

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne oppgaven ble utført hos gruppen for Molekylær cellebiologi ved instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Universitetet for miljø og biovitenskap.

Først vil jeg takke min hovedveileder Tor Lea for god hjelp i forbindelse med oppgaven.

Takk til Charlotte Kleiveland, Trine Eker Christoffersen og Lene Olsen Hult for god hjelp og veiledning.

Stor takk til Ellen Karlstrøm for praktisk hjelp på laben.

Jeg vil også takke venner og familie for støtte og avkobling.

Ås, 6. mai 2012

Linn Floer

Innholdsfortegnelse

1.0 Innledning.....	1
1.1 Inflammatorisk tarmsykdom	1
1.2 Tarmens oppbygging.....	2
1.2.1 Tynntarmen	2
1.2.2 Tykktarmen	3
1.3 Tarmens immunsystem.....	4
1.4 Aktivering av antigenpresenterende celler.....	6
1.5 Kostimulerende molekyler	7
1.5.1 CD83	8
1.5.2 CD40	9
1.6 Aktivering av immunrespons	9
1.6.1 NF- κ B.....	10
1.7 Cytokinproduksjon.....	12
1.7.1 IL-12.....	12
1.7.2 IL-10.....	13
1.7.3 IL-6.....	13
1.8 Nedregulerende faktorer av immunforsvaret.....	13
1.8.1 PD-L1/PD-1.....	13
1.9 BioProtein.....	14
1.10 <i>Methylococcus capsulatus</i>	14
1.11 Prosjektets målsetting.....	15
2.0 Materialer	16
2.1 Laborarieutstyr og instrumenter	16
2.2 Kjemikalier.....	17
2.3 Antistoff	18
2.4 Medier og løsninger.....	18
2.5 Cellelinjer og bakterier.....	19
2.6 Oppskrifter	19
2.6.1 Celloarbeid.....	19
2.6.2 Monocytisolering fra PBL.....	20
2.6.3 Elisa.....	20
2.6.4 Bakteriedyrking	20
2.6.5 NF- κ B luciferase assay.....	21

3.0 Metoder	22
3.1 Dyrking av U937 cellelinje	22
3.2 Nedfrysing av celler	22
3.3 Tining av celler.....	22
3.4 NF- κ B luciferase assay.....	23
3.5 Stimulering av U937 monocytter	23
3.6 Dyrking av <i>M. capsulatus</i>	23
3.7 Tillaging av <i>M. capsulatus</i> frysestock.....	24
3.8 Isolering av PBL fra buffy coats	24
3.9 Isolering av CD14 ⁺ monocytter fra PBL	24
3.10 Differensiering av CD14 ⁺ monocytter til dendritiske celler.....	25
3.11 Stimulering av dendritiske celler med <i>M. capsulatus</i>	25
3.12 Test av overflatemarkører på stimulerte DC	26
3.13 Måling av cytokinproduksjon.....	26
3.13.1 ELISA IL-10.....	26
3.13.2 ELISA IL-6	27
4.0 Resultater.....	28
4.1 Differensiering av dendritiske celler	28
4.2 Stimulering av umodne dendritiske celler med <i>M. capsulatus</i>	29
4.3 Test av overflatemarkører på dendritiske celler stimulert med <i>M. capsulatus</i>	31
4.3.1 CD86	31
4.3.2 CD80	32
4.3.3 CD83	32
4.3.4 CD40	33
4.3.5 PD-L1	34
4.4 Cytokinproduksjon	35
4.4.1 IL-10.....	35
4.4.2 IL-6.....	36
4.5 NF- κ B luciferase assay.....	38
5.0 Diskusjon.....	40
5.1 Overflatemarkører	40
5.2 NF- κ B.....	44
5.3 Cytokinproduksjon	44
5.4 Konklusjon og viderearbeid	46

Sammendrag

Inflammatorisk tarmsykdom viser et komplisert og sammensatt sykdomsbilde med miljø-, genetisk predisposisjon- og immunforstyrrende faktorer som ligger til grunn for utvikling av sykdommen. Pasienter med inflammatorisk tarmsykdom har en grunnleggende svikt i reguleringen av tarmenes immunforsvar. Bakgrunnen for denne oppgaven er studiene som viser at BioProtein forebygger kolitt hos mus. BioProtein består av 88 % *Methylococcus capsulatus*, og det er i denne oppgaven undersøkt hvilke stimuleringssevner denne metanotrofe bakterien har på humane immunsystemer.

Dendritiske celler er profesjonelle antigenpresenterende celler med viktige roller ved aktivering av immunforsvaret knyttet til tarmen. Cellene har mulighet til å komme i direkte kontakt med tarminnholdet i lumen via deres dendritiske utløpere, eller bearbeide antigen tatt opp av epitelcellene og transportert gjennom epitelcellene via transcytose. Ved kontakt med antigenmateriale vil cellene modnes og være i stand til å aktivere T-celler.

I denne oppgaven ble dendritiske celler og monocytter kokultivert med *M. capsulatus* for å undersøke bakteriens stimulerende egenskaper. Analyser av overflatemarkørene på dendritiske celler viser at *M. capsulatus* stimulerer oppregulering av modningsmarkørene og de kostimulerende molekylene CD80 og CD86. Dette muliggjør T-celle aktivering ved antigenpresentasjon. Et interessant funn er at *M. capsulatus* ikke stimulerer oppregulering av modningsmarkøren CD83. Dette kan være en viktig regulerende egenskap ved *M. capsulatus* da fravær av CD83 på dendritiske celler kan hemme T-celle prolifereringen.

Cytokiner ble analysert i supernatanter fra celler kokultivert med *M. capsulatus*. Cytokin-analysene viser at *M. capsulatus* stimulerer produksjon av IL-6, som er et proinflammatorisk cytokin, hos både dendritiske celler og monocytter. I tillegg viser *M. capsulatus* egenskaper til å indusere anti-inflammatorisk IL-10, som har regulerende egenskaper på immunsystemet.

Abstract

Inflammatory bowel disease is a complex disease with environmental factors, genetic predisposition, and dysfunctional immune response that triggers the development of the disease. Patients with inflammatory bowel disease have a fundamental dysfunction in the regulation of gut immune system. This study is based upon recent observations that bacterial meal containing BioProtein prevent colitis in mouse. BioProtein is mainly containing *Methylococcus capsulatus*, and the aim of this study is to determine the activation pattern in human dendritic cells caused by this methanotrophic bacteria.

Dendritic cells are professional antigen presenting cells with central functions in the initiation of the immune system in the intestine. The dendrites of the cells can get in direct contact with the contents of the intestinal lumen, or the cells can process antigen transported across the epithelial cells via transcytosis. When dendritic cells get in contact with antigens they differentiate to mature cells with capability of activating T-cells.

In this study dendritic cells and monocytes were exposed to *M. capsulatus* to determine whether the bacteria could induce maturation of these immune cells. Dendritic cells exposed to *M. capsulatus* up-regulate their surface molecules and maturation markers CD80 and CD86. These co-activating molecules are essential in the activation of T-cells. *M. capsulatus* does not induce the expression of the maturation marker CD83; this is interesting because CD83 deficient dendritic cells could interfere with the proliferation of activated T-cells, and could be a regulating trait of *M. capsulatus*.

Cytokines were determined in the cell supernatants after incubation with *M. capsulatus*. The bacteria induce IL-6 production, a pro-inflammatory cytokine, in both dendritic cells and monocytes. *M. capsulatus* also induce production of anti-inflammatory IL-10, a cytokine with regulating effects on the immune system.

Forkortelser

ABTS	2'2-azinobis[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid]-diammonium salt
APC	Profesjonelle antigenpresenterende celler
BSA	Bovint serum albumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
FCS	Føtalt kalveserum
GALT	Gut Associated Lymphatic Tissue
GI	Gastrointestinal trakt
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
IBD	Inflammatory bowel disease
IFN-γ	Interferon gamma
IκB	Inhibitor of κ B kinase
IKK	I κ B kinasekompleks
IL-4	Interleukin 4
LPS	Lipopolysakkarid
M-celler	Microfold cells
MHC	Major histocompatibility complex
MMO	Metan monooksygensase enzym
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NMS medium	Nitrate mineral salts medium
PBL	Peripheral Blood Leukocytes
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PGE2	Prostaglandin E2
PRR	Pattern recognizing receptors
T_C	Cytotoksiske T-celler
T_H	T-hjelperceller
TLR	Toll-liknende reseptorer
TNF-α	Tumornekrose faktor α
T_{reg}	Regulatoriske T-celler

1.0 Innledning

1.1 Inflammatorisk tarmsykdom

Crohns sykdom og ulcerøs kolitt er gjerne de to diagnosene som omtales når det er snakk om inflammatorisk tarmsykdom, IBD (inflammatory bowel disease). Pasienter med en av disse diagnosene har en grunnleggende svikt i reguleringen av tarmens immunforsvar. Forekomsten av denne sykdommen er høyere i industrialiserte land. Dette gir en geografisk avgrensning og underbygger antagelsen om at miljøpåvirkning sammen med genetisk predisposisjon og forstyrret funksjon av tarmens immunforsvar utgjør de viktigste faktorene når det gjelder utvikling av sykdommen (Hanauer 2006). Industriell forurensning, diett og utsettelse for infeksjoner er noen av miljøfaktorene som ser ut til å påvirke IBDs sykdomsutvikling (Hanauer 2006). Flere genmutasjoner har blitt assosiert med IBD, og crohns sykdom og ulcerøs kolitt har flere like IBD-assosierte gen (Khor et al. 2011).

Opprettholdelsen av immun homeostasen er viktig for et normalt immunsystem i tarmen. Fordi tarmen kontinuerlig blir utsatt for stimuli fra tarmfloraen, må immunsystemet i tarmen kunne utvikle toleranse for disse samtidig som det må kunne iverksette en immunreaksjon mot patogene mikroorganismer. Langvarige forstyrrelser av immun homeostasen kan føre til inflammasjon i tarmen som ved IBD (MacDonald & Monteleone 2005). Samspillet mellom immuncellene og epitelcellene i mukosa er viktig for et normalt immunsystem i tarmen. Epitecellene er med på å regulere immunresponsen etter møte med kommensale- eller patogene bakterier. Studier viser at epitelceller produserer stimuli som påvirker dendrittske celler til å indusere en immunrespons som gir et ikke-inflammatorisk miljø. Tarmepitelcellene produserer TSLP (thymic stromal lymphopoietin), og dendrittske celler som lever i dette miljøet produserer ikke IL-12, som er et proinflammatorisk cytokin, og påvirkes ikke til å indusere en proinflammatorisk T-cellerespons. Rimoldi et al. (2005) viser at 70 % av pasienter med crohns sykdom ikke uttrykker TSLP (Rescigno & Di Sabatino 2009; Rimoldi et al. 2005).

Epitecellene i mukosa danner en fysisk barriere som beskytter det underliggende vevet fra tarminnholdet. Paneth celler er epitelceller i mukosa som produserer antimikrobielle peptider som skaper et beskyttende miljø. Defekt i permeabiliteten kan gjøre at bakterier trenger gjennom epitellaget og aktiverer immunceller som dendrittske celler. De vil dermed bidra til

å aktivere en immunrespons. Det kan se ut til at svekket permeabilitet opptrer før IBD slår ut for fullt. Flere mutante gen er funnet å påvirke forandringer i kontaktene (junctions) mellom epitelcellene og bidrar til å øke permeabiliteten i mukosa. Også cytokiner, som TNF- α og IFN- γ , produsert ved inflammasjon, forårsaker endringer i sammensetningen av tette-kontaktproteiner (tight junctions) som igjen fører til økt permeabilitet (Clayburgh et al. 2004; Fasano & Shea-Donohue 2005).

Det er et sammensatt og omfattende sykdomsbilde med mange faktorer som påvirker sykdommen. Bakteriefloreaen, som for friske individer fungerer som en kommensal flora og kan ha en positiv effekt på immunsystemet i tarmen, trigger i stedet en til tider kraftig immunrespons hos pasienter med IBD (Hanauer 2006; O'Hara & Shanahan 2006). Pasienter med IBD har en annen bakteriesammensetning i tarmen enn friske individer. Dette kan være en induserende effekt for inflammatoriske responser eller kan ha skjedd som en konsekvens av sykdommen (Artis 2008; Round & Mazmanian 2009). Pasientenes sammensetning av fylogenetiske bakteriegrupper endres, og ofte øker mukosa assosierte bakterier i forhold til facal assosierte bakterier. Deriblant har det blitt registrert et høyere antall *Escherichia coli* som koloniserer epitelet i tarmen ved IBD, og er karakteristisk ved crohns sykdom (Chassaing & Darfeuille-Michaud 2011). Bruk av probiotika har vist seg å gi varierende effekter, men det kan se ut til at det kan ha en positiv effekt hos pasienter med ulcerøs kolitt (Fedorak et al. 2011).

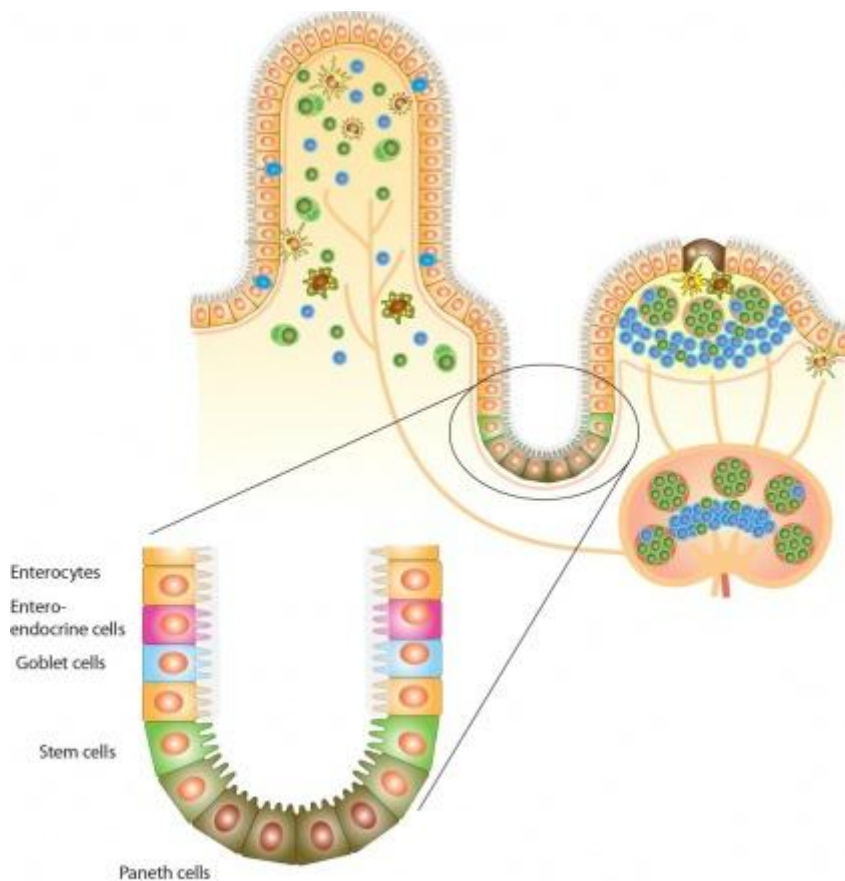
1.2 Tarmens oppbygging

Fordøyelseskanalen er bygget opp av mukosa, submukosa, muscularis externa og serosa. Mukosa dekker den innerste delen av fordøyelseskanalen, lumen. Lamina propria er løst bindevev som sammen med et tynt lag glatt muskulatur og epitelcellene danner mukosa og er en del av vårt ytre forsvar. Peyerske flekker og mesenteriske lymfeknuter er eksempler på lymfoide vev i tarmen som kalles tarm-assosiert lymfoid vev, GALT (Gut Associated Lymphatic Tissue), og strekker seg fra mukosa til submukosa enkelte steder i GI trakten (gastrointestinal trakt). Submukosa er et tykkere lag av løst bindevev. Muscularis externa består av to lag med muskler. Serosa består av bindevev og mesotel (Saladin 2010).

1.2.1 Tynntarmen

Det meste av absorpsjon av næringsstoffer foregår i tynntarmen. Det er grunnet tynntarmens store overflateareal som dannes av sirkulære folder i mukosa og submukosa, og fingerlignende prosjektiler kalt villi. Villi, eller tarmtottene, er dekket med absorberende

enterocytter og mukusekreserende begerceller (figur 1). En børstekant av mikrovilli på villiene øker overflaten ytterligere. I bunnen av kryptene, mellom villiene, finnes stamceller som i løpet av 3-6 dager differensierer til epitelceller og migrerer til toppen av villi. Paneth celler som befinner seg i bunnen av kryptene skiller ut antimikrobielle peptider. Peyerske flekker i tarmen inneholder lymfatiske follikler. Disse blir større jo nærmere tykktarmen de er lokalisert (Saladin 2010).



Figur 1: Figuren viser kryptstrukturen i tarmen. Nederst i krypten befinner Paneth cellene seg. De produserer antimikrobielle peptider. Fra stamcellene differensieres det epitelceller som på toppen av strukturen vil være fullt differensierte epitelceller (Illustrasjon: Tor Lea).

1.2.2 Tykktarmen

I tykktarmen absorberes store mengde vann og salter fra feces. Det er kun tynntarmen som har sirkulære folder og villi, mens både tynntarm og tykktarm har kryptstrukturer. (Saladin 2010).

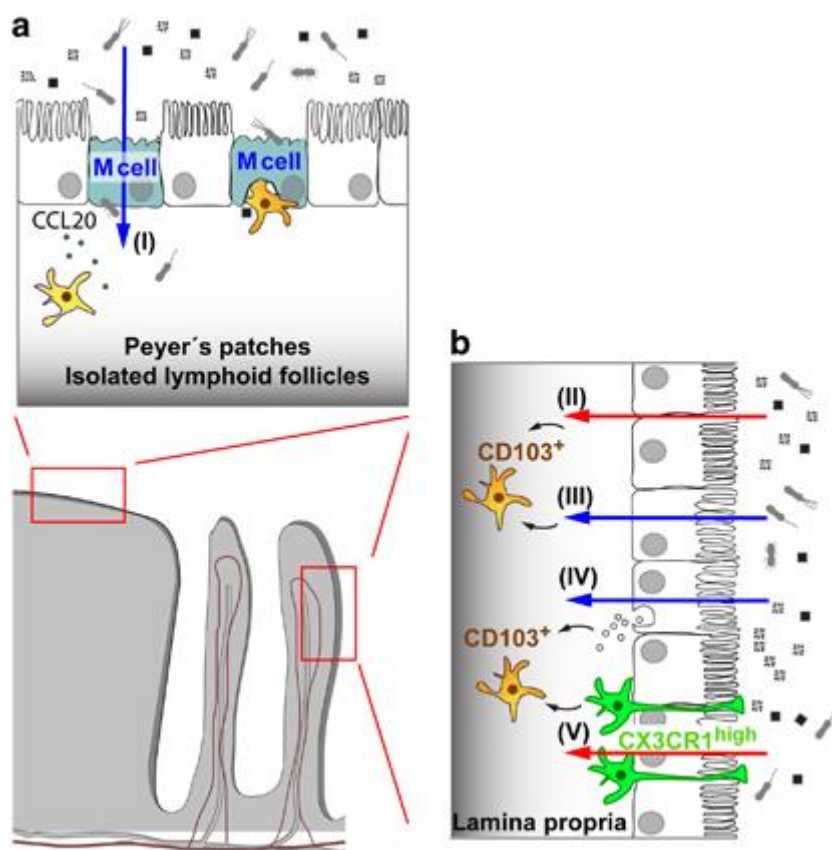
Bakteriefloraen i fordøyelsessystemet øker i tetthet nedover i GI-trakten, og oppnår høyeste tetthet i tykktarmen (O'Hara & Shanahan 2006). Tarmens bakterieflora har stor betydning for utviklingen av normal fysiologi og immunforsvar i tarmen. Deres tilstedeværelse er med på å utvikle epitelet i tarmen. Immunsystemet ville vært underutviklet hadde det ikke vært for

bakteriene. Den kommensale bakteriefloraen gir også næringsmessige fordeler ved at de hjelper til med å bryte ned materialer som mennesker ikke kan. Tarmen trenger beskyttelse mot patogene organismer som kroppen kan ta inn. De kommensale bakteriene gir beskyttelse mot patogene bakterier ved at de tar opp plass og næring og produserer antimikrobielle peptider (Artis 2008). Sammensetningen av bakterier i tarmen er avhengig av livsstil og alder, samtidig som tarmens immunsystem påvirker bakterienes miljø og leveforhold og kan påvirke sammensetningen av bakterier (Artis 2008; O'Hara & Shanahan 2006).

1.3 Tarmens immunsystem

Tarmens immunforsvar deles ofte i induserende- og effektor områder. De induserende områdene er lymfoide vev som Peyerske flekker, lymfoide follikler og mesenteriale lymfeknuter. Lamina propria og epitelet utgjør effektor områdene sammen med lymfocytter og antigenpresenterende celler som ikke er en del av de organiserte, induserende lymfoide vevene (Pabst & Mowat 2012).

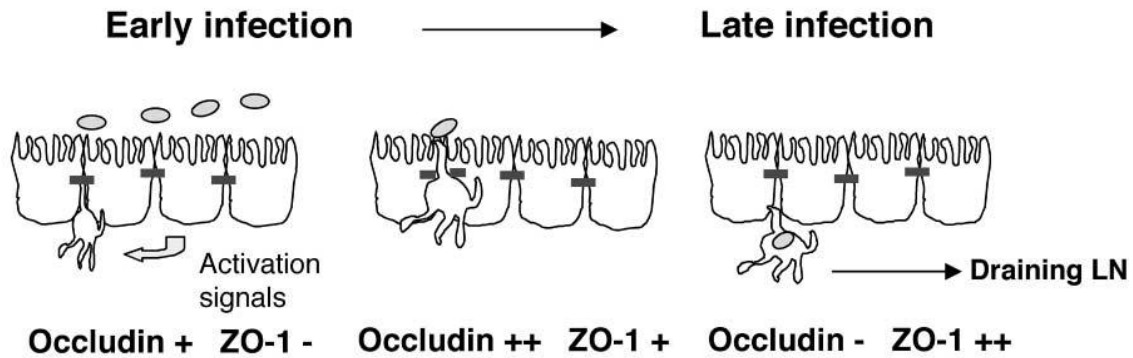
M-celler, Microfold cells, befinner seg i follikelassosiert epitel. Dette spesialiserte epitelcellelaget befinner seg over det lymfoide vevet. M-cellene har en viktig rolle ved at de fagocytterer materiale fra lumen og frakter det over til den basolaterale siden av epitelcellene (Figur 2a). På den basolaterale siden av epitelet vil materialet møtes av dendrittiske celler, makrofager og lymfocytter. De profesjonelle antigenpresenterende cellene vil bearbeide materialet og presentere innholdet for T-cellene (Lea 2006).



Figur 2: a) M-celler fagocytterer materiale fra luminal side og frakter det over til basolateral-side av epitelcellene, her kan profesjonelle antigenpresenterende celler som dendrittiske celler fange opp materiale og presentere det for lymfocytene. CCL20 er et kjemokin produsert av epitelcellene som tiltrekker seg dendrittiske celler. b) Dendrittiske celler kan enten fange opp antigen via M-celler, eller de kan fange opp antigen ved at de strekker dendritter mellom epitelceller og ut i lumen. CX3CR1^{high} er makrofager som også fanger opp antigen i lumen (Pabst & Mowat 2012).

Nye studier viser at mukusproduserende begerceller også har en rolle ved antigenopptak i lumen. De viser egenskaper for å kunne transportere antigen til underliggende dendrittiske celler i lamina propria. (McDole et al. 2012).

I tillegg til M-cellenes- og begercellens transcytose, har også de dendrittiske cellene en viktig funksjon for opptak av antigen fra luminalsiden av tarmen (figur 2b). Tette kontakter (tight junctions) mellom epitelcellene i tarmen hindrer at makromolekyler og mikroorganismer trenger gjennom mukosa. Dