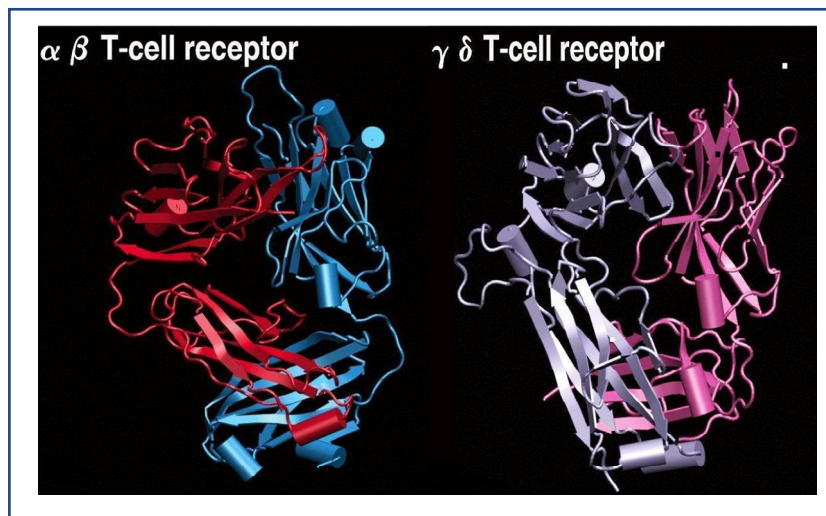


# Karakterisering av NK-reseptorer og kjemokinreseptorer i $\alpha\beta$ NKT-celler og $\gamma\delta$ NKT-celler

---



Hilde Herning

2009

Karakterisering av  
NK-reseptorer og kjemokinreseptorer  
i  $\alpha\beta$  NKT-celler og  $\gamma\delta$  NKT-celler

av

*Hilde Herning*

*Master i biomedisin*

*Avdeling for helsefag*

Masteroppgave, 60 studiepoeng, utført ved Immunologisk Institutt  
og HiO

20 mai 2009



RIKSHOSPITALET

Immunologisk Institutt

## **Forord**

Resultatet av mange timers arbeid skal nå presenteres i denne oppgaven. Jeg har jobbet mye og lært en masse. NK-celler og kjemokiner var kjente begreper. NKT-celler kunne jeg lite om. Nå kan jeg mye mer.

Oppgaven er en del av Masterstudium i Biomedisin ved Høgskolen i Oslo. Arbeidet med oppgaven er utført ved Immunologisk Institutt, Rikshospitalet. Dette året har jeg fått være del av den veldig hyggelige forskergruppen til John Torgils Vaage. Takk til alle dere og til dere i Bent Rolstads gruppe for et lærerikt og morsomt år.

Noen må nevnes. Takk til Lise Kveberg og Ke Zheng Dai., alltid like tålmodige og hjelpsomme. Sist, men mest, Marit Inngjerdingen, min hovedveileder. Tilgjengelig, konstruktiv, litt stresset, pirkete, morsom, - en helt perfekt veileder. Tusen, tusen takk for all hjelp.

En stor klem til mannen min. Fordi han fortjener det. ☺

Takk til Sandra, Simen, Hanna, Jesper, Eirik, Kristine og alle andre flotte, inspirerende ungdommer jeg er så heldig å kjenne.

Takk til venner og familie som alltid oppmuntrer og hjelper.

Oslo 15.mai 2009

Hilde Herning

*Mennesket må forbli i den tro at det uforståelige er forståelig,  
ellers ville vi aldri forske.*

*Goethe*

## **Forkortelser og forklaringer**

Alexa 488	Fluorokrom Absorpsjonsmaksimum ved 488nm og emisjonsmaksimum ved 530 nm.
Alexa 647	Fluorokrom. Absorpsjonsmaksimum ved 600-650nm og emisjonsmaksimum ved 668 nm.
cDNA	Komplementært DNA med RNA som templat
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate Ribonuclease hemmer.
CD3	Et proteinkompleks som medvirker til å generere aktiveringssignal i T-celler.
CD4	Ko-reseptor for T-cellereseptor.
CD8	Ko-reseptor for T-cellereseptor.
CD45	Tyrosin fosfatase
dNTP	Deoksynukleotidtrifosfater, adeninTP, guaninTP, cytosinTP, tyminTP
EDTA	Ethylendiamintetraacetat. Binder til divalente kationer.
FBS	Føtalt bovint (kalve) serum
FACS	Fluorescenceactivated cell sorter. Flowcytometer
FITC	Fluorescein isotiocyanat Fluorokrom Absorpsjonsmaksimum ved 488nm og emisjonsmaksimum ved 525 nm.
Fluorokrom	Fluoriserende fargestoff med karakteristisk eksitasjons og emisjonsspekter
HLA	Human Leukocytt Antigen
IL-4	Interleukin 4.Cytokin
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$ . Cytokin
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA	MHC klasse I relatert kjede(chain) A
MICB	MHC klasse I relatert kjede(chain) B

MMLV	Moloney murine leukemia
PBS	Fosfatbufret saltvann.
PE	Phycoerythrin
	Fluorokrom
	Absorbsjonsmaksimum ved 495nm og emisjonsmaksimum ved 575 nm.
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex.
	Fluorokrom
	Absorbsjonsmaksimum ved 488nm og emisjonsmaksimum ved 678 nm.
Rpm	Sentrifugehastighet
	Antall omdreininger per minutt
RPMI Media	Roswell Park Memorial Institute Media
	Celledyrkningsmedium
TAE buffer	Tris-acetat EDTA buffer.
	Buffer for agarosegel elektroforese hvor man separerer DNA og RNA.
Tris base	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

## Sammendrag

NKT (Natural Killer T) celler er en undergruppe av T-celler som har egenskaper til felles med både NK (Natural Killer)-celler og konvensjonelle T-celler. De uttrykker både T-cellerreseptor (TCR) og NK-cellemarkører. T-cellerreseptoren uttrykkes som en heterodimer med enten en  $\alpha$ - og en  $\beta$ -kjede eller en  $\gamma$ - og en  $\delta$ -kjede. Konvensjonelle T-celler regnes til det adaptive immunforsvaret, mens NKT-celler fungerer som en celle i det medfødte immunforsvaret. Dette skyldes at de har en rask respons på stimulering av T-cellerreseptoren ved å produsere store mengder cytokiner. De er helt unike blant lymfocytter ved at de nærmest eksplosivt frigjør IL-4. NKT-celler kan også ha cytotoksisk aktivitet som vi ser hos NK-celler.

Mekanismene for NKT-celleaktivering og immunregulering er ikke klarlagt, men det ser ut til at NKT-celler er involvert i immunreguleringen av en rekke patologiske tilstander.

De fleste studiene av NKT-celler er gjort i mus. En rekke sykdomsassosierte humane gener har homologer i rottegenomet. Det er derfor viktig å også ha kunnskap om rotte NKT-celler. Man vet i dag svært lite om NKT-celler i rotte, og vi har derfor gjort en kartlegging av rotte NKT-cellers uttrykk av NK-cellerreseptorer og kjemokinreseptorer. I rotte defineres NKT-celler av NK-reseptoren NKR-P1A, i kombinasjon med enten  $\alpha\beta$ TCR eller  $\gamma\delta$ TCR.

Vi har sortert ut  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler fra rottemilt og studert de to populasjonene med hensyn på et repertoar av NK-reseptorer og kjemokinreseptorer. Uttrykket av de ulike reseptorene er studert på mRNA-nivå ved hjelp av RT-PCR og på proteinnivå ved bruk av flowcytometri. Vi fant sammenfallende uttrykk av NK-reseptorer på de to gruppene av NKT-celler, mens det var enkelte ulikheter i uttrykk av kjemokinreseptorer som kan ha betydning for *in vivo* distribusjon av cellene.

## Summary

NKT (Natural Killer T) cells is a subpopulation of T-cells that share some characteristics with both NK (Natural Killer) -cells and conventional T-cells. They express both the T-cell receptors (TCR) and NK-cell markers. The T-cell receptor is expressed as a heterodimer consisting of either an  $\alpha$ - and a  $\beta$ -chain or a  $\gamma$ - and a  $\delta$ -chain. Conventional T cells are a part of the adaptive immune system, whereas NKT cells function as cells in the non-adaptive immune system. They respond quickly to T-cell receptor stimulation by producing high amounts of cytokines. NKT cells are quite unique among lymphocytes due to their almost explosive release of IL-4. NKT cells do also show cytotoxic activity similar to NK cells.

The mechanisms for NKT cell activation and immune regulation are not fully understood, but it seems that NKT-cells are implicated in the regulation of several pathological conditions. Most studies of NKT cells are done in mouse models. Many human genes associated to disease have homologues in the rat genome. To have knowledge of rat NKT cells is therefore of great importance. Up till now, the knowledge of rat NKT cells is quite limited. To take this knowledge a step further, we have done a phenotypic survey of rat NKT cells with regard to NK receptors and chemokine receptors. In the rat, NKT cells are defined by the NK receptor NKR-P1A in combination with  $\alpha\beta$ TCR or  $\gamma\delta$ TCR.

We have sorted out  $\alpha\beta$ NKT cells and  $\gamma\delta$ NKT cells from rat spleen, and studied a repertoire of NK receptors and chemokine receptors on both subsets. The receptor expression was studied at the mRNA level with RT-PCR, and at the protein level by flowcytometri. We found that the expression of NK receptors where quite similar for the two subsets, whereas there were some differences in chemokine receptor expression that may indicate differential localization *in vivo*.

# ***Innhold***

<b>FORORD</b> .....	<b>3</b>
<b>FORKORTELSER OG FORKLARINGER</b> .....	<b>4</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>6</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>7</b>
<b>1 INNLEDNING</b> .....	<b>10</b>
1.1 Hva er en NKT-celle? .....	11
1.2 Klassifisering av NKT-celler .....	12
1.2.1 $\alpha\beta$ NKT-celler.....	12
1.2.2 $\gamma\delta$ NKT-celler.....	14
1.2.3 Uttrykk av koreseptorene CD4 og CD8.....	14
1.3 NKT-cellenes lokalisasjon .....	14
1.4 NKT-cellenes funksjon .....	15
1.5 NK-reseptorer .....	17
1.6 Kjemokiner og kjemokinreseptorer .....	19
1.6.1 Kjemokinreseptorer .....	19
1.7 Formålet med oppgaven .....	20
<b>2 MATERIALE OG METODE</b> .....	<b>21</b>
2.1 Materialer .....	21
2.2 Metoder.....	25
2.2.1 Forsøksdyr .....	25
2.2.2 Isolering av mononukleære leukocytter fra rottemilt.....	25
2.2.2.1 Bakgrunn.....	25
2.2.2.2 Prosedyre .....	25
2.2.3 Anriking av celler til flowcytometri (fenotyping eller cellesortering).....	26
2.2.3.1 Formål .....	26
2.2.3.2 Prosedyrer .....	26
2.2.3.2.1 Anriking av NKT-celler i forkant av sortering .....	26
2.2.3.2.1.1 Antistoffbasert metode .....	26
2.2.3.2.1.2 Nylonullbasert metode .....	27
2.2.3.2.2 Anriking av celler i forkant av flowcytometri .....	27
2.2.4 Flowcytometri.....	28
2.2.4.1 Prinsipp.....	28
2.2.4.2 Utstyr .....	29
2.2.4.3 Prosedyre .....	29
2.2.5 Isolering av RNA.....	32
2.2.5.1 Prinsipp.....	32
2.2.5.2 Prosedyre .....	33
2.2.6 Revers Transkripsjon(53) .....	33



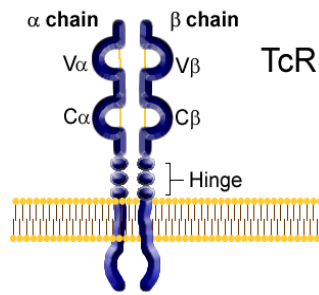
2.2.6.1	Prinsipp .....	33
2.2.6.2	Utstyr .....	34
2.2.6.3	Prosedyre .....	34
2.2.7	Polymerasekjedereaksjon -PCR(53) .....	35
2.2.7.1	Prinsipp .....	35
2.2.7.2	Utstyr .....	36
2.2.7.3	Prosedyre .....	36
2.2.8	Agarose gel-elektroforese .....	38
2.2.8.1	Prinsipp .....	38
2.2.8.2	Utstyr .....	39
2.2.8.3	Prosedyre .....	39
<b>3</b>	<b>RESULTATER .....</b>	<b>40</b>
3.1	Uttrykk av CD4 og CD8 på rotte NKT-celler .....	40
3.2	NK-reseptorer på $\alpha\beta$ NKT- og $\gamma\delta$ NKT-celler .....	41
3.2.1	Uttrykk av NK-reseptorer på mRNA nivå .....	41
3.2.2	Uttrykk av NK-reseptorer på proteinnivå .....	43
3.3	Kjemokinreseptorer på $\alpha\beta$ NKT- og $\gamma\delta$ NKT-celler .....	47
3.3.1	Uttrykk av kjemokinreseptorer på mRNA nivå .....	47
3.3.2	Uttrykk av kjemokinreseptorer på proteinnivå .....	48
<b>4</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>51</b>
4.1	NK-reseptorer på $\alpha\beta$ NKT- og $\gamma\delta$ NKT-celler i rotte .....	51
4.2	Kjemokinreseptorer på $\alpha\beta$ NKT- og $\gamma\delta$ NKT-celler i rotte .....	53
4.3	Metodiske betraktninger .....	54
4.3.1	Arbeidet med RT-PCR .....	54
4.3.2	Positive og negative kontroller for PCR og flowcytometri .....	55
4.4	Funksjon .....	56
4.5	Konklusjon .....	56
<b>5</b>	<b>REFERANSER .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>APPENDIX A .....</b>	<b>62</b>
6.1	Bruk av dyr i medisinsk forskning .....	62
6.1.1	Bakgrunn .....	62
6.1.2	Etiske betraktninger .....	64

# 1 Innledning

Avanserte organismer, som pattedyr, er utstyrt med et komplekst immunforsvar som beskytter oss mot infeksjoner eller ondartet cellevekst. *Immun* kommer fra latinske *immunis* og betyr *fri for*. Alle levende skapninger, både primitive og mer høyerestående, kan til en viss grad beskytte seg mot, holde seg *fri for*, angrep fra eksterne eller interne kilder. Immunforsvaret er et komplekst og sammensatt system som involverer mange organer, celletyper og løselige faktorer.

Tradisjonelt har immunforsvaret blitt inndelt i det non-adaptive (medfødte) og det adaptive (ervervede) immunforsvaret. Det non-adaptive immunforsvaret kan gi en umiddelbar reaksjon mot infeksjoner, mens det adaptive forsvaret trenger lenger tid på å utvikle seg, typisk en uke. Et viktig trekk ved adaptivt immunforsvar er utvikling av immunologisk hukommelse. Kjernen av immunforsvaret utgjøres av de hvite blodcellene (leukocytter). Leukocytter stammer alle fra pluripotente hematopoietiske stamceller i benmargen, og er enten av myeloid eller lymfoid avstamning. En myeloid stamcelle gir opphav til blant annet monocytter, dendritiske celler og mastceller. Disse celletypene regnes til det non-adaptive immunforsvaret. En lymfoid stamcelle gir opphav til B-celler, T-celler, NK (Natural Killer)-celler og NKT-celler. B- og T-cellene regnes til det adaptive immunforsvaret, mens NK-cellene regnes til det non-adaptive immunforsvaret. Både B-celler og NK-celler antas å bli ferdig utviklet i benmargen. T-cellene, derimot, fraktes som umodne celler (thymocytter) til thymus, og modnes der.

Lymfocytter uttrykker antigenreseptorer mot spesifikke molekyler eller strukturer. T-cellenes antigenreseptor (T-cellerreseptor, TCR) er en heterodimer bestående av enten en  $\alpha$ - og en  $\beta$ -kjede eller en  $\gamma$ - og en  $\delta$ -kjede. Flertallet av T-celler er  $TCR\alpha\beta^+$ , mens omtrent fem prosent av T-cellene uttrykker  $\gamma\delta$ TCR.  $TCR\alpha\beta$  binder seg til MHC klasse I, mens  $TCR\gamma\delta$  antas å binde til non-klassiske MHC-molekyler.  $\alpha\beta$ T-celler har to hovedoppgaver. Enten å drepe infiserte celler, eller skille ut cytokiner som hjelper i gang B-cellenes antistoffproduksjon og T-cellenes drapsfunksjon. T-drepercellene uttrykker koreseptoren CD8, mens T-hjelpeceller benytter koreseptoren CD4. Mens CD4 binder seg til MHC klasse II, binder CD8 seg til MHC klasse I. CD8-molekylet kan uttrykkes som en heterodimer med en  $\alpha$ - og  $\beta$ -kjede eller en homodimer med to  $\alpha$ -kjeder. T-celler er hovedsaklig  $CD8\alpha\beta^+$ . (1;2)



**Figur1.** Figuren viser T-cellenes antigenreseptor. Reseptormolekylet er en dimer. Her består den av en  $\alpha$ -kjede og en  $\beta$ -kjede.  $\gamma\delta$ TCR er bygget opp på samme måte.(3)

NK-celler har en del fellestrekk med T-dreperceller, og dreper infiserte celler eller kreftceller. Reseptorene som benyttes er derimot annerledes, og disse reseptorene omhandles senere i dette kapittelet. Majoriteten av NK-celler er  $CD8\alpha\alpha^+$ , i motsetning til T-celler som uttrykker  $CD8\alpha\beta$ -heterodimeren. (4)

Natural Killer T-celler (NKT-celler), som spiller hovedrolle i denne oppgaven, regnes som en undergruppe av T-celler, men har sin funksjon i det medfødte immunforsvaret. NKT-cellene kjennetegnes blant annet ved at de uttrykker T-cellerreseptorer i kombinasjon med NK-reseptorer. Ref: NKT-cellene ble oppdaget som resultat av en rekke funn på slutten av 1980-tallet og på begynnelsen av 1990-tallet.(5) Utrykket "NKT-celler" ble brukt første gang i 1995 i beskrivelsen av en undergruppe av murine T-celler som også hadde karakteristika til felles med NK-celler (6)

## 1.1 Hva er en NKT-celle?

Natural Killer T-celler (NKT-celler), som spiller hovedrollen i denne oppgaven, regnes som en undergruppe av T-celler. NKT-cellene ble oppdaget som resultat av en rekke funn på slutten av 1980-tallet og på begynnelsen av 1990-tallet.(5) Utrykket "NKT-celler" ble brukt første gang i 1995 i beskrivelsen av en undergruppe av murine T-celler som også hadde karakteristika til felles med NK-celler (6;7). Det vil si at NKT-celler uttrykker både T-cellerreseptor og NK-reseptorer. I mus er NK-reseptoren NKR-P1C en klassisk markør for NKT-celler, i kombinasjon med enten  $\alpha\beta$ TCR eller  $\gamma\delta$ TCR. Vi kommer tilbake med en nærmere beskrivelse av NKR-P1C senere i kapittelet. Som T-cellene, utvikles NKT-cellene i thymus, og de uttrykker også ulike markører som er typisk for aktiverte T-celler, eksempelvis CD44 og CD62L.(8) Tross likheter med T-cellene, er NKT-cellene kategorisert som en del av det medfødte immunforsvaret. Dette skyldes at de reagerer raskt, innen timer, etter en infeksjon ved å produsere store mengder immunregulatoriske cytokiner. NKT-celler er involvert i en lang rekke ulike immunresponser, som vi kommer tilbake til senere i kapittelet. (9)

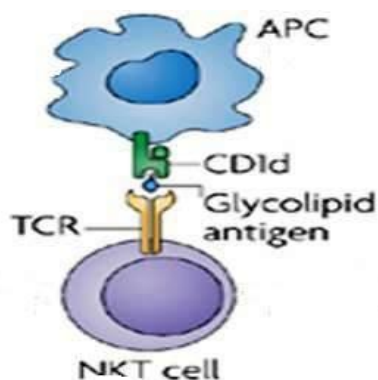
## 1.2 Klassifisering av NKT-celler

Alle modne  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler i mus uttrykker NKR-P1C.  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler i menneske og rotte uttrykker NK-cellemarkøren NKR-P1A. (10)

### 1.2.1 $\alpha\beta$ NKT-celler

Dale I. Godfrey *et al.* publiserte i 2004 en klassifisering av  $\alpha\beta$ NKT-celler hvor de ble delt inn i tre grupper (Tabell 1). De fleste  $\alpha\beta$ NKT-cellene i mus og menneske har en T-cellereseptor som viser restriksjon til det MHC klasse I lignende molekylet CD1d. Disse NKT-cellene kalles klassiske eller invariante (iNKT). Det meste som er publisert av NKT-cellelitteratur baserer seg på studier av disse invariante NKT-cellene. T-cellereseptoren har karakteristisk rearrangering av  $\alpha$ -kjeden kombinert med et begrenset utvalg av V $\beta$  gensegmenter (Tabell 1).(11) Invariante NKT-celler har dermed et definert, begrenset TCR repertoar. Mus  $\alpha\beta$ NKT-celler uttrykker V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 sammen med V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 eller V $\beta$ 2, mens humane  $\alpha\beta$ NKT-celler uttrykker V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 i kombinasjon med V $\beta$ 11. En homolog invariant TCR  $\alpha$ -kjede i rotte, V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18, med stor likhet til V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 i mus og V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 i menneske ble identifisert i 2000 (12). TCR  $\alpha$ -kjeden på rotte NKT-celler har ingen kjent preferanse for  $\beta$ -kjede, og det er vist et varierende uttrykk av V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 8.4, V $\beta$ 10 og V $\beta$ 16 i ulike rottestammer. (13;20)

Invariante NKT-celler gjenkjenner glykolipid presentert av CD1d. (14) På grunn av NKT-cellenes tilbøyelighet til å reagere med autologe celler antar man at NKT-celler kan gjenkjenne både endogene og eksogene glykolipider. Bendelac *et al.* fant i 2004 at isoglobotrihexosylceramide (iGb3), et lysosomalt glykosphingolipid, er et naturlig CD1d-presenterende ligand som stimulerer NKT-celler. iGb3 som et fysiologisk ligand for NKT-celler er imidlertid kontroversiell, blant annet fordi iGb3 gir et svakt stimulus for NKT-cellene. (9) På grunn av iGb3s svake stimulering av NKT-celler, er glykolipidet  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ GalCer) det mest benyttede glykolipidet for å stimulere NKT-celler.  $\alpha$ GalC er utvunnet fra en marin svamp. CD1d har høy spesifisitet for  $\alpha$ GalCer og  $\alpha$ GalCer/CD1d-kompleksets har høy affinitet for NKT celler. Mye tyder på at gjenkjennelse av CD1d er høyt konservert gjennom evolusjonen. (13) Mus CD1d tetramerer kan binde til humane NKT-celler og humane CD1d tetramerer merker mus NKT-celler. I kontrast til dette viser det seg at rotte NKT-celler kun stimuleres av syngent CD1d og ikke binder mus CD1d. Det er ikke direkte vist at NKT-celler i rotte stimuleres av  $\alpha$ GalCer. (13)



**Figur 2.** Figuren viser CD1d/glycolipid-komplekset presentert av en antigenpresenterende celle (APC) til NKT-cellens T-cellereseptor (TCR) (15)

Type 2, eller non-klassiske,  $\alpha\beta$ NKT-celler uttrykker et bredere repertoar av TCR $\alpha$ -kjeder hvor V $\alpha$ 3-J $\alpha$ 9 eller V $\alpha$ 8 kombinert med V $\beta$ 8.2 er beskrevet. Disse cellene binder også til CD1d i kompleks med  $\alpha$ GalCer.

Den tredje typen, NKT-lignende celler, er av Dodfrey *et al.* beskrevet som CD1d-uavhengige NKR-P1C<sup>+</sup> T-celler. CD1d-uavhengige NKR-P1C<sup>+</sup> T-celler ser ut til å være heterogene, og omfatter muligens også konvensjonelle T-celler som har oppregulert NKR-P1C etter aktivering. (6) For eksempel kan konvensjonelle virus spesifikke CD8<sup>+</sup> T-celler oppregulere NKR-P1C. (16)

Tabell 1 gir en oppsummering av de tre typene av  $\alpha\beta$ NKT-celler. Det er per i dag ingen klar definisjon av undergrupper av  $\alpha\beta$ NKT-celler i rotte, og cellene vi har studert kan derfor være en blanding av disse tre celletypene.

	<b>Type 1 klassisk/invariant</b>	<b>Type 2 non-klassisk</b>	<b>Type3 NKT-lignende</b>
<b>TCR <math>\alpha</math>-kjede</b>	V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 (mus) V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 (menneske)	V $\alpha$ 3.2J $\alpha$ 9, V $\alpha$ 8 (mus) (blant flere)	Diverse
<b>TCR <math>\beta</math>-kjede</b>	V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7, V $\beta$ 2 (mus) V $\beta$ 11 (menneske)	V $\beta$ 8.2 (mus) (blant flere)	Diverse
<b>NKR-P1C(mus) NKR-P1A(menneske)</b>	+/-	+/-	+
<b>CD1d-avhengig</b>	Ja	Ja	Nei
<b>Reaktiv til <math>\alpha</math>GalCer</b>	Ja	Ja	Nei
<b>Undergrupper</b>	CD4 <sup>+</sup> eller DN (mus) CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> eller DN (menneske)	CD4 <sup>+</sup> eller DN (mus)	CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> eller DN (mus)
<b>IL-4-produksjon</b>	Ja	Ja	Nei
<b>INF-<math>\gamma</math>-produksjon</b>	Ja	Ja	Ja

**Tabell 1.** Klassifisering av  $\alpha\beta$ NKT og  $\alpha\beta$ NKT-lignende celler i mus og menneske. Rotte  $\alpha\beta$ NKT-celler er ikke tatt med i tabellen, da de er ufullstendig kartlagt.

### **1.2.2 $\gamma\delta$ NKT-celler.**

NKT-celler med  $\gamma\delta$ TCR er beskrevet i mus og rotte. I mus viser  $\gamma$ - og  $\delta$ -kjedene en bias mot V $\gamma$ 1.1 og V $\delta$ 6.3. Det er vist at de på samme måte som  $\alpha\beta$ NKT-celler frigjør IL-4 ved aktivering av TCR. (17) De non-klassiske MHC-klasse I molekylerne T10 og T22 har vist seg å trigge  $\gamma\delta$ T-celler, (18) og man antar derfor at disse molekylerne er potensielle ligander for  $\gamma\delta$ TCR i mus. Vi kan derfor spekulere om  $\gamma\delta$ NKT-celler også binder til T10 og T22. I menneske er det foreslått at de non-klassiske MHC-molekylerne MICA og MICB er ligander for  $\gamma\delta$ TCR. Det er ukjent hvilke molekyler rotte  $\gamma\delta$ TCR vil binde til, men det kan med en viss sannsynlighet være non-klassisk MHC.

Det er sannsynligvis ikke tilstrekkelig å si at rotte NKT-celler er T-lymfocytter som også uttrykker NK-cellemarkører. I denne oppgaven har vi allikevel, i mangel av en bedre definisjon, valgt å definere rotte NKT-celler som celler som uttrykker  $\alpha\beta$ - eller  $\gamma\delta$ TCR i kombinasjon med NKR-P1A.

### **1.2.3 Uttrykk av koreseptorene CD4 og CD8.**

$\alpha\beta$ NKT-celler i mus uttrykker CD4 eller er dobbelt negative for CD4 og CD8. De aller fleste  $\gamma\delta$ NKT-celler i mus er CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. Humane NKT-celler kan også være dobbelt negative eller uttrykke CD4, men så mye som 50 prosent av humane NKT-celler uttrykker CD8 $\alpha$ . De aller fleste av de humane CD8<sup>+</sup> NKT-cellene uttrykker CD8 $\alpha$  homodimeren. Rotte NKT-celler skiller seg skarpt fra NKT-celler i mus ved at majoriteten uttrykker CD8 $\alpha\beta$  heterodimeren, og er negative for CD4. Dette er vist både for  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler. (8;13;19;20) Det er med andre ord store artsvariasjoner med hensyn på uttrykk av CD4 og CD8.

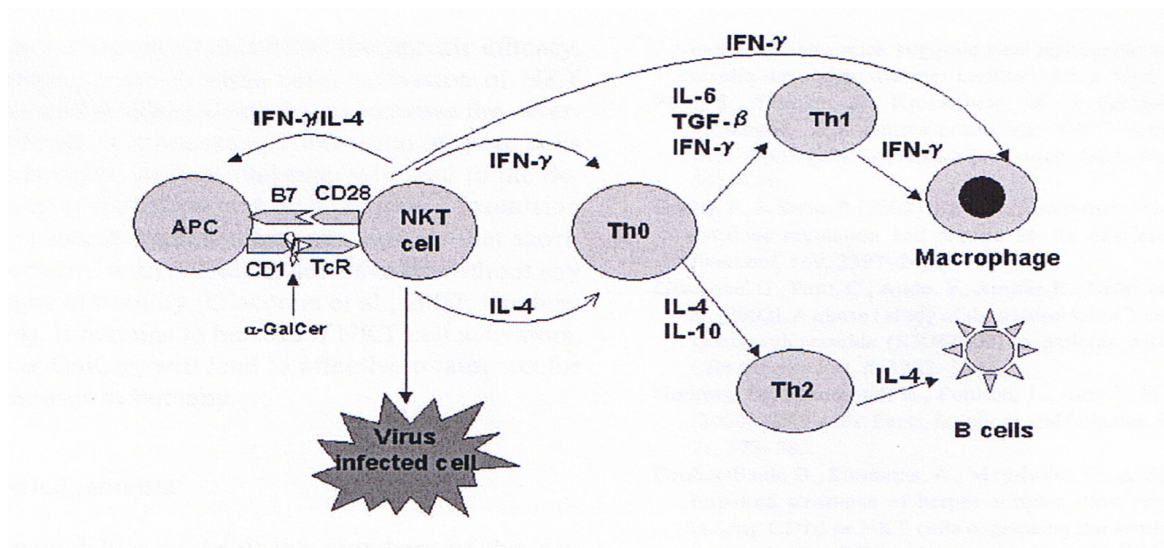
## **1.3 NKT-cellenes lokalisasjon**

NKT-cellenes distribusjon er best studert i mus for invariante  $\alpha\beta$ NKT-celler, og de finnes overalt hvor konvensjonelle T-celler finnes. Det vil si i perifert blod og i lymfevev som thymus, milt, lymfeknuter og benmarg. I milt utgjør  $\alpha\beta$ NKT-cellene rundt 3 prosent av  $\alpha\beta$ T-cellene, men kun 0,5 prosent av  $\alpha\beta$ T-cellene i perifert blod og lymfeknuter. (7;21) Invariante NKT-celler er spesielt godt utbredt i lever, hvor de utgjør ca. 30 prosent av alle lymfocytter og omtrent 50 prosent av  $\alpha\beta$ T-cellene.  $\gamma\delta$ NKT-celler er også funnet i thymus, milt, lever og benmarg, hvor de utgjør ca.  $10^5$  celler per organ. (8) Det er langt flere  $\alpha\beta$ NKT-celler, ca.  $10^6$  per organ. Antall  $\alpha\beta$ NKT-celler i humant perifert blod varierer med hundregangen mellom individer. Man har ikke kunnet påvise  $\alpha\beta$ NKT-celler i milt hos mennesker,

mens frekvensen i lever er vist å være på ca. 1 prosent, i perifert blod  $\leq 1$  prosent, og i thymus  $\leq 0,001$  prosent. I rotte lever og milt utgjør  $\alpha\beta$ NKT-cellenes 2- til 7 prosent av lymfocyttopopulasjonen. (12)

## 1.4 NKT-cellenes funksjon

Leukocytter skiller ut cytokiner, som er løselige signalmolekyler med viktige funksjoner i regulering av immunprosesser. Aktiverte NKT-celler produserer store mengder IFN- $\gamma$ , og er helt unike blant lymfocytter ved at de nærmest eksplosivt frigjør IL-4. (21) IFN- $\gamma$  er et T<sub>H</sub>1-cytokin, mens IL-4 er et T<sub>H</sub>2-cytokin. NKT-cellenes produserer dermed en blanding av T<sub>H</sub>1 og T<sub>H</sub>2 cytokiner (Figur 3). T<sub>H</sub>1-cytokinene virker stort sett på celler i inflammatoriske prosesser, som NK-celler, fagociterende celler og cytotoxiske T-celler. T<sub>H</sub>2-cytokinene påvirker modning av B-celler og regulering av antistoffproduksjon. (1) Frigjøring av cytokiner fra NKT-celler resulterer dermed i aktivering av en rekke andre leukocytter. (7) De kan dermed påvirke både non-adaptivt og adaptivt immunsvare, og gi immunresponsen en "kick-start". (21) NKT-celler er også vist å ha cytotoxisk aktivitet, men det er uklart om dette gjelder for alle NKT-celler.



**Figur 3.** Antigenpresenterende celler (APC) presenterer CD1d/ $\alpha$ GalCer til NKT-celler. NKT-celler frigjør T<sub>H</sub>1- og T<sub>H</sub>2- cytokiner som forsterker immunresponsen. NKT-celler har også vist å ha cytotoxisk effekt på samme måte som CD8<sup>+</sup> T-celler. (7)

NKT-celler er involvert i regulering av en rekke forskjellige immunresponser inkludert autoimmune tilstander (Tabell 2). NKT-cellenes rolle i sykdommene nevnt i Tabell 2 avhenger av en rekke faktorer som for eksempel sykdommens natur (organspesifikk/systemisk), sykdommens utviklingsstadium, sykdomsmodellen og hvilken musestamme eller menneskepopulasjon som har blitt studert. I søken etter en endogen ligand har det blitt dokumentert NKT-reaktivitet mot lipider fra ulike autologe celler, tumorer, mikrober og pollen. (11) Mekanismene for NKT-celleaktiverting og immunregulering er ennå

ikke fullstendig klarlagt. For eksempel viser noen resultater at NKT-cellemangel forverrer tilstandene, mens andre studier viser ingen effekt av NKT-cellemangel.(9)

<b>Parasitter</b>	Studier av mus som manglet funksjonelle iNKT-celler viste signifikant alvorligere sykdom ved infisering med parasitter.
<b>Bakterier</b>	To ulike studier viste at iNKT hindrer akutt bakteriell pneumoni ved å påvirke det non-adaptive immunsystemet veldig raskt etter infeksjonsstart.
<b>Virus</b>	iNKT har vist seg å være viktig for antiviruseresponser. En studie viste at NKT knockout mus (CD1d <sup>-/-</sup> eller V $\alpha$ 14 <sup>-/-</sup> ) var mer mottagelig for Herpes simplex- og hepatitt B virus enn normale mus. Aktivering med $\alpha$ GalCer hemmet infeksjonen.
<b>Diabetes</b>	I både muse- og humane modeller har man sett direkte sammenheng mellom et redusert antall NKT-celler og diabetes. Aktivering med $\alpha$ GalCer hemmer utbrudd og progresjon. Dette indikerer at NKT-celler kan være en viktig faktor i utvikling av sykdommen. Andre studier har vist økt antall NKT-celler hos diabetes pasienter, så årsakssammenhengen er foreløpig ikke klarlagt.
<b>Rheumatoid artritt</b>	Det er vist redusert antall NKT-celler i perifert blod og synovium hos RA pasienter. Det er også sett redusert nivå av løselige CD1d molekyler, men betydningen av dette er høyst uklar. Det er også vist at blokkering av CD1d med antistoff reduserte sykdommens alvorlighetsgrad. Det samme så man hos mus som manglet J $\alpha$ 18.
<b>Allergisk astma</b>	Aktivering av NKT-celler er vist å forverre allergiske betennelser i luftveiene. CD1d <sup>-/-</sup> eller V $\alpha$ 14 <sup>-/-</sup> knockout mus viser veldig få slike reaksjoner når de blir presentert luftveissallergener. Aktivering med $\alpha$ GalCer forverret den allergisk reaksjonen hos normale mus.
<b>Atherosclerose</b>	NKT-celler er også vist å spille en rolle ved atherosclerose. Aktivering med $\alpha$ GalCer forverret tilstanden. Muligens på grunn av økt utskillelse av proinflammatoriske cytokiner fra NKT-celler.
<b>Tarmsykdom</b>	Ukontrollerte immunresponser i tarmens slimhinner kan føre til inflammatoriske sykdommer som Ulcerøs kolitt og Chrons sykdom. Studier har vist at CD1d <sup>+</sup> epitelceller drepes av NKT celler. Dette kan medvirke til en kronisk inflammatorisk tilstand i tarmen. Andre studier har vist at NKT-celler kan beskytte mot kolitt. NKT-celler er også foreslått å spille en rolle i forsvaret mot patogene agens i tarmen. Spesielt i immunforsvaret mot Salmonella typhimurium og Toxoplasma gondii.
<b>Kreft</b>	Det er vist i musemodeller at NKT-celler hemmer anti-tumor immunitet. CD4 <sup>+</sup> NKT-celler i mus produserer IL-13 som hemmer cytotoxiske T-lymfocytters tumorbekjempelse. NKT-celler kan også spille en beskyttende rolle ved å forhindre dannelse av spontane tumorer. En nylig publisert studie viser at anti-humant CD1d mAb modner dendrittske celler, som igjen påvirker NKT-cellenes aktivitet. Dette er det første studiet som viser at terapi med anti-CD1d mAb hemmer veksten eksperimentelle tumorer.

**Tabell 2.** NKT-cellers mulige roller i ulike sykdomsprosesser.(7;9;11;16;22-24)

Det arbeides stadig med å utvikle NKT-basert immunterapi mot inflammatoriske sykdommer, kreft og autoimmune sykdommer. Effekt av behandling med  $\alpha$ GalCer er påvirket av en rekke parametre som dose og frekvens. Kjønn, alder og genetisk bakgrunn spiller også en rolle. Det er rapportert



bivirkninger i museforsøk som levertoksisitet, abort hos enkelte stammer og økt atherosclerose og allergiske reaksjoner. Kliniske studier i menneske har vist at  $\alpha$ GalCer-terapi er trygt. Dette er muligens relatert til CD1d/NKT-celleforskjeller i mus og menneske.

## 1.5 NK-reseptorer

NK-celler benytter seg ikke av rearrangering av gener for å utvikle antigenspesifisitet slik som B- og T-celler, men har i stedet en rekke reseptorer som enten aktiverer eller hemmer NK-cellenes effektorfunksjoner. Disse reseptorene tilhører enten familier av immunoglobulinlignende reseptorer eller C-type lektinlignende reseptorer. En beskrivelse av reseptorene og deres ligander er angitt i Tabell 3. De tre største NK-reseptorfamiliene utgjøres i gnagere av Ly49, NKG2/CD94 og NKR-P1. Mens Ly49-reseptorer og CD94/NKG2-reseptorer gjenkjenner MHC-klasse I, binder NKR-P1-reseptorene til en familie av C-type lektinlignende proteiner kalt Clr (C-type lektinlignende reseptorer). Alle tre familiene har både aktiverende og hemmende reseptorer.

NKp46 er en aktiverende reseptor som anses å være spesifikt uttrykt på NK-celler. CD16 er også en aktiverende reseptor som finnes på NK-celler, men ikke på andre lymfocytter.

De aktiverende reseptorene signalerer inn i NK-cellen via adaptorprotein, for eksempel DAP12, som er ansvarlig for å initiere signaleringskaskader inne i NK-cellen. Mange ulike aktiverende reseptorer på samme NK-celle kan gjenkjenne en rekke ulike ligander på samme målcelle. Resultatet av signalet vil være enten en cytotoxisk respons og/eller cytokinfrigjøring.

Hemmende reseptorer assosierer med intracellulære tyrosinfosfataser når de binder sitt ligand. Aktivering av fosfatasene fører til defosforylering av signalproteiner i den aktiverende signalveien. På den måten blokkeres NK-cellenes effektorfunksjoner (cytotoxisitet og cytokinfrigjøring).

<b>Klassifisering av NK-reseptorer</b>			
<b>Ly49 (Killer cell lectin-like receptor, KLRA) C-type lektin superfamilie</b>	Mange Ly49-reseptorer hos gnagere. En mutert non-funksjonell human Ly49-reseptor. Uttrykkes som homodimerer i cellemembranen.	Murin Ly49 gjenkjenner murin MHC H-2D <sup>d</sup> , H-2D <sup>k</sup> og H-2D <sup>p</sup> . Murin Ly49H ser ikke ut til å binde MHC molekyler, men binder til et non-klassisk MHC-molekyl fra mus cytomegalovirus. Rotte Ly49i2 binder til klassisk MHC-1a molekyl RT1-A1 <sup>c</sup> . Andre Ly49 reseptorer binder trolig til et MHC klasse 1b molekyl.	Uttrykkes på NK-celler, NKT-celler, T-celler. Aktiverende Ly49 kun uttrykt på NK-celler.
<b>CD94-NKG2 (Killer cell lectin-like receptor, KLRC) C-type lektin superfamilie</b>	Må dimerisere med CD94 for å uttrykkes på cellemembranen. Aktiverende og inhiberende funksjon defineres av NKG2-kjeden.	CD94-NKG2A og C binder HLA-E hos mennesker. CD94-NKG2A,C,E binder MHC-klasse 1b molekylet Qa-1 hos mus, og BM1 i rotte.	Uttrykkes på NK-celler og T-celler.
<b>NKG2D (Killer cell lectin-like receptor, KLRC4). C-type lektin superfamilie</b>	Aktiverende reseptor NKG2D assosierer ikke til CD94, i motsetning til NKG2A, C og E.	NKG2D gjenkjenner stressinduserte non-klassiske MHC-molekyler (bl.a. MICA og MICB i menneske, og Rae-1 og ULBP i mus).	Uttrykkes på NK-celler, og er beskrevet på $\gamma\delta$ T- og CD8 <sup>+</sup> T-celler i menneske og mus.
<b>NKR-P1 (Killer cell lectin-like receptor, KLRB). C-type lektin superfamilie</b>	Fire NKR-P1 er funnet i mus, fire i rotte, en i menneske.	Binder til C-type lektin beslektede (related) molekyler, Clr. Disse er høyt uttrykt på nesten alle hematopoietiske celler.	Uttrykkes på NK-celler, NKT-celler og aktiverte CD8 <sup>+</sup> T-celler.
<b>NKp46 Immunoglobulin reseptor superfamilie</b>	Aktiverende reseptor. NK-cellespesifikk. Identifisert bl.a. i rotte, mus og menneske.	Gjenkjenner og dreper tumorceller og virusceller.	NKp46 uttrykkes kun på NK-celler.
<b>CD 16 (Fc<math>\gamma</math>RIII)</b>	Aktiverende reseptor. Binder til IgG, og initierer antistoffmediert celledrap (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)	Destruksjon av antistoffbundne patogener på makrofager og nøytrofile granulocytter.	NK-celler, makrofager og nøytrofile granulocytter.

**Tabell 3.** Klassifisering av NK-reseptorer (10;25-34)

## 1.6 Kjemokiner og kjemokinreseptorer

Kjemokinene, en undergruppe av cytokiner, virker hovedsaklig som kjemoattraktanter. Det vil si at de virker tiltrekkende på celler og får dem til å vandre i retning av kilden som skiller ut kjemokinene. Kjemokiner er små molekyler på 8-10 kDa, og kan frigjøres fra ulike celletyper. De deles inn i grupper etter plasseringen av to N-terminale cysteiner. Cysteinene er enten ved siden av hverandre (CC), atskilt med en aminosyre (CXC), atskilt med tre aminosyrer (CX<sub>3</sub>C), eller inneholder bare én cystein (C).(35) Kjemokinene deles gjerne også inn i to grupper basert på deres fysiologiske egenskaper. Inflammatoriske kjemokiner blir produsert av ulike celletyper ved patologiske tilstander, mens homeostatiske kjemokiner produseres kontinuerlig, og er involvert i dagligdagse, vedvarende funksjoner som leukocytmodning i benmargen, transport av lymfocytter og fosterutvikling.

