

Isolering og vurdering av invariable NKT-cellers dreperfunksjon

**5. årsoppgave MED-3950 – Profesjonsstudiet i medisin ved Universitetet i
Tromsø**

Karsten Holt Simonsen - MK07

Veileder: Tor B. Stuge, Immunologisk forskningsgruppe, IMB , UiT

Tromsø 30.05.12

INNHOLDSFORTEGNELSE

Sidetall

- 4. Resymé
- 5. Forkortelser
- 6. Introduksjon
- 9. Hovedmål for oppgaven
- 11. Materiale og metode
- 16. Resultater
- 19. Data / Illustrasjoner
- 27. Diskusjon
- 30. Referanseliste

RESYMÉ

Invariable Natural Killer T (iNKT) celler er en undergruppe av T-lymfocytter som interagerer med det non-polymorfe CD1d-molekylet og aktiveres av glykosphingolipid-antigener (som α GalCer). iNKT celler kan produsere rikelige mengder immunoregulerende cytokiner som påvirker nivået av aktivering til mange typer celler og kan også drepe andre celler.

Målet for denne oppgaven var å undersøke om iNKT-celler hadde innvirkning på dannelsen av Epstein-Barr transformerte cellelinjer i laboratoriet.

Isolering av B-celler med anti-CD22 gir tilsynelatende mer effektiv etablering av Epstein-Barr Virus transformerte B-lymfoblaster (EBV-BL) sammenlignet med isolering av B-celler med anti-CD19. Både CD19 og CD22 uttrykkes nærmest utelukkende på B-celler. Det er derimot vist at iNKT celler uttrykker lave, men signifikante nivåer av CD19 på celleoverflaten. Vi undersøkte om iNKT-celler ko-isoleres med anti-CD19 og om de dreper EBV-transformerte B-celler.

PBMC ble sortert til hhv $CD19^+$ og $CD22^+$ celler ved MACS, og deretter transformert med Epstein-Barr virus. Cellekulturene ble vurdert for celleproliferasjon og innhold av $6B11^+$ iNKT celler ved flowcytometri. Vi isolerte senere PBMC og sorterte til $CD56^+$ celler ved MACS. Av disse ble $6B11^+$ celler isolert ved FACS. Den sorterte celleduspensjon ble merket med anti-CD107 antistoff og deretter reagerte med målceller (EBV-BL). Til slutt utførte vi flowcytometri for å vurdere celledreping i form av celledegranulering.

Vi identifiserte $6B11^+$ celler i PBMC fra alle donorer. B-cellesortering med MACS er mer effektivt (renere populasjon) med anti-CD22 antistoff sammenlignet med anti-CD19 antistoff. iNKT-celler degranulerte ikke ved inkubering med EBV-BL. Derimot fant vi at $CD3^+$ -celler, forskjellige fra iNKT celler, degranulerte i respons til EBV-BL og at disse ko-isoleres ved MACS sorting med anti-CD56 antistoff selv om disse er CD56 negative.

Vi kunne ikke påvise at iNKT-celler dreper EBV-BL. Dette skyldes trolig at donorene har tidligere gjennomgått EBV-infeksjon, og dermed har T-cellemediert immunitet mot viruset. Det er uvisst hvorfor disse cellene følger passivt med ved MACS.

FORKORTELSER

APC	Antigen Presenterende Celler
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxylfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
CTL	Cytotoksiske T-lymfocytter
EBV-BL	Epstein-Barr Virus transformerte B-lymfoblaster
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNKT celler	invariable Natural Killer T celler
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
NK celler	Natural Killer celler
NKT celler	Natural Killer T celler
PBMC	Mononukleære hvite blodceller (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
TNF	Tumor Nekrose Faktor

INTRODUKSJON

Invariable Natural Killer T (iNKT) celler er en undergruppe av T-lymfocytter. Disse cellene finnes i thymus lever, milt og benmarg. Til forskjell fra vanlige T-celler som binder til MHC-molekyler for aktivering, interagerer NKT-cellene med det non-polymorfe CD1d molekylet, og aktiveres av glykosphingolipid-antigener (som α GalCer). Dette resulterer i utskillelse av cytokiner (1). CD1d er et MHC I-lignende molekyl som normalt uttrykkes på en rekke ulike celler som B-celler, dendritiske celler, monocytter/makrofager og epiteliale celler (2). NKT-celler utvikles fra $CD4^+CD8^+$ - dobbeltpositive (DP) thymocytter. Da thymusepitelceller mangler CD1d, antar man at den positive seleksjonen faktisk skjer ved at NK-T celler selekteres av $CD4^+CD8^+$ -thymocytter som presenterer selvglykolipidantigener på CD1d (3).

En skiller i dag mellom følgende varianter NKT-celler:

Type I NKT celler, også kalt iNKT celler eller konvensjonelle NKT celler. Disse er CD1d-betinget T-celler som uttrykker en semi-invariant TCR dannet av kombinasjonen av $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ og $V\beta 11$ kjeder.

Type II NKT-celler, også kalt non-klassiske NkT celler, er også CD1d-betinget men har større TCR diversitet.

Den siste type NKT-lignende celler består av et stort utvalg celletyper, inkludert CD1d uavhengige celler. For enkelthets skyld er det anbefalt at disse cellene ikke kalles NKT celler (4).

iNKT-cellene utgjør ca 0,01-1% av lymfocytter i perifert blod (5).

NKT-cellenes funksjon

Et av kjennetegnene til iNKT celler er deres evne til å produsere rikelige mengder immunoregulerende cytokiner raskt etter aktivering. Cytokiner produsert av iNKT celler kan påvirke nivået av aktivering til mange typer celler, både i det medfødte, og ervervede immunsystemet, i tillegg til kvaliteten til en adaptiv immunrespons.

Dermed er iNKT celler en viktig regulator av immunresponser, og spiller en rolle i mikrobiell immunitet, autoimmunitet, tumor immunitet og kontroll av metastaser av flere tumorer, utvikling av diabetes type 1 og rheumatoid artritt (1). Se figur 1.

Denne diversiteten kommer av evnen til produksjon og utskillelse av ulike cytokiner med ulike funksjoner, både proinflammatoriske (IFN- γ , IL-17 og TNF- α) og antiinflammatoriske (IL-4, IL-10 og IL-13) (2)(6).

I tillegg til sekresjon av cytokiner kan iNKT-celler aktivere andre celler. En dendrittisk celle kan stimulere en NKT-celle til å uttrykke CD40L, som igjen fører til at NKT-cellen kan binde til CD40 på den dendritiske cell og stimulere den til produksjon av IL-12 (7). NKT-celler som er aktiverte kan igjen føre til aktivering av B-celler og NK-celler (8).

Mekanismene for aktivering av iNKT-celler er lite kartlagt. Studier foreslår imidlertid flere aktiveringsveier. Ved direkte aktivering vil glykolipider binde til CD1d og aktivere iNKT-celler direkte. Derimot kan iNKT-celler aktiveres av mange mikrober som mangler beslektede iNKT-celle antigener. Dette ved aktivering av cytokiner som under en pågående infeksjon. Ved slik indirekte aktivering vil mikrobielle produkter koble seg på ekstra- eller intracellulære toll-like reseptorer (TLRs), som igjen induserer produksjon av cytokiner (eks. IL-12, IL-18 og/eller interferoner). Disse cytokinene bindes til cytokinreseptorer på iNKT-cellene og aktiverer disse (4).

Det er vist at IL-2 og IL-12 er viktige cytokiner i aktivering av iNKT celler (1).

NKT-celler gjenkjenner og aktiveres av glykolipider fra bakterier, presentert av CD1d-molekylet (9). NKT-celler er også involvert i immunresponsen etter binding av LPS eller CpG (10).

iNKT celler uttrykker høye nivåer av granzyme B, perforin og FasL, noe som samsvarer med en cytolytisk funksjon for disse cellene. In vitro forsøk har vist at iNKT celler har egenskaper til å drepe antigen-pulserende APC ved en CD1d-avhengig måte (11).

Dagens vaksinasjonsstrategier som baserer seg på bruk av rekombinante virus er ikke alltid i stand til å fremkalle T-celleresponser lik de som trigges av naturlige infeksjoner. Kapasiteten til iNKT-celleligander for å øke effektiviteten av vaksiner mot multiple mikrobielle patogener har blitt testet. α -GalCer ble inkludert i en malaria-vaksine, noe som resulterte i økt immunitet. Dette var avhengig av produksjon av IFN- γ fra iNKT-celler. De adjuvante aktivitetene har og blitt testet i multiple kreft vaksiner (4).

En av de mer lovende kliniske studiene pr i dag omhandler en studie hvor pasienter med ikke-småcellet lungekreft ble fire ganger administrert PBMC dyrket med α -GalCer, IL-2, og GM-CSF (Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor). Denne behandlingen ble godt tolerert og ble etterfulgt av induksjon av iNKT-celle avhengige responser. Pasienter med økt IFN- γ produserende celler, sammenlignet med pasienter som responderte dårlig, hadde en økt median overlevelse. (Responders: 31,9 måneder, n =10; poor responders: 9,7 måneder, n=7; P=0,0015) (12).

NKT-celler finnes i den føto-maternelle interfasen (13) og kan dermed være av betydning i regulering av immunresponser i forbindelse med svangerskap. Publisert materiale knytter abort til tilstedeværelse av infeksjon og pro-inflammatoriske cytokiner. Siden NKT celler er kjent for å aktivere et antall andre leukocytter, kan det tenkes at abort grunnet aktivering av NKT celler kun er første steg i en kaskade av hendelser. Et fullgått svangerskap krever en koordinert regulering av det medfødte og ervervede immunsystemet.

Neonatal alloimmun trombocytopeni (NAIT) er en tilstand med blødningstendens som kan ramme et foster eller nyfødt barn og kan i alvorlige tilfeller føre til intrakraniell blødning og død. Tilstanden skyldes som regel antistoffer, produsert i moren, som angriper og fjerner fosterets blodplater. Til tross for mye kunnskap om antistoffene som forårsaker NAIT, er lite kjent vedrørende mekanismer som fører til immunisering og dannelse av disse antistoffene (14). Siden NKT-celler finnes i den føto-maternelle interfasen kan det tenkes at disse cellene spiller en rolle for NAIT.

Identifisering

Det har tidligere vært vanskelig å identifisere de invariante NKT-cellene da disse deler sine overflatemarkører med både NK-celler og T-celler, og ikke har noe eget cellespesifikt CD-molekyl. Dagens metode baserer seg på at det på iNKT-cellene er en konstant CDR3 region i α -kjeden av T-cellerreseptoren. Denne regionen er det utviklet et antistoff mot, kalt 6B11, som kan konjugeres med fluorokromer (FITC, Alexa 488, Biotin eller PE) for bruk ved flowcytometri (5). Dette antistoffet gjenkjenner dermed spesifikt iNKT-celler.

Hovedmål

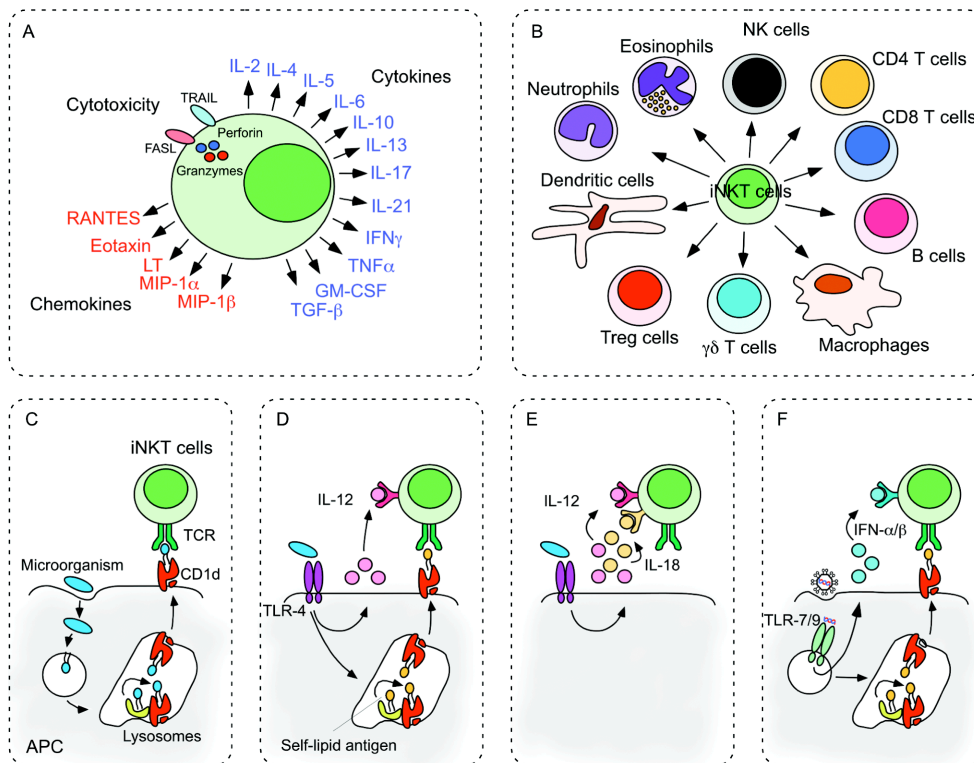
Denne oppgaven bygger videre på funn gjort av studenter i forbindelse med 5.årsoppgave i 2009 (15). De undersøkte om 6B11 var en effektiv markør for iNKT-celler. Som et bifunn oppdaget de at iNKT-cellene hadde et signifikant økt uttrykk av CD19 sammenlignet med T-celler, NK-celler og makrofager. CD19 har tidligere ikke blitt rapportert på overflaten av NKT-celler. CD19 er et signalerende molekyl og på B-celler er den en koreseptor og viktig for full aktivering av B-cellen. Anti-CD19 er tidligere blitt brukt i flowcytometri analyser for å ekskludere non-spesifikt merkede B-celler, celler som deler forward og side scatter karakteristikker til iNKT celler (16).

Utgangspunktet for denne studien var opprinnelig å undersøke om iNKT-celler kan aktiveres med anti-CD19 og om iNKT-celler uttrykker CD19 når de aktiveres. Vi fant med metodene vi benyttet at dette ikke var tilfellet.

En ny prosedyre brukt ved Immunologisk forskningsgruppe for å produsere humane monoklonale antistoffer innebærer isolering av B-celler og transformasjon av disse med Epstein-Barr virus (EBV). Transformerte B-celler vil da produsere antistoff. Anrikning av B-cellene før EBV-transformasjon har vist seg å gi godt resultat med hensyn til å etablere EBV-transformerte lymfoblast (EBV-BL) cellelinjer sammenlignet med uten anrikning. Grunnen er trolig at immunceller som cytotoksiske T celler og NK celler kan drepe EBV-BL. En overraskende observasjon er at isolasjon av B celler med anti-CD22 gir tilsynelatende mer effektiv etablering av EBV-BL sammenlignet med når B celler isoleres med anti-CD19 antistoffer. Både CD19 og CD22 uttrykkes høyt nærmest utelukkende på B celler. En mulig grunn er at det lave uttrykket av CD19 på iNKT celler fører til koiolering av iNKT celler sammen med B celler, og at iNKT cellene så dreper nylig transformerte B celler. iNKT celler er vist å ha dreper funksjon. Følgende problemstillinger ble derfor valgt for denne oppgaven:

1. Vil iNKT-celler koioleres med anti CD19 eller anti-CD22 antistoff?
2. Dreper iNKT-celler EBV-transformerte B-celler in vitro?

Får å besvare disse spørsmål utførte vi flere eksperimenter og vurderte resultatene ved mikroskopi og flowcytometri.



Figur 1. Aktiverte iNKT celler. Beskrivelse av funksjon. Figuren og figurteksten er hentet fra Matsuda et. al (11)

A) CD1d-betinget iNKT celler utøver potent dreping og raskt utskillelse av diverse cytokiner og kjemiokiner som (B) påvirker flere typer celler i det medfødte og ervervede immunsystem. Flere mekanismer for aktivering av iNKT celler er identifisert. C) Mikroorganismer som inneholder CD1d-betinget glykolipider aktiverer iNKT-celler direkte gjennom TCR, ved fravær av ko-stimulering. D) Alternativt kan LPS-positive bakterier aktivere APC som uttrykker TLR4 gjennom LPS og dermed indirekte indusere iNKT celle aktivering gjennom presentasjon av selv-glykolipider konjugert med IL-12 ko-stimulering, eller E) via IL-12/IL-18-avhengig, CD1d-uavhengig mekanisme. F) Sist, intracellulære patogener kan stimulere TLR7/9 til å indusere presentasjon av CD1d-betingede selv-glykolipider til iNKT celler. I denne settingen er ko-stimulering av IFN- α/β nødvendig.

