

ONDERZOEK NAAR HET EFFECT VAN FYSIEKE INSPANNING OP DE IMMUNOLOGISCHE STATUS VAN PATIENTEN MET MULTIPLE SCLEROSE

Door:
Nathalie Deckx

Eindverhandeling voorgelegd tot het behalen van de graad van
Master in de Biochemie & Biotechnologie

29 juni 2011
Academiejaar 2010-2011

Promotor: Dr. Nathalie Cools
Copromotor: Prof. Dr. Viggo Van Tendeloo en Prof. Dr. Bert Op't Eijnde
Begeleidster: Dr. Nathalie Cools

Laboratorium voor Experimentele Hematologie, UA
Vaccin en Infectieziekteninstituut
Universitair Ziekenhuis Antwerpen
Wilrijkstraat 10
B-2650

Inhoudstafel

Samenvatting	3
Abstract	4
Lijst met gebruikte afkortingen	5
1. Inleiding	7
1.1 Multiple sclerose	7
1.1.1 Klinische symptomen en verloop	
1.1.2 Epidemiologie	
1.1.3 Pathogenese	
1.1.4 Behandelingen	
1.2 Het immuunsysteem	10
1.2.1 T-lymfocyten	
1.2.2 Dendritische cellen	
1.3 Training en immunologie	14
1.3.1 Effect van training op het ziekteverloop van MS	
1.3.2 Effect van training op het immuunsysteem	
1.3.2.1 Effect van training op DCs	
1.3.2.2 Effect van training op cytokines	
1.4 Doel van de studie	17
2. Materiaal en Methoden	18
2.1 Studiepopulatie en studieopzet	18
2.2 Karakterisering circulerende DCs en Tregs	19
2.2.1 Celtelling	
2.2.2 PBMC isolatie met Ficoll dichtheitsgradiënt	
2.2.3 Treg karakterisering	
2.2.4 DC fenotype bepaling	
2.2.5 Bepaling van DC activatie en functie na TLR ligatie	
2.2.6 Flowcytometrie	
2.3 Analyse van immuunmodulerende moleculen in plasma en serum	24
2.3.1 ELISA	
2.3.1.1 Principe	

2.3.1.2 Toepassing	
2.3.2 Serum isolatie	
2.3.3 CBA	
2.3.3.1 Principe	
2.3.3.2 Toepassing	
2.4 Immuunmodulerend effect van serum	25
2.4.1 Selectie MOG/MBP en/of CMV responders	
2.4.2 ELISpot	
2.4.2.1 Principe	
2.4.2.2 Toepassing	
2.5 Statistische analyse	27
3. Resultaten	28
3.1 Effect van training op aantal en fenotype van circulerende DCs en Tregs	28
3.1.1 Treg karakterisering	
3.1.2 Bepaling van het aantal en fenotype van DCs	
3.1.2.1 Aantal DCs	
3.1.2.2 DC fenotype	
3.1.3 Bepaling van DC fenotype en functie na TLR ligatie	
3.1.3.1 Expressie van DC activatiemerkers na TLR ligatie	
3.1.3.2 Productie van pro-inflammatoire cytokines na TLR ligatie	
3.2 Analyse van immuunmodulerende moleculen in serum	35
3.2.1 Serumconcentraties van pro- en anti-inflammatoire cytokines	
3.2.2 Immuunmodulerend effect van het serum voor en na training	
4. Discussie	37
Referentielijst	41
Dankwoord	45

Samenvatting

Multiple sclerose (MS) is een chronische ontstekingsaandoening van het centraal zenuwstelsel. Door een auto-immuunrespons tegen myeline-antigenen treedt er degeneratie van de myelineschede rond axonen op. MS kan momenteel nog niet voorkomen of curatief behandeld worden. De huidige standaardbehandeling voor MS patiënten is een symptomatische behandeling met corticosteroïden, welke het gehele immuunsysteem onderdrukken. Recent hebben ook verschillende immuunmodulerende behandelingen hun weg naar de kliniek gevonden: (i) IFN β , (ii) tysabri of natalizumab en (iii) glatirameeracetaat. Fysieke inspanning kan ziektegerelateerde symptomen verminderen en de levenskwaliteit van MS patiënten verbeteren. Hoewel de onderliggende mechanismen nog niet helemaal ontrafeld zijn, beïnvloedt fysieke inspanning het immuunsysteem, welk gekarakteriseerd is door een overmatige inflammatoire component in MS patiënten. Dendritische cellen (DCs) zijn gespecialiseerde antigeen presenterende cellen en spelen een belangrijke rol in de initiatie en modulatie van het immuunantwoord omdat ze B- en T-cellen efficiënt kunnen stimuleren. Daarom wordt er gedacht dat DCs een centrale rol spelen in de pathogenese van verschillende auto-immuunziekten zoals MS. Een potentiële therapeutische optie voor auto-immuunziekten zou modulatie van DCs kunnen zijn. Om de rol van DCs in de pathogenese van MS te identificeren werd in deze thesis het chronische effect van gecombineerde training bepaald op (i) het aantal, fenotype en functie van DCs van MS patiënten; (ii) op regulerende T-cellen en (iii) op circulerende cytokines. Verkregen resultaten duiden erop dat het absolute aantal van DCs lager ligt in MS patiënten en dat circulerende DCs in MS patiënten zich in een meer matuur stadium bevinden in vergelijking met gezonde controlepersonen. Na 6 weken training vertonen circulerende mDCs in MS patiënten een verminderde expressie van maturatiemerkers, CD86 en CCR7. Daarnaast lijken plasmacytoïde DCs van MS patiënten gevoeliger te zijn voor Toll-like receptor ligatie. Ook al konden er geen verschillen aangetoond worden in relatieve aantallen van Treg subsets tussen gezonde controlepersonen en MS patiënten, toch werd er een significant verschil geobserveerd na 6 weken in zowel de getrainde als de sedentaire MS patiënten. IL-8 serumconcentraties blijken lager te liggen in MS patiënten dan in gezonde controlepersonen, maar stijgen na 6 weken training in MS patiënten. Samengevat suggereren onze resultaten een immuunmodulerend effect van fysieke inspanning bij MS patiënten.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disorder of the central nervous system. An auto-immune response against myelin antigens causes degeneration of the myelin sheath around axons. The current standard treatment for MS patients is a symptomatic treatment with corticosteroids, which suppress the entire immune system. Recently, a variety of immune-modulating treatments can be applied: (i) IFN β , (ii) tysabri or natalizumab and (iii) glatirameracetate. Physical exercise can reduce disease-related symptoms and enhance quality of life in patients with MS. Although the underlying mechanisms are not completely understood, physical exercise may influence immune function, which is characterized by an excessive inflammatory component in MS patients. Dendritic cells (DCs) are specialized antigen-presenting cells and play a pivotal role in the initiation and modulation of the immune response since they are able to efficiently stimulate B- and T-cells. DCs are thought to play a pivotal role in the pathogenesis of several auto-immune disorders. A potential therapeutic option for auto-immunity could be modulation of DCs. To define the role of DCs in the pathogenesis of MS the chronic effect of combined exercise on the number, phenotype and function of DCs of MS patients was determined in this thesis as well as the effect on regulatory T-cells (Tregs) and circulating cytokines. Obtained results indicate that circulating DCs of MS patients display a more mature phenotype in comparison with DCs from healthy controls, and that the absolute number of DCs is lower in MS patients. After six weeks of combined exercise circulating mDCs of MS patients display a reduced expression of maturation markers, CD86 and CCR7. Plasmacytoid DCs of MS patients seem to be more sensitive to Toll-like receptor ligation. Although there were no significant differences in relative numbers of Treg subsets between healthy controls and MS patients, there was a significant difference observed after 6 weeks in the trained and untrained MS patients. IL-8 serum concentrations are lower in MS patients in comparison with healthy controls, but are upregulated after 6 weeks of training in MS patients. Our results suggest a possible immune-modulating effect of physical exercise.

Lijst met gebruikte afkortingen

°C	graden Celsius
µL	microliter
APC	antigeenpresenterende cel
APC	allophycocyanin
AZ	aminozuur
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium
BDCA	blood dendritic cell antigen
BMI	body mass index
CBA	cytometric bead assay
CCR	C-C chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
CMV	cytomegalovirus
COPD	chronische obstructieve pulmonaire aandoeningen
CRP	C-reactive protein
CTL	cytotoxische T-lymfocyt
Cy	cyanine
DC	dendritische cel
EAE	experimentele auto-immuun encephalomyelitis
EDTA	ethyleendiaminetetra-acetaat
EDSS	expanded disability status scale
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme-linked immunosorbent spot
FACS	fluorescence-activated cell sorting
fg	femtogram
FITC	fluorescein isothiocyanaat
FOXP3	forkhead box P3
Gem	gemiddelde
HC	healthy controls
HLA	humane leukocytantigenen
HRP	horseradisch peroxidase
Id	identiteit
IFN	interferon
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
IQ	imiquimod
kg	kilogram
L	liter
LPS	lipopolysaccharide
m	meter

M	molair
MBP	myelin basic protein
mDC	myeloïde dendritische cel
MFI	mean fluorescence intensity
mg	milligram
MHC	majeure histocompatibiliteit complex
min	minuten
mL	milliliter
Mm	millimolair
MOG	myeline oligodendrocyt glycoproteïne
MRI	magnetic resonance imaging
MS	multiple sclerose
nm	nanometer
PB	pacific blue
PBMC	perifeer bloed mononucleaire cellen
PBS	phosphate-buffered saline
pDC	plasmacytoïde dendritische cel
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll proteins
pg	picogram
PHL	provinciale hogeschool limburg
PP-MS	primair-progressieve MS
PVDF	polyvinylidene difluoride
RBC	rode bloedcellen
REVAL	studiecentrum voor revalidatie-onderzoek, van de PHL
rpm	rotaties per minuut
RR-MS	relapsing-remitting MS
SD	standaarddeviatie
SP-MS	secundair-progressieve MS
SST	serum-separating tube
SVC	spotvormende cellen
TCR	T-cel receptor
TGF β	transforming growth factor- β
T _H	T helper cel
TLR	Toll-like receptor
TMB	tetramethylbenzidine
TNF	tumor necrosis factor
Treg	regulerende T-lymfocyt
V450	violet 450
VO ₂	volume zuurstofgas
WBC	witte bloedcellen

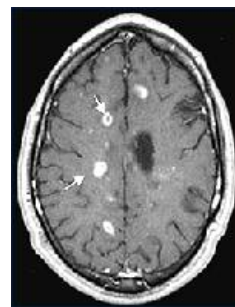
1. Inleiding

1.1 Multiple sclerose

1.1.1 Klinische symptomen en verloop

Multiple sclerose (MS) is een chronische ontstekingsaandoening van het centraal zenuwstelsel. Door een auto-immuunrespons tegen myeline-antigenen treedt er degeneratie van de myelineschede rond axonen op (Wingerchuk et al., 2001). De meeste patiënten vertonen klinische symptomen met betrekking tot motorische, sensorische, visuele en autonome systemen. Daarnaast kunnen er nog vele andere symptomen optreden, welke bijdragen tot een aanzienlijke handicap. Enkele voorbeelden zijn pijn, moeheid, epilepsie, en cognitieve problemen. Om de diagnose van MS te stellen is beeldvorming met magnetische resonantie (MRI) zeer belangrijk. Bij 95% van de patiënten zijn er op MRI focale of confluyente plaques te zien in het centraal zenuwstelsel (**Fig. 1**).

Toch zijn enkel deze plaques niet voldoende om de diagnose van MS te stellen (McDonald et al., 2001). Het klinisch verloop van deze ziekte is zeer heterogeen. Over het algemeen zijn er twee vormen van MS. De meest voorkomende vorm is relapsing-remitting MS (RR-MS) en komt voor in 80% van de patiënten. In deze vorm worden periodes van ziekte afgewisseld met volledige of onvolledige remissies.



Figuur 1: MRI beeld van de hersenen met MS plaques (http://www.umm.edu/ms/what_is_ms.htm).

Initieel is inflammatie tijdelijk en komt remyelinatie voor, maar dit is niet langdurig. Hierdoor wordt het vroege ziekteverloop gekarakteriseerd door periodes van neurologische problemen, die meestal herstellen. Na een aantal jaar herstellen de neurologische problemen minder en minder, wat leidt tot accumulatie van symptomen. RR-MS gaat dan over in een secundair-progressieve vorm (SP-MS). Hier verergert de ziekte traag, maar ononderbroken. 20% van de patiënten lijden aan een andere vorm van MS, de primair-progressieve vorm (PP-MS). Hier verergert de ziekte langzaam vanaf aanvang van ziekte, en zijn opflakkingen afwezig. In beide gevallen start de progressieve vorm rond de leeftijd van 40 jaar. Een kleine fractie van MS patiënten ontwikkelt een atypische ernstige ziekte, welke tot een enorme handicap of zelfs tot de dood leidt in slechts enkele maanden (Confavreux and Vukusic, 2006). Opflakkingen worden gedefinieerd op basis van klinische criteria, maar algemeen wordt aanvaard dat ze gepaard gaan met focale plaques in het centraal zenuwstelsel. Opflakkingen kunnen moeilijk voorspeld worden en de graad van herstel varieert (Tremlett et al., 2008).

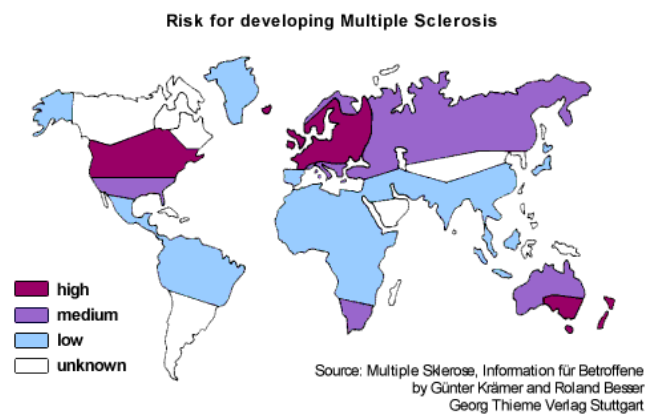
De graad van invaliditeit bij MS patiënten wordt gemeten met de EDSS-schaal, dit staat voor Expanded Disability Status Scale. John Kurtzke ontwikkelde de EDSS-schaal in 1983. Deze schaal werkt met scores tussen 0 en 10: hoe hoger de score, hoe ernstiger de functionele beperkingen (**Tabel 1**). De EDSS-schaal meet de functionele afname door MS in 8 verschillende functionele systemen van het centraal zenuwstelsel. MS patiënten kunnen zeer lang op hetzelfde niveau blijven en op een ander moment een snelle evolutie doormaken, de EDSS-schaal is dus niet lineair. Het kan zelfs zijn dat een MS patiënt zakt op de EDSS-schaal als gevolg van herwonnen mobiliteit.

Tabel 1: EDSS-schaal (Kurtzke, 1983)

0	normale neurologische bevindingen
1	geen invaliditeit, minimale verschijnselen in één functioneel systeem
2	minimale invaliditeit in één functioneel systeem
3	matige invaliditeit in één functioneel systeem, wandelen zonder hulp is mogelijk
4	500 meter zonder hulp stappen is mogelijk, maar ernstige invaliditeit in één functioneel systeem
5	200 meter wandelen zonder hulp of rustpauze kan, maar invaliditeit is te ernstig om voltijds te kunnen werken
6	wandelstok, kruk of looprek is nodig om 100 meter te kunnen wandelen, al dan niet met rustpauze
7	niet meer in staat om meer dan 5 meter te gaan, zelfs met hulp; zelfstandig bewegen en in en uit rolstoel stappen is mogelijk
8	afhankelijkheid van bed of stoel; gebruik van de armen is mogelijk maar hulp nodig bij verplaatsen van stoel naar bed enz.
9	hulpbehoevend en bedlegerig, communiceren met anderen en eten is mogelijk
10	overlijden als gevolg van MS

1.1.2 Epidemiologie

MS is de meest voorkomende neurologische aandoening in jongvolwassenen in de westerse wereld. In 1975 suggereerde John Kurtzke dat de distributie van MS in drie frequentiezones kan verdeeld worden (**Fig. 2**). Een hoge prevalentie ($>30/10^5$) wordt teruggevonden in Noord Europa, Noord Amerika, Canada, Zuid Australië en Nieuw Zeeland. In Zuid Europa, Zuid Amerika en Noord Australië is er een gemiddelde prevalentie ($5-30/10^5$). Er zijn ook gebieden met een lage prevalentie ($<5/10^5$), zoals Azië, Zuid Amerika, en andere gebieden. Het komt er dus op neer dat de prevalentie van MS stijgt met de afstand tot de evenaar (Kurtzke, 1975a; Kurtzke, 1975b).



Figuur 2: Distributie van MS op wereld schaal (http://www.hendess.net/ms_e.htm).

Over het algemeen lijden meer vrouwen aan een auto-immuunziekte dan mannen, ook bij MS is dit zo. MS komt 2 tot 3 maal vaker voor in vrouwen dan in mannen. De klinische presentatie verschilt ook tussen mannen en vrouwen. In vrouwen treden de symptomen vroeger op (RR-MS), maar mannen vertonen een progressieve en ernstigere ziekte (Beeson, 1994).

1.1.3 Pathogenese

MS wordt gekarakteriseerd door een complexe relatie tussen individuele genetische vatbaarheid en omgevingsfactoren. Tweelingstudies zijn belangrijk om genetische invloeden van omgevingsfactoren te scheiden. Er is aangetoond dat er een hogere concordantie is in eeneiige dan in twee-eiige tweelingen, wat een genetische invloed suggereert. Eeneiige vrouwelijke tweelingen uit Canada bijvoorbeeld hebben een concordantie van 38%, terwijl twee-eiige tweelingen een concordantie van 4% hebben (Ebers, 2008). Omgevingsfactoren die opflakkingen kunnen opwekken zijn infecties, de postpartum periode, weinig fysieke activiteit, roken en stress (D'hooghe et al., 2010).

Daarnaast blijkt uit verschillende experimentele resultaten dat MS, ten minste gedeeltelijk, een T-celgedemedieerde auto-immuunziekte is. (i) De plaques in het centraal zenuwstelsel bevatten T-cellen (zie §1.2.1). (ii) Experimentele auto-immuun encephalomyelitis (EAE), een diermodel voor MS, kan geïnduceerd worden door adoptieve transfer van myelinespecifieke CD4⁺ T-cellen van zieke naar naïeve dieren (Ben-Nun et al., 1981). (iii) Bepaalde MHC klasse II allelen zijn genetische risicofactoren voor de ontwikkeling van MS, voornamelijk het *DRB1*1501* allel (Oksenberg et al., 2008). (iv) Er treedt klonale expansie op van zowel T- als B-celpopulaties, wat wil zeggen dat er reactiviteit is tegen een aantal onbekende antigenen (Babbe et al., 2000). (v) Individuele T-celklonen kunnen geïdentificeerd worden in het bloed van MS patiënten gedurende lange tijd. Dit duidt op een sterk aanhoudende respons en dat antigeenblootstelling een belangrijk kenmerk van MS is (Skulina et al., 2004). Deze data suggereren dat MS zich ontwikkelt in genetisch vatbare individuen wanneer auto-immune CD4⁺ T_H1-cellen, waarschijnlijk gestimuleerd door infectie, doorheen de bloed-hersenbarrière migreren. De CD4⁺ T_H1-cellen worden vervolgens in de hersenen geactiveerd en oefenen ook daar hun effectorfuncties uit. Hierdoor worden de myelineschede en andere weefselcomponenten beschadigd door toxische effectormoleculen, eventueel in samenwerking met specifieke auto-antilichamen. Er zijn echter ook argumenten tegen het vooropgestelde CD4⁺ T_H1 model. (i) In plaats van CD4⁺ T-cellen zijn CD8⁺ T-cellen het dominante type dat teruggevonden wordt in MS plaques (Booss et al., 1983). (ii) CD8⁺ T-cellen kunnen pathogeen zijn in modellen voor immunologische demyelinatie van het centraal zenuwstelsel (Rivera-Quinones et al., 1998). (iii) T_H1-cellen in MS plaques kunnen ook niet-pathogeen zijn (Moalem et al., 1999). Deze data wijzen er op dat verschillende T-celpopulaties betrokken zijn bij de initiatie, propagatie en modulatie van de ziekte. Bovendien kunnen de cellen die ontsteking in het centraal zenuwstelsel veroorzaken, eveneens bijdragen tot een optimale omgeving voor remyelinatie en herstel. Het verloop van MS en de vorming van plaques is dus afhankelijk van de interactie tussen de verschillende componenten van het immuunsysteem.

Naast de T_H1-cellen zijn er waarschijnlijk nog andere immunologische mechanismen en neurodegeneratieve componenten die bijdragen tot de initiatie, propagatie en modulatie van MS (Lassmann and Ransohoff, 2004). Inderdaad, dendritische cellen (zie §1.2.2) blijken een kritische rol te spelen in de initiatie en progressie van MS (Comabella et al., 2010). Eén van de taken van dendritische cellen (DCs) is het behouden van centrale en perifere T-celtolerantie (zie §1.2.1), dit

is het proces dat zorgt voor de eliminatie of neutralisatie van autoreactieve cellen. DCs doen dit door het induceren van deletie en/of anergie van autoreactieve cellen of door regulerende T-cellen te stimuleren, welke autoreactieve immuunantwoorden inhiberen (zie §1.2.1). De tolerogene capaciteit van DCs is zeer belangrijk voor het bewaren van tolerantie t.o.v. zelf-antigenen in steady-state omstandigheden, in afwezigheid van infectie en/of ontstekingsreacties. Zodoende worden ongewilde immuunantwoorden tegen onschadelijke antigenen vermeden.

Ook cytokines spelen een belangrijke rol in MS. Dit zijn bepaalde proteïnen die geproduceerd worden als reactie op antigenen en toxines of na stimulatie door andere cytokines. In gezonde personen zijn cytokines maar in zeer lage hoeveelheden aanwezig in het perifere bloed of zelfs afwezig. In MS patiënten worden cytokines vaak in verhoogde hoeveelheden aangetroffen in de periferie en in plaques. Daarom gelooft men dat cytokines het ziekteverloop van MS kunnen beïnvloeden. Er wordt een onevenwicht gezien in MS patiënten tussen T_H1 pro-inflammatoire cytokines en T_H2 anti-inflammatoire cytokines (zie §1.2.1). Eén verklaring suggereert dat MS pathologie tot stand komt door een overmatige secretie van pro-inflammatoire T_H1 cytokines zoals $IFN\gamma$, IL-2, IL-12 en $TNF\alpha$. Daarentegen kunnen de anti-inflammatoire T_H2 cytokines zoals IL-4 en IL-10 het ziekteverloop vertragen (White and Castellano, 2008).

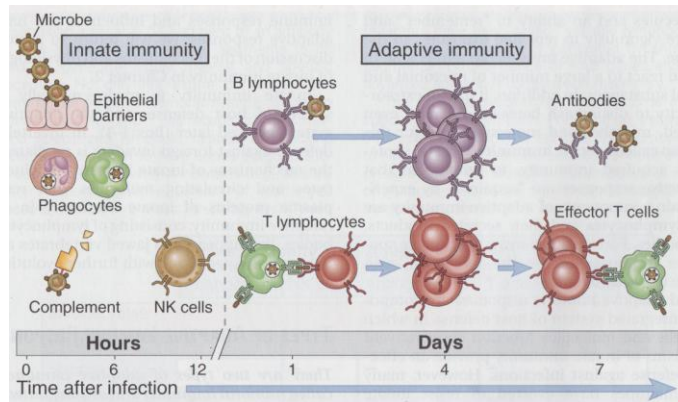
1.1.4 Behandelingen

Momenteel zijn er weinig therapeutische opties om de ziekte af te remmen of te voorkomen. Behandelingen zoals corticosteroiden zijn alleen symptomatisch en werken via een algemene onderdrukking van het afweersysteem. Deze symptomatische behandeling wordt tegenwoordig aangevuld met drie nieuwe klassen immuunmodulerende behandelingen, dewelke ook de frequentie van opflakkingen verlagen: glatirameeracetaat, $IFN\beta$ en tysabri (anti-4-integrine). Geen van de tot op heden beschikbare behandelingen resulteert echter in een genezing.

Daarnaast is er nog een variëteit aan potentieel beïnvloedbare factoren die ook het ziekteverloop van MS kunnen moduleren. Omgevingsfactoren die een gunstige invloed lijken te hebben zijn zwangerschap, het geven van borstvoeding, blootstelling aan zonlicht, hogere vitamine D niveaus en fysieke activiteit. Een goede kennis van deze factoren, alsook een beter inzicht in de onderliggende mechanismen draagt mogelijk bij tot de ontwikkeling van nieuwe en/of alternatieve behandelingsschema's en is essentieel voor de raadgeving aan patiënten (D'hooghe et al., 2010).

1.2 Het immuunsysteem

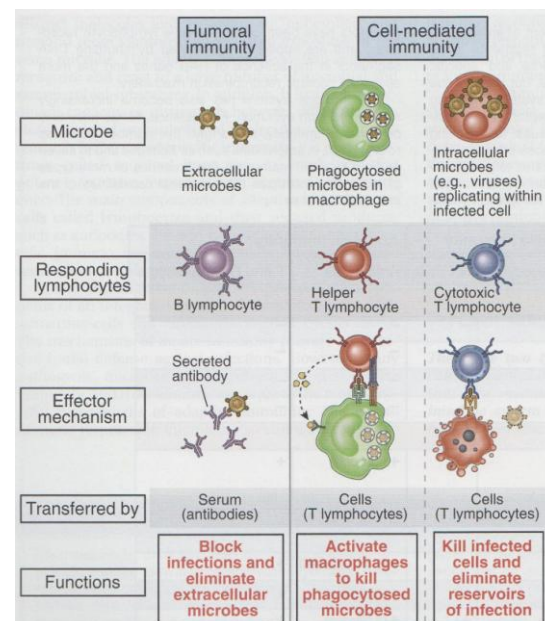
Ons immuunsysteem bestaat uit twee grote takken, namelijk het aangeboren en het adaptief immuunsysteem (**Fig. 3**). Het aangeboren immuunsysteem is het eerste defensiemechanisme dat reageert tegen lichaamsvreemde antigenen, zoals microben. Dit immuunsysteem bestaat uit cellulaire en biochemische defensiemechanismen die permanent doorheen het lichaam patrouilleren en daardoor snel kunnen reageren tegen infecties. Deze mechanismen reageren voornamelijk tegen microben op een niet-specifieke manier en reageren op dezelfde manier na herhaalde blootstelling. Het herkent algemene structuren die voorkomen op allerlei microben en kan geen onderscheid maken tussen deze microben.



Figuur 3: Componenten van het aangeboren en adaptief immuunsysteem (Abbas et al., 2007).

Dit in tegenstelling tot het adaptief immuunsysteem, welk gestimuleerd wordt door infectie en telkens krachtiger optreedt na herhaalde blootstelling van dezelfde microbe. Dit immuunsysteem heeft een uitstekende specificiteit voor verschillende moleculen en heeft een geheugen zodat dit systeem na herhaalde blootstelling sneller kan reageren. De voornaamste componenten van het adaptief immuunsysteem zijn de lymfocyten. Vreemde substanties die specifieke immunantwoorden opwekken worden antigenen genoemd. Lymfocyten herkennen de antigenen op een specifieke manier en reageren er op.

Er zijn twee types adaptieve immunreacties, namelijk humorale en cellulaire immuniteit (**Fig. 4**). Humorale immuniteit komt tot stand door antilichamen geproduceerd door B-lymfocyten (B-cellen). Antilichamen herkennen microbiële antigenen waardoor deze microben geneutraliseerd worden of gemerkt worden voor verschillende eliminatiemechanismen. Cellulaire immuniteit is het gevolg van T-lymfocyten (T-cellen). Virussen en sommige bacteriën kunnen overleven in fagocyten en andere gastheercellen, waardoor ze dus niet bereikbaar zijn voor bloedcirculerende antilichamen. Cellulaire immuniteit activeert enerzijds de fagocyten waardoor ze de intracellulaire microben kunnen vernietigen en lyseert anderzijds geïnfecteerde cellen om zo het infectiereservoir te verwijderen.



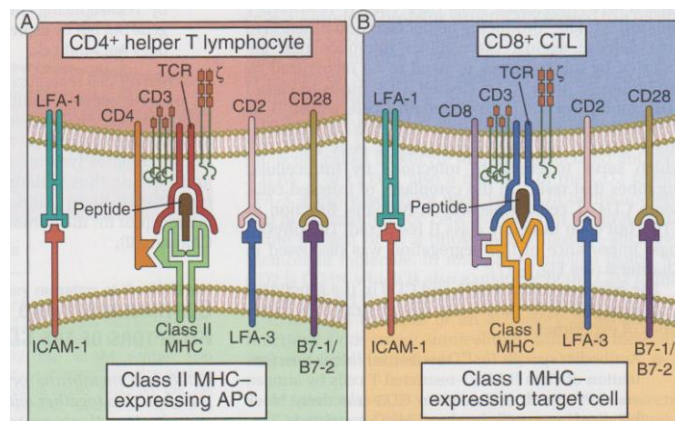
Figuur 4: Types van adaptieve immunreacties (Abbas et al., 2007).

1.2.1 T-lymfocyten

T-lymfocyten herkennen antigenen van intracellulaire microben via membraangebonden antigeenreceptoren, de T-cel receptor (TCR). T-cellen herkennen enkel peptide-antigenen als ze gekoppeld zijn aan een MHC-complex. Dit staat voor 'majeure histocompatibiliteit complex' en bestaat uit lichaamseigen proteïnen die tot expressie komen op het oppervlak van andere cellen. Menselijke MHC moleculen worden humane leukocytantigenen (HLA) genoemd. Een voorbeeld

hiervan is HLA-DR, welk een MHC klasse II molecule is. T-cellen reageren dus niet op vrije antigenen, maar op oppervlaktegebonden antigenen. Er zijn verschillende soorten T-lymfocyten, waaronder de T helper (T_H) lymfocyten en de cytotoxische T-lymfocyten (CTL). Als reactie op antigeenblootstelling produceren T_H -cellen bepaalde cytokines die de proliferatie en differentiatie van T_H -cellen stimuleren, alsook de activatie van andere cellen zoals B-cellen en macrofagen. Geactiveerde macrofagen kunnen dan de microben in hun fagosomen vernietigen. CTL vernietigen cellen die vreemde antigenen produceren, zoals geïnfecteerde cellen, en verwijderen zo de virusreservoirs. Dan zijn er nog regulerende T-cellen, welke voornamelijk het immuunantwoord inhiberen.

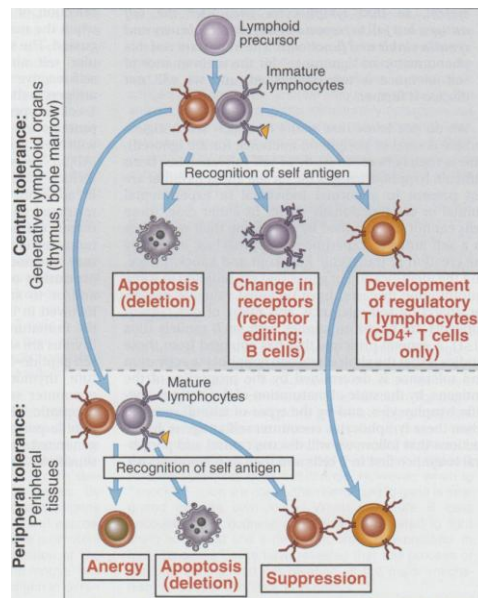
T_H -cellen worden gekenmerkt door expressie van CD4 moleculen op hun membraan terwijl CTL gekenmerkt worden door expressie van CD8. CD4 en CD8 zijn beide coreceptoren voor T-celactivatie door antigeenherkenning. Antigeenpresenterende cellen (APC) presenteren antigenen aan T-cellen in een MHC-complex. De TCR herkent het antigeen-MHC-complex, terwijl CD4 of CD8 ook binden aan de MHC molecule. CD4 bindt aan een niet-polymorfe regio van MHC klasse II moleculen en CD8 bindt aan een niet-polymorfe regio van MHC klasse I moleculen. Costimulerende moleculen, zoals CD80 en CD86, zijn echter noodzakelijk om de T-cel te activeren (**Fig. 5**). Zonder costimulatie kan er immers geen activatie, en dus ook geen immuunreactie, plaatsvinden. Als de T-cel alle signalen ontvangt voor activatie worden deze signalen doorgegeven aan CD3. Dit is een signaaltransductiemolecule die instaat voor de activatie van de T-cel. (**Fig. 5**).



Figuur 5: Interactie van een $CD4^+$ helper T-cel met een APC (A), en interactie van een $CD8^+$ CTL met een doelcel (B). CD28 is een typische costimulatie receptor. B7-1 = CD80, B7-2 = CD86 (Abbas et al., 2007).

Er zijn verschillende types van T_H -cellen. T_H1 -cellen secreteren pro-inflammatoire cytokines, waaronder $IFN\gamma$, IL-2, lymfotoxine en $TNF\alpha$. T_H1 -cellen stimuleren dus het cellulair immuunsysteem en activeren macrofagen die microben in hun fagosomen bevatten. T_H2 -cellen secreteren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 en $TGF\beta$, welke anti-inflammatoir werken. T_H2 -cellen vormen de adaptieve immuunrespons tegen parasitaire infecties. Dan is er nog een derde type, namelijk T_H17 -cellen, die als voornaamste cytokine IL-17 secreteren. Ook deze subset is net als T_H1 -cellen pro-inflammatoir. De T_H1 - en T_H17 -cellen worden verantwoordelijk geacht voor de auto-immuunreactie tegen myeline-antigenen in MS.

Anti-inflammatoire cytokines van het T_H2 type worden geassocieerd met remissie van de ziekte. Dit is in tegenstelling tot T_H1 en T_H17 type cytokines, welke pro-inflammatoir zijn en een sleutelrol spelen in de pathogenese van MS (Golzari et al., 2010). Regulerende T-cellen (Tregs) zijn ook een type van T_H -cellen. Zij brengen immers ook CD4 tot expressie op hun membraan. Tregs ontstaan in de thymus. Immature lymfocyten komen daar in contact met lichaamseigen antigenen. Wanneer lymfocyten daar zelf-antigenen herkennen met een hoge affiniteit, ondergaan ze apoptose. In het andere geval ontwikkelen deze $CD4^+$ T-cellen zich tot Tregs (**Fig. 6**). Deze Tregs spelen een rol in perifere tolerantie: ze onderdrukken immuunantwoorden gericht tegen lichaamseigen antigenen en inhiberen T-celactivatie en T-cel-effector functies. De twee voornaamste subtypes van Tregs zijn de natuurlijk voorkomende Tregs en de antigeengeïnduceerde Tregs. De natuurlijk voorkomende Tregs die ontstaan in de thymus zijn $CD4$ en $CD25$ (IL-2 receptor α keten) positief en worden gekarakteriseerd door de transcriptiefactor forkhead box P3 (FOXP3). FOXP3 is cruciaal voor de ontwikkeling en functionaliteit van $CD4^+CD25^+$ Tregs. Deze Treg subset heeft immuunonderdrukkende eigenschappen en vertegenwoordigt 5-10% van de perifere $CD4^+$ T-cellen. De antigeengeïnduceerde Tregs worden gekarakteriseerd door expressie van immuunonderdrukkende cytokines zoals IL-10 en/of TGF β . In normale omstandigheden reguleren Tregs immuunantwoorden en voorkomen ze auto-immuniteit. Afwijkingen in Treg functie of aantal kan leiden tot verlaagde immuniteit of auto-immuniteit (Cools et al., 2007).



Figuur 6: Centrale en perifere tolerantie tegen lichaamseigen antigenen (Abbas et al., 2007).

1.2.2 Dendritische cellen

DCs zijn de meest gespecialiseerde APCs en vormen de link tussen het aangeboren en adaptieve immuunsysteem. Twee subsets binnen de DCs werden gekarakteriseerd, namelijk myeloïde DCs (mDCs) en plasmacytoïde DCs (pDCs), en vertonen verschillen zowel wat betreft expressie van membraanmerkers als functionaliteit. mDCs ontstaan in het beenmerg en migreren via de bloedcirculatie naar allerlei weefsels, waar ze met microben in contact kunnen komen. mDCs worden gekenmerkt door expressie van CD1c (BDCA-1) op hun membraan. Daarnaast brengen mDCs verschillende Toll-like receptoren (TLR) tot expressie. Bijvoorbeeld TLR-4 dat na binding

met lipopolysaccharide (LPS), een gram-negatief bacterieel peptidoglycaan, zorgt voor een intracellulaire signaaltransductiecascade waardoor mDCs geactiveerd worden. Na activatie secreteren mDCs voornamelijk IL-6, IL-12 en TNF α en is hun voornaamste functie antigeenspecifieke T-cellen stimuleren. pDCs lijken morfologisch op plasmacellen en verkrijgen de typische DC morfologie pas na activatie, namelijk een grillige cel met uitlopers. Ze worden in het bloed gevonden als precursors en in kleine aantallen in de lymfoïde organen. pDCs worden gekenmerkt door expressie van CD303 (BDCA-2) en brengen daarnaast eveneens enkele TLR tot expressie, meer bepaald deze die specifiek zijn voor virale nucleïnezuren, zoals TLR-7 en TLR-9. Imiquimod (IQ) kan via binding met TLR-7 pDCs stimuleren. Als ze geactiveerd zijn produceren pDCs hoge hoeveelheden type 1 interferon (IFN α) en spelen ze een belangrijke rol in de verdediging tegen virussen (Suchanek et al., 2010).

Immature DCs worden teruggevonden in verschillende perifere organen en weefsels (darm, long, huid, ...). Deze wijdverspreide verdeling van DC onderlijnt hun belangrijke immunologische functie: ze patrouilleren als het ware het lichaam om indringers en ziekteverwekkers te fagocyteren en vervolgens de opgenomen antigenen aan T-cellen te presenteren zodat een efficiënte immuunrespons gegenereerd wordt. Door de expressie van C-C chemokine receptor (CCR) 5 migreren immature DCs vanuit het beenmerg naar de periferie en blijven daar tot ze geactiveerd worden. Immature DCs gelegen in epitheel- en bindweefsel nemen microben op die van het extern milieu afkomstig zijn. Dit doen ze via membraanreceptoren zoals mannose receptoren. Die receptoren binden de microben zodat ze opgenomen kunnen worden via endocytose. De DCs verwerken deze microben tot antigenen, die ze dan presenteren in een MHC complex. Gelijktijdige maturatie van DCs, na contact met zogenaamde gevaarsignalen (bijvoorbeeld TLR liganden en heat shock proteïnen), is een cruciale stap voor hun T-cel-stimulerende en -polariserende activiteit. Het maturatieproces van DCs is een complex proces en houdt onder meer opregulatie van costimulerende moleculen in, zoals CD80 en CD86, alsook afname van de expressie van CCR5 en gelijktijdige opregulatie van CCR7. Deze receptor is specifiek voor chemokines die geproduceerd worden in de T-celzones van de lymfeknopen, en hierdoor migreren mature DCs naar de lymfeknopen. CCR7 komt ook tot expressie op naïeve T-cellen; ze migreren dus naar dezelfde regio's als antigeenpresenterende DCs. Ook CD62L, een selectine, helpt bij de migratie van mature DCs en naïeve T-cellen naar de lymfeknopen. Daarnaast vertonen mature DCs ook een verhoogde expressie van MHC moleculen op hun membraan en secreteren ze cytokines die de differentiatie van antigeenspecifieke effector T-cellen stimuleren (vb. IL-1, IL-6, TNF α en IL-12). Door het uitscheiden van een aantal cytokines kunnen DCs naïeve T-cellen in verschillende subtypes van T_H-cellen laten differentiëren. Dit wordt T-celpolarisatie genoemd, en induceert cellulaire immuniteit. Deze T_H-cellen migreren dan naar bepaalde locaties waar het immuunantwoord het meest nodig is.

1.3 Training en immunologie

1.3.1 Effect van training op het ziekteverloop van MS

Fysieke training bij MS patiënten werd vroeger afgeraden. Dit advies werd gegeven omdat de symptomen van sommige patiënten tijdens training verergerden. Bovendien redeneerde men dat de patiënt dan meer energie overhield voor dagelijkse activiteiten. Dit advies resulteerde echter in een vicieuze cirkel. Inactiviteit leidt immers tot gezondheidsproblemen zoals osteoporose,

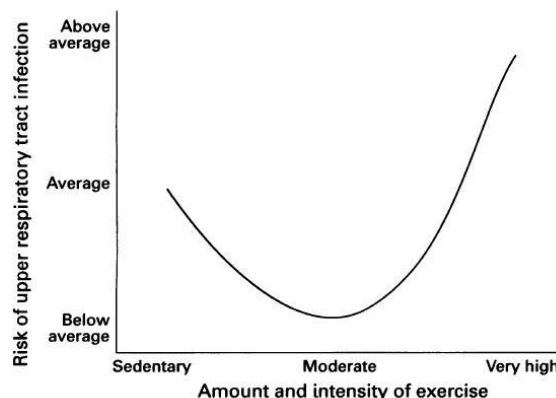
depressie, en moeheid. Hierdoor wordt de patiënt nog minder actief. In 1988 toonde Schapiro et al. aan dat uithoudingstraining wel goed getolereerd wordt door MS patiënten en zelfs voordelige effecten heeft (Schapiro et al., 1988). Fysieke activiteit bestaat uit twee extremen, namelijk krachttraining en uithoudingstraining. Krachttraining resulteert in een stijging van de spiermassa en verbeterde neuronale activatie. Uithoudingstraining resulteert in een verbeterde functie van zowel het cardiorespiratoir als neuromusculair systeem. Het is waarschijnlijk dat een aantal beperkingen gezien in MS patiënten te wijten zijn aan inactiviteit en niet aan onherstelbare weefselschade. Dit wordt bevestigd door een aantal studies waarin patiënten die deelnamen aan een trainingsprogramma verbeterden op verschillende vlakken. Het dient hierbij opgemerkt te worden dat beperkingen die het gevolg zijn van MS zelf waarschijnlijk niet reversibel zijn, terwijl beperkingen die het gevolg zijn van inactiviteit dit waarschijnlijk wel zijn (Dalgas et al., 2009).

Het afraden van training was vooral gebaseerd op het acuut effect van training. Tijdens training ondervindt 40% van de patiënten een verhoging van intensiteit en aantal van sensorische symptomen. Dit blijkt echter een tijdelijk fenomeen te zijn en 85% van de patiënten keert terug naar zijn normale waarden een halfuur na training (Smith et al., 2006). Op lange termijn bleek training voordelige effecten te hebben, en hierdoor verbeterde de levenskwaliteit van MS patiënten.

1.3.2 Effect van training op het immuunsysteem

De relatie tussen training en vatbaarheid voor infecties kan voorgesteld worden door een J-curve (Fig. 7). Dit wil zeggen dat matige activiteit het immuunsysteem stimuleert, terwijl overmatige activiteit immuunonderdrukkend werkt. Daarom worden er bij topsporters o.a. vaker luchtweginfecties vastgesteld (Nieman, 1994). Een fysieke inspanning gaat met zowel cellulaire als humorale immuunantwoorden gepaard, die gelijkaardig zijn aan deze geïnduceerd door infectie.

Het aantal circulerende witte bloedcellen stijgt aanzienlijk na fysieke activiteit. Maar ook de plasmaconcentraties van pro-inflammatoire cytokines, anti-inflammatoire cytokines en acute fase proteïnen (aangeboren immuniteit) stijgen (Lancaster et al., 2004). Er gebeuren ook hormonale veranderingen na fysieke inspanning zoals een stijging in de plasmaconcentratie van adrenaline, cortisol, groeihormoon en prolactine (Steensberg et al., 2003). Al deze substanties hebben niet alleen een invloed op het immuunsysteem, maar ook op andere orgaansystemen zoals het zenuwstelsel.



Figuur 7: De relatie tussen training en vatbaarheid voor infecties voorgesteld als een J-curve (Nieman, 1994).

1.3.2.1 Effect van training op DCs

Suchánek et al. hebben het acuut effect van training in sportlui nagegaan. Er werd een significante toename gedetecteerd in de absolute aantallen van alle witte bloedcelpopulaties in perifeer bloed onmiddellijk na de inspanningsproef, waarvan DCs en lymfocyten het meeste

toenamen (Suchanek et al., 2010). Deze stijging werd zowel voor mDCs als pDCs waargenomen, maar lag bij de pDCs het hoogst. Ondanks een toename van het aantal DCs, ging dit niet gepaard met een opregulatie van costimulerende moleculen. Inderdaad, er was geen verschil na training in het aantal DCs die costimulerende moleculen tot expressie brengen, en ook niet in de hoeveelheid costimulerende moleculen per cel.

Het chronische effect van uithoudingstraining werd in ratten nagegaan door Chiang et al. Zij volgden twee groepen ratten op, waarvan één groep aan 5 weken uithoudingstraining onderworpen werd. Na die periode werden uit beenmergcellen van de ratten DCs gekweekt en vervolgens gematureerd. Men toonde aan dat langdurige training een invloed heeft op de ontwikkeling van DCs. Het aantal DCs was significant hoger in de getrainde groep dan in de controlegroep. Bovendien was niet alleen het aantal DCs verhoogd na 5 weken uithoudingstraining, ook de DC activiteit was toegenomen. Inderdaad, IL-12 productie was verhoogd in de getrainde groep, alsook de expressie van MHC klasse II moleculen bleek verhoogd te zijn. Er werd geen significant verschil gevonden voor de expressie van CD80 en CD86 (Chiang et al., 2007).

1.3.2.2 Effect van training op cytokines

Fysieke inspanning kan onderverdeeld worden in kracht- of weerstandstraining en uithoudingstraining, en in een acute of chronische (langere termijn) inspanningsproef. Er zou een verband zijn tussen fysieke inspanning en de relatieve concentraties van T_H1 en T_H2 cytokines. Het acuut effect van krachttraining in gezonde personen omvat een stijging van de concentratie van zowel pro- als anti-inflammatoire plasmacytokines. Op lange termijn dalen de pro-inflammatoire cytokines in het plasma, zowel in rust als na fysieke inspanning. Dit is het gevolg van aanpassing aan training (Calle and Fernandez, 2010). Twee studies toonden aan dat de concentratie van IL-10 kort na krachttraining stijgt in ongetrainde gezonde individuen (Hirose et al., 2004); (Smith et al., 2000). Daarnaast wordt een stijging van de concentratie van IL-6 in meerdere studies aangetoond. De IL-6 stijging na weerstandsinspanning blijkt minder hoog te zijn dan de toename die men waarneemt na uithoudingstraining (Pedersen et al., 2007). De levels van TNF α wijzigen niet na acute krachttraining in gezonde personen en na 12 weken krachttraining werd er in rust geen effect op de concentratie van zowel pro- als anti-inflammatoire cytokines gemeten, maar er was wel een daling van CRP (C-reactive protein), een acute fase proteïne (Stewart et al., 2007). Getrainde MS patiënten vertonen een hogere cytokinerespons na een acute uithoudingsinspanning in vergelijking met sedentaire MS patiënten. De respons van getrainde MS patiënten was zelfs gelijkaardig aan deze van gezonde controlepersonen. Uithoudingstraining heeft dus belangrijke immunomodulerende effecten. In rust werden er echter geen verschillen gevonden tussen getrainde en sedentaire MS patiënten (Heesen et al., 2003). Een andere studie stelde vast dat na 8 weken krachttraining de plasmaconcentratie van IL-4, IL-10, CRP en IFN γ in rust daalt in gezonde personen. Krachttraining kan dus ook immunomodulerend zijn (White et al., 2006). De plasmaconcentratie van IL-10 stijgt dus kort na krachttraining (Hirose et al., 2004); (Smith et al., 2000), maar daalt op lange termijn in rust. Golzari et al. hebben het effect van gecombineerde training nagegaan in vrouwelijke MS patiënten. Na 8 weken gecombineerde kracht- en uithoudingstraining waren de plasmaconcentraties van IL-17 en IFN γ significant gedaald. Voor IL-4 werd er geen significant verschil geobserveerd (Golzari et al., 2010).

Voorgaande studies zijn het er over eens dat het acuut effect van training in een stijging van zowel pro- als anti-inflammatoire cytokines resulteert. Maar over het chronische effect zijn er nog wat tegenstrijdigheden. Enerzijds wijzen studies uit dat langdurige krachttraining leidt tot een daling van pro-inflammatoire cytokines in rust (Calle and Fernandez, 2010). Dit zou het gunstig effect van training op MS kunnen verklaren, want volgens White en Castellano (2008) komt de MS pathologie tot stand door overmatige secretie van pro-inflammatoire T_H1 cytokines. Anderzijds stelt men vast dat langdurige krachttraining resulteert in een daling van zowel pro- als anti-inflammatoire cytokines in rust (White et al., 2006). De daling van anti-inflammatoire cytokines kan het gunstig effect van training op MS niet verklaren aangezien productie van deze cytokines het ziekteverloop van MS eerder zouden kunnen vertragen (White and Castellano, 2008). Om patiënten beter te kunnen adviseren over het effect van training zijn dus verdere studies noodzakelijk.

1.4 Doel van de studie

Na een literatuurstudie lijkt er een verband te zijn tussen lichaamsbeweging, bevordering van neurologische functie en een anti-inflammatoire factor bij MS. Tot op heden zijn er echter nog maar een beperkt aantal studies uitgevoerd die het effect van fysieke inspanning op de immunologische status van MS patiënten onderzocht hebben. Bovendien worden in enkele van deze studies tegenstrijdige resultaten bekomen. Uit deze bevindingen blijkt dan ook de noodzaak voor bijkomend onderzoek. Daarom beogen we in deze masterproef het chronische effect van training op fenotype en functie van cellulaire mediators van immuniteit, namelijk DCs en Tregs, in MS verder te onderzoeken. Het gaat hier om een gecombineerde training van uithouding en kracht gedurende 12 weken. Bloedstalen werden verzameld pre (week 0), mid (week 6), en post (week 12) training. In deze masterproef beperken we ons tot de eerste 6 weken van de studieopzet.

In het Laboratorium voor Experimentele Hematologie werd reeds eerder aangetoond dat DCs van MS patiënten verschillen vertonen met betrekking tot hun fenotype en functie vergeleken met DCs van gezonde controlepersonen (Nuyts et al., ingediend voor publicatie). Met behulp van flowcytometrie onderzoeken we het chronische effect van gecombineerde training op het aantal, fenotype en functie van DCs in MS patiënten, in vergelijking met een sedentaire controlegroep, voor en na training. Daarnaast bepalen we de cytokineconcentraties in het serum van patiënten m.b.v. een multiplex immuno-assay en onderzoeken we de aanwezigheid van een immuunonderdrukkende serumfactor d.m.v. ELISpot.

Met dit onderzoek hopen we om een beter inzicht te verkrijgen in de mechanismen betrokken bij de immuunmodulerende rol van fysieke inspanning, alsook van de functie van DCs in de pathogenese van MS.

2. Materiaal en methoden

2.1 Studiepopulatie en studieopzet

Eenentwintig MS patiënten, gediagnosticeerd volgens McDonald criteria (McDonald et al., 2011) werden geïncludeerd (**Tabel 2**), door REVAL, studiecentrum voor revalidatie-onderzoek, van de Provinciale Hogeschool Limburg (PHL) en het Biomedisch Onderzoeksinstituut van de Universiteit Hasselt (Prof. Dr. Bert Op't Eijnde). Exclusiecriteria waren: (i) >3 opflakkingen of >1 punt gestegen op de EDSS schaal in het afgelopen jaar, (ii) chronische obstructieve pulmonaire aandoeningen (COPD), (iii) cardiovasculaire aandoeningen, (iv) andere inflammatoire aandoeningen (acute/chronische infecties, allergieën, reumatoïde artritis of kanker), (v) behandeling met anti-inflammatoire medicatie 28 dagen voor studieaanvang, (vi) zwangerschap, (vii) ernstige psychiatrische aandoeningen, en (viii) elk argument tegen fysieke inspanning. Patiënten werden gerandomiseerd op basis van bloedglucosespiegel, biometrische gegevens en resultaten in kracht- en uithoudingsproef.

Tabel 2: Karakteristieken van geïncludeerde MS patiënten.

UPN	Gewicht (kg)	Lengte (m)	BMI	EDSS	Geslacht	Leeftijd (jaar)	Datum diagnose	Type MS	Medicatie
MS 227	73,2	1,79	22,8	3	0	32	05/'07	RR-MS	Avonex + medrol (vaste tijdstippen)
MS 225	52,5	1,77	16,8	2,5	1	52	09/'00	RR-MS	/
MS 221	90,5	1,66	32,8	1,5	1	40	11/'95	RR-MS	Rebif 44
MS 212	102	1,9	28,3	6	0	60	10/'98	RR-MS	Copaxone
MS 213	98	1,65	36,0	2,5	1	47	11/'07	RR-MS	Avonex
MS 216	53,5	1,63	20,1	2	1	52	01/'95	RR-MS	IFN β
MS 219	63,5	1,64	23,6	2,5	0	65	'02	PP-MS	Avonex
MS 001	73	1,71	22,8	6	1	68	10/'85	PP-MS	/
MS 202*	56,5	1,72	19,1	6	1	49	'82	SP-MS	Avonex
MS 203*	99	1,74	32,7	4	0	40	'03	SP-MS	Avonex + medrol (recent)
MS 205*	88,8	1,88	25,1	2	0	50	01/'01	RR-MS	IFN β
MS 206*	86	1,79	26,8	6	0	64	01/'01	PP-MS	/
MS 207*	65,7	1,63	24,7	3	1	58	06/'98	SP-MS	/
MS 208*	62	1,69	21,7	4,5	0	49	02/'84	SP-MS	Alemtuzumab
MS 209*	62,5	1,62	23,8	2,5	1	52	02/'85	SP-MS	Copaxone
MS 210*	79,2	1,82	23,9	3,5	0	59	08/'06	SP-MS	Rebif 44
MS 211*	62,5	1,62	23,8	1,5	1	38	03/'08	RR-MS	Tysabri
MS 218*	52	1,6	20,3	4	1	51	11/'92	SP-MS	Alemtuzumab
MS 223*	65	1,75	21,2	2,5	0	54	11/'00	RR-MS	Rebif 22
MS 224*	81,5	1,82	24,6	1,5	0	27	05/'08	RR-MS	Tysabri
MS 226*	100	1,63	37,6	1	1	39	05/'07	RR-MS	Copaxone + medrol (recent)
Gem			25,3			49,8			

UPN, Unique Patient Number; EDSS, Expanded Disability Status Scale; BMI, Body Mass Index; RR-MS, Relapsing-Remitting MS; PP-MS, Primair-progressieve MS; SP-MS, Secundair-progressieve MS; Gem, gemiddelde; 0, man; 1, vrouw; * MS patiënten die deelnamen aan de gecombineerde training.

Vervolgens nemen 13 patiënten deel aan een gecombineerde training van uithouding en kracht gedurende 6 weken, terwijl de 8 andere patiënten hun sedentaire levensstijl behouden. Elke trainingssessie start met een gestandaardiseerde opwarming, gevolgd door conditietraining aan 40-70% van de maximale VO₂ capaciteit. Vervolgens voeren de patiënten ook een sessie oefeningen van krachttraining uit. Bloedstalen (< 20 mL) werden afgenomen in rust voor en na 6 weken training om het chronische effect van gecombineerde training te kunnen nagaan. Alle bloedstalen werden binnen 24u na afname verwerkt en/of ingevroren voor verdere analyse van cytokineconcentraties en het immuunonderdrukkend effect van serum en karakterisering van DCs subsets en Tregs met behulp van flowcytometrie. Gezonde controlepersonen (n = 20) werden eveneens geïncludeerd overeenstemmend volgens leeftijd en geslacht, ter vergelijking van de beginwaarden (**Tabel 3**).