### 1.6.1 Kjemokinreseptorer

Kjemokinenes effekt på målceller styres av deres binding til kjemokinreseptorer. Kjemokinreseptorene inndeles i fire grupper, basert på hvilke typer kjemokiner de binder: CXC-reseptorer 1-6, CC-reseptorer 1-11, CX<sub>3</sub>CR1 og XCR1. Uttrykket av ulike kjemokinreseptorer varierer mellom forskjellige typer av leukocytter.(35)

Reseptor	Funksjon	Ligand	Cellepopulasjon
CCR1	Inflammatorisk	CCL5, CCL3, CCL1	NK, B, M, Ms,N,T
CCR2	Inflammatorisk	CCL2	NK, B, Bs, M,T
CCR3	Inflammatorisk	CCL5, CCL11, CCL8, CCL13	NK, Bs, Eo,T
CCR4	Inflammatorisk Homeostatisk	CCL22,CCL17	NK, T
CCR5	Inflammatorisk	CCL5, CCL3, CCL4	NK, DC,M,T
CCR6	Inflammatorisk Homeostatisk	CCL20	NK,B,Dc,T
CCR7	Homeostatisk	CCL19, CCL21	NK,B,Dc,T
CCR8	Inflammatorisk	CCL1, CCL17	NK,T,M
CCR9	Homeostatisk	CCL25	T,NK
CCR10	Inflammatorisk?	CCL27,CCL28	T
CCR11	Homeostatisk?	CCL27,CCL19,CCL21	T,DC

Tabell 4. Fortsetter neste side

Reseptor	Funksjon	Ligand	Cellepopulasjon
<b>CXCR1</b>	Inflammatorisk	CXCL6, CXCL8	NK, Bs, M, Ms, N, T, NKT
<b>CXCR2</b>	Inflammatorisk	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8	M, Ms, M, T, NKT
<b>CXCR3</b>	Inflammatorisk	CXCL9, CXCL10, CXCL11	NK, T, NKT
<b>CXCR4</b>	Homeostatisk	CXCL12	NK, B, DC, T, NKT
<b>CXCR5</b>	Homeostatisk	CXCL13	B, NKT
<b>CXCR6</b>	Inflammatorisk	CXCL16	NK, T, NKT
<b>CX<sub>3</sub>CR1</b>	Inflammatorisk	CX <sub>3</sub> CL1	NK, M, T, NKT
<b>XCR1</b>	Inflammatorisk?	XCL1, XCL2	NK, B, T, N

**Tabell 4.** Oversikt over kjemokinreseptorer, ligander og uttrykk i leukocytter. B= B-lymfocyt, T= T-lymfocyt, N=nøytrofil granulocyt, Bs=basofil, Eo= eosinofile, DC=dendrittisk celle, M=monocyt, makrofag, Ms=mastcelle, NK=Natural Killer celler, NKT= Natural Killer T-celler (35-37)

## 1.7 Formålet med oppgaven

Funksjonen til NKT-celler er fortsatt ikke klarlagt, og man vet lite om NKT-celler i rotte. De fleste studier av NKT-celler er gjort i musemodeller. I dette prosjektet ønsket vi å kartlegge og sammenligne hvilke NK-reseptorer og hvilke kjemokinreseptorer som uttrykkes av  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler. Studier er gjort på mRNA-nivå fra sorterte celler fra milt, og på proteinnivå ved hjelp av flowcytometri. Mer kunnskap om fenotypen til rotte NKT-celler kan forhåpentligvis bidra til økt forståelse av deres funksjon. Mange humane gener med assosiasjon til sykdom har homologer i rottegenomet, og det er derfor viktig å kunne bruke rottemodeller i biomedisinske eksperimenter.

## 2 Materiale og Metode

### 2.1 Materialer

Denne oppgaven omhandler karakterisering av NKT-celler i rotte. Arbeidet er utført i John Torgils Vaages forskningsgruppe ved Immunologisk Institutt, Rikshospitalet, Oslo Universitetssykehus i samarbeid med Bent Rolstads gruppe ved Avdeling for Anatomi, Institutt for Medisinske Basalfag, Universitetet i Oslo.

Kommersielle produkter	Produsent/ leverandør
96-brønners plate V-bunn	Sterilin Ltd., London, Storbritannia Distributør: Heger AS, Rjukan, Norge
Absolutt alkohol	Arcus-Kjemi, Vestby, Norge
Biotin	Sigma- Aldrich ,Oslo, Norge
Cell Strainer 70µm	BD Biosciences, Trondheim,Norge
Coulter ISOTON <sup>®</sup> II Diluent	Beckman Coulter, CA, USA Distributør: Nerlien Meszansky Oslo,Norge
DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)	Fluka, Sigma- Aldrich ,Oslo,Norge
Dinatriumhydrogenfosfat	Merck VWR International, Oslo,Norge
DNA Ladder	Promega Corporation, WI,USA Distributør: Nerlien Meszansky Oslo, Norge
dNTP Mix 10mM	Fermentas GMBH,Helsingborg, Sverige
Dynabeads Pan Mouse IgG	Invitrogen Dynal, Oslo, Norge
Dynabeads Sheep anti-Rat IgG	Invitrogen Dynal, Oslo, Norge
Eddiksyre	Merck VWR International, Oslo, Norge
EDTA (Etylendiamintetraacetat)	Sigma- Aldrich ,Oslo,Norge
FBS Australian origin	Lonza Verviers SPRL, Basel, Sveits Distributør: MedProbe, Oslo, Norge
30 µm Syringe Filcons (til cellesortering)	BD Biosciences, Trondheim, Norge
Flowrør polypropylen 12x75 mm.	Sarstedt A/S, Ski, Norge
GoTaq DNA Polymerase	Promega Corporation, WI, USA Distributør: Nerlien Meszansky, Oslo,Norge
GoTaq Reaction Buffer and Magnesium Chloride	Promega Corporation, WI,USA Distributør: Nerlien Meszansky, Oslo, Norge
Isopropanol	Arcus-Kjemi, Vestby, Norge
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck VWR International, Oslo, Norge VWR International,Oslo, Norge
Kaliumklorid	Sigma- Aldrich ,Oslo ,Norge
Kloroform	Sigma- Aldrich ,Oslo ,Norge
Lymphoprep	Axis-Shield, Oslo, Norge Distributør: Medinor AS Oslo, Norge
MMLV Revers Transcriptase 5x Reaction Buffer	Promega Corporation, WI, USA Distributør: Nerlien Meszansky, Oslo,Norge
PCR-rør (strips og lokk)	Axygen, CA, USA Distributør: OneMed, Lørenskog, Norge
Primere til PCR	EuorofinsMWG Operon, Hamburg, Tyskland
Pwo SuperYield DNA Polymerase	Roche, Oslo, Norge

Tabell 5. Fortsetter neste side

Produkt	Produsent/ leverandør
MMLV Revers Transcriptase	Promega Corporation, WI, USA Distributør: Nerlien Meszansky Oslo, Norge
Natriumklorid	Merck VWR International, Oslo, Norge
Nylonull	G.Kisker GbR, Steinfurt, Tyskland
RNasin <sup>®</sup> Plus RNase Inhibitor	Promega Corporation, WI, USA Distributør: Nerlien Meszansky Oslo, Norge
RPMI Medium 1640 L-glutamine	Invitrogen Norge AS Oslo, Norge
Saltsyre	Merck VWR International Oslo, Norge
SeaKem <sup>®</sup> LE Agarose	Lonza Verviers SPRL, Basel, Sveits Distributør: MedProbe, Oslo, Norge
SYBR <sup>®</sup> Safe DNA gel stain	Invitrogen Norge AS, Oslo, Norge
TRI Reagent <sup>®</sup> RNA Isolation Reagent	Sigma- Aldrich, Oslo, Norge
Trizma <sup>®</sup> base (tris base)	Sigma- Aldrich, Oslo, Norge

**Tabell 5.** Oversikt over kommersielle produkter som er benyttet i oppgaven. Kolonne 1 viser produkt. Kolonne 2 viser produsent og distributør.

Løsninger.	
Produkt	Sammensetning
75 % RNasefritt etanol	Absolutt alkohol fortynnet med DEPC-H <sub>2</sub> O
cRPMI (complete)	RPMI 1650 L-glutamine tilsatt 1:100 antibiotika (penicillin/streptomycin) 10 % FBS 1: 1000 2-Mercaptoetanol 1: 100 NaPyruvat
DEPC- H <sub>2</sub> O	DEPC løst 1:1000 i ionebyttet, UV-bestrålt vann fra MilliQ biocel og autoklavert.
PBS (fosfat bufret saltvann)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, 1,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Low Salt PCR buffer	50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8,3 2 mM MgCl <sub>2</sub>
TAE elektroforesebuffer	En liter 50 X TAE-buffer 242 g Tris-base(= 2mol) 27,1 ml iskald eddiksyre (=1 mol) 100 ml 0,5 M EDTA (gir pH 8,0) H <sub>2</sub> O til 1 liter

**Tabell 6.** Oversikt over ikke-kommersielle løsninger som er benyttet i oppgaven. Kolonne 1 viser løsningene. Kolonne 2 viser innholdet i løsningene.

<b>Kommersielle antistoff.</b>			
Spesifisitet	Antistoff	Fortynning	Produsent
NKR-P1A (rotte)	Anti-rotte mAb IgG (klon 10/78), konjugert til PE	1:400	BD Biosciences, Trondheim, Norge
CCR6 (mus)	Anti-mus mAb IgG, konjugert til PE	1:20	R&D Systems Europe Ltd. Abingdon, Storbritannia
CCR9 (mus)	Anti-mus mAb IgG, konjugert til PE	1:20	R&D Systems Europe Ltd. Abingdon, Storbritannia
CXCR3 (mus)	Anti-mus mAb IgG, konjugert til PE	1:20	R&D Systems Europe Ltd. Abingdon, Storbritannia
CXCR4 (mus)	Anti-mus mAb IgG, konjugert til PE	1:20	R&D Systems Europe Ltd. Abingdon Storbritannia
CCR5 (mus)	Anti-mus mAb IgG, konjugert til biotin	1:50	BD Biosciences, Trondheim, Norge
CCR2 (mus, rotte)	Anti-mus og rotte geit pAb	1:20	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
CX <sub>3</sub> CR1 (mus, rotte)	Anti-mus og rotte geit pAb	1:20	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Biotin	Streptavidin konjugert til PerCP	1:200	BD Biosciences, Trondheim, Norge

**Tabell 7.** Oversikt over kommersielle antistoff som er benyttet til sortering og fenotyping. Kolonne 1 viser antistoffspesifisitet. Kolonne 2 viser navn på antistoffklon, subklasse og konjugat. Kolonne 3 viser hvilken fortynning av antistoffet som er brukt. Optimale fortynninger er tidligere bestemt i Vaages gruppe ved å gjøre fortynningsrekker. Kolonne 4 viser produsent og leverandør. CCR2 og CX<sub>3</sub>CR1 ble direktekonjugert med Alexa488.

<b>Ikke-kommersielle antistoff.</b>		
Antistoffene er produsert fra hybridomaceller hos Bent Rolstad, Avdeling for Anatomi, Institutt for Medisinske Basalfag. Antistoffkonjugeringer med FITC, Alexa 647 og biotin er utført samme sted. Alle antistoffer har spesifisitet for rotte.		
Spesifisitet	Antistoff	Fortynning
NKR-P1A	mAb IgG, 3.2.3-biotin	1:100
$\alpha$ T-cellereseptor (rotte)	mAb IgG, R73-Alexa 647	1:500
$\delta$ T-cellereseptor (rotte)	mAb IgG, V65-FITC mAb IgG, V65-biotin	1:100 1:200
CD8 $\alpha$ (rotte)	mAb IgG, OX 8-FITC	1:100
CD8 $\beta$ (rotte)	mAb IgG, 341-biotin	1:100
CD4 (rotte)	mAb IgG, W3/25- FITC	1:100
NKR-P1B	mAb IgG, STOK27-Alexa 647	1:700
Ly49i2	mAb IgG, STOK2-biotin	1:100
Ly49i3/s3/i4/s4	mAb IgG, Dar13-biotin	1:100
Ly49i5/ s5	mAb IgG, Fly 5-biotin	1:100
NKp46	mAb IgG, Wen23-biotin	1:370
NKG2 A/C/E	mAb IgG, Wen28-Alexa 647	1:400
KLRH1	mAb IgG, STOK9-biotin	1:250
Monocytter	mAb IgG, ED1	I overskudd
B-celler	mAb IgG, OX 12	I overskudd
CD45RA på modne B-celler	mAb IgG, OX 33	I overskudd

**Tabell 8.** Oversikt over ikke-kommersielle antistoff som er benyttet til anriking, sortering og fenotyping. Kolonne 1 viser antistoffspesifisitet, kolonne 2 viser navn på antistoffklon, subklasse og konjugat. Kolonne 3 viser hvilken fortynning av antistoffet som er brukt.



## 2.2 Metoder

### 2.2.1 Forsøksdyr

Vi benyttet rottestammen PVG. PVG-rotter er mest brukt og best karakterisert i Vaages og Rolstads grupper. Dyrene ales opp i dyrestallen ved Institutt for Medisinske Basalfag, Universitetet i Oslo. De lever i forhold til retningslinjer gitt av Forsøksdyrutvalget. (38) Utvalgets arbeidsoppgaver og arbeidsmåte er fastsatt av Landbruksdepartementet. Dyrene blir rutinemessig kontrollert for smittsomme sykdommer i henhold til anbefalinger fra Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA).

Dyrene ble avlivet med CO<sub>2</sub> ved 8-12 ukers alder. Avlivingsmetoden og de etiske aspekter ved bruk av forsøksdyr behandles i Appendix A.

### 2.2.2 Isolering av mononukleære leukocytter fra rottemilt

#### 2.2.2.1 Bakgrunn

Vi har valgt å studere NKT-celler fra milt. Dette er et lett tilgjengelig organ som inneholder rikelig med hvite blodceller (100-200 millioner celler avhengig av alder og kjønn). Fra milten separerte vi ut mononukleære leukocytter fra polymorfonukleære leukocytter ved hjelp av Lymphoprep. Lymphoprep er et tetthetsgradientmedium til isolasjon av mononukleære celler, og er en norsk oppfinnelse utviklet av Dr. Arne Bøyum.(39)

#### 2.2.2.2 Prosedyre

1. Rotten avlives, bukhulen åpnes med saks, og milten dissekeres forsiktig ut. Milten er lokalisert på venstre side av bukhulen. Milten legges i et rør med 40 ml PBS med 2 % FBS (heretter 2 % FBS).
2. Milten moses gjennom en Cell Strainer i en Petriskål med 40 ml 2 % FBS, for å oppnå en suspensjon av enkeltceller. Alt pipetteres over i et 50 ml rør og sentrifugeres ved 1200 rpm i 10 min. Supernatanten pipetteres av og cellepelletten resuspenderes i et mindre volum. Volumet justeres til 20 ml med 2 % FBS.
3. Suspensjonen pipetteres **langsomt** over i et rør med 10 ml Lymphoprep, og legges som et eget lag over Lymphoprepen. Røret sentrifugeres ved 1800 rpm i 20 min uten brems. Uten brems er viktig for ikke å forstyrre lagdelingen.

4. En hvit "sky" med celler i midten av røret pipetteres av og resuspenderes i 40 ml 2 % FBS. Sentrifugeres ved 1200 rpm i 8 min. Supernatant fjernes, pellet resuspenderes i 40 ml 2 % FBS og cellene sentrifugeres nok en gang. Antall celler i suspensjonen blir talt ved hjelp av en automatisk celleteller, Beckman Coulter Inc, Z1 Coulter Particle Counter (Cal.,USA).
5. Cellene er nå klare for videre eksperimenter.

### ***2.2.3 Anriking av celler til flowcytometri (fenotyping eller cellesortering)***

#### ***2.2.3.1 Formål***

Vi fjerner rutinemessig B-cellene i forkant av fenotyping ved hjelp av flowcytometri. Erfaringsmessig blir merkingen bedre, seiden IgG-reseptoren på B-cellene ellers vil kunne interagere uspesifikt med antistoff. I forbindelse med cellesortering, er det optimalt med en cellepopulasjon som er høyest mulig anriket for de cellene vi er interessert i.

#### ***2.2.3.2 Prosedyrer***

##### ***2.2.3.2.1 Anriking av NKT-celler i forkant av sortering***

###### ***2.2.3.2.1.1 Antistoffbasert metode***

Prinsipp: Cellene inkuberes med en cocktail av antistoffer mot B-celler og monocytter, som deretter fjernes ved hjelp av paramagnetiske kuler. Denne metoden ble brukt i forbindelse med sortering av NKT-celler.

Følgende antistoffsupernatanter ble benyttet (alle mus IgG):

ED1, som binder til CD68. CD68 er et glykoprotein som binder til LDL, low density lipoprotein.

Finnes hovedsakelig på monocytter og makrofager. (40)

OX 12, som binder til IgG kappa-kjeden på B-celler.(41)

OX 33, som binder til glykoproteinet CD45RA på B-celler. (42)

1. Cellene ble inkubert med 8 ml ED1, 10 ml OX12 og 10 ml OX33 i 30 min ved 4 °C.
2. Cellene ble vasket to ganger i 40 ml 2 % FBS slik at overskudd av antistoff ble fjernet. Cellepellet ble resuspendert til 20 mill/ml i 2 % FBS.
3. Dynalkuler med henholdsvis anti-mus IgG og anti-rotte IgG ble tilsatt cellesuspensjonen i tre trinn. Tre trinn gir en mer effektiv opprensning. Anti-mus kulene vil binde til ED1,OX12 og OX 33 som er museantistoffer. Anti-rotte kulene vil binde til B-cellene i suspensjonen. B-cellene vil dermed bli fjernet på to ulike måter. Dette er nødvendig fordi cellesuspensjonen

inneholder langt flere B-celler enn monocytter. Dynalkulene ble vasket med 2 % FBS før bruk.

Trinn1: 500 µl Anti mus IgG Dynabeads og 200 µl Anti rotte IgG Dynabeads. Kuler og celleduspensjon ble inkubert ved 4 °C i tretti minutter. Kulene ble så fjernet fra supernatanten ved hjelp av magnet.

Trinn2: Gjentakelse av trinn 1.

Trinn3: 500 µl Anti mus IgG Dynabeads. Samme inkubasjon som trinn 1 og 2.

4. Kulene er paramagnetiske, de blir magnetiske når de utsettes for et magnetfelt. For hvert trinn ble rørene satt i et magnetstativ, kulene ble trukket mot magneten og supernatanten kunne pipetteres av.
5. Sentrifugerte til slutt 5 min ved 1300 rpm. Cellene ble resuspendert i 10 ml cRPMI og oppbevart i kjøleskap til neste dag.

#### **2.2.3.2.1 Nylonullbasert metode**

Prinsipp: B-celler og monocytter fester seg til nylonull ved 37 °C. Det gjør ikke T-celler, NKT-celler eller NK-celler. T-celler, NKT-celler og NK-celler elueres ut etter endt inkubering. Denne metoden ble brukt i forbindelse med sortering av T-celler.(43)

1. Nylonull ble bløtlagt i PBS (1,2 g til en 25 ml sprøyte).
2. Nylonullen ble pakket løst i sprøytene, dekket med aluminiumsfolie og autoklavert.
3. En treveiskran ble festet til sprøyten. PBS ble fjernet og nylonullen vasket med RPMI tilsatt Heparin og 10 % FBS (heretter 10 % FBS). Nylonullen ble forvarmet i 30 min ved 37 °C.
4. Etter Lymphoprep (se ovenfor) ble cellene resuspendert i 3 10 % FBS, pipettert over i sprøyten med nylonull og inkubert i 30 min ved 37 °C.
5. Etter endt inkubering ble cellene eluert dråpevis fra sprøyten gjennom treveiskranen ved hjelp av 40 ml forvarmet 10 % FBS.
6. Cellene ble talt.

#### **2.2.3.2.2 Anriking av celler i forkant av flowcytometri**

Prinsipp: Som i A, men i forbindelse med flowcytometri for fenotyping, fjernet vi bare B-celler ved hjelp av paramagnetiske kuler.

1. Cellene ble resuspendert til 20 mill/ml i 2 % FBS.

2. 1,5 ml celleduspensjon ble tilsatt 100 µl forvasket anti-rotte IgG Dynalkuler. Ble inkubert på roterende vippe i 30 min ved romtemperatur.
3. Kulene ble fjernet med magnet. Cellene i supernatanten ble vasket en gang med FACS-buffer. Sentrifugert ved 1200 rpm i 8 min.
4. Cellene ble talt og resuspendert i 2 % FBS til 10 mill/ml

## 2.2.4 Flowcytometri

### 2.2.4.1 Prinsipp

Flowcytometri er en teknikk for å telle, fenotype og sortere partikler eller celler. Flowcytometri kan også kalles væskestrømscytometri, og begrepet er satt sammen av ordene "flow" for væskestrøm, "cyto" for celle og "metri" for måling. Målingene gjøres på enkeltceller som på forhånd er merket med fluoriserende stoffer (fluorokromer). Fluorokromene er vanligvis konjugert til antistoffer mot overflateantigen på cellene.

I flowcytometriinstrumentet beveger cellene seg i en væskestrøm forbi en lysstråle fra en laser. Lyskilden sender ut lys av en spesifikk bølgelengde. Fluorokromene som er festet til cellene vil absorbere energi fra lyskilden, eksiteres og emittere lys med lavere energi og med en lengre bølgelengde. Ulike fluorokrom har karakteristiske eksitasjons- og emisjonsspektre. Når man bruker flere fluorokromer i samme prøve, vil man kunne se en viss overlapp mellom de ulike fluorokromene. Dette kan man kompensere for ved hjelp av software i instrumentet, og vi benytter celler merket med kun ett fluorokrom for å forhåndsinnstille instrumentet.

Cellene passerer lysstrålen enkeltvis, og hver celle vil spre lyset. Detektorer fanger opp lys som spres fra lysstrålens retning (*forward scatter*), lys som spres vinkelrett fra innfallende lys (*side scatter*) og det emitterte lyset fra fluorokromene. Forward scatter-signalet gir et mål på cellens størrelse, mens side scatter-signalet gir et mål på cellens kompleksitet (f.eks. granularitet i cytoplasma). Ut fra disse parametrene kan man identifisere og tallfeste ulike populasjoner av celler i en celleduspensjon. Ønsker man å analysere spesifikke cellepopulasjoner, kan man velge ut en populasjon ved hjelp av analyseprogrammet som følger med flowcytometeret. Dette kalles å "gate". I en celleduspensjon skal cellene vi er interessert i sorteres ut i egne rør. Instrumentet har derfor en vibrerende mekanisme som gjør at væskestrømmen brytes opp i små dråper. Væskedråpene tilføres elektrisk ladning beregnet ut fra fluorescensintensitet. De ladede dråpene går så gjennom et spenningsfelt og dråpene ledes til ulike rør. (44)

### **2.2.4.2 Utstyr**

BD FACSCalibur System Flow Cytometer fra BD Biosciences (NJ, USA). Dette flowcytometeret har to lasere. (45) En laser som sender ut lys av en bølgelengde på 488 nm og en laser med lys av en bølgelengde på 635 nm. FACS-instrumentet kan analysere fire fluorokrom på samme tid.

BDFACSAria Cell Sorter fra BD Biosciences (NJ, USA). Vi utførte celledatering på Patologiklinikken ved Rikshospitalet, som har et flowcytometer med tre lasere, 488 nm, 633 nm og 405 nm og mulighet for å detektere inntil tretten farger. (46)

### **2.2.4.3 Prosedyre**

Formålet var å undersøke og sammenligne uttrykket av ulike NK- og kjemokinreseptorer på  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler ved hjelp av flowcytometri, og å sortere ut  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler for å kunne utføre PCR. Som interne kontroller og sammenligningsgrunnlag for senere PCR, ble NK-celler,  $\alpha\beta$ T-celler og  $\gamma\delta$ T-celler sortert ut samtidig. Vi valgte å sortere NKT-celler som var  $CD8\alpha\beta^+$ , og å ekskludere NKT-celler som var  $CD8\alpha\alpha^+$ . Valget ble tatt fordi majoriteten av både  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler er  $CD8\alpha\beta^+$  (se Resultater, side 40 ).

Alt arbeid ble gjort på is, i 96-brønners V-formet brett. Alle merkinger var i hovedsak firemerkinger, og samme oppsett ble fulgt både for fenotyping ved hjelp av FACS og for å merke celler til sortering.