MATERIALE OG METODE

Blodmateriale

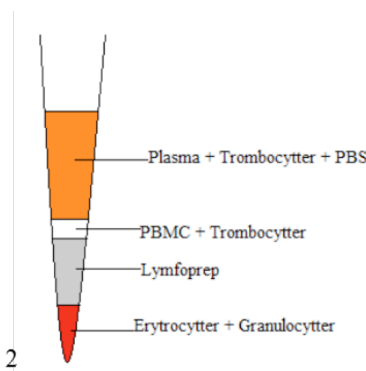
Vi brukte buffy coats i våre forsøk separert fra fullblod til friske blodgivere på Blodbanken ved Universitetssykehuset Nord-Norge. Dette er blodgivere som har sagt seg villige til at deres blod blir brukt i forskning. Det skilles ikke på kjønn. Tidligere studier viser ingen signifikant forskjell på frekvens av iNKT-celler hos menn og kvinner (5).

Det er ingenting som tilsier at det skal være forskjell på blodtype A, B og O.

Vi brukte blod fra fire donorer.

Isolering av mononukleære hvite blodceller, PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

For isolering av PBMC fra hver donor fulgte vi prinsippene beskrevet av Lymphoprep™ (Axis-Shield PoC, Norge) (17). Vi brukte 12ml Lymphoprep™ og la forsiktig blanding av 25 ml buffy coat og 15 ml PBS (phosphate buffer saline) som et lag oppå Lymphoprep-løsningen. PBS holder konstant pH (7,2 - 7,4) og osmolaritet er lik som hos mennesker. Deretter sentrifugerte vi dette (800xg, 30 min, 24, sakte akselerasjon, "no brakes"). Etter sentrifugering vil blandingen deles i fire ulike fraksjoner. Plasma og blodplater som har minst tetthet vil legge seg øverst, PBMC og en del blodplater vil legge seg som et lag over Lymphoprep™, mens de røde blodcellene og granulocytene som har større tetthet vil konsentreres i bunnen av prøveglasset. PBMC pipetteres ut, tilsettes PBS (slik at sum blir 45ml pr reagensrør). Deretter ny sentrifugering ved 250xg i 10 min. Heller så av supernatant, gjentar prosedyren to ganger for å vaske bort trombocytene. Etter siste vask resuspenderte vi cellene i 10 ml IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) + 10% FBS (Føtalt kalveserum), blandet godt slik at cellesuspensjon ble homogen.



Figur 2

Fordeling av ulike cellyper etter sentrifugering ved bruk av Lymphoprep™

Reagenser og medier

- T-cellemedium: 4% humant serum, 10% FBS (føtalt kalveserum), 85% IMDM, 1% 100x antibiotika (penicillin/streptomycin).
- PBSA: PBS (fosfate buffer saline) med 2% BSA (Bovint Serum Albumin)

Vurdering av cellekonsentrasjon

For å vurdere cellekonsentrasjonen tok vi ut 10µl celler og fortynte med 1ml PBSA. Deretter tok vi ut 10µl av den fortynte celleduspensjon og la på tellekammer. På det anvendte tellekammeret utgjør 16 ruter 0,1µl. For å finne konsentrasjonen i den aktuelle fortynte suspensjonen multipliseres antall celler i 16 ruter med 10^4 for å få konsentrasjonen i celler/ml. Dette må så multipliseres med 100 på grunn av at den utregnede konsentrasjon er fortyntet 1:100.

Fryse ned celler

For videre eksperimenter valgte vi å fryse ned celler fra alle donorene. Vi lagde en blanding av: Flexbumin (Humant serumalbumin) 50ml, IMDM 40ml, 10% DMSO (frysemedium) 10ml som filtrertes gjennom et filtersystem.

10ml celleduspensjon ble sentrifugert (300xg, 6min, 20°), heller deretter av supernatant og celler settes på is i 1min. Dette bedrer resultatet v/tilførsel av frysemedium. Tilsetter så 7ml frysemedium sammen med 1ml celleduspensjon. Dette resuspenderes og fordeles i 5 små cryoviles, ca 1,5ml blanding i hver. Fryses ned, først til -80°, deretter i flytende nitrogen.

Vurdere effektiviteten av dannelse av EBV transformerte B-cellelinjer

Isolerte B-celler ble inkubert i en time med EBV-supernatant og CpG 1g/ml. Dette er beskrevet som en effektiv metode å danne udødelige B-cellelinjer (18). EBV infiserer B-celler via CD12-reseptor, og cellene omdannes til lymfoblastoide cellelinjer som kontinuerlig deler seg. CpG er en kjent polyklonal B-celle aktivator. Cellene ble deretter resuspendert og overført til brønner på en rund bunn 96-brønns plate. Cellekonsentrasjon pr brønn ble fordelt ved to-folds fortykning, og strakk seg fra hhv 100 – 3 celler og 400 – 12 celler pr brønn. Etter 5-10 dager ble platene undersøkt under mikroskop, og vekst av B-celler ble evaluert.

Flowcytometri – måle innhold av 6B11 positive celler

Til flowcytometri brukte vi Beckton Dickinson FACScalibur flow cytometer.

For å vurdere innhold av 6B11-positive celler brukte vi PBMC fra de fire donorene 1622, 1624, 1639 og 1756.

Disse reagerte vi med følgende antistoff:

6B11 PE
CD19 Pe Alexa 610
CD3 APC
Buffer

Vi fordelte cellesuspensjon med konsentrasjon $2,0 \times 10^7$ celler/ml, blandet dette med medium og tilsatte i tuber til et samlet volum av 500 μ l. Cellene ble så vasket med fortykning i PBSA, sentrifugert ved 350xg i 4 minutter og resuspendert i PBSA. Deretter analysert ved flowcytometri.

Flowcytometri – Dreper assay

Etter at CD56-positive celler er isolert v/ MACS, og CD56 pos / 6B11 pos og negative celler er isolert v/ FACS, ble lymfoblastene merket med CFSE ihht beskrevet prosedyre (19). Tap av CFSE intensitet vil være et mål på dreping.

Disse populasjonene ble vurdert for dreping av B-celler og for degranulering (overflateuttrykk av CD107) av effektorceller ved flowcytometri. CD107 uttrykkes temporært på overflaten av cytotoxiske celler etter dreping (degranulering). CD107 er membranbundet på innsiden av cytotoxiske granuler. Når celler dreper, smelter granulene sammen med celleveggen og innsiden av granulene blir dermed eksponert på celleoverflaten. Disse blir derimot raskt internalisert. Derfor har vi CD107-APC antistoffet til stede i drepercelle-eksperimentet slik at antistoffet kan binde når degranulering finner sted. Når CD107 internaliseres følger bundet antistoff med inn i cellen, men fluorokromet fortsetter å fluorisere (selv om signalet kan reduseres en del over tid).

Cellekultur

For å undersøke om iNKT-celler vil ko-isolere med anti-CD19 ble B-celler isolert med hhv CD19 og CD22-antistoff, transformert med EBV og satt i kultur. Deretter ble det gjort flowcytometri for å undersøke innhold av 6B11-positive iNKT celler i kulturrene.

MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting)

Tidligere isolert PBMC sorteres til hhv CD19⁺ og CD22⁺ celler. Dette gjøres ved å overføre 4,5 ml cellekultur (tilsvarende 2×10^7 celler) til hvert sitt rør. Cellesuspensjon vaskes, og suspenderes til 100µl, settes på is. Tilsetter hhv anti-CD19 Pe-Alexa610, 20µl og anti-CD22 PE til hvert rør. Inkuberer på is i 30 min. Suspensjon tilsettes PBSA og ”vaskes” x 2 og resuspenderes til 160µl. Førte µl MACS beads tilsettes hvert rør, og suspensjon settes i kjøleskap 20 min. MACS beads er magnetiske partikler som bindes til antistoffet, og dermed vil celler merket med antistoffet sorteres magnetisk med MACS. Magneten som kolonnen settes inn i, kjøles ned i fryser i ca 30 min. Dette for blant annet å unngå at celler setter seg fast i kolonnen. Cellesuspensjonene tilsettes 10ml PBSA, sentrifugeres, supernatant helles av. Suspenderer til 500µl m/ IMDM+10%FBS. Celler sorteres ved at cellesuspensjonen vandrer gjennom MACS kolonnen. Cellene sorteres dermed ved positiv (adherent) (CD19⁺/CD22⁺) og negativ (non-adherent) (CD19⁻/CD22⁻) seleksjon. Celler som blir igjen i kolonnen er celler merket med antistoffer. Celler som renner igjennom er celler ikke merket med antistoff.

FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

For sortering av celler benyttet vi FACS Calibur (Becton, Dickinson Company). Dette er en metode der enkeltceller separeres fysisk fra resten av cellepopulasjonen. PBMC fra donor #1622 og #1756 er i forkant sortert med anti-CD56 ved MACS. Vi kombinerte disse to metodene for celledortering for å anrike celler av interesse med MACS og deretter finsortere små veldefinerte (multiparameter flowcytometri) cellepopulasjoner med FACS.

Antistoff

Vi benyttet følgende antistoff: CD22 Microbeads (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Tyskland*), Anti-PE Microbeads (*Miltenyi Biotec*), Human CD3 R-PE conjugated (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), Human CD22 R-PE conjugated (*Invitrogen*), 6B11-PE (*eBioscience Inc, San Diego, CA, USA*), Human CD3 APC conjugated (*Invitrogen*), Human CD19 PE-Alexa Fluor 610 conj, Streptavidin R-Phycoerythrin conj (*Invitrogen*), Anti-Biotin Microbeads (*Miltenyi Biotec*), Human CD4 PE-Alexa Fluor (*Invitrogen*), Anti-human CD19 PE EasySep (*Stem Cell Technologies Inc, Vancouver BC, Canada*), Anti-human CD56 (*Biolegend, San Diego, CA, USA*)

Statistikk

Observasjoner av cellepopulasjoner fremstilles ved flowcytometri. Data fra flowcytometri er bearbeidet i dataprogrammet FlowJo™. Vi har valgt å registrere opptil 200.000 celler pr cellesuspensjon. Resultater presenteres ved flowcytometri-illustrasjon. Da aksene er logaritmiske vil tydelig avgrensede cellepopulasjoner illustrere signifikante forskjeller i populasjoner. Begrenset tid er avgjørende for at disse forsøkene ikke er gjentatt med økt antall donorer.

RESULTATER

For å studere iNKT-cellers evne til å drepe B-celler og hvorvidt de påvirker etablering av EBV-transformerte B-cellelinjer begynte vi med å undersøke tilfeldig valgt donorblod for tilstedeværelse av iNKT-celler. Antallet iNKT-celler varierer mye fra et menneske til et annet, og vi ville identifisere donorblod med nok celler til å jobbe med.

Identifisering av 6B11 positive iNKT celler.

PBMC fra 4 donorer ble undersøkt innhold av 6B11⁺ iNKT-celler. Av disse ble donor #1622 (0,057%) og #1756 (0,070%) selektert for videre studier. Se figur 3.

EBV-transformerte B-cellekulturer

Siden hvilende iNKT-celler uttrykker lave, men signifikante nivåer av CD19 på overflaten; vil iNKT-celler ko-isolere med anti-CD19-antistoff? Dette spørsmålet er basert på observasjonen av at dannelsen av EBV-transformerte B-cellekulturer virker å være mer effektiv når B-celler er preisolert med anti-CD22 sammenlignet med anti-CD19 antistoff. Det er mulig at ko-isolerte iNKT celler kan drepe eller på annen måte inhibere veksten av transformerte B-celler (f.eks ved sekresjon av cytokiner). NK-celler er som kjent meget effektive til å lysere EBV transformerte B-celler (20). Dette kan være gjeldene for iNKT-celler da disse deler egenskaper til NK-celler og har blitt rapportert å være kapable til å drepe EBV transformerte B-celler (21). Det kan tenkes at flere iNKT-celler ko-isoleres med anti-CD19 sammenlignet med anti-CD22 siden det er vist at iNKT-celler uttrykker noe CD19 på celleoverflaten (15).

For å tilnærme dette spørsmålet, utformet vi flere underspørsmål: Det første var for å bekrefte om isolering med to forskjellige antistoff faktisk utgjorde noen forskjell i et kontrollert eksperiment.

Er dannelsen av EBV-transformerte B-cellekulturer mer effektivt når celler er preisolert med anti-CD22 antistoffer sammenlignet med anti-CD19 antistoffer? For å besvare dette utførte vi side-om-side sammenligning av effektiviteten av dannelsen av EBV transformerte B-celler når B-celler var preisolert med anti-CD22 eller anti-CD19 antistoff. Cellene ble isolert ved bruk av anti-CD19 og anti-CD22 antistoff i

MACS. Deretter utførte vi begrenset fortynningskulturer med transformerte celler og evaluerte vekst av B-cellelinjer ved mikroskopi. Se tabell 1 og figur 4. Observasjon ved mikroskopi viser at celler isolert med CD22⁺ celler i T-cellemedium fra donor #1622 gav flest celler. Derimot viste kultur tilsatt CD22⁺ celler i IMDM + 10% FBS ingen brønner med cellekonsentrasjon > 50 celler. For #1756 var det flest brønner med cellekonsentrasjon >100 pr brønn for CD19⁺-isolerte.

Vi fikk ikke entydig bedre fremvekst av EBV-BL med anti-CD22 antistoff.

Koisolering av iNKT-celler med anti-CD19

Vil iNKT-celler ko-isolere med anti-CD19, men ikke anti-CD22 antistoff? For å undersøke dette utførte vi to forskjellige eksperimenter.

Først isolerte vi B-celler med de to forskjellige antistoffene, transformerte med EBV, og satt i kultur i en begrenset periode for å tillate vekst av B-celler og potensielle ko-isolerte iNKT-celler. Se bilde 1. Tilstedeværelsen og mengden CD19⁺ og CD22⁺ B-celler ble deretter fastsatt ved bruk av flowcytometri. Se figur 5A og 5B.

Dette viste at B-celler isoleres effektivt med både CD19 og CD22 antistoffer. Videre så vi at flere ikke-B-celler ble sortert sammen med B-cellene med anti-CD19 antistoffet. B-cellesortering med MACS er mer effektivt (renere populasjon) med anti-CD22 antistoff sammenlignet med anti-CD19 antistoff. Andre celler har en tendens til å følge med anti-CD19 antistoff og dette kan være andre celler i tillegg til iNKT celler.

Deretter ble B-cellene isolert med to forskjellige antistoffer og tilstedeværelsen av 6B11-positive celler ble umiddelbart undersøkt til de positive og negative selekterte og preisolerte populasjoner vha multifarge flowcytometri. Se figur 6 og tabell 2.

6B11 positive (iNKT) celler kan identifiseres blant de sorterte B-cellene, men svært få iNKT celler ko-isoleres med B-cellene. De er tilstede i lavt antall og de ko-isoleres oftere med anti-CD19 (hhv 0,098 % og 0,034% av lymfocytter) sammenlignet med anti-CD22 (hhv 0% og 0,013 % av lymfocytter).

Dreper iNKT-celler EBV-transformerte B-celler?

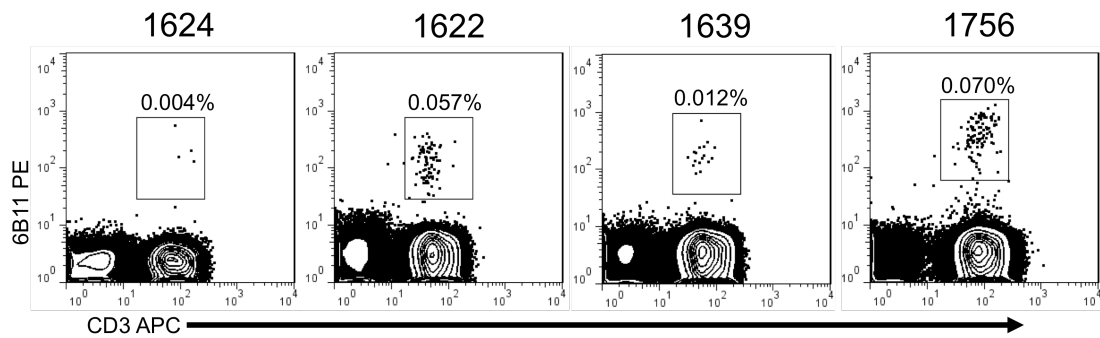
For å besvare dette isolerte vi forskjellige cellepopulasjoner, inkludert 6B11-positive celler og CD56-positive celler. Disse populasjonene ble vurdert ift dreping av B-celler og for degranulering (CD107a overflateuttrykk) av effektorceller ved bruk av flowcytometri. Rasjonalet for isolering med anti-CD56 antistoff er at de fleste NK-celler er CD56-positive og er kjent for å drepe EBV-transformerte celler (22). De fungerer derfor som en intern positiv kontroll og relativ sammenligning for vurdering av dreping og degranulering. iNKT celler er rapportert å være CD56-positive (5). Vi benyttet derfor både anti-CD56 og 6B11 antistoff i en to-steps isoleringsprotokoll for effektiv sortering av 6B11-celler. Se figurer 7A og 7B.

iNKT-celler degranulerte ikke ved inkubering med EBV-transformerte lymfoblaster.

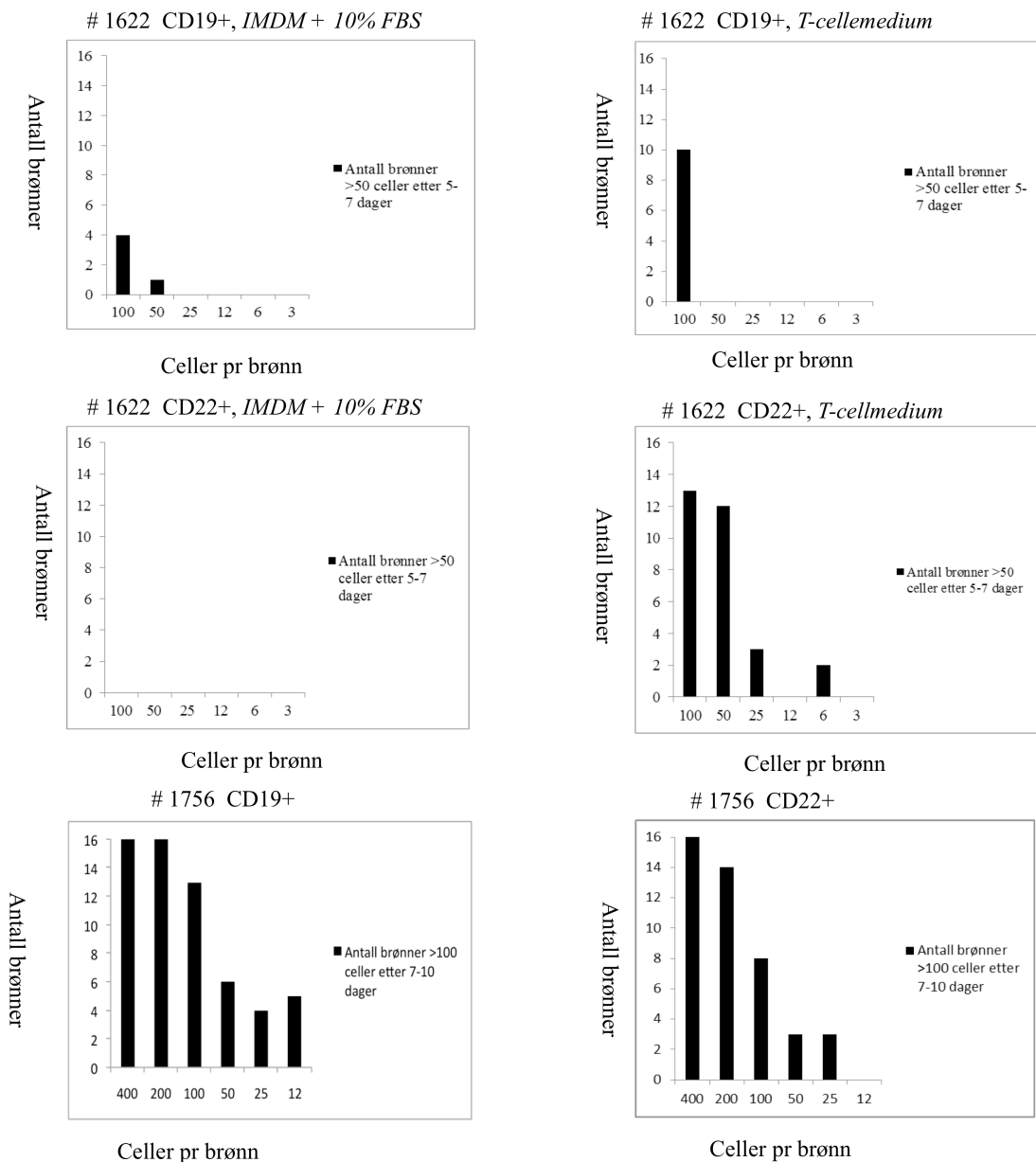
Derimot viste eksperimentet at CD3-positive celler, forskjellige fra iNKT-celler, degranulerte i respons til EBV-BL og at disse koisoleres ved MACSorting med anti-CD56 antistoff selv om disse er CD56 negative. Se figur 7C.

I dette eksperimentet lot det seg ikke gjøre å måle nøyaktig andel CFSE-merkede B-lymfoblaster. Vi har derfor ikke sammenholdt slik data med celledegranuleringen.

DATA / ILLUSTRASJONER



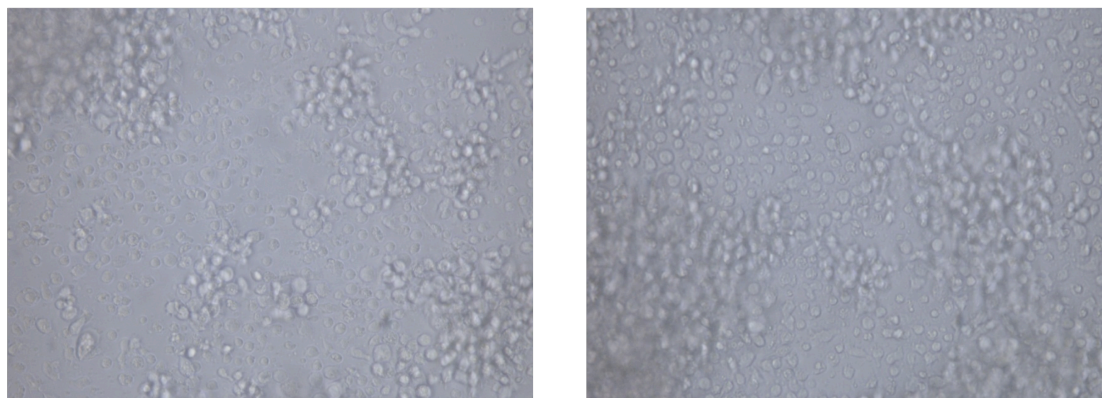
Figur 3. Hvite mononukleære blodceller (PBMC) fra fire friske donorer ble undersøkt for andelen celler som reagerte med et monoklonalt antistoff: 6B11 som spesifikt binder til iNKT celler. PBMC ble ”gattet” på lymfocytter og CD3-positive (og CD19low) celler. Data fra 200.000 ”events” (hendelser = celler eller partikler) ble samlet i hver datafil. Donor #1622 og #1756 ble selektert for videre studier fordi de hadde høyest andel 6B11-reaktive celler i blodet



