een proliferatie-assay uitgevoerd. Dat gebeurt om te achterhalen of de myeline-actieve T-cellen voldoende antigeenreactief zijn om de transfer te kunnen uitvoeren. Als bewijs dat de myeline-actieve T-cellen voldoende antigeenreactief zijn, worden de gemiddelde counts/min van 3 celsamples lymfocyten die niet gestimuleerd worden met antigeen en van 3 celsamples lymfocyten die wel gestimuleerd worden met antigeen bepaald. Als de ratio van het gemiddelde van de antigeen-gestimuleerde cellen over de niet-gestimuleerde cellen groter of gelijk aan 3 is, wijst dat op voldoende antigeenreactiviteit.

Aangezien er onderzoek gedaan wordt naar het herstelmechanisme bij transfer van rustende myeline-actieve T-cellen tijdens herstel bij EAE, wordt vóór de transfer eerst nog het percentage geactiveerde cellen bepaald. Dat wordt verwezenlijkt met behulp van een flowcytometrische analyse. Daarvoor wordt aan de T-lymfocyten een anti CD 25 en anti CD3 antilichaam toegevoegd. Er wordt maximum een activatiegraad van 10% van de te transfereren cellen toegelaten. Een voorbeeld van een activatiegraad van een transfer van myeline-



reactieve T-cellen is 9,52%. Dat wijst erop dat 9,52% van de te transfereren cellen nog actief zijn. De output van de analyse is weergegeven in figuur 3.1.



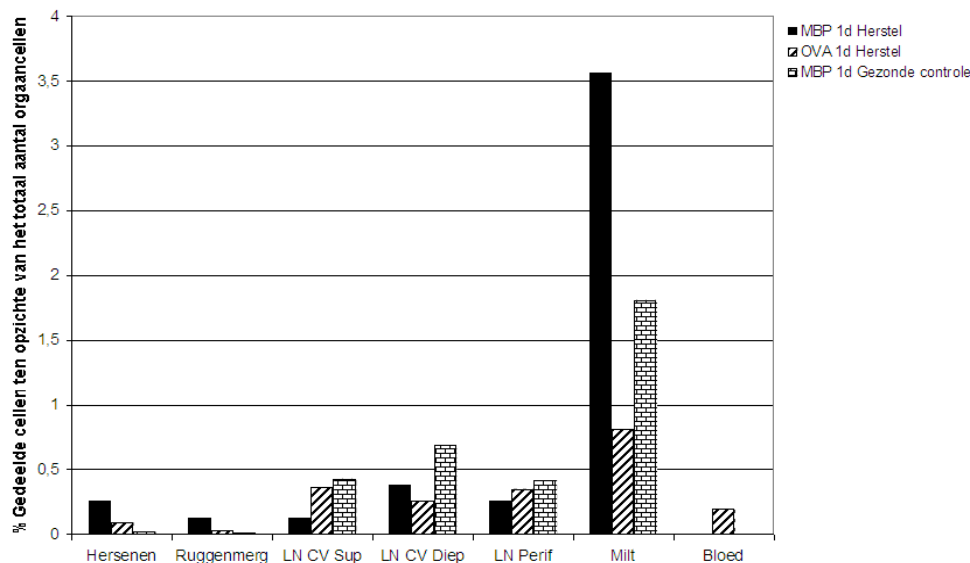
**Figuur 3.1:** Een voorbeeld van de verkregen flowcytometrische output van de activatiegraad bepaling met behulp van anti CD25 en anti CD3 van myeline-reactieve T-cellen voor transfer. Het percentage geactiveerde myeline-reactieve T-cellen ten opzichte van het totaal aantal getransfereerde myeline-reactieve T-cellen is 9,52%. Dat wil zeggen dat 9,52% van de te transfereren cellen nog actief zijn. De maximum toegelaten activatiegraad is 10%, dus die cellen zijn voldoende rustend voor transfer. Het bekomen percentage is eveneens omcirkeld in de figuur.

### 3.2 De bepaling van celinfiltratie in de organen van de getransfereerde cellen

Het percentage getransfereerde cellen in de hersenen, ruggenmerg, oppervlakkige, diepe cervicale lymfeknopen, perifere lymfeknopen, milt en bloed wordt één dag na transfer achterhaald met behulp van een flowcytometrische analyse. Gecultiveerde autoreactieve T-cellen tegen MBP worden met CFSE gemerkt en intraveneus toegediend. De transfer wordt uitgevoerd vanaf het moment dat de 90 % of meer van cellen zich in een rustend stadium bevinden en de ratten zich in de herstelfase bevinden. Ook wordt een transfer van rustende OVA-reactieve T-cellen tijdens herstel uitgevoerd. Rustende OVA-reactieve T-cellen worden gekozen om een vergelijking te maken met rustende myeline-reactieve T-cellen. Dat wordt gedaan omdat de OVA-reactieve cellen antigeenspecifiek zijn tegen een antigeen dat zich

niet in de rat bevindt. Dat maakt ze geschikt als controle voor de myeline-reactieve T-cellen voor de bepaling van celinfiltratie. Als tweede controle wordt een transfer van myeline-reactieve T-cellen in een gezonde rat uitgevoerd. Daarbij wordt nagegaan of rustende myeline-reactieve T-cellen de BHB van een gezonde rat niet kunnen infiltreren. Met behulp van flowcytometrische analyse wordt er gegated op CFSE positieve myeline-reactieve T-cellen.

De verkregen data zijn samengezet in figuur 3.2. Na transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen tijdens herstel in een EAE dier kan besloten worden dat het grootste relatieve percentage myeline-reactieve T-cellen in het CZS aanwezig zijn, in verhouding met het totaal aantal orgaancellen. De bekomen relatieve percentages zijn voor een myeline-reactieve T-celtransfer één dag na transfer tijdens herstel voor de hersenen en het ruggenmerg respectievelijk 0,26 % en 0,13 %. De percentages voor een OVA-reactieve T-celtransfer op één dag na transfer zijn voor de hersenen en ruggenmerg respectievelijk 0,09% en 0,03%. Daaruit kan besloten worden dat het percentage infiltratie van de getransfereerde myeline-reactieve T-cellen in het CZS tijdens herstel hoger is dan bij de getransfereerde OVA-reactieve T-cellen in verhouding met het totale aantal orgaancellen. Uit de analyse op één dag na transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen in de organen van een gezonde rat kan besloten worden dat de relatieve infiltratie in het CZS nagenoeg nul is ten opzichte van het totaal aantal orgaancellen. Er is echter wel meer relatieve infiltratie te bespeuren in de lymfeknopen in vergelijking met de transfer van de cellen in een geïmmuniseerd dier. Als laatste kan nog waargenomen worden dat de milt hoge infiltratiewaarden weergeeft bij transfer met myeline en OVA-reactieve T-cellen.