1. Cellene ble suspendert i FACS-buffer (PBS med 2 % FBS) til en konsentrasjon på 10 mill celler per ml. Hver brønn ble tilsatt 100  $\mu$ l celleduspensjon. Dette ga ca. 1 mill celler per brønn. Kontrollbrønner til enkeltmerkinger ble tilsatt 50  $\mu$ l celleduspensjon, ca. 0,5 mill celler.
2. Prøvene ble sentrifugert i 2 min ved 1300 rpm ved 4 °C. Supernatanten ble kastet av i en hurtig bevegelse.
3. Merkingen ble foretatt i to omganger, siden ett av antistoffene alltid var biotinkonjugert. En mastermiks av det biotinkonjugerte antistoffet sammen med et direktekonjugert antistoff ble tilsatt cellene, totalt 200  $\mu$ l løsning per brønn.
4. Prøvene ble inkubert i 30 min på is, lysbeskyttet, og deretter vasket med FACS-buffer tre ganger.
5. En mastermiks med Streptavidin-PerCP og de resterende direktekonjugerte antistoffene ble tilsatt cellene, totalt 200  $\mu$ l løsning per brønn.

Prøvene ble inkubert i 30 min på is, lysbeskyttet, og deretter vasket med FACS-buffer tre ganger.

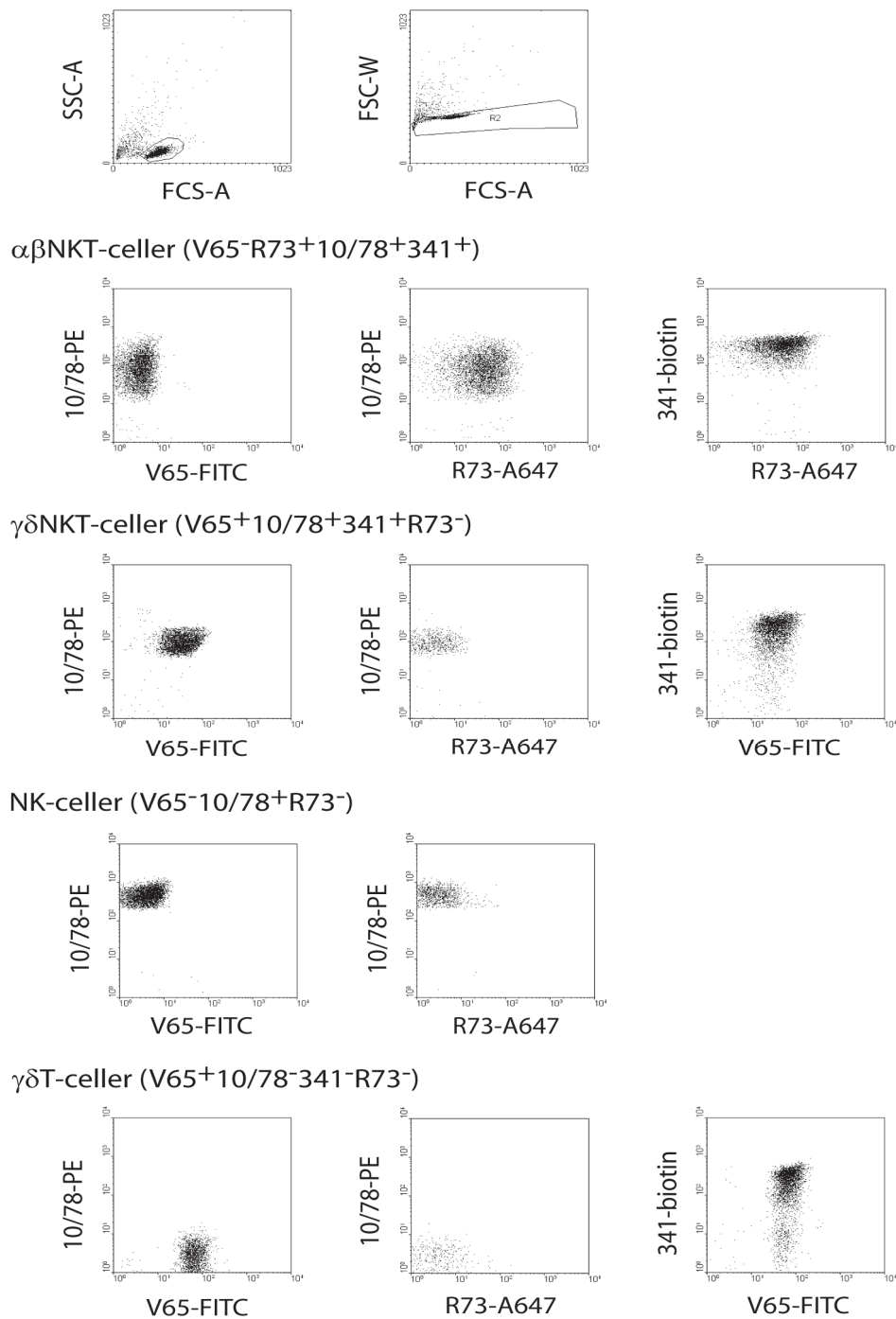
Prøver med enkeltmerking, samt en umerket prøve ble merket i parallell.

For fenotyping ved hjelp av FACS: Prøvene ble resuspendert i 100  $\mu$ l og overført til FACS rør med 200  $\mu$ l FACS buffer.

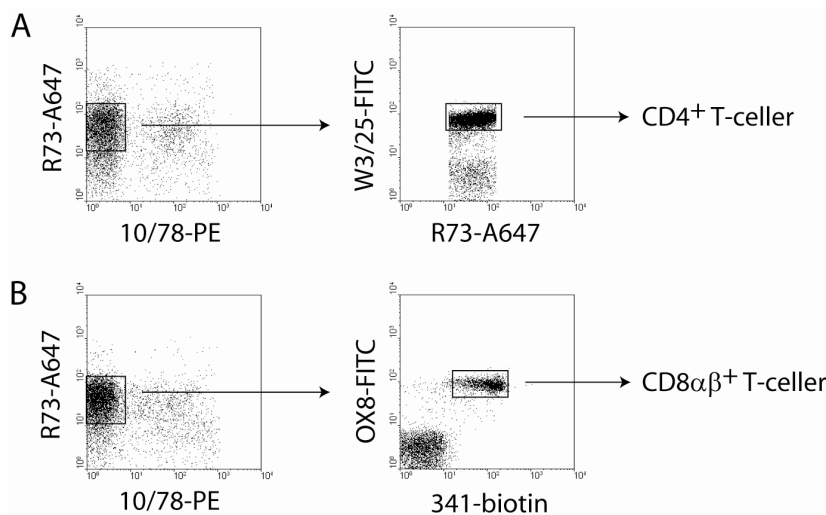
For celledatering: Alle firemerkingene ble samlet sammen i én prøve på totalt 1 ml i FACS buffer. Cellesuspensjonen ble filtrert før bruk gjennom et 30 µm filter. Enkeltmerkinger ble filtrert og samlet i separate rør i 0,5 ml FACS buffer.

Figurene 4 og 5 viser data fra celledateringen, mens Tabell 5 gir en oversikt over utbyttet av dateringen.

Oversikt over alle antistoff til datering og fenotyping finnes i tabell 7 og 8.



**Figur 4.** Renheten av de sorterte cellepopulasjonene etter endt sortering. Vist er data for  $\alpha\beta$ NKT-celler (V65-FITC<sup>-</sup>( $\gamma\delta$ TCR), R73-Alexa647<sup>+</sup>( $\alpha\beta$ TCR), 10/78-PE<sup>+</sup>(NKR-P1A), 341-biotin/StreptPerCP<sup>+</sup>(CD8 $\beta$ )),  $\gamma\delta$ NKT-celler (V65-FITC<sup>+</sup>( $\gamma\delta$ TCR), R73-Alexa647<sup>-</sup>( $\alpha\beta$ TCR), 10/78-PE<sup>+</sup>(NKR-P1A), 341-biotin/StreptPerCP<sup>+</sup>(CD8 $\beta$ )), NK-celler (V65-FITC<sup>-</sup>( $\gamma\delta$ TCR),R73-Alexa647<sup>-</sup>( $\alpha\beta$ TCR), 10/78-PE<sup>+</sup>(NKR-P1A)) og  $\gamma\delta$ T-celler (V65-FITC<sup>+</sup>( $\gamma\delta$ TCR), R73-Alexa647<sup>-</sup>( $\alpha\beta$ TCR), 10/78-PE<sup>-</sup>(NKR-P1A), 341-biotin/StreptPerCP<sup>+</sup>(CD8 $\beta$ )). (47;47-50)



**Figur 5.** Sortering av CD4<sup>+</sup> og CD8αβ<sup>+</sup> αβT-celler. Panelene til venstre i A) og B) viser gating for αβT-celler (R73+ celler), som videre ble gitt en sorteringsgate for enten A) CD4<sup>+</sup>-celler (W3/25<sup>+</sup>-celler) eller B) CD8<sup>+</sup>-celler (dobbel positive for OX8-FITC (CD8α) og 341-biotin/StreptPerCP (CD8β)). (49;51;52)

Populasjon	Gate	Antall sorterte celler
αβNKT	αβTCR <sup>+</sup> CD8β <sup>+</sup> NKR-P1A <sup>+</sup>	1.691.533
γδNKT	γδTCR <sup>+</sup> CD8β <sup>+</sup> NKR-P1A <sup>+</sup>	300.995
NK	NKR-P1A <sup>+</sup> TCR <sup>-</sup>	4.369.329
γδTCR	γδTCR <sup>+</sup> αβTCR <sup>-</sup> CD8β <sup>+</sup> NKR-P1A <sup>-</sup>	784.367
CD4 <sup>+</sup> αβT	αβTCR <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> NKR-P1A <sup>-</sup>	7.000.000 (avsluttet samlingen)
CD8 <sup>+</sup> αβT	αβTCR <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> CD8β <sup>+</sup> NKR-P1A <sup>-</sup>	4.339.941

**Tabell 9.** Tabellen viser en oversikt over utbyttet av cellosteringen. Den midtre kolonnen viser hvilke cellemarkører vi har gattet på for å sortere ut de ulike populasjonene. Kolonnen til høyre viser antall sorterte celler for de ulike populasjonene.

## 2.2.5 Isolering av RNA

### 2.2.5.1 Prinsipp

Å studere uttrykk av mRNA gir oss et bilde på hvilke gener som uttrykkes i en celle på det tidspunkt hvor RNA isoleres. RNA er svært fragilt, og er utsatt for degradering forårsaket av ribonukleaser eller høy temperatur. Alt arbeid med RNA foregikk derfor med utstyr og reagenser som var fritt for ribonukleaser, og sentrifugeringer ble utført ved 4°C.



### 2.2.5.2 Prosedyre

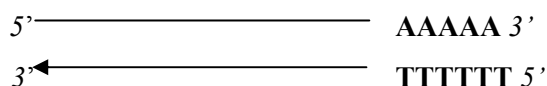
1. Alle celleprøvene fra celledisponeringen ble sentrifugert, og pelleten resuspendert i 0,5 – 1,0 ml TRI-reagens og overført til DEPC-behandlede Eppendorfrør. Volum av TRI-reagens varierte med antall celler. En ml av reagenset er tilstrekkelig for å lysere opp til  $10 \times 10^6$  celler. Våre rør inneholdt fra  $0,3-7 \times 10^6$  celler (Tabell 9).
2. Prøvene ble tilsatt 0,2 ml kloroform per ml TRI-reagens. Prøvene ble ristet kraftig i 15 sek og inkubert 5 min ved romtemperatur. Dette for å sikre at nukleo-proteinkomplekser ble fullstendig dissosiert. Sentrifugerte så ved  $4^{\circ}\text{C}$  i 15 min ved 13.000g.
3. Etter sentrifugering var løsningen separert i tre faser. En nedre, rød fase med proteiner, en mellomfase med DNA og en øvre, vannfase med RNA. Vannfasene ble pipettert over i nye rør og tilsatt 0,5 ml isopropanol per ml TRI-reagens.
4. Prøvene ble blandet og inkubert i romtemperatur i 5-10 min. Sentrifugerte ved  $4^{\circ}\text{C}$  i 10 min, 13.000g.
5. RNA-presipitatet vises som en pellet i bunnen av røret, litt på siden. Supernatanten ble pipettert av, og pelleten tilsatt 1 ml 75% etanol per ml TRI-reagens. Sentrifugerte ved 7.500g i 5 min ved  $4^{\circ}\text{C}$ .
6. Supernatanten ble pipettert av og pelleten løst i 15  $\mu\text{l}$  DEPC-vann. Konsentrasjon ble målt i spektrofotometer, Smart Spec<sup>TM</sup>3000, BioRad Laboratories, Inc (CA., USA).

### 2.2.6 Revers Transkripsjon(53)

#### 2.2.6.1 Prinsipp

For å kunne detektere mRNA fra de sorterte cellene, benyttet vi teknikken revers transkripsjon. Her benyttes mRNA som templat for å lage komplementært DNA (cDNA), ved hjelp av enzymet revers transkriptase. cDNAet ble videre brukt som templat for fenotyping med PCR-teknikk.

3'-enden i ferdig prosessert mRNA har en polyA-hale, mens 5'-enden har en "hette" av modifisert guanin som kalles 5' cap. Begge deler er tilstede for å beskytte RNA-tråden mot degradering. I revers transkripsjonsreaksjonen benytter vi en oligoT-primer, som vil binde til polyA-halen og starte transkripsjonen.



**Figur 6.** Figuren viser mRNA med poly-A hale og oligoT-primer.

### 2.2.6.2 Utstyr

2720 Thermal Cycler PCR-maskin fra Applied Biosystem (CA,USA)

### 2.2.6.3 Prosedyre

Vi benyttet enzymet M-MLV revers transkriptase (Moloney murin leukemi virus revers transkriptase), sammen med en M-MLV Buffer. Bufferen inneholder  $MgCl_2$ , KCl, DTT og Tris-HCl (pH 8,3 ved 25 °C).  $MgCl_2$  og KCl er viktige kofaktorer for enzymreaksjonen, DTT medvirker til å stabilisere enzymet mens Tris medvirker til å holde en stabil pH.

Følgende reagenser ble blandet i et PCR rør :

4,0 $\mu$ l	M-MLV Buffer (5x konsentrat)
0,7 $\mu$ l	oligodT primer (100 pmol/ $\mu$ l)
3,0 $\mu$ l	dNTP (10 mM)
1 $\mu$ g	RNA
0,5 $\mu$ l	RNasin (RNasehemmer)
RNasefritt vann til totalvolum 18,6 $\mu$ l.	

Røret ble satt i en PCR-maskin, med følgende program:

80°C	5 min	Denaturering
37°C	60 min	cDNA dannes
94°C	5 min	Inaktivering av enzym
4°C	Uendelig	Prøven er ferdig

Enzymblanding ble tilsatt prøven etter denatureringstrinnet, når PCR-maskinen hadde kjølnet til 37 °C:

0,4 $\mu$ l	RNasin
1,0 $\mu$ l	M-MLV revers transkriptase

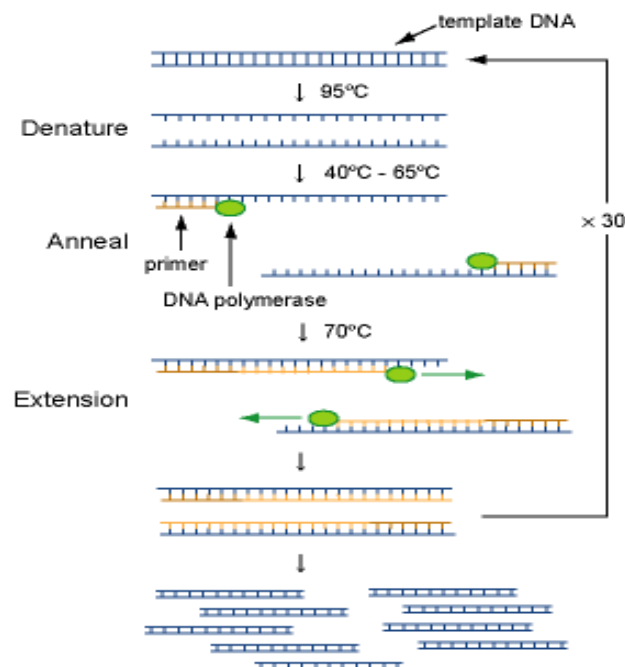
cDNA ble frosset ned ved -20 °C.

## 2.2.7 Polymerasekjedereaksjon -PCR(53)

### 2.2.7.1 Prinsipp

Polymerasekjedereaksjon (Polymerase Chain Reaction; PCR) gjør det mulig å lage et enormt antall kopier av en bestemt DNA-sekvens. Man bruker gjerne betegnelsen *in vitro* amplifisering av DNA, hvor ”å amplifisere” betyr ”å forsterke”. I en PCR-reaksjonsblanding må man ha DNA som man ønsker å kopiere (”templat”), to primere som skal sette i gang reaksjonen (binder seg til hver ende av DNAet), DNA-polymerase (enzym), Mg-ioner som kofaktor og nukleotidbyggestenene dNTP. PCR er en tre-trinns prosess som styres av endringer i temperatur, og foregår i sykler. Man får en eksponentiell økning av PCR-produkter fordi produktet fra en syklus blir templat i neste syklus, og man får dermed amplifiseringskaskaden 2-4-8-16 produkter osv. De tre trinnene i hver syklus har følgende formål:

1. Denaturering: DNA blir enkelttrådet
2. ”Annealing”: Primer fester seg.
3. Polymerisering: Nye DNA-tråder dannes.



**Figur 7.** Illustrasjonen viser en PCR-syklus. DNA-tråden denatureres til enkelttrådet templat, primerne festes, polymerasen kopierer templat-tråden, og PCR-produktet dannes.

For å designe primere til PCR må man kjenne DNA-sekvensen på hver ende av det DNA-området man skal amplifisere. Man lager deretter primere som er spesifikke for starten og slutten av DNA-området ("forward" (forlengs) og "revers" (baklengs) primer, se Figur 7). En primer er som oftest 18-22 basepar lang, og annealingstemperaturen,  $T_a$ , beregnes ut fra primernes smeltepunkt,  $T_m$ . Ved denne temperaturen er halvparten av molekylene dobbeltrådet, og halvparten enkelttrådet. (54)  $T_m$  beregnes ut fra innholdet av guanin/cytosin og adenin/thymin i primeren etter formelen:  $T_m = 2(AT) + 4(GC)$ . Et utgangspunkt for annealingstemperatur er  $T_m$  minus 5 °C.

DNA-polymerasen katalyserer DNA-syntese fra primerne. Byggesteinene er nukleotider som består av deoksyribose, fosfat og en base (adenin, guanin, cytosin eller thymin). DNA-polymerasen har 5'—3' polymerase-aktivitet. Forlengelsen av DNA-tråden skjer alltid fra fri 3'-ende. Hvilken base som skal bindes avhenger av baserekkefølgen i templatet.

Lite eller manglende produkt, samt uspesifikke produkter er et vanlig problem ved PCR-reaksjoner. Man kan redusere problemet ved å justere konsentrasjonen av magnesiumioner eller øke annealingstemperaturen. Erfaring viser at det teoretisk beregnede smeltepunkt bare har nytte som en veiledende temperatur. (55) Et tredje alternativ er å starte PCR-reaksjonen med en såkalt "touchdown"-prosedyre.

Prinsippet for touchdown-PCR er at man starter med en annealingstemperatur som er høyere enn det beregnede smeltepunkt for deretter å senke temperaturen gradvis over et antall syklener. Ved å anneale ved høy temperatur vil man oppnå en mest mulig spesifikk binding av primerne. På grunn av PCR-reaksjonens prinsipp med sekvensiell økning, vil det spesifikke fragmentet bli amplifisert gjennom de påfølgende syklene med synkende temperatur. Dette vil gi de spesifikke produktene et forsprang, og redusere de uspesifikke produktene. I arbeidet med denne oppgaven inngår touchdown-PCR som en standard del av PCR-reaksjonene.

### **2.2.7.2 Utstyr**

2720 Thermal Cycler PCR-maskin fra Applied Biosystem (CA,USA)

### **2.2.7.3 Prosedyre**

cDNA fra de sorterte populasjonene ble benyttet som templat i PCR-reaksjoner med spesifikke primere for NK-reseptorer og kjemokinreseptorer. Tabell 10 gir en oversikt over primerne som ble benyttet.

Navn	Ta °C	Sykler	Sekvens
CCR1 fwd	60	35	5'GGCCCTAGCCATCTTAGCTT 3'
CCR1_rev			5'GTCAGATTGTAGGGGGTCCA 3'
CCR2 fwd	56	35	5'CTTGTGGCCCTTATTTTCCA-3'
CCR2_rev			5'-GAATTCCTGGAAGGTGGTCA-3'
CCR4-fwd	56	40	5'GGGGATCATGTTGTTCTGCT3'
CCR4_rev			5'GCGATGTACTIONTGCAGGAATTT3'
CCR5 fwd	56	35	5'TTTC AAGGGTCGATTCCAAC 3'
CCR5_rev			5'GGCCAGGTTGAACAGGTAGA3'
CCR6-fwd	56	35	5'TACGCTCCAGAACACTGACG3'
CCR6_rev			5'CAGCAAAGGGATGAAGAAGC3'
CCR7 fwd	56	35	5'GTGTGCTTCTGCCAAGATGA3'
CCR7_rev			5'AGGACTTGGCTTCGCTGTAG3'
CCR9 fwd	57	40	5'CACCATGGACACCCACAGAAT3'
CCR9_rev			5'GATGAGTAGCACACAGCTGTAG3'
CXCR3 fwd	54	35	5'GTTTTTCGGCTCTGGTCTCTG 3'
CXCR3_rev			5'AGGAGGCCTCAGTTGTCTCA3'
CXCR4_fwd	54	35	5'CAATGGGTTGGTAATCTGG3'
CXCR4_rev			5'TGGAGTGTGACAGCTTGGAG3'
CXCR5_fwd	56	35	5'TCATCTTGCCTTTTGCAGTG 3'
CXCR5_rev			5'TGCACTGTGGTAAGGACTCG 3'
CX3CR1 fwd	56	35	5'AGCTGCTCAGGACCTCACCAT
CX3CR1_rev			5'GTTGTGGAGGCCCTCATGGCTGAT3'
Ly49s2_fwd	54	35	5' GTGTTTCTTTCGGCTAGTAT 3'
Ly49s2_rev			5' AGGCAAGTTTAGATGGGTT 3'
Ly49i4_fwd	45	39	5' AACAAAGTGAGGTCTGAGGAT 3'
Ly49i4_rev			5' ATGGTGCTGCAGTTATGC 3'
Ly49i8_fwd	47	38	5' AGACAAGAGAAACATGAACAT 3'
Ly49i8_rev			5' GAAGTTGGGACTTAAGGAAG 3'
Ly49s7/s1/i1_fwd	47	35	5' TCG TAA ATT CCT CAC CAC AT 3'
Ly49s7/s1/i1_rev			5' CCA GTA ATT GTC TGG AAT AAG 3'
NKR-P1A_fwd	56	30	5' CCT CAG TTT AAA GCC ATC CAA GAC 3'
NKR-P1A_rev			5' CAC TCG GCA TGG CTC CAC TGA 3'
NKR-P1B_fwd	56	35	5' AGC ACA AGT CAC CTC CAT CTC T 3'
NKR-P1B_rev			5' TCC AAA ATG ATC TGT CTT TCC CCT 3'
NKR-P1F_fwd	56	35	5' AAG AGT CTA TGG TAA TGT AAA GAC A 3'
NKR-P1F_rev			5' CAT TCT AGT ATG GCT GAT CTC C 3'
NKR-P1G_fwd	56	35	5' TGC ACC AGT GCT CTA TGC TGA ATT 3'
NKR-P1G_rev			5' ATT CCA GTG CAA ATG CCA ATC TCT 3'
NKp46_fwd	60	35	5' CTC ACA TAC TGC AGG GAT CTA CA 3'
NKp46_rev			5' TGC TGG ATA TGG TTG GAT TCT CTC T 3'
NKG2A_fwd	54	30	5' GTA ATA GAG CAG GAA ATC GTT 3'
NKG2A_rev			5' TGG TAG GTT CTC GTC ATT GA 3'
CD45_fwd	62	30	5' CGG GGT TGT TCT GTG CTC TGT TC 3'
CD45_rev			5' CTT TGC TGT CTT CCT GGG CTT TGT 3'
DAP12_fwd	54	35	5' AGC CCC TGG ACT GTG GTG T 3'
DAP12_rev			5' GGC ATA GGG TGG GTT CAT C-3'
CD16_fwd	55	35	5'-CAATGGCTACTCCCACCACT-3'
CD16_rev			5'-GCACCGGTATTCTCCACTGT-3'

**Tabell 10.** Tabellen viser en oversikt over de ulike primerne som er brukt til fenotyping på mRNA nivå.

Kolonne 1 viser spesifisiteten til de ulike primerne, kolonne 2 og 3 viser annealingstemperatur og antall sykler for de ulike primerne, og kolonne 4 viser primersekvensene.

For alle PCR-reaksjonene unntatt DAP12, ble GoTaq buffer og GoTaq polymerase benyttet. For DAP12 PCR benyttet vi low salt buffer og Pwo polymerase. DAP 12-protokollen er utviklet av Ke-Zheng Dai ved Immunologisk Institutt (ikke publisert), PCR-betingelsene for kjemokinreseptorer er utviklet av Marit Inngjerdingen ved Immunologisk Institutt (ikke publisert), mens PCR-protokoll for NK-reseptorer er utviklet av Lise Kveberg og Ke-Zheng Dai. (56-59)

Protokoll:

Følgende reaksjonsblanding ble tillaget i PCR-rør, og tilsvarer en løsning på 15 µl for 1 prøve:

- 0,5 µl cDNA
- 1,0 µl primer (10 pmol/µl)
- 1,0 µl dNTP (10 mM)
- 3,0 µl 5x GoTaq buffer (eller 3,0 µl 5x low salt buffer)
- 9,5 µl dH<sub>2</sub>O

Rørene ble overført til PCR-maskin, og denaturert i 3 min ved 94°C.

5 µl enzymblanding ble så tilsatt ved 80°C:

- 0,1 µl GoTaq polymerase
- 1,0 µl 5x GoTaq buffer (eller 1,0 µl 5x low salt buffer)
- 3,9 µl dH<sub>2</sub>O

Programmet videre var som følger:

Touchdown PCR på 5 sykler, med -1 °C/ syklus. Startet ved primerspesifikk temperatur pluss 5 °C.

Touchdown ble etterfulgt av et primerspesifikt program med sykler ved 94°C 30s, T<sub>a</sub>°C 60s, 72°C 60s. Antall sykler varierte med primer, og er angitt i Tabell 10, sammen med primerens T<sub>a</sub>.

## ***2.2.8 Agarose gel-elektroforese.***

### ***2.2.8.1 Prinsipp***

Agarose gel-elektroforese kan brukes til å separere, identifisere og rense DNA-fragmenter. Når agarosegelen er stivnet danner den et nettverk der tettheten er bestemt av mengde agarose i gelen. DNA er negativt ladet og vil vandre mot en positiv anode. Små DNA-fragmenter vil vandre raskere

gjennom gelen enn større fragmenter, og man får på denne måten en separasjon av DNA-fragmenter etter størrelse. Ved å benytte en standard inneholdende DNA-fragmenter av kjent lengde, kan man bestemme lengden av PCR-produktene i prøven. For å kunne visualisere DNA tilsettes et fluoriserende stoff, SYBR® Safe DNA, til gelen. Dette inkorporeres i DNA, og vil synliggjøre PCR-produktet under UV-lys.

### **2.2.8.2 Utstyr**

Elektroforesekar: HE33 Amersham Biosciences (PA, USA).

Powersupply: EPS 301/601 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sverige).

Gel Doc 2000 med programmet Quantity One, BioRad Laboratories, Inc (CA., USA).

### **2.2.8.3 Prosedyre**

1. En 2,5% TAE agarosegelløsning ble tillaget ved å smelte 2,5 g SeaKem agarosepulver i 100 ml TAE-buffer i mikrobølgeovn.
2. 35 ml 2,5% TAE agarosegel ble tilsatt 3,5 µl SYBR® Safe DNA.
3. Gelen ble helt over i et støpekar, en kam med brønner ble satt ned i gelen, gelen ble avkjølt, og 10 µl PCR-produkt ble applisert. Gelen ble kjørt i TAE-buffer i 30 min ved 90 V.
4. DNA-produktet ble visualisert med Gel Doc 2000.

### 3 Resultater

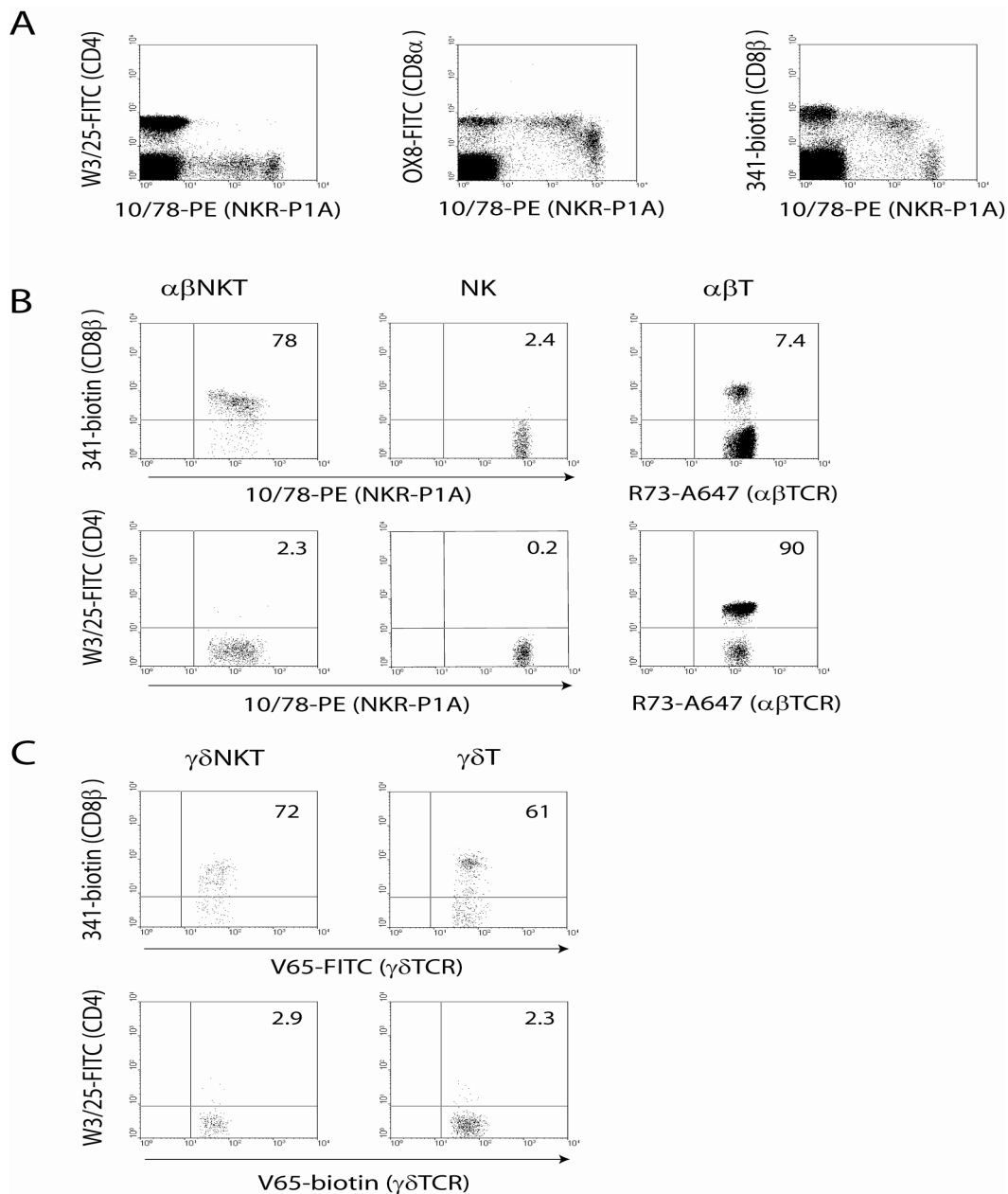
I dette arbeidet karakteriseres NK-celle- og kjemokinreseptorer på  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler ved bruk av RT-PCR og flowcytometri. NKT-celler er her definert som celler som uttrykker  $\alpha\beta$ - eller  $\gamma\delta$ TCR i kombinasjon med NKR-P1A. Siden det er store artsvariasjoner med hensyn på uttrykk av koreseptorene CD4 og CD8 på NKT-celler, har vi her sett på uttrykket av CD4 og CD8 på rotte NKT-celler, og gjort en direkte sammenligning av uttrykket av CD4 og CD8 på  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler.

#### 3.1 Uttrykk av CD4 og CD8 på rotte NKT-celler.

NKT-celler i rotte er vist å være hovedsakelig  $CD8\alpha\beta^+$  og  $CD4^-$ . Få tidligere studier har tatt hensyn til hvilken TCR som uttrykkes på NKT-cellene, og stort sett karakterisert rotte NKT-celler som NKR-P1A<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> celler. Vi ønsket derfor å bestemme uttrykket av CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$  og CD4 på både  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler for å definere andelen av  $CD8\alpha\beta^+$ ,  $CD8\alpha\alpha^+$  og  $CD4^+$  celler. Miltceller ble merket med antistoff mot CD4 (W3/25-FITC), CD8 $\alpha$  (OX8-FITC) og CD8 $\beta$  (341-biotin), i tillegg til antistoff mot enten TCR $\alpha\beta$  (R73-Alexa647), TCR $\gamma\delta$  (V65-FITC) eller NKR-P1A (10/78-PE).

Figur 8A viser merking av den totale miltcellepopulasjonen med antistoffer mot henholdsvis CD4, CD8 $\alpha$  eller CD8 $\beta$  mot NKR-P1A. Både NK-celler og NKT-celler er positive for NKR-P1A, men NKT-celler har en lavere fluorescensintensitet med NKR-P1A-antistoffer, sammenlignet med NK-celler. Dette kan observeres som to separate NKR-P1A<sup>+</sup> populasjoner. Av figuren kan man se at celler med lav intensitet av NKR-P1A er hovedsakelig  $CD4^-$ ,  $CD8\alpha^+$  og  $CD8\beta^+$ . I Figur 8B og C, vises uttrykk av CD4 og CD8 på henholdsvis  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ -NKT-celler. Majoriteten av begge NKT-cellepopulasjonene er  $CD8\alpha\beta^+$  (78 % av  $\alpha\beta$ NKT og 72 % av  $\gamma\delta$ -NKT-cellene), men  $CD4^-$ .  $\alpha\beta$ T-celler er som kjent enten  $CD4^+$  eller  $CD8\alpha\beta^+$ , mens flertallet av  $\gamma\delta$ T-celler er  $CD8\alpha\beta^+$ . NK-celler er, som tidligere vist, hovedsaklig  $CD8\alpha\alpha^+$ , og dermed negative for CD8 $\beta$ .





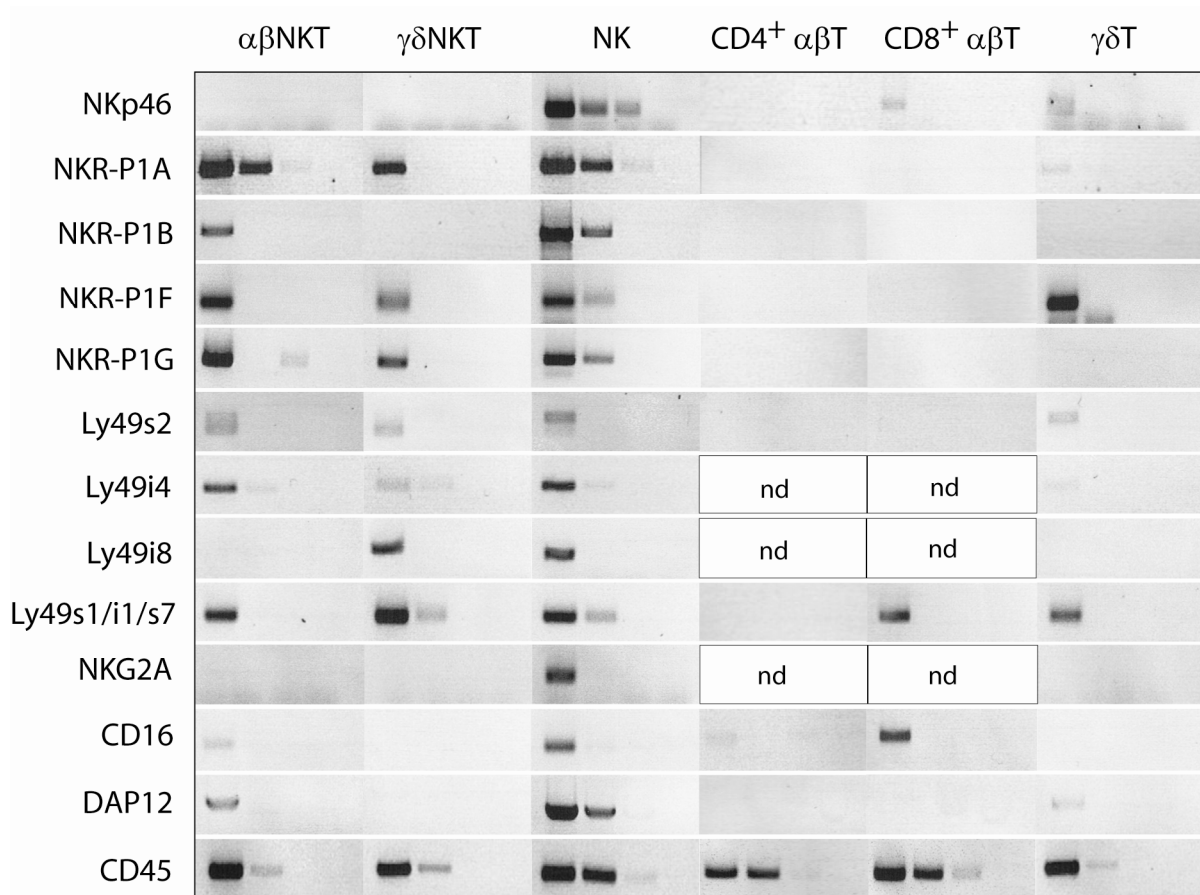
**Figur 8.** Overflateuttrykk av CD4, CD8 $\alpha$  og CD8 $\beta$  på rotte NKT-celler. A: Miltceller merket med antistoff mot NKR-P1A, CD4, CD8 $\alpha$  eller CD8 $\beta$ . NKR-P1A<sup>høy</sup> representerer NK-celler, mens NKR-P1A<sup>lav</sup> representerer NKT-celler. B: Uttrykk av CD8 $\beta$  og CD4 på  $\alpha\beta$ NKT-, NK- og  $\alpha\beta$ T-celler. C: Uttrykk av CD8 $\beta$  og CD4 på  $\gamma\delta$ NKT- og  $\gamma\delta$ T-celler.

## 3.2 NK-reseptorer på $\alpha\beta$ NKT- og $\gamma\delta$ NKT-celler

### 3.2.1 Uttrykk av NK-reseptorer på mRNA nivå.

For å kartlegge uttrykket av NK-reseptorer i de to gruppene av NKT-celler, sorterte vi ut de to populasjonene fra milt. Vi benyttet milt, siden dette organet inneholder store mengder hvite blodceller som enkelt lar seg isolere. Ved hjelp av spesifikke antistoffer sorterte vi ut  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-

celler (se Materiale og Metoder). Vi valgte å ekskludere NKT-celler som er  $CD8\alpha\alpha^+$ , og anriktet NKT-cellepopulasjoner som var  $CD8\alpha\beta^+$ . Denne anrikningen ble gjort, siden majoriteten av  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler er  $CD8\alpha\beta^+$ . I tillegg ble også NK-celler,  $\gamma\delta$ T-celler,  $CD4^+$ - og  $CD8^+ \alpha\beta$ T-celler sortert og benyttet som kontroller og sammenligningsgrunnlag (Figur 4).



**Figur9.** Uttrykk av NK-reseptorer i  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler på mRNA nivå. Figuren viser uttrykk av 11 NK-reseptorer samt adaptermolekylet DAP12. NK-reseptorene ble valgt ut som representanter for de største klassene av NK-reseptorer (se Innledning). PCR ble gjort i 10-foldsfortynninger av cDNA for den enkelte celletype. Utgangsfortynningen ble bestemt av den felles markøren CD45. For å sikre reproduserbarhet ble en ny sortering utført og RT-PCR ble gjentatt med lignende resultat. n.d.= ikke bestemt ("not determined").

NKp46 er en NK-cellespesifikk reseptor og dermed uttrykt på alle NK-celler.(25;26) Det tydelige uttrykket av NKp46 på NK-celler kan sees i Figur 9. Ingen av NKT-populasjonene uttrykker NKp46, mens det kan ses svake bånd for NKp46 på  $\gamma\delta$ T-celler og  $CD8^+ \alpha\beta$ T-celler.

Ulike medlemmer av NKR-P1-reseptorfamilien finnes uttrykt på både NK-celler, NKT-celler og T-celler (se Innledning).  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler uttrykker tilnærmet like mengder av NKR-P1A, NKR-P1G og NKR-P1F. NKR-P1B er bare uttrykt på  $\alpha\beta$ NKT-celler i tillegg til NK-celler.

Uttrykk av Ly49-reseptorer er stort sett sammenfallende for de to populasjonene av NKT-celler. Begge populasjonene uttrykker alle Ly49-reseptorer som vi testet, med unntak av Ly49i8 som mangler i  $\alpha\beta$ NKT-celler. Alle reseptorene uttrykkes av NK-celler, men også til en viss grad i  $CD8^+$  T-celler og  $\gamma\delta$ T-celler. Vi prøvde også med spesifikke primere for Ly49i5 og Ly49s5. Ly49i5 ga ikke noe produkt, heller ikke med NK-celler som positiv kontroll. Ly49s5 ga mange uspesifikke bånd. Vi testet ut ulike PCR-protokoller med ulik annealingstemperatur, og med og uten touchdown PCR, men ble ikke kvitt de uspesifikke båndene. Det så ut til å være produkt for Ly49s5 i  $\alpha\beta$ NKT-celler og NK-celler, men vi har valgt å ikke vise resultatene her da det er usikkerhet rundt spesifisiteten.

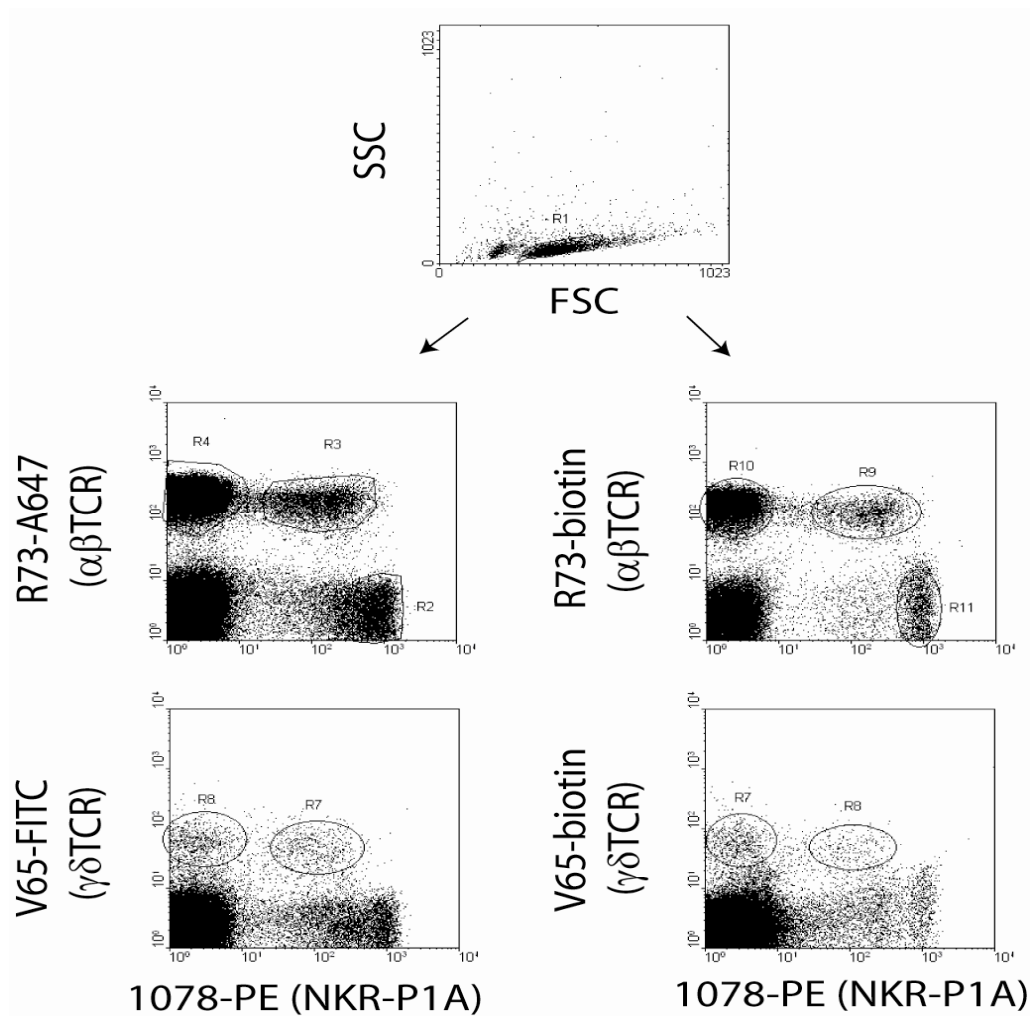
NKG2-familien består av tre medlemmer, men vi har spesifikk primer kun for NKG2A. NKG2A ble bare detektert i NK-celler. Vi testet også for NKG2D, som ikke er beslektet med NKG2/CD94reseptorene, men fikk ikke opp bånd for NK-cellene som er positiv kontroll. Resultatet er derfor ikke med.

Vi detekterte et svakt bånd for CD16 i  $\alpha\beta$ NKT-celler, men ikke i  $\gamma\delta$ NKT-celler. I tillegg fant vi mRNA for CD16 i NK-celler,  $CD4^+$  T-celler og  $CD8^+$  T-celler.

Adaptermolekylet DAP12 er tilknyttet aktiverende Ly49- og NKG2-reseptorer. Vi detekterte mRNA for DAP12 i både  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler, men båndene var betydelig svakere enn for NK-cellene. Båndet for DAP12 på  $\gamma\delta$ NKT-celler var svært svakt og knapt synlig etter å ha scannet inn bildet fra gelen. I tillegg fant vi et svakt bånd for DAP12 i  $\gamma\delta$ T-celler.

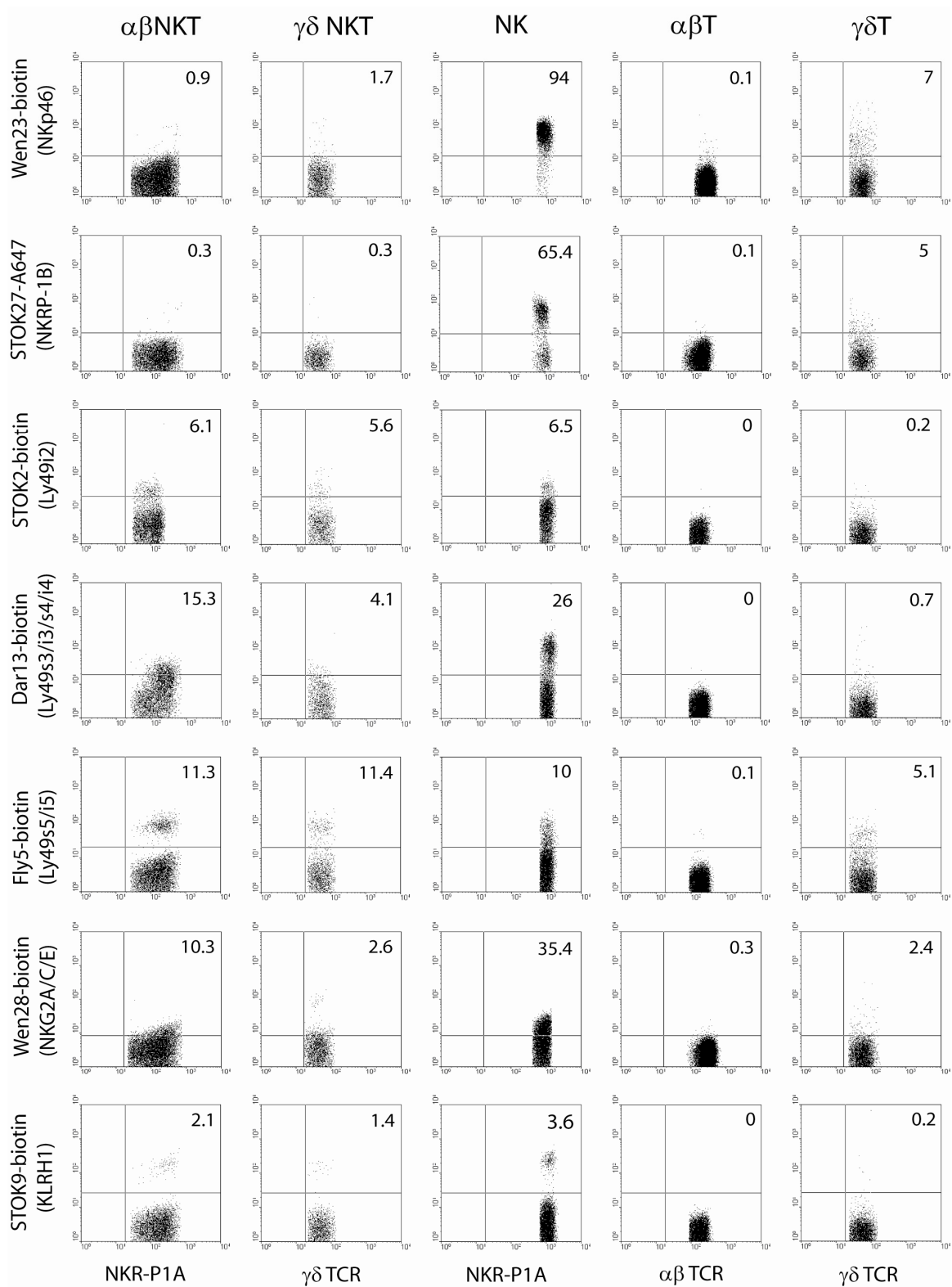
### ***3.2.2 Uttrykk av NK-reseptorer på proteinnivå***

Uttrykk av NK-reseptorer på de to NKT-populasjonene ble videre testet på proteinnivå ved hjelp av flowcytometri. Dette er en metode som vi benyttet for å studere overflateuttrykk av reseptorene. For å kunne direkte sammenligne  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\delta\gamma$ NKT-celler ble de to populasjonene testet i samme prøve. Det vil si at vi i én prøve satte opp en firemerking av celler med antistoff for NK-celler (NKR-P1A; 10/78 eller 3.2.3),  $\alpha\beta$ T-celler (TCR $\alpha\beta$ ; R73),  $\gamma\delta$ T-celler (TCR $\gamma\delta$ ; V65) og et antistoff for en NK-reseptor. Det ble satt "gater" for hver enkelt av NKT-populasjonene.  $\alpha\beta$ NKT-celler ble definert som dobbelt positive for NKR-P1A og  $\alpha\beta$ TCR, mens  $\gamma\delta$ NKT-celler ble definert som dobbelt positive for NKR-P1A og  $\gamma\delta$ TCR. Det ble benyttet ulike konjugater av R73-antistoffet og V65-antistoffet, avhengig av hvilket fluorokrom de andre antistoffene i oppsettet var konjugert med. I Figur 10 har vi vist eksempler på hvordan vi har "gattet" for  $\alpha\beta$ NKT-celler (R3, R9),  $\gamma\delta$ NKT-celler (R7, R13),  $\alpha\beta$ T-celler (R4, R10),  $\gamma\delta$ T-celler (R8, R12) og NK-celler (R11).



**Figur 10.** "Gating" av NKT-celler. Figuren viser hvordan en "gate" er satt rundt de ulike cellepopulasjonene som er studert for uttrykk av NK-reseptorer og kjemokinreseptorer på proteinnivå.

Figur 11 viser resultatene fra flowcytometri for NK-reseptorer. Mens  $\alpha\beta$ T-cellene ble sortert i CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> celler for RT-PCR, ser vi her  $\alpha\beta$ T-cellene som én samlet populasjon. Dette på grunn av begrensningene i antall antistoff vi kan ha i én prøve, som bemerket ovenfor. I figuren er det angitt hvilket NK-reseptorantistoff som er benyttet, og hvorvidt det er biotinkonjugert eller direktekonjugert til et fluorokrom. Mindre enn 1 % positive celler regner vi som bakgrunn og at reseptor ikke uttrykkes.



**Figur 11.** Figuren viser resultatene for flowcytometri for NK-reseptorer. Kombinasjonene av fluorokromene ble planlagt ut i fra hvilke konjugater av NK-reseptorantistoff som var tilgjengelig. Biotinkonjugerte antistoff detekteres med Streptavidin-PerCP. I alle merkingene, med unntak av STOK27-oppsettet, merkes  $\alpha\beta$ TCR med R73-Alexa647. R73-biotin/Strept-PerCP ble benyttet sammen med STOK27-Alexa647.  $\gamma\delta$ TCR ble merket med V65-FITC, mens NK-celler ble merket med 10/78-PE. Forsøket er representativt for 2-3 eksperimenter.

Begge NKT-cellepopulasjonene er negative for NKp46. Som forventet er NKp46 uttrykt på flesteparten av NK-cellene (94 %), mens  $\alpha\beta$ T-celler er negative. Vi fant, noe overraskende, at 7 prosent av  $\gamma\delta$ T-cellene er positive for NKp46.

Både  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler er negative for NKR-P1B ved bruk av antistoffet STOK27 (0,3 %). 65,4 prosent av NK-cellene er positive for NKR-P1B som forventet. (56)  $\gamma\delta$ T-celler er svakt positive, 5 %, men med klart lavere fluorescensintensitet sammenlignet med NK-cellene, mens  $\alpha\beta$ T-celler er negative.

Det finnes få Ly49-spesifikke antistoffer i rotte. Dette skyldes at ekstracellulærdelen av Ly49 er svært lik mellom par av hemmende og aktiverende Ly49-reseptorer. For å teste Ly49-uttrykk på NKT-celler, benyttet vi tre Ly49-antistoff med ulik spesifisitet. Antistoffet Dar13 binder til både Ly49i3, Ly49s3, Ly49i4 og Ly49s4. (57) De to NKT-cellepopulasjonene avviker fra hverandre med hensyn på disse reseptorene. Mens 15,3 % av  $\alpha\beta$ NKT-cellene er positive, er bare 4,1 prosent av  $\gamma\delta$ NKT-celler positive. 20,7 % av NK-cellene er positive for Dar13-antistoffet, som vist tidligere. NK-cellene merker også med høyere fluorescensintensitet sammenlignet med NKT-cellene. Både  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler er positive med antistoff mot Ly49i2 (STOK2) og Ly49i5/s5 (Fly5), og merkes i samme grad (STOK2; 6,1 % versus 5,6 %, og Fly5; 11,3 % versus 11,4 %). I tråd med publiserte data er 6,5 % av NK-cellene positive med STOK2-antistoffet, (58) og 10 % positive med Fly5-antistoffet. (59) Både  $\alpha\beta$ T-celler og  $\gamma\delta$ T-celler er negative for disse Ly49-reseptorene, men unntak av Ly49i5/s5, som uttrykkes av 5 % av  $\gamma\delta$ T-cellene.

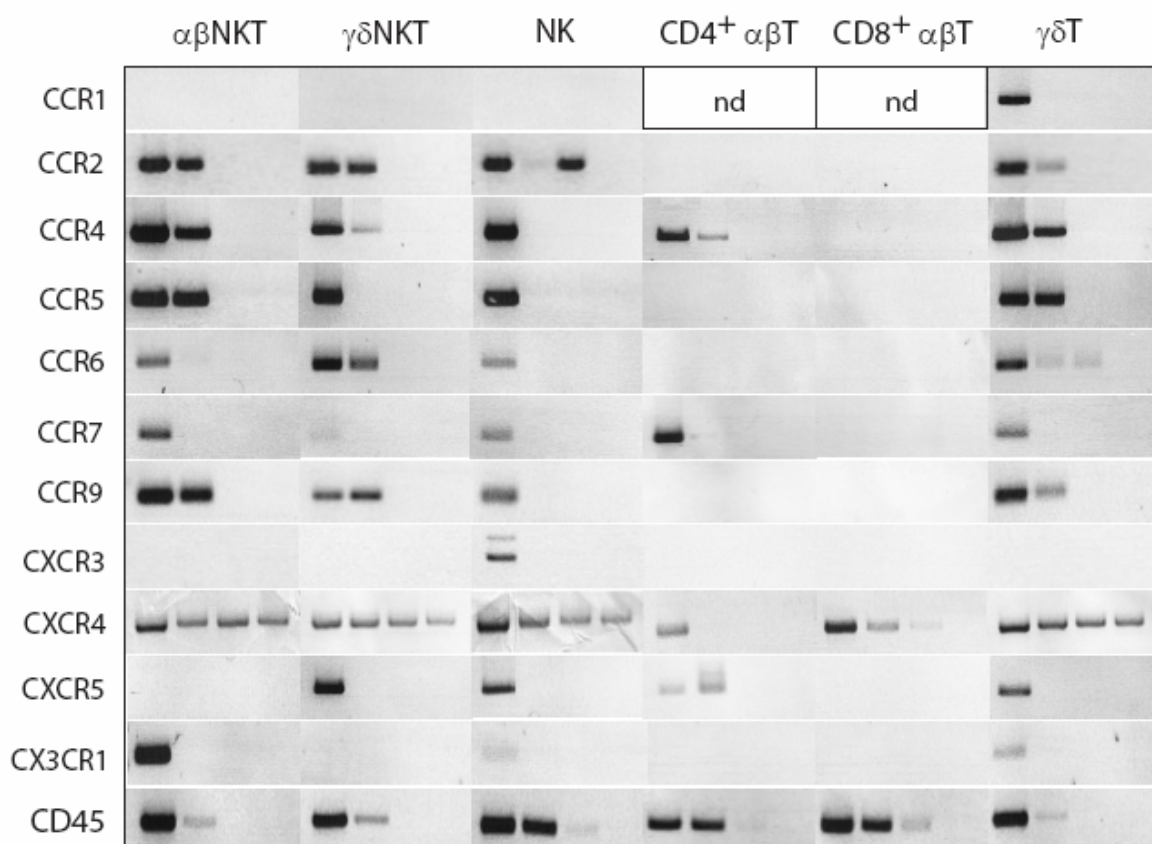
For å detektere NKG2/CD94 benyttet vi antistoffet Wen28 som binder til både NKG2A, NKG2C og NKG2E. (60) Begge NKT-cellepopulasjonene er positive, men NKG2 er noe høyere uttrykt på  $\alpha\beta$ NKT-celler (10,3 % på  $\alpha\beta$ NKT versus 2,6 % på  $\gamma\delta$ NKT). 35,4 prosent av NK-cellene er positive,  $\alpha\beta$ T-celler er negative, mens  $\gamma\delta$ T-celler er svakt positive med 2,4 % uttrykk.

Til slutt testet vi antistoffet STOK9 som binder til KLRH1.  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler er begge positive med henholdsvis 2,1 og 1,4 % uttrykk. 3,6 % av NK-cellene er positive for KLRH1 som tidligere rapportert, mens begge T-cellepopulasjonene er negative. Dette resultatet ble forsøkt bekreftet med RT-PCR, men primeren viste seg å ikke fungere.

### 3.3 Kjemokinreseptorer på $\alpha\beta$ NKT- og $\gamma\delta$ NKT-celler

#### 3.3.1 Uttrykk av kjemokinreseptorer på mRNA nivå.

Uttrykket av kjemokinreseptorer varierer for ulike typer leukocytter, og for ulike undergrupper av leukocytter. For å teste mRNA for kjemokinreseptorer, har vi benyttet cDNA fra de samme cellepopulasjonene som i Figur 9. Kjemokinreseptorene er kartlagt for T-celler og NK-celler, og fungerer som interne kontroller i oppsettet vårt.



**Figur 12.** Uttrykk av kjemokinreseptorer på mRNA nivå. Figuren viser uttrykk av 11 kjemokinreseptorer. De ble valgt ut som representanter for de ulike klassene av kjemokinreseptorer (se Innledning). PCR ble gjort i 10-foldsfortynning av cDNA for den enkelte celletype. Utgangsfortynningen ble bestemt av den felles markøren CD45. For å sikre reproduserbarhet, ble en ny sortering utført og RT-PCR ble gjentatt med lignende resultat. n.d.= ikke bestemt ("not determined").

Kjemokinreseptorene CCR2,-4,-5,-6 og -9, samt CXCR4, er mer eller mindre likt uttrykk på  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler. Disse uttrykkes også på NK-celler og  $\gamma\delta$ T-celler. CCR1 og CXCR3 er ikke uttrykt på NKT-cellene, mens vi ser bånd for CCR1 i  $\gamma\delta$ T-celler, og for CXCR3 i NK-celler. Vi fant lite uttrykk

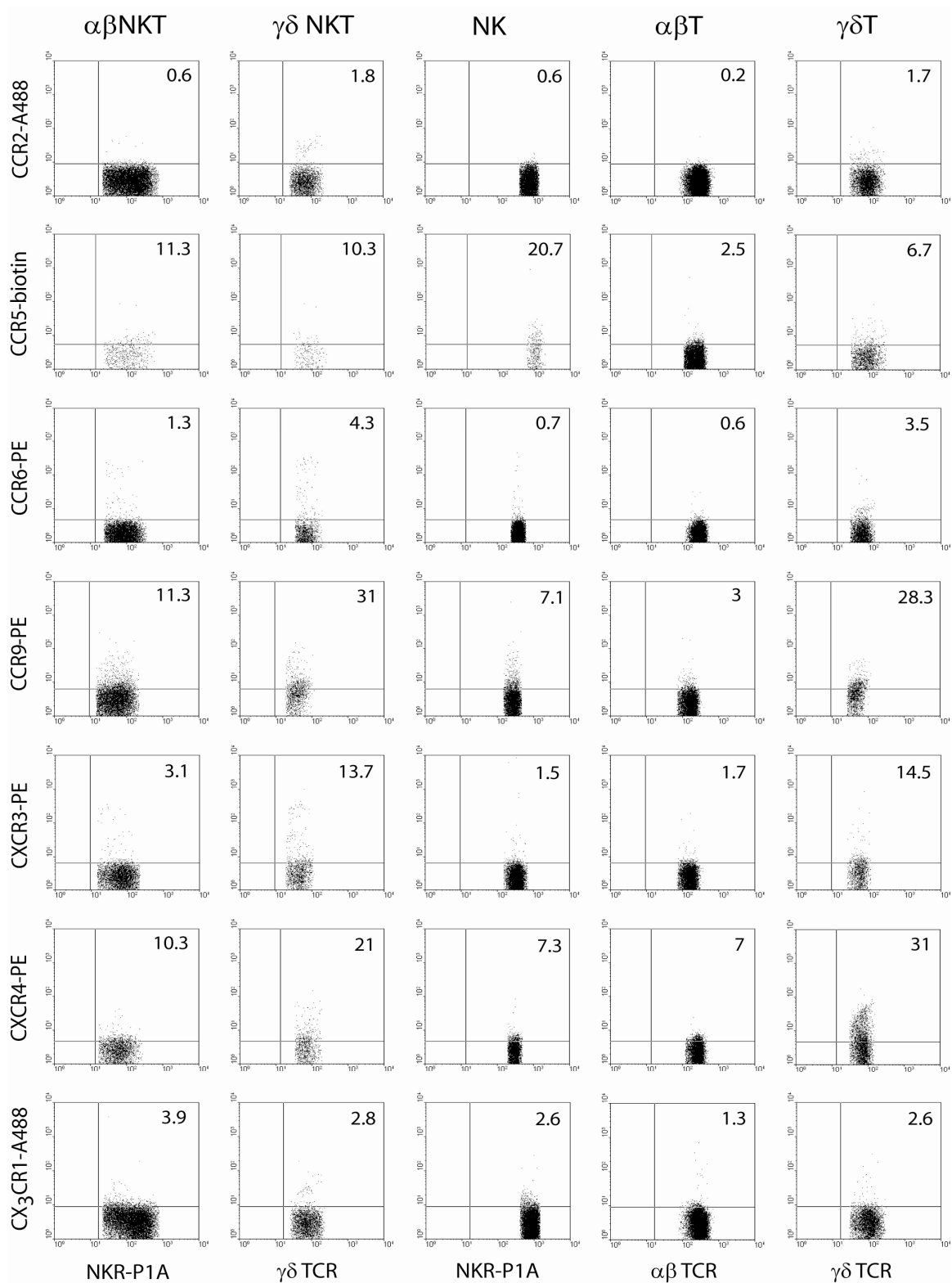
av kjemokinreseptorer på CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> T-celler, men utelukker ikke at vi har operert med for høy fortykning av prøvene.

Det er forskjeller i uttrykk av tre kjemokinreseptorer mellom  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler, nemlig CCR7, CXCR5 og CX<sub>3</sub>CR1. Mens CCR7 og CX<sub>3</sub>CR1 bare er uttrykt i  $\alpha\beta$ NKT-celler, er CXCR5 kun uttrykt i  $\gamma\delta$ NKT-celler. NK-celler er tidligere vist å uttrykke alle tre reseptorene (61-63), noe vi også finner her. CCR7, viktig for CD4<sup>+</sup> T-cellers vandring til lymfeknuter er som forventet uttrykt på disse cellene. (64)

### ***3.3.2 Uttrykk av kjemokinreseptorer på proteinnivå***

Figur 13 viser resultatene fra flowcytometri for kjemokinreseptorer. Det finnes ingen kommersielt tilgjengelige antistoff mot rotte kjemokinreseptorer, og det er heller ikke laget noen internt på laboratoriet. Mus og rotte kjemokinreseptorer er svært like ekstracellulært, (65) og vi benyttet derfor antistoff mot murin kjemokinreseptorer i dette studiet. Vi benyttet samme fremgangsmåte som for NK-reseptorene. Vi satte opp en prøve med fire ulike antistoff. Vi ”gatet” for  $\alpha\beta$ NKT-celler,  $\gamma\delta$ NKT-celler, NK-celler,  $\alpha\beta$ T-celler og  $\gamma\delta$ T-celler på basis av uttrykk av NKR-P1A,  $\alpha\beta$ TCR og  $\gamma\delta$ TCR (som vist i Figur 10).





**Figur 13.** Figuren viser resultatene fra flowcytometri for kjemokinreseptorer. Kombinasjonene av fluorokromene ble planlagt ut i fra hvilke konjugater av reseptorantistoff som var tilgjengelig.  $\alpha\beta$ TCR ble merket med R73-Alexa647,  $\gamma\delta$ TCR ble merket med V65-FITC og NK-celler med 3.2.3-biotin/Strept-PerCP i oppsettene med PE-merket kjemokinreseptorantistoff. I merkingene med kjemokinreseptorer konjugert til Alexa488 brukte vi V65-biotin/Strept-PerCP i stedet for V65-FITC, mens NK-celler ble merket med 10/78-PE. Figuren er representativ for 2-3 eksperimenter.

$\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler viser et sammenfallende uttrykk for CCR5 (11,3% versus 10,3 %) og for CX<sub>3</sub>CR1 (3,9 versus 2,8%). Uttrykket av CCR2 er svært lavt, eller negativt, på begge NKT-cellepopulasjonen med 0,6 %  $\alpha\beta$ NKT- og 1,8 %  $\gamma\delta$ NKT-celler. CCR6 uttrykkes også lavt på både  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler (1,3 % versus 4,3 %).

$\gamma\delta$ NKT-celler uttrykker høyere nivåer av CCR9, CXCR3 og CXCR4 sammenlignet med  $\alpha\beta$ NKT-celler (CCR9; 11,3 % versus 31 %, CXCR3; 3,1 % versus 13,7 %, CXCR4; 10,3 % versus 21 %). Disse tre reseptorene er også uttrykt i større eller mindre grad på de andre lymfocyttopulasjonene. Vi merket oss at  $\gamma\delta$ NKT-celler er mer like  $\gamma\delta$ T-celler enn  $\alpha\beta$ NKT-celler når det gjelder uttrykk av kjemokinreseptorer, spesielt når det gjelder CCR6, CCR9, CXCR3 og CXCR4.

Uttrykket på NK-cellene samsvarer med tidligere studier i mus og menneske. Kim *et al* har gjort en studie av kjemokinreseptorer på humane  $\alpha\beta$ NKT-celler. Deres arbeid viser uttrykk av alle kjemokinreseptorene vi har studert med unntak av CX<sub>3</sub>CR1 som ikke med i deres studie.(64)

## 4 Diskusjon

Natural Killer T-celler (NKT), en undergruppe av T-celler, er vist å spille en rolle i en rekke ulike sykdomsprosesser. De fleste studier som beskriver NKT-cellene funksjonelt er gjort i mus. Siden mange humane gener som man vet assosierer til sykdom har homologer i rottegenomet, er det også interessant og viktig å kunne gjøre studier i rottemodeller. Her har vi gjort en fenotyping av overflatereseptorer på rotte NKT-celler isolert fra milt.

NKT-celler uttrykker T-cellereseptor (TCR) og NK-cellemarkøren NKR-P1. TCR uttrykkes som en dimer, og finnes enten som en  $\alpha\beta$ -heterodimer eller en  $\gamma\delta$  heterodimer. Vi har sortert og studert NKT-cellepopulasjoner både med  $\alpha\beta$ TCR og med  $\gamma\delta$ TCR.  $\alpha\beta$ NKT-celler i mus og menneske deles inn i tre klasser ut i fra ulike kriterier (se Innledning).  $\alpha\beta$ NKT-cellene i våre studier kan være en blanding av disse tre klassene. NKT-celler spiller en rolle i regulering av ulike immunresponser. Det gjør også Natural Killer (NK)-celler. Både NK- og NKT-celler regnes til det non-adaptive immunforsvaret. Migrasjon av leukocytter fra blodårer til vev og fra benmarg og thymus til blod spiller en nøkkelrolle i både det non-adaptive og adaptive immunforsvaret. Det samme gjør intern migrasjon i lymfatisk vev. Det er hovedsakelig kjemokiner som kontrollerer denne vandringsprosessen. For å danne oss et overordnet bilde av NKT-celler i rotte, har vi studert kjemokin- og NK-reseptorer på  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler. Vi har studert uttrykk på mRNA nivå med PCR-teknikk og uttrykk på proteinnivå med flowcytometri. Våre studier viser at både  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler uttrykker et bredt repertoar av NK-reseptorer og kjemokinreseptorer.

### 4.1 NK-reseptorer på $\alpha\beta$ NKT- og $\gamma\delta$ NKT-celler i rotte

I rotte og menneske er NKR-P1A den NK-cellemarkøren som sammen med TCR definerer en NKT-celle. Det er viktig å poengtere at NKR-P1A i rotte og menneske ikke er homologe. NKR-P1A i menneske er en hemmende reseptor, mens NKR-P1A i rotte er en aktiverende reseptor. Det er per i dag usikkert om noen av rotte NKR-P1 reseptorene er homologe til den humane NKR-P1A-reseptoren.(66) I mus defineres NKT-celler av NKR-P1C. Denne antas å være homolog til NKR-P1A i rotte.

Vi har funnet uttrykk av alle de fire NKR-P1 reseptorene i rotte (NKR-P1A, NKR-P1B, NKR-P1F og NKR-P1G) på mRNA nivå i  $\alpha\beta$ NKT-celler. NK-celler har det samme uttrykket.  $\gamma\delta$ NKT-celler uttrykte ikke NKR-P1B, men de tre andre reseptorene. I tillegg var NKR-P1F uttrykt på mRNA nivå også i  $\gamma\delta$ T-celler.  $\gamma\delta$ T-celler ble sortert med kriterium om å være negative for NKR-P1A. Det svake båndet

for NKR-P1A som observeres i  $\gamma\delta$ T-celler skyldes derfor enten en kontaminasjon eller at de har et svakt uttrykk av NKR-P1A på mRNA nivå. På proteinnivå har vi bare studert NKRP-1B (i tillegg til NKR-P1A, som er NKT-cellemarkøren). Utenom NK-celler, uttrykkes NKR-P1B bare på  $\gamma\delta$ T-celler. Vi fant dermed ikke proteinuttrykk av NKR-P1B på  $\alpha\beta$ NKT-celler, tross uttrykk av mRNA.

Utrykksmønsteret for NKR-P1 familien på NKT-celler i mus er bare delvis kjent. I en studie av Rolf *et al.* er det funnet uttrykk av aktiverende NKR-P1F (homolog til NKR-P1F i rotte), svakt uttrykk av NKR-P1A (ukjent homolog i rotte) og uttrykk av hemmende NKR-P1B (homolog til NKR-P1B i rotte) på  $\alpha\beta$ NKT-celler. Det kan dermed virke som at både  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler kan uttrykke flere medlemmer av NKR-P1 reseptorene, både aktiverende og hemmende utgaver. (67)

Ly49-familien i mus og rotte består av både aktiverende og hemmende reseptorer. Hemmende Ly49-reseptorer er tidligere vist å være uttrykt på  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler i mus, i tillegg til at de kan oppreguleres på  $\alpha\beta$ T- og  $\gamma\delta$ T-celler i menneske og mus.(8;30;31) Våre studier viser at hemmende Ly49-reseptorer også uttrykkes på NKT-celler i rotte, både på mRNA og proteinnivå.

Det har tidligere vært antatt at aktiverende Ly49-reseptorer kun uttrykkes av NK-celler, og ikke av verken NKT-celler eller T-celler. Rolf *et al* viser i sin artikkel et svakt uttrykk av de aktiverende reseptorene Ly49H og Ly49U på  $\alpha\beta$ NKT-celler og på CD4<sup>+</sup>T-celler. I vår studie fant vi uttrykk av den aktiverende reseptoren Ly49s2 på mRNA nivå både i  $\alpha\beta$ NKT-celler,  $\gamma\delta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ T-celler. Aktiverende Ly49-reseptorer assosierer med DAP12 som gir signal til celleaktivering. Vi ser svake bånd for DAP12 på mRNA nivå for de samme cellepopulasjonene. Dette underbygger muligheten for at NKT-celler uttrykker aktiverende Ly49-reseptorer.

Vi har ikke antistoff som er spesifikt for Ly49s2, så vi kan ikke med sikkerhet si at vi har uttrykk på proteinnivå. STOK6, som er et spesifikt antistoff mot Ly49s3, er tidligere vist å ikke reagere med NKT-celler i rotte (57), og ble ikke tatt med i denne oppgaven. Antistoffet Dar13, som binder til både Ly49s3, Ly49i3, Ly49s4 og Ly49i4, viser et positivt uttrykk på begge NKT-cellepopulasjonene, men det er ikke mulig å spekulere i hvilke(n) av de fire reseptorene som er mest uttrykt. Fly5 binder til både Ly49s5 og Ly49i5, og merker begge NKT-cellepopulasjonene og  $\gamma\delta$ T-celler. Som tidligere nevnt (se Resultater), mener vi å se uttrykk av Ly49s5 på mRNA nivå, men at resultatet er for usikkert til at vi viser det. Det er imidlertid vist tidligere at NK-celler merket med Fly5 deles i to grupper, enten Fly5<sup>høy</sup> eller Fly5<sup>lav</sup>, og at Fly5<sup>høy</sup> NK-celler hovedsakelig inneholder Ly49i5, mens Fly5<sup>lav</sup> NK-celler inneholder Ly49s5.(59) Av Fly5-merkingen (Figur 11), kan man se at NKT-cellene er Fly5<sup>høy</sup>, som indikerer at NKT-cellene inneholder stort sett Ly49i5, og ikke Ly49s5.

NKG2/CD94 reseptorer er tidligere vist på  $\alpha\beta$ NKT og  $\gamma\delta$ NKT-celler i mus.(67;68) NKG2 er også beskrevet på T-celler. Uttrykk av den hemmende reseptoren NKG2A var negativt for begge NKT-

cellepopulasjonene på mRNA-nivå. Det finnes ingen antistoff som spesifikt merker enkeltmedlemmer av NKG2/CD94-familien i rotte. I stedet merker antistoffet Wen28 både NKG2A, NKG2C og NKG2E. På proteinnivå, fikk vi svak merking med Wen28-antistoffet på  $\gamma\delta$ NKT- og  $\gamma\delta$ T-celler, mens  $\alpha\beta$ NKT-celler hadde noe sterkere merking. Vi kan derfor spekulere i at det er en aktiverende NKG2-reseptor som merkes med antistoffet, siden NKT-cellene er negative for NKG2A på mRNA-nivå.

NKp46 regnes for å være en spesifikk NK-cellemarkør.(25;26) Vi fant likevel NKp46 uttrykt på  $\gamma\delta$ T-celler på mRNA og proteinnivå, samt et svakt uttrykk på  $\gamma\delta$ NKT-celler på proteinnivå. Uttrykk på proteinnivå i  $\gamma\delta$ NKT-celler er tidligere vist i mus, og Rolf *et al* viste nylig et svakt uttrykk av NKp46 på  $\alpha\beta$ NKT-celler. Vi har også fått et svakt uttrykk på mRNA nivå for CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta$ T-celler. Vi ønsker å etterprøve dataene våre før vi konkluderer om NKp46 kan uttrykkes av andre lymfocytgrupper i rotte.

KLHR1 antas å være en hemmende reseptor. Vi finner reseptoren uttrykt på proteinnivå på begge NKT-cellepopulasjonene. Våre resultater for NK- og NKT-celler sammenfaller med tidligere funn. (69) Funksjonen til KLRH1 er foreløpig ukjent.

## 4.2 Kjemokinreseptorer på $\alpha\beta$ NKT- og $\gamma\delta$ NKT-celler i rotte

Studier i mus og menneske har vist at klassiske NKT-celler viser et høyt uttrykk av inflammatoriske kjemokinreseptorer, og at de uttrykker et mønster som indikerer at de beveger seg til inflammatorisk vev.(36;64;70) Våre studier i rotte viser også uttrykk av inflammatoriske reseptorer på mRNA nivå. CCR2, CCR6 (også homeostatisk) og CCR5 uttrykkes på både  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler. Disse reseptorene indikerer en mulighet til å vandre til et sted med en pågående inflammasjon. CXCR3 har samme funksjon. Vi fant ikke uttrykk på mRNA nivå på NKT-cellene i vårt studie, men cellene viser et svakt uttrykk på proteinnivå. Dette uttrykket er sterkere på  $\gamma\delta$ NKT-celler enn på  $\alpha\beta$ NKT-celler. Den inflammatoriske reseptoren CX<sub>3</sub>CR1 uttrykkes lavt på begge NKT-populasjonene på proteinnivå, og uttrykkes kun på  $\alpha\beta$ NKT-celler på mRNA nivå. CCR1, som også er en inflammatoriske reseptorer, uttrykkes ikke.

CXCR4 er en homeostatisk reseptor som uttrykkes på de fleste cellene i immunforsvaret. Våre data stemmer med dette, den uttrykkes sterkt av alle populasjonene på mRNA-nivå og også til en viss grad på proteinnivå. CXCR5 påvirker vandring mot lymfeknutefollikler, og uttrykkes hovedsakelig på B-celler og en undergruppe av CD4<sup>+</sup> T-celler som vandrer mot folliklene. CXCR5 uttrykkes ikke på  $\alpha\beta$ NKT-celler, men på  $\gamma\delta$ NKT-celler. Studier i menneske har vist et lavt uttrykk av CXCR5 på  $\alpha\beta$ NKT-celler. Betydningen av uttrykk av CXCR5 på  $\gamma\delta$ NKT-celler i rotte er foreløpig ukjent. CCR4 har både inflammatorisk og homeostatisk funksjon, og uttrykkes på begge NKT-populasjoner på

mRNA-nivå. Reseptoren er implisert i lymfocytters tiltrekning mot hud. CCR7 er en reseptor som medvirker til lymfocyttenes vandring fra blod til lymfeknuter. Denne er svakt uttrykt på begge NKT-cellepopulasjonene, sammenlignet med CD4<sup>+</sup> T-celler. Selv om NKT-cellene vil ha mulighet til å vandre til lymfeknuter, hvor de også finnes, kan det virke som at et mønster av inflammatoriske kjemokinresptorer er mer dominerende.

CCR9 er antatt å være viktig for leukocytters vandring til tarm, og mRNA uttrykkes på begge populasjonene av NKT-celler. På proteinnivå viser  $\gamma\delta$ NKT-cellene et mye høyere uttrykk enn  $\alpha\beta$ NKT-celler, noe som sammenfaller med uttrykk av CCR9 på  $\gamma\delta$ T-celler. Dette bygger opp under antagelsen om at celler med  $\gamma\delta$ TCR er spesielt konsentrert i tarm.

### 4.3 Metodiske betraktninger

#### 4.3.1 Arbeidet med RT-PCR

Relevante kontroller bør være med i ethvert eksperiment som utføres i laboratoriet. Alle PCR-reaksjonene i våre studier har cDNA som templat, og det er viktig å benytte tilnærmet lik mengde cDNA til PCR hvis man skal sammenligne PCR-uttrykk i flere cDNA-preparasjoner. Kontrollgener bør være gener som uttrykkes konstitutivt og på tilnærmet samme nivå i de ulike cellepopulasjonene. De bør heller ikke uttrykkes på et mye høyere nivå enn gensekvensene som undersøkes. Hvis vi lager fortynningsrekker ut fra høyt uttrykte kontrollgener, kan vi komme under deteksjonsgrensen for gensekvensene i eksperimentet, og dermed få falske negative svar.  $\beta$ -aktin og Glyceraldehydfosfat dehydrogenase (GAPDH) er eksempler på gener med et slikt høyt uttrykk. De har vært mye brukt som kontrollgener, men er mye høyere uttrykt enn de fleste andre gener.(71)

Vi kontrollerte cDNA med spesifikk primer for CD45 og sammenlignet uttrykket av CD45 på de ulike populasjonene. Med det som utgangspunkt ble det gjort ti-folds fortynninger slik at vi kunne gjøre en semikvantitativ vurdering av de ulike PCR-produktene. Bruk av CD45 er erfaringsmessig en god metode for å kontrollere lik mengde av cDNA. CD45 uttrykkes på alle hematopoetiske celler. Selv om ulike celletyper kan uttrykke ulike isoformer av CD45, binder primeren for CD45 som brukes i vårt oppsett til alle isoformer av CD45. Analyser med flowcytometri har også vist at CD45 uttrykkes like sterkt på ulike lymfocytter, og er dermed en god kontroll i vårt oppsett. (72)

CD8<sup>+</sup> og CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ T-celler viste et overraskende svakt uttrykk av de ulike reseptorene. Fortynninger av cDNA ble gjort ut i fra PCR med primer for CD45, men PCR-oppsettet ble gjort på et annet tidspunkt

enn for de andre cDNA-preparasjonene. Selv om mengden av CD45 ser sammenlignbar ut, kan vi ikke utelukke at fortyningen likevel er under deteksjonsgrensen for noen reseptorer.

### ***4.3.2 Positive og negative kontroller for PCR og flowcytometri***

Som positiv kontroll for NK-reseptorene hadde vi for RT-PCR med cDNA fra NK-celler. Uttrykket vi fant sammenfaller med det som tidligere er publisert. Unntaket er NKR-P1F og NKR-P1G som ikke er publisert enda, men som er detektert på NK-celler.(73) Våre data viser omtrent samme grad av merking av NK-celler som tidligere publisert. Merkingen med STOK2 og Fly5 er noe lavere enn forventet, men fortsatt godt detekterbart. Siden T-celler er rapportert å uttrykke NK-reseptorer i liten grad, benyttet vi cDNA fra disse cellene som negativ kontroll.(26;57-59;59;69) Både  $\alpha\beta$ T- og  $\gamma\delta$ T-celler ble tatt med i studiet, for direkte å kunne sammenligne med  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$  NKT-celler. Som forventet var T-cellene negative for de fleste NK-reseptorene på både mRNA-nivå og proteinnivå, med unntak av reseptorene som er diskutert ovenfor.

Uttrykket av kjemokinreseptorer er studert både på T-celler og NK-celler i mus og menneske. Begge populasjonene var derfor med som kontroller.(61;62;67) NK-cellene er positive for alle reseptorer på mRNA nivå unntatt CCR1. Det er vist tidligere at CCR1 uttrykkes svakt på humane NK-celler. Alle cellepopulasjonene viser et generelt lavt uttrykk av kjemokinreseptorer på proteinnivå. Vi har jobbet med hvilende celler, og siden inflammatoriske kjemokinreseptorer vil oppreguleres ved stimulering var ikke dette uventet. Et potensielt problem er at antistoffene mot CCR5, CCR6, CCR9, CXCR3, CXCR4 er rotte anti-mus mAb. Sannsynligvis er det valgt en epitope som er mest ulik rotte for å få spesifikk reaksjon mot mus, og det kan medføre at de binder dårlig til rotte kjemokinreseptorer. En test av geit anti-mus CXCR3 antistoff med kjent kryssreaktivitet for rotte merket like svakt som antistoffet vi benyttet (data ikke vist), og vi mener derfor at uttrykket vi fant er tilnærmet reelt.

Antistoffene mot CX<sub>3</sub>CR1 og CCR2 er begge polyklonale geit anti-mus antistoff med kryssreaktivitet mot rotte. Dessverre finnes det ingen kommersielt tilgjengelige antistoff mot rotte kjemokinreseptorer. Vi mener likevel at alle antistoffene vi har testet reagerer til en viss grad med rotte kjemokinreseptorer. For å kunne påvise antistoffenes reaktivitet mot rotte kjemokinreseptorer burde vi gjort en test mot cellelinjer med uttrykk av ulike rotte kjemokinreseptorene. Dette er testet for CXCR3 og CXCR4, og begge antistoff benyttet i denne oppgaven viste reaktivitet mot celler med rotte CXCR3 og rotte CXCR4 (data ikke vist). Anti-CCR2 ble også testet i ettertid mot IL-2 aktiverte NK-celler, og viste et høyere uttrykk enn på de hvilende miltcellene benyttet i denne oppgaven (data ikke vist). Innen for tidsrammen for denne oppgaven var det ikke mulig å få testet spesifisiteten av de andre antistoffene.

## 4.4 Funksjon

Våre studier viser at  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler stort sett viser et sammenfallende uttrykk av NK-reseptorer.  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler viser også nokså sammenfallende uttrykk av kjemokinreseptorer på mRNA nivå, men på proteinnivå er forskjellene større. De største forskjellene ser vi for CCR9, CXCR3 og CXCR4. En interessant observasjon er at for disse kjemokinreseptorene ser vi større likhet mellom  $\gamma\delta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ T-celler. Som nevnt ovenfor er CCR9 involvert i lymfocytters vandring til tarm. Mens konvensjonelle  $\alpha\beta$ T-celler hovedsakelig er tilstede i sekundært lymfoid vev, med få  $\gamma\delta$ T-celler tilstede, er det relativt flere  $\gamma\delta$ T-celler tilstede i epitelvev i hud, tarm, tunge og lunger hvor de spiller en rolle i førstelinjeforsvaret.(74) På bakgrunn av sammenfallende nivå av kjemokinreseptorer mellom  $\gamma\delta$ T- og  $\gamma\delta$ NKT-celler kan vi spekulere i en sammenheng mellom disse cellenes funksjon. NKT-celler er vist å spille en rolle for å opprettholde likevekt i tarmslimhinnen, men det er også vist at de spiller en rolle ved inflammatorisk tarmsykdom. Vi kan anta at dette har en sammenheng med uttrykket av CXCR4 og CXCR3.(22)

$\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler er sammenlignet i mus tidligere, hvor det er funnet at  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler utvikles på samme måte, og viser sammenfallende vevslokalisasjon og reseptoruttrykk. Våre studier viser stort sett det samme, men i tillegg viser vi en sammenheng mellom  $\gamma\delta$ T- og  $\gamma\delta$ NKT-celler. En naturlig vei videre vil være å gjøre en vevsdistribusjonsanalyse av  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler i rotte, for å underbygge våre funn om kjemokinreseptoruttrykk.

Det er ikke tidligere studert hvorvidt rotte NKT-celler kan ha cytotoxisk kapasitet, men tilstedeværelse av en rekke NK-reseptorer på både  $\alpha\beta$ NKT- og  $\gamma\delta$ NKT-celler kan tyde på at de har funksjonelle likheter med NK-celler. Spesielt interessant er dataene som antyder at NKT-celler kan uttrykke aktiverende reseptorer. Man kan også spekulere om stimulering gjennom NK-reseptorer fører til produksjon av IFN- $\gamma$ , mens TCR-stimulering er ansvarlig for IL-4 produksjonen. Dette er studier som er planlagt i fremtiden.

## 4.5 Konklusjon

Vi viser her at  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler uttrykker en rekke ulike NK-reseptorer, både aktiverende og hemmende varianter. Uttrykket av NK-reseptorer er stort sett sammenfallende for begge NKT-populasjonene. Det er også likheter i uttrykk av inflammatoriske kjemokinreseptorer på  $\alpha\beta$ NKT-celler og  $\gamma\delta$ NKT-celler på mRNA-nivå. Proteinuttrykket var lavt for de fleste kjemokinreseptorene, men det er en klar tendens til at  $\gamma\delta$ NKT-celler har større likheter med  $\gamma\delta$ T-celler enn med  $\alpha\beta$ NKT-celler, spesielt med tanke på CCR9, CXCR3 og CXCR4.



## 5 Referanser

- (1) Lea T. Basal og klinisk Immunologi, prinsipper og molekylære mekanismer. Bergen: 2000.
- (2) Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. IMMUNOBIOLOGY; the immune system in health and disease. 6th ed. New York: Garland Science Publishing; 2005.
- (3) T-cellereseptor. Western Kentucky University, Biology 2009 April 20 Available from: URL: [www.alltheweb.com](http://www.alltheweb.com)
- (4) Yrlid U, Petersson E, Dohlsten M, Hedlund G. TCR alpha beta+ anti-tumor cytolytic T lymphocytes express NKR-P1 while the anti-tumor activity of TCR gamma delta+ T lymphocytes is not correlated to NKR-P1 expression. Cell Immunol 1996 Nov 1;173(2):287-94.
- (5) MacDonald HR. NKT cells: In the beginning.. Eur J Immunol 2007 Nov;37 Suppl 1:S111-S115.
- (6) Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van KL. NKT cells: what's in a name? Nat Rev Immunol 2004 Mar;4(3):231-7.
- (7) Mercer JC, Ragin MJ, August A. Natural killer T cells: rapid responders controlling immunity and disease. Int J Biochem Cell Biol 2005 Jul;37(7):1337-43.
- (8) Lees RK, Ferrero I, MacDonald HR. Tissue-specific segregation of TCR gamma delta+ NKT cells according to phenotype TCR repertoire and activation status: parallels with TCR alphabeta+NKT cells. Eur J Immunol 2001 Oct;31(10):2901-9.
- (9) Wu L, Van KL. Natural killer T cells and autoimmune disease. Curr Mol Med 2009 Feb;9(1):4-14.
- (10) Kveberg, Lise. Molecular and functional studies of NK cell receptors. Doktoravhandling . 2005. 5-9-0008.  
Ref Type: Journal (Full)
- (11) Van KL. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. Curr Opin Immunol 2007 Jun;19(3):354-64.
- (12) Matsuura A, Kinebuchi M, Chen HZ, Katabami S, Shimizu T, Hashimoto Y, et al. NKT cells in the rat: organ-specific distribution of NK T cells expressing distinct V alpha 14 chains. J Immunol 2000 Mar 15;164(6):3140-8.
- (13) Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Berberich I, Cardell S, et al. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. J Immunol 2006 Jun 15;176(12):7447-55.
- (14) Brutkiewicz RR. CD1d ligands: the good, the bad, and the ugly. J Immunol 2006 Jul 15;177(2):769-75.
- (15) Godfrey DI, Berzins SP. Control points in NKT-cell development. Nat Rev Immunol 2007 Jul;7(7):505-18.

- (16) Kinjo Y, Kronenberg M. V alpha14 i NKT cells are innate lymphocytes that participate in the immune response to diverse microbes. *J Clin Immunol* 2005 Nov;25(6):522-33.
- (17) Vicari AP, Mocci S, Openshaw P, O'Garra A, Zlotnik A. Mouse gamma delta TCR+NK1.1+ thymocytes specifically produce interleukin-4, are major histocompatibility complex class I independent, and are developmentally related to alpha beta TCR+NK1.1+ thymocytes. *Eur J Immunol* 1996 Jul;26(7):1424-9.
- (18) Crowley MP, Fahrner AM, Baumgarth N, Hampl J, Gutgemann I, Teyton L, et al. A population of murine gammadelta T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule. *Science* 2000 Jan 14;287(5451):314-6.
- (19) Perez-Cano FJ, Castellote C, Marin-Gallen S, Gonzalez-Castro A, Franch A, Castell M. Phenotypic and functional characteristics of rat spleen lymphocytes during suckling. *Dev Comp Immunol* 2007;31(12):1264-77.
- (20) Knudsen E, Seierstad T, Vaage JT, Naper C, Benestad HB, Rolstad B, et al. Cloning, functional activities and in vivo tissue distribution of rat NKR-P1+ TCR alpha beta + cells. *Int Immunol* 1997 Jul;9(7):1043-51.
- (21) Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:297-336.
- (22) van Dieren JM, van der Woude CJ, Kuipers EJ, Escher JC, Samsom JN, Blumberg RS, et al. Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2007 Sep;13(9):1146-52.
- (23) Terabe M, Berzofsky JA. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2004 Apr;16(2):157-62.
- (24) Teng MW, Yue S, Sharkey J, Exley MA, Smyth MJ. CD1d activation and blockade: a new antitumor strategy. *J Immunol* 2009 Mar 15;182(6):3366-71.
- (25) Storset AK, Kulberg S, Berg I, Boysen P, Hope JC, Dissen E. NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. *Eur J Immunol* 2004 Mar;34(3):669-76.
- (26) Westgaard IH, Berg SF, Vaage JT, Wang LL, Yokoyama WM, Dissen E, et al. Rat NKp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with FcepsilonRIgamma and CD3zeta. *J Leukoc Biol* 2004 Dec;76(6):1200-6.
- (27) Mandelboim O, Porgador A. NKp46. *Int J Biochem Cell Biol* 2001 Dec;33(12):1147-50.
- (28) Merck E, Voyle RB, MacDonald HR. Ly49D engagement on T lymphocytes induces TCR-independent activation and CD8 effector functions that control tumor growth. *J Immunol* 2009 Jan 1;182(1):183-92.
- (29) Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001;19:291-330.
- (30) Ortaldo JR, Winkler-Pickett R, Mason AT, Mason LH. The Ly-49 family: regulation of cytotoxicity and cytokine production in murine CD3+ cells. *J Immunol* 1998 Feb 1;160(3):1158-65.
- (31) Uhrberg M, Valiante NM, Young NT, Lanier LL, Phillips JH, Parham P. The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical

- alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol* 2001 Mar 15;166(6):3923-32.
- (32) Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Baltar JM, Ortega F, Lopez-Larrea C. Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: new target for immunointervention. *Am J Transplant* 2009 Feb;9(2):251-7.
- (33) Ogasawara K, Lanier LL. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol* 2005 Nov;25(6):534-40.
- (34) Lau P, Lorenzi R, Joly E. Comparison of RT-BM1 sequences from six different rat major histocompatibility complex haplotypes reveals limited variation, and alternate splicing in the 3' untranslated region. *Immunogenetics* 2000 Feb;51(2):148-53.
- (35) Inngjerdingen, Marit. Chemokine Receptors in NK Cells. Doktoravhandling . 2001. 5-9-0008. Ref Type: Journal (Full)
- (36) Thomas SY, Hou R, Boyson JE, Means TK, Hess C, Olson DP, et al. CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *J Immunol* 2003 Sep 1;171(5):2571-80.
- (37) Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004 Feb;25(2):75-84.
- (38) Landbruks og matdepartementet. Forskrift om forsøk med dyr. 2004. Ref Type: Generic
- (39) Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:7.
- (40) Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Adv Exp Med Biol* 1985;186:409-19.
- (41) Hunt SV, Fowler MH. A repopulation assay for B and T lymphocyte stem cells employing radiation chimaeras. *Cell Tissue Kinet* 1981 Jul;14(4):445-64.
- (42) McCall MN, Shotton DM, Barclay AN. Expression of soluble isoforms of rat CD45. Analysis by electron microscopy and use in epitope mapping of anti-CD45R monoclonal antibodies. *Immunology* 1992 Jun;76(2):310-7.
- (43) Eisen SA, Wedner HJ, Parker CW. Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. *Immunol Commun* 1972;1(6):571-7.
- (44) Flowcytometri. Center of Flow Cytometri Praha Tsjeckia 2008 [cited 2008 Oct 22]; Available from: URL: [www.cytometry.cz/en/services/flow-cytometry.html](http://www.cytometry.cz/en/services/flow-cytometry.html)
- (45) BD, Biosciences. BD FACSCaliburSystem. 2008. 22-10-2008. Ref Type: Pamphlet
- (46) BD, Biosciences. BD FACS Aria Cell Sorter. 2008. Ref Type: Pamphlet
- (47) Hunig T, Wallny HJ, Hartley JK, Lawetzky A, Tiefenthaler G. A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation.

- Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J Exp Med* 1989 Jan 1;169(1):73-86.
- (48) Kuhnlein P, Park JH, Herrmann T, Elbe A, Hunig T. Identification and characterization of rat gamma/delta T lymphocytes in peripheral lymphoid organs, small intestine, and skin with a monoclonal antibody to a constant determinant of the gamma/delta T cell receptor. *J Immunol* 1994 Aug 1;153(3):979-86.
- (49) Torres-Nagel N, Kraus E, Brown MH, Tiefenthaler G, Mitnacht R, Williams AF, et al. Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur J Immunol* 1992 Nov;22(11):2841-8.
- (50) Chambers WH, Vujanovic NL, DeLeo AB, Olszowy MW, Herberman RB, Hiserodt JC. Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J Exp Med* 1989 Apr 1;169(4):1373-89.
- (51) Brideau RJ, Carter PB, McMaster WR, Mason DW, Williams AF. Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1980 Aug;10(8):609-15.
- (52) White RA, Mason DW, Williams AF, Galfre G, Milstein C. T-lymphocyte heterogeneity in the rat: separation of functional subpopulations using a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1978 Sep 1;148(3):664-73.
- (53) Sjøberg Nils Olav. Genetikk på Internett. Høgskolen i Oslo 2009 January 5 Available from: URL: [www.home.hio.no](http://www.home.hio.no)
- (54) Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 2008;3(9):1452-6.
- (55) Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991 Jul 25;19(14):4008.
- (56) Kveberg L, Back CJ, Dai KZ, Inngjerdningen M, Rolstad B, Ryan JC, et al. The novel inhibitory NKR-P1C receptor and Ly49s3 identify two complementary, functionally distinct NK cell subsets in rats. *J Immunol* 2006 Apr 1;176(7):4133-40.
- (57) Kveberg L, Dai KZ, Dissen E, Ryan JC, Rolstad B, Vaage JT, et al. Strain-dependent expression of four structurally related rat Ly49 receptors; correlation with NK gene complex haplotype and NK alloreactivity. *Immunogenetics* 2006 Nov;58(11):905-16.
- (58) Naper C, Hayashi S, Joly E, Butcher GW, Rolstad B, Vaage JT, et al. Ly49i2 is an inhibitory rat natural killer cell receptor for an MHC class Ia molecule (RT1-A1c). *Eur J Immunol* 2002 Jul;32(7):2031-6.
- (59) Naper C, Dai KZ, Kveberg L, Rolstad B, Niemi EC, Vaage JT, et al. Two structurally related rat Ly49 receptors with opposing functions (Ly49 stimulatory receptor 5 and Ly49 inhibitory receptor 5) recognize nonclassical MHC class Ib-encoded target ligands. *J Immunol* 2005 Mar 1;174(5):2702-11.
- (60) Sæther PC. 2009.  
Ref Type: Unpublished Work
- (61) Inngjerdningen M, Damaj B, Maghazachi AA. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 2001 Jan 15;97(2):367-75.

- (62) Campbell DJ, Debes GF, Johnston B, Wilson E, Butcher EC. Targeting T cell responses by selective chemokine receptor expression. *Semin Immunol* 2003 Oct;15(5):277-86.
- (63) Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *J Immunol* 2006 Dec 1;177(11):7833-40.
- (64) Kim CH, Johnston B, Butcher EC. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 2002 Jul 1;100(1):11-6.
- (65) Inngjerdingen Marit. 4-5-2009.  
Ref Type: Personal Communication
- (66) Kveberg Lise. 30-4-2009.  
Ref Type: Personal Communication
- (67) Rolf J, Berntman E, Stenstrom M, Smith EM, Mansson R, Stenstad H, et al. Molecular profiling reveals distinct functional attributes of CD1d-restricted natural killer (NK) T cell subsets. *Mol Immunol* 2008 May;45(9):2607-20.
- (68) Stewart CA, Walzer T, Robbins SH, Malissen B, Vivier E, Prinz I. Germ-line and rearranged Tcrd transcription distinguish bona fide NK cells and NK-like gammadelta T cells. *Eur J Immunol* 2007 Jun;37(6):1442-52.
- (69) Naper C, Hayashi S, Lovik G, Kveberg L, Niemi EC, Rolstad B, et al. Characterization of a novel killer cell lectin-like receptor (KLRH1) expressed by alloreactive rat NK cells. *J Immunol* 2002 May 15;168(10):5147-54.
- (70) Johnston B, Kim CH, Soler D, Emoto M, Butcher EC. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. *J Immunol* 2003 Sep 15;171(6):2960-9.
- (71) Lion T. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia* 2001 Jul;15(7):1033-7.
- (72) Dai, Ke-Zheng. 30-5-2009.  
Ref Type: Personal Communication
- (73) Kveberg Lise. 2009.  
Ref Type: Unpublished Work
- (74) Xiong N, Raulet DH. Development and selection of gammadelta T cells. *Immunol Rev* 2007 Feb;215:15-31.

## **6 Appendix A**

### **6.1 Bruk av dyr i medisinsk forskning**

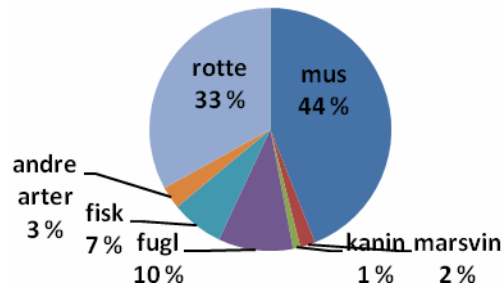
#### **6.1.1 Bakgrunn**

Anvendelse av dyr i medisinsk forskning er et stadig tilbakevendende diskusjonstema. De etiske aspektene ved dette er jevnlig oppe til debatt, og man har gjennom historien sett behov for et lovverk som sikrer at dyr som nyttes til forskning behandles forsvarlig og ikke utsettes for unødige lidelser. Helt fram til det 17. århundre utførte man dyreforsøk uten å ha noen særlig etiske betenkeligheter. Bruk av dyr til eksperimentell forskning har fulgt den medisinske utvikling siden Hippokrates i antikkens Hellas. Hippokrates (ca. 460- 377 f.Kr.) samlet sin kunnskap i Corpus Hippocraticum. Kunnskapen hadde han hovedsakelig tilegnet seg ved disseksjon av dyr.(1) Gjennom Middelalderen (ca.400-1400 e. Kr.) utviklet det seg en tro på at mennesker kunne ha noe til felles med dyr. Den franske filosofen René Descartes (1596-1650) mente at forskjellen på dyr og mennesker var at mennesket kunne tenke, og at dette var en absolutt nødvendighet for at man skulle kunne føle smerte. Dyr lignet mer på maskiner. Charles Darwin (1809-1882) kom i 1859 med boken ”Artenes opprinnelse gjennom det naturlige utvalg”. Han viste biologiske likheter mellom dyrearter og mennesket. Dette, kombinert med oppdagelsen av anesthesiologi på midten av 1800-tallet, førte til en økende interesse for medisinske forsøk med dyr.

På slutten av 1800-tallet begynte man å etablere laboratorier for biomedisinsk forskning. Privat industri, offentlige institusjoner og universiteter etablerte samarbeid. Forskningen fortsatte å øke inn i det 20. århundre. Vi ser nå en rask utvikling i ulike forskningsområder som farmakologi, immunologi, nevrologi og genteknologi. Dette faller sammen med et økt behov for antall forsøksdyr. Dagens lovverk skal sikre at de får forsvarlig behandling.

Frosk har vært et viktig forsøksdyr opp gjennom historien, men i dag er det mest rotter og mus som benyttes. Fordelingen i Figur A er fra 2004.

## Fordeling av forsøksdyr



**Figur A.** Figuren viser fordeling av ulike dyrearter som brukes i forskning. Dataene er fra 2004.(1)

Den første loven som beskyttet laboratoriedyr ble vedtatt i Storbritannia i 1876. Med loven kom et krav om at alle som ønsket å utføre eksperimenter på dyr måtte søke lisens. Senere har lignende lover trådt i kraft i andre land. I Norge gjelder i dag ” Lov om dyrevern” fra 1974 og ”Forskrift om forsøk med dyr” fra 1996.

Lov om dyrevern omfatter allmenn adferd med dyr.(2) Virkeområdet for Forskrift om forsøk med dyr er spesifikt rettet mot dyr som skal nyttes til forskning.(3) Hele forskriften skal ikke siteres her, bortsett fra lovens formål og hva den omfatter. I tillegg nevnes enkelte paragrafer som har hatt betydning for arbeidet med denne oppgaven.

**§1. Formål** *Formålet med forskriften er å sikre at dyr som omfattes av denne forskriften får forsvarlig behandling og ikke utsettes for unødig smerte og lidelse.*

**§2. Virkeområde** *Forskriften omfatter forsøk med dyr, samt avl, oppdrett og hold av dyr som skal benyttes i forsøk.*

*Forskriften gjelder selv om det benyttes beroligende, bedøvende eller smertestillende midler i forsøket, herunder forsøk som utføres på totalanestesert dyr som avlives mens det fortsatt er bevisstløst.*

*Kommentar:* I arbeidet med denne oppgaven er det ikke gjort forsøk på dyr, men vi har avlivet rotter for uttak av milt. Miltcellene er brukt i forsøk. Disse dyrene er avlet i dyrestallen på Institutt for Medisinske Basalfag, Universitetet i Oslo. Dyrestallen tilfredstiller kravene i Forskrift om forsøk med dyr.

**§13 , første ledd** krever at *personer som planlegger eller utfører forsøk, skal ha gjennomgått opplæring etter opplegg godkjent av Mattilsynet.*

*Kommentar:* Jeg har ikke slik opplæring, og alt direkte arbeid med forsøksdyr har foregått sammen med min veileder som har godkjent opplæring fra Veterinærhøgskolen.

I §13, fjerde ledd står det: *For dyr i forsøksavdelinger skal det føres kort for hvert bur med dyr som benyttes i forsøk. Kortet skal angi forskerens navn, ankomstdato for dyret, dato for forsøkets start og løpende registrering av alle inngrep.*

Et eksempel på et slikt kort er vist i Figur B.

		ROTTE		Prosjekt nr. Vit. 02.02
				Ordrenr. BR0037
Kjønn ♀	Stamme DVG-RT7 <sup>b</sup> (78x1)	Alder v/ ank. 2.6.6.08	Antall 3	
Avd./inst. ANATOMISK		Vekt v/ank.	Ankomst dato 1/2/08	
<b>BRUKER</b> BOLSTADDISSEN	Tlf. 51212		Forventet oppst. tid 1/11/08	
<del>BOOKED</del> (SF) ————— MARIT				

**Figur B.** Figuren viser et eksempel på kort som alle bur i dyrestallen er merket med. Som forskriften krever viser kortet forskerens navn og ankomstdato for dyret. I tillegg viser kortet dyrets rasetilhørighet, kjønn og fødselsdato. Øverst i høyre hjørne vises prosjektnummer for våre godkjente *in vitro* forsøk. Etter siste godkjenning er prosjektnummer nå endret til Vit.09.1512.

§16 omhandler avliving av forsøksdyr. I paragrafen står det at avliving av forsøksdyr skal utføres slik at dyret ikke påføres unødig lidelse. Vi bruker CO<sub>2</sub>- gass for å avlive rottene. Ved dyreavdelingen ved Institutt for Medisinske Basalfag er det utviklet en metode hvor rottene først får CO<sub>2</sub> i en lav dose til de har sovnet inn. Så økes dosen maksimalt og dyret dør. Rottene viser få tegn til ubehag gjennom prosessen. Tillatelse til denne type forsøk gis av ansvarshavende ved dyreavdelingen jfr. §7 i Forskrift om forsøk med dyr.

### 6.1.2 Ethiske betraktninger

Etikk: *Læren om de normer og verdier som skal styre våre handlinger med sikte på rett og galt, godt og ondt.* (caplex.no)

Etisk: Moralsk, sedelig, riktig handlemåte.

Hva som er rett og galt i forhold til bruk av dyr i medisinsk forskning er det nok stor uenighet om. Riktig handlemåte i forhold til dyrene reguleres av lovverket. Vi har et formål med å bruke dyr i



eksperimentelle forsøk. Vi ønsker å øke vår kunnskap om ulike medisinske problemstillinger for deretter å benytte denne kunnskapen til å kunne gi pasienter med ulike sykdommer bedre og mer målrettet behandling. Man må gjøre nøye vurderinger i forkant av hvert forsøk slik at man ikke bruker flere dyr enn nødvendig eller at dyrene ikke blir påført mer lidelse enn nødvendig.

W.M.S. Russell og R.L. Burch introduserte i 1959 prinsippene om de tre R-ene.(4) Det la grunnlaget for lovverkene som omhandler bruk av forsøksdyr i en rekke land. De tre R-ene er nå rettleidende for alt praktisk arbeid med forsøksdyr.

- **Reduction** - redusere antall forsøksdyr
- **Refinement** - forbedre, raffinere forsøksmetoden, samt søke å redusere ubehag for dyrene
- **Replacement** - søke å erstatte *in vivo* forsøk med dyr med *in vitro* forsøk

Russell og Burch sin publikasjon, "The Principles of Humane Experimental Technique" hadde sitt utspring i et prosjekt initiert i 1954 av UFAW (Universities Federation for Animal Welfare).(5) UFAW ble grunnlagt i 1926, og er en uavhengig organisasjon som arbeider for å forbedre velferden til dyr som blir brukt i forskning og undervisning. De tre R-er ble først presentert på et UFAW symposium i 1957.

I august 1999 ble kongressen, "3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences" avholdt i Bologna i Italia. I en avsluttende uttalelse fra denne kongressen står det blant annet: *Det eneste dyreforsøk som kan aksepteres er et forsøk som har blitt godkjent av en etisk komité, som bruker færrest mulig dyr og som forårsaker minst mulig lidelse i arbeidet med å oppnå vitenskapelige resultater.* Disse punktene ivaretas av lovverket i Norge.

Til tross for disse hensyn, - har vi mennesker rett til å bruke individer fra andre arter for å forbedre livet for vår egen art? Dette spørsmålet har ingen fasitsvar. Noen vil alltid mene at bruk av dyr i eksperimentell forskning er forkastelig i enhver sammenheng. Deres utgangspunkt er at dyr også har rett til å bli behandlet med respekt for sin egenart og sitt eget liv.

Jeg skal ikke påberope meg retten til å ha de riktige meningene om bruk av forsøksdyr, men jeg kan vanskelig forestille meg dagens biomedisinske forskning uten. Hvordan skal man for eksempel gjøre utprøving av enkelte behandlinger? Skal menneskene være forsøksdyrene? Ja, mener kanskje noen, siden det er vi som skal nyte godt av forbedrede behandlingsmetoder. Mitt inntrykk er at vi behandler våre forsøksdyr med respekt, og gjør det vi kan for ikke å påføre dem unødige smerter. Vi prøver også innad i forskningsgruppen å samarbeide om bruken av organene fra rottene. På den måten bruker vi færrest mulig dyr.

Ut fra mine normer og verdier kan jeg ikke si å ha betenkeligheter ved de forsøkene som er utført i arbeidet med denne oppgaven.

- (1) Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther* 2004 Oct;11 Suppl 1:S64-S66.
- (2) Landbruks og matdepartementet. Lov om dyrevern. Dyrevernloven. 2004 Sist endret[Lov 1974-12-20 nr 73: Lov om dyrevern], 1-6. 1-1-1977. Lovdata. 1-1-2004.  
Ref Type: Generic
- (3) Landbruks- og matdepartementet. Forskrift om forsøk med dyr. 2004 Sist endret[For-1996-01-15-23], 1-5. 1-2-1996. L.  
Ref Type: Generic
- (4) From 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in Life Sciences. The Three Rs Declaration of Bologna. [www.worldcongress.net/2002/worldcongress/bologna](http://www.worldcongress.net/2002/worldcongress/bologna) 2002:1-6.  
Available from: URL: [www.worldcongress.net/2002/worldcongress/bologna](http://www.worldcongress.net/2002/worldcongress/bologna)
- (5) Universities Federation of Animal Welfare. Science in the Service of Animal Welfare. [www.ufaw.org.uk](http://www.ufaw.org.uk) 2009 [cited 2009 Jan 3]; Available from: URL: [www.ufaw.org.uk](http://www.ufaw.org.uk)