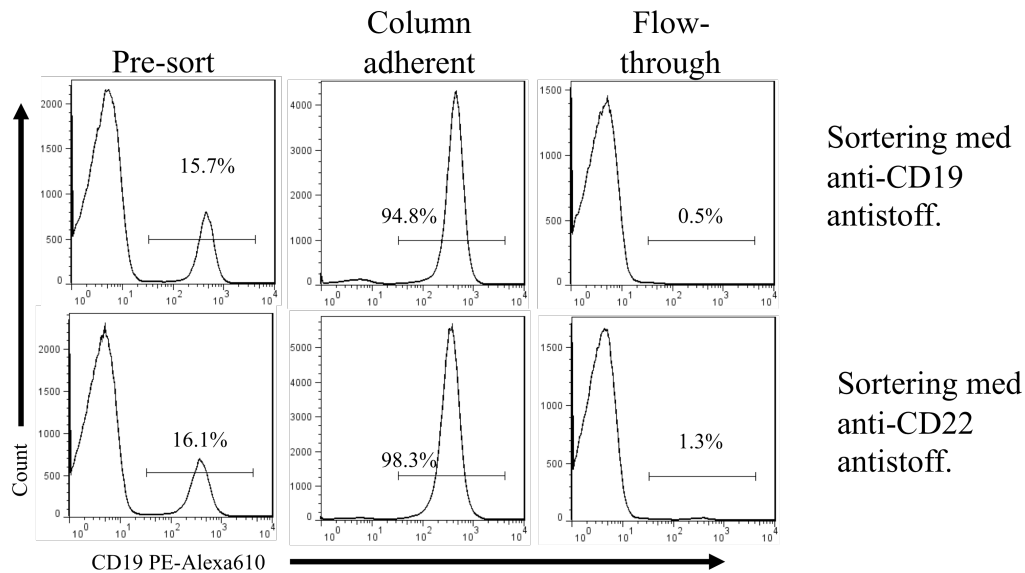
Figur 4. For dannelse av B-cellekulturer brukte vi PBMC fra donor #1622 og #1756. Etter tofolds-fortynning var konsentrasjonen for #1622 hhv 100, 50, 25, 12, 6 og 3 og for #1756 400, 200, 100, 50, 25, 12 celler pr brønn. Disse konsentrasjonene utgjorde hver 16 brønner, til sammen 96 brønner. Som cellemedium ble IMDM +10 FBS (føtalt kalveserum) eller T-cellemedium brukt. Etter 5-10 dager vurderte vi cellekonsentrasjon ved mikroskopi. Vi valgte å fremstille grafisk brønner som inneholdt >50 celler pr brønn for #1622 og >100 celler pr brønn for #1756 etter denne perioden. Jamfør tabell 1.

<u>Cellekultur</u>	<u>Antall brønner > 50 celler</u>	<u>Andel brønner</u>
#1622 CD19 <i>IMDM</i>	5	5,20%
#1622 CD19 <i>T-cellem.</i>	10	10,40%
#1622 CD22 <i>IMDM</i>	0	0,00%
#1622 CD22 <i>T-cellem.</i>	20	31,30%
Gjennomsnitt	8,75	11,60%
Standardavvik		13,73%
<u>Cellekultur</u>	<u>Antall brønner > 100 celler</u>	<u>Andel brønner</u>
#1756 CD19	60	62,50%
#1756 CD22	44	45,80%
Gjennomsnitt	52	53,25%
Standardavvik		13,08%

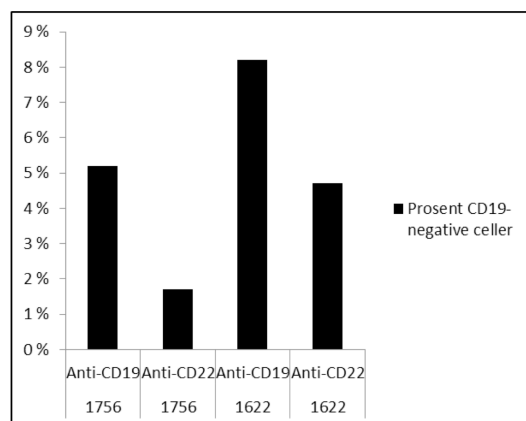
Tabell 1. Dannelse av B-cellekultur, ved bruk av PBMC fra donor #1622 og #1756. Jmfør figur 4 med figurtekst.



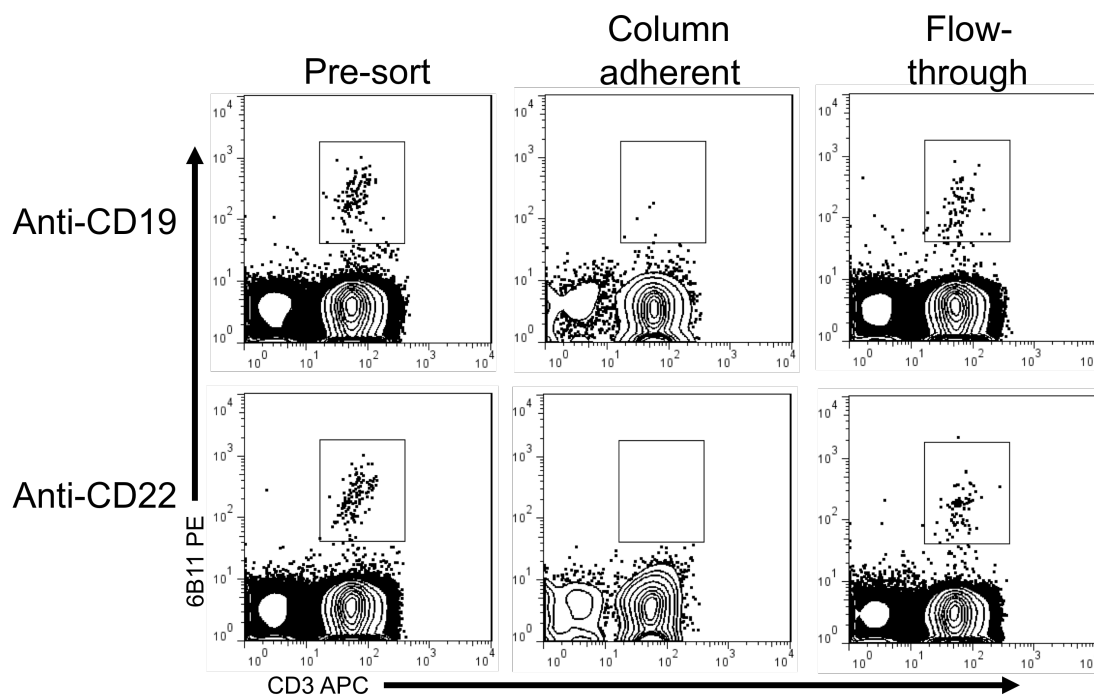
Bilde 1. Cellekultur fra donor #1622. Bilde tatt etter 4 dager. Venstre: B-cellekultur med CD19⁺ isolerte celler. Høyre: B-cellekultur med CD22⁺ isolerte celler



Figur 5 A. Flowcytometri analyse etter MACS sortering med anti-CD19 eller anti-CD22 antistoffer. Figuren viser hvor effektiv sorteringen av B celler er med anti-CD19 og anti-CD22 antistoffer. Som man ser av figuren isoleres B-celler effektivt med begge typer antistoff. Flere ikke-B-celler blir isolert sammen med B-cellene med anti-CD19 antistoffet.



Figur 5 B. Data fra flowcytometri i 5A, presentert ved stolpediagram. B-cellesortering med MACS er mer effektiv (renere populasjon) med anti-CD22 antistoff sammenlignet med anti-CD19 antistoff. Andre celler har en tendens til å følge med i sortering med anti-CD19 antistoff og dette kan være andre celler i tillegg til iNKT-celler.

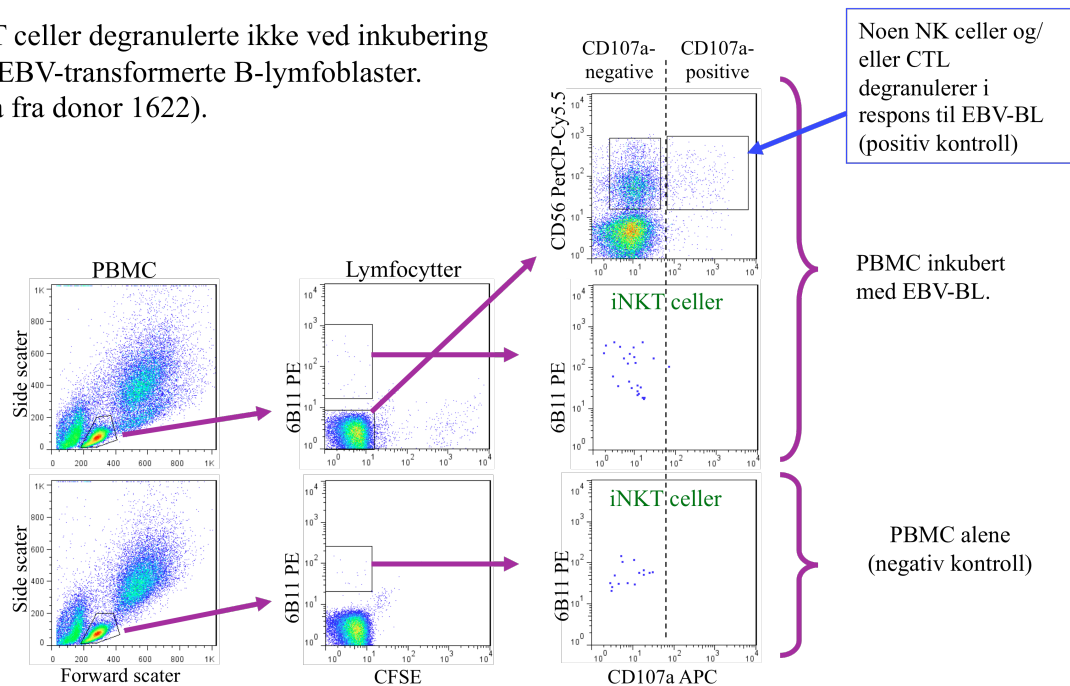


Figur 6. Flowcytometri analyse etter MACS sortering med anti-CD19 eller anti-CD22 antistoffer. 6B11-positive (iNKT) celler kan identifiseres bland de sorterte B cellene. Gatet på CD3-positive celler. Tabell 2 summerer antall 6B11 positive celler.