Tabel 3: Leeftijd- en geslachtovereenstemmende gezonde controlepersonen.

Id	Gewicht (kg)	Lengte (m)	BMI	Geslacht	Leeftijd (jaar)	Medicatie
HC 001	71	1,78	22,4	0	32	
HC 002	62	1,72	21,0	1	52	
HC 003	74	1,68	26,2	1	42	
HC 004	71	1,72	24,0	0	64	
HC 005	80	1,75	26,1	1	46	
HC 006	54,4	1,61	21,0	1	51	Pantomed
HC 007	85,5	1,76	27,6	0	67	
HC 008	70	1,7	24,2	1	47	
HC 009	89	1,78	28,1	0	44	
HC 010	88	1,93	23,6	0	51	
HC 011	70	1,84	20,7	0	65	
HC 012	105	1,57	42,6	1	55	
HC 013	83	1,88	23,5	0	47	
HC 014	104	1,64	38,7	1	54	L-Thyrone (175 mg), Paroxetine (20 mg)
HC 015	72,5	1,66	26,3	0	58	
HC 016	52	1,62	19,8	1	38	
HC 017	64	1,73	21,4	0	51	
HC 018	56	1,69	19,6	0	28	
HC 019	58	1,71	19,8	1	40	
HC 020	60,5	1,57	24,5	1	68	Libita
Gem			25,1		50	

HC, Healthy Control; Id, Identiteit; BMI, Body Mass Index; Gem, gemiddelde; 0, man; 1, vrouw

2.2 Karakterisering circulerende DCs en Tregs

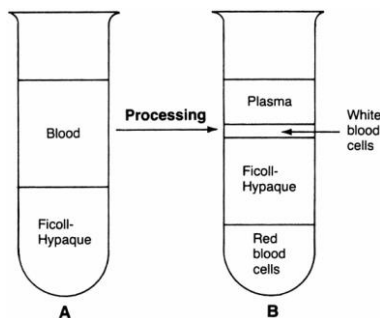
2.2.1 Celtelling

Tijdens de bloedafname werd er een 10 mL heparine tube (BD Biosciences, Erembodegem, België) gevuld. Heparine is een anti-coagulans waardoor bloedstolling wordt vermeden. Allereerst gebeurt er een celtelling op volbloed met behulp van de celteller ABX Micros 60 (Horiba, Deurne, België).

2.2.2 PBMC isolatie met Ficoll densiteitsgradiënt

Perifeer bloed mononucleaire cellen (PBMC) worden geïsoleerd d.m.v. densiteitsgradiëntcentrifugatie. Ficoll-paqueTMPLUS (GE Healthcare, Uppsala, Zweden) is een oplossing van Ficoll natriumdiatrizoaat met de geschikte dichtheid (1.077 ± 0.001 g/mL), viscositeit en osmotische druk om PBMC te isoleren. Ficoll is een sucrosepolymeer en veroorzaakt aggregatie van rode bloedcellen (RBC). RBC aggregaten hebben een dichtheid groter dan 1.077 g/ml, waardoor deze tijdens centrifugatie doorheen de Ficoll-paque kunnen migreren. Ook granulocyten hebben een voldoende grote dichtheid om doorheen Ficoll-paque te migreren, waardoor ze zich bovenop de RBC bevinden na centrifugatie. Lymfocyten hebben daarentegen een lagere dichtheid dan Ficoll-paque en blijven er bovenop liggen na centrifugatie. Samen met andere partikels die een dichtheid lager dan 1.077 g/mL hebben zoals monocyten bevinden lymfocyten zich in de interfase tussen Ficoll-paque en het plasma, dit zijn de PBMC (**Fig. 8**).

Tien mL perifeer bloed wordt 1 op 3 verdund in PBS [1L PBS: 900mL H₂O (Baxter, Lessines, België) en 100mL 10x PBS (Phosphate-buffered saline, Life Technologies, Merelbeke, België)], waarna er 10 mL Ficoll-paque onder het bloed wordt aangebracht. Na 20 min centrifugeren op 2000 rpm wordt de interfase met PBMC geïsoleerd.



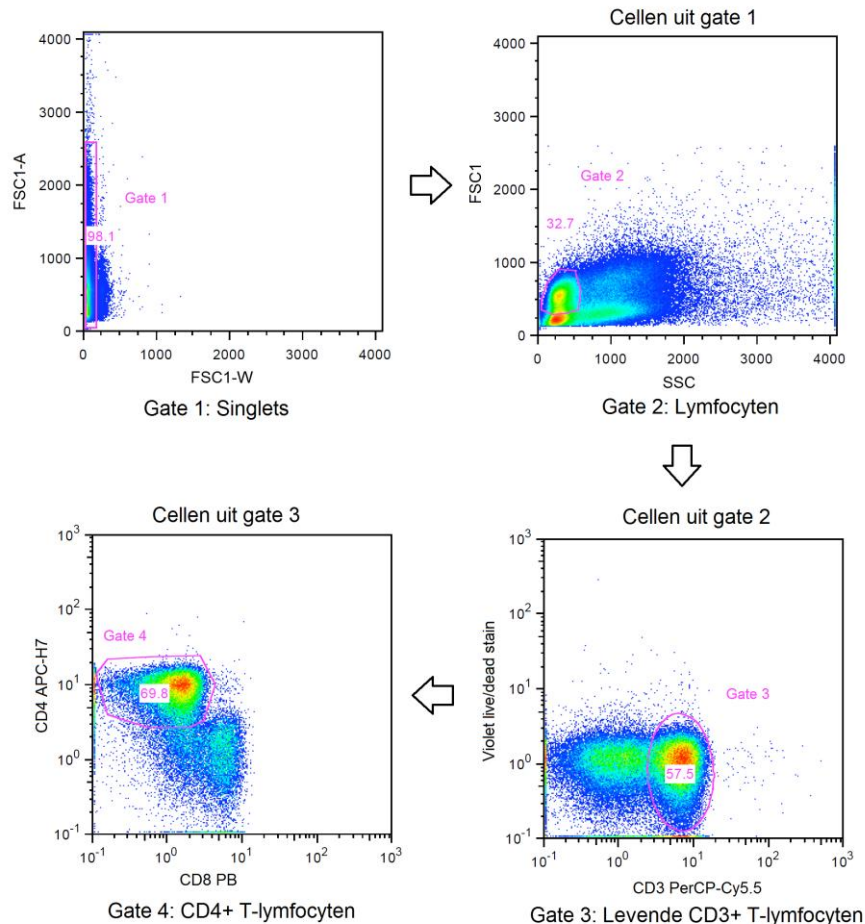
Figuur 8: PBMC isolatie met Ficoll-paque (<http://de-heer.eu/links.cgi>).

2.2.3 Treg karakterisering

PBMC worden gewassen (10 min, 1500 rpm) en geresuspendeerd in 2 mL IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium, Life Technologies) gesupplementeerd met 5% humaan AB serum (Life Technologies) en 2 μ l Brefeldine A (10 mg/ml, Life Technologies). Brefeldine A blokkeert het eiwittransport t.h.v. het Golgi-apparaat waardoor de cytokines in vesikels in de cellen blijven en niet worden gesecreteerd. Na overnacht incubatie bij 37°C en 5% CO₂ worden de cellen gewassen (10 min, 1500 rpm) en aangekleurd voor flowcytometrische analyse.

Dode cellen worden geëxcludeerd met violet live/dead stain (Life Technologies) en de volgende antilichamen worden gebruikt voor analyse van membraanmoleculen: anti-CD3-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences), anti-CD4-APC-H7 (BD Biosciences), anti-CD8-PB (Dako, Enschede, Nederland) en anti-CD25-PE-Cy7 (BD Biosciences). Na 30 min incubatie in het donker op kamertemperatuur worden de cellen gefixeerd en gepermeabiliseerd. Eerst worden de cellen gefixeerd met 1 ml Fix (1/4 FixPerm + 3/4 FixPerm diluent, eBiosciences, Wenen, Oostenrijk). Na 1 uur incubatie in het donker op 4°C worden de cellen tweemaal gewassen (5 min op 2000 rpm) met 2 ml Permbuffer (1/10 Perm + 9/10 H₂O, eBiosciences). Vervolgens worden de cellen aangekleurd voor intracellulaire moleculen met volgende antilichamen: anti-IL-10-APC (BD Biosciences, Pharmingen) en anti-TGF β -PE (IQ products, Groningen, Nederland). Er wordt een

negatieve controle voorzien die niet intracellulair aangekleurd wordt. Na 1 uur incubatie in het donker op 4°C worden de cellen gewassen met 2 ml Permbuffer en geresuspendeerd in 1 ml FACS buffer [1L FACS buffer: 946.7 mL sheath (BD Biosciences), 3.3 mL BSA (Bovine serum albumine, 0.1%, Sigma-Aldrich, Bornem, België) en 50 mL NaN₃ (0.05%)]. De cellen zijn nu klaar om gemeten te worden op de CyFlow® ML flowcytometer (Partec, Münster, Duitsland). Analyse van de resultaten gebeurt met Flowjo software (Tree Star, Inc, Ashland, OR, VS). De toegepaste gatingstrategie om de CD4⁺ T cellen te identificeren wordt verduidelijkt in **Figuur 9**.

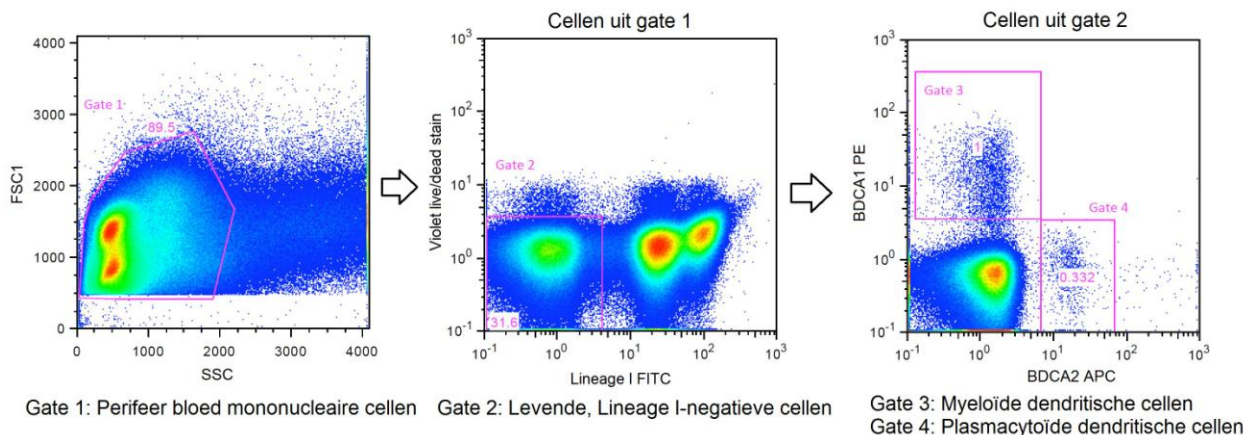


Figuur 9: Toegepaste gatingstrategie voor identificatie van CD4⁺ T-lymfocyten. Eerst worden de aggregaten geëxcludeerd. Vervolgens worden de lymfocyten en de levende CD3⁺ T-lymfocyten geselecteerd. Door te kleuren voor CD4 en CD8 kunnen de CD4⁺ T-lymfocyten geïdentificeerd worden.

2.2.4 DC fenotype bepaling

PBMC geïsoleerd met behulp van een dichtheitsgradiënt worden gewassen (10 min, 1500 rpm) en vervolgens worden de specifieke bindingsplaatsen op de cellen geblokkeerd met ongelabelde muis IgG₁ antilichamen (BD Biosciences). Hierdoor vermijden we dat de fluorescent-gelabelde antilichamen specifiek gaan binden aan Fc-receptoren op de cellen waarop de constante keten van antilichamen kan binden. Hierna worden de cellen gekleurd met anti-Lineage I-FITC (BD Biosciences) en violet live/dead stain. Lineage I is een mengsel van volgende antilichamen: anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD20 en anti-CD56. Door deze kleuring worden volgende cellen geëxcludeerd: lymfocyten, monocyt, eosinofielen en neutrofielen. Simultaan

worden de cellen aangekleurd met anti-BDCA1-PE (Miltenyi Biotec, Leiden, Nederland) en anti-BDCA2-APC (Miltenyi Biotec) om respectievelijk myeloïde en plasmacytoïde DC subsets te identificeren. Eveneens bepalen we de expressie van enkele maturatiemerkers en chemokinereceptoren. Hiervoor worden de volgende fluorescent-gelabelde antilichamen gebruikt: anti-CD62L-PE-Cy7 (eBiosciences), anti-CD80-APC-H7 (BD Biosciences), anti-CD86-V450 (BD Biosciences), anti-CCR5-PE-Cy7 (BD Biosciences) en anti-CCR7-V450 (BD Biosciences). Er werden ook overeenkomstige isotype-controles gebruikt. Na 30 min incubatie in het donker op kamertemperatuur worden de cellen gewassen in 3.5 mL FACS buffer en geresuspendeerd in 1.5 mL FACS buffer. De cellen zijn nu klaar om gemeten te worden op de CyFlow® ML flowcytometer (Partec). De verschillende DC subsets worden geïdentificeerd via de gatingstrategie zoals weergegeven in **Figuur 10**.



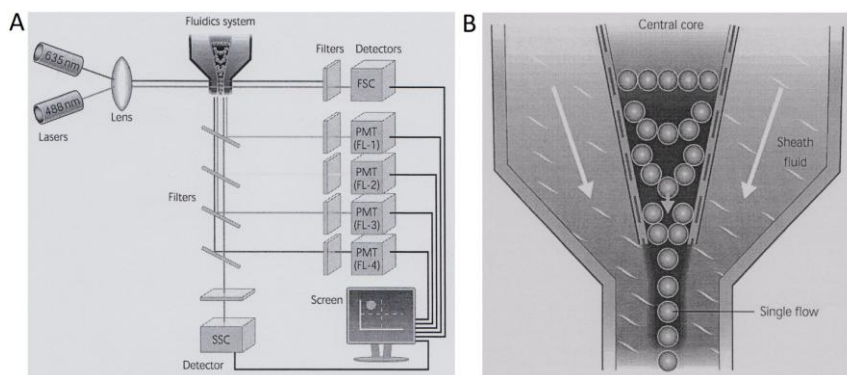
Figuur 10: Toegepaste gatingstrategie om de DC subsets te identificeren. Eerst worden de PBMC geselecteerd, waarna de dode en Lineage I-positieve cellen uitgesloten worden. Een uitzetting van BDCA1 ten opzichte van BDCA2 maakt dan respectievelijk de mDCs en pDCs zichtbaar.

2.2.5 Bepaling van DC activatie en functie na TLR ligatie

Om de maturatiestatus en functie van DCs te bepalen, worden volbloedstalen overnacht gestimuleerd met LPS en IFN γ of IQ. Hiervoor wordt aan 1 mL perifeer bloed ofwel 2 μ L LPS (1 mg/mL, Invivogen, Toulouse, Frankrijk) en 2 μ L IFN γ (25 mg/mL, Immunotools, Friesoythe, Duitsland), ofwel 2 μ L IQ (5 mg/mL, Invivogen) toegevoegd. Een ongestimuleerd staal wordt als controle gebruikt. Na overnacht incubatie bij 37°C en 5% CO $_2$ worden de drie bloedstalen gecentrifugeerd bij 2000 rpm gedurende 15 min. Vervolgens wordt enerzijds het plasma afgenomen en bewaard op -20°C voor verdere analyse naar cytokineproductie met ELISA. Anderzijds worden de witte bloedcellen (WBC) geïsoleerd door de rode bloedcellen (RBC) te lyseren met lysebuffer [1L 10x lysebuffer: 1.55M NH $_4$ Cl, 0.1M KHO $_3$ en 1mM Na $_2$ -EDTA (Ethyleendiaminetetra-acetaat) opgelost in 1L H $_2$ O]. Na lyse worden de WBC gewassen (5 min op 1500 rpm) en geresuspendeerd in 5 mL PBS. Vervolgens worden dode cellen uitgesloten door te kleuren met violet live/dead stain en worden de cellen gekleurd met volgende fluorescent-gelabelde antilichamen: anti-Lineage I-FITC, anti-BDCA1-PE, anti-BDCA2-APC anti-HLA-DR-APC-H7 (BD Biosciences), anti-CD86-V450 en anti-CCR5-PE-Cy7. Na 30 min incubatie in het donker op kamertemperatuur worden de cellen gewassen met 5 mL FACS buffer en geresuspendeerd in 1.5 mL FACS buffer. De cellen zijn nu klaar om gemeten te worden op de CyFlow® ML flowcytometer (Partec, Münster, Duitsland). De toegepaste gatingstrategie voor identificatie van de DC subsets wordt weergegeven in **Figuur 10**.

2.2.6 Flowcytometrie

Flowcytometrie is een methode om de lichtverstrooiingskarakteristieken en fluorescentie-eigenschappen van membraanmoleculen op het oppervlak van een individuele cel te analyseren, maar ook de intracellulaire expressie van verschillende moleculen kan gemeten worden. Om individuele cellen te kunnen detecteren moeten de individuele cellen op één lijn gefocuseerd worden. Hiervoor wordt hydrodynamische focussering gebruikt (**Fig. 11B**). Dit systeem bestaat uit een centraal smaller wordend kanaal waarin het staal geïnjecteerd wordt, en dat omringd wordt door sneller stromende sheath- of geleidingsvloeistof. Daardoor oefent de sheath vloeistof een grote zuigkracht uit op het staal waardoor de stroom van het staal parabolisch wordt. Dit resulteert in een smalle stroom van individuele cellen die uit het centraal kanaal komt. De sheath vloeistof blijft langs het staal stromen zodat de cellen individueel en centraal de laserstraal passeren en hierdoor geëxciteerd kunnen worden.



Figuur 11: A: Het principe van flowcytometrie; B: Hydrodynamische focussering (Introduction to Flow Cytometrie, M. Rahman, AbD serotec).

Cellen verstrooien het licht van de laser op een manier die afhankelijk is van hun grootte en morfologie. Voorwaartse lichtverstrooiing (of forward scatter) reflecteert de grootte van de cel en zijwaartse lichtverstrooiing (of side scatter) geeft informatie over de interne complexiteit van de cel, zoals cytoplasmatische granules. Met deze informatie kunnen er verschillende celtypen geïdentificeerd worden.