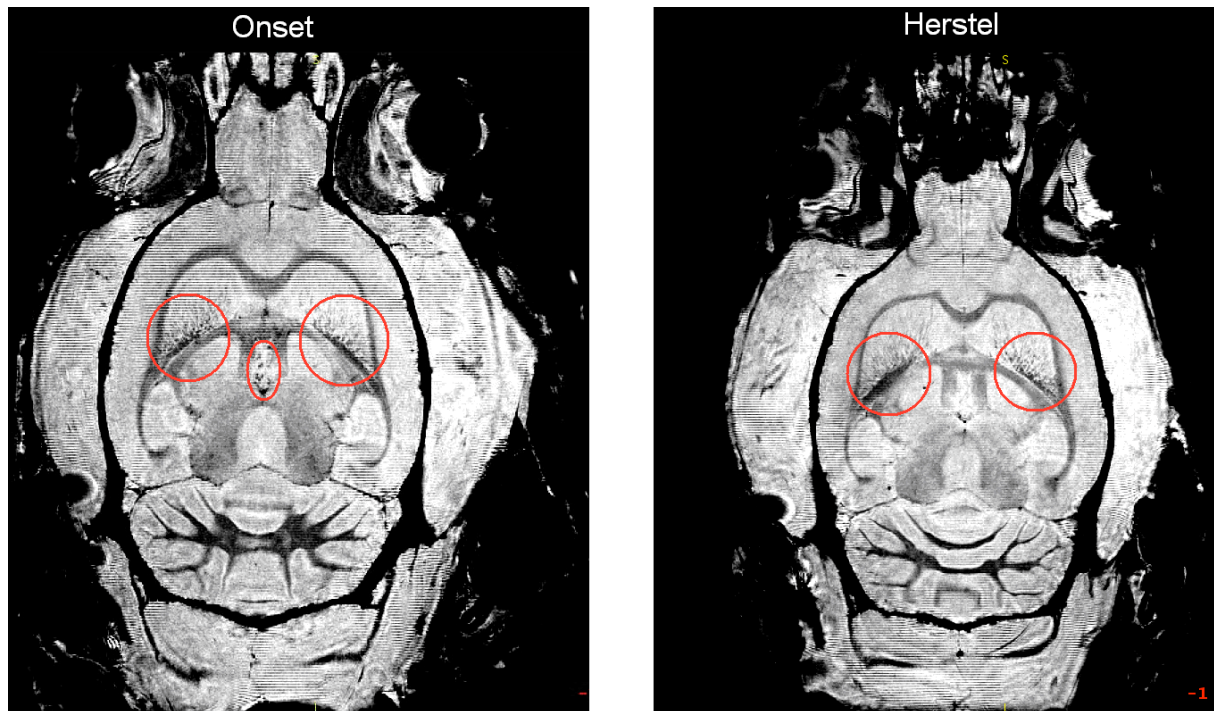


**Figuur 3.2: De infiltratie van het relatief percentage getransfereerde myeline of OVA-reactieve T-cellen, ten opzichte van het totaal aantal orgaancellen, één dag na transfer tijdens herstel.** De zwarte balken stellen het relatief percentage myeline-reactieve T-cellen voor tijdens herstel. De gestreepte balken stellen het percentage OVA-reactieve T-cellen voor tijdens herstel. De geblokte balken stellen het percentage myeline-reactieve T-cellen voor in een gezond dier. Daaruit kan besloten worden dat het percentage infiltratie van de getransfereerde myeline-reactieve T-cellen in het CZS tijdens herstel hoger is dan bij de getransfereerde OVA-reactieve T-cellen in verhouding met het totale aantal orgaancellen. De transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen in een gezonde rat geeft weer dat de relatieve infiltratie in het CZS nagenoeg nul is.

### **3.3 Distributie en infiltratiebepaling van SPIO-gelabelde myeline-reactieve T-cellen**

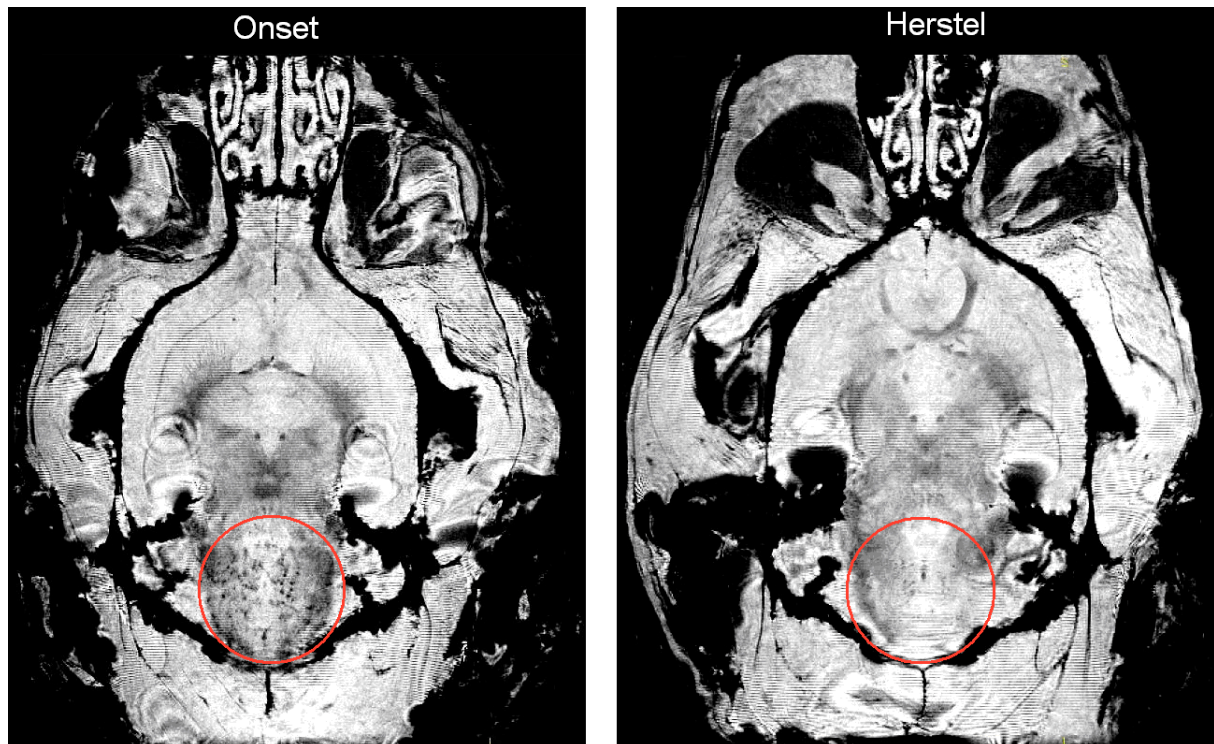
In dit gedeelte worden de data tijdens de onset of de herstelfase weergegeven. Deze worden bekomen na transfer van SPIO-gelabelde myeline-reactieve T-lymfocyten in EAE ratten. Dit onderzoek wordt uitgevoerd om de infiltratie van myeline-reactieve T-cellen bij onset en tijdens herstel te bepalen. Ook wordt op die manier de distributie van de getransfereerde cellen weergegeven in de rathersenen. Één dag na transfer wordt de analyse uitgevoerd. Uit een 3D gradiënt-echo opname tijdens onset of herstelfase van de ziekte kan men 2D-beelden reconstrueren in de gewenste vlakken en locaties. Een eerste weergave is een axiaal beeld geselecteerd ter hoogte van de bulbus olfactorius, de grote en de kleine hersenen. De SPIO-partikels zijn vooral zichtbaar in de witte stof van de hersenen. De bekomen beelden zijn weergegeven in figuur 3.3. Daarvan is de linkerkant het bekomen beeld tijdens onset, rechts is het bekomen beeld tijdens herstel. Er wordt waargenomen dat er meer SPIO-partikels

zichtbaar zijn in de witte stof van de hersenen na transfer van de SPIO-gelabelde T-cellen bij onset dan tijdens herstel.



**Figuur 3.3:** Een axiaal MRI-beeld van rathersenen, ter hoogte van de bulbus olfactorius, de grote en kleine hersenen, die getransfereerd werden met SPIO-gelabelde myeline-reactieve T-cellen. Links en rechts van de figuren zijn respectievelijk de linker- en rechterkant van de rattenkop. De bovenkant is de anteriore zijde van de rattenkop en de onderkant is de superioere zijde van de rattenkop. De SPIO-partikels zijn omcirkeld. Er wordt waargenomen dat er meer SPIO-partikels zichtbaar zijn na transfer van de SPIO-gelabelde T-cellen bij onset dan tijdens herstel in de witte stof van de hersenen.

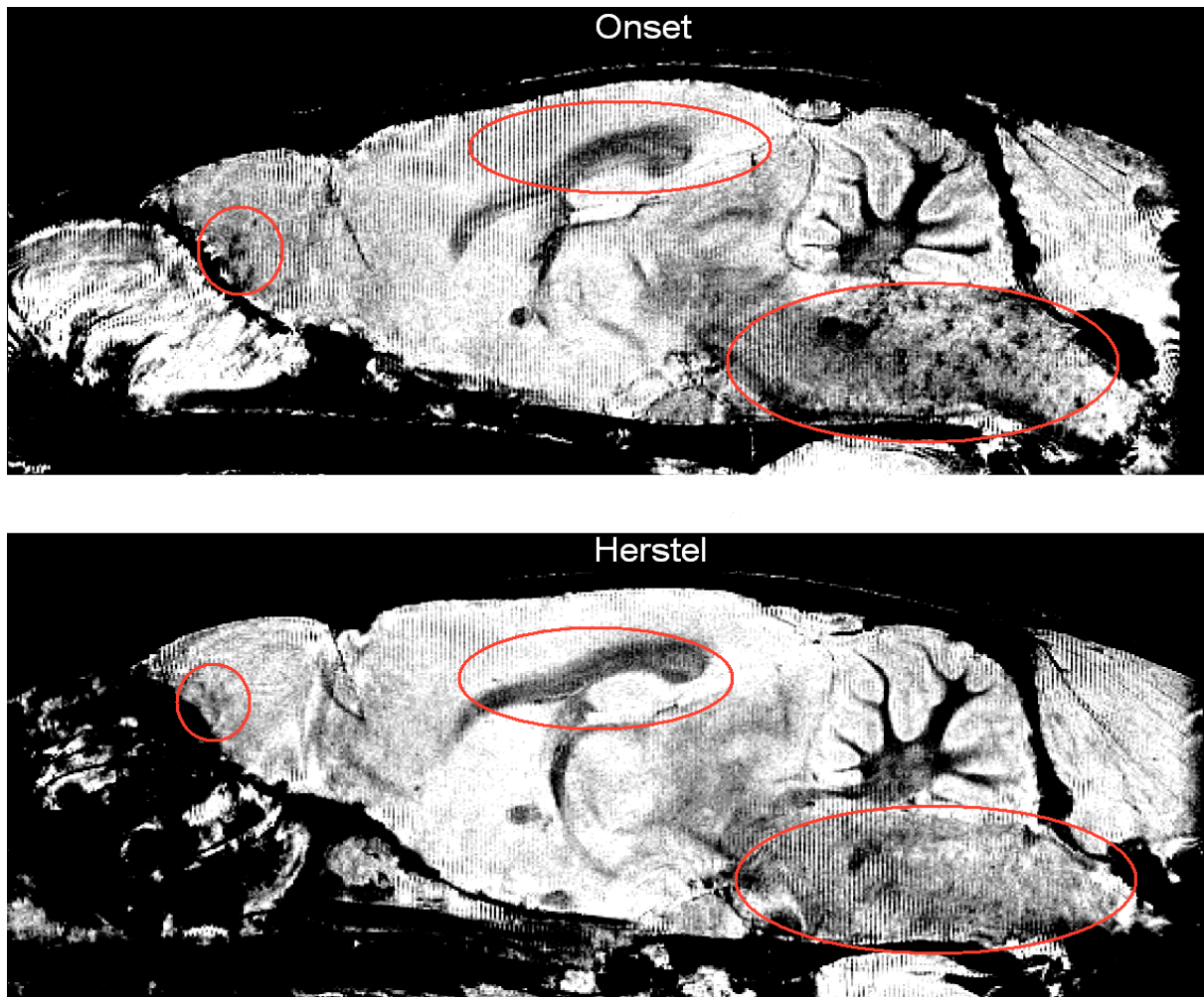
Een tweede bekomen beeld is een axiale doorsnede van de rathersenen ter hoogte van de pons. De bekomen beelden zijn weergegeven in figuur 3.4. Daarvan is de linkse figuur het bekomen beeld tijdens onset, rechts is het bekomen beeld tijdens herstel. In de pons zijn er meer SPIO-partikels zichtbaar tijdens onset dan tijdens herstel één dag na transfer van SPIO-gelabelde myeline-reactieve T-cellen.



**Figuur 3.4:** Een axiaal MRI-beeld van rathersenen, ter hoogte van de pons, die getransfereerd werden met SPIO-gelabelde myeline-reactieve T-cellen. Links en rechts van de figuren zijn respectievelijk de linker- en rechterkant van de rattenkop. De bovenkant is de anteriore zijde van de rat en de onderkant is de superieure zijde van de rattenkop. De SPIO-partikels zijn omcirkeld. Er wordt besloten dat in de pons meer SPIO-partikels zichtbaar zijn tijdens onset dan tijdens herstel één dag na transfer van SPIO-gelabelde myeline-reactieve T-cellen.

Een derde bekomen beeld is een sagittale doorsnede van de volledige rathersenen. De bekomen beelden zijn weergegeven in figuur 3.5. Daarvan is de bovenste figuur het bekomen beeld bij onset één dag na transfer van SPIO-gelabelde myeline-reactieve T-cellen. De onderste figuur is het bekomen beeld tijdens herstel één dag na transfer van SPIO-gelabelde myeline-reactieve T-cellen. Hieruit wordt besloten dat de SPIO-partikels vooral zichtbaar zijn in de witte stof van de hersenen en pons. Een kleine hoeveelheid SPIO kan gedetecteerd worden in de bulbus olfactorius.



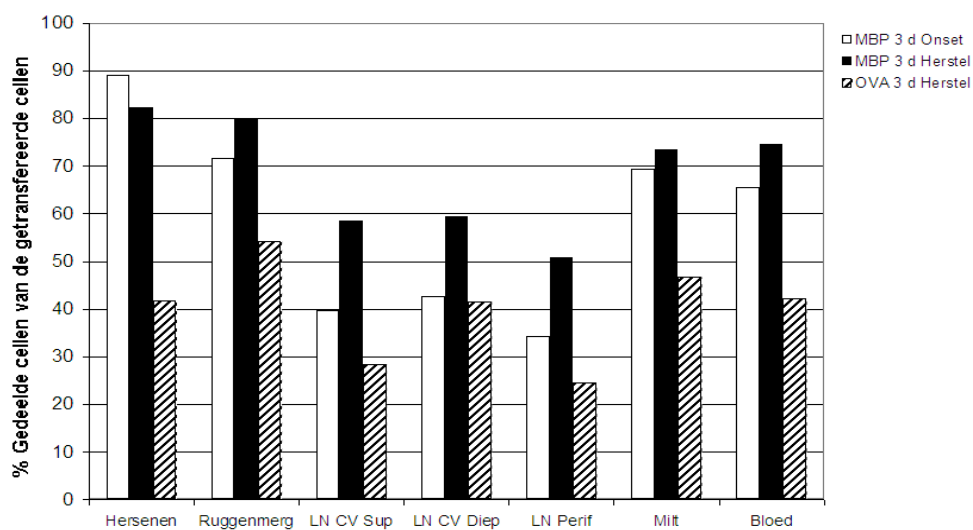


**Figuur 3.5:** Een sagittaal MRI-beeld van de volledige rathersenen, die getransfereerd werden met SPIO-gelabelde myeline-reactieve T-cellen. De linkerkant van de figuur is de anteriore kant van de rat. De rechterkant is de posteriore kant van de rattenkop. De bovenkant is de superiore kant van de rattenkop en de onderkant is de inferiore kant van de rattenkop. De SPIO-partikels zijn omcirkeld. Hieruit wordt besloten dat de SPIO-partikels vooral zichtbaar zijn in de witte stof van de hersenen en pons.

### **3.4. Proliferatiebepaling in de organen van de getransfereerde cellen 3 dagen na transfer**

De vorige resultaten geven weer dat rustende myeline-reactieve T-cellen infiltreren in de organen van geïmmuniseerde ratten. Vervolgens kan drie dagen na transfer bepaald worden wat het percentage gedeelde cellen is in de hersenen, ruggenmerg, oppervlakkige, diepe cervicale lymfeknopen, perifere lymfeknopen, milt en bloed. Daarvoor wordt een transfer uitgevoerd van rustende myeline-reactieve T-cellen in een EAE rat bij onset en tijdens herstel. Als blanco controle worden rustende OVA-reactieve T-cellen getransfereerd in een

EAE rat tijdens herstel. Van de bekomen celsuspensies wordt een concentratiegradiënt centrifugatie uitgevoerd met ficoll voor de milt en het bloed, en met percoll voor de hersenen en het ruggenmerg. Op die manier worden de lymfocyten geïsoleerd van de rest van de cellulaire vloeistof. Vervolgens kunnen de lymfocyten van alle geïsoleerde organen een flowcytometrische analyse ondergaan. Proliferatiebepaling wordt verwezenlijkt door op lymfocyten, die CD 3-positief waren, te gaten. Daarop wordt de concentratie CFSE in de cellen bepaald. Een hoge concentratie CFSE wijst op weinig of geen proliferatie. Een lage CFSE-concentratie wijst op proliferatie. In figuur 3.6 wordt van ieder geanalyseerd orgaan tijdens de onset of herstelfase drie dagen na transfer het percentage gedeelde cellen van de getransfereerde cellen weergegeven. Uit deze data kan besloten worden dat er bij een transfer van myeline-actieve T-cellen in een EAE rat bij herstel meer proliferatie van de getransfereerde cellen waargenomen kan worden dan bij een transfer van OVA-actieve T-cellen. Het percentage gedeelde cellen van de getransfereerde myeline-actieve T-cellen is tevens hoger in het CZS dan in de andere organen.