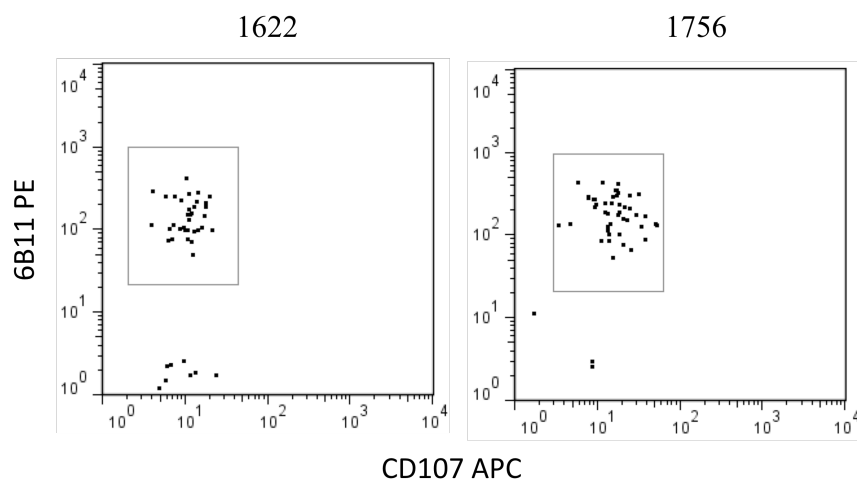
Donor ID:	MACS Ab:	Pre-sort:	Column adherent:	Flow-through:
1756	Anti-CD19	113 (0.103%)	6 (0.098%)	75 (0.102%)
1756	Anti-CD22	115 (0.105%)	0 (0,0%)	74 (0.091%)
1622	Anti-CD19	84 (0.071%)	4 (0.034%)	67 (0.055%)
1622	Anti-CD22	108 (0.091%)	1 (0.013%)	80 (0.066%)
Gjennomsnitt		105 (0,093%)	2,75 (0,036%)	74 (0,079%)
Standardavvik		(0,016%)	(0,043%)	(0,022%)

Tabell 2. Antall 6B11-positive celler identifisert i 200.000 analyserte "events". Prosent av lymfocytter i parentes. Kolonneadherente celler betyr prosent av B cellene.

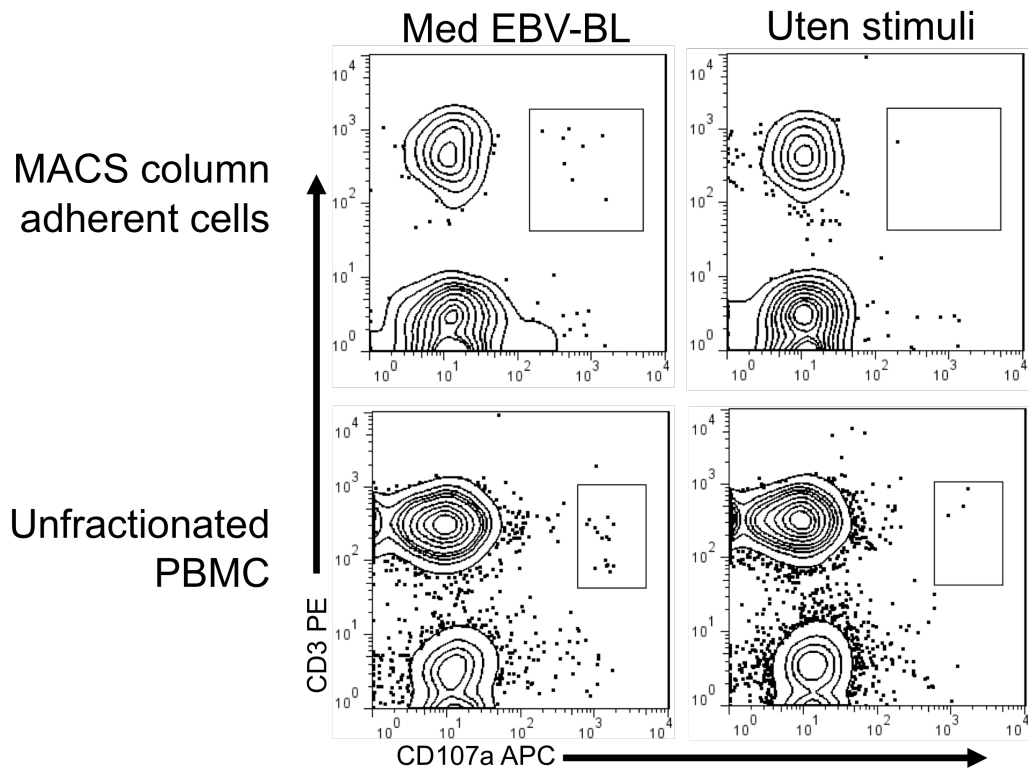
iNKT celler degranulerte ikke ved inkubering med EBV-transformerte B-lymfoblaster. (Data fra donor 1622).



Figur 7 A. Viser resultater fra 6B11-positive celler isolert med FACS og som ikke degranulerer i respons til B-lymfoblaster. I eksperimentet ovenfor ble ufraksjonert PBMC reagert med EBV-transformerte B lymfoblaster (EBV-BL) før cellene ble reagert med antistoffer. 6B11-positive celler ble deretter identifisert ved gating (istedenfor sortering) og analysert for degranulering. "PBMC alene" er PBMC som ikke ble reagert med EBV-BL og derfor ikke forventes å degranulere. Samme resultat for 1756 PBMC (ikke vist). (CTL = Cytotoksiske T-lymfocytter)



Figur 7 B. Celler fra begge donorer sortert med FACS, gatet på 6B11⁺ celler. Ved FACS ble det fra donor #1622 sortert 521 6B11⁺ celler. Fra #1756 sortert 443 6B11⁺ celler. Disse ble hver tilsatt 500 målceller. Flowcytometri ble gjort for å undersøke om det skjer celledegrulering ved å måle innhold av CD107.



Figur 7 C. CD3-positive celler, forskjellige fra iNKT-celler, degranulerer i respons til EBV-BL og koesoleres ved MACSortering med anti-CD56 antistoff selv om de er CD56 negative. Dette viser at det finnes celler i blod hos tilfeldig valgte friske individer som har cytotoxiske T celler som kan drepe EBV-transformerte B celler, og at disse cellene kan følge passivt med ved MACSortering.

DISKUSJON

I denne studien har vi identifisert iNKT-celler og sett på ulike metoder for å undersøke funksjonelle responser hos aktiverte NKT-celler. Vi identifiserte 6B11-positive iNKT-celler hos alle donorer. Vi fant at B-celler isoleres effektivt med både CD19 og CD22 antistoffer, og at iNKT-celler kan identifiseres i begge populasjoner. Videre undersøkte vi om iNKT-celler dreper EBV-transformerte B-celler. I vårt eksperiment var degranulering mål på celledreping, og iNKT-celler degranulerte ikke ved inkubering med EBV-transformerte B-lymfoblaster.

Det er rapportert om flere parametere på aktivering av iNKT-celler. Studier har vist at aktiverte iNKT-celler har økt utskillelse av cytokiner som IL-2, IL-4 og IFN- γ . Aktivering av dendrittiske celler involverer interaksjoner mellom CD40 og CD40 ligand med økt uttrykk av CD40L hos iNKT celler (4). Overflatemarkører som CD25, CD38, CD69, CD95, CD154, HLA-DR er rapportert å være oppregulert ved aktivering. iNKT-celler deler noen overflatemarkører med NK-celler, som CD16, CD56 og CD161 (5). Proliferasjon er en parameter på aktivering av celler.

I vår studie valgte celleproliferasjon som mål på aktivering. Dette valget begrunnes med tidsbegrensning, antall gjennomførte eksperimenter og tilgjengelige antistoff ved studiens oppstart. Ved å måle utskillelse av diverse cytokiner, eventuelt måle uttrykk av andre overflatemolekyler ville dette trolig resultert i bedre kontroll og målinger av aktivering.

Dannelsen av EBV-transformerte B-cellelinjer ble vurdert ved mikroskopi. Hos donor #1622 observerte man flest celler i den CD22⁺ isolerte populasjon. Hos donor #1756 ble det derimot observert flest celler i den CD19⁺ isolerte populasjon. Vi fikk altså ikke entydig bedre fremvekst av EBV-BL med anti-CD22 antistoff. Tilfeldigheter ved fortynning kan være utslagsgivende, og derfor bør dette eksperimentet gjentas flere ganger. Cellekulturene kan ikke direkte sammenlignes av flere årsaker. De har forskjellig fortynning; #1622 ble fortynnet fra 100 celler pr brønn, mens #1756 ble fortynnet fra 400 celler pr brønn. De ble undersøkt mikroskopisk ved forskjellig tidspunkt, og ved #1756 ble det kun brukt en type cellemedium.

Cellekulturen som ble vurdert for innhold av 6B11-positive celler viste at iNKT-celler kan identifiseres blant de sorterte B-cellene. De ko-isoleres oftere med anti-CD19 enn

med anti-CD22, men begge er kun i svært lavt antall. Dette stemmer med at det ble påvist et lavt antall iNKT-celler i PBMC fra donorene (hhv 0,057% og 0,070%). Cellene ble i forkant isolert med MACS. Det er mulig at kombinasjonen av to isoleringsprosedyrer, MACS og FACS, vil resultere i et mer gunstig resultat i forhold til effektivitet av EBV transformasjon og/eller vekst av celler, når preisolering utføres med anti-CD22 sammenlignet med anti-CD19. I forsøk hvor man har fulgt MACS isolering med FACS for å isolere IgG-positive B-celler, har vist at B-celler utgjør 5-10% av de MACS isolerte cellene (Eksteen et al, data ikke publisert). Siden kombinasjonen av begge prosedyrene er tidkrevende, valgte vi i denne oppgaven kun å isolere med MACS.

B-cellesortering med MACS er mer effektivt og gir renere populasjon, med anti-CD22 antistoffet sammenlignet med anti-CD19 antistoff. 6B11 positive celler ble identifisert i begge B-cellepopulasjoner, men høyest blant de anti-CD19 isolerte B-cellene (hhv 0,098% og 0,034% av lymfocytene). Dette i henhold til vår teori om at det er celler som følger med og som fører til lavere suksess i etablering av B-cellekultur, og blant disse er iNKT-celler.

Vi viste at iNKT-celler ikke degranulerte ved inkubering med EBV-transformerte B-lymfoblaster. Degranulering (målt med deteksjon av CD107a antistoff i flowcytometri) var ment som et mål på dreping. En årsak til dette kan være at dreper eksperimentet ble utført etter at cellene ble reagert med 6B11 antistoffet og det kan ha hindret dreping. Tilsetning av 6B11-antistoff kan føre til aktivering av iNKT celler. iNKT-celler kan etter aktivering bli anerge (23). Derimot degranulerte CD3 positive celler, som ikke var iNKT-celler. Dette viser at det finnes celler i blod hos tilfeldig valgte friske individer som har cytotoxiske T-celler som kan drepe EBV-transformerte B-celler, og at disse cellene kan følge passivt med ved MACSortering. En slik cytotoxisk T-cellereaksjon forutsetter at individet tidligere har gjennomgått en EBV-infeksjon. Det er kjent at de fleste personer er infisert med EBV og har aktiv T-cellemediert immunitet som holder viruset under kontroll. For å undersøke dette videre kan man screene donorer for antistoff mot EBV, og deretter gjenta eksperimentet med PBMC fra donorer som ikke har gjennomgått en slik infeksjon. Studier har vist bruk av cyclosporin A for å hemme T-celler i å drepe infiserte B-celler i cellekultur for å etablere EBV-transformerte cellelinjer fra humant blod (24).

Det ser ut til at anti-CD19 antistoff drar med seg flere "ikke-B-celler" i større grad enn anti-CD22 antistoffet. Det er uvisst hva som er årsaken til dette. Det er mulig at dette er grunnen til at man ser en slik degranulering. For å undersøke dette kan man utføre et eksperiment der man sorterer med anti-CD19 og anti-CD22 og måler degranulering i alle populasjoner.

Vi har i denne studien utført eksperimenter med bruk av PBMC fra kun to donorer. Det ville vært interessant å gjenta eksperimentene med et større utvalg, samt inkludert donorer med en akutt eller kronisk immun-mediert sykdom, f.eks diabetes type I, da disse er vist å ha et høyere innhold av iNKT-celler i blodet.

REFERANSER

1. Hou R, Goloubeva O, Neuberg DS, Strominger JL, Wilson SB. Interleukin-12 and interleukin-2-induced invariant natural killer T-cell cytokine secretion and perforin expression independent of T-cell receptor activation. *Immunology*. 2003;110(1):30-7.
2. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annual review of immunology*. 2005;23:877-900.
3. Bogen B, Munthe LA. *Immunologi 2007*. 334 p.
4. Wu L, Gabriel CL, Parekh VV, Van Kaer L. Invariant natural killer T cells: innate-like T cells with potent immunomodulatory activities. *Tissue antigens*. 2009;73(6):535-45.
5. Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, Kumari K, Wasserfall C, Mulder CB, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*. 2007;122(1):1-14.
6. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(8):557-68.
7. Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y, et al. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(7):1121-8.
8. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*. 1999;163(9):4647-50.
9. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, Fujio M, Garcia-Navarro R, Benhnia MR, et al. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nature immunology*. 2006;7(9):978-86.
10. Paget C, Mallevaey T, Speak AO, Torres D, Fontaine J, Sheehan KC, et al. Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. *Immunity*. 2007;27(4):597-609.
11. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Current opinion in immunology*. 2008;20(3):358-68.
12. Motohashi S, Nagato K, Kunii N, Yamamoto H, Yamasaki K, Okita K, et al. A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J Immunol*. 2009;182(4):2492-501.
13. Boyson JE, Rybalov B, Koopman LA, Exley M, Balk SP, Racke FK, et al. CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(21):13741-6.
14. Skogen B, Killie MK, Kjeldsen-Kragh J, Ahlen MT, Tiller H, Stuge TB, et al. Reconsidering fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia with a focus on screening and prevention. *Expert review of hematology*. 2010;3(5):559-66.
 15. Pedersen LK, Holgersen C. Identifisering og fenotyping av invariable NKT-celler. 5års oppgave i Stadium IV - medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø 2009.
 16. Sharma AA, Chew L, Ladd M, Jen R, Lavoie PM. Ex vivo purification and characterization of human invariant Natural Killer T cells. *Journal of immunological methods*. 2011;373(1-2):1-7.
 17. AS A-SP. Lymphoprep - Product Description. In: AXIS-SHIELD, editor. 2003.
 18. Fraussen J, Vrolix K, Martinez-Martinez P, Losen M, Meulemans E, De Baets MH, et al. A novel method for making human monoclonal antibodies. *Journal of autoimmunity*. 2010;35(2):130-4.
 19. Molecular Probes IDT. CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (C34554). 2005.
 20. Markasz L, Vanherberghen B, Flaberg E, Otvos R, Stuber G, Gustafsson Jernberg A, et al. NK cell-mediated lysis is essential to kill Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B cells when using rituximab. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2009;63(6):413-20.
 21. Chung B, Allan L, Priatel J, den Elzen Pv, Tan R. NKT Cells Kill EBV Transformed B Cells following CD1d Upregulation by RAR α . *Clinical Immunology*. 2010;135, Supplement(0).
 22. Boyson JE, Aktan I, Barkhuff DA, Chant A. NKT cells at the maternal-fetal interface. *Immunological investigations*. 2008;37(5):565-82.
 23. Cerundolo V, Silk JD, Masri SH, Salio M. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(1):28-38.
 24. Chen C, Johnston TD, Jeon H, Gedaly R, McHugh P, Ranjan D. Cyclosporine epstein-barr virus-infected human B-cell transformation assayed by three correlated assay methods. *Transplantation proceedings*. 2009;41(1):366-70.