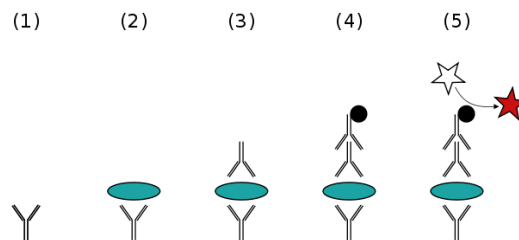
Om de expressie van membraanmoleculen na te gaan worden de cellen gekleurd met probes. Dit zijn meestal fluorescent-gelabelde antilichamen die specifiek zijn voor de extra- of intracellulaire moleculen. Cytoplasmatische moleculen kunnen enkel aangekleurd worden als de cellen gepermeabiliseerd worden zodat de probes de cel in kunnen. Na excitatie van de gebonden probes kan de flowcytometer (**Fig. 11 A**) fluorescentie detecteren van individuele cellen. Hiervoor wordt de emissie van die probes opgevangen door detectors, en kan zowel het aantal cellen die de merker waaraan de probe bindt tot expressie brengen geteld worden, als de fluorescentie-intensiteit [weergegeven in 'mean fluorescence intensity' (MFI)] van een bepaalde probe op een cel bepaald worden. Met flowcytometrie kan er dus naar opregulatie van een merker gekeken worden op (of in) de cellen en naar een toename van het aantal cellen die de merker tot expressie brengen. Moderne flowcytometers kunnen meerdere lasers bevatten waardoor drie of meer verschillend gekleurde fluorescente signalen kunnen gedetecteerd worden. De in deze thesis gebruikte flowcytometer [CyFlow® ML (Partec)] kan 12 verschillende fluorescente signalen detecteren. Hierdoor is simultane polychromatische analyse van de expressie van verschillende moleculen mogelijk.

2.3 Analyse van immuunmodulerende moleculen in plasma en serum

2.3.1 ELISA

2.3.1.1 Principe

ELISA staat voor ‘enzyme-linked immunosorbent assay’ en is een immunologische methode om de concentratie van een specifieke molecule te bepalen. Er zijn verschillende variaties van de ELISA beschikbaar, maar de “sandwich assay” is de meest gebruikte test (**Fig. 12**). Deze assay maakt gebruik van twee verschillende antilichamen die beide de molecule van interesse binden, echter op een andere epitoot van die molecule. M.b.v. het primair antilichaam bindt de molecule aan het oppervlak, het secundair antilichaam wordt gebruikt voor detectie. Vooraleer het toevoegen van het staal worden eerst de aspecifieke binding plaatsen op het oppervlak geblokkeerd. Na elke stap worden de ongebonden antilichamen en moleculen weggewassen. De hoeveelheid van de specifieke molecule kan bepaald worden na detectie van het signaal. Als het signaal een kleurverandering is, wordt de absorptie ervan gemeten.



Figuur 12: Sandwich ELISA. (1) Binding van primair antilichaam op oppervlak; (2) Toevoegen van staal met ongekende hoeveelheid van een specifieke molecule; (3) Binding van biotine-gelabeld secundair antilichaam op de te detecteren molecule; (4) Binding van enzyme-gelabeld streptavidine op secundair antilichaam; (5) Conversie van substraat door het enzyme dat gekoppeld is aan het streptavidine (<http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>).

2.3.1.2 Toepassing

Na overnacht stimulatie van de perifeer bloedstalen wordt de secretie van IL-12 en IFN α in de ingevroren plasmastalen bepaald m.b.v. ELISA. IL-12 wordt voornamelijk door mDCs geproduceerd, terwijl IFN α voornamelijk door pDCs gesecreteerd wordt. In de gebruikte IL-12 ELISA kit (eBiosciences) is het detectie-antilichaam gekoppeld aan biotine. Hierdoor kan streptavidine gekoppeld met horseradisch peroxidase (HRP) gebruikt worden als tertiair antilichaam, aangezien streptavidine een hoge affiniteit heeft voor biotine. HRP oxideert het substraat tetramethylbenzidine (TMB), wat resulteert in een kleurverandering. Ook de IFN α ELISA (PBL interferon source, Huissen, Nederland) werkt met voorgaand detectieprincipe.

2.3.2 Serum isolatie

Serum is de vloeistof die overblijft als men het bloed laat stollen en het stolsel vervolgens afcentrifugeert. Het serum wordt verkregen door het bloedstaal op te vangen in een serum-separating tube (SST, BD Biosciences). Deze tubes bevatten partikels die stolling van het bloed bevorderen en een gel die de bloedcellen scheidt van het serum. Na 30 min incubatie, gevolgd door 15 min centrifugatie op 3000 rpm wordt het serum geïsoleerd en kan het bewaard worden op -80°C voor latere analyse.

2.3.3 CBA

2.3.3.1 Principe

Cytokines in het serum worden bepaald met een multiplex immuno-assay of CBA. CBA staat voor 'cytometric bead assay' en is een high-throughput variant van ELISA. Bij deze techniek is een primair antilichaam gericht tegen een bepaald cytokine gebonden op fluorescente partikels. Deze partikels verschillen in grootte en fluorescentie-intensiteit, waardoor er simultaan verschillende cytokines gekwantificeerd kunnen worden in één staal. Naar analogie met ELISA, gebeurt detectie met anti-cytokine secundaire antilichamen en streptavidine. Weliswaar is het streptavidine in CBA niet gekoppeld met een enzyme, maar met een fluorofoor dat verschillend is van het fluorofoor in de partikels. De hoeveelheid cytokine aanwezig in het staal is dus recht evenredig met fluorescentie-intensiteit. De analyse gebeurt met flowcytometrie. Eens de verschillende partikels geïdentificeerd zijn, kan de fluorescentie-intensiteit van de fluoroforen van de gebonden detectie-antilichamen geanalyseerd worden voor de verschillende partikels.

2.3.3.2 Toepassing

Volgende cytokines werden bepaald in het serum van MS patiënten voor en na training, in vergelijking met sedentaire MS patiënten en gezonde individuen, m.b.v. CBA: IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-8, IL-10, TNF α en IFN γ . Hiervoor werd een BD Human Enhanced Sensitivity Cytometric Bead Array (CBA) (BD Biosciences) gebruikt. Identificatie van de beads gebeurt aan de hand van verschillende fluorescentie-intensiteit in het ver-rood kanaal na excitatie met een 633 nm laser. Streptavidine is gekoppeld met de fluorofoor PE (phycoerythrin), waardoor PE fluorescentie-intensiteit gekoppeld is met cytokineconcentratie. Fluorescentie-intensiteiten worden gemeten m.b.v. een BD FACSAarray flowcytometer (BD Biosciences).

2.4 Immuunmodulerend effect van serum

2.4.1 Selectie MOG/MBP en/of CMV responders

Om het immuunmodulerend effect van de serumstalen, verzameld voor en na training, te bepalen op een antigeenspecifiek immuunantwoord, worden MOG (Myeline Oligodendrocyt Glycoproteïne) / MBP (Myeline Basic Proteïne) en/of CMV (Cytomegalovirus) pp65 responders geselecteerd m.b.v. IFN γ ELISpot (Gen-probe, Diaclone, Besancon Cedex, Frankrijk) (zie §2.4.2). PBMC worden geïsoleerd uit buffy coats verkregen van het Bloedtransfusiecentrum Antwerpen (Rode Kruis Vlaanderen) d.m.v. dichtheitsgradiëntcentrifugatie (zie §2.2.2). Vervolgens worden de PBMC geresuspendeerd in IMDM gesupplementeerd met 5% humaan AB serum, 1 μ L/mL IL-7 (1 ng/ μ L, Immunotools) en 1 μ L/mL IL-15 (1 ng/ μ L, Immunotools) (Jennes et al., 2002) en gestimuleerd met 5 μ L/ml MOG (1 mg/mL, Severn Biotech Ltd, Worcester, VK) en 5 μ L/mL MBP (4 mg/mL, Severn Biotech Ltd) of met 5 μ L/ 1.10^6 cellen hCMVpp65 pepmix (0.05 μ g/ μ L, JPT Peptide Technologies, Berlijn, Duitsland) om een antigeenspecifieke T-celrespons op te wekken in een directe IFN γ ELISpot assay. Om een MOG/MBP respons op te wekken worden niet de volledige eiwitten gebruikt, maar peptidepools bestaande uit peptides van \pm 20 aminozuren afgeleid van het MOG of MBP eiwit. Volgende myeline-afgeleide peptiden worden gebruikt: MOG (AZ 1-22), MOG (AZ 34-56), MOG (AZ 64-86), MOG (AZ 74-96), MBP (AZ 84-102) en MBP (AZ 143-168). Ongestimuleerde PBMC worden gebruikt als negatieve controle. Een donor wordt als responder gedefinieerd indien er per

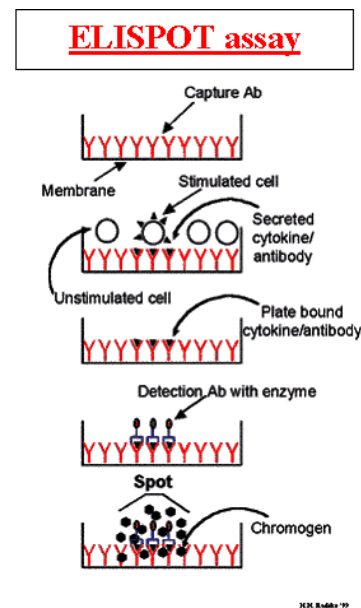
10^6 cellen minstens een verschil van 50 spotvormende cellen (SVC) is met de negatieve controle, en indien de ratio van SVC ten opzichte van de negatieve controle groter dan 3 is. De overige PBMC worden levend ingevroren aan 50×10^6 cellen in 1.5 mL FCS (Foetaal kalfserum, Life Technologies) gesupplementeerd met 10% DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich). De PBMC worden vervolgens in cryoboxen (Nalgene® Labware, Leuven, België) op -80°C geplaatst. De cryobox zorgt ervoor dat de cellen slechts 1°C per minuut afkoelen, waardoor de vorming van ijskristallen in de celmembraan voorkomen wordt. Deze cellen worden later gebruikt om het immunomodulerend effect van de serumstalen voor en na training te bepalen (zie §2.4.2).

2.4.2 ELISpot

2.4.2.1 Principe

Dit staat voor ‘enzyme-linked immunosorbent spot’ en is een methode om cellulaire immuunreacties te onderzoeken (**Fig. 13**). Met ELISpot is het mogelijk om cytokineproducerende cellen te visualiseren, te identificeren en te kwantificeren, aangezien elke spot representatief is voor een individuele reactieve cel. Deze methode is gebaseerd op het principe van de sandwich ELISA.

Eerst wordt er een antilichaam specifiek voor een bepaald cytokine gebonden op een polyvinylidene difluoride (PVDF) membraan. Na toevoegen van de cellen en stimuli produceren sommige cellen het specifieke cytokine. De geproduceerde cytokines gaan binden aan de vastgehechte antilichamen vlakbij de locatie van de cel. Hierdoor wordt diffusie van het cytokine in het supernatans, protease degradatie en binding aan oplosbare membraanreceptoren vermeden en is deze techniek veel gevoeliger dan ELISA. Omdat de cellen op de PVDF membraan geïmmobiliseerd zijn, kan de cytokineproductie van individuele cellen gevisualiseerd worden. Na het wegwassen van de cellen en andere ongebonden substanties kunnen de SVC gedetecteerd worden met een detectie-antilichaam en hieropvolgende enzymatische reactie.



Figuur 13: Principe ELISpot (<http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/ELISPOT-3456.html>).

2.4.2.2 Toepassing

Responder PBMC worden gestimuleerd met MOG/MBP of CMV pp65 peptidepools om een antigeenspecifieke IFN γ respons op te wekken. Dit gebeurt in aanwezigheid van IL-7 en IL-15 en in aanwezigheid van een serumstaal. Ongestimuleerde PBMC worden gebruikt als negatieve controle. De gebruikte IFN γ ELISpot kit maakt gebruik van een anti-IFN γ gebiotinyleerd antilichaam. Daarna wordt er streptavidine toegevoegd dat gekoppeld is aan alkalisch fosfatase, gevolgd door toevoeging van het substraat, namelijk BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium). Alkalisch fosfatase zet deze gelige substantie om naar blauwzwarte spots ter hoogte van IFN γ secretie. Om het immunomodulerend effect van bepaalde effectormoleculen aanwezig in serum te bepalen, vergelijken we de antigeenspecifieke IFN γ respons uitgevoerd in aanwezigheid van serum verzameld na training, met het aantal IFN γ SVC in aanwezigheid van serum verzameld voor training en serum van sedentaire MS patiënten en gezonde controlepersonen.

2.5 Statistische analyse

Statistische analyse gebeurde met behulp van Graphpad Prism versie 5. Om verschillen aan te tonen tussen gezonde controlepersonen en MS patiënten bij start van het onderzoek werd er een ongepaarde niet-parametrische t-test gebruikt, namelijk de 'Mann-Whitney U test'. Om verschillen aan te tonen na 6 weken training werd er een gepaarde niet-parametrische t-test gebruikt, namelijk de 'wilcoxon matched pairs test'. Verschillen werden significant beschouwd als $p \leq 0.05$.

3. Resultaten

3.1 Effect van training op aantal en fenotype van circulerende DCs en Tregs

3.1.1 Treg karakterisering

Tregs werden gekarakteriseerd omdat ze het immuunantwoord kunnen reguleren en immuunonderdrukkende eigenschappen hebben. Ze zijn belangrijk in onderzoek naar MS omdat ze autoreactieve immuunantwoorden kunnen inhiberen (Cools et al., 2007). De aanwezigheid van natuurlijk voorkomende Tregs werd flowcytometrisch bepaald op basis van hoge expressie van de α -keten van de IL-2 receptor CD25. Antigeengeïnduceerde Tregs werden gekarakteriseerd door intracellulaire expressie van anti-inflammatoire cytokines IL-10 en TGF β na te gaan m.b.v. flowcytometrie. In **Tabel 4** wordt telkens het gemiddeld percentage positieve cellen voor elk van de verschillende Treg subsets binnen de CD4⁺ T-cellen weergegeven.

Tabel 4: Percentage Treg subsets binnen CD4⁺ T-cellen.

		CD25 ^{hi}	IL-10	TGF β
		Gem \pm SD	Gem \pm SD	Gem \pm SD
	Gezonde controles (n = 20)	3,53 \pm 0,98	0,21 \pm 0,12	0,11 \pm 0,12
	MS-patiënten (n = 19)	4,01 \pm 0,94	0,16 \pm 0,06	0,13 \pm 0,06
	<i>P</i> -waarden	>0,05	>0,05	>0,05
Trainingsgroep (n = 10)	Start	3,79 \pm 0,87	0,15 \pm 0,05	0,13 \pm 0,06
	Na 6 weken	3,04 \pm 1,23	0,37 \pm 0,26	0,07 \pm 0,08
	<i>P</i> -waarden	<0,01	<0,05	<0,05
Sedentaire controlegroep (n = 8)	Start	4,26 \pm 0,89	0,17 \pm 0,07	0,12 \pm 0,06
	Na 6 weken	2,63 \pm 0,67	0,43 \pm 0,23	0,06 \pm 0,06
	<i>P</i> -waarden	<0,001	<0,05	<0,05

Gem, Gemiddelde; SD, Standaarddeviatie. Significante *P*-waarden worden in het vet aangeduid.

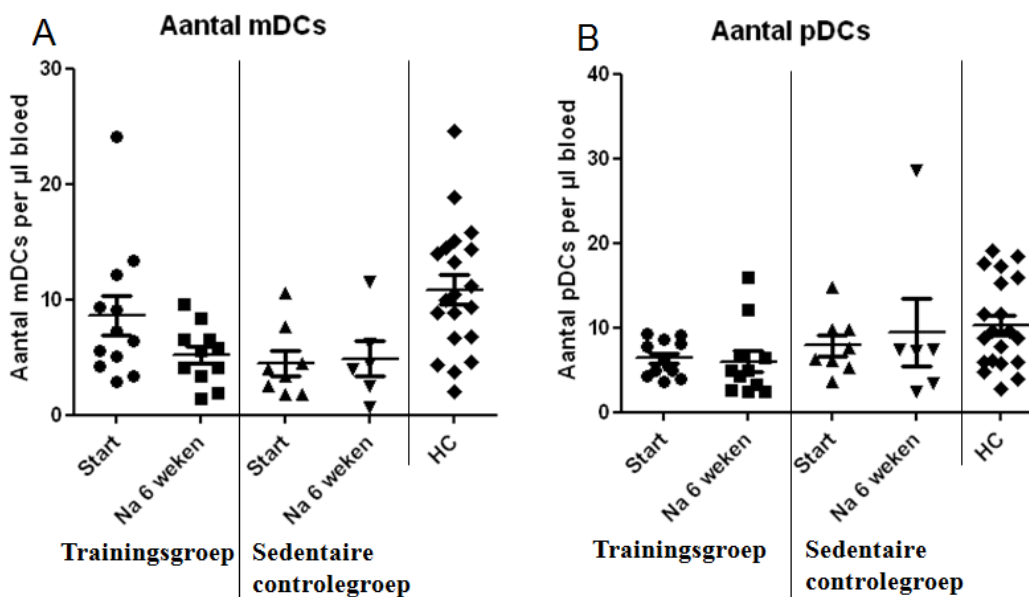
Niettegenstaande er geen significant verschil geobserveerd werd tussen gezonde controlepersonen en MS patiënten voor de drie Treg subsets, is het relatieve aantal Tregs dat we terugvinden na 6 weken significant gewijzigd voor zowel de trainingsgroep als de sedentaire controlegroep. Inderdaad, terwijl we een daling zien van het percentage CD4⁺CD25^{hi} Tregs en TGF β ⁺ Tregs, is het percentage IL-10⁺ Tregs significant toegenomen. IL-10 en TGF β dubbelpositieve cellen werden weinig of niet geobserveerd, zonder verschil tussen de verschillende groepen (data niet weergegeven).

3.1.2 Bepaling van het aantal en fenotype van DCs

DCs blijken een kritische rol te spelen in de initiatie en progressie van MS en zijn cruciaal in het behouden van centrale en perifere T-celtolerantie (Comabella et al., 2010). Aangezien wijzigingen in aantal en/of fenotype van DC gecorreleerd zijn met een gewijzigde DC functie (Nuyts et al., ingediend voor publicatie), vergelijken we zowel het aantal als fenotype van circulerende DCs in het perifere bloed van gezonde controlepersonen en MS patiënten. Daarnaast evalueren we eveneens het effect van training op DCs in MS patiënten.

3.1.2.1 Aantal DCs

Het aantal circulerende mDCs en pDCs wordt flowcytometrisch bepaald op basis van BDCA1 en BDCA2 expressie respectievelijk (**Fig. 14**).

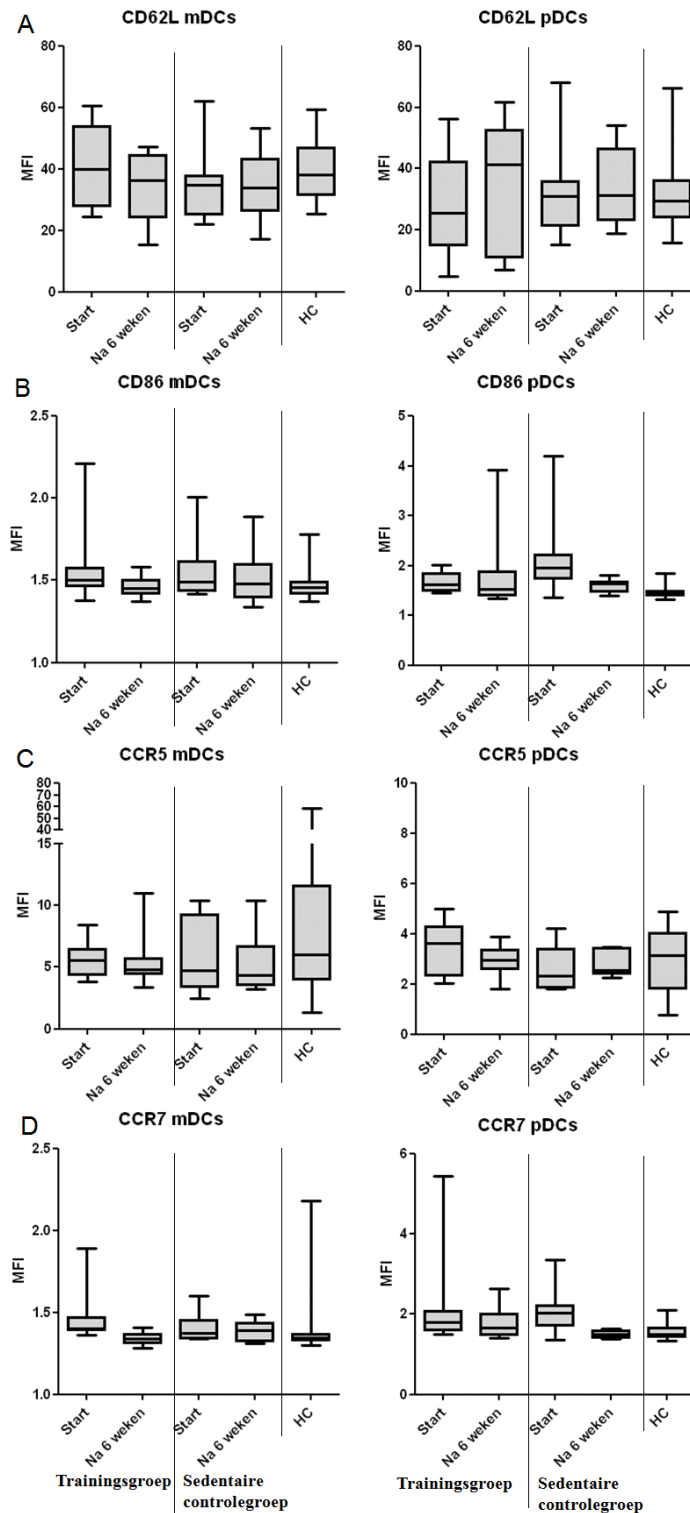


Figuur 14: Op basis van respectievelijk BDCA1 en BDCA2 expressie werd het absolute aantal mDCs (A) en pDCs (B) bepaald. De absolute aantallen van zowel mDCs als pDCs blijken hoger te liggen in gezonde controlepersonen. Er wordt geen effect van training geobserveerd op de absolute aantallen van DC subsets. HC, Healthy Controls.

Na statistische analyse blijkt dat zowel het aantal mDCs als het aantal pDCs significant lager is in het perifeer bloed van MS patiënten dan in gezonde controlepersonen ($p < 0.05$). Dit resultaat bevestigt eerdere bevindingen van het Laboratorium voor Experimentele Hematologie (Nuyts et al., manuscript in voorbereiding). Er worden geen significante verschillen geobserveerd na 6 weken voor beide groepen van MS patiënten ($p > 0.05$). Voorlopig wordt er dus geen effect van training waargenomen op de absolute aantallen van beide DC subsets.

3.1.2.2 DC fenotype

Voor karakterisering van het DC fenotype wordt de membraanexpressie van volgende moleculen flowcytometrisch bepaald op beide DC subsets: CD62L, CD80, CD86, CCR5 en CCR7 (**Fig. 15**). In de verschillende groepen wordt CD80 expressie nauwelijks tot niet gedetecteerd (data niet weergegeven).



Figuur 15: Membranexpressie van CD62L (A), CD86 (B), CCR5 (C) en CCR7 (D) op beide DC subsets, weergegeven in MFI van het specifieke antilichaam. Het fenotype van DC subsets gekarakteriseerd via BDCA1 en BDCA2 expressie werd geanalyseerd via flowcytometrie. Voor CD62L en CCR5 werd er geen significant verschil geobserveerd tussen MS patiënten en gezonde controlepersonen, en ook niet na 6 weken in zowel de trainingsgroep als de sedentaire controlegroep. CD86 en CCR7 expressie was verhoogd op beide DC subsets in MS patiënten ten opzichte van gezonde controlepersonen. Na 6 weken training daalt CD86 en CCR7 expressie op mDCs van MS patiënten. HC, Healthy Controls; MFI, Mean fluorescence intensity.

De expressie van CD62L en CCR5 is niet significant verschillend waargenomen tussen gezonde controlepersonen en MS patiënten ($p > 0.05$), noch kan er een significant verschil m.b.t. de expressie van deze merkers aangetoond worden na 6 weken in zowel de getrainde als de sedentaire groep ($p > 0.05$). Expressie van CD62L en CCR5 op circulerende DCs is dus niet gewijzigd in MS patiënten. Zes weken gecombineerde training lijkt ook geen invloed te hebben op CD62L en CCR5 expressie op circulerende DCs. Er werden wel significante resultaten bekomen voor CD86 en CCR7 expressie. Bij aanvang van de studie vertonen beide DC subsets van MS patiënten een verhoogde expressie van CD86 (mDC: $p < 0.05$; pDC: $p < 0.0001$) en CCR7 (mDC: $p < 0.01$; pDC: $p < 0.001$) in vergelijking met gezonde controlepersonen. Na 6 weken training vertonen mDCs van MS patiënten een significant lagere expressie van CD86 ($p < 0.05$) en CCR7 ($p < 0.01$) dan voor training, in vergelijking met de sedentaire controlegroep ($p > 0.05$). Geen significant verschil werd geobserveerd voor de expressie van CD86 en CCR7 op pDCs na 6 weken in beide groepen ($p > 0.05$). CD86 en CCR7 zijn beide maturatie merkers, wat er op duidt dat beide circulerende DC subsets in MS patiënten zich in een meer matuur stadium bevinden in vergelijking met gezonde controlepersonen. De gecombineerde training van 6 weken heeft als effect dat de expressie van CD86 en CCR7 op mDCs daalt naar waarden van gezonde controlepersonen. Inderdaad, voor training zijn er significante verschillen tussen de trainingsgroep en gezonde controlepersonen voor expressie van CD86 ($p = 0.05$) en CCR7 ($p < 0.001$) op mDCs. Terwijl er na training geen significant verschil meer wordt gedetecteerd ($p > 0.05$). Met andere woorden, de circulerende mDCs in MS patiënten na 6 weken training hebben een minder matuur fenotype, dan voor training. Gezien de lage MFI waarden voor de expressie van CD86 en CCR7, is het aangewezen de significante daling in expressie die we zien na 6 weken training in vergelijking met de sedentaire controlegroep, te bevestigen met andere methoden, zoals bijvoorbeeld kwantitatieve RT-PCR.

3.1.3 Bepaling van DC fenotype en functie na TLR ligatie

Naast het fenotype van in vivo circulerende DCs (**Fig. 15**), evalueren we in onderstaand experiment het fenotype en de functie van DCs na TLR ligatie zowel in perifeer bloed van MS patiënten als van gezonde controlepersonen. Hiervoor werden perifeer bloedstalen gedurende 24u gestimuleerd met ofwel IQ, ofwel LPS en $IFN\gamma$, ofwel niet gestimuleerd. Vervolgens werd enerzijds de expressie van verschillende activatiemerkers bepaald m.b.v. volgende fluorescent-gelabelde antilichamen en flowcytometrie: anti-CCR5, anti-CD86 en anti-HLA-DR (zie §3.1.3.1.). Anderzijds werd het plasma geïsoleerd en de concentratie van IL-12 en $IFN\alpha$ na TLR ligatie bepaald (zie §3.1.3.2.).

3.1.3.1 Expressie van DC activatiemerkers na TLR ligatie

In **Tabel 5** wordt telkens de MFI van anti-CCR5, anti-CD86 en anti-HLA-DR op zowel mDCs als pDCs in MS patiënten en gezonde controlepersonen weergegeven. Daarnaast kan het expressiepatroon van CCR5 en CD86 eveneens vergeleken worden met de expressie op dag 0 (zie §3.1.2.2.).

Tabel 5: DC fenotype en functie na TLR ligatie van MS patiënten vergeleken met gezonde controlepersonen.

			Gezonde controles (MFI)	MS patiënten (MFI)	
			Gem ± SD	Gem ± SD	<i>P</i> -waarden
mDC	CCR5	Dag 0	11.83 ± 15.14	5.64 ± 2.15	>0.05
		Onbehandeld	8.25 ± 3.58	6.62 ± 1.02	>0.05
		IQ	5.87 ± 1.38	4.21 ± 1.15	<0.01
		LPS + IFN γ	5.93 ± 2.31	3.678 ± 2.03	<0.001
	CD86	Dag 0	1.47 ± 0.01	1.56 ± 0.20	<0.05
		Onbehandeld	4.13 ± 1.01	4.02 ± 1.07	>0.05
		IQ	6.18 ± 1.64	5.57 ± 1.07	>0.05
		LPS + IFN γ	7.56 ± 2.525	6.43 ± 1.61	>0.05
	HLA-DR	Onbehandeld	126.73 ± 28.34	112.72 ± 33.97	>0.05
		IQ	155.27 ± 48.55	125.41 ± 37.49	>0.05
		LPS + IFN γ	150.55 ± 40.85	119.77 ± 32.79	<0.05
pDC	CCR5	Dag 0	3.03 ± 1.11	3.10 ± 1.05	>0.05
		Onbehandeld	2.84 ± 0.78	2.72 ± 0.61	>0.05
		IQ	3.21 ± 0.77	2.36 ± 0.53	<0.001
		LPS + IFN γ	2.71 ± 0.61	2.30 ± 0.79	<0.05
	CD86	Dag 0	1.47 ± 0.12	1.87 ± 0.60	<0.0001
		Onbehandeld	1.52 ± 0.18	1.69 ± 0.31	<0.05
		IQ	2.48 ± 0.48	3.67 ± 1.02	<0.0001
		LPS + IFN γ	1.99 ± 0.49	2.64 ± 0.58	<0.001
	HLA-DR	Onbehandeld	31.28 ± 6.31	27.86 ± 6.20	>0.05
		IQ	84.59 ± 30.21	74.89 ± 24.75	>0.05
		LPS + IFN γ	87.02 ± 23.07	74.74 ± 31.21	>0.05

Gem, Gemiddelde; SD, Standaarddeviatie. Significante *P*-waarden worden in het vet aangeduid.

Na stimulatie van zowel mDCs als pDCs met IQ of LPS en IFN γ brengen beide DC subsets van MS patiënten significant minder CCR5 tot expressie dan DCs van gezonde controlepersonen. Bovendien valt het op te merken dat, na TLR ligatie, gemiddelde expressie van CCR5 op zowel mDCs als pDCs van MS patiënten sterker lijkt te dalen t.o.v. de onbehandelde conditie in vergelijking met gezonde controlepersonen. We waren echter niet in staat significante verschillen aan te tonen m.b.t. de deltawaarden voor de afname van CCR5 expressie op mDCs (LPS/IFN γ : HC 0.77 ± 0.26 ; MS patiënten 0.71 ± 0.39) ($p > 0.05$). Na stimulatie met IQ detecteren we een kleine afname van de expressie van CCR5 op pDCs van MS patiënten (0.94 ± 0.22) vergeleken met de onbehandelde conditie, terwijl deze op gezonde controlepersonen zwak lijkt toe te nemen (1.21 ± 0.49) ($p < 0.05$). Analooq aan de resultaten beschreven in voorgaande paragraaf, bevestigen we hier dat ook na 24u incubatie zonder stimulatie ongestimuleerde pDCs van MS patiënten een verhoogde expressie van CD86 vertonen in vergelijking met gezonde controlepersonen. Dit wordt echter niet bevestigd voor CD86 expressie op mDCs. Na 24u incubatie zonder stimulatie wordt er geen significant verschil waargenomen in CD86 expressie op mDCs tussen gezonde controlepersonen en MS patiënten. Daarnaast is ook na stimulatie met zowel IQ als LPS en IFN γ de expressie van CD86 op pDCs van MS patiënten significant hoger dan deze op gezonde controlepersonen. Noemenswaardig is dat CD86 expressie op pDCs van MS patiënten significant sterker toeneemt na TLR ligatie (2.22 ± 0.47) in vergelijking met de

onbehandelde conditie, dan op deze van gezonde controlepersonen (1.65 ± 0.34) ($p < 0.001$). Geen verschillen m.b.t. de deltawaarden voor de expressie van CD86 op mDCs konden worden aangetoond tussen MS patiënten en gezonde controlepersonen (LPS/IFN γ : HC 1.87 ± 0.55 ; MS patiënten 1.81 ± 0.55) ($p > 0.05$). Deze bevindingen wijzen mogelijk op een verhoogde gevoeligheid van pDCs van MS patiënten voor TLR ligatie weergegeven door een meer uitgesproken wijziging in het expressiepatroon van CCR5 en CD86. In tegenstelling hiermee is de expressie van HLA-DR op mDCs van MS patiënten lager dan deze van gezonde controlepersonen na stimulatie met LPS en IFN γ .

In tabel 6 geven we de resultaten weer van het effect van een 6 weken durend trainingsschema op het fenotype van DCs van MS patiënten, vergeleken met een sedentaire controlegroep.

Tabel 6: DC fenotype en functie na TLR ligatie van MS patiënten die gedurende 6 weken een trainingsschema volgden vergeleken met een sedentaire controlegroep.

			Trainingsgroep (MFI)		Sedentaire controlegroep (MFI)	
			Start	Na 6 weken	Start	Na 6 weken
			Gem \pm SD	Gem \pm SD	Gem \pm SD	Gem \pm SD
mDC	CCR5	Dag 0	5.58 \pm 1.34	5.28 \pm 1.80	5.73 \pm 3.07	5.05 \pm 2.47
		Onbehandeld	6.40 \pm 2.27	5.63 \pm 1.66	7.11 \pm 0.87	5.19 \pm 1.12
		IQ	4.23 \pm 0.74	4.16 \pm 1.71	4.16 \pm 1.59	3.83 \pm 1.14
		LPS + IFN γ	3.53 \pm 0.98	3.31 \pm 1.86	4.02 \pm 1.48	3.24 \pm 1.11
	CD86	Dag 0	1.56 \pm 0.20	1.46 \pm 0.06	1.57 \pm 0.19	1.51 \pm 0.18
		onbehandeld	3.75 \pm 0.57	3.50 \pm 1.24	4.61 \pm 1.67	3.77 \pm 1.30
		IQ	5.56 \pm 1.19	4.24 \pm 1.29	5.59 \pm 0.53	4.56 \pm 1.48
		LPS + IFN γ	6.40 \pm 1.82	5.16 \pm 2.45	6.50 \pm 0.67	5.16 \pm 1.47
	HLA-DR	Onbehandeld	107.12 \pm 29.71	90.01 \pm 33.30	125.04 \pm 40.29	103.28 \pm 38.06
		IQ	126.52 \pm 27.03	101.43 \pm 45.88	122.74 \pm 58.48	115.87 \pm 47.36
		LPS + IFN γ	118.78 \pm 32.84	97.78 \pm 58.21	122.16 \pm 32.46	110.19 \pm 47.15
pDC	CCR5	Dag 0	3.42 \pm 1.00	2.81 \pm 0.78	2.63 \pm 0.91	2.66 \pm 0.58
		Onbehandeld	2.77 \pm 0.60	2.52 \pm 0.40	2.60 \pm 0.63	2.17 \pm 0.51
		IQ	2.32 \pm 0.38	2.22 \pm 0.66	2.41 \pm 0.70	2.24 \pm 0.30
		LPS + IFN γ	2.05 \pm 0.38	2.21 \pm 0.69	2.67 \pm 1.08	1.95 \pm 0.41
	CD86	Dag 0	1.67 \pm 0.18	1.93 \pm 0.73	2.17 \pm 0.86	1.61 \pm 0.13
		Onbehandeld	1.60 \pm 0.19	2.47 \pm 1.22	1.91 \pm 0.41	1.54 \pm 0.17
		IQ	3.38 \pm 0.73	3.08 \pm 1.22	4.10 \pm 1.24	2.53 \pm 0.60
		LPS + IFN γ	2.64 \pm 0.56	3.04 \pm 1.42	2.63 \pm 0.61	2.74 \pm 1.41
	HLA-DR	Onbehandeld	26.07 \pm 5.16	28.75 \pm 16.16	31.78 \pm 6.55	23.30 \pm 3.18
		IQ	73.05 \pm 18.17	52.53 \pm 22.86	77.64 \pm 32.90	57.88 \pm 15.68
		LPS + IFN γ	67.83 \pm 22.70	57.32 \pm 28.36	85.11 \pm 39.45	55.78 \pm 20.04

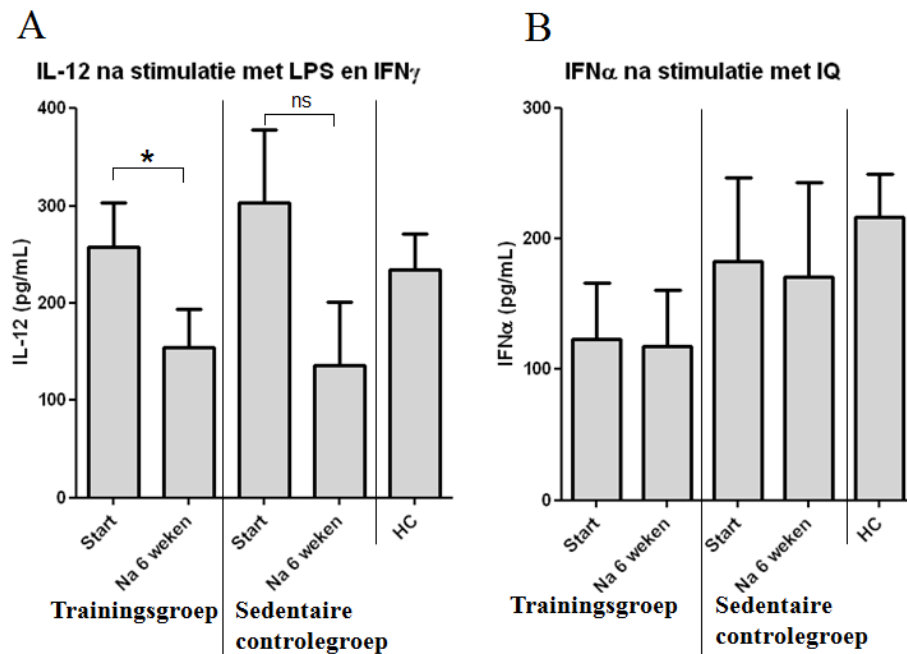
Gem, Gemiddelde; SD, Standaarddeviatie. Significante verschillen worden in het vet aangeduid.

De resultaten beschreven in voorgaande paragraaf betreffende verhoogde CD86 expressie op circulerende mDCs in MS patiënten na 6 weken training ($p < 0.05$), worden niet bevestigd na 24u incubatie zonder stimulatie ($p > 0.05$). Maar na 6 weken training is expressie van CD86 op IQ gestimuleerde mDCs significant gedaald ($p < 0.05$) in MS patiënten in tegenstelling tot de sedentaire controlegroep ($p > 0.05$). Daarnaast vertonen IQ gestimuleerde pDCs na 6 weken training een significant lagere expressie van HLA-DR ($p < 0.05$), in vergelijking met de sedentaire

controlegroep ($p>0.05$). Beide bevindingen suggereren dat DCs in MS patiënten na training zich in een minder matuur stadium bevinden dan voor training, weergegeven door de verlaagde expressie van CD86 op IQ gestimuleerde mDCs en van HLA-DR op IQ gestimuleerde pDCs na training gedurende 6 weken.

3.1.3.2 *Productie van pro-inflammatoire cytokines na TLR ligatie*

Productie van IL-12 en IFN α werd bepaald op de plasmastalen geïncubeerd na overnacht stimulatie met TLR liganden m.b.v. ELISA. In tegenstelling tot onbehandelde stalen (range: 1.74 – 25.47 pg/mL) en deze gestimuleerd met IQ (range: 2.51 – 26.07 pg/mL), zien we zowel in stalen van MS patiënten als gezonde controlepersonen, een zeer hoge IL-12 concentratie (range: 10.98 – 555.15 pg/mL) na stimulatie met LPS en IFN γ . Stimulatie met IQ daarentegen resulteerde in een verhoogde productie van IFN α (range: 5.25 – 557.16 pg/mL) in vergelijking met onbehandeld (range: 2.46 – 297.89 pg/mL) en stimulatie met LPS en IFN γ (range: 2.48 – 379.88 pg/mL), zowel in MS patiënten als gezonde controlepersonen. In **Figuur 16** vergelijken we de concentratie van IL-12 en IFN α van gezonde controlepersonen en MS patiënten voor en na training gedurende 6 weken.



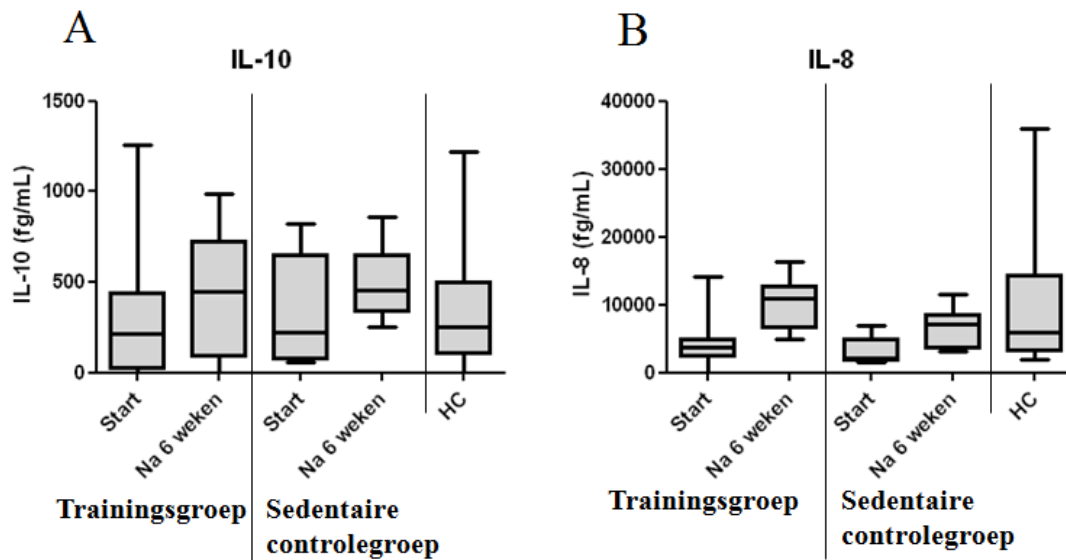
Figuur 16: IL-12 (A) en IFN α (B) plasmaconcentratie na 24u stimulatie met respectievelijk LPS/IFN γ en IQ. Er is geen verschil tussen gezonde controlepersonen en MS patiënten bij aanvang van studie voor zowel IL-12 als IFN α . Na 6 weken training is de IL-12 plasmaconcentratie significant gedaald (*). Er werd geen significant effect gedetecteerd van 6 weken training op de plasmaconcentratie van IFN α . HC, Healthy Controls; ns, niet significant.

Bij aanvang van de studie kunnen we geen significant verschil aantonen tussen gezonde controlepersonen en MS patiënten voor de plasmaconcentratie van zowel IL-12 als IFN α na stimulatie met respectievelijk LPS/IFN γ en IQ ($p>0.05$). Na 6 weken training vinden we echter een significante daling van de IL-12 plasmaconcentratie in MS patiënten ($p<0.001$), in tegenstelling tot de sedentaire controlegroep waar de geobserveerde daling niet significant verschillend is. Geen significante verschillen worden geobserveerd voor IFN α concentratie in zowel de trainingsgroep als de sedentaire controlegroep ($p>0.05$). In navolging van voorgaande resultaten wijst ook hier een afname van pro-inflammatoire IL-12 productie op een afname van de functie van mature DC.

3.2 Analyse van immuunmodulerende moleculen in serum

3.2.1 Serumconcentraties van pro- en anti-inflammatoire cytokines

Met behulp van een multiplex CBA werden de serumconcentraties van volgende cytokines bepaald: IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-8, IL-10, TNF α en IFN γ . IL-1 β , IL-2, IL-5, TNF α en IFN γ werden niet tot nauwelijks gedetecteerd en geen verschillen konden aangetoond worden tussen de verschillende groepen (data niet weergegeven). De productie van IL-8 en IL-10 was meer uitgesproken (**Fig. 17**).

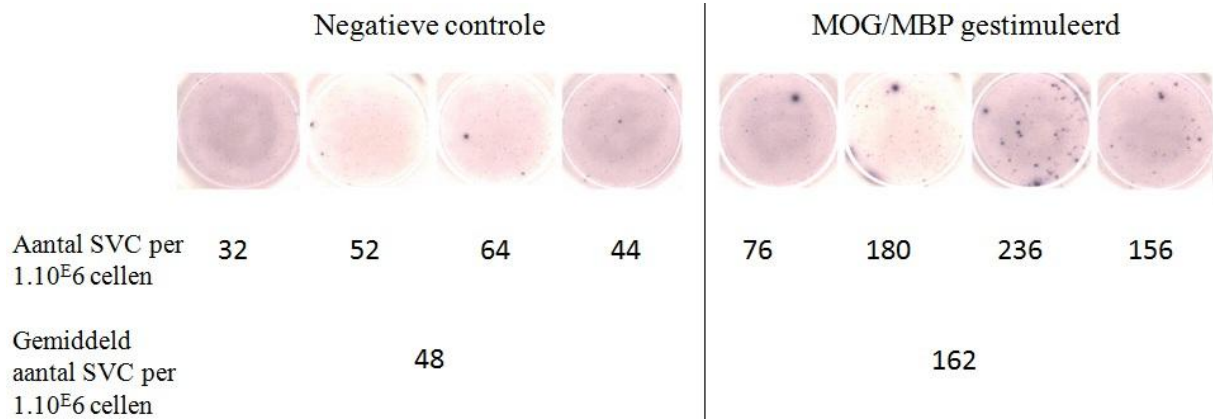


Figuur 17: Serumconcentratie van IL-10 (A) en IL-8 (B). Cytokineconcentraties in serum geïsoleerd van gezonde controlepersonen en MS patiënten voor en na 6 weken werden bepaald via een multiplex CBA. IL-10 serumconcentratie is niet gewijzigd in MS patiënten in vergelijking met gezonde controlepersonen. Een effect van 6 weken training op IL-10 serumconcentratie kan niet waargenomen worden in MS patiënten. IL-8 serumconcentratie ligt lager in MS patiënten dan in gezonde controlepersonen en stijgt in MS patiënten na 6 weken training. HC, Healthy Controls.

Ondanks een stijgende trend na 6 weken, worden geen significante verschillen geobserveerd voor de serumconcentratie van IL-10 in beide patiëntengroepen, noch kon een significant verschil aangetoond worden tussen gezonde controlepersonen en MS patiënten ($p > 0.05$). In tegenstelling hiermee detecteren we een significant lagere serumconcentratie van IL-8 in MS patiënten vergeleken met gezonde controlepersonen ($p < 0.05$). Bovendien is de concentratie IL-8 significant toegenomen in het serum van MS patiënten na 6 weken training ($p < 0.05$), in tegenstelling tot de sedentaire controlegroep ($p > 0.05$).

3.2.2 Immuunmodulerend effect van het serum voor en na training

Om het immuunmodulerend effect van serum op een antigeenspecifiek immuunantwoord te bepalen, werden MOG/MBP en CMV responders geselecteerd. Hiervoor werden PBMC overnacht gestimuleerd met MOG- en MBP-afgeleide peptides enerzijds, of een CMV pp65 peptidepool anderzijds. Vervolgens werden antigeenspecifieke IFN γ producerende T-cellen gekwantificeerd m.b.v. een IFN γ ELISPOT. **Figuur 18** geeft een representatieve weergave van een MOG/MBP responder.



Figuur 18: Donor die een MOG/MBP respons vertoont. Deze donor voldeed aan de responder criteria, namelijk een verschil groter dan 50 (114) voor het aantal SVC ten opzichte van de negatieve controle en een ratio groter dan 3 (3.38). SVC, Spot vormende cellen.

In toekomstige experimenten zullen we onderzoeken in welke mate deze antigeenspecifieke IFN γ respons versterkt of afgezwakt kan worden door toevoeging van serum geïmmeerd voor en na het trainingsschema.

4. Discussie

MS is een chronische ontstekingsaandoening van het centraal zenuwstelsel (Wingerchuk et al., 2001). Voorlopig kan deze ziekte nog niet worden voorkomen, en een genezing is ook nog niet voorhanden. Omdat MS ten minste gedeeltelijk een auto-immuunziekte is, kunnen symptomen behandeld worden met immunosuppressiva zoals corticosteroiden. Een nadeel hiervan is dat corticosteroiden via een algemene onderdrukking van het immuunsysteem werken. Kennis van de onderliggende mechanismen die schade berokkenen aan het centraal zenuwstelsel is noodzakelijk om nieuwe therapieën te ontwikkelen die de MS pathologie kunnen tegenhouden of omkeren. Omdat DCs het evenwicht tussen immuniteit en tolerantie kunnen beïnvloeden (Comabella et al., 2010), zijn ze een interessant aangrijpingspunt voor een eventuele behandeling tegen MS. DCs zouden gebruikt kunnen worden om het immuunsysteem te moduleren en het evenwicht naar tolerantie te laten overhellen. Maar voordat dit naar werkelijkheid omgezet kan worden, is er nog meer kennis nodig over de functie van DCs en hun rol in het reguleren van het immuunantwoord.

Voorgaande studies hebben aangetoond dat fysieke inspanning een gunstig effect heeft op het verloop van de MS pathologie (Schapiro et al., 1988). Ondanks gebrek aan wetenschappelijk bewijs, is het waarschijnlijk dat een aantal beperkingen gezien in MS patiënten te wijten zijn aan inactiviteit en niet aan onherstelbare weefselschade (Dalgas et al., 2009). Daarom werd in deze thesis het chronische effect van gecombineerde training van kracht en uithouding nagegaan op de cellulaire mediators van het immuunsysteem, namelijk Tregs en DCs, alsook het effect op circulerende cytokines. Hiermee beogen we om het onderliggende (immuunmodulerende) mechanisme van eerder gerapporteerde positieve effecten van langdurige gecombineerde training op de levenskwaliteit en het ziekteverloop van MS patiënten te identificeren. Met behulp van flowcytometrie werd het chronische effect van gecombineerde training op het aantal, fenotype en functie van DCs en Tregs in MS patiënten bepaald, in vergelijking met een sedentaire controlegroep, voor en na training gedurende 6 weken. Cytokineconcentraties in het serum van patiënten werden bepaald m.b.v. een multiplex immuno-assay.

Ondanks dat eerder het chronische effect van beweging werd nagegaan in MS patiënten op beenspierkracht en functionele capaciteit (Broekmans et al., 2010), werd het lange termijn effect van gecombineerde training op cellulaire mediators van het immuunsysteem en cytokines in MS patiënten voorheen nog niet bepaald. Dit maakt vergelijking van de in deze thesis verkregen resultaten moeilijk. Er zijn wel een aantal studies die het effect van training op het immuunsysteem van gezonde personen hebben nagegaan. Het acuut effect van training in gezonde personen werd reeds gekarakteriseerd, namelijk een opregulatie van het aantal circulerende witte bloedcellen, en een opregulatie van de plasmaconcentraties van zowel pro- als anti-inflammatoire cytokines en acute fase proteïnen (Lancaster et al., 2004). Ook stijgt de plasmaconcentratie van adrenaline, cortisol, groeihormoon en prolactine na fysieke inspanning (Steensberg et al., 2003). De toename van circulerende DCs gaat niet gepaard met een opregulatie van costimulerende moleculen (Suchanek et al., 2010). Onderzoek naar het chronische effect van training in gezonde personen leverde een aantal tegenstrijdigheden op, vermoedelijk omwille van de verschillende trainingsprogramma's. Enerzijds wordt er besloten dat langdurige krachttraining leidt tot een daling van pro-inflammatoire cytokines in rust (Calle and Fernandez, 2010). En anderzijds stelt men vast dat langdurige krachttraining resulteert in een daling van zowel pro- als anti-inflammatoire cytokines in rust (Stewart et al., 2007). Daarnaast werd ook bij patiënten met chronisch hartfalen het effect van gecombineerde training reeds onderzocht (Conraads et al., 2002). Vier maanden gecombineerde aerobische training heeft een anti-inflammatoir effect in

patiënten met chronisch hartfalen, weergegeven door een daling van de plasmaconcentratie van TNF α receptor na training. Eén zaak hebben deze studies wel duidelijk gemaakt, namelijk dat uithoudings- en krachttraining wel degelijk immuunmodulerende eigenschappen hebben. Om MS patiënten beter te kunnen adviseren over het effect van training zijn verdere studies noodzakelijk.

In deze thesis werden resultaten verzameld en vergeleken met het oog op het onderzoeken van het effect van 6 weken training in MS patiënten, alsook van het verschil tussen MS patiënten en gezonde controlepersonen. Niettegenstaande er geen verschillen aangetoond konden worden in relatieve aantallen van Treg subsets tussen gezonde controlepersonen en MS patiënten, werd er wel een significant verschil geobserveerd na 6 weken in zowel de trainingsgroep als de sedentaire controlegroep. Daarnaast werden eerdere bevindingen van het Laboratorium voor Experimentele Hematologie bevestigd (Nuyts et al., manuscript in voorbereiding), namelijk dat het aantal circulerende DCs in het perifere bloed van MS patiënten lager ligt dan in gezonde controlepersonen. We observeerden echter geen effect van training op DC aantallen na 6 weken.

Bij aanvang van de studie vertonen beide DC subsets van MS patiënten een verhoogde expressie van CD86 en CCR7 in vergelijking met gezonde controlepersonen. Dit wordt bevestigd door eerdere experimenten in het Laboratorium voor Experimentele Hematologie (Nuyts et al., manuscript in voorbereiding). Deze bevindingen zijn echter tegenstrijdig met resultaten beschreven door Stasiolek et al. (2006). Zij toonden aan dat ex vivo expressie van CD86 significant lager is op pDCs van MS patiënten in vergelijking met gezonde controlepersonen (Stasiolek et al., 2006). Er valt wel op te merken dat zij enkel RR-MS patiënten includeerden in de studie, die bovendien geen immuunmodulerende medicatie namen. In die studie gebeurde analyse van de resultaten op basis van het percentage cellen positief voor CD86, terwijl in deze thesis de analyse gebeurde op basis van CD86 expressieniveau (uitgedrukt door MFI) van de totale DC subset populatie. Aangezien onze MFI waarden opmerkelijk laag zijn, is het noodzakelijk om onze resultaten te bevestigen met kwantitatieve RT-PCR. De verhoogde expressie van CD86 en CCR7 op circulerende mDCs van MS patiënten daalde naar het expressieniveau van gezonde controlepersonen na 6 weken training. Verder zagen we geen verschil in CD62L en CCR5 expressie op circulerende DCs, en ook geen effect van training op de expressie van deze moleculen. CD86 en CCR7 zijn beide maturatiemerkers. CD86 is een costimulerende molecule, welke noodzakelijk is om T-cellen te activeren. CCR7 is een chemokinereceptor die instaat voor de migratie van mature DCs naar de lymfeknopen waar ze antigenen presenteren aan T-cellen. Onze bevindingen duiden er op dat beide circulerende DCs subsets in MS patiënten zich in een meer matuur stadium bevinden in vergelijking met gezonde controlepersonen en dus beter uitgerust zijn om T-cellen te activeren. Dit zou gedeeltelijk kunnen verklaren waarom een T-celrespons tegen eigen antigenen kan geactiveerd worden in patiënten met MS. Anderzijds, toonde Menges et al. (2002) aan dat semi-mature DCs, gematureerd met TNF α een hoge expressie van HLA moleculen en costimulatoren vertonen, maar slechts lage cytokinesecretie. Deze semi-mature DCs zijn tolerogeen en induceren CD4⁺ IL-10⁺ Tregs. Hierdoor verhinderen ze de ontwikkeling van EAE in muizen (Menges et al., 2002). Bijkomend onderzoek is dus noodzakelijk om het effect van fysieke activiteit op het T-celstimulerend vermogen van DCs te onderzoeken.

Fenotype en functie van DCs na TLR ligatie werden bepaald in perifere bloed van MS patiënten en gezonde controlepersonen. Na TLR ligatie is de expressie van CCR5 op beide DC subsets lager in MS patiënten dan in gezonde controlepersonen. Er wordt echter geen effect van training geobserveerd. Door expressie van de chemokinereceptor CCR5 migreren immature DCs uit het

beenmerg naar de periferie en blijven daar tot ze geactiveerd worden. Tijdens maturatie daalt CCR5 expressie en stijgt CCR7 expressie (Sallusto et al., 1998). Na TLR ligatie is de expressie van CD86 op pDCs hoger in MS patiënten dan in gezonde controlepersonen. Bovendien neemt CD86 expressie op pDCs van MS patiënten sterker toe na stimulatie dan op deze van gezonde controlepersonen in vergelijking met de onbehandelde conditie. Deze bevindingen wijzen mogelijk op een verhoogde gevoeligheid van pDCs van MS patiënten voor TLR ligatie weergegeven door een meer uitgesproken wijziging in het expressiepatroon van CCR5 en CD86. Deze bevindingen worden echter niet bevestigd in de literatuur. Stasiolek et al. (2006) concludeerden dat pDCs van MS patiënten inefficiënte maturatie vertoonden, omdat ze lagere of vertraagde CD86 opregulatie op pDCs aantoonden na stimulatie. Er zijn echter noemenswaardige verschillen met de in deze thesis uitgevoerde experimenten. Stasiolek et al. isoleerden namelijk pDCs uit PBMC, cultiveerden deze voor 96u, en stimuleerden de pDCs met CD40 ligand in de laatste 24u. In deze thesis werd de 24u maturatie met IQ of LPS en IFN γ van pDCs in volbloed nagegaan. Na 6 weken training is expressie van CD86 op IQ gestimuleerde mDCs significant gedaald in MS patiënten in tegenstelling tot de sedentaire controlegroep. Daarnaast ligt expressie van HLA-DR op mDCs van MS patiënten lager dan op deze van gezonde controlepersonen na stimulatie met LPS en IFN γ . Dit is in tegenstelling tot de bevinding dat pDCs van MS patiënten een verhoogde expressie van CD86 vertonen na TLR ligatie, in vergelijking met gezonde controlepersonen. Anderzijds vertonen IQ gestimuleerde pDCs na 6 weken training een significant lagere expressie van HLA-DR, in vergelijking met de sedentaire controlegroep. Analoog aan de resultaten van het fenotype van in vivo circulerende DC weergegeven in vorige paragraaf, vermoeden we dat DCs zich na training in een minder matuur stadium bevinden in MS patiënten, weergegeven door de verlaagde expressie van CD86 op IQ gestimuleerde mDCs en van HLA-DR op IQ gestimuleerde pDCs na training gedurende 6 weken. Of deze bevindingen het verwacht gunstig effect van training op de MS pathologie onderstrepen, zal verder onderzocht moeten worden.

Productie van IL-12 en IFN α werd bepaald op het bovenstaande plasma gecollecteerd na overnacht stimulatie met TLR liganden van volbloedstalen m.b.v. ELISA. Onze resultaten geven aan dat stimulatie met LPS en IFN γ voornamelijk in IL-12 productie resulteert, terwijl na IQ stimulatie voornamelijk IFN α productie gedetecteerd wordt. Aangezien LPS via TLR4 mDCs stimuleert die vervolgens IL-12 produceren en IQ via TLR7 pDCs stimuleert tot IFN α productie, stemmen deze resultaten overeen met onze verwachtingen. Om hoge IL-12 productie uit te lokken bij DCs, zijn er twee signalen vereist (Snijders et al., 1998). Stimulatie met LPS alleen is immers niet voldoende voor hoge IL-12 productie door DCs, terwijl additionele stimulatie met IFN γ of anti-CD40 resulteert in een sterk verhoogde IL-12 productie. Ter vergelijking, observeerden Van Brussel et al. (2011) IL-12 plasmaconcentraties < 10 pg/ml na stimulatie met uitsluitend LPS (Van Brussel et al., 2011). Daarentegen, in deze thesis resulteerde stimulatie met LPS en IFN γ in plasmaconcentraties tot 500 pg/ml. Bij aanvang van de studie kon geen verschil tussen MS patiënten en gezonde controlepersonen aangetoond worden voor zowel IL-12 als IFN α concentratie in plasmastalen na respectievelijk LPS/IFN γ en IQ stimulatie. Na 6 weken training observeren we een significante daling van de IL-12 secretie na stimulatie met LPS en IFN γ . Afname van pro-inflammatoire IL-12 productie wijst op een afname van de functie van mature DCs. Dit is in analogie met het verminderd mature DC fenotype na 6 weken training. IFN α productie was niet gewijzigd na 6 weken in zowel de trainingsgroep als de sedentaire controlegroep.

Serumconcentraties van volgende cytokines werden niet tot nauwelijks gedetecteerd: IL-1 β , IL-2, IL-5, TNF α en IFN γ . Voor deze cytokines kon er ook geen verschil aangetoond worden tussen de verschillende groepen. Productie van IL-8 en IL-10 daarentegen was meer uitgesproken. IL-10 serumconcentratie was niet verschillend in MS patiënten in vergelijking met gezonde controlepersonen. Na 6 weken lijkt de IL-10 serumconcentratie in zowel de trainingsgroep als de sedentaire controlegroep verhoogd, maar dit verschil kon niet statistisch bevestigd worden. IL-10 is een anti-inflammatoir cytokine, dat immuunonderdrukkende eigenschappen heeft. IL-8 serumconcentratie ligt lager in MS patiënten dan in gezonde controlepersonen. Daarnaast is er een effect van training zichtbaar op de serumconcentratie van IL-8, namelijk een stijging na 6 weken training. Aangezien IL-8, net zoals IL-12, een pro-inflammatoir cytokine is, is deze bevinding tegenstrijdig met de waargenomen IL-12 daling na 6 weken training in stalen gestimuleerd met LPS en IFN γ . Wat het immuunmodulerende effect is van de geobserveerde wijzigingen in concentratie van de bepaalde cytokines, zal verder onderzocht moeten worden. Hiervoor onderzoeken we m.b.v IFN γ ELISpot of antigeenspecifieke T-celresponsen versterkt of onderdrukt worden na toevoeging van serum verzameld voor en na training.

Ondanks de significante verschillen die we vinden voor (i) het relatieve aantal van de verschillende Treg subsets, (ii) expressie van CD86 en HLA-DR op respectievelijk mDCs en pDCs na IQ stimulatie, (iii) IL-12 productie na LPS/IFN γ stimulatie, en (iv) IL-8 serumconcentratie na 6 weken training door MS patiënten, observeren we deze verschillen – zij het soms niet significant - eveneens in de sedentaire controlegroep. Het significant verschil gezien in de trainingsgroep na 6 weken kan dus in vraag gesteld worden. Indien de geobserveerde verschillen werkelijk een effect van training zouden zijn, is de sedentaire controlegroep dan ook actiever geworden? Dit zou onderzocht kunnen worden door de MS patiënten een vragenlijst m.b.t. dagelijkse fysieke activiteit te laten invullen. Of zijn de geobserveerde verschillen het gevolg van interassay variabiliteit? Bovendien is bij aanvang van de studie reeds een verschil op te merken tussen de controlegroep en trainingsgroep binnen de MS patiënten voor zowel het aantal mDCs als voor de IFN α secretie na IQ stimulatie. Dit wijst mogelijk op een inefficiënte randomisatie van de patiënten over de twee groepen. Ondanks vooropgestelde randomisatiecriteria, namelijk bloedglucosespiegel, biometrische gegevens en resultaten in kracht- en uithoudingsproef, dienen we ons af te vragen of er ook rekening moet worden gehouden met type MS. Er werden immers reeds eerder verschillen geobserveerd tussen RR-MS patiënten en SP-MS patiënten met betrekking tot CD4⁺CD25⁺ Treg functie (Venken et al., 2006). Voor beide types van MS worden er geen kwantitatieve of fenotypische abnormaliteiten geobserveerd in CD4⁺CD25⁺ T-cellen. Echter CD4⁺CD25⁺ T-cellen in RR-MS patiënten vertonen een verminderde immuunonderdrukkende functie, in tegenstelling tot CD4⁺CD25⁺ T-cellen in SP-MS patiënten, welke een normale Treg functie vertonen.

Het dient opgemerkt te worden dat de resultaten weergegeven in deze masterproef afkomstig zijn van de stalen verzameld van voor aanvang van de training en na 6 weken deelgenomen te hebben in een opgesteld trainingsprogramma. Deze studie loopt echter nog verder, en nieuwe stalen worden verzameld na 12 weken training. Daarnaast werden recent ook nieuwe MS patiënten in de studie geïnccludeerd. Een uitbreiding van het aantal geïnccludeerde proefpersonen zal ons toelaten de geobserveerde significante verschillen te bevestigen, of verschillen die door toeval significant werden bevonden uit te sluiten. Niettegenstaande onze resultaten een immuunmodulerend effect van fysieke inspanning doen vermoeden, zijn deze bijkomende experimenten noodzakelijk om te kunnen concluderen of fysieke inspanning een gunstig of ongunstig effect heeft op aantal, fenotype en functie van cellulaire mediators van het immuunsysteem van MS patiënten.

Referentielijst

Artikels

1. Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R., and Rajewsky, K. (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 192, 393-404.
2. Beeson, P.B. (1994). Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am. J. Med.* 96, 457-462.
3. Ben-Nun, A., Wekerle, H., and Cohen, I.R. (1981). The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 11, 195-199.
4. Booss, J., Esiri, M.M., Tourtellotte, W.W., and Mason, D.Y. (1983). Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 62, 219-232.
5. Broekmans, T., Roelants, M., Alders, G., Feys, P., Thijs, H., and Eijnde, B.O. (2010). Exploring the effects of a 20-week whole-body vibration training programme on leg muscle performance and function in persons with multiple sclerosis. *J. Rehabil. Med.* 42, 866-872.
6. Calle, M.C., and Fernandez, M.L. (2010). Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutr. Res. Pract.* 4, 259-269.
7. Chiang, L.M., Chen, Y.J., Chiang, J., Lai, L.Y., Chen, Y.Y., and Liao, H.F. (2007). Modulation of dendritic cells by endurance training. *Int. J. Sports Med.* 28, 798-803.
8. Comabella, M., Montalban, X., Munz, C., and Lunemann, J.D. (2010). Targeting dendritic cells to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 499-507.
9. Confavreux, C., and Vukusic, S. (2006). Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 129, 595-605.
10. Conraads, V.M., Beckers, P., Bosmans, J., De Clerck, L.S., Stevens, W.J., Vrints, C.J., and Brutsaert, D.L. (2002). Combined endurance/resistance training reduces plasma TNF-alpha receptor levels in patients with chronic heart failure and coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 23, 1854-1860.
11. Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F., and Berneman, Z.N. (2007). Regulatory T cells and human disease. *Clin. Dev. Immunol.* 2007, 89195.
12. D'hooghe, M.B., Nagels, G., Bissay, V., and De, K.J. (2010). Modifiable factors influencing relapses and disability in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 16, 773-785.
13. Dalgas, U., Ingemann-Hansen, T., and Stenager, E. (2009). Physical Exercise and MS Recommendations. *Int. MS J.* 16, 5-11.
14. Ebers, G.C. (2008). Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 7, 268-277.
15. Golzari, Z., Shabkhiz, F., Soudi, S., Kordi, M.R., and Hashemi, S.M. (2010). Combined exercise training reduces IFN-gamma and IL-17 levels in the plasma and the supernatant of peripheral blood mononuclear cells in women with multiple sclerosis. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1415-1419.

16. Heesen, C., Gold, S.M., Hartmann, S., Mladek, M., Reer, R., Braumann, K.M., Wiedemann, K., and Schulz, K.H. (2003). Endocrine and cytokine responses to standardized physical stress in multiple sclerosis. *Brain Behav. Immun.* 17, 473-481.
17. Hirose, L., Nosaka, K., Newton, M., Laveder, A., Kano, M., Peake, J., and Suzuki, K. (2004). Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exerc. Immunol. Rev.* 10, 75-90.
18. Jennes, W., Kestens, L., Nixon, D.F., and Shacklett, B.L. (2002). Enhanced ELISPOT detection of antigen-specific T cell responses from cryopreserved specimens with addition of both IL-7 and IL-15--the Amplispot assay. *J. Immunol. Methods* 270, 99-108.
19. Kurtzke, J.F. (1975a). A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 51, 137-157.
20. Kurtzke, J.F. (1975b). A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol. Scand.* 51, 110-136.
21. Kurtzke, J.F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-1452.
22. Lancaster, G.I., Halson, S.L., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A.E., Drayson, M.T., and Gleeson, M. (2004). Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc. Immunol. Rev.* 10, 91-106.
23. Lassmann, H., and Ransohoff, R.M. (2004). The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. *Trends Immunol.* 25, 132-137.
24. McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., and Wolinsky, J.S. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 121-127.
25. Menges, M., Rossner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N.A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M.B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* 195, 15-21.
26. Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I.R., and Schwartz, M. (1999). Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* 5, 49-55.
27. Nieman, D.C. (1994). Exercise, infection, and immunity. *Int. J. Sports Med.* 15 Suppl 3, S131-S141.
28. Nuyts, A., Van Tendeloo, V.F., Van Camp, K., Lenders, K., Stein, B., Nagels, G., D'hooghe, M.B., Willekens, B., Berneman, Z.N., and Cools, N. (2011) Impairment of monocyte-derived dendritic cells to induce CD4+CD25hiFOXP3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. Submitted for publication.
29. Oksenberg, J.R., Baranzini, S.E., Sawcer, S., and Hauser, S.L. (2008). The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 9, 516-526.
30. Pedersen, B.K., Akerstrom, T.C., Nielsen, A.R., and Fischer, C.P. (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *J. Appl. Physiol* 103, 1093-1098.

31. Rivera-Quinones, C., McGavern, D., Schmelzer, J.D., Hunter, S.F., Low, P.A., and Rodriguez, M. (1998). Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 4, 187-193.
32. Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 28, 2760-2769.
33. Schapiro, R.T., Petajan, J.H., Kosich, D. (1988). Role of cardiovascular fitness in multiple sclerosis: a pilot study. *J. Neurol. Rehabil.* 2, 43-49.
34. Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Goebels, N. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 2428-2433.
35. Smith, L.L., Anwar, A., Fragen, M., Rananto, C., Johnson, R., and Holbert, D. (2000). Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur. J. Appl. Physiol* 82, 61-67.
36. Smith, R.M., Adeney-Steel, M., Fulcher, G., and Longley, W.A. (2006). Symptom change with exercise is a temporary phenomenon for people with multiple sclerosis. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 87, 723-727.
37. Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C.M., and Kapsenberg, M.L. (1998). High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int. Immunol.* 10, 1593-1598.
38. Stasiolek, M., Bayas, A., Kruse, N., Wieczarkowicz, A., Toyka, K.V., Gold, R., and Selmaj, K. (2006). Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. *Brain* 129, 1293-1305.
39. Steensberg, A., Fischer, C.P., Keller, C., Moller, K., and Pedersen, B.K. (2003). IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 285, E433-E437.
40. Stewart, L.K., Flynn, M.G., Campbell, W.W., Craig, B.A., Robinson, J.P., Timmerman, K.L., McFarlin, B.K., Coen, P.M., and Talbert, E. (2007). The influence of exercise training on inflammatory cytokines and C-reactive protein. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39, 1714-1719.
41. Suchanek, O., Podrazil, M., Fischerova, B., Bocinska, H., Budinsky, V., Stejskal, D., Spisek, R., Bartunkova, J., and Kolar, P. (2010). Intensive physical activity increases peripheral blood dendritic cells. *Cell Immunol.* 266, 40-45.
42. Tremlett, H., Zhao, Y., Joseph, J., and Devonshire, V. (2008). Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 1368-1374.
43. Van Brussel, I., Van Vre, E.A., De Meyer, G.R., Vrints, C.J., Bosmans, J.M., and Bult, H. (2011). Decreased numbers of peripheral blood dendritic cells in patients with coronary artery disease are associated with diminished plasma Flt3 ligand levels and impaired plasmacytoid dendritic cell function. *Clin. Sci. (Lond)* 120, 415-426
44. Venken, K., Hellings, N., Hensen, K., Rummens, J.L., Medaer, R., D'hooghe, M.B., Dubois, B., Raus, J., and Stinissen, P. (2006). Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J. Neurosci. Res.* 83, 1432-1446.
45. White, L.J., and Castellano, V. (2008). Exercise and brain health--implications for multiple sclerosis: Part II--immune factors and stress hormones. *Sports Med.* 38, 179-186.

46. White, L.J., Castellano, V., McCoy, S. (2006). Cytokine changes after a resistance training program in multiple sclerosis patients. *J. Sport. Sci.* 24, 1-4.
47. Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., and Noseworthy, J.H. (2001). Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest* 81, 263-281.

Boeken

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai S. (2007). *Cellular and Molecular Immunology*. 6th edition (Philadelphia: Saunders Elsevier).

Dankwoord

Hierbij zou ik graag iedereen bedanken die ervoor gezorgd heeft dat mijn thesis goed verlopen is. Allereerst mijn promotor Dr. Nathalie Cools, tevens mijn begeleidster. Ik dank haar voor de goede begeleiding in het labo, haar hulp bij het schrijven van deze thesis en het feit dat ze altijd klaar stond bij vragen en problemen. Ik ben haar ook dankbaar voor de kans om op dit project te kunnen werken. Ook Prof. Dr. Viggo Van Tendeloo, mijn co-promotor ben ik dankbaar voor het nalezen van deze thesis en voor de kans om in het Laboratorium voor Experimentele Hematologie onderzoek uit te voeren.

Ik apprecieer de samenwerking met de Universiteit van Hasselt ten zeerste, waarvoor dank aan mijn tweede co-promotor Prof. Dr. Bert Op't Eijnde. Ik wil ook het REVAL Rehabilitation Research Center of the PHL University College en het Biomedisch Onderzoek Instituut van de Universiteit van Hasselt bedanken voor het verzamelen van de MS patiënten en het organiseren van de trainingssessies.

Al de vrijwilligers die mij met plezier verder hielpen door een kleine bloeddonatie, wil ik hier graag bedanken. Maar ook Dr. Sébastien Anguille, Dr. Yannick Willemen, Dr. Amaryllis Van Craenenbroeck en de verpleging van het hematologisch dagziekenhuis voor het nemen van de bloedstalen bij de vrijwilligers.

Maar ik mag alle werknemers van het Laboratorium voor Experimentele Hematologie en het Centrum voor Celtherapie en Regeneratieve Geneeskunde zeker niet vergeten in dit dankwoord. Zij waren altijd bereid om mij te helpen bij problemen en vragen.

Uiteraard ben ik ook dankbaar aan mijn ouders, zij hebben mij de afgelopen vijf jaar enorm gesteund in mijn studies.

Bedankt!

Nathalie Deckx