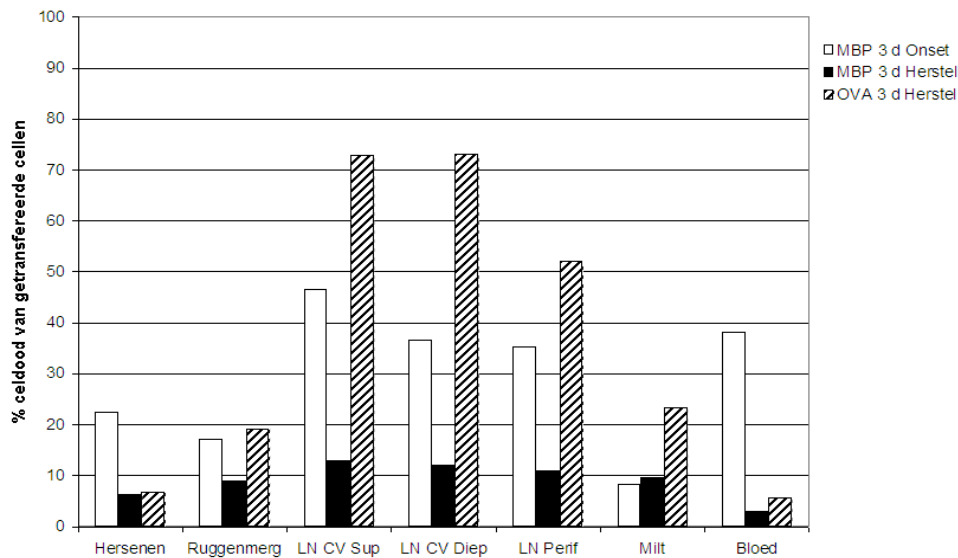


**Figuur 3.6:** Het percentage gedeelde cellen van de getransfereerde myeline-actieve T-cellen tijdens onset en herstel drie dagen na transfer. De witte en zwarte balken stellen het gemiddelde percentage CFSE-positieve myeline-actieve T-cellen voor, die in het orgaan geprolifereerd hebben, drie dagen na transfer bij onset en tijdens herstel respectievelijk. De gestreepte balken stellen het gemiddelde percentage OVA-actieve T-cellen voor, die in het orgaan geprolifereerd hebben, drie dagen na transfer tijdens herstel. Uit deze data kan besloten worden dat er bij een transfer van myeline-actieve T-cellen in een EAE rat meer proliferatie van de getransfereerde cellen waargenomen kan worden dan bij een transfer van OVA-actieve T-cellen in een EAE rat. Het percentage gedeelde cellen van de getransfereerde myeline-actieve T-cellen is tevens hoger in het CZS dan in de andere organen.

### **3.5. Determinatie celdood in getransfereerde cellen in de organen drie dagen na transfer**

Om te achterhalen of de getransfereerde myeline-reactieve T-cellen celdood ondergaan, wordt de hoeveelheid celdood van de getransfereerde cellen in de organen bepaald drie dagen na transfer bij onset en tijdens herstel. De hersenen, ruggenmerg, oppervlakkige, diepe cervicale lymfeknopen, perifere lymfeknopen, milt en bloed worden drie dagen na transfer van myeline-reactieve T-cellen geïsoleerd uit een EAE rat. De organen worden gesuspenderd zodat de lymfocyten geïsoleerd kunnen worden. De lymfocyten worden geïsoleerd uit de milt en bloed door een concentratiegradiënt centrifugatie met ficoll. Om de lymfocyten te isoleren uit de hersenen en het ruggenmerg wordt een concentratiegradiënt centrifugatie uitgevoerd met percoll. Als controle wordt een transfer van OVA-reactieve T-lymfocyten uitgevoerd tijdens herstel. De lymfocyten worden gelabeld met 7-AAD. Er wordt een flowcytometrische analyse uitgevoerd. Daardoor kunnen de CD 3 en CFSE-positieve lymfocyten gated worden, waarvan de concentratie 7-AAD bepaald wordt. Een lage concentratie 7-AAD wijst op levende cellen. Een middelmatige concentratie 7-AAD wijst op apoptose en een hoge concentratie wijst op necrose van de T-lymfocyten. Figuur 3.7 geeft de bekomen data weer. Er kan besloten worden dat er drie dagen na transfer van myeline-reactieve T-cellen een groter percentage getransfereerde cellen in celdood gedwongen wordt bij onset dan bij herstel. De milt is daar een uitzondering op. Het percentage getransfereerde cellen dat in celdood gedwongen wordt in de hersenen en ruggenmerg is respectievelijk 22,5% en 17,1% bij onset. Tijdens herstel zijn deze respectievelijk 6,4% en 9,1%. Het percentage CFSE-gelabelde OVA-reactieve T-cellen dat in celdood gedwongen wordt in de lymfeknopen was ook hoger dan 50 % van de getransfereerde cellen.



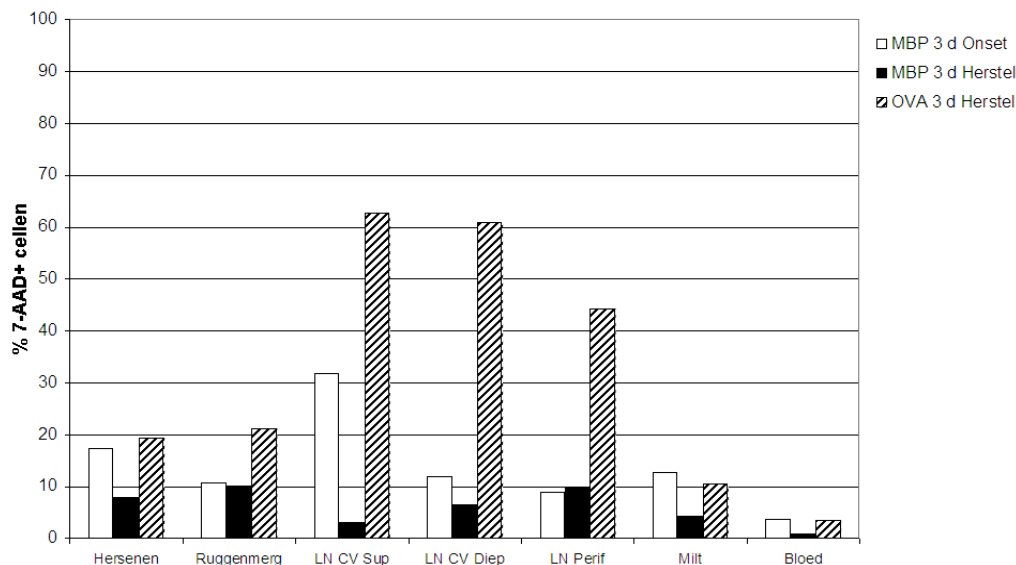


**Figuur 3.7:** Het percentage getransfereerde CFSE-gelabelde myeline- of OVA-reactieve T-cellen dat celdood ondergaat ten opzichte van het aantal getransfereerde cellen, drie dagen na transfer. De witte en zwarte balken geven respectievelijk het percentage in celdood gedwongen getransfereerde cellen weer, ten opzichte van het totaal aantal getransfereerde cellen, bij onset en tijdens herstel. De zwart-wit gestreepte balken zijn de OVA-controles. Deze geven het percentage in celdood gedwongen getransfereerde OVA-reactieve T-cellen weer ten opzichte van het totaal aantal getransfereerde cellen tijdens herstel. Er kan besloten worden dat er drie dagen na transfer een groter percentage getransfereerde cellen in celdood gedwongen zijn bij onset dan tijdens herstel, met uitzondering van de milt.

### 3.6. Bepaling celdood in “host derived” T-cellen in de organen 3 dagen na transfer

Het in celdood gedwongen worden van de “host derived” T-lymfocyten wordt onderzocht om te achterhalen of er een verschil is bij onset of tijdens herstel. Hiervoor wordt analoog gewerkt als bij de determinatie van het in celdood gedwongen worden van de getransfereerde cellen in de organen 3 dagen na transfer. Alleen wordt er ditmaal gegated op CFSE-negatieve cellen tijdens de flowcytometrische analyse. De bekomen data zijn samengevat in figuur 3.8. Er kan waargenomen worden dat er tijdens onset meer “host derived” T-cellen in celdood gedwongen worden als tijdens herstel. In de hersenen worden er 17,4 % van de “host derived” T-cellen in celdood gedwongen. Tijdens herstel is dit maar 7,9 %. Enkel in de perifere lymfeknoopcellen was er nagenoeg evenveel celdood van de “host derived” T-cellen bij onset (8,9 %) als tijdens herstel (9,8 %). Een overvloed van “host derived” cellen die in celdood gedwongen worden, wordt waargenomen tijdens het OVA-experiment van de geïsoleerde cellen welke bekomen wordt uit alle lymfeknopen. In de oppervlakkige cervicale

lymfeknopen wordt er 62,7 % van de “*host derived*” T-cellen in celdood gedwongen. Voor de diepe cervicale lymfeknopen is dit 60,9 % en voor de perifere lymfeknopen is dit 44,3 %.

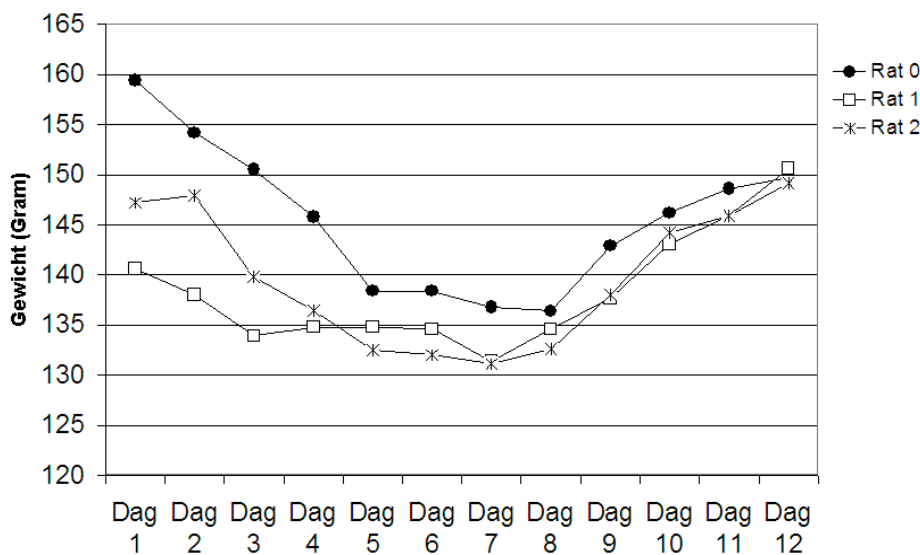


**Figuur 3.8: Het percentage “*host derived*” T-cellen dat in celdood gedwongen wordt 3 dagen na transfer van myeline of OVA-reactieve T-cellen.** De witte en zwarte balken geven respectievelijk het percentage in celdood gedwongen “*host derived*” T-cellen weer ten opzichte van het totaal aantal T-lymfocyten bij onset en tijdens herstel na transfer van rustende myeline-actieve T-cellen. De zwart-wit gestreepte balken geven het percentage in celdood gedwongen “*host derived*” T-cellen weer na transfer van OVA-actieve T-cellen. Er kan waargenomen worden dat er tijdens onset meer “*host derived*” T-cellen in celdood gedwongen worden als tijdens herstel 3 dagen na transfer van myeline-actieve T-cellen.

### **3.7. Het verloop van ziekte-inductie door de transfer van rustende myeline-actieve T-cellen in EAE ratten tijdens herstel**

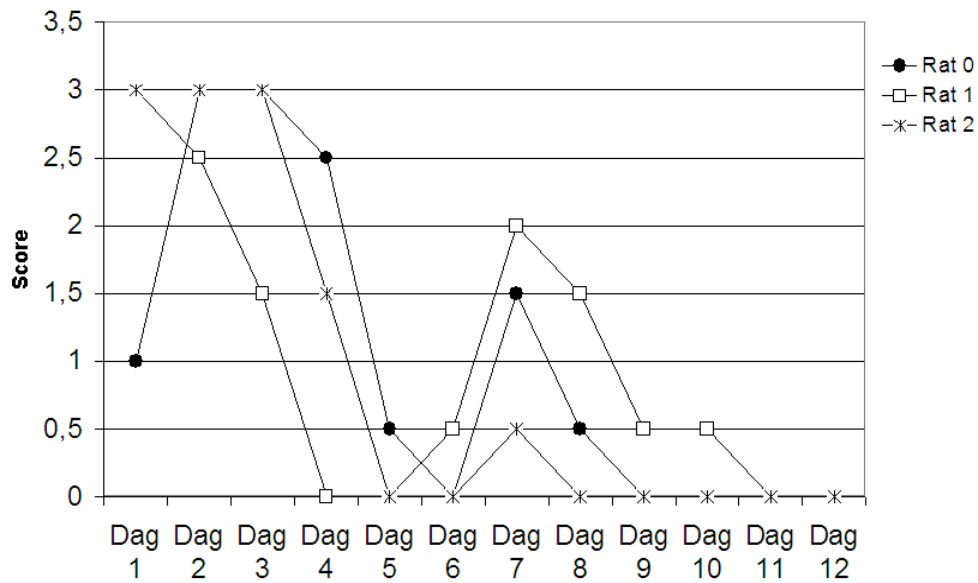
Om te achterhalen of een transfer van myeline-actieve T-cellen tijdens herstel leidt tot een nieuwe ziekte-inductie van een EAE rat wordt deze stelling uitgevoerd. De ziekte-inductie wordt eerst geanalyseerd door na de transfer het gewicht te onderzoeken. Ziekte-inductie gaat gepaard met een gewichtsverlies van de rat. Om het verloop te bepalen van het rattengewicht wordt op drie EAE ratten tijdens herstel een transfer uitgevoerd van myeline-actieve T-cellen. Het gewicht wordt dagelijks gemeten op dezelfde tijdstippen. Figuur 3.9 geeft de bekomen gewichten van de getransfereerde dieren weer in gram. Dag 1 komt overeen met het gewicht van de ratten op de dag van transfer. Na transfer wordt een gewichtsafname waargenomen, maar enkele dagen later komen de ratten ook weer gewicht aan. Rat 0 weegt

op de dag van transfer 159.4 gram en op dag 7 nog 136.8 gram, maar op dag 12 weegt deze rat terug 149.7 gram.



**Figuur 3.9: Het dagelijks gemeten gewicht van 3 EAE ratten na transfer van myeline – reactieve T – cellen tijdens herstel.** Dag 1 komt overeen met het gemeten gewicht op de dag van transfer. De bolletjes (●), vierhoeken (■) en driehoeken (▲) vertegenwoordigen de bekomen gewichten van rat 0, 1 en 2 respectievelijk. Na transfer wordt er een gewichtsafname waargenomen, maar de ratten komen enkele dagen later ook weer gewicht aan.

De invloed op de neurologische effecten worden eveneens bepaald en dit door er een score aan toe te kennen. Vanaf het uitvoeren van de transfer met rustende myeline–reactieve T–cellen wordt deze score dagelijks bepaald. Hier worden dezelfde drie geïmmuniseerde ratten gebruikt als voor de gewichtsbepaling. Figuur 3.10 geeft de bekomen scores weer van de getransfereerde dieren. Dag 1 komt overeen met de toegekende score op de dag van transfer. Er wordt vastgesteld dat er na herstel een tweede relaps geïnduceerd wordt.



**Figuur 3.10:** De neurologische scores toegekend aan 3 myeline geïmmuniseerde ratten na transfer van met myeline-reactieve T-cellen tijdens herstel. Dag 1 komt overeen de toegekende neurologische score op de dag van transfer. De bolletjes (●), vierhoeken (■) en driehoeken (▲) vertegenwoordigen de toegekende neurologische score van rat 0, 1 en 2 respectievelijk. Er wordt besloten dat er na herstel een tweede relaps geïnduceerd wordt.

## 4. Discussie

Het doel van deze verhandeling was een beter inzicht te krijgen in de mogelijkheid tot infiltratie, distributie, proliferatie en overleving van rustende myeline-reactieve T-cellen tijdens de herstelfase van EAE ratten. Dit onderzoek kan fundamentele inzichten doen verschaffen over de immunologische mechanismen betrokken bij MS.

Eerst werd er een onderzoek verricht om na te gaan of er een infiltratie van getransfereerde rustende myeline-reactieve T-cellen plaatsvindt in het CZS van een EAE rat tijdens herstel. De bekomen data gaven weer dat getransfereerde rustende myeline-reactieve T-cellen ten opzichte van het totaal aantal orgaancellen voor een zeer groot percentage het CZS geïnfiltrerd hadden tijdens herstel. De data werden vergeleken met OVA-reactieve T-cellen die getransfereerd werden in een EAE rat tijdens herstel. De infiltratie van de OVA-reactieve T-cellen in het CZS was nihil. De myeline en OVA-reactieve T-cellen waren tijdens herstel in even grote hoeveelheden terug te vinden in de lymfeknopen. Er werden rustende OVA-reactieve T-cellen gekozen omdat deze geen antigen in de rat terugvinden. Dat maakt ze geschikt als controle voor de myeline-reactieve T-cellen. Eerder uitgevoerd onderzoek bewees al dat bij het uitvoeren van een adoptieve transfer van myeline-reactieve cellen, tijdens de acute fase van een EAE rat, infiltratie van de getransfereerde cellen in het CZS optrad [40, 52]. Odoardi et al. beschreven dat de maximale tijd nodig voor infiltratie van getransfereerde effector T-cellen één dag bedroeg [40]. Die tijdsperiode van één dag werd ook overgenomen voor de bepaling van infiltratie van de rustende myeline-reactieve T-cellen. Om na te gaan of de geziene infiltratie ook plaats vond in een gezonde rat werd daarop een transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen uitgevoerd. Het verkregen resultaat was dat er geen infiltratie in CZS van de rustende getransfereerde cellen was, wel in de lymfeknopen en milt.

Er wordt gesteld dat de getransfereerde rustende myeline-reactieve T-cellen na transfer in de lymfeknopen gemigreerd zijn. Er werd geen infiltratie vastgesteld in het bloed, maar de transfer werd wel uitgevoerd in het bloed. Er wordt gesuggereerd dat het percentage CFSE-positieve cellen in de totale bloedpopulatie beneden de detectielimiet valt door het grote aantal rode bloedcellen in het bloed. Flügel et al. stelden vast dat er na adoptieve transfer van myeline-reactieve T-cellen in een gezond dier EAE geïnduceerd werd. Infiltratie van de

getransfereerde myeline-reactieve T-cellen in het CZS werd pas 3,5 dagen na transfer vastgesteld [39]. In dit onderzoek werd er een analyse uitgevoerd op één dag na intraveneuze transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen. Flügel et al. stelden eveneens vast dat de getransfereerde cellen eerst in de lymfeknopen infiltreerden en dan verder migreerden om zo de milt en later het CZS te infiltreren [39]. In dit onderzoek werd er tijdens herstel op één dag na transfer van rustende myeline-reactieve cellen infiltratie in de lymfeknopen, milt en in het CZS vastgesteld. Bij transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen in een gezonde rat werd dezelfde infiltratie van de lymfeknopen als tijdens herstel waargenomen. De getransfereerde cellen waren echter niet in staat om de BHB door te dringen en om zo het CZS van de gezonde rat te infiltreren.

Uit deze data wordt besloten dat er bij transfer van reactieve T-lymfocyten tijdens herstel infiltratie van de getransfereerde cellen plaatsvond in het CZS. De getransfereerde cellen dienden nog niet eens geactiveerd te worden, ze dienden enkel myeline-reactief te zijn.

Een andere methode om de infiltratie alsook de distributie van rustende myeline-reactieve T-cellen in een EAE rat tijdens herstel te bepalen is het uitvoeren van een analyse met behulp van MRI. Om detectie van de getransfereerde cellen mogelijk te maken met behulp van MRI dienden de rustende myeline-reactieve T-cellen eerst gelabeld te worden met SPIO waarna ze getransfereerd werden. Eerder onderzoek bewees al dat het labelen van T-lymfocyten met SPIO-partikels geen effect heeft op de celfunctie [13]. Er werd ook een transfer uitgevoerd van SPIO-gelabelde rustende myeline-reactieve T-cellen bij onset. Op die manier kon een vergelijking gemaakt worden van infiltratie en distributie van de getransfereerde cellen tijdens herstel en bij onset. De infiltratie van de SPIO-gemerkte rustende myeline-reactieve T-lymfocyten in de witte stof van de hersenen werd bij herstel minder teruggevonden dan bij onset.

Er werd verwacht dat de SPIO-gelabelde rustende myeline-reactieve T-cellen de rathersenen zouden infiltreren, meer bepaald in de witte stof van de hersenen [13, 40, 54, 56]. Ook werd er verwacht dat de infiltratie gelijk zou zijn tijdens herstel als bij onset in de witte stof van de hersenen. Dat werd reeds bepaald met behulp van FACS-experimenten in BIOMED Diepenbeek. Herhaling van dit experiment is nodig om de contradictie te verklaren tussen de MRI en FACS-experimenten. Ook dient er best nog een MRI-bepaling uitgevoerd te worden van een gezonde rat. Op die manier kan achterhaald worden of de hypo-intense regio's ook wel effectief SPIO-cellen zijn.

Uit deze data kan besloten worden dat tijdens herstel SPIO-gemerkte rustende myeline-reactieve T-lymfocyten het CZS infiltreren. Infiltratie van de getransfereerde cellen worden eveneens waargenomen bij onset. De distributie van de getransfereerde SPIO-gemerkte rustende myeline-reactieve T-lymfocyten in een EAE rat tijdens herstel en bij onset vond plaats op dezelfde plaatsen namelijk in de witte stof van de hersenen.

Na de bepaling van de infiltratie van rustende myeline-reactieve T-cellen in een EAE rat tijdens herstel kon achterhaald worden wat het effect was in de organen waarin infiltratie geïnduceerd werd. Als eerste werd achterhaald of de getransfereerde cellen tijdens herstel prolifereren in de geïnfiltreerde organen. Al eerder is vastgesteld dat antigenspecifieke T-cellen vaak in anergie gaan in het CZS tijdens EAE, dus ook tijdens herstel [54, 55]. Proliferatie duidt echter meestal op activatie van de getransfereerde rustende myeline-reactieve T-cellen. Tijdens herstel werd onderzoek verricht naar deze proliferatie. Tijdens herstel werd er dus een transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen in een EAE rat uitgevoerd. Om de bekomen data te kunnen vergelijken werden dezelfde cellen getransfereerd in een EAE rat bij onset. Ook werd er een transfer van rustende OVA-reactieve T-cellen uitgevoerd. Analyse ervan gebeurde drie dagen na transfer om zo de geïnfiltreerde cellen de kans te geven om te prolifereren. De data gaven weer dat het proliferatief niveau van de getransfereerde rustende myeline-reactieve T-cellen in het CZS, milt en bloed in een EAE rat tijdens herstel even hoog was als bij onset. Het percentage proliferatie van de getransfereerde myeline-reactieve T-cellen tijdens herstel is hoger dan dat van de getransfereerde OVA-reactieve T-cellen in alle organen van een EAE rat tijdens herstel. Ook was het percentage gedeelde cellen van de getransfereerde rustende myeline-reactieve T-cellen hoger voor het CZS dan voor de andere organen tijdens herstel en bij onset.

