

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Masteroppgave 2014
60 stp

Immunmodulerende effekter av
Methylococcus capsulatus (Bath) på THP-1
deriverte dendrittiske celler.

Immune Modulating Effects of
Methylococcus capsulatus (Bath) on THP-1
Derived Dendritic Cells.

Anne Flore Bakke

Forord

I denne oppgaven vil jeg presentere resultatene fra mitt arbeid på Laboratorium for molekylær cellebiologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Det har vært mange lange uker, men og en veldig lærerik og spennende tid.

Jeg vil takke Tor Lea for at jeg fikk mulighet til å være en del av gruppen det siste året, og for alle innspill under masteroppgaveskrivingen. En annen person som fortjener et stort takk er Charlotte Kleiveland, både for hjelp med den praktisk delen på laben, men også med oppgaveskrivingen. Andre personer som fortjener oppmerksomhet er Ellen Karlstrøm, Lars Fredrik Moen, Katarzyna Kuczkowska og Stine Indrelid. Takk for mye hjelp, og for et godt miljø på laben. Og tusen takk til Elin Ørmen ved Mikroskopi laboratoriet for alle de fine sveipeelektronmikroskopi bildene.

Det siste året har det blitt mange lange dager og helger på laben, og en som var der minst like mye som meg var Henriette Solberg. Takk til Henriette for å gjøre lab-hverdagen litt bedre! Det hadde ikke vært det samme uten deg.

Anne Flore Bakke

Sammendrag

Tidligere studier har vist at den ikke-kommensale jordbakterien *Methylococcus capsulatus* (Bath) har immunregulerende egenskaper ved å hemme DSS-indusert kolitt hos mus (Kleiveland et al., 2013). I tillegg har studier ved Laboratorium for molekylær cellebiologi, ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), vist at *M.capsulatus* (Bath) binder spesifikt til *in vitro* differensierte CD14⁺ monocytt-deriverte dendrittiske celler (ikke publisert data). Den humane monocyttleukemicellelinjen THP-1 ble differensiert til dendrittiske celler (THP-1 DC) som videre ble benyttet for å studere mulige immunmodulerende effekter av *M. Capsulatus* (Bath) på dendrittiske celler *in vitro*.

Det blir her vist at modne THP-1 DC etter ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath og Texas) fører til en økt ekspresjon av CD80, CD86 og CD83, og en økt proliferasjon hos humane T-celler i en blandet lymfocytkultur(MLC). Kvantitering av cytokiner viser at ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917 induserte ulik produksjon av cytokiner, både hos THP-1 DC og T-celler. Dette indikerer at bakteriene binder til THP-1 DC via ulike reseptorer, og dermed aktiverer ulike intracellulære signalveier. Utførte bindingsstudier viser også at *M. capsulatus* (Bath og Texas) binder til ulike strukturer, som er uttrykt på ulike tidspunkt, hos THP-1 DC. Ved bruk av væskestrømscytometrisk analyser ble det vist at de aktiverte humane T-cellene, stimulert til proliferasjon av modne THP-1 DC, kun uttrykker transkripsjonsfaktorene T-bet og Foxp3. Og at de aktiverte T-celler viste en nedgang i ekspresjon av T-bet, men en økt ekspresjon av Foxp3, sammenlignet med transkripsjonsfaktorer detektert hos ikke-aktiverte T-celler.

Resultatene viser at de tre bakteriestammene *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917 har ulike effekter på aktivering og modning av THP-1 DC og at dette har funksjonelle konsekvenser for deres evne til å indusere proliferasjon hos T-celler. Bindingsstudiene viser at bakteriene interagerer ulikt med THP-1 DC og dette er trolig årsaken til de forskjellene vi finner i egenskaper hos THP-1 DC. Resultatene i denne oppgaven viser at THP-1 fungerer som modellsystem for studier av immunmodulerende effekter hos umodne eller modne DC.

Abstract

Previous studies have shown that the noncommensal soil-bacterium *Methylococcus capsulatus* (Bath) has immune-regulatory properties by inhibiting DSS-induced colitis in mice (Kleiveland et al., 2013). The research group at the Laboratory of molecular cell biology, at the Norwegian university of life science (NMBU), has demonstrated that *Methylococcus capsulatus* (Bath) *in vitro* binds with high specificity to human CD14⁺ monocyte derived dendritic cells (unpublished data). The human monocyte leukemia cell line THP-1 was differentiated to dendritic cells (THP-1 DC) and was used to study the possible immune modulating effects of *M. capsulatus* (Bath) on dendritic cells *in vitro*.

Studies in this paper show that mature THP-1 DC co-cultivated with *M. capsulatus* (Bath) enhance the expression of CD80, CD86 and CD83, and increase the proliferation of human T-cells in a mixed lymphocyte culture (MLC). Quantification of cytokines shows that co-cultivating *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) and *E. coli* Nissle 1917 induce different cytokine production, in both THP-1 DC and T-cells. This indicates that the various bacteria bind through different receptors, hence activating different intracellular signalling pathways. Binding studies show that *M. capsulatus* (Bath and Texas) bind to different structures, which is expressed at different time point, on THP-1 DC. Flow cytometric analysis shows that the activated human T-cells, stimulated to proliferation by mature THP-1 DC, only expresses T-bet and Foxp3, and that the activated T-cells show a decreased expression of T-bet, but increased Foxp3 expression, compared to unstimulated T-cells.

The results in this paper show that the three bacterial strains *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) and *E. coli* Nissle 1917 has different effects on activation and maturation of THP-1 DC, and that this has functional consequences in their ability to induce proliferation in T-cells. Binding studies show that the bacteria interact with THP-1 DC in different ways, and that this probably causes the different properties of THP-1 DC. Results in this paper shows that THP-1 as a functioning model system for studies of immune modulating effects on immature or mature DCs.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Innholdsfortegnelse	V
1 Innledning	1
1.1 Tarm: oppbygging og immunforsvar	1
1.2 Inflammatorisk tarmsykdom (Inflammatory bowel disease, IBD)	3
1.3 Det medfødte og adaptive immunsystemet.....	4
1.4 Mikrobe-assosierte molekulære mønstre (Microbe-associated molecular patterns).....	5
1.5 Dendrittiske celler (DC).....	7
1.5.1 Intestinale dendrittiske celler.....	8
1.5.2 Overflatemarkører CD80, CD83 og CD86 hos DC.....	8
1.6 T-celler	9
1.6.1 Presentasjon av antigen til T-celler.....	9
1.6.2 Aktivering av T-celler	10
1.6.3 T-cellepopulasjoner	12
1.7 Cytokiner.....	13
1.7.1 Interleukin-2 (IL-2), IL-6, IL-10 og IL-12.	14
1.8 <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath og Texas) og <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917.....	15
1.9 Den humane monocytteleukemicellelinjen THP-1	16
1.9.1 Molekulære og funksjonelle egenskaper hos THP-1 deriverte dendrittiske celler (THP-1 DC)	17
1.10 Bakgrunn for oppgaven.....	18
2 Materialer	19
3 Metoder	19
3.1 Vekstmedium THP-1	19
3.1.1 Modifisert RPMI cellekultur medium	19
3.1.2 Differensieringsmedium til umodne THP-1 DC.	19
3.1.3 Differensieringsmedium modne THP-1 DC.....	19

3.2	Medium til dyrking av bakterier	19
3.2.1	LB-medium.....	19
3.2.2	Natrium mineralsaltløsning (NMS).....	20
3.3	Dyrking av bakterier	21
3.3.1	<i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath og Texas)	21
3.3.2	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917.....	21
3.4	Cellekultur THP-1	21
3.5	Differensiering av THP-1 deriverte dendrittiske celler (THP-1 DC)	21
3.5.1	Differensiering til modne THP-1 DC.....	21
3.5.2	Differensiering til umodne THP-1 DC.....	22
3.6	Isolering av mononukleære celler (MNC) fra buffy coat	22
3.7	Isolering av T-lymfocytter fra MNC.....	22
3.8	Blandet lymfocyttkultur (mixed leukocyte culture, MLC).....	22
3.8.1	MLC med modne THP-1 DC.....	23
3.8.2	MLC med umodne THP-1 DC.....	23
3.9	Deteksjon av overflatemarkører hos modne/umodne THP-1 DC.....	24
3.10	Kvantitering av cytokinene interleukin(IL)-2, IL-6,IL-10 og IL-12.....	24
3.11	Farging av intracellulære transkripsjonsfaktorer.....	25
3.12	Bindingsforsøk	26
3.12.1	Modne THP-1 DC	26
3.12.2	Umodne THP-1 DC.....	26
3.13	Fremføring til sveipelektronmikroskopi.....	26
3.14	Konstruksjon av <i>M.capsulatus</i> (Bath) Pile mutant.....	27
3.14.1	Konstrukt av plasmid pJQΔPile.....	27
3.14.2	Konjugering av pJQΔPile inn i <i>M.capsulatus</i> (Bath) ved triparental mating.....	29
4	Resultater	30
4.1	Ekspresjon av overflatemarkørene CD80, CD83 og CD86 hos modne og umodne THP-1 deriverte dendrittiske celler.....	30
4.2	Blandet leukocyttkultur (mixed leukocyte culture, MLC) med modne THP-1 DC.....	32
4.3	Blandet leukocyttkultur (mixed leukocyte culture, MLC) med umodne THP-1 DC.....	33
4.4	Cytokinproduksjon hos umodne/modne THP-1 DC.....	34
4.5	Ekspresjon av transkripsjonsfaktorer hos T-celler fra MLC med modne THP-1 DC.....	37
4.6	Cytokinproduksjon av IL-2 og IL-10 hos T-celler fra MLC	39

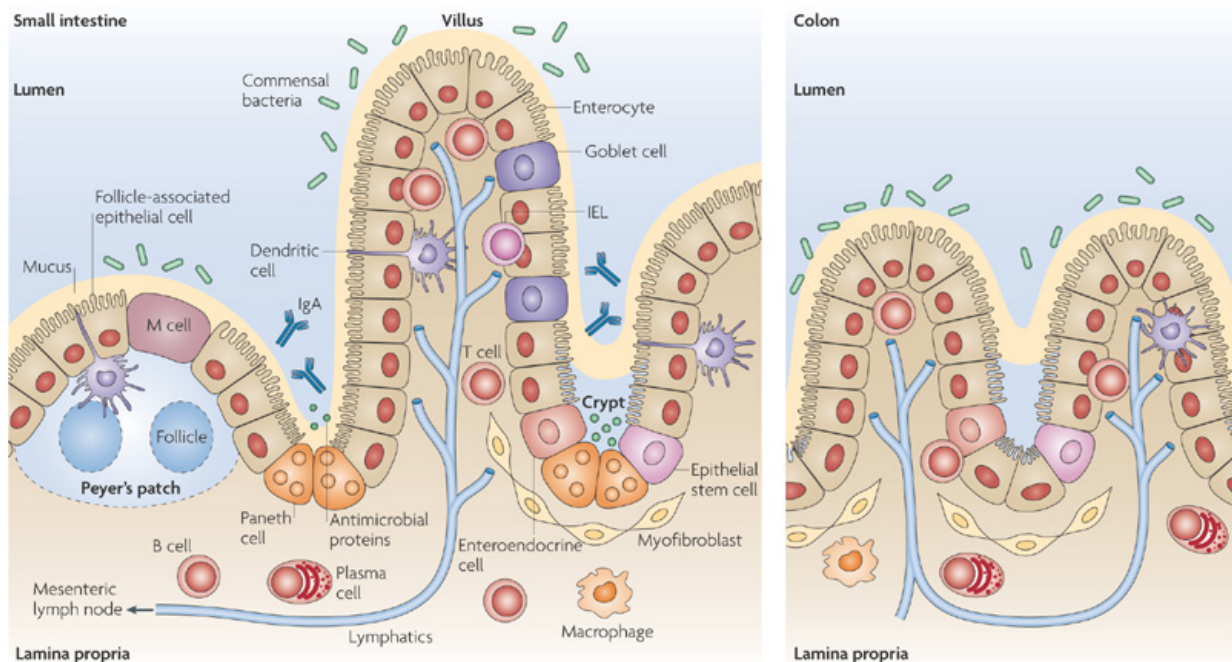
4.7	Resultat bindingsforsøk.....	41
4.7.1	Binding av <i>M. capsulatus</i> (Bath og Texas) og <i>E. coli</i> Nissle 1917 til modne THP-1 DC.....	41
4.7.2	Binding av <i>M. capsulatus</i> (Bath og Texas) og <i>E. coli</i> Nissle 1917 til umodne THP-1 DC.....	43
4.7.3	Morfologisk endring av modne THP-1 ko-kultivert med <i>E. coli</i> Nissle 1917.	46
4.8	Konstruksjon av <i>M. capsulatus</i> (Bath) Pile mutant.....	47
5	Diskusjon	48
5.1	THP-1 celler - Et modellsystem for <i>in vitro</i> studier av immunmodulerende effekter på dendrittiske celler.	48
5.2	Ekspresjon av overflatemarkørene CD80, CD83 og CD86 hos THP-1 DC	49
5.3	THP-1 DC som stimulatorcelle for humane T-celler i MLC	50
5.4	Cytokinproduksjon hos umodne og modne THP-1 DC	51
5.5	Ekspresjon av transkripsjonsfaktorer hos T-celler fra MLC med modne THP-1 DC	52
5.6	Cytokinproduksjon av IL-2 og IL-10 hos aktiverte humane T-celler	53
5.7	Bindingsforsøk	54
5.8	Konstruksjon av <i>M.capsulatus</i> (Bath) Pile mutant (Bath Δ Pile)	56
5.9	Konklusjon	57
6	Referanser	59
	Vedlegg I - Materialer	62

1 Innledning

1.1 Tarm: oppbygging og immunforsvar

Et enkelt lag av sylinderepitelceller skiller innholdet i tarmlumen fra det underliggende lamina propria (LP). Det intestinale epitelcellelaget har to viktige funksjoner; den fungerer som en barriere mellom innholdet i tarmlumen og LP, og som et selekterende filter som tillater overførsel av blant annet viktige næringsstoffer fra lumen til LP (Groschwitz & Hogan, 2009). Det intestinale epitelcellelaget utøver sin selektive permabilitet på to måter; transcellulær permabilitet (gjennom selve cellen) eller via paracellulære veier (i det intercellulære rommet mellom epitelcellene) (Groschwitz & Hogan, 2009). Overflaten av epitelcellelaget er dekket av et slimlag, kalt mukus. Mukus utgjør en barriere mot bakterier, da det inneholder blant annet antimikrobielle peptider (AMP) og immunoglobulin (IgA) sekretert av plasmaceller, som bidrar i bekjempelse av patogener og til regulering av tarmfloraen. AMP av både defensin-, cathelicidin- og histatinklassene finnes hos mennesker. I tillegg til sin antimikrobielle funksjon virker AMP som mediatorer i inflammatoriske responser, og utøver sin effekt på både epitelceller og ulike immunceller (Bals, 2000). IgA kan binde antigener i mukus og på den måten hindrer overførsel til LP. I tillegg bidrar IgA til å opprettholde riktige bakteriesamfunn i ulike deler av tarmen (Cerutti & Rescigno, 2008).

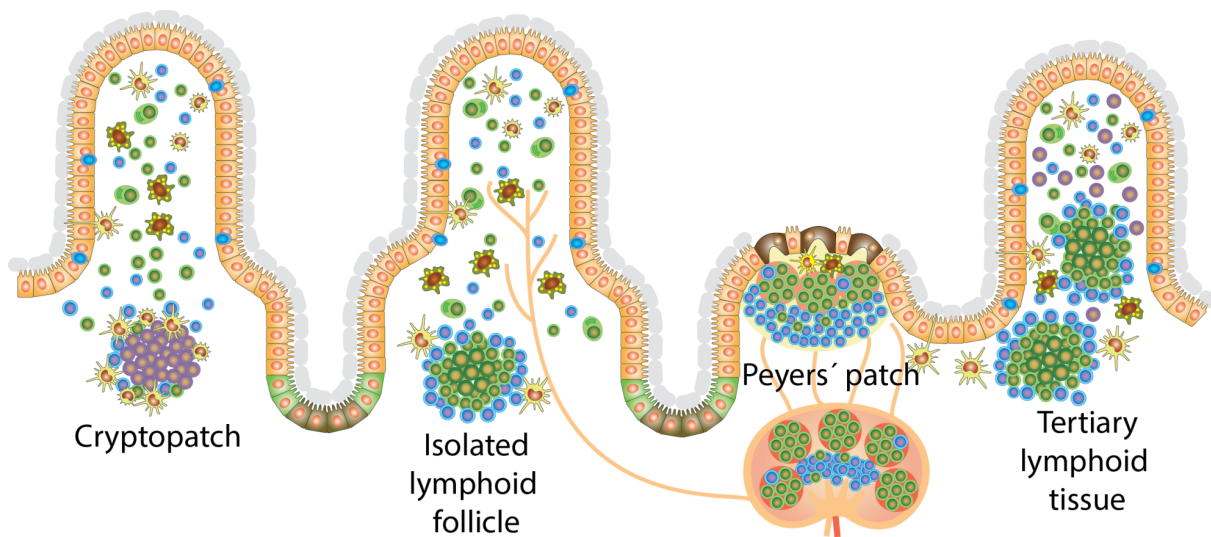
Det intestinale epitelcellelaget består av fire typer celler; begerceller – som er mukusproduserende, enterocytter - som absorberer næring (i tynntarm) og vann (i tykktarm), enteroendokrine celler – som skiller ut hormoner og Paneth celler – som produserer antimikrobielle peptider (Abreu, 2010). I bunnen av kryptene finnes intestinale stamceller som kontinuerlig gir opphav til nye intestinale epitelceller. I LP finner en store mengder immunceller, både fra det medfødte og adaptive immunsystemet, som vil påvirkes av signaler de mottar fra epitelcellene. Samspillet mellom epitelceller, immuncellene i LP og bakterier i tarmen er derfor essensiell for å opprettholde en intestinal homeostase.



Nature Reviews | Immunology

Figur 1.1 Anatomien til tarmens immunsystem (Abreu, 2010).

Tarmimmunsystemet hos pattedyr inkluderer flere organiserte strukturer av immunceller, som blant annet Peyerske flekker, mesenteriske lymfeknuter (MLK), isolerte lymfoide follikler (ILF), tertiært lymfoide vev, og såkalte cryptopatcher (CP). En samlebetegnelse for alle disse strukturene er tarm assosiert lymfoid vev. MLK er en ansamling av immunceller koblet til lymfesystemet, og mottar antigener og celler som fraktes fra tarmen via lymfesystemet (Eberl & Lochner, 2009). CP er en ansamling av celler som induserer dannelse av lymfoid vev. CP er forløperen til ILF som dannes postnalt, og som er avhengig av at tarmen koloniseres av bakterier. CP er ennå ikke påvist hos mennesker, kun mus, men det er vist en CP-lignende strukturer hos mennesker (Nochi, Denton, Wahl, & Garcia, 2013). I tynntarmen finner en Peyerske flekker. Peyerske flekker er en ansamling av ulike immunceller assosiert med epitelcellelaget, og spesielle epitelceller kalt Microfold celler (M-celler). M-celler frakter antigener fra tarmlumen til Peyerske flekker. Subepiteliale dendrittiske celler vil i Peyerske flekker kunne ta opp antigener overført fra tarmlumen via M-cellene, degradere og presentere disse for T-celler (Uematsu & Fujimoto, 2010). I tykktarm finnes såkalte tertiære lymfoide vev, disse har omtrent samme funksjon som Peyerske flekker, men de er ikke så tett assosiert med epitelcellelaget.



Figur 1.2 Oversikt over de ulike lymfoide vevstrukturene i tarmen. Illustrasjon: Tor Lea

Det er estimert at tarmen er kolonisert av nærmere 100 trillioner bakterier (Hill & Artis, 2010). Kommensale bakterier er bakterier som er tilpasset den humane tarmfloraen, men ikke nødvendigvis har en kjent funksjon. Kommensale bakterier har vist å ha mange viktige roller, blant annet bidrar de i fordøyelse av mat, produksjon av vitaminer og kortkjedete fettsyrer, opprettholdelse av epitelhomeostase og beskytte mot infeksjoner (Canny & McCormick, 2008; Hill & Artis, 2010). Kommensale bakterier bidrar til intestinal homeostase ved å kommunisere med intestinale epitelceller. Signaler fra kommensale bakterier vil kunne påvirke differensieringen av T-effektorceller, og en modulering av inflammatoriske responsen gjennom å indusere regulatorisk T-celler og IL-10 produksjon (Rescigno, 2009).

1.2 Inflammatorisk tarmsykdom (Inflammatory bowel disease, IBD)

Inflammatorisk tarmsykdom (IBD) er karakterisert ved en kronisk betennelse i tarmen. Det skilles mellom to former av sykdommen, Crohn's sykdom (CD) og ulcerøs kolitt (UC). Hvordan IBD oppstår er fortsatt ikke kjent, men utvikling av denne sykdommen kan forårsakes av flere faktorer. Dette inkluderer genetiske faktorer, immunsystemet og miljøet (Maloy & Powrie, 2011). Kortvarige inflammasjoner kan oppstå hos friske individer, men spesifikt for individer med IBD er at inflammasjonen ikke nedreguleres. Balanse i samspill mellom

intestinale epitelceller, immunceller og bakterier i tarmen er ikke bare viktig i patogenesen av IBD, men også for å opprettholde en normal intestinal homeostase og for beskyttelse mot mulige patogener (Maloy & Powrie, 2011).

Det er vist at gjenkjenning av bakterier via mønstergjenkjennende reseptorer bidrar til å opprettholde en intestinal epitel homeostase (Rakoff-Nahoum, Paglino, Eslami-Varzaneh, Edberg, & Medzhitov, 2004). Basal aktivering via mønstergjenkjennende reseptorer hjelper til å opprettholde barrierefunksjonen, mens unormalt mye aktivering via mønstergjenkjennende reseptorer kan bidra i utvikling av IBD (Maloy & Powrie, 2011). To av de mest kjente mønstergjenkjennende reseptorene er toll-like reseptor (TLR) og nukleotid-bindende oliomeriseringsdomene reseptor (NOD), som begge er vist å ha viktige funksjoner i opprettholdelse av barrierefunksjonen (Hiemstra, Bouma, Geerts, Kraal, & den Haan, 2012), da aktivering via TLR og NOD- reseptor kan føre til blant annet dannelse av antimikrobielle peptider og generering av nye intestinale epitelceller (Maloy & Powrie, 2011). Flere mutasjoner hos mønstergjenkjennende reseptorer er koblet til IBD. Det har lenge vært kjent at mutasjon av genet som koder for NOD2 – reseptor er assosiert med utvikling av CD (Xavier & Podolsky, 2007). En av de viktigste T-celle subpopulasjonene i tarmen er Foxp3⁺ regulatoriske T-celler. Foxp3⁺ regulatoriske T-celler har anti-inflammatoriske funksjoner, og mutasjoner i genet som koder for Foxp3 har vist seg å resultere i dødelige inflammatoriske sykdommer hos mus (Maloy & Powrie, 2011). Foxp3⁺ regulatoriske T-celler finnes i store mengder både i tykk- og tynntarm og kontrollerer potensielt skadelige responser mot mat- og bakterie-antigener (Maloy & Powrie, 2011).

1.3 Det medfødte og adaptive immunsystemet

Mennesker er kontinuerlig eksponert for mikrober. Både de ytre og indre hudoverflate, i tillegg til alt som blir inhalert og spist, inneholder store mengder mikroorganismer. Om disse mikrobene forårsaker sykdom, eller ikke, er avhengig av patogenisiteten til mikroben, men også kroppens egenskap til å bekjempe de. Immunsystemet hos mennesker er et interaktivt nettverk av lymfoide organer, celler, humorale faktorer og cytokiner. Defekter hos immunforsvaret vil kunne resultere i alvorlige infeksjoner, allergier eller autoimmune sykdommer.

Immunsystemet deles ofte i to deler, det medfødte og det adaptive immunsystemet, hvor hver representeres av karakteristiske celler og løselige faktorer. Det medfødte immunsystemet inkluderer ofte fysiske, kjemiske og mikrobielle barrierer, men består også av monocytter, makrofager, dendrittiske celler (DC), mastceller, naturlige dreperceller (NK-cellene, Natural Killer), og granulocytter. Det adaptive immunsystemet består av B- og ulike typer T-celler.

Medfødte immunceller befinner seg i kroppen fra fødselen av, uavhengig av hvilke mikrober som befinner seg i miljøet vi vokser opp i. De reagerer raskt, noe som er essensielt for effektiv bekjempelse av mikroorganismer som deler seg hurtig. Dersom det oppstår infeksjoner som det medfødte immunsystemet ikke klarer å bekjempe selv, vil det adaptive immunsystemet bli aktivert. Det adaptive immunsystemet, B- og T-celler, vil etter gjenkjennelse av ulike strukturer hos mikroorganismer utvikle seg til effektorceller. Effektorceller er ansvarlige for bekjempelse av mikrobene. I tillegg har det adaptive immunsystemet også muligheten til å danne hukommelsesceller slik at neste gang kroppen blir utsatt for samme mikroorganisme vil bekjempelse av mikroorganismen skje raskere. De viktigste trekkene ved det adaptive immunsystemet er; hver enkelt lymfocytt i det adaptive immunsystemet er spesifikk for kun én fremmed strukturell delkomponent ved ulike antigen, mangfoldet, evnen til å nedreguleres og sist, men ikke minst, egenskapen til å skille mellom kroppens egne antigene strukturer og fremmede strukturer.

Et samarbeid mellom det medfødte og adaptive immunsystemet, samt en tilpasset immunrespons, er viktig for å opprettholde en frisk kropp. Defekter hos ulike celler, eller i samspillet mellom cellene, vil kunne resultere i systemiske inflammasjoner og autoimmune sykdommer.

1.4 Mikrobe-assosierte molekylære mønstre (Microbe-associated molecular patterns, MAMPs)

Celler fra både det medfødte og adaptive immunsystemet har reseptorer som gjenkjenner fremmedmateriale. For å raskt kunne bekjempe patogene bakterier er enkelte celler utstyrt med mønster-gjenkjennerende reseptorer (Pattern Recognizing Receptor, PRR) i cellemembranene. PRR gjenkjenner karakteristiske mønstre av strukturegenskaper hos mikroorganismer kalt mikrobe-assosierte molekylære mønstre (Microbe-Associated Molecular Pattern, MAMPs). MAMPs finnes ofte i form av ulike glykoproteiner og glykolipider, som bidrar til strukturer

som er essensielle for at mikroben skal overleve. Slike strukturer er ikke gjenstand for mutasjoner, hvilket betyr at mutasjoner som endrer egenskapen til mikroben, ikke påvirker strukturene som gjenkjennes av PRR. Aktivering av celler via PRR kan føre til produksjon av proinflammatoriske cytokiner, som blant annet interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12 og TNF- α , som igjen vil sette i gang ulike inflammatoriske responser. De mest kjente PRR hos mennesker inkluderer Toll-liknende reseptorer (TLR), nukleotid oligomeriseringsdomene like reseptorer (NLR), C-type lektin reseptorer (CTLR) og RIG-I-like reseptorer (RLR).

TLR er medfødte PPR som gjenkjenner konserverte motiver hos bakterier og andre mikroorganismer. TLR har utviklet seg til å gjenkjenne flere mikrobe-deriverte produkter, inkludert dobbeltrådet viral RNA (TLR3), lipopolysakkarid (LPS) i celleveggen hos Gram-negative bakterier (TLR4) og flagellin som er en proteinkomponent av bakterieflagell (TLR5) (Hill & Artis, 2010). TLR uttrykkes i hovedsak på celleoverflaten, med unntak av TLR3,7,8 og 9, som finnes intracellulært knyttet til endosommembranen (Hill & Artis, 2010). TLR uttrykkes på mange celletyper, men i hovedsak av antigen-presenterende celler (APC), som makrofager og dendrittiske celler, men også hos andre celler som for eksempel intestinale epitelceller (Hill & Artis, 2010; Kaisho & Akira, 2006). Hver TLR utøver lignende effekter, slik som induksjon av proinflammatoriske cytokiner og oppregulering av ko-stimulatoriske molekyler (Kaisho & Akira, 2006). Signaler mottatt via TLR vil aktivere APC, som igjen kan aktivere adaptive immunceller.

NLR, for eksempel nukleotid oligomeriseringsdomene (NOD)1 og NOD2, detekterer cytoplasmatiske mikrobe-deriverte produkter. NLR er derfor essensiell i bekjempelse av intracellulære bakterier og virus (Uematsu & Fujimoto, 2010). NLR er også viktige mediatorer i proinflammatoriske og immunregulerende responser. Gjenkjennelse av mikrobe-deriverte produkter gjennom NLR er viktig både for utvikling av intestinale lymfoide vev, men også for å opprettholde et normalt tarmsamfunn (Hill & Artis, 2010). Mutasjoner i genet *Card15*, som koder for human NOD2, har også vært assosiert med utvikling av Chron's sykdom, og mutasjoner hos NOD2 kan blant annet kan bidra til en uhensiktsmessig respons overfor kommensale og/eller patogene bakterier (Uematsu & Fujimoto, 2010).

CTLR uttrykkes i store mengder hos profesjonelle antigenpresenterende celler (APC). CTLR uttrykkes både som transmembrane og løselige proteiner, og utøver sin funksjon som PRR ved å binde karbohydrat motiver (Figdor, van Kooyk, & Adema, 2002). RLR binder, i likhet med

TLR, nukleinsyrer derivert fra virus. RLR er cytoplasmatiske proteiner som gjenkjenner virus RNA (Kawai & Akira, 2008)

1.5 Dendritiske celler (DC)

En av de mest sentrale medfødte immuncellene er dendritiske celler (DC). I tilfeller der det medfødte immunsystemet ikke kan bekjempe en infeksjon selv, må det adaptive immunsystemet aktiveres, blant annet ved hjelp av immunceller fra det medfødte immunsystemet (Janeway & Medzhitov, 2002). DC er en profesjonell antigenpresenterende celle, det vil si at den har egenskapen til å aktivere naive T-celler fra det adaptive immunsystemet. APC presenterer peptidantigener i groppen av membranmolekylet hovedvevsforlikelighetsantigenkomplekser (HLA) til T-celler. Binding av T-cellerreseptorer til peptidantigen/HLA-komplekset vil gi aktiverende signal til T-cellene. DC finnes i to funksjonelt distinkte tilstander, umodne eller modne DC, der den største forskjellen ligger i funksjonelle egenskaper og hvilke overflate reseptorer de uttrykker. Umodne DC er aktive fagocytter, dårlig APC (ingen ekspresjon av HLA klasse II-molekyler), uttrykker ikke CD83 og de ko-stimulatoriske molekylerne CD80 og CD86. Mens modne DC er mindre fagocytterende, bedre APC (vist ved økt ekspresjon av HLA klasse II-molekyler), uttrykker CD83 og de ko-stimulatoriske molekylerne CD80/86.

Det finnes ulike subpopulasjoner av DC, som kan vise ulike funksjoner med tanke på toleranse, krysspresentere av antigener, og T-cellepolarisering. Men like subpopulasjoner, isolert fra ulike vev, kan også vise funksjonelle forskjeller. Hvilket tyder på at funksjonelle egenskaper hos DC ikke bare er avhengig av hvilke subpopulasjon de tilhører, men også miljøet de befinner seg i (Rescigno, 2010). Det er utført lite studier som omhandler karakterisering av ulike subpopulasjoner av DC hos mennesker. Men i en artikkel skrevet av Segura og Amigorena (2014) blir humane DC, i fravær av inflammasjon, delt inn i to undergrupper; klassiske DC (kDC) og plasmacytoide DC (pDC). kDC blir videre delt inn i to grupper; residente DC og vandrende DC. Det har blitt beskrevet to hovedgrupper av residente kDC i lymfoide organer og blod; BDCA1/CD1c⁺ DC og Clec9A⁺ BDCA3/CD141⁺ DC (Segura & Amigorena, 2014). I respons på inflammasjoner vil det i tillegg oppstå enda en subpopulasjon av DC, kalt inflammatoriske DC. Studier av gen signaturer av *in vitro* differensierte CD14⁺ monocyttderiverte DC, ved bruk av IL-4 og GM-CSF, viser store likheter med inflammatoriske DC (Segura & Amigorena, 2014). Clec9A⁺ BDCA3/CD141⁺ DC tilsvarer det en hos mus kjenner

som CD8 α ⁺ DC, og viser evne både til krysspresentasjon av antigen, og aktivering/polarisering av ulike T-cellersubpopulasjoner (Thaiss, Semmling, Franken, Wagner, & Kurts, 2011). Mens pDC viser en større evne til å regulere immunrespons ved å promotere toleranse, og polarisering av regulatoriske T-celler (Matta, Castellana, & Thomson, 2010).

1.5.1 Intestinale dendritiske celler

Dendritiske celler (DC) befinner seg blant annet i lamina propria (LP) i tynn- og tykktarm, og i tarm-assosierte lymfoide vev. Det er utført mange studier som omhandler karakterisering av subpopulasjoner av DC i mus, men ikke hos mennesker. CD8-liknende DC hos mus består av residente CD8⁺ og vandrende CD103⁺ DC. Videre er det også beskrevet flere fenotypiske subpopulasjoner av LP-DC hos mus. LP-DC i mus kan skilles fra hverandre på bakgrunn av ekspresjon av CXCR1, CD11b og CD103, men kan funksjonelt deles inn i to hovedgrupper; CD103⁺ og CD103⁻ DC. Der pre-DC og monocytter i mus gir opphav til henholdsvis CD103⁺ og CD103⁻ DC, mens differensiering til CD103⁺ DC og CD103⁻ DC er avhengig av både opphavsceller og vekstfaktorer (Rescigno, 2010). Både CD103⁺ og CD103⁻ bidrar i en rekke ulike betennelses prosesser i tarmen, men også i polarisering av T-celler. Det er blant annet vist at CD103⁺ DC, isolert fra LP eller mesenteriske lymfeknuter, kan promotere utviklingen av Foxp3⁺ regulatoriske T-celler (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007). Det er også vist at intestinale epitelceller som uttrykker TGF- β og retinsyre kan føre til differensiering av CD103⁻ DC fra CD103⁺ DC (Rescigno, 2010).

1.5.2 Overflatemarkørene CD80, CD83 og CD86 hos DC

Dendritiske celler, og andre immunceller, uttrykker overflatemolekyler som bidrar til for eksempel binding av bakterier, signaloverføring, og ikke minst aktivering av T-celler. Antigenpresenterende celler, slik som DC, uttrykker enkelte reseptorer på overflaten som er essensielle for aktivering av T-lymfocytter, to av disse er de ko-stimulatoriske molekylene CD80 og CD86. De binder begge til CD28 hos T-celler, og bidrar i formidling av signal 2 til T-celler. CD80 og CD86 uttrykkes i liten grad hos umodne DC, men vil oppreguleres etter aktivering. CD80 og CD86 binder også til CD152 hos T-celler. Binding av CD152 hos T-celler vil føre til en nedregulering av aktiverte T-celler (Carreno et al., 2000). CD83 er en overflatemarkør en ser hos modne DC, vi sier derfor at CD83 er en modningsmarkør.

1.6 T-celler

T-celler er et eksempel på en celletype som kun finnes hos høyerestående dyr, og T-celler er en del av det adaptive immunsystemet hos mennesker. De blir dannet fra hematopoetiske stamceller, og modnes i thymus. Spesifikt for T-celler er at de kun reagerer med antigen dersom det befinner seg i groppen av HLA-molekyler i membranen hos andre celler. De kan med andre ord ikke binde noe som er fritt i løsning. Celler som kan vise antigener til T-celler kalles for antigenpresenterende celler (APC). Hvordan antigenet blir tatt opp av APC, og hvordan det presenteres for T-celler, avgjør hvilken T-effektorcelle subpopulasjon som dannes.

1.6.1 Presentasjon av antigen til T-celler

DC presenterer både ekstracellulære og intracellulære antigener for T-celler. Antigener som befinner seg intracellulært, som for eksempel ved en virusinfeksjon, vil bli merket og transportert til et enzymkompleks kalt proteasomer. Proteasomer befinner seg i cytosol hvor de bryter ned virus- og egne proteiner til mindre peptidfragmenter før de fraktes inn i endoplasmatiske retikulum (ER). Der vil nysyntetiserte HLA klasse I molekyler binde et peptidfragment før de transporteres til celleoverflaten via Golgi-apparatet. Peptider i groppen på HLA klasse I molekyler gjenkjennes i hovedsak av CD8⁺ T-dreper celler.

Etter binding til PRR vil antigener i det ekstracellulære miljøet bli endocyttert, og videre blir de fragmentert i ulike steg av endosomer. Presentasjon av slike endosomale antigener skjer ved binding til HLA klasse II molekyler. Nysyntetiserte HLA klasse II molekyler befinner seg i ER, og består av en α - og en β - polypeptidkjede, som er assosiert med binding av peptid, i tillegg til en I-polypeptidkjede. I-polypeptidkjeden inneholder transportsignaler, og har i tillegg som funksjon å hindre binding av antigene peptider til HLA klasse II molekylet i ER. Til forskjell fra HLA klasse I molekylerne som transporteres rett til celleoverflaten fra Golgi apparatet, vil HLA klasse II molekylerne transporteres fra Golgi apparatet til endosomene, hvor peptidfragmenter befinner seg. Det sure miljøet og proteaser i endosomene før til at I-kjeden blir degradert, og de antigene peptidfragmentene kan binde til HLA klasse II molekylet. Etter binding av peptidfragmentet vil HLA klasse II molekylerne fraktes til celleoverflaten hvor de kan aktivere CD4⁺ T-celler.

I tillegg til vanlige HLA klasse II presentasjon av ekstracellulære antigener til CD4⁺ T-celler, utøver enkelte subpopulasjoner av DC en alternativ vei for presentering av ekstracellulære antigener via HLA klasse I til CD8⁺ T-celler. Dette er kjent som kryss-presentering (Segura &

Amigorena, 2014). To intracellulære veier for krysspresentering har blitt beskrevet, og blir ofte referert til som cytosolisk eller vakuoler krysspresentering (Segura & Amigorena, 2014). Krysspresentering ved den cytosoliske veien involverer overføring av antigener fra endosomer til cytosol, der vil de bli tatt hånd om av proteasomer, og deretter videre presentering til T-celler via HLA klasse I molekyler. Vakuoleveien involverer degradering av ekstracellulære antigener av lysosomale proteaser og en N-terminal peptidasen i endosomer, før det blir vist i gropen på HLA klasse I molekyler. Flere humane DC har vist å kryss-presentere antigen svært effektivt (Segura & Amigorena, 2014).

1.6.2 Aktivering av T-celler

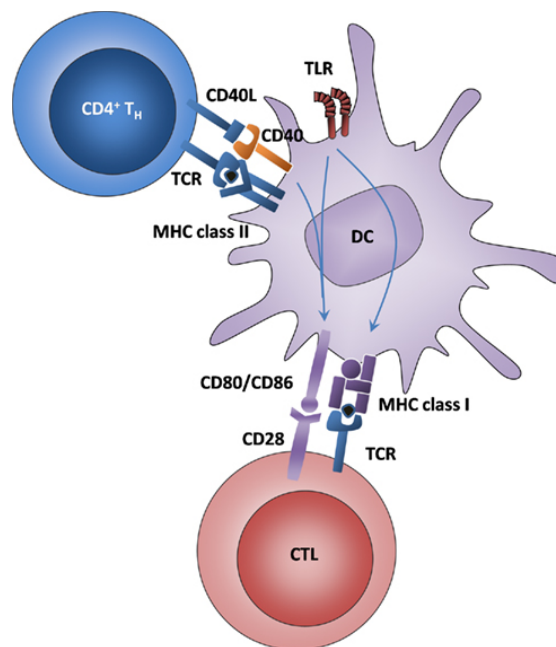
T-celler utvikles og modnes i thymus. T-celler kan ikke binde fritt antigen. Antigenet må dermed presenteres av en APC med samme type HLA-molekyl på overflaten som cellene som befant seg i thymus når T-cellen utviklet seg. En av de mest kjente APC er dendrittiske celler. Dendrittiske celler har egenskapen til å ta opp fremmedmateriale, degradere, og deretter presentere det som små peptidfragmenter i gropstrukturen ytterst i HLA-molekylene. T-celler kan også gjenkjenne peptid-HLA komplekser på overflaten av celler som ikke befant seg i thymus når cellen ble modnet. Slike T-celler kalles alloreaktive T-celler (Felix & Allen, 2007).

T-celler uttrykker antigenreseptorer, T-cellereseptor(TCR), som består av to polypeptidkjeder. Polypeptidkjeden består av et variabelt- og et konstantregiondomene, der den variable regionen bestemmer T-cellens antigenspesifisitet. TCR gjenkjenner ikke antigenet i seg selv, men som et kompleks av peptidet sammen med HLA-molekylet. Videreformidling av de aktiverende signaler gjøres i samarbeid med CD3-komplekset. Alle T-celler uttrykker CD3 på overflaten. TCR og CD3 er avhengig av hverandre for å kunne eksponeres på overflaten av T-lymfocytter, men og for å kunne aktivere T-lymfocytten. TCR har svært korte intracytoplasmatiske deler som ikke er direkte knyttet til noen signaloverføringselementer. T-lymfocyttene utnytter derfor CD3-komplekset til å overføre intracellulær signaler slik at T-lymfocyttene kan aktiveres og utvikles til effektorceller. I tillegg til TCR/CD3-komplekset er det flere andre membranmolekyler som bidrar i formidling av signaler til cellekjernen.

Slike membranmolekyler, som bidrar i formidling av signaler til cellekjernen, kalles med en fellesbetegnelse for celleinteraksjonsmolekyler. Slike celleinteraksjonsmolekyler kan videre deles inn i to undergrupper; ko-reseptorer og celleadhesjonsmolekyler. Eksempel på ko-

reseptorer er CD4 og CD8, som uttrykkes på henholdsvis T-hjelperceller og T-dreperceller. CD4 og CD8 har dermed en egen rolle i aktivering av de ulike T-lymfocytter. Vist ved at CD4⁺ T-hjelperceller interagerer med antigenpresenterende celler som eksponerer HLA klasse II-molekyler, og CD8⁺ T-dreperceller interagerer med antigenpresenterende celler som eksponerer HLA klasse I-molekyler. Slike ko-reseptorer vil bidra til formidling av signal 1 til T-cellen.

Signal 1 er det første aktiveringssignalet som T-cellen mottar, og kreves for at T-cellen skal kunne utvikle seg til effektorceller. Signal 1 formidles etter binding mellom TCR og HLA-molekyler. T-cellen krever to signaler for at den skal utvikle seg til effektorcelle, signal 1 og signal 2. Signal 2 oppstår etter interaksjon mellom CD28, et membranmolekyl hos T-lymfocytten, og CD80 og CD86 hos den antigenpresenterende cellen. Signal 2 bidrar til at T-lymfocytten starter å dele seg, samtidig som den modnes til effektorcelle. For å nedregulere aktiveringen av T-celler vil CD80 og CD86 kunne interagere med et annet kompleks, med høyere bindingsstyrke enn til CD28, kjent som CD152. CD152 er et molekyl som ikke finnes på overflaten til hvilende T-lymfocytter. Men vil eksponeres etter aktivering. Funksjonen til CD152 er å bremse delingen av aktiverte T-lymfocytter, og dermed bidra i nedregulering av T-celleaktiviteten.



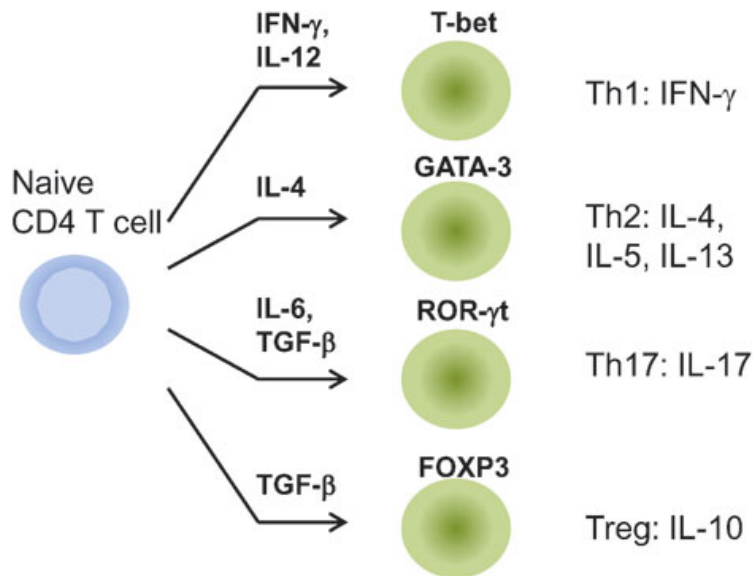
Figur 1.3. Aktivering av T-celler. Binding av T-cellereseptor til HLA-molekyler fører til signal 1, signal 2 oppstår etter binding av CD28 til CD80/CD86. (Thaiss et al., 2011)

T-celler uttrykker også CD40L. CD40L vil etter binding til CD40 hos DC føre til blant annet økt IL-12 sekresjon, IL-12 bidrar i polarisering av CD4⁺ T-celler til T_H1 celler og økt proliferasjon hos CD8⁺ T-celler (O'Sullivan & Thomas, 2003).

1.6.3 T-cellepopulasjoner

T-cellepopulasjonene er definert av to markører (CD2 og CD3) som finnes hos alle T-celler. CD3 er spesifikk for T-celler, mens CD2 også finnes hos andre celler. T-cellene kan deles inn i tre ulike subpopulasjoner ved hjelp av markørene CD4(T-hjelperceller), CD8(T-dreperceller) og CD4/CD25/Foxp3⁺ (regulatoriske T-celler). I senere tid har det også blitt oppdaget en ny T-hjelpercelle, Th17 (Korn, Bettelli, Oukka, & Kuchroo, 2009).

T-celler som er CD4⁺, og viser HLA klasse II restriksjoner, vil etter aktivering utvikle seg til effektorceller med regulatoriske- eller hjelper-funksjoner, også kjent som regulatoriske T-celler (T_{reg}) og T-hjelperceller (Wolf, Sieburth, & Sypek). Regulatoriske T-celler uttrykker både CD4 og CD25 på overflaten, i tillegg til at de uttrykker transkripsjonsfaktoren Foxp3. Regulatoriske T-celler skiller ut det anti-inflammatoriske cytokinet IL-10, og er essensielle for nedregulering og kontroll av immunrespons, men også for å opprettholde en intestinal homeostase ved å forhindre en upassende immunrespons (Barnes & Powrie, 2009; Beissert, Schwarz, & Schwarz, 2006). T-hjelpercellene deles inn i ulike subpopulasjoner ut fra hvilke transkripsjonfaktorer og cytokiner de produserer. T-hjelpercellene T_H1, T_H2 og T_H17, skiller ut cytokiner som på ulike måter påvirker en immunrespons. T_H1- celler skiller i hovedsak ut cytokiner som virker på celler som deltar i betennelsesprosesser og cellulær immunrespons, mens T_H2 skiller ut cytokiner som er kjent for å påvirke modning av B-lymfocytter. T_H17 cellene produserer cytokiner som er spesielt viktige i forsvaret mot ekstracellulære bakterieinfeksjoner, men også i samspillet mellom immunsystemet og epitel (Ouyang, W. 2008). En kan også skille mellom T_H1, T_H2 og T_H17 ved å se på transkripsjonsfaktorene de uttrykker. T_H1, T_H2 og T_H17 uttrykker henholdsvis T-bet, GATA3 og RORγT (Zhu, Yamane, & Paul, 2010).



Figur 1.4 Oversikt over ekspresjon av transkripsjonsfaktorer og cytokiner assosiert med T_H1 , T_H2 , T_H17 og T_{reg} (Kemeny, 2012).

I tillegg til $CD4^+$ T-hjelperceller kan en annen undergruppe utvikle seg til cytotoxiske T-celler, også kjent som T-dreperceller. T-dreperceller er $CD8^+$, og viser dermed HLA klasse I-restriksjon, noe som betyr at antigenet befant seg i cellens cytosol. Antigener fra cytosol er ofte virus, og beste måten å stanse virus på vil være å drepe den infiserte cellen, slik at viruset ikke kan replikeres. T-dreperceller dreper ved å indusere programmert celledød. Dette kan den gjøre på to ulike måter, enten via direkte membrankontakt eller ved utskillelse av cytokiner. T-dreperceller er derfor svært viktig i bekjempelse av virusinfeksjoner.

1.7 Cytokiner

Cytokiner er i hovedsak lavmolekylære proteiner eller glykoproteiner som bidrar i cellekommunikasjon. Cytokiner dannes i hovedsak av hvite blodceller, men også av andre typer celler. De overfører signaler til celler ved å binde til spesifikke overflatereseptorer i membranene. Cytokiner virker i hovedsak lokalt, enten på produsentcellen selv (autokrint) eller på nabocellen (parakrint), selv om noen kan virke på celler langt unna (endokrin aktivitet). Karakteristisk for cytokinene er at flere kan ha lignende effekt, og at et enkelt cytokin kan ha flere funksjoner.

1.7.1 Interleukin-2 (IL-2), IL-6, IL-10 og IL-12.

IL-2 er et cytokin som i hovedsak produseres av aktiverte T-celler, og da spesielt $CD4^+$ T-celler. Hos aktiverte T-celler vil nye overflatemolekyler dannes i membranen, et av disse er CD25. CD25 er α -kjeden i høyaffinitetsreseptoren for IL-2. Etter aktivering av T-celler vil de starte å skille ut IL-2, som igjen kan binde seg til IL-2 reseptoren på overflaten. Binding av IL-2 til sin korresponderende reseptor fører til ytterligere aktiveringssignaler, og til at T-cellen starter å dele seg (proliferere). IL-2 bidrar i T-celleprolifisering, men også i differensiering av naive T-celler til effektor og hukommelses T-celler. IL-2 er et cytokin med flere viktige funksjoner, både for primær og sekundær aktivering av T-celler, men også i nedregulering av en immunrespons ved å stimulere til dannelse av T_{reg} (Bachmann & Oxenius, 2007).

Interleukin 6 (IL-6) er et typisk eksempel på et multifunksjonelt cytokin, og er involvert i flere steg i reguleringen av immunresponsen. IL-6 produseres blant annet av APC og kan være både pro- og anti-inflammatorisk. IL-6 stimulerer leverceller til produksjon og utskillelse av C-reaktive proteiner, og andre akutfasereaktanter. IL-6 bidrar både i aktivering og polarisering av T-lymfocytter. IL-6 i samspill med $TGF-\beta$ kan inducerer utviklingen av T_H17 -celler fra naive T-celler. Senere studier har også vist at IL-6 bidrar i å opprettholde en balanse mellom T_H17 celler og regulatoriske T-celler (Kimura & Kishimoto, 2010), men også at det produseres av DC for opprettholde en umoden tilstand (S.-J. Park et al., 2004).

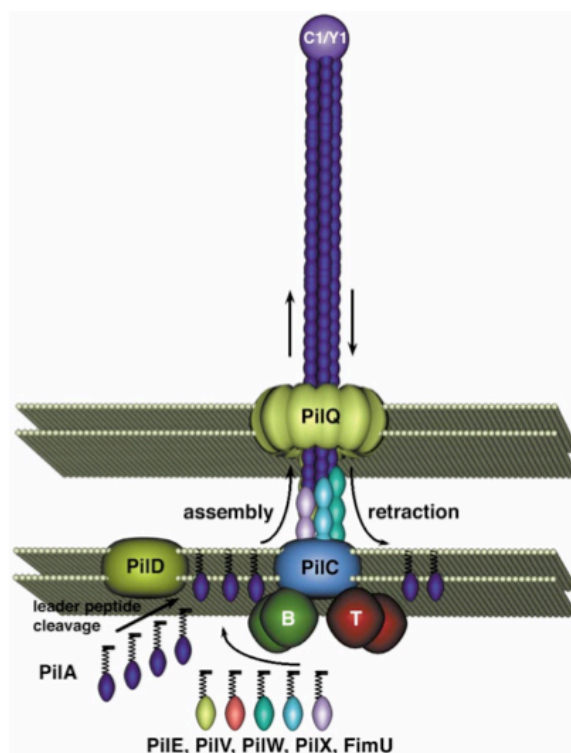
IL-10 er et anti-inflammatorisk cytokin, og spiller en viktig rolle i å begrense inflammasjoner. IL-10 produseres av en rekke ulike celler fra det adaptive immunsystemet, både T_H1 , T_H2 , T_H17 , T_{Reg} , $CD8^+$ T-celler og B-celler, og DC (Saraiva & O'Garra, 2010). IL-10 hemmer produksjonen av T_H1 -cytokinet IL-12 fra aktiverte DC, og vil dermed styre T-celle differensieringen i retning av T_H2 eller T_{Reg} . Mange studier har identifisert IL-10 produsert av $CD4^+$ T-celler som en viktig mediator i intestinal homeostase, og mutasjoner i IL-10 locus har derfor vært tenkt å kunne ha en sammenheng med utvikling av IBD (Saraiva & O'Garra, 2010).

IL-12 er et cytokin som i hovedsak produseres av antigenpresenterende celler (APC), ofte i respons på binding av CD40L hos $CD4^+$ T-celler til CD40 hos DC. Ekspresjon av IL-12 bidrar i polariseringen av T-celler, ved å føre til at $CD4^+$ T-celler differensierer til T_H1 -celler. IL-12 vil også aktivere medfødte immunceller, slik som NK-celler (Hamza, Barnett, & Li, 2010).

1.8 *Methylococcus capsulatus* (Bath og Texas) og *Escherichia coli* Nissle 1917

M. capsulatus er en obligat metanotrof gram-negativ bakterie. Metanotrofe bakterier kan utnytte metan som sin karbonkilde, ved at de oksiderer CH₄ til CO₂. *M. capsulatus* er en type I metanotrof, og hører dermed til gammaproteobakteriene. *M. capsulatus* er ikke en del av tarmfloraen hos mennesker, og vil mest sannsynlig ikke kunne vokse der da vekstbetingelsene (45°C, tilførsel av oksygen/metan) ikke er tilstede. Tilsettelse av *M. capsulatus* (Bath) i fôr har vist seg å ha en anti-inflammatorisk effekt ved tarmbetennelse i forsøksdyr som mus og atlantehavslaks (Kleiveland et al., 2013; Romarheim, Overland, Mydland, Skrede, & Landsverk, 2011). Til tross for at *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) har svært stor sekvenslikhet, viser ikke *M. capsulatus* (Texas) samme anti-inflammatoriske egenskapene (ikke publisert data).

Både *M. capsulatus* (Bath og Texas), i tillegg til andre Gram-negative bakterier, inneholder gensekvenser for type IV pili (T4P) og tip-adhesiner. T4P er et multiprotein-kompleks som er involvert i en rekke ulike funksjoner, blant annet biofilmdannelse, DNA opptak, samt binding til celler og overflater. Bindingen kan være til andre bakterier, men også eukaryote celler. Hos eukaryote celler kan T4P mediere både kolonisering og kontakt. T4P ser ut til å binde via tuppen til spesifikke reseptorer hos epitelceller hos pattedyr, men og andre celletyper (Mattick, 2002). T4P er typiske 5-7nm i diameter, og kan bli flere µm lange. De er i hovedsak sammensatt av små protein subenheter kalt pilin. Pilin er de strukturelle enhetene som bygger pilusen, der major pilin, PilA, er hovedsubenheten. Men andre mindre piliner, som for eksempel PilE, kan implementeres i strukturen og føre til endring i egenskapen til pilusen. PilA fra ulike arter er vanligvis 145-160 aminosyrer i lengde og har svært lik primærstruktur, med en kort positiv ledersekvens og en svært konservert hydrofob terminalsekvens. Ved å sammenligne genomiske DNA sekvenser for *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) er det tidligere identifisert forskjeller i genet som koder for PilE og et adhesin (masteroppgave Stine Indrelid, UMB 2013). Der ble *M. capsulatus* (Texas) vist å ha en kortere PilE- og adhesin-gensekvens enn *M. capsulatus* (Bath).



Figur 1.5. Type IV pili (T4P) uttrykt hos Gram-negative bakterier. Der PilA, og andre piliner som for eksempel PilE, vil bidra i oppbygging av den extracellulære delen av type IV pili systemet (Mattick, 2002).

Escherichia coli Nissle 1917 er, som *M.capsulatus* (Bath og Texas), en ikke-patogen gram-negativ gammaproteobakterie. Den kommensale bakterien *E.coli* Nissle 1917 er også regnet som en probiotiske bakterier (Leatham et al., 2009; Tromm et al., 2004). Probiotiske bakterier har blitt definert som levede organismer i mat og kosttilskudd som ved inntak vil forbedre helsen til verten (Madsen et al., 2001). *E.coli* Nissle 1917 har vært brukt i en rekke forsøk som omhandler behandling av inflammatorisk tarmsykdom med probiotiske bakterier (Gronbach, K. et.al, 2010).

1.9 Den humane monocytteleukemicellelinjen THP-1

THP-1 er en human monocytteleukemicellelinje som ble dyrket fra blodet til en gutt med akutt monocytteleukemi (Tsuchiya, S. 2006). THP-1 kan differensieres til både modne og umodne dendrittiske celler (DC). De dendrittiske cellene som dannes fra THP-1 er svært monotypiske, og viser samme morfologi, fenotype, molekylære og funksjonelle egenskaper som dendrittiske celler som stammer fra humane monocytter.

1.9.1 Molekylære og funksjonelle egenskaper hos THP-1 deriverte dendrittiske celler (THP-1 DC)

Det har blitt observert at umodne THP-1 DC celler innehar mange av de samme egenskapene som en CD14⁺ monocytt-derivert umoden dendrittisk celle (Berges et al., 2005). Etter inkubering med 10% varme-inaktivert føtalt kalveserum(FCS), IL-4 og GM-CSF i 5 døgn ble det observert *de novo* ekspresjon av blant annet CD80 og CD86, og intracellulær ekspresjon av IL-10, men manglende ekspresjon av CD83. Disse cellene viste også lav T-cellestimulerende effekter, noe som er karakteristisk for umodne dendrittiske celler(DC). På bakgrunn av manglende ekspresjon av CD83, og lav T-cellestimulerende effekt, ble de karakterisert som umodne DC (Berges et al., 2005). Dersom en inkuberte cellene med 10% varme-inaktivert føtalt kalveserum(FCS), IL-4, GM-CSF, TNF- α og ionomycin i 1-3 døgn førte det til en differensiering av modne THP-1 DC. Modne THP-1 DC viser *de novo* ekspresjon av CD80, CD83 og CD86, samt intracellulær ekspresjon av IL-10. Disse cellene viste god evne til å aktivere T-celler, noe som er karakteristisk for modne DC. Studier viser også at modne THP-1 DC visere en større evne til å aktivere CD4⁺ enn CD8⁺ T-celler (Berges et al., 2005),

In vitro kan CD14⁺ monocytt-deriverte dendrittiske celler differensieres til modne DC ved bruk av blant annet lipopolysakkarider (LPS), TNF- α og CD40L. LPS, som er en komponent i celleveggen til Gram-negative bakterier, vil aktiverer DC via binding til TLR4. TNF- α og CD40L aktiverer DC via binding til henholdsvis TNF- α reseptor og CD40. Ulike cytokiner og modningsmediatorer, inkludert LPS, TNF- α og CD40L, har blitt testet for å indusere en modning av umodne THP-1 DC. Umodne THP-1 DC viser lav ekspresjon av TLR4, dermed fører ikke LPS til modning. TNF- α og CD40L klarer ikke å indusere en modning av umodne THP-1 DC, men ikke fordi umodne THP-1 DC mangler ekspresjon av TNF- α og CD40 reseptor, noe som kan indikere defekte intracellulære signalveier hos TNF- α og CD40 reseptor (Berges et al., 2005) Det ser dermed ikke ut til at THP-1 DC differensiert til umodne THP-1 DC kan differensieres videre til CD83⁺ modne THP-1 DC. Modning av THP-1 cellene krever TNF- α i kombinasjon med ionomycin, noe som forklares i sammenheng med at ionomycin delvis gjenoppretter samarbeidet mellom TNF- α og TNF- α reseptor (Berges et al., 2005).

1.10 Bakgrunn for oppgaven

Soyabønnemel (SBM) er en mye brukt proteinkilde i dyrefôr. Allerede for 30-40 år siden var det sett et behov for alternative proteinkilder, til bruk i blant annet dyrefôr. Dette var starten på produksjonprosesser for encelleproteiner basert på ulike næringskilder. Norferm produserer i dag encelleproteinet BioProtein(BP). BP er et proteinrikt mel som er produsert av mikroorganismer, i hovedsak *Methylococcus capsulatus* (Bath), med naturgass som næringskilde. Bruk av SBM i fôret til atlantehavslaks (*Salmo salar*) har vært assosiert med inflammasjon i tarmen hos atlantehavslaksen, også kjent som SBM-indusert tarmbetennelse. I 2011 publiserte Romarheim et. al en artikkel der de viste at atlantehavslaks som ble foret med SBM utviklet SBM-indusert tarminflammasjon, mens de individene som ble foret med en diett bestående av både SBM og BP viste ingen tegn til inflammasjon. Inflammasjonen som oppstår hos laksen med SBM-indusert tarminflammasjon har mange likhetstrekk med det som hos mennesker heter inflammatorisk tarm sykdom (IBD). Spørsmålet ble derfor stilt om BP, og da i hovedsak *M.capsulatus* (Bath), kunne ha en lignende anti-inflammatorisk effekt hos andre dyrearter enn laks.

For å studere om effekten av BP var lik hos andre dyrearter ble det utført forsøk der mus, med dextran sulfat natrium (dextran sulfat sodium – DSS) indusert kolitt, ble foret med en kontroll diett eller en eksperimentell diett (Kleiveland et al., 2013). Der den eksperimentelle dietten inneholdt BP, og da i hovedsak bakterieproteiner fra *M.capsulatus* (Bath). Resultatet viste en nedgang i typiske kolitt-assosierte parameterer, som for eksempel reduksjon av vekt, kortere tarm og epitelskader. Senere *in vitro* studier har også vist at *M.capsulatus* (Bath) har en spesiell evne til å binde til CD14⁺ monocytt-deriverte dendritiske celler. *M.capsulatus* (Bath) som er en ikke-kommensal jordbakterier, har vist å ha immunregulerende egenskaper samtidig som den har vist å ha dempende effekter både hos DSS indusert kolitt hos mus, og hos SBM-indusert tarminflammasjon hos atlantehavs laks (Kleiveland et al., 2013; Romarheim et al., 2011).

Formålet med denne masteroppgaven ble dermed å studere mulige immunmodulerende effekter av *M.capsulatus* (Bath) på dendritiske celler (DC).

2 Materialer

Se vedlegg 1.

3 Metoder

3.1 Vekstmedium THP-1

3.1.1 Modifisert RPMI cellekultur medium

THP-1 cellene ble dyrket i medium bestående av RPMI-1640, varme-innaktivert føtalt kalveserum, natriumpyruvat, ikke-essensielle aminosyrer, monothioglyserol og antibiotika(streptavidin/penicillin).

Mediet ble laget på følgende vis:

500ml RPMI 1640 ble tilsatt 50ml varme-innaktivert føtalt kalveserum,

5ml 110mM natriumpyruvat,

5ml 100x ikke-essensielle aminosyrer,

25 ul 1M monothioglycerol,

5ml 100x streptavidin/penicillin.

3.1.2 Differensieringsmedium til umodne THP-1 DC.

Modifisert RPMI tilsatt 100ng/ml IL-4, 100ng/ml GM-CSF.

3.1.3 Differensieringsmedium modne THP-1 DC.

Modifisert RPMI tilsatt 200ng/ml IL-4, 100ng/ml GM-CSF, 20ng/ml TNF-a og 200ng/ml ionomycin.

3.2 Medium til dyrking av bakterier

3.2.1 LB-medium

20g LB-Broth løses i 1000ml destillert vann før det autoklaveres.

3.2.2 Natrium mineralsaltløsning (NMS)

Tabell 1: Preparering av løsninger til NMS medium

Kjemikalier	Konsentrasjon
KNO ₃	0,1g/ml
MgSO ₄ x6H ₂ O	0,1g/ml
CaCl ₂ (anhydrid)	0,1g/ml
JernEDTA	0,038g/ml
NaMoO ₄ x2H ₂ O	0,26mg/ml
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,1g/ml
FeSO ₄ x7H ₂ O	1mg/ml
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,1g/ml
H ₃ BO ₃	10mg/ml
CoCl ₂ x6H ₂ O	10mg/ml
EDTA di sodium salt	0,5M
MnCl ₂ xH ₂ O	10mg/ml
NiCl ₂ x6H ₂ O	10mg/ml

10X NMS salter ble laget på følgende måte: 100ml KNO₃ , 100ml MgSO₄x6H₂O og 10m CaCl₂ (anhydrid) ble fortynnet til 1liter destillert vann.

Trace elements ble laget på følgende måte: 1ml CuSO₄x5H₂O, 250ml FeSO₄x7H₂O, 2ml ZnSO₄x7H₂O, 750µl H₃BO₃ , 2,5ml CoCl₂x6H₂O, 740µl EDTA di sodium salt, 1ml MnCl₂xH₂O og 500µl NiCl₂x6H₂O ble fortynnet i destillert vann i et totalvolum på 500ml.

Fosfatbuffer ble laget på følgende måte: 71,6g Na₂HPO₄x12H₂O og 26g KH₂PO₄ ble løst opp i angitt rekkefølge i 800ml destillert vann. pH ble justert til 6,8 og fortynnet til 1liter.

NMS medium:

1. 100ml 10x NMS salter fortynnes til 1000ml destillert vann
2. 1ml NaMoO₄x2H₂O
3. 1ml Trace elements
4. 100µl JernEDTA
5. 10ml fosfatbuffer
6. Juster pH til 6,8.
7. Sterilfiltrer og oppbevar mørkt.

3.3 Dyrking av bakterier

3.3.1 *Methylococcus capsulatus* (Bath og Texas)

M.capsulatus (Bath og Texas) ble dyrket i NMS medium, i en atmosfære av luft, metan- og karbondioksid i forhold 75(O₂): 23,75 (CH₄):1,25 (CO₂) ved 45°C i risteinkubator. Det ble alltid benyttet ferske overnattkulturer til forsøkene. Bakteriekulturene ble satt opp fra tidligere overnattkulturer som var oppbevart ved 4°C. Fersk overnattkultur ble sentrifugert i 10min (3345rcf) og resuspendert i modifisert RPMI til OD=0,27±0,02 (440nm), som tilsvarer 10⁸ bakterier/ml.

3.3.2 *Escherichia coli* Nissle 1917

E.coli Nissle 1917 ble dyrket i LB medium i risteinkubator ved 37°C. Det ble alltid benyttet ferske overnattkulturer til forsøkene, og bakteriekulturene ble satt opp fra tidligere overnattkulturer som var oppbevart ved 4°C. Alle forsøk benyttet UV-inaktivert *E.coli* Nissle 1917. UV-bestrålingen ble utført for å hindre vekst under ko-kultivering med celler. Fersk overnattkultur ble sentrifugert i 10min (3345rcf), vasket med PBS 3x, resuspendert i modifisert RPMI til OD=0,22±0,02 (600nm), som tilsvarer 10⁸ bakterier/ml. 15ml suspensjon ble overført til petri-skåler og UV-bestrålt i 1time.

3.4 Cellekultur THP-1

THP-1 ble hentet fra frys (-80°C), tint på is og resuspendert i modifisert RPMI medium og sentrifugert i 10min (350rcf), vasket med PBS og resuspendert i modifisert RPMI. Videre ble cellene dyrket i modifisert RPMI medium i cellekulturflasker. Cellene ble splittet med 2-3 dager mellomrom, til en tetthet på ca. 2x10⁵ celler/ml.

3.5 Differensiering av THP-1 deriverte dendrittiske celler (THP-1 DC)

3.5.1 Differensiering til modne THP-1 DC.

Cellekulturen ble sentrifugert i 10min (350rcf), og resuspendert i 1ml RPMI før cellene ble telt i en automatisk celledetektor (Coulter Z1™). Det antallet celler som skulle brukes i forsøket ble sentrifugert i 10min (350rcf) og resuspendert i differensieringsmedium til 2x10⁵ celler/ml. Cellene ble platet ut i 24- eller 96-brønnersplater. Cellene differensierte i 5 døgn. Mediet ble skiftet annenhver dag.

3.5.2 Differensiering til modne THP-1 DC

Cellekulturen ble sentrifugert i 10min (1300rpm), og resuspendert i 1ml RPMI før cellene ble telt i en automatisk celledeteller. Det antallet celler som skulle brukes i forsøket ble sentrifugert i 10min (350rcf) og resuspendert i differensieringsmedium til 2×10^5 celler/ml. Cellene ble plattet ut i 24- eller 96-brønnersplater. Cellene differensierte i 3 døgn.

3.6 Isolering av mononukleære celler (MNC) fra buffy coat

Sentrifugerør (50ml) ble tilsatt 25ml steril PBS, 10ml buffy coat og 10ml Lymphoprep®. Lymphoprep® ble tilsatt i bunnen av sentrifugerørene ved bruk av sprøyte og hestekanyle. Rørene ble deretter sentrifugert, uten brems, i 20min (400rcf). Etter sentrifugeringen vil MNC befinner seg i sjiktet over Lymphoprep®. De MNC ble overført til nye sentrifugerør. For å fjerne blodplater ble cellene tilsatt RPMI-1640 og sentrifugert ved 350rcf i 10min, neste vask med RPMI-1640 ble cellene sentrifugert ved 200rcf i 10min, og minst en vask til sentrifugert ved 350rcf. Cellene ble videre telt i en automatisk celledeteller og resuspendert i innfrysningsmedium/RPMI. Innfrysningsmedium bestod av modifisert RPMI tilsatt 20% dimethylsulfoxide (DMSO). Cellene ble fordelt i ampuller med ca. 25-50 millioner celler per ampulle og satt i -80°C fryser. Dagen etter ble ampullene overført til en nitrogentank for langtidslagring.

3.7 Isolering av T-lymfocytter fra MNC.

Passende kolonne (10ml engangssprøyte) ble pakket med nylonull, og autoklavert. Cellesuspensjon med perifere mononukleære celler (MNC), oppbevart i nitrogentank, ble tint og resuspendert i 10ml modifisert RPMI, deretter sentrifugert i 10min (350rcf). Supernatanten ble fjernet, og pelleten ble resuspendert i 4-5ml modifisert RPMI og tilsatt på nylonsøylen. Nylonsøylen ble i forkant ekvilibrert med modifisert RPMI. Nylonsøyle tilsatt MNC ble inkubert ved 37°C i 30-40min. Cellene ble eluert med modifisert RPMI, sentrifugert i 10min (350rcf) og resuspendert i 1ml RPMI. Cellene ble telt i en automatisk celledeteller for å bestemme antall isolerte T-celler. I forsøkene ble det brukt 1×10^6 T-celler/ml.

3.8 Blandet lymfocyttkultur (mixed leukocyte culture, MLC).

Det ble utført en alternativ blandet lymfocyttkultur, videre kalt for MLC, hvor en benyttet seg av potensialet til THP-1 som antigenpresenterende celler for humane alloreaktive T-celler.

Modne THP-1 DC ble ko-kultivert med bakterier i tre døgn, da modne THP-1 DC ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath) i tre døgn ga høyest proliferasjon hos de humane T-cellene. Tidligere utførte forsøk med CD14⁺ monocyttderiverte DC, på laben for molekylær cellebiologi ved NMBU, hadde benyttet en ko-kultiveringstid med bakterier i et døgn. Dette var årsaken til at modne THP-1 DC ble ko-kultivert med bakterier i et døgn.

3.8.1 MLC med modne THP-1 DC.

THP-1 cellekultur ble sentrifugert i 10min (35rcf), resuspendert i 1ml RPMI og telt i en automatisk celledetektor. Ønsket antall celler ble tilsatt differensieringsmedium for modne THP-1 DC og 2×10^5 celler/ml ble platet ut i triplikater (100µl/brønn) i 96-brønnersplater. Cellene differensierte i tre døgn. *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og UV-inaktivert *E.coli* Nissle 1917 ble tilsatt til cellene (100µl/brønn, 10^8 bakterier/ml) på dag 0. På dag 3 ble alt medium, og bakterier i løsning, fjernet. 100µl/brønn mitomycin C (0,04mg/ml) i modifisert RPMI ble tilsatt til cellene og inkubert i 30min ved 37°C, for å hindre proliferasjon av THP-1 cellene. Cellene ble deretter vasket tre ganger med RPMI. Videre ble det tilsatt T-celler isolert fra MNC (100µl/brønn, 1×10^6 T-celler/ml). På dag 8 ble cellene pulset med 20µl/brønn ³H-tymidine (0,25 µCi/ml) før platen ble høstet over på et nylonfilter som ble tørket ved 50°C i 1 time. Filteret ble deretter montert i plast ramme og 25µl scintillasjonsvæske ble tilsatt til hver brønn. Mengde ³H-tymidine ble telt ved bruk av en scintillasjonsteller (TopCount NXT) på dag 9. Cellene ble inkubert ved 37°C gjennom hele prosessen.

3.8.2 MLC med umodne THP-1 DC.

THP-1 cellekultur ble sentrifugert i 10min (350rcf), resuspendert i 1ml RPMI og telt i en automatisk celledetektor. Ønsket antall celler ble tilsatt differensieringsmedium for umodne THP-1 DC, og 2×10^5 celler/ml ble platet ut i triplikater (100µl/brønn) i 96-brønnersplater. Cellene differensierte i 5 døgn, mediet ble skiftet på dag 2 og 4. *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og UV-inaktivert *E.coli* Nissle 1917 ble tilsatt til cellene (100µl/brønn, 10^8 bakterier/ml) på dag 4. På dag 5 ble alt medium, og bakterier i løsning, fjernet. 100µl/brønn mitomycin C (0,04mg/ml) i modifisert RPMI ble tilsatt til cellene og inkubert i 30min ved 37°C, for å hindre proliferasjon av THP-1 cellene. Cellene ble deretter vasket tre ganger med RPMI. Videre ble det tilsatt T-celler isolert fra MNC (100µl, 1×10^6 T-celler/ml). På dag 10 ble cellene pulset med 20µl/brønn ³H-tymidine (0,25µCi/ml) før platen ble høstet over på et nylonfilter som ble tørket ved 50°C i 1 time. Filteret ble deretter montert i plast ramme og 25µl

scintillasjonsvæske ble tilsatt til hver brønn. Mengde ^3H -tymidine ble telt ved bruk av en scintillasjonsteller (TopCount NXT) på dag 11. Cellene ble inkubert ved 37°C gjennom hele prosessen.

3.9 Deteksjon av overflatemarkører hos modne/umodne THP-1 DC.

THP-1 ble differensiert mot umodne og modne THP-1 DC i 24-brønners plater ($500\ \mu\text{l}/\text{brønn}$, 2×10^5 celler/ml). Modne THP-1 DC ble ko-kultivert med bakteriene *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og *E.coli* Nissle 1917 ($500\ \mu\text{l}/\text{brønn}$, 10^8 bakterier/ml) i tre døgn, bakterier ble tilsatt på dag 0, før deteksjon av overflatemarkørene ble utført på dag 3. Umodne THP-1 DC ble ko-kultivert med bakteriene *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og *E.coli* Nissle 1917 ($500\ \mu\text{l}/\text{brønn}$, 10^8 bakterier/ml) i et døgn (tilsatt på dag 4), mediet ble skiftet på dag 2 og 4, før deteksjon av overflatemarkørene ble utført på dag 5. Videre prosedyre var lik for både modne og umodne THP-1 DC.

Supernatant ble fjernet (senere benyttes til kvantiering av cytokiner), og cellene ble løsnet fra 24-brønnersplaten ved inkubasjon med EDTA-trypsin. Cellene ble overført til 15ml rør, sentrifugert i 10min (350rcf). Supernatanten ble fjernet og cellene ble resuspendert i 1ml modifisert RPMI før de ble telt i en automatisk celledetektor. Antallet celler fra hvert oppsett (THP-1 DC alene, THP-DC/*M.capsulatus* (Bath), osv.) ble likt fordelt i 5 brønner i en 96-brønners plate (v-bunn). Deretter ble cellene sentrifugert (3min, 350rcf) og vasket med PBS tre ganger. Det ble videre tilsatt $100\ \mu\text{l}/\text{brønn}$ med blokkeringsbuffer (5% bovine serum albumin – BSA i PBS) og inkubert i romtemperatur i 30min. Deretter ble platen sentrifugert i 3min (350rcf) og supernatant ble fjernet før det ble tilsatt fluorokromkonjugert anti-CD80, CD83 og CD86 etter anvisning fra leverandør. Platen ble inkubert med fluorokromkonjugert anti-CD80, CD83 og CD86 mørkt i en time ved romtemperatur. Prøvene ble deretter sentrifugert (3min, 350rcf) og vask med PBS tre ganger før prøvene tilslutt ble resuspendert i $200\ \mu\text{l}$ PBS. Deretter ble prøvene analysert i væskestrømscytometeret.

3.10 Kvantitering av cytokinene interleukin(IL)-2, IL-6, IL-10 og IL-12.

Innholdet av cytokinene IL-6, IL-10 og IL-12 i supernatant fra umodne THP-1 DC ble kvantitert. THP-1 ble differensiert mot umodne THP-1 DC i 5 døgn (2×10^5 celler/ml, $500\ \mu\text{l}/\text{brønn}$), medium skiftet på dag 2 og 4, tilsettelse av bakterier på dag 4 ($500\ \mu\text{l}/\text{brønn}$, 10^8

bakterier/ml). Supernatant ble hentet ut på dag 5, samme dag som det ble utført deteksjon av overflatemarkører hos umodne THP-1 DC.

Innholdet av IL-6 i supernatant fra modne THP-1 DC ble kvantitert. Cellene ble differensiert mot modne THP-1 DC i tre døgn (2×10^5 celler/ml, 500 μ l/brønn), og bakterier ble tilsatt på dag 0 (500 μ l/brønn, 10^8 bakterier/ml). Supernatant ble hentet ut på dag 3, samme dag som det ble utført deteksjon av overflatemarkører hos modne THP-1 DC.

Innholdet av cytokinene IL-2 og IL-10 fra T-celler i MLC ble kvantitert. Supernatant for kvantiering av cytokiner ble hentet ut samme dag som det ble utført intracellulær farging av transkripsjonsfaktorer av T-celler, dvs. på dag 8 (Se 4.11 Farging av intracellulære transkripsjonsfaktorer).

Alle prøvene ble analysert i triplikater, og det ble brukt oppgitt protokoll for utførelse av enzymlinket-immunosorbent assay - ELISA fra leverandør, med unntak av fremkallingstrinnet. Fremkalling ble utført på følgende måte: 100 μ l streptavidin-HRP (fortynnet 1:5000 i PBS med 1% BSA) ble tilsatt i hver brønn og inkubert i romtemperatur i 20min. Vasket 4X med oppgitt vaskebuffer fra produsent av ELISA kit. Deretter ble det tilsatt 100 μ l fra en løsning bestående av 12,5ml ABTS (0,18mg ABTS/ml fortynnet i natriumacetat) + 10 μ l 3% H₂O₂. Platen ble videre inkubert mørkt i romtemperatur til farge oppstod. Deretter ble platen kontinuerlig lest av i Sunrise Absorbant Reader, til høyeste standard på standardkurven hadde en OD \approx 1,2.

3.11 Farging av intracellulære transkripsjonsfaktorer.

For å detektere de intracellulære transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA3, ROR γ T og Foxp3 ble det utført en oppskalert MLC (utført i 24-brønnersplater, istedenfor 96-brønnersplater).

Dag 0 ble cellene satt opp til differensiering mot modne THP-1 DC og plattet ut i 24-brønnersplater i duplikater (500 μ l, 2×10^5 celler/ml) og tilsatt *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og *E.coli* Nissle 1917 (500 μ l/brønn, 10^8 bakterier/ml). På dag tre ble alt medium, inkludert bakterier i løsning, fjernet. Cellene ble mitomycinbehandlet (0,04mg/ml) og tilsatt T-celler (500 μ l, 1×10^6 T-celler/ml). Dag 8 ble supernatanten med T-celler overført til 15ml rør og sentrifugert i 10min (350rcf). Supernatanten ble fjernet (senere benyttet til kvantitering av IL-2 og IL-10) og pellet med T-cellene ble resuspendert i 1ml RPMI, og telt i en automatisk celledetektor. T-cellene ble deretter likt fordelt i 5 brønner i en 96-brønners plate

(v-bunn). Cellene ble vasket to ganger med PBS. Videre ble det benyttet oppgitt protokoll av produsent for Foxp3/Transcripton factor staining buffer set (eBioscience), før det ble utført væskestrømscytometriske analyser.

3.12 Bindingsforsøk

3.12.1 Modne THP-1 DC

THP-1 celler ble satt opp til differensiering mot modne THP-1 DC (i tre døgn) i filterkopper (0,4µm porer) på 24-brønners plater (300µl/filterkopp, 2×10^5 celler/ml). Brønneren hvor filterkoppen ble plassert ble fylt med 500µl modifisert RPMI medium. Cellene ble ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og *E.coli* Nissle 1917 (300µl/brønn, 10^8 bakterier/ml) i tre døgn, eller tre timer, før fremføring til sveipeelektronmikroskopi.

3.12.2 Umodne THP-1 DC

THP-1 celler ble satt opp til differensiering mot umodne THP-1 DC i fem døgn, mediet ble skiftet på dag 2 og 4. Cellene ble satt opp i filterkopper (0,4µm porer) på 24-brønners plater (300µl, 2×10^5 celler/ml). Brønneren hvor filterkoppen ble plassert ble fylt med 500µl modifisert RPMI medium. Cellene ble ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og *E.coli* Nissle 1917 (300µl/brønn, 10^8 bakterier/ml) i et døgn, eller tre timer, før fremføring til sveipeelektronmikroskopi.

3.13 Fremføring til sveipeelektronmikroskopi

Filtrene med celler ble vasket 2-3 ganger med PBS for å fjerne bakterier, og deretter inkuberte i 30min med 4% paraformaldehyd i romtemperatur og vasket med PBS 2x. Dehydrert på følgende måte: 3 x 5min med 50% etanol i PBS, 3 x 5min med 70% etanol i PBS og 2 x 5min 100% etanol. Cellene ble oppbevart i 100% til det ble utført kritiskpunkt tørking.

Prøvene ble plassert i trykkammeret i et kritiskpunkt tørkingsinstrument (BAL-TEC CPD 030, BAL-TEC AG) og dekket med 100% etanol. Trykket ble økt ved å tilsette CO₂-gass til ca 50atm. (likevekts-trykk for CO₂ i gass/væske ved romtemp.). Deretter ble prøvene kjølt ned til ca 10°C, og trykk-kammeret ble fylt med CO₂ i væskeform. CO₂ væsken blir så slipt ut, men aldri mer enn at prøvene fortsatt er dekket av væske. Dette ble utført 3-5 ganger til all etanol var fjernet. Dette ble bekreftet ved lukteprøver, og tørris ved utløpsventilen til trykk-kammeret. Temperaturen ble deretter økt til ca. 40°C og trykket til omtrent 90atm. Dette førte til at CO₂

væsken går over til gass-form. CO₂ gassen ble så sluppet sakte ut. De tørkede prøvene ble videre montert på en aluminiumstubbe før de ble dekket med et lag av gull-palladium ved bruk av en sputter coater (Polaron SC 7640 - Quorum Technologies Ltd).

3.14 Konstruksjon av *M.capsulatus* (Bath) Pile mutant

3.14.1 Konstrukt av plasmid pJQΔPile

Konstrukt av plasmidet pJQΔpile utført på følgende måte:

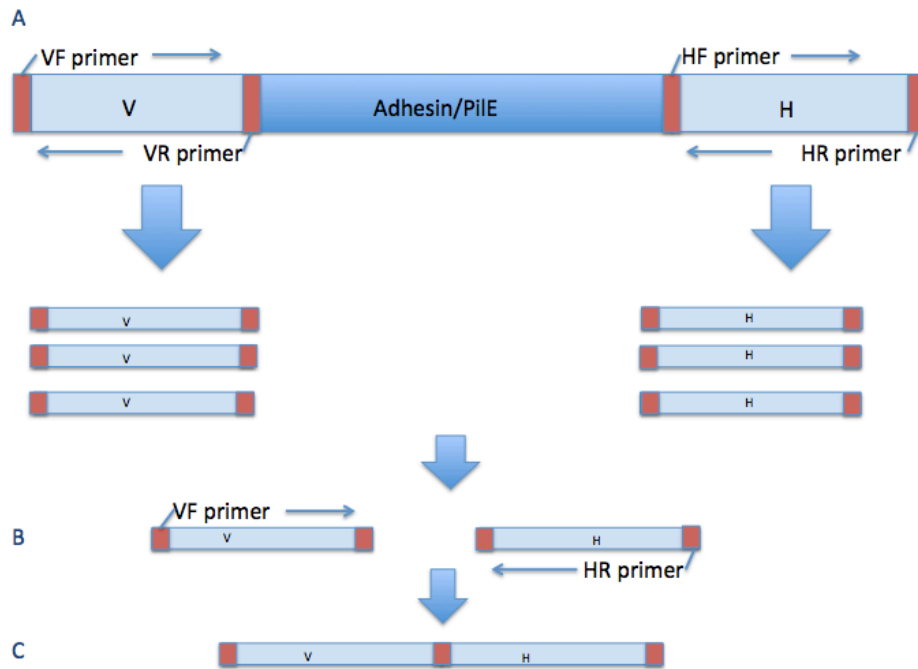
1. Genomisk DNA ble isolert fra *M.capsulatus* (Bath) ved bruk av ØIA® amp DNA Mini Kit, og oppkonsentrert ved etanol presipitering.
2. Det ble utført PCR amplifikasjon av 1003bp oppstrøms for adhesin genen ved bruk av
 - venstre fremover(VF) primer = 5'-CATCTAGACCGGAAACCCCATCA-3'
 - venstre revers(VR) primer = 5'-TCACGCCCATCGAAAGCACCATG-3'.

PCR amplifikasjon av 1028bp nedstrøms av pile genen ved bruk av:

- høyre fremover(HF) primer; 5'-CATGGTGCTCCCTGGGCGTGAA-3',
- høyre revers(HR) primer : 5'-CATGTCGACCAGTACCGCTCGGT-3'.

PCR reaksjonen ble separert på en 1% agarosegel. Båndet med korrekt størrelse ble ekstrahert fra gel ved bruk av QIAquick gel extraction kit. Se figur 3.1.

3. Etter å ha ekstrahert riktig bånd fra gel, ble det utført en fusjon av PCR produktene ved bruk av VF-primer og HR-primer. PCR produktene ble deretter kjørt på 1% agarosegel for å isolere fusjon-produktet på ca 2000kb. Riktig bånd ble ekstrahert fra gel ved QIAquick gel extraction kit. Produktet som ble ekstrahert er videre kalt Δpile
4. ΔPile ble kuttet med restriksjonsenzymet XbaI for å kunne ligere inn i selvmordsvektoren pJQ200SK. Dette gir et XbaI overheng i den ene enden og en blunt-ende på den andre enden av ΔPile. Videre kalt ΔPile_XbaI.
5. pJQ200SK ble isolert ved bruk av PureYield™ Plasmid Midiprep System. Isolert pJQ200SK ble kuttet med restriksjonsenzymene XbaI og SmaI. Kutting med SmaI gir en blunt-ende. Linearisert pJQ200SK ble kjørt på 1% agarosegel, og riktig produkt ble ekstrahert fra gel ved QIAquick gel extraction kit. Videre kalt pJQ200SK_XbaI/Sma



Figur 3.1. PCR av genomisk DNA. **A:** ca 1000bp oppstrøms -ved hjelp av VF og VR primer, og nedstrøms – ved hjelp av HF og HR primer, av Adhesin/PilE genet ble amplifisert ved PCR. **B:** Fusjon av PCR produktene ved bruk av VF-primer og HR-primer **C:** Etter fusjon av PCR produktene får en dannet et ca 2000kb produkt. Dette 2000kb produktet består da av ca 1000kb oppstrøm og nedstrøms av Adhesin+PilE genet.

6. Deretter ble det satt opp overnatt ligering med Δ PilE_XbaI og pJQ200SK_XbaI/SmaI ved 16⁰C. Produktet som da ble laget er videre kalt pJQ Δ PilE.
7. pJQ Δ PilE ble transformert inn i *E.coli* TOP10 før det kunne overføres til *M.capsualtus* (Bath). Det ble utført på følgende måte:
 - I. *E.coli* TOP10 ble tint på is i 15min
 - II. Tilsatte pJQ Δ PilE – 15min til på is
 - III. Inkubert ved 42°C i 1min
 - IV. Tilsatte 1ml LB medium
 - V. Inkubert ved 37°C i 1time
 - VI. Ulike konsentrasjoner ble platet ut på LB/agar plater med gentamicin.
8. For å verifisere at kolonier fra platene inneholdt pJQ Δ PilE, ble det utført PCR av flere kolonier ved bruk av VF og HR primere. En av koloniene som inneholdt riktige bånd (2000kb) og ble brukt videre, og den ble senere sekvensert for å bekrefte riktig sekvens.

3.14.2 Konjugering av pJQΔPile inn i *M.capsulatus* (Bath) ved triparental mating.

Overførelse av pJQΔPile fra *E.coli* TOP10 til *M.capsulatus* (Bath) ble utført ved triparental mating. I denne type konjugering ble det brukt tre ulike bakterier;

- *E.coli* TOP10 med pJQΔPile plasmid, som er donor av pJQΔPile. pJQΔPile inneholdt gener som er ansvarlig for mobiliseringen av overførelse av plasmidet.
- *E.coli* DH5α med pRK2013 plasmid. pRK2013 plasmidet inneholder gener som er ansvarlig for plasmid overførelse (hjelper).
- *M.capsulatus* (Bath) – mottaker av pJQΔPile plasmidet.

Konjugeringen ble utført på følgende måte:

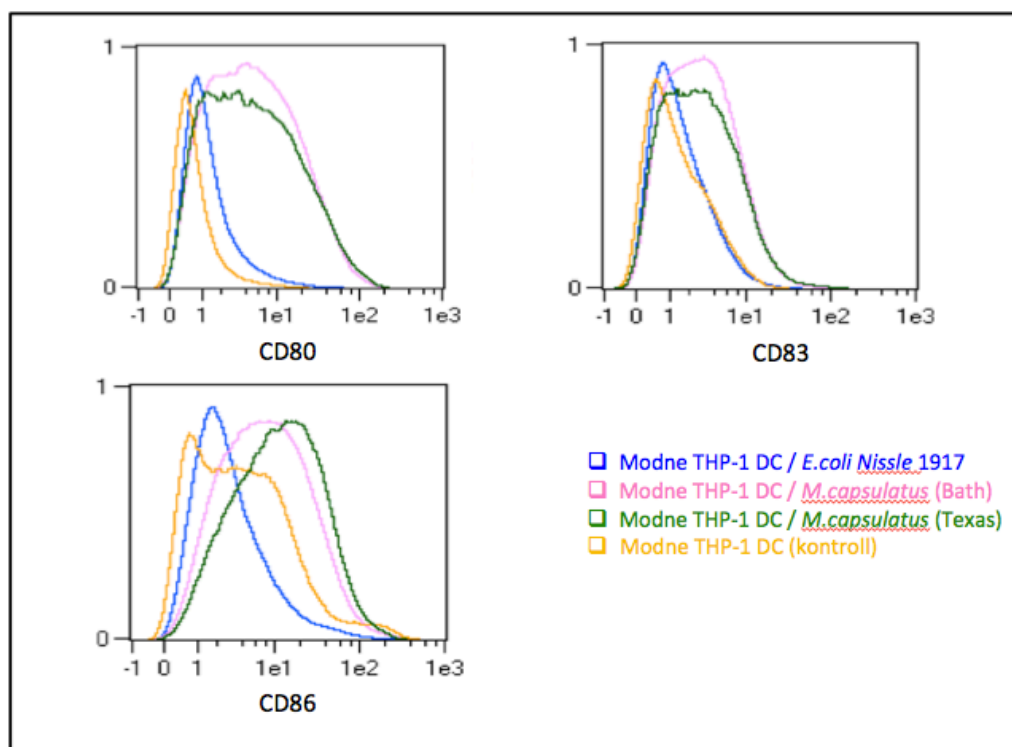
- I. Overnattkulturer av de ulike bakteriene ble laget på følgende måte:
E.coli TOP10/pJQΔPile ble dyrket i 5ml LB-medium med 15μg/ml gentamicin og *E.coli* DH5α/ pRK2013 ble dyrket i 5ml LB-medium med 50μg/ml kanamycin, i 37°C. *M.capsulatus* (Bath) ble dyrket i 50ml NMS i en atmosfære med 25% CH₄/CO₂.
- II. *E.coli* TOP10/pJQΔPile og *E.coli* DH5α/ pRK2013 ble sentrifugert i 10 min (3345rcf) og vasket med NMS 3x, før bakteriene ble resuspendert i 1ml NMS. *M.capsulatus* (Bath) ble sentrifugert en gang i 10min (3345rcf) og løst i 0,5ml NMS.
- III. De tre kulturene ble blandet 1:1:2 (donor:hjelper:mottaker), og spottet 600μl og 400μl på nitrocellulosepapir på NMS-agarplater som inneholdt 0,2% protease pepton og 0,1% thiamin.
- IV. Platene ble inkubert i en atmosfære med 25% CH₄/CO₂ (37°C), i et døgn.
- V. Bakterie spottene ble så overført til nye NMS-agarplater som inneholdt 15μg/ml gentamicin. Platene ble så inkubert i 42°C i en atmosfære med 25% CH₄/CO₂. Det ble skiftet gass med 4-5 dagers mellomrom.
- VI. Etter ca. 10-12 dager kunne en se vekst av *M. capsulatus* (Bath)-mutanter på platen.

På grunn av manglende tid, ble det ikke utført noe mer arbeid med *M.capsulatus* (Bath) mutanten.

4 Resultater

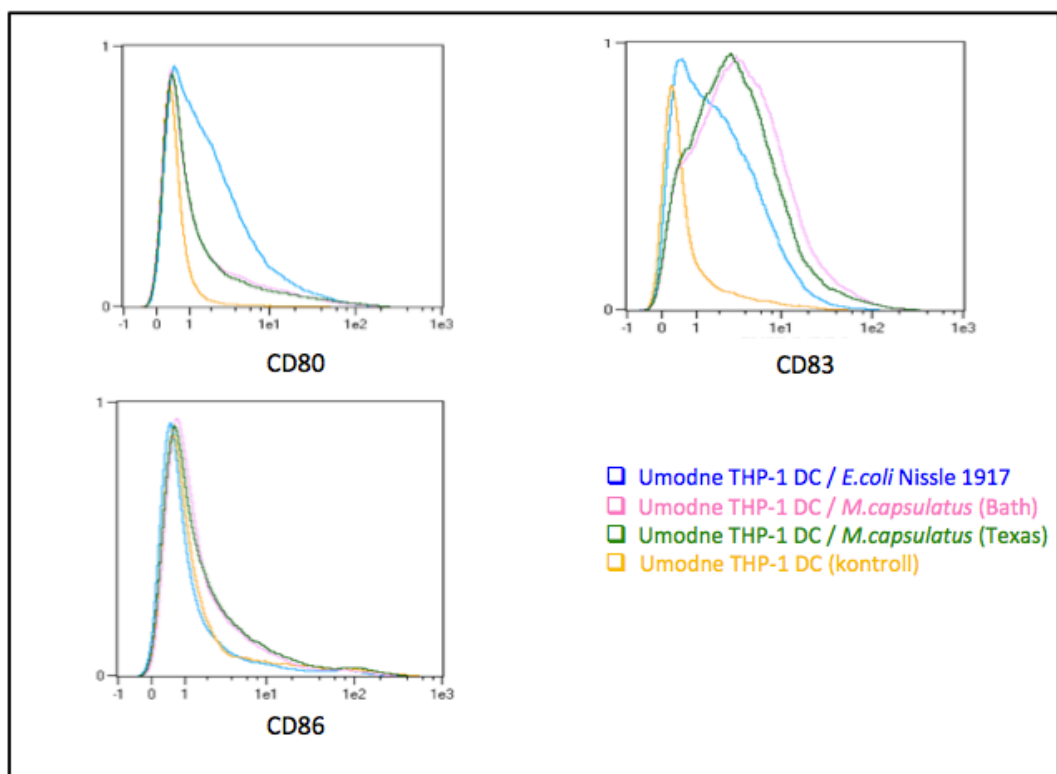
4.1 Ekspresjon av overflatemarkørene CD80, CD83 og CD86 hos modne og umodne THP-1 deriverte dendrittiske celler

THP-1 celler kan differensieres til både umodne og modne DC. For å karakterisere cellenes potensiale som antigenpresenterende celler ble ekspresjon av CD80, 83 og 86 undersøkt ved væskestrømscytometrisk analyse. CD80 og CD86 er to essensielle ko-stimulatoriske molekyler ved aktivering av T-celler, mens CD83 er ansett å være en modningsmarkør for DC. Det ble videre undersøkt om ko-kultivering med bakteriene *M.capsulatus* (Bath og Texas) og *E.coli* Nissle 1917 påvirket ekspresjonen av disse overflatemolekylene. Modne og umodne THP-1 DC ble ko-kultivert med bakteriene i henholdsvis tre døgn (figur 4.1) og et døgn (figur 4.2).



Figur 4.1. Resultat fra væskestrømscytometrisk analyse av overflatemarkørene hos modne THP-1 DC. Modne THP-1 DC ble ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og *E.coli* Nissle 1917 i 3 døgn. Forsøket ble gjennomført to ganger. Resultatene presentert er fra et oppsett.

Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath og Texas) viste en økt ekspresjon av CD80, CD83 og CD86 (figur 4.1, grønn og rosa). Ko-kultivering av modne THP-1 DC med *E.coli* Nissle 1917 førte til en noe økt ekspresjon av CD80, men ikke økt CD83 og CD86, sammenlignet med kontrollcellene (figur 4.1, blå).



Figur 4.2. Resultat fra væskestrømscytometrisk analyse av overflatemarkørerne hos umodne THP-1 DC. Umodne THP-1 DC ble ko-kultivert, i ulike brønner, med *M.capsulatus* (Bath og Texas) og *E.coli* Nissle 1917 i et døgn. Forsøket ble gjennomført to ganger. Resultatene er fra et forsøk.

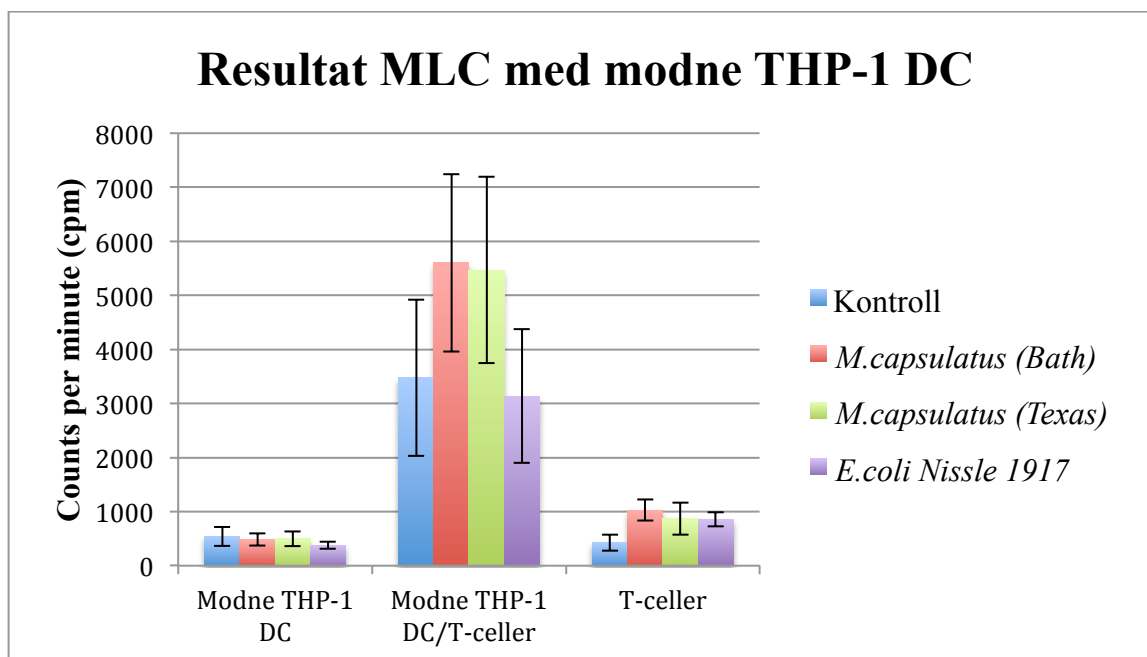
Umodne THP-1 DC uttrykker ikke CD83 (Berges et al., 2005). Resultatene her viser imidlertid en økt ekspresjon av CD83 hos umodne THP-1 DC etter ko-kultivering med bakterier, sammenlignet med kontrollcellene (figur 4.2, CD83, grønn, blå og rosa). Der *M.capsulatus* (Bath og Texas) induserer noe mer ekspresjon av CD83 hos umodne THP-1 DC, enn *E.coli* Nissle 1917. *E.coli* Nissle 1917 induserer også en økt ekspresjon av CD80 hos umodne THP-1 DC i forhold til *M.capsulatus* (Bath og Texas). Det ble også vist en svak økning i ekspresjon av CD86 hos umodne DC ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath og Texas) (figur 4.2, CD86, grønn og rosa), sammenlignet med kontrollcellene.

Resultatene viser at de ulike Gram-negative bakteriene påvirke ekspresjon av overflatemarkører hos THP-1 DC. Der *M. capsulatus* (Bath) fører til økt ekspresjon av CD80, CD86 og CD83 hos modne THP-1 DC. Ko-kultivering av umodne THP-1 DC med Gram-negative bakterier fører til økt ekspresjon av CD83. *E.coli* Nissle 1917 induserer også en økt ekspresjon av CD80 hos umodne THP-1 DC, og til en viss grad også hos modne THP-1 DC. Umodne THP-1 DC ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath og Texas) viste en noe økt ekspresjon av CD86.

4.2 Blandet leukocyttkultur (mixed leukocyte culture, MLC) med modne THP-1 DC.

Etter å ha bekreftet at modne THP-1 DC uttrykker de to ko-stimulatoriske molekylerne CD80 og CD86 ble det utført en variant av MLC. Der THP-1 DC ble benyttet som stimulatorcelle for humane T-celler. THP-1 DC ble ko-kultivert med ulike Gram-negative bakterier i forkant av tilsettelse av T-celler. Bakteriene hadde vist å påvirke ekspresjon av overflatemarkører, det var dermed av interesse å se hvordan bakteriene påvirket THP-1 DC evne til å aktiverte humane alloreaktive T-celler.

Etter systematisk arbeid, for å finne en best mulig protokoll for bruk av modne THP-1 DC som stimulatorcelle i en MLC, ble følgende protokoll benyttet; bakterier og differensieringsmedium for modne THP-1 DC ble tilsatt til cellene samme dag, cellene ble deretter sådd ut i 96-brønners plate. På dag 3 ble cellene mitomycin C-behandlet, for å hindre videre proliferasjon av THP-1 cellene, og vasket tre ganger før tilsetting av T-celler. Dag 8 ble THP-1 cellene pulset med ^3H -Tymidine, før platen ble høstet på dag 9. Modne THP-1 DC ble ko-kultivert med bakteriene i tre døgn, da dette førte til mest proliferasjon hos de humane T-celler. Resultat fra MLC med modne THP-1 DC vises i figur 4.3.



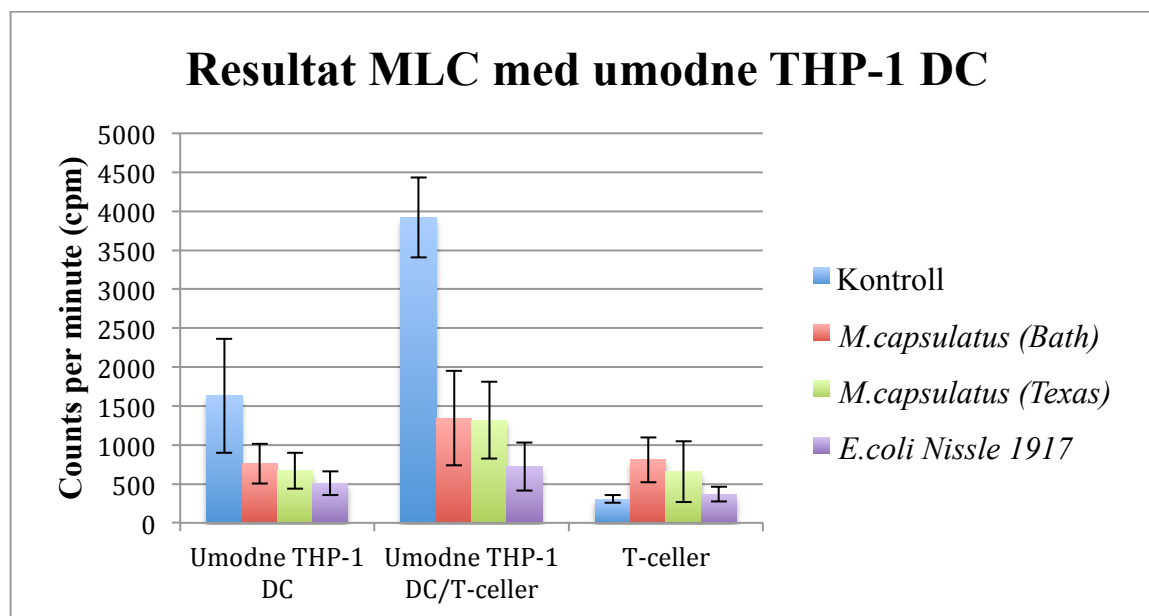
Figur 4.3. Resultat fra MLC med modne THP-1 DC. Modne THP-1 DC ble ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917 i tre døgn, før de ble tilsatt T-celler. Resultatet er vist som gjennomsnittlig cpm ± standardfeil. En p-verdi < 0,05 ble ansett som statistisk signifikant.

Resultatet viser at modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath og Texas) fører til ~63% økt T-celleproliferasjon, mens *E. coli* Nissle 1917 fører til 11% lavere T-celleproliferasjon, sammenlignet med kontroll celler (figur 4.3). Resultatene viser dermed at modne THP-1 DC fungerer som APC for humane T-celler og at ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath og Texas) fører til en økt T-celleproliferasjon, sammenlignet med kontroll.

4.3 Blandet leukocytkultur (mixed leukocyte culture, MLC) med umodne THP-1 DC.

Andre studier har vist at modne THP-1 DC ikke kan differensieres videre til modne THP-1 DC (Berges et al., 2005). Resultatene fra væskestrømscytometrisk analyse av overflatemarkører hos umodne THP-1 DC viste imidlertid at ko-kultivert med intakte Gram-negative bakterier førte til en økt ekspresjon av CD83. På bakgrunn av at CD83 er en markør for modne DC var det ønsket å se om bakteriene hadde klart å indusere en modning hos de umodne THP-1 DC. Dette ble studert ved å se på cellenes evne til å aktivere humane alloreaktive T-celler, da dette er en egenskap som er karakteristisk for modne DC.

THP-1 DC ble differensiert mot umodne THP-1 DC i 5 døgn, mediet ble skiftet på dag 2 og 4. Bakterier ble tilsatt på dag 4, før cellene ble mitomycin C-behandlet og tilsatt T-celler på dag 5. Umodne THP-1 DC ble ko-kultivert med bakterier i ett døgn. Resultatet fra MLC med umodne THP-1 DC vises i figur 4.4.

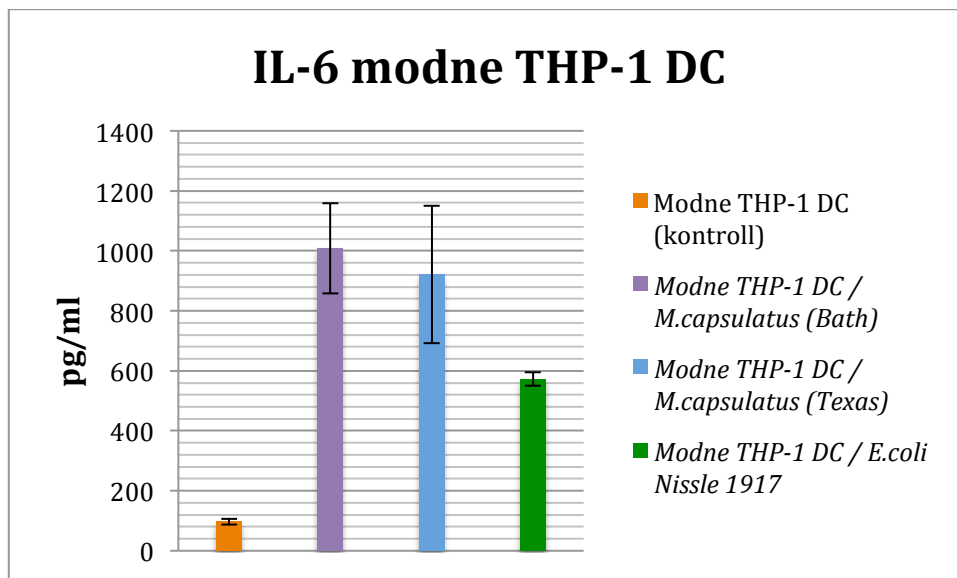


Figur 4.4. Resultat fra MLC umodne THP-1. Umodne THP-1 DC ble ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og *E.coli* Nissle 1917 i et døgn, før det ble tilsatt T-celler. Resultatet er vist som gjennomsnittlig cpm ± standardfeil. En p-verdi < 0,05 ble ansett som statistisk signifikant.

Der var en signifikant nedgang i T-celleproliferasjon hos T-celler stimulert av umodne THP-1 DC ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath) (-66%, p=0,03), *M.capsulatus* (Texas) (-66%, p=0,02) og *E.coli* Nissle 1917 (-82%, p=0,006), sammenlignet med kontroll. Resultatene viser dermed at umodne THP-1 DC har evne til å aktivere humane T-cellene, men at ko-kultivering med bakterier reduserer cellenes evne til å stimulere til proliferasjon i T-cellene.

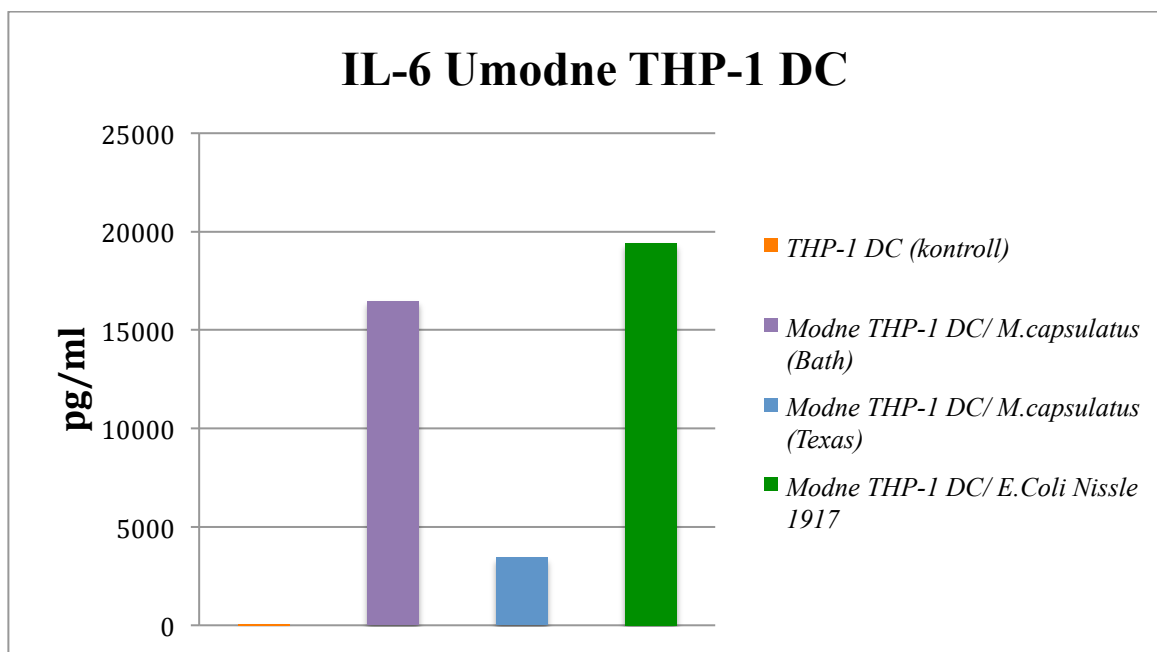
4.4 Cytokinproduksjon hos umodne/modne THP-1 DC.

Resultatene fra MLC med modne og umodne THP-1 DC viste at bakteriene påvirket cellenes evne til å aktivere de humane T-celler. Det var derfor naturlig å studere om bakteriene også induiserte til ulik produksjon av cytokiner, da cytokiner bidrar både i aktivering og polarisering av T-celler. Innholdet av cytokinene interleukin-6 (IL-6), IL-10 og IL-12 i supernatant fra modne og umodne THP-1 DC ble kvantitert ved enzym-linket immunosorbent assay (ELISA). Kvantitert IL-6 i supernatant fra modne og umodne THP-1 DC vises i figur 4.5 og 4.6.



Figur 4.5. Gjennomsnittlig konsentrasjon av kvantitert IL-6 i supernatant fra modne THP-1 DC alene, eller ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og *E.coli* Nissle 1917. Resultatene er fra tre ulike oppsett, og er vist som gjennomsnittlig konsentrasjon \pm standardfeil. En p-verdi $< 0,05$ ble ansett som statistisk signifikant.

Det ble detektert lave konsentrasjoner av IL-6 i supernatant fra modne THP-1 DC alene. I supernatant fra modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath og Texas) ble det imidlertid detektert en signifikant økning i konsentrasjon av IL-6 på henholdsvis 940% ($p=0,004$) og 849% ($p=0,02$), sammenlignet med modne THP-1 DC (kontroll). Modne THP-1 DC ko-kultivert med *E.coli* Nissle 1917 viste lavere produksjon av IL-6 i forhold til *M. capsulatus* (Bath og Texas), men fortsatt en signifikant økning sammenlignet med kontroll (490%, $p=0,00004$). Resultatene viser at ko-kultivering av modne THP-1 DC med *M. capsulatus* (Bath og Texas) indukere en økt sekresjon av IL-6 fra cellene, i forhold til ko-kultivering med *E. Coli* Nissle 1917.



Figur 4.6. Gjennomsnittlig konsentrasjon av kvantitert IL-6 i supernatant fra umodne THP-1 DC alene, eller ko-kultivert med *M.capsulatus* (Bath), *M.capsulatus* (Texas) og *E.coli* Nissle 1917. Resultatene er fra ett oppsett.

Resultatene viser at umodne THP-1 DC sekreterer lite IL-6, mens ko-kultivering med bakterier fører til økt sekresjon av IL-6. Det ble detektert høyest konsentrasjon av IL-6 i supernatant fra umodne THP-1 DC ko-kultivert med *E.coli* Nissle 1917 og *M.capsulatus* (Bath), med en økning på henholdsvis $1,9 \times 10^4$ pg/ml og $1,6 \times 10^4$ pg/ml, sammenlignet med kontroll. Ko-kultivering av umodne THP-1 DC med *M.capsulatus* (Texas) viste en mye lavere sekresjon av IL-6, med en økning på $6,4 \times 10^3$ pg/ml, sammenlignet med kontroll

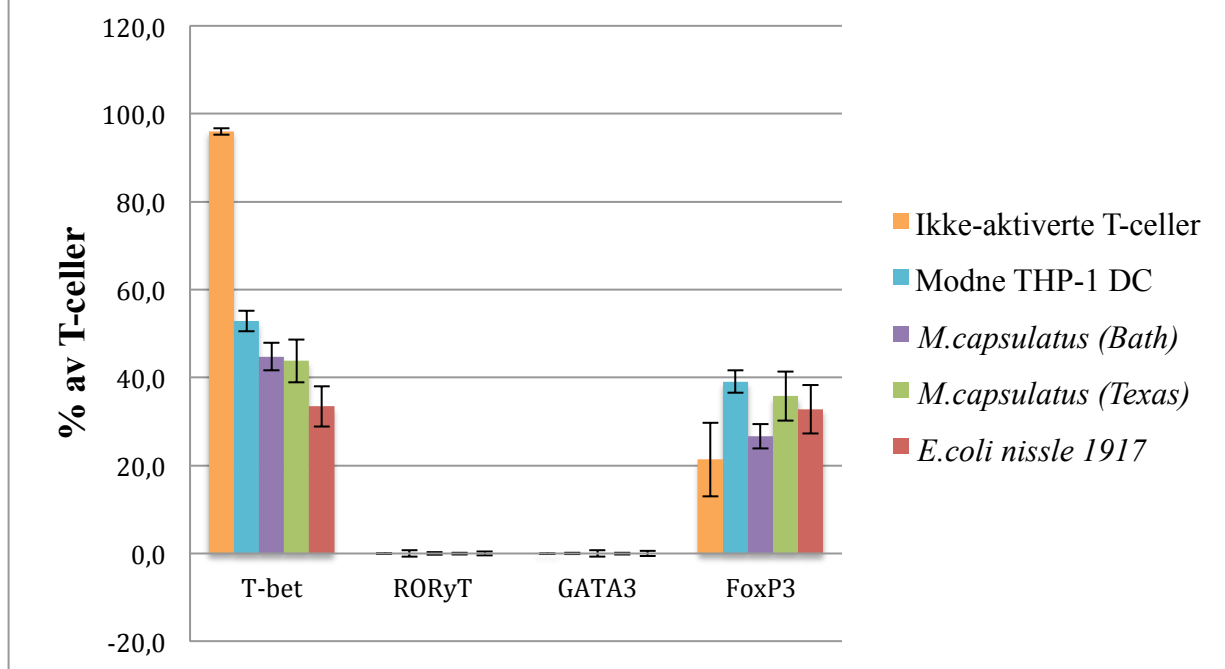
Kvantitering av cytokinene IL-10 og IL-12 i supernatant fra umodne THP-1 DC alene viste at umodne THP-1 ikke sekreterte IL-10 og IL-12, da de ikke kunne detekteres i supernatanten. Resultatet er ikke vist.

Alle de Gram-negative bakteriene induserer til økt sekresjon av IL-6 hos modne og umodne THP-1 DC, sammenlignet med kontroll. Umodne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) og *E. coli* Nissle 1917 induserer til økt sekresjon av IL-6, sammenlignet med *M. capsulatus* (Texas). Mens hos modne THP-1 DC ble det vist at *M. capsulatus* (Bath og Texas) induserer til økt sekresjon av IL-6, i forhold til *E. coli* Nissle 1917. Kvantitering av IL-6 viser og at umodne THP-1 DC sekreterer 15-30 ganger så mye IL-6 som modne THP-1 DC.

4.5 Ekspresjon av transkripsjonsfaktorer hos T-celler fra MLC med modne THP-1 DC.

Dendritiske celler (DC) er sentrale i aktivering og polariseringen av naive T-celler. Gjenkjennelse og binding av ulike bakterier via mønstergjenkjennende reseptorer vil kunne aktivere ulike intracellulære signalveier hos DC, noe som igjen påvirker deres egenskaper i polarisering og aktivering av T-celler. MLC resultatene viste at modne THP-1 DC stimulerte til proliferasjon i humane T-celler, og at *M.capsulatus* (Bath og Texas) førte til en ytterligere prolifisering. For å undersøke om de ulike Gram-negative bakteriene også påvirket THP-1 DCs evne til å polarisere til ulike T-effektorceller ble det utført væskestrømscytometriske analyser av intracellulære transkripsjonsfaktorer med fluorokromkonjugerte antistoffer hos de aktiverte T-celler i en MLC. Det ble utført på følgende måte; modne THP-1 DC ble ko-kultivert med de ulike bakteriene i tre døgn, før cellene ble mitomycin C-behandlet og tilsatt T-celler. På dag 8 ble det utført væskestrømscytometriske analyser. Det ble testet for ekspresjon av transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA-3, ROR γ T og Foxp3, som uttrykkes hos henholdsvis T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} og T_{reg} (Kemeny, 2012). Forsøket ble utført 3 ganger, med T-celler fra tre ulike givere. Det ble også utført væskestrømscytometriske analyser av intracellulære transkripsjonsfaktorer hos ikke-aktivert T-celler fra samme givere. Forsøket ble ikke utført med umodne THP-1 DC, da de ikke hadde vist samme evne til å aktivere humane T-celler. Resultatet vises i figur 4.7.

Transkripsjonsfaktorer detektert hos T-celler fra MLC



Figur 4.7. Resultat av væskestrømscytometriske analyser av intracellulære transkripsjonsfaktorer hos ikke-aktiverede T-celler, T-celler stimulert av modne THP-1 DC alene, eller ko-kultivert med bakteriene *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli nissle* 1917. Resultatet er vist som gjennomsnittsverdi \pm standardfeil. En p -verdi $< 0,05$ ble ansett som statistisk signifikant.

Resultatet viser at T-celler aktivert av modne THP-1 DC uttrykker signifikant mindre T-bet, sammenlignet med de ikke-aktiverede T-cellene (gjennomsnittlig -54%, $p \approx 0,0001$). Bakteriene ser imidlertid ikke ut til å påvirke ekspresjon av T-bet hos de aktiverte T-cellene. Den eneste signifikante forskjellen som kunne detekteres var en reduksjon i T-bet uttrykt hos modne THP-1 DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917, sammenlignet med modne THP-1 DC alene (-37%, $p=0,02$).

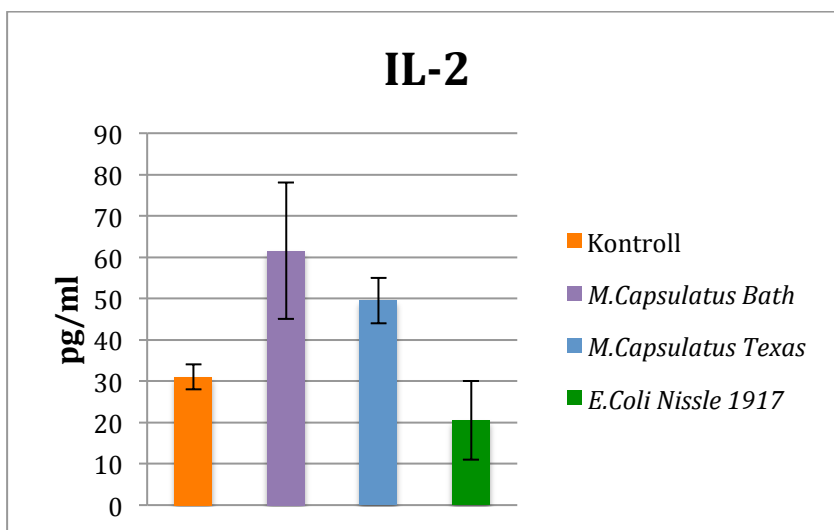
På den andre siden viser resultatene at aktiverte T-celler har økt ekspresjon av Foxp3 sammenlignet med de ikke-aktiverede T-cellene. T-cellene stimulert av modne THP-1 DC gir 83% økt ekspresjon av Foxp3, sammenlignet med de ikke-aktiverede. Ko-kultivering av modne THP-1 DC med *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917 fører til en økt ekspresjon av Foxp3 hos T-cellene på hhv. 24%, 67% og 53%, sammenlignet med ikke-aktivert T-celler. Hvilket betyr at T-celler stimulert at modne THP-1 DC alene ga høyest ekspresjon av Foxp3. Bakteriene ser imidlertid ikke ut til å påvirke ekspresjon av Foxp3 hos de

aktiverte T-cellene i stor grad. Den eneste signifikante forskjellen som kunne detekteres var en reduksjon i Foxp3 uttrykt hos T-celler stimulert av modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath), sammenlignet med modne THP-1 DC alene (-32%, p=0,03). Ko-kultivering av modne THP-1 DC med *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917 ga en nedgang i ekspresjon av Foxp3 hos T-cellene på henholdsvis 8% og 16%, sammenlignet med T-cellene stimulert av modne THP-1 DC alene.

T-celler stimulert av modne THP-1 DC viser dermed lavere ekspresjon av T-bet, men økt ekspresjon av Foxp3, sammenlignet med ikke-aktiverte celler. Bakteriene viste imidlertid ikke å påvirke ekspresjonen av T-bet og Foxp3 i stor grad, annet enn en noe lavere ekspresjon av T-bet og Foxp3 hos de aktiverte T-cellene, sammenlignet med T-cellene aktivert av modne THP-1 DC alene.

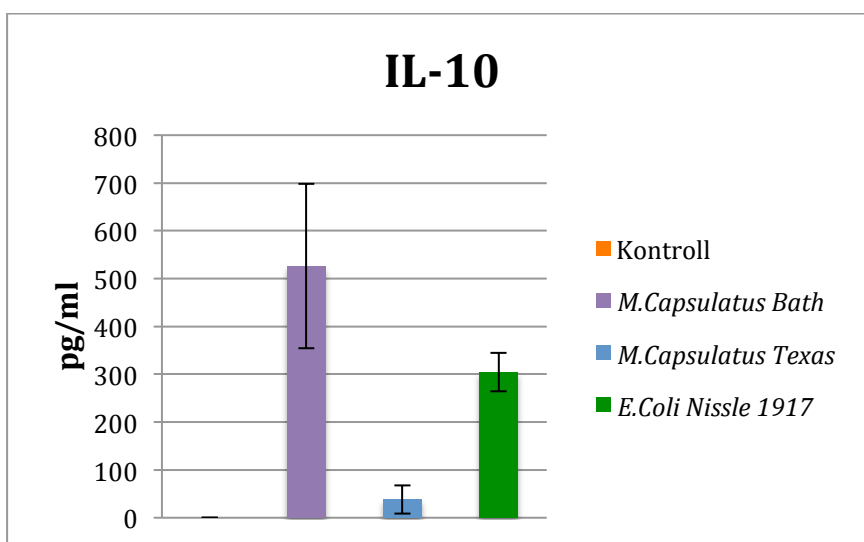
4.6 Cytokinproduksjon av IL-2 og IL-10 hos T-celler fra MLC

For å undersøke om bakterienes påvirkning på modne THP-1 DC også hadde betydning for cytokinproduksjon hos de humane T-cellene ble cytokinene IL-2 og IL-10 kvantitert i supernatant fra MLC. IL-2 ble valgt fordi det er et cytokin som bidrar både i aktivering og polarisering av T-celler (Bachmann & Oxenius, 2007). IL-10 er et anti-inflammatorisk cytokin som bidrar i regulering av immunrespons, og fører til økt proliferasjon hos regulatoriske T-celler (Saraiva & O'Garra, 2010). Supernatant for kvantiering av cytokiner ble hentet ut samme dag som det ble utført intracellulær farging av transkripsjonsfaktorer av T-celler. Kvantitert IL-2 vises i figur 4.8, mens kvantitert IL-10 vises i figur 4.9.



Figur 4.8. Kvantitert IL-2 i supernatant fra MLC. IL-2 produsert av T-celler stimulert av modne THP-1 DC (Kontroll), modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917. Resultat fra to ulike givere. Resultatet er vist som gjennomsnittsverdi \pm standardfeil, der en p-verdi $< 0,05$ ble ansett som statistisk signifikant.

Resultatet viser at IL-2 sekresjonen fra T-cellene er høyest etter stimulering fra modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas), med en økning på henholdsvis 98% og 60%, sammenlignet med kontroll. Ko-kultivering av modne THP-1 DC og *E. coli* Nissle 1917 gir lavest IL-2 sekresjons fra T-cellene, med en nedgang på 34% sammenlignet med kontroll. Det ble ikke detektert noen signifikante forskjeller i IL-2 produksjon.



Figur 4.9. Kvantitert IL-10 i supernatant fra MLC. IL-10 produsert av T-celler stimulert av modne THP-1 DC (Kontroll), modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917. Resultat fra to ulike givere. Resultatet er vist som gjennomsnittsverdi \pm standardfeil, der en p-verdi $< 0,05$ ble ansett som statistisk signifikant.

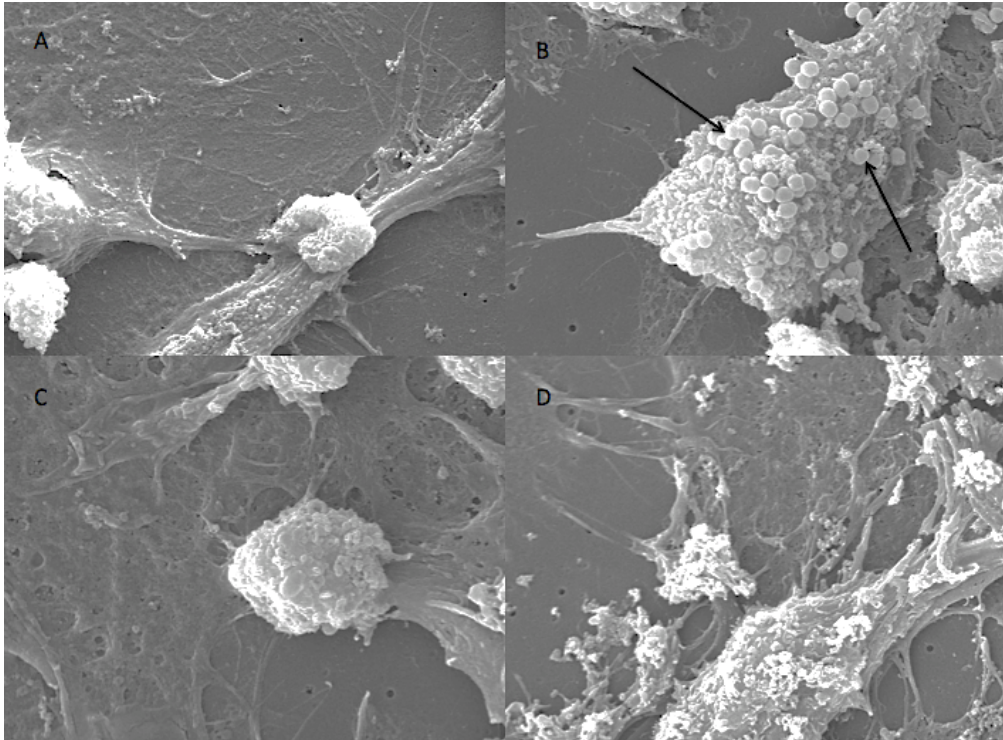
Det ble ikke detekteres IL-10 i supernatant fra T-celler stimulert av modne THP-1 DC alene (Figur 4.9). Ko-kultivering av modne THP-1 DC med *M. capsulatus* (Bath) førte til mest sekresjon av IL-10 fra T-cellene, med en økning på 526 pg/ml sammenlignet med kontroll (0 pg/ml). Ko-kultivering av modne THP-1 DC med *E. coli* Nissle 1917 førte òg til en økt sekresjon av IL-10 på 304,8pg/ml fra T-cellene, men 42% lavere enn *M. capsulatus* (Bath). Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Texas) ga lavest IL-10 produksjon, med en økning på kun 38pg/ml sammenlignet med kontroll. Ko-kultivering med *M. capsulatus* (Texas) førte dermed til 93% mindre IL-10 sekresjon, sammenlignet med IL-10 sekresjon fra T-cellene stimulert av modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath).

Kort oppsummert viser T-celler stimulert av modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) høyest IL-2 og IL-10 produksjon, sammenlignet med kontroll. T-celler stimulert av modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917 gir lavest sekresjon av henholdsvis IL-10 og IL-2.

4.7 Resultat bindingsforsøk

4.7.1 Binding av *M. capsulatus* (Bath og Texas) og *E. coli* Nissle 1917 til modne THP-1 DC.

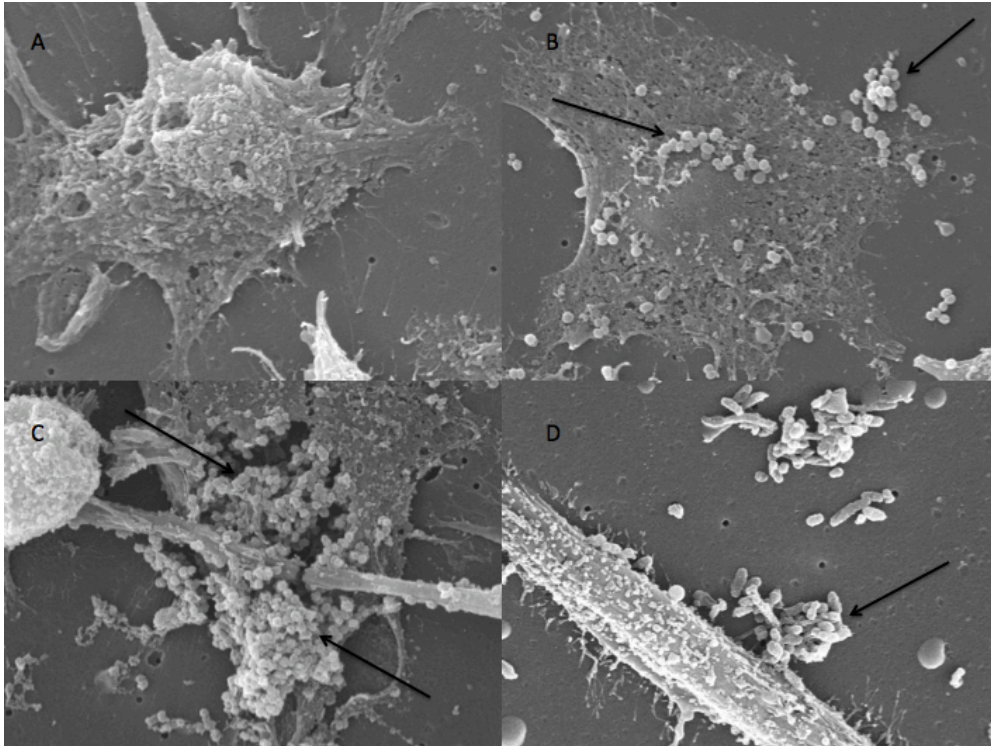
Andre studier har vist at den ikke-kommensale jordbakterien *M. capsulatus* (Bath) har immunregulerende egenskaper ved å hemme DSS-indusert kolitt hos mus (Kleiveland et al., 2013). *In vitro* studier har òg vist at *M. capsulatus* (Bath), og ikke *M. capsulatus* (Texas), binder seg spesifikt til umodne humane CD14⁺ monocyttderiverte dendrittiske celler (ikke publisert data). Formålet med dette forsøket var derfor å se om denne spesifikke bindingen av *M. capsulatus* (Bath) til umodne humane CD14⁺ monocyttderiverte dendrittiske celler, også kunne detekteres hos THP-1 DC. Bindingsforsøket ble utført ved at modne THP-1 DC ble ko-kultivert med bakteriene i 3 timer, samme ko-kultiveringstid som ble brukt i oppsett med umodne CD14⁺ monocyttderiverte dendrittiske celler (ikke publisert data), før de ble preparert til sveipeelektronmikroskopi - SEM. Resultatet vises i figur 4.10.



Figur 4.10. SEM-bilder av modne THP-1 DC ko-kultivert med bakterier i 3 timer **A.** Modne THP-1 DC (kontroll) **B.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. Capsulatus* (Bath) **C.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M.capsulatus* (Texas) **D.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *E.coli* Nissle 1917

SEM bildene av modne THP-1 celler ko-kultivert med bakterier i tre timer viser kun binding av *M. capsulatus* (Bath) (figur 4.10, B). Resultatet med modne THP-1 DC bekrefter dermed tidligere resultater med umodne CD14+ monocyttderiverte dendrittiske celler, ved å vise binding av kun *M. capsulatus* (Bath). Ko-kultivering av modne THP-1 DC med *E.coli* Nissle 1917 og *M. capsulatus* (Texas) viser ingen binding av bakteriene til cellene (figur 4.10, C og D).

MLC resultater i denne oppgaven har vist at modne THP-1 DC ko-kultivert med både *M. capsulatus* (Bath og Texas) fører til en økt T-celleproliferasjon. For å undersøke om ko-kultiveringstiden var av betydning for binding av bakterier til cellene ble det utført samme bindingsforsøk med en ko-kultiveringstid på 3 døgn. Resultatet vises i figur 4.11.



Figur 4.11. SEM-bilder av modne THP-1 DC ko-kultivert med bakterier i 3 døgn **A.** Modne THP-1 DC (kontroll) **B.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) **C.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Texas) **D.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917

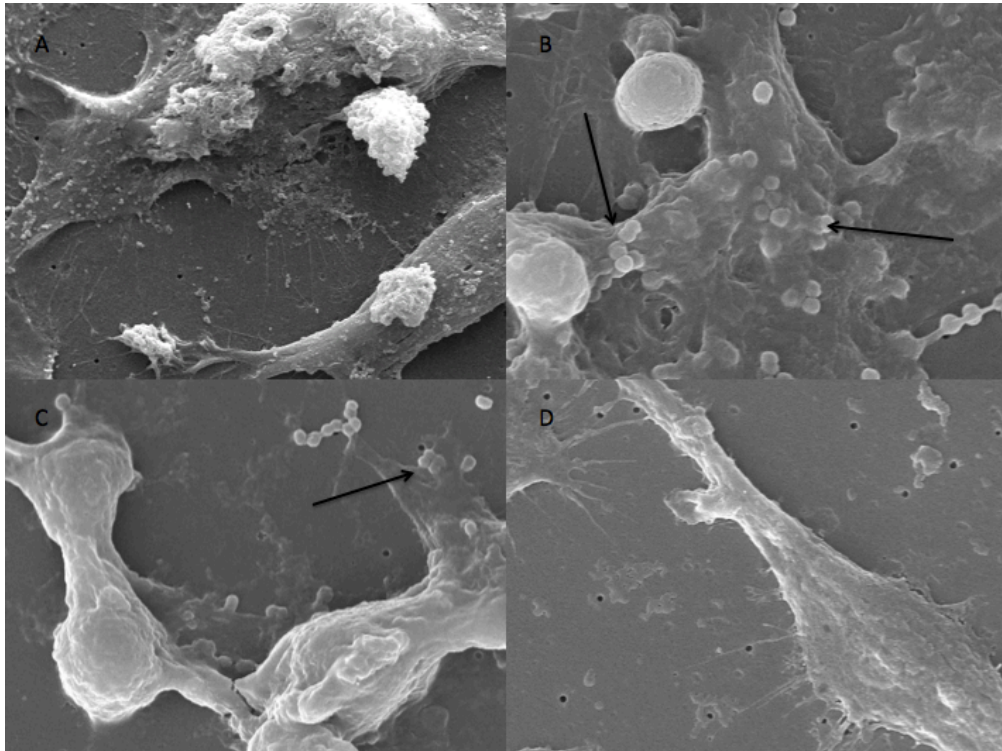
SEM bildene av modne THP-1 celler ko-kultivert med bakterier i tre døgn viser at både *M. capsulatus* (Bath og Texas) binder til modne THP-1 DC, der *M. capsulatus* (Texas) ser ut til å binde sterkere enn *M. capsulatus* (Bath) (Figur 4.11, B og C). *E. coli* Nissle 1917 viser ingen stor grad av binding til modne THP-1 DC (figur 12, D).

Resultatene viser kun binding av *M. capsulatus* (Bath) til modne THP-1 DC etter å ha vært ko-kultivert med de ulike bakteriene i tre timer. Ko-kultivering av bakterier med modne THP-1 i tre døgn, slik som i en MLC, viser både *M. capsulatus* (Bath og Texas) binding til cellene. *E. coli* Nissle 1917 viser ikke særlig grad av binding til modne THP-1 DC, uavhengig av ko-kultiveringstid.

4.7.2 Binding av *M. capsulatus* (Bath og Texas) og *E. coli* Nissle 1917 til umodne THP-1 DC.

Andre studier har vist at umodne THP-1 DC har ikke egenskapen til å differensieres til modne THP-1 DC i respons på stimuli fra ulike cytokiner og DC modningsfaktorer (Berges et al., 2005). I denne oppgaven er det imidlertid vist at ko-kultivering av umodne THP-1 DC og

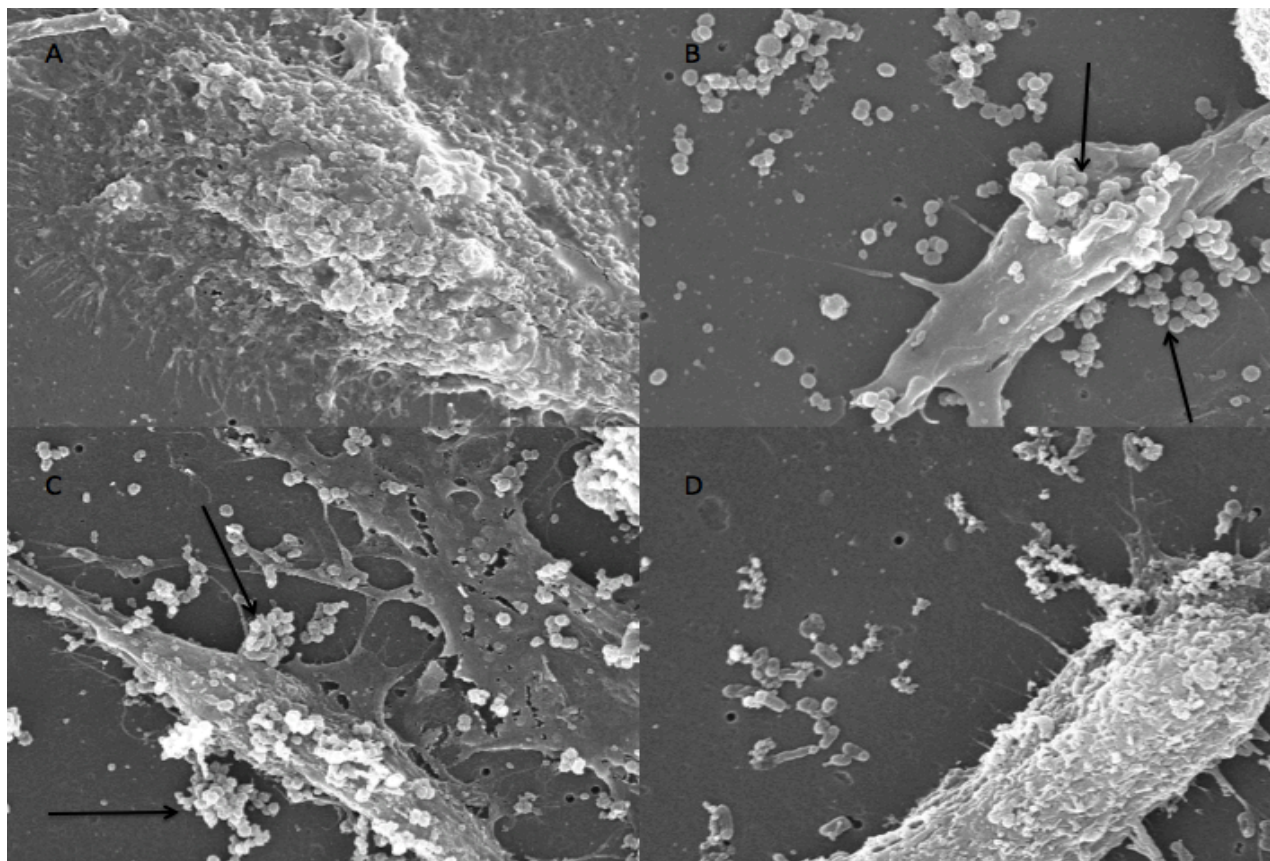
intakte Gram-negative bakterier induerte en viss modning, vist ved økt ekspresjon av CD83. Det er også vist at i en MLC med umodne THP-1 DC vil bakteriene redusere cellenes evne til å stimulere til proliferasjon hos humane T-celler. På bakgrunn av disse observasjonene var det av interesse å nærmere studere interaksjonen mellom bakteriene og umodne THP-1 DC. Det ble dermed utført bindingsforsøk med umodne THP-1 DC ko-kultivert med bakteriene i tre timer, før de ble preparert til sveipeelektronmikroskopi. Resultatet er vist i figur 4.12.



Figur 4.12. SEM-bilder av umodne THP-1 DC ko-kultivert med bakterier i 3 timer **A.** Modne THP-1 DC (kontroll) **B.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) **C.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Texas) **D.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917

SEM-bildene av umodne THP-1 DC ko-kultivert med bakterier i tre timer viser at både *M. capsulatus* (Bath og Texas) blir endocyttert, og da *M. capsulatus* (Bath) i større grad enn *M. capsulatus* (Texas) (figur 4.12, B og C). *E. coli* Nissle 1917 viste ingen tegn til å binde til, eller bli endocyttert, av umodne THP-1 DC (figur 4.12, D).

Vi hadde vist at ko-kultiveringstiden var avgjørende for binding av *M. capsulatus* (Texas) til modne THP-1 DC. For å se om ko-kultiveringstiden også var av betydning for bakterienes evne til å binde til umodne THP-1 DC, ble det utført bindingsforsøk med umodne THP-1 DC ko-kultivert med bakterier i et døgn. Resultatet vises i figur 4.13.



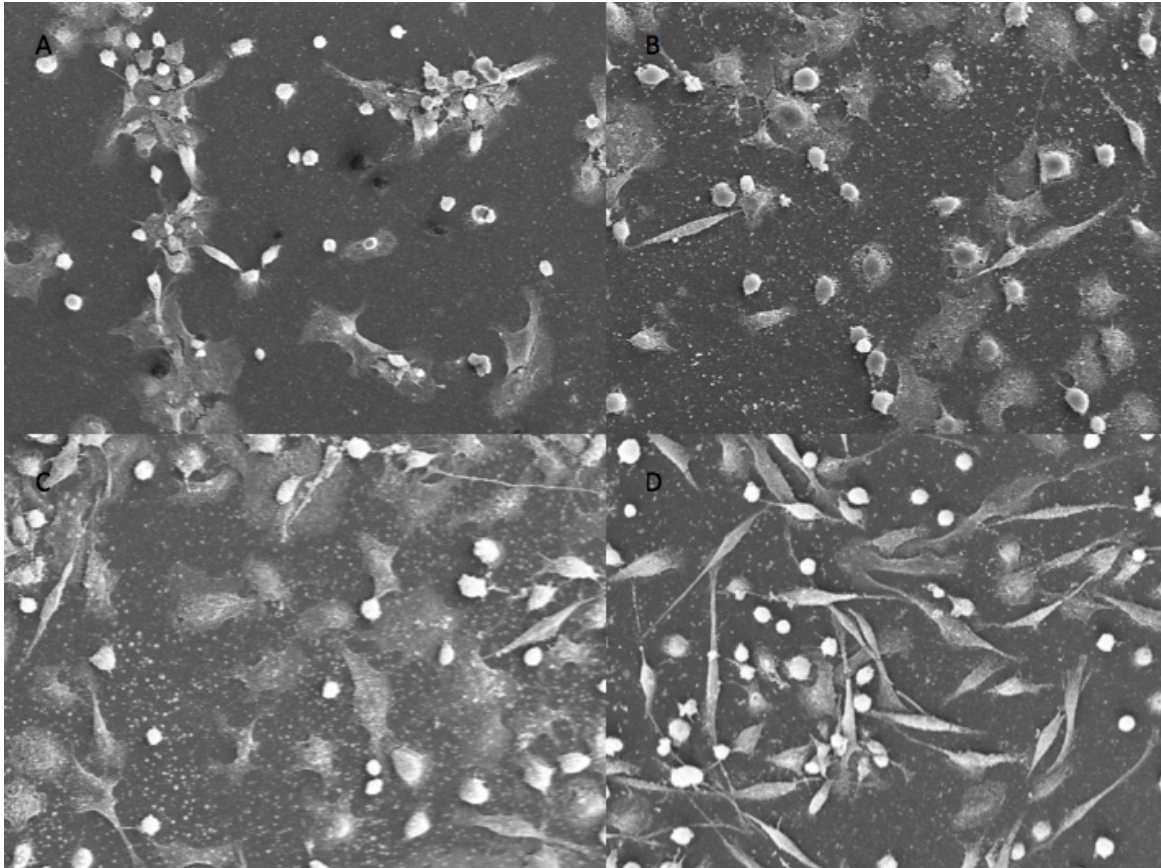
Figur 4.13. SEM-bilder av umodne THP-1 DC ko-kultivert med bakterier i et døgn. **A.** Modne THP-1 DC (kontroll) **B.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) **C.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Texas) **D.** Modne THP-1 DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917

SEM bildene av umodne THP-1 DC ko-kultivert med bakterier i et døgn viser binding av både *M. capsulatus* (Bath og Texas) (figur 4.13, B og C). *E. coli* Nissle 1917 viser ikke samme evne til å binde til umodne THP-1 (Figur 4.13, D).

Dette viser at binding av bakteriene til umodne THP-1 DC også er avhengig av ko-kultiveringstid. Ko-kultiveringstid på et døgn viser at *M. capsulatus* (Bath og Texas) begge binder til umodne THP-1 DC, mens en ko-kultiveringstid på tre timer viser at både *M. capsulatus* (Bath og Texas) bli endocyttert av cellene. *E. coli* Nissle 1917 viser ingen binding til umoden THP-1 DC, uavhengig av ko-kultiveringstid.

4.7.3 Morfologisk endring av modne THP-1 ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917.

I tillegg til binding av de ulike bakteriene til modne THP-1 DC ble det observert en vesentlig endring i morfologi hos de modne THP-1 cellene som var ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 i tre døgn. Endring i morfologi vises i figur 4.14.



Figur 4.14. SEM-bilder av morfologiske endringer av modne THP-1 celler ko-kultivert med bakterier i 3 døgn. **A.** Modne THP-1 (kontroll) **B.** Modne THP-1 og *M. capsulatus* (Bath) **C.** Modne THP-1 og *M. capsulatus* (Texas) **D.** Modne THP-1 og *E. coli* Nissle 1917.

Modne THP-1 DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 viser en mye mer utstrakt morfologi og økt mengde utløpere (dendritter) på overflaten (figur 4.14, D), sammenlignet med modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath og Texas) (figur 4.14, B og C).

4.8 Konstruksjon av *M. capsulatus* (Bath) Pile mutant

Både *M. capsulatus* (Bath og Texas) inneholder gener som koder for type IV pili (T4P) piliner og tip-adhesiner. T4P er assosiert med binding av blant annet eukaryote celler (Mattick, 2002). Ved sammenligning av genomisk DNA sekvens var det identifisert forskjeller i genet som koder for Pile, en av byggesteinene i T4P, og et adhesin (masteroppgave Stine Indrelid, UMB 2013). For å se om T4P bidro i den spesifikke binding av *M. capsulatus* (Bath) til CD14⁺ monocytt-deriverte dendritiske celler, ble det forsøkt å lage en mutant av *M. capsulatus* (Bath), der genet som kodet for Pile og adhesinet ble deletert. Genene for Pile og adhesinet er to nærliggende gener, og ble dermed fjernet samtidig. Dette ble utført ved å amplifisere og fusjonere ca. 1000kb oppstrøms og nedstrøms for Pile/adhesin genene ved PCR, kalt Δ Pile. Δ Pile ble deretter ligert inn i selvmordsvektoren (pJQ200SK), videre kalt pJQ Δ Pile. At Δ Pile inneholdt riktige sekvenser ble bekreftet ved sekvensering. pJQ Δ Pile ble deretter overført til *E.coli* TOP10. Konjugering av pJQ Δ Pile inn i *M. capsulatus* (Bath) ble utført ved triparental mating. Dette ble vellykket gjennomført en gang, men på grunn av manglende tid ble det ikke utført videre arbeid med *M.capsulatus* (Bath) Δ Pile genet.

5 Diskusjon

5.1 THP-1 celler - Et modellsystem for *in vitro* studier av immunmodulerende effekter på dendrittske celler.

Bakgrunnen for denne oppgaven var å studere de mulige immunmodulerende effektene av *M. capsulatus* (Bath) på dendrittske celler (DC). Det mest brukte modellsystemet for *in vitro* studier av humane dendrittske celler er utført ved bruk av CD14⁺ monocytt-deriverte DC. I 2005 presenterte Berges et.al en human monocytteleukemicellelinje (THP-1), som kunne differensieres til dendrittske celler (DC). Berges et.al viste at THP-1 innehar mange av de samme egenskapene som CD14⁺ monocytt-deriverte DC. Bruk av en cellelinje i stedet for primære celler har flere fordeler. Blant annet kan en ved bruk av cellelinjer utelukke donorvariasjoner, noe som gir mer reproducerbare resultater. *In vitro* studier av humane DC vil ikke klare å gjenskape de cellulære forholdene *in vivo*. Det er dermed observerbare forskjeller i respons på ulike stimuli en ønsker å detektere. Denne oppgaven viser dermed at THP-1 kan representere et mulig modellsystem for studier av immunmodulerende effekter på humane DC.

THP-1 celler kan differensieres til umodne og modne dendrittske celler, og som tidligere nevnt er de vist å inneha mange av de samme egenskapene som en CD14⁺ monocytt-deriverte dendrittske celler (Berges et al., 2005). Samtidig er det forskjeller mellom THP-1 DC og CD14⁺ monocytt-deriverte dendrittske celler. Det er blant annet ikke mulige å indusere en fullstendig modning av umodne THP-1 DC (Berges et al., 2005). Flere av forsøkene ble dermed utført med både modne og umodne THP-1 DC for å undersøke endringer i cytokinproduksjon, og ekspresjon av overflatemarkører som funksjon av modning. THP-1 er en mye brukt cellelinje for studier av monocytter og makrofager, men kun Berges et.al (2005) omtaler differensiering av THP-1 til dendrittske celler. På bakgrunn av dette har resultatene i denne oppgaven i stor grad blitt sammenlignet med studier utført med CD14⁺ monocytt-deriverte dendrittske celler.

5.2 Ekspresjon av overflatemarkørene CD80, CD83 og CD86 hos THP-1 DC

CD80 og CD86 er to viktige ko-stimulatoriske molekyler i T-celleaktiveringsprosessen, mens CD83 er en modningsmarkør for DC. Både CD80, CD86 og CD83 uttrykkes kun hos modne/aktiverede dendritiske celler (DC). Modne THP-1 DC er vist å ha *de novo* ekspresjon av både CD80 og CD86 ett døgn etter tilsetning av differensieringsmedium (Berges et al., 2005). Ko-kultivering av modne THP-1 DC med *M. capsulatus* (Bath og Texas) førte til en ytterligere økt ekspresjon av både CD80, CD83 og CD86, sammenlignet med kontroll (Figur 4.1). *E. coli* Nissle 1917, en annen gammaproteobakterie, førte ikke til økt ekspresjon av CD80, CD83 og CD86. Lipopolysakkarid (LPS) er en viktig komponent i celleveggen hos Gram-negative bakterier. Binding av LPS til TLR4 er kjent for å aktiverte DC, og bidrar til produksjon av cytokiner og ko-stimulatoriske molekyler for T-celleaktivering (Pufnock et al., 2011). Men LPS er vist å ikke indusere modning av umodne THP-1 DC, noe som kan skyldes lav ekspresjon av TLR4 i cellemembranen hos THP-1 DC (Berges et al., 2005). At LPS ikke klarer å indusere en modning er også funnet hos andre leukemicellelinjer (Kim et al., 2006). På bakgrunn av dette kan man anta at binding av LPS til TLR4 ikke er hovedårsaken til den økte ekspresjonen av CD80, CD83 og CD86 i våre forsøk. Forskjellene i ekspresjon overflatemarkørene etter ko-kultivering av modne THP-1 DC med bakterier indikerer at *M. capsulatus* (Bath og Texas) og *E. coli* Nissle 1917 interagerer med de dendritiske cellene på ulike måter eller med ulik affinitet uavhengig av LPS.

Umodne THP-1 DC ko-kultivert med bakterier viser økt ekspresjon av CD83, sammenlignet med kontroll (Figur 4.2). Der *M. capsulatus* (Bath og Texas) viste å indusere en noe økt ekspresjon av CD83, sammenlignet med *E. coli* Nissle 1917. Økt ekspresjon av CD83 som resultat av ko-kultivering av umodne THP-1 DC med bakterier er i seg selv et interessant funn, da tidligere studier har vist at umodne THP-1 DC ikke kan differensieres til CD83⁺ THP-1 DC ved stimulering med ulike cytokiner og DC modningfaktorer (Berges et al., 2005). Dette indikerer at stimulering av umodne THP-1 DC med intakte bakterier aktiverer andre signalveier enn modningsfaktorene, og dermed klarer å indusere en viss modning av cellene, vist ved økt ekspresjon av CD83.

Det ble også vist at ko-kultivering av umodne THP-1 med *M. capsulatus* (Bath og Texas) førte til en noe økt ekspresjon av CD80 og CD86, mens *E. coli* Nissle 1917 kun førte til økt ekspresjon av CD80, sammenlignet med kontrollcellene. Binding av CD80 og CD86 til CD152 hos T-celler har en inhiberende effekt på T-celleaktiveringsprosessen. Det har vært foreslått at

en økt ekspresjon av CD80, i forhold til CD86, kan bidra til immuntoleranse gjennom interaksjon med CD152 istedenfor CD28 (Sansom, Manzotti, & Zheng, 2003). Noe som kan indikerer at den kkommensale probiotiske bakterien *E. coli* Nissle 1917 inducerer toleranse, vist ved kun økt CD80 ekspresjon hos umodne THP-1 DC.

5.3 THP-1 DC som stimulatorcelle for humane T-celler i MLC

Modne THP-1 DC ble vist å kunne stimulere humane T-celler i et blandet lymfocyttkulturoppsett, vist ved økt T-celleproliferasjon. Dette bekrefter at modne THP-1 DC har egenskaper som APC. Som vist i figur 4.1 resulterte ko-kultivering av modne THP-1 DC med *M. capsulatus* (Bath og Texas) i en økt ekspresjon av de ko-stimulatoriske molekylerne CD80 og CD86 hos cellene, og disse cellene viste seg også å inducere økt proliferasjon hos T-cellene (Figur 4.3). Ko-kultivering av modne THP-1 DC og *E. coli* Nissle 1917 førte derimot ikke til endring i ekspresjon av CD80, CD86 og CD83, noe som reflekteres i at modne THP-1 DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 i førte til økt T-celleproliferasjonen i forhold til kontrollcellene (Figur 4.3).

Karakteristisk for umodne DC er at de ikke uttrykker CD80, CD83 og CD86, og derfor fungerer dårlig som antigenpresenterende celler (APC). Ko-kultivering av umodne THP-1 DC med ulike bakterier førte til en økt ekspresjon av CD83, men lite endring i CD80 og CD86 nivåene. Tidligere studier med umodne THP-1 DC viser at umodne THP-1 DC har dårlig evne til å stimulere CD4⁺ og CD8⁺ T-celler (Berges et al., 2005). Resultatene i denne oppgaven er ikke i overensstemmelse med disse funnene, da umodne THP-1 DC viste en viss evne til å stimulere til proliferasjon av humane T-celler (Figur 4.4). Ko-kultivering av umodne THP-1 DC med bakterier viser imidlertid å hemme stimuleringen av T-cellene, vist ved redusert T-celleproliferasjon. Hvorfor ko-kultivering av umodne THP-1 DC med bakterier fører til økt ekspresjon av CD83, og til en viss grad CD80 og CD86, men inhiberer T-celleproliferasjon, er ukjent. Binding av bakterier til umodne THP-1 DC vil kunne føre til en annen cytokinprofil, endret ekspresjon av overflatereseptorer, aktivere andre signalveier etc., sammenlignet med umodne THP-1 DC alene. Dette vil igjen kunne påvirke umodne THP-1 DCs evne til å inducere proliferasjon i humane T-celler. Det ville derfor vært av interesse å undersøke hvordan binding av bakterier til umodne THP-1 DC påvirker ekspresjon av andre membranmolekyler involvert i T-celleaktiveringen, blant annet HLA klasse II-molekyler.

5.4 Cytokinproduksjon hos umodne og modne THP-1 DC

Cytokiner er viktige mediatorer både i T-celleaktivering og polarisering. For å studere om og eventuelt hvordan bakteriene påvirket THP-1 DCs evne til å produsere cytokiner ble det utført kvantitering av IL-6, IL-10 og IL-12 i supernatanter fra umodne/modne THP-1 DC, alene eller ko-kultivert med bakterier.

IL-6 er et cytokin som blant annet produsert av DC, og som bidrar både i pro- og anti-inflammatoriske prosesser (Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras, & Rose-John, 2011).

Kvantitering av cytokiner viste lave konsentrasjoner IL-6 i supernatanter fra modne/umodne THP-1 DC alene, mens ko-kultivering med bakterier førte til en økt sekresjon av IL-6 hos cellene. Modne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath og Texas) sekreterte større mengder IL-6, sammenlignet med de cellene som var ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 (Figur 4.5). Resultatene viste også en forskjell i IL-6 sekresjon mellom umodne THP-1 DC ko-kultivert *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas), med en økning på henholdsvis 16ng/ml og 3,5ng/ml, sammenlignet med kontroll (Figur 4.6). Ko-kultivering av umodne THP-1 DC og *E. coli* Nissle 1917 førte til mest sekresjon av IL-6 med 19ng/ml sammenlignet med kontroll. Kvantitert IL-6 i supernatant fra umodne THP-1 DC var i tillegg 15-30 ganger så høy som i supernatanter fra modne THP-1 DC. Det er vist at IL-6 bidrar til å opprettholde en umoden tilstand av DC. I tillegg vil en økning i IL-6 signaler motvirke aktivering av T-celler (S. J. Park et al., 2004). Økt sekresjon av IL-6 hos umodne THP-1 DC ko-kultivert med bakterier kan tyde på hvorfor de stimulerte til mindre T-celleproliferasjon, sammenlignet med umodne THP-1 DC alene. Kvantitering av IL-6 viser dermed at *M. capsulatus* (Bath og Texas) og *E. coli* Nissle 1917 induserer til ulike produksjon av IL-6 hos THP-1 DC. Dette indikere at bakteriene binder til THP-1 DC via ulike reseptorer, og dermed aktiverer ulike intracellulære signalveier.

Det ble ikke imidlertid ikke detektert IL-10 eller IL-12 i supernatanter fra umodne THP-1 DC alene, eller ko-kultivert med bakterier. Det ble ikke utført kvantitering av IL-10 og IL-12 i supernatant fra modne THP-1 DC.

5.5 Ekspresjon av transkripsjonsfaktorer hos T-celler fra MLC med modne THP-1 DC

BioProtein (BP) er et proteinrikt bakteriemel som i hovedsak er produsert av *M. capsulatus* (Bath). Tilførsel av BP i dyrefôr har vist å ha dempende effekter på inflammatoriske tilstander i tarm hos ulike dyrearter (Kleiveland et al., 2013; Romarheim et al., 2011). Dendritiske celler (DC) er viktige både i aktivering og polarisering av naive T-celler. Det ble det dermed sett på som en mulighet at *M. capsulatus* (Bath) påvirket DC til polarisering av større mengder regulatoriske T-celler, da regulatoriske T-celler er essensielle for nedregulering og kontroll av immunrespons, men også for å opprettholde en intestinal homeostase ved å forhindre en upassende immunrespons (Barnes & Powrie, 2009). Tidligere resultater i denne oppgaven hadde vist at *M. capsulatus* (Bath og Texas) og *E. coli* Nissle 1917 påvirket THP-1 DCs evne til å aktivere humane T-celler i ulik grad. Det var dermed også av interesse å studere om bakteriene også førte til polarisering av ulike T-hjelperceller. For å studere dette ble det utført væskestrømscytometrisk påvisning av transkripsjonsfaktorene T-bet, Foxp3, GATA3 og ROR γ T, som uttrykkes hos henholdsvis T_H1-, T_{reg}-, T_H2- og T_H17-effektorceller (Zhu et al., 2010). Væskestrømscytometrisk analyse av transkripsjonsfaktorekspresjonen hos aktiverte og ikke-aktiverte T-cellene viste at det i hovedsak ble uttrykt T-bet og Foxp3, og at de ikke-aktiverte T-cellene viste en mye høyere ekspresjon av T-bet enn T-cellene stimulert av modne THP-1 DC (Figur 4.7). Det ble ikke detektert ekspresjon av ROR γ T og GATA3 hos noen av T-cellene. Forsøk ble ikke utført med umodne THP-1 DC, da disse i mindre grad induiserte proliferasjon i T-cellene.

Den høye T-bet ekspresjonen som ble vist hos ikke-aktiverte T-cellene er overraskende, da T-bet er en transkripsjonsfaktor som uttrykkes hos effektorceller, ikke hos ikke-aktiverte T-celler. Den høye ekspresjonen av T-bet indikere at de cellene, som her blir omtalt som ikke-aktiverte T-celler, består av blant annet hukommelsesceller, eller til og med aktiverte celler. Om en ser på andel ikke-aktiverte T-celler, positive for henholdsvis Foxp3 og T-bet, ser en at summen av de to blir over 100%. Dette tyder på at T-cellene isolert fra perifert blod hos friske blodgivere er positive for flere enn en transkripsjonsfaktor. Man kan dermed ikke konkludere med at én type T-hjelperceller uttrykker kun én transkripsjonsfaktor, da resultatene her viser at dette ikke er tilfelle.

Når T-cellene ble ko-kultivert sammen med modne THP-1 DC i en blandet leukocyttkultur, viste resultatene en signifikant nedgang i ekspresjon av T-bet sammenlignet med de ikke-aktiverede ($p < 0,05$). T-cellene stimulert av modne THP-1 DC viste samtidig økt ekspresjon av Foxp3, sammenlignet med de ikke-aktiverede. Bakteriene så imidlertid ikke ut til å påvirke ekspresjon av T-bet eller Foxp3 i større eller mindre grad. Det er vanskelig å dra noen konklusjoner fra dette forsøket, annet enn at modne THP-1 DC induserer mindre ekspresjon av T-bet og økt ekspresjon av Foxp3, sammenlignet med ikke-aktiverede T-celler. Flere aspekter ved metoden bør forbedres før en kan dra en konklusjon fra forsøket. Det vil også være relevant å utføre dobbelfarging for å studere hvor stor andel av de modne THP-1 DC som er positive for både T-bet og Foxp3, og hvor positive de er for de ulike transkripsjonsfaktorene. Det ville også vært fordelaktig å bruke en annen metode for isolering av T-celler. T-cellepopulasjonene som ble benyttet i forsøkene er ikke helt rene, og der vil for eksempel være naturlig dreperceller tilstede, som kan påvirke resultatet.

Andre studier viser også at en populasjon av CD103⁺ DC fra mesentrisk lymfeknuter i tarmen hos mus kan indusere Foxp3⁺ regulatoriske T-celler, og at denne promoteringen er avhengig av både transforming growth factor (TGF)- β og retinsyre(RA). Det er også vist at TGF- β kan promotere regulatoriske T-celler i kultur (Coombes et al., 2007). For å studere om THP-1 DC kan ha en tilsvarende evne til å indusere Foxp3⁺ T-celler, vil det vært naturlig å studere om modne THP-1 DC produserer TGF- β og retinsyre, som igjen kan drive T-cellepolariseringen i retning av regulatoriske T-celler.

5.6 Cytokinproduksjon av IL-2 og IL-10 hos aktiverte humane T-celler

IL-2 er et cytokin med flere viktige funksjoner, både for primær og sekundær aktivering av T-celler, men også i nedregulering av en immunrespons ved å stimulere til dannelse av regulatoriske T-celler (Bachmann & Oxenius, 2007). IL-2 produseres av aktiverte T-celler, og bidrar i T-celleprolifisering. Kvantitert IL-2 i supernatant fra de aktiverte T-cellene korrelerte med proliferasjonen hos T-cellene stimulert av modne THP-1 DC (Figur 4.8 og 4.3). Der ko-kultivering av modne THP-1 DC og *M. capsulatus* (Bath og Texas) førte til økt proliferasjon, og sekresjon av IL-2, hos T-cellene i MLC. Mens modne THP-1 DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 viste en dårligere evne til å stimulere til proliferasjon, og førte til lavere sekresjon av IL-2, hos de humane T-cellene. Det er imidlertid ikke mulig å si noe om hvorvidt IL-2

bidrar i polarisering av ulike T-cellepopulasjoner, da polariseringen av T-cellene er avhengig av flere faktorer enn IL-2 produksjon.

IL-10 er et anti-inflammatorisk cytokin, og studier viser at IL-10 fører til økt differensiering av IL-10 produserende regulatoriske T-celler (Saraiva & O'Garra, 2010). Det ble kun detektert IL-10 i supernatanter fra T-celler stimulert av modne THP-1 ko-kultivert med bakterier, der *M. capsulatus* (Bath) førte til høyest IL-10 sekresjon (Figur 4.9). *M. capsulatus* (Bath) er tidligere vist å hemme utviklingen av DSS-indusert kolitt hos mus (Kleiveland et al., 2013). Den økte IL-10 produksjonen vist hos de aktiverte T-celler kan være en mekanisme som bidrar til å redusere utvikling av kolitt hos mus. Det ble også detektert økt IL-10 sekresjon fra T-celler stimulert av modne THP-1 DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917. Resultatene viser imidlertid ikke en sammenheng mellom IL-10 produksjon og ekspresjon av Foxp3 hos de aktiverte T-cellene, vist ved at *M. capsulatus* (Bath) inducerer høyest IL-10 sekresjon, men lavest ekspresjon av Foxp3⁺ T-celler. Andre studier viser at *E. coli* Nissle 1917 hindrer proliferering av T-celler fra perifert blod, i tillegg til at de førte til økt produksjon av IL-10, men ikke IL-2 (Sturm et al., 2005). Resultatene i denne oppgaven stemmer overens med disse funnene, noe som indikerer en mulig immunmodulerende effekt av *E. coli* Nissle 1917 på THP-1 DC.

5.7 Bindingsforsøk

Det er i tidligere studier vist at *M. capsulatus* (Bath), men ikke *M. capsulatus* (Texas), binder seg spesifikt til umodne humane CD14⁺ monocyttderiverte dendrittiske celler (ikke publisert materiale). Resultatene i denne oppgaven viser at både *M. capsulatus* (Bath og Texas), men ikke *E. coli* Nissle 1917, binder til både umodne og modne THP-1 DC, men òg at ko-kultiveringstiden påvirker grad av binding til THP-1 DC.

Umodne CD14⁺ monocyttderiverte dendrittiske (mo-DC) vil i respons på bakterier modnes. Dette er en manglende egenskap hos umodne THP-1 DC, da bakterier ikke fører til en fullstendig modning av cellene. Dermed blir det mer riktig å sammenligne studier av modne THP-1 DC med umodne CD14⁺ mo-DC ko-kultivert med bakterier. For å studere om den tydelige bindingen av *M. capsulatus* (Bath) til CD14⁺ mo-DC også kunne detekteres hos modne THP-1 DC ble det utført bindingsstudier der cellene var ko-kultivert med bakterier i tre timer (Figur 4.10).

Resultatene viste kun binding av *M. capsulatus* (Bath). Dette samsvarer med andre studier som kun viser binding av *M. capsulatus* (Bath) til umodne CD14⁺ mo-DC (ikke publiserte data). Dette tyder på at modne THP-1 DC uttrykker de samme membranmolekylene som er involvert i binding av *M. capsulatus* (Bath) til mo-DC.

MLC-resultatene viste at både *M. Capsulatus* (Bath og Texas) førte til en ytterligere proliferasjon hos T-cellene. I MLC ble bakteriene og differensieringsmediet for modne THP-1 DC tilsatt til cellene på samme dag (dag 0), før de ble fremført til sveipeelektronmikroskopi på dag 3. For å studere om bindingen av bakterier til modne THP-1 DC var avhengig av ko-kultiveringstiden, ble det utført bindingsforsøk der en ko-kultiverte modne THP-1 DC med bakterier i tre døgn. Resultatene viste da binding av både *M. capsulatus* (Bath og Texas). Noe som kan indikerer at ko-kultivering med bakterier i tre døgn, påvirker modningen av THP-1 DC. Det ville derfor vært av interesse å utføre en MLC med kortere ko-kultiveringstid med bakterier, da ulik modning av THP-1 DC vil påvirke aktivering av T-celler. Resultatene indikerer også at *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) binder til ulike strukturer, som er uttrykt på ulike tidspunkt, hos de modne THP-1 DC.

Umodne THP-1 DC har ikke egenskapen til å kunne differensieres til modne THP-1 DC. Væskestremscytometrisk analyse av overflatemarkører hos umodne THP-1 viste imidlertid at ko-kultivering med intakte bakterier fører til økt ekspresjon av CD83 (Figur 4.2). Mens MLC-resultatene viste at bakteriene reduserte umodne THP-1 DC sin evne til å stimulere til proliferasjon hos T-cellene (Figur 4.4). På bakgrunn av disse observasjonen var det av interesse å nærmere studere interaksjon mellom de ulike bakteriene og umodne THP-1 DC. Umodne THP-1 DC ko-kultivert med bakteriene i tre timer viser at både *M. capsulatus* (Bath og Texas) blir endocyttert, og da *M. capsulatus* (Bath) i større grad enn *M. capsulatus* (Texas). *E. coli* Nissle 1917 viste ingen binding til celleoverflaten hos umodne THP-1 DC, men det kan ikke utelukkes at bakterien alt hadde blitt endocyttert.

Tidligere resultater indikerer at *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) binder til ulike strukturer, som er uttrykt på ulike tidspunkt, hos modne THP-1 DC. For å studere om binding av bakterier til de umodne THP-1 DC også var avhengig av ko-kultiveringstiden ble det utført bindingsstudier der cellene var ko-kultivert med bakterier i ett døgn (Figur 4.10). Resultatene viste da binding av både *M. capsulatus* (Bath og Texas), men ikke *E. coli* Nissle 1917, til celleoverflaten hos umodne THP-1 DC. Noe som igjen indikerer igjen at *M. capsulatus* (Bath

og Texas) binder til ulike strukturer, som er uttrykt på ulike tidspunkt, hos både modne og umodne THP-1.

Resultatene fra bindingsforsøket indikerer dermed at både ko-kultiveringstid og grad av modning hos DC er avgjørende for binding av *M. capsulatus* (Bath og Texas) til THP-1 DC. Det ble ikke observert binding av *E. coli* Nissle 1917 til THP-1 DC. Noe som igjen indikerer at *E. coli* Nissle 1917 og *M. capsulatus* (Bath og Texas) interagerer med THP-1 DC via ulike reseptorer.

Det ble også observert en spesiell morfologisk endring av de modne THP-1 DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917. *E. coli* Nissle 1917 viste ingen tydelig binding til THP-1 DC, og bakteriene førte heller ikke til økt T-celleproliferasjon i en MLC. Ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917 ser likevel ut til å påvirke morfologien hos THP-1 DC (Figur 4.11). Cellene viste en mer utstrakt morfologi og økt mengde utløpere (dendritter) på overflaten, som tyder på at *E. coli* Nissle 1917 interagerer via andre reseptorer hos modne THP-1 DC enn *M. capsulatus* (Bath og Texas), og også vil aktiverer andre intracellulære signalveier.

5.8 Konstruksjon av *M.capsulatus* (Bath) Pile mutant (*Bath* Δ Pile).

Både *M. capsulatus* (Bath og Texas) inneholder gener som koder for type IV pili (T4P) piliner og tip-adhesiner. T4P pili er funnet å være kritiske virulensfaktorer hos patogene *Neisseria sp.*, patogene stammer av *E.coli* og i *Pseudomonas aeruginosa* (Craig & Li, 2008). T4P er blant annet assosiert med binding til eukaryote celler, og ser ut til å binde til spesifikke reseptorer hos epitelceller hos pattedyr via adhesiner på enden av pili (Mattick, 2002). Ved sammenligning av genomiske DNA sekvenser for *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) er det identifisert forskjeller i genet som koder for Pile og et adhesin (masteroppgave Stine Indrelid, UMB 2013). Der ble *M. capsulatus* (Texas) vist å ha en kortere Pile- og adhesin-gensekvens enn *M. capsulatus* (Bath). For å undersøke om T4P var involvert i den spesifikke bindingen av *M. capsulatus* (Bath) til umodne CD14⁺ monocytt-deriverte DC, ble det forsøkt å lage en mutant av *M. capsulatus* (Bath) der genene som kodet for Pile og adhesinet ble deletert. De to genene er lokalisert ved siden av hverandre og ble dermed deletert samtidig. 1000kb oppstrøms og nedstrøms av genene som kodet for Pile og adhesinet ble satt inn i selvmordsvektoren pJQ200SK (pJQ Δ Pile/Adhesin) og overført til *E. coli* TOP 10. Selve konjugeringen ble utført

ved triparental mating. På grunn av manglende tid ble det ikke arbeidet videre med mutanten av *M. capsulatus* (Bath).

pjQ200SK inneholder markøren *sacB* og et gentamicin-resistens gen (*gtmR*). Dersom en dyrker mutanter av Gram-negative bakterier, i medium som inneholder mer enn 5% sukrose, vil *sacB* være dødelig. Videre arbeid ville dermed vært å plukke noen gentamicin resistente kolonier fra konjugeringen og dyrket disse på NMS-agar eller i NMS-kultur med gentamicin. Deretter ville bakteriene blitt dyrket på NMS-agar med 5% sukrose(uten gentamicin), for å selektere for kolonier som ikke lenger inneholder vektoren. Bekreftelse av riktig mutant ville blitt undersøkt ved sekvensering. Når man har funnet *M. capsulatus* (Bath) med korrekt delesjon av *PilE*- og adhesin-genet vil det bli utført bindingsforsøk for å se om T4P er involvert i bindingen av *M. capsulatus* (Bath) til umodne CD14⁺ monocyttderiverte DC.

5.9 Konklusjon

Resultatene i denne oppgaven viser at THP-1 kan fungere som et modellsystem for studier av immunmodulerende effekter hos umodne eller modne DC. Det har og blitt vist at modne THP-1 DC fungerer som APC for humane T-celler i en blandet lymfocyttkultur, og at en ko-kultivering av THP-1 cellene med *M. capsulatus* (Bath og Texas) fører til en ytterligere økning i proliferasjon hos T-cellene. Tidligere studier har vist at umodne THP-1 DC ikke kan differensieres til CD83⁺ THP-1 DC (Berges et al., 2005), resultatene i denne oppgaven viser imidlertid at ko-kultivering av umodne THP-1 DC med intakte Gram-negative bakterier inducerer en viss grad av modning av cellene, vist med økt ekspresjon av CD83. Det ble også detektert en mye høyere konsentrasjon av IL-6 sekretert fra umodne THP-1 DC, enn modne THP-1 DC, ko-kultivert med bakterier. Dette kan bidra til å opprettholde den umodne tilstanden hos DC (S. J. Park et al., 2004).

Det ble utført væskestrømscytometrisk analyse av transkripsjonsfaktorene T-bet, GATA3, ROR γ T og Foxp3 hos T-celler fra blandet leukocyttkulturoppsett (MLC), og ikke-aktiverte T-celler. Resultatene viste at aktiverte T-celler, stimulert av modne THP-1 DC i MLC, fører til lavere ekspresjon av T-bet og økt ekspresjon Foxp3, sammenlignet med ikke-aktiverte T-celler. Ko-kultivering av modne THP-1 DC med ulike bakterier førte imidlertid ikke til store forskjeller i ekspresjon av hverken T-bet eller Foxp3 hos de aktiverte T-cellene.

Bindingsstudier viser at både *M. capsulatus* (Bath og Texas), men ikke *E. coli* Nissle 1917, binder til både umodne og modne THP-1 DC, men òg at ko-kultiveringstiden påvirker grad av binding til THP-1 DC. Bindingsforsøk med modne THP-1 DC ko-kultivert med bakterier i tre timer viste kun binding av *M. capsulatus* (Bath), noe som samsvarer med tidligere forsøk som også viser binding av *M. capsulatus* (Bath) til umodne CD14⁺ mo-DC (ikke publisert data). Mens umodne THP-1 DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath og Texas) viser at cellene endocyttere bakteriene, og da *M. capsulatus* (Bath) i større grad enn *M. capsulatus* (Texas). Resultatene indikerer også at *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) binder til ulike strukturer, som er uttrykt på ulike tidspunkt, hos THP-1 DC.

Det har i denne oppgaven blitt vist at de ikke-kommensale jordbakteriene *M. capsulatus* (Bath og Texas) har immunmodulerende effekter på dendrittiske celler derivert fra den humane monocytteleukemicellelinjen THP-1. *M. capsulatus* (Bath) skiller seg imidlertid fra *M. capsulatus* (Texas) ved at den blant annet viser en spesiell evne til å binde seg til modne THP-1 DC, og fører til økt sekresjon av det anti-inflammatoriske cytokinet IL-10 hos humane T-celler i en blandet lymfocyttkultur. Den ikke-kommensal bakterien *M. capsulatus* (Bath) viser dermed en større immunmodulerende effekter på humane THP-1 DC enn den kkommensale bakterien *E. coli* Nissle 1917. Dette er kan bidra i å forklare hvorfor *M. capsulatus* (Bath) viser å ha dempende effekter ved ulike inflammatoriske tilstander i tarm hos mus og atlanterhavslaks (Kleiveland et al., 2013; Romarheim et al., 2011). Videre arbeid er nødvendig for å kartlegge hvilke spesielle egenskaper hos *M. capsulatus* (Bath) som virker immunmodulerende på dendrittiske celler, og eventuelt andre immunceller.

6 Referanser

- Abreu, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*, *10*(2), 131-144. doi: 10.1038/nri2707
- Bachmann, M. F., & Oxenius, A. (2007). Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep*, *8*(12), 1142-1148. doi: 10.1038/sj.embor.7401099
- Bals, R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*, *1*(3), 141-150. doi: 10.1186/rr25
- Barnes, M. J., & Powrie, F. (2009). Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity*, *31*(3), 401-411. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.011
- Beissert, S., Schwarz, A., & Schwarz, T. (2006). Regulatory T cells. *J Invest Dermatol*, *126*(1), 15-24. doi: 10.1038/sj.jid.5700004
- Berges, C., Naujokat, C., Tinapp, S., Wieczorek, H., Hoh, A., Sadeghi, M., . . . Daniel, V. (2005). A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *333*(3), 896-907. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.171
- Canny, G. O., & McCormick, B. A. (2008). Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *Infect Immun*, *76*(8), 3360-3373. doi: 10.1128/IAI.00187-08
- Carreno, B. M., Bennett, F., Chau, T. A., Ling, V., Luxenberg, D., Jussif, J., . . . Madrenas, J. (2000). CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol*, *165*(3), 1352-1356.
- Cerutti, A., & Rescigno, M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*, *28*(6), 740-750. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.001
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., & Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, *204*(8), 1757-1764. doi: 10.1084/jem.20070590
- Craig, L., & Li, J. (2008). Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol*, *18*(2), 267-277. doi: 10.1016/j.sbi.2007.12.009
- Eberl, G., & Lochner, M. (2009). The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. *Mucosal Immunol*, *2*(6), 478-485. doi: 10.1038/mi.2009.114
- Felix, N. J., & Allen, P. M. (2007). Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol*, *7*(12), 942-953. doi: 10.1038/nri2200
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., & Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*, *2*(2), 77-84. doi: 10.1038/nri723
- Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, *124*(1), 3-20; quiz 21-22. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.038
- Hamza, T., Barnett, J. B., & Li, B. (2010). Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int J Mol Sci*, *11*(3), 789-806. doi: 10.3390/ijms11030789
- Hiemstra, I. H., Bouma, G., Geerts, D., Kraal, G., & den Haan, J. M. (2012). Nod2 improves barrier function of intestinal epithelial cells via enhancement of TLR responses. *Mol Immunol*, *52*(3-4), 264-272. doi: 10.1016/j.molimm.2012.06.007
- Hill, D. A., & Artis, D. (2010). Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol*, *28*, 623-667. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101330

- Janeway, C. A., Jr., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- Kaisho, T., & Akira, S. (2006). Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, 117(5), 979-987; quiz 988. doi: 10.1016/j.jaci.2006.02.023
- Kawai, T., & Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1143, 1-20. doi: 10.1196/annals.1443.020
- Kemeny, D. M. (2012). The role of the T follicular helper cells in allergic disease. *Cell Mol Immunol*, 9(5), 386-389. doi: 10.1038/cmi.2012.31
- Kim, K. D., Choi, S. C., Noh, Y. W., Kim, J. W., Paik, S. G., Yang, Y., . . . Lim, J. S. (2006). Impaired responses of leukemic dendritic cells derived from a human myeloid cell line to LPS stimulation. *Exp Mol Med*, 38(1), 72-84. doi: 10.1038/emm.2006.9
- Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*, 40(7), 1830-1835. doi: 10.1002/eji.201040391
- Kleiveland, C. R., Hult, L. T., Spetalen, S., Kaldhusdal, M., Christofferesen, T. E., Bengtsson, O., . . . Lea, T. (2013). The noncommensal bacterium *Methylococcus capsulatus* (Bath) ameliorates dextran sulfate (Sodium Salt)-Induced Ulcerative Colitis by influencing mechanisms essential for maintenance of the colonic barrier function. *Appl Environ Microbiol*, 79(1), 48-56. doi: 10.1128/AEM.02464-12
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 27, 485-517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710
- Leatham, M. P., Banerjee, S., Autieri, S. M., Mercado-Lubo, R., Conway, T., & Cohen, P. S. (2009). Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infect Immun*, 77(7), 2876-2886. doi: 10.1128/IAI.00059-09
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., . . . De Simone, C. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 121(3), 580-591.
- Maloy, K. J., & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 298-306. doi: 10.1038/nature10208
- Matta, B. M., Castellaneta, A., & Thomson, A. W. (2010). Tolerogenic plasmacytoid DC. *Eur J Immunol*, 40(10), 2667-2676. doi: 10.1002/eji.201040839
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, 56, 289-314. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160938
- Nochi, T., Denton, P. W., Wahl, A., & Garcia, J. V. (2013). Cryptopatches are essential for the development of human GALT. *Cell Rep*, 3(6), 1874-1884. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.037
- O'Sullivan, B., & Thomas, R. (2003). CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol*, 23(1-2), 83-107.
- Park, S. J., Nakagawa, T., Kitamura, H., Atsumi, T., Kamon, H., Sawa, S., . . . Hirano, T. (2004). IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol*, 173(6), 3844-3854.
- Park, Sung-Joo, Nakagawa, Takayuki, Kitamura, Hidemitsu, Atsumi, Toru, Kamon, Hokuto, Sawa, Shin-ichiro, . . . Hirano, Toshio. (2004). IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 Activation. *The Journal of Immunology*, 173(6), 3844-3854.
- Pufnock, J. S., Cigal, M., Rolczynski, L. S., Andersen-Nissen, E., Wolf, M., McElrath, M. J., & Greenberg, P. D. (2011). Priming CD8+ T cells with dendritic cells matured using

- TLR4 and TLR7/8 ligands together enhances generation of CD8+ T cells retaining CD28. *Blood*, 117(24), 6542-6551. doi: 10.1182/blood-2010-11-317966
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229-241. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.002
- Rescigno, M. (2009). Gut commensal flora: tolerance and homeostasis. *F1000 Biol Rep*, 1, 9. doi: 10.3410/B1-9
- Rescigno, M. (2010). Intestinal dendritic cells. *Adv Immunol*, 107, 109-138. doi: 10.1016/B978-0-12-381300-8.00004-6
- Romarheim, O. H., Overland, M., Mydland, L. T., Skrede, A., & Landsverk, T. (2011). Bacteria grown on natural gas prevent soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon. *J Nutr*, 141(1), 124-130. doi: 10.3945/jn.110.128900
- Sansom, D. M., Manzotti, C. N., & Zheng, Y. (2003). What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol*, 24(6), 314-319.
- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*, 10(3), 170-181. doi: 10.1038/nri2711
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813(5), 878-888. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Segura, E., & Amigorena, S. (2014). Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunol Lett*, 158(1-2), 73-78. doi: 10.1016/j.imlet.2013.12.001
- Sturm, A., Rilling, K., Baumgart, D. C., Gargas, K., Abou-Ghazale, T., Raupach, B., . . . Dignass, A. U. (2005). Escherichia coli Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infect Immun*, 73(3), 1452-1465. doi: 10.1128/IAI.73.3.1452-1465.2005
- Sun, C. M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R., & Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*, 204(8), 1775-1785. doi: 10.1084/jem.20070602
- Thaiss, C. A., Semmling, V., Franken, L., Wagner, H., & Kurts, C. (2011). Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation. *Front Immunol*, 2, 31. doi: 10.3389/fimmu.2011.00031
- Tromm, A., Niewerth, U., Houry, M., Baestlein, E., Wilhelms, G., Schulze, J., & Stolte, M. (2004). The probiotic E. coli strain Nissle 1917 for the treatment of collagenous colitis: first results of an open-label trial. *Z Gastroenterol*, 42(5), 365-369. doi: 10.1055/s-2004-812709
- Uematsu, S., & Fujimoto, K. (2010). The innate immune system in the intestine. *Microbiol Immunol*, 54(11), 645-657. doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00267.x
- Wolf, S. F., Sieburth, D., & Sypek, J. (1994). Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells*, 12(2), 154-168. doi: 10.1002/stem.5530120203
- Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434. doi: 10.1038/nature06005
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, 28, 445-489. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212

Vedlegg I - Materialer

Cellelinje

Navn	Karakteristika	Leverandør
THP-1	human monocytteleukemi-cellelinje	ATCC

Bakteriestammer

Art	stamme	Leverandør
<i>Methylococcus capsulatus</i>	Bath	NCIMB
<i>Methylococcus capsulatus</i>	Texas	NCIMB
<i>Escherichia coli</i>	Nissle 1917	Gave fra Ardeypharm GmbH Herdecke, Tyskland.
<i>Echerichia coli</i>	TOP10	Life Technologi
<i>Echerichia coli</i>	DH5 α med pRK2013	Gave fra dr Lukasz Dziewit ved Universitetet i Warszawa.
<i>Vektor: PJQ200SK</i>		ATCC

Laboratorieutstyr og instrumenter

Teknikk	Utstyr/instrument	Leverandør
Celledyrking	Sterilbenk	Biowizard
	Steril-cycle incubator, HEPA class 100	Thermo Science
	24-brønners cellkulturplate	BD Falcon TM
	24-brønners FALCON filterkopper	Becton Dickinson

	PP-testrør 15mL	Greiner bio-one
	PP-testrør 50mL	Greiner bio-one
	Automatpipette	IBS Integra Bioscience
Automatisk celleteller	Coulter Z1™	Coulter Electronics Ltd
	250mL FALCON cellekulturflaske (T25)	Becton Dickinson
MLC	TopCount NXT (scintillasjonsteller)	Packard
	Erlenmeyerkolbe (100ml)	-
	Gummikork	SIGMA
UV-lys	Gel Doc 1000	BioRad
Sentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus
	BIOFUGE pico	Heraeus
Mikroskoper	Leica DFC 420	Leica Microsystems
Sveipeelektronmikroskopi	Zeiss EVO-50-EP	Carl Zeiss SMT Ltd.
Væskestrømscytometer	MACSQuant Analyzer	Miltenyi Biotec
	MicroWell plate	NUNC
Spektrofotometer	UV-160A	Shimadzu
	Kyvetter 1,0mL	Brand GMBH
ELISA	Sunrise Absorbance Reader	TECAN
	96 Well EIA/RIA plates	Costar
Autoklav	HIRAYAMA Autoclave	
Kritiskpunkt tørker	BAL-TEC CPD 030	BAL-TEC AG
T-celle isolering	Leuko-pak Leukocyte filert (Nylonull)	FENWAL
Tildekking av aluminiumstubber med gull/palladium	Polaron SC 7640	Quorum Technologies Ltd
Scintillasjonsteller	Packard Matrix micromate 196	Packard

Konjugering	Nitrocellulosepapir	BioRad
-------------	---------------------	--------

Kjemikalier og reagenser

Kjemikalier	Leverandør
ABTS(0,18mg/ml)	Roche
CaCl ₂ (Vannfri)	SIGMA
CoCl ₂ *6H ₂ O	SIGMA
Coulter® Isoton® II Diluent	Beckman Coulter
Dulbecco's PBS (1X)	PAA Laboratories
EDTA	SIGMA
Etanol	Arcus Kjemi AS
FeSO ₄ *7H ₂ O	SIGMA
MgSO ₄ *6H ₂ O	Fluka Analytical
MnCl ₂ *4H ₂ O	SIGMA
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	SIGMA
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	SIGMA
NiCl ₂ *6H ₂ O	SIGMA
KH ₂ PO ₄	SIGMA
KNO ₃	SIGMA
ZnSO ₄ *7H ₂ O	SIGMA
CO ₂	AGA
CH ₄	AGA
CuSO ₄ *5H ₂ O	SIGMA
EDTA disodiumsalt	SIGMA
Jern-EDTA	SIGMA
Paraformaldehyd	SIGMA
Streptavidin-HRP konjugat	SouthernBiotech
Tween 20	SIGMA
MACS Bleach Solution	Miltenyi Biotech
MACSQuant Calibration Beads	Miltenyi Biotech
MACSQuant Running Buffer	Miltenyi Biotech

MACSQuant Wahsing Solution	Miltenyi Biotech
Thiamine hydrochloride	SIGMA
Protease peptone	SIGMA
Agarose	Invitrogen life science
DNA ligase	New England Biolabs
H ₂ O ₂	SIGMA

Medier og løsninger

LB Broth	SIGMA
Agar bacteriological	OXOID
Dulbecco`s PBS (1X)	PAA Laboratories
Gentamycin Sulfat (50mg/mL)	LONZA
Kanamycin	SIGMA
Mitomycin C from Streptomyces caespitosus	SIGMA
Interleukin (IL)-4	Immuno Tools
IL-6	Immuno Tools
Granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF)	Immuno Tools
TNF-a	Immuno Tools
Ionomycin	SIGMA
Monotioglycerol	SIGMA
Natrium molybdate	SIGMA
RPMI 1640	Thermo scientific
Trypsin-EDTA (1X)	PAA laboratories
Penicillin	SIGMA
Streptomycin	SIGMA
Primere	Eurofins Norge
Q5 High-Fidelity 2X Maste Mix	New England BioLabs
XbaI/smaI (restriksjonsenzym)	New England BioLabs

Antistoffer

Alexa Fluor 488 Anti-Foxp3	eBioscience
PE-Cy7 Anti-Human/Mus T-bet	eBioscience
eFluor 660 Anti-Human/Mus Gata-3	eBioscience
PE Anti-Human/Mus ROR γ T	eBioscience
PE Mouse-Anti-Human CD80	BD Pharmingen
Alexa Fluor 700 Mus-Anti-Human CD86	BD Pharmingen
Pe-Cy 5 Mus-Anti-Human CD83	BD Pharmingen
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience
Anti-human IL-6	Immuno Tools
Biotinylert Anti-human IL-6	Immuno Tools

Kit

ELISA development KIT human IL-10	PeptoTech
ELISA development KIT human IL-12	PeptoTech
ELISA development KIT human IL-2	PeptoTech
QIA® amp DNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
PureYield™ Plasmin Midiprep System	PROMEGA