In de literatuur wordt gesteld dat tijdens herstel celdood van autoreactieve T-cellen in het CZS geïnduceerd wordt [55 – 59]. Autoreactieve cellen kunnen na transfer een gebrek hebben aan co-stimulatie waardoor ze in activatie-geïnduceerde celdood gaan [55, 56]. Daardoor werd er verwacht dat proliferatie van de getransfereerde myeline-reactieve T-cellen tijdens herstel lager zou zijn dan bij onset. Eerder uitgevoerde gelijkaardige experimenten in BIOMED Diepenbeek toonden aan dat er evenveel proliferatie van de getransfereerde myeline-reactieve T-cellen was tijdens herstel als bij onset en dit in alle organen, ook in de lymfeknopen. Een mogelijke verklaring waarom proliferatie van myeline-reactieve T-cellen toch tijdens herstel kan voorkomen is dat de getransfereerde cellen in het CZS zich mogelijk in een niet-suppressief milieu bevinden. Het feit dat de proliferatie van getransfereerde OVA-

reactieve cellen tijdens herstel voorkomt in alle organen valt te verklaren door het bijstaander effect [40].

Uit deze data wordt besloten dat proliferatie van getransfereerde rustende myeline–reactieve T–cellen in het CZS van een EAE rat tijdens herstel mogelijk is.

Een ander bestudeerd effect tijdens herstel van de geïnfilterde cellen was het onderzoek naar de viabiliteit van de getransfereerde rustende myeline–reactieve T–cellen in de organen. Om te achterhalen of de rustende myeline–reactieve T–cellen tijdens herstel verwijderd werden door middel van celdood uit de geïnfilterde organen, werd het percentage celdood van de getransfereerde cellen bepaald. Tijdens herstel werden rustende myeline–reactieve T–cellen getransfereerd in een EAE rat. Drie dagen na transfer werd er waargenomen dat er bij onset een groter percentage getransfereerde cellen is die in celdood in de organen gedwongen waren dan tijdens herstel, met uitzondering van de milt. Het percentage getransfereerde OVA–reactieve T–cellen dat drie dagen na transfer in celdood gedwongen werd en dit tijdens herstel was hoger in vergelijking met de getransfereerde myeline–reactieve T–cellen tijdens herstel in alle organen buiten de hersenen en het bloed.

Er werd verwacht dat tijdens herstel de getransfereerde cellen meer in celdood gedwongen werden dan bij onset. Eerder verricht onderzoek suggereerde al dat autoreactieve T–cellen tijdens herstel door middel van activatie geïnduceerde apoptose geëlimineerd worden uit het CZS [55 – 59]. Het verwachte resultaat was totaal niet waar te nemen in de data van het experiment. Uit de verkregen data kan op dit moment niets geconcludeerd worden. Een mogelijke verklaring hiervoor zou zijn dat CD 3 receptorverlies geïnduceerd wordt tijdens apoptose. Tijdens het onderzoek werd er gegated op die receptor voor de bepaling van het in celdood gedwongen worden van de getransfereerde T–lymfocyten. Maar bij verder onderzoek bleek dat hetzelfde resultaat bekomen werd door enkel te gaten op CFSE–positieve cellen. Een andere opmerking is dat de OVA–reactieve T–cellen door een gebrek aan stimulatie in apoptose gedwongen worden. OVA–reactieve T–cellen zijn niet lichaamseigen, dus een gebrek aan celstimulatie is mogelijk [58]. Daardoor is de transfer van OVA–reactieve T–cellen niet geschikt als controle voor het in celdood gedwongen worden van getransfereerde myeline–reactieve T–cellen in een EAE rat.

Er kan geconcludeerd worden dat het percentage in celdood gedwongen getransfereerde rustende myeline–reactieve T–cellen tijdens herstel nauwelijks te detecteren is in het CZS.

Ook werden de “*host derived*” T–cellen bestudeerd op het in celdood gedwongen worden drie dagen na transfer van rustende myeline–reactieve T–cellen tijdens herstel en bij onset. Op die



manier trachtte achterhaald te worden of tijdens herstel de “*host derived*” T-cellen ook in celdood gedwongen worden. Er werd meer celdood vastgesteld na transfer van “*host derived*” T-cellen bij onset dan tijdens herstel in de hersenen. In het ruggenmerg was de graad van het in celdood gedwongen “*host derived*” T-cellen evenveel tijdens herstel als bij onset.

Bij onset werd een hogere graad van “*host derived*” cellen die in celdood gedwongen werden verwacht als tijdens herstel. Die stelling werd geopteerd omdat het geweten is dat myeline-reactieve T-cellen reeds vroeg tijdens EAE in celdood gedwongen worden. De meting voor celdood gebeurde drie dagen na de onset, wat overeenkomt met de vroege initiatie van herstel, wat dus een verklaring zou kunnen zijn voor de waargenomen celdood van de “*host derived*” T-cellen. De meting uitgevoerd drie dagen na herstel komt overeen met de late fase van herstel, wat dus een verklaring zou kunnen zijn voor de lagere waargenomen celdood bij onset van de “*host derived*” T-cellen.

Uit deze data kan besloten worden dat er tijdens herstel “*host derived*” T-cellen drie dagen na transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen in celdood gedwongen worden in de hersenen en het ruggenmerg. Verder onderzoek is echter nodig om dit besluit te staven.

Als laatste werden er nog 3 transfers van rustende myeline-reactieve T-cellen uitgevoerd in 3 EAE ratten tijdens herstel. Op die manier kon tijdens herstel de mogelijkheid tot ziekte-inductie van de getransfereerde rustende myeline-reactieve T-cellen in EAE ratten bepaald worden. Ziekte-inductie werd al vastgesteld en bepaald door een gewichtsverlies van de proefdieren en de inductie van neurologische gebreken in eerder uitgevoerd onderzoek [52, 60]. Er werd vastgesteld dat er een tweede relaps geïnduceerd werd na herstel. Na een transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen in EAE ratten tijdens herstel werd een ziekte-inductie verwacht. Dit omdat er in deze thesis reeds vastgesteld werd dat na transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen tijdens herstel de getransfereerde cellen infiltreren, als ook prolifereren in het CZS.

Er kan besloten worden dat tijdens herstel een transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen in een EAE rat ziekte-inductie teweegbrengt.

Algemeen kan er geconcludeerd worden dat de getransfereerde cellen het CZS infiltreren na transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen tijdens de herstelfase in een EAE rat. De infiltratie en distributie van de getransfereerde SPIO-gelabelde rustende myeline-reactieve T-cellen tijdens herstel en bij onset vindt plaats in de witte stof van de hersenen. Proliferatie van de getransfereerde rustende myeline-reactieve T-cellen wordt geïnduceerd in het CZS. De getransfereerde cellen worden nauwelijks gedwongen tot het in celdood gaan drie dagen na transfer. Als laatste kan er nog besloten worden dat een transfer van rustende myeline-reactieve T-cellen tijdens herstel van een EAE rat nog in staat is om een relaps te induceren.

## 5. Literatuurlijst

1. Lassmann H, Ransohoff RM. The CD4 – Th1 model for multiple sclerosis: a crucial re – appraisal. *Trends in Immunology* 2004; 25(3): 132-137.
2. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis aetiology: Implications for diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine* 2001; 7(3): 115-121.
3. Höftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, et al. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain pathology* 2004; 14: 43-50.
4. Hellings N, Rau J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunologic research* 2001; 24: 411-466.
5. Sandyk R, Awerbuch GI. Pineal calcification and its relationship to the fatigue of multiple sclerosis. *International journal of neuroscience* 1994; 74:95-103.
6. Beck RW, Cleary PA, Trobe JD, Kaufman DI, Kupersmith MJ, et al. The effect of corticosteroids for optic neuritis on the subsequent development of multiple sclerosis. *The new England journal of medicine* 1993; 329(24): 1764-1769.
7. Ragonese P, Aridon P, Salemi G, D'Amelio M, Sevettieri G. Mortality in multiple sclerosis: a review. *European journal of neurology* 2008; 15: 123-127.
8. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *European journal of neurology* 2006; 13: 700-722.
9. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *The new England journal of medicine* 2000; 343(13): 938-952.
10. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology* 2007; 17:210-218.
11. Achiron A, Gurevich M, Snir Y, Segal E, Mandel M. Zinc-ion binding and cytokine activity regulation pathways predicts outcome in relapsing – remitting multiple sclerosis. *British society for immunology, Clinical and experimental immunology* 2007; 149: 235-242.
12. McQuarterm JJ, Bernard CCA. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *Journal of neurochemistry* 2007; 100: 295-306.
13. Anderson SA, Shukaliak-Quant J, Jorhan EK, Arbab AS, Martin R, et al. Magnetic resonance imaging of labelled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis. *Annals of neurology* 2004; 55(5): 654-659.
14. Mouzaki A, Tselios T, Papathanassopoulos P, Matsoukas I, Chatzantoni K. Immunotherapy for multiple sclerosis: Basic insights for new clinical strategies. *Current neurovascular research* 2004, 1(4): 325-340.
15. Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *International review of neurobiology* 2007; 79: 127-147.
16. Martin R, Gran B, Zhao Y, Markovic-Plese S, Bieleova B, et al. Molecular mimicry and antigen-specific T – cell responses in multiple sclerosis and chronic CNS lyme disease. *Journal of autoimmunity* 2002; 16(3): 187-192.
17. Lang HLE, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, et al. A functional and structural basis for TCR cross – reactivity in multiple sclerosis. *Nature immunology* 2002; 3(10): 940-943.

18. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell – mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; 80: 695-705.
19. HolmOy T. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: concepts and controversies. *Acta neurol scand* 2007, 115; 39-45.
20. Dinter H, Tse J, Halks-Miller M, Asarnow D, Onuffer J, et al. The type IV phosphodiesterase specific inhibitor mesoparm inhibits experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents. *Journal of neuroimmunology* 2000; 108: 136-146.
21. Misu T, Onodera H, Fujihara K, Matsushima K, Yoshie O, et al. Chemokine receptor expression on the T cell in blood and cerebrospinal fluid at relapse and remission of multiple sclerosis: imbalance of Th1/Th2-associated chemokine signalling. *Journal of neuroimmunology* 2001; 114: 207-212.
22. Laman JD, Thompson E.J, Kappos L. Balancing the Th1/Th2 concept in multiple sclerosis. *Immunology today* 1998; 19(11): 498-490.
23. Wang H, Matsui M, Araya S, Onai N, Matsushima K, et al. Chemokine receptors associated with immunity within and outside the central nervous system in early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 2002; 133: 184-192.
24. Weiss HA, Millward JM, Owens T. CD8<sup>+</sup> T cells in inflammatory demyelinating disease. *Journal of neuroimmunology* 2007; 191: 70-85.
25. Kornek B, Lassmann H. Neuropathology of multiple sclerosis – new concepts. *Brain research bulletin* 2003; 61: 321-326.
26. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacology & therapeutics* 2005; 106: &63-177.
27. Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends in neuroscience* 1996; 19: 331-338.
28. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem R, Stefferl A, et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis. *American journal of pathology* 2000; 157(1): 267-276.
29. Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain pathology* 1996; 6(3): 259-274.
30. Swanborg HS, Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T – cell immunology and auto reactivity. *Immunological reviews* 2001; 184: 129-135.
31. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung H. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nature clinical practice* 2006; 2(4): 201-211.
32. Smith T, Hewson A.K, Kingsley C.I, Leonard J.P, Cuzner ML. Interleukin – 12 induces relapse in experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rat. *American journal of pathology* 1997; 150(6): 1909-1917.
33. Wekerle H, Kurschus FC. Animal models of multiple sclerosis. *Drug discovery today* 2006; 3(4): 359-367.
34. Swanborg H. Animal models of human disease. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rodents as a Model for Human Demyelinating Disease. *Clinical immunology and immunopathology* 1995; 77(1): 4-13.
35. Nakatsuij Y, Moriya M, Sakoda S. Targeting interferons in multiple sclerosis. *Drug discovery today: therapeutic strategies/immunological disorders* 2007; 4(1): 49-55.

36. Paul S, Ricour C, Sommereyns C, Sorgeloos F, Michiels T. Type I interferon response in the central nervous system. *Biochimie* 2007; 89: 770-778.
37. Ahmed Z, Doward AI, Pryce G, Taylor DL, Pocock JK, et al. A role for caspase – 1 and – 3 in the pathology of experimental allergic encephalomyelitis. *American journal of pathology* 2002; 161(5): 1577-1586.
38. D' Souza S.D, Bonetti B, Balasingam V, Cashman N.R, Barker P.A, et al. Multiple sclerosis: Fas signalling in oligodendrocyte cell death. *J. Exp Med* 1996; 184: 2361-2370.
39. Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 2001; 14: 547-560.
40. Odoardi F, Kawakami N, Klinkert WEF, Flügel A. Blood-borne soluble protein antigen intensifies T cell activation in autoimmune CNS lesions and exacerbates clinical disease. *PNAS* 2007; 107(47): 18625-18630.
41. Lecoeur H, Février M, Garcia S, Rivière Y, Gougeon M-L. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *Journal of immunological methods* 2001; 253: 177-187.
42. Clay CC, Rodrigues DS, Harvey DJ, Leutenegger CM, Esser U. Distinct chemokine triggers an in vivo migratory paths of fluorescein dye-labeled T lymphocytes in actuely simian immunodeficiency virus SIV<sub>mac251</sub>-infected and uninfected macaques. *Journal of virology* 2005; 79(21): 13759-13768.
43. Song F, Wardrop RM, Gienapp IE, Stuckman SS, Meyer AL, et al. The Peyer's patch is a critical immunoregulatory site for mucosal tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of autoimmunity* 2007; 1: 1-8.
44. Lyons BA. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of immunological methods* 2000; 243: 147-154.
45. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13(2): 204-208.
46. Lecoeur H, Ledru E, Gougeon M-L. A cytofluorometric method for the simultaneous detection of both intracellular and surface antigens of apoptotic peripheral lymphocytes. *Journal of immunological methods* 1998; 217: 11-26.
47. Pirko I, Johnson A, Ciric B, Gamez J, Macura SI, et al. In vivo magnetic resonance imaging of immune cells in the central nervous system with superparamagnetic antibodies. *The FASEB journal* 2003; 1: 1-14.
48. Hildebrandt IJ, Gambhir SS. Molecular imaging applications from immunology. *Clinical immunology* 2004; 111: 210-224.
49. Gelan J. Basisprincipes voor magnetische resonantie imaging. Limburgs Universitair Centrum Diepenbeek.
50. <http://www.zol.be/Internet/MBV/MBV.asp?id=942>
51. Arbab AS, Wilson LB, Ashari P, Jorhan EK, Lewis BK, Frank JA. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed* 2005; 18: 383-389.
52. Gordon FL, Nguyen KB, White CA, Pender MP. Rapid entry and downregulation of T cells in the central nervous system during the reinduction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 2001; 112: 15-27.

53. Bauer J, Bradl M, Hickey WF. T - Cell Apoptosis in Inflammatory Brain Lesions. *American Journal of Pathology*, 1998; 153(3): 715-724.
54. Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathology*, 1991; 1(2): 97-105.
55. Tabi Z, McCombe PA, Pender MP. Apoptotic Elimination Of V $\beta$ 8.2+ Cells From The Central Nervous System During Recovery From Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induced By The Passive Transfer Of V $\beta$ 8.2+ Encephalitogenic T Cells. *European Journal of Immunology*, 1994, 24: 2609-2617.
56. White CA, McCombe PA, Pender MP. The Roles of Fas, Fas Ligand and Bcl-2 in T cell Apoptosis in the Central Nervous System in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 1998; 82(1): 47-55.
57. McCombe PA, Nickson I, Tabi Z, Pender MP. Apoptosis of V beta 8.2+ T lymphocytes in the spinal cord during recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis induced in Lewis rats by inoculation with myelin basic protein. *Journal of Neurological Sciences*, 1996; 139(1): 1-6.
58. Pender MP, McCombe PA, Yoong G, Nguyen KB. Apoptosis of alpha beta T lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: its possible implications for recovery and acquired tolerance. *Journal of Autoimmunity*, 1992; 5(4): 401-410.
59. Tabi Z, McCombe PA, Pender MP. Antigen-specific down-regulation of myelin basic protein-reactive T cells during spontaneous recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis: further evidence of apoptotic deletion of autoreactive T cells in the central nervous system. *Int Immunol*, 1995; 7(6): 967-973.
60. Badovinac V, Mostarica-Stojković M, Dinarello CA, Stosić-Grujčić S. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis\_EAE/in rats by influencing the activation and proliferation of encephalitogenic cells. *Journal of Neuroimmunology*, 1998; 85: 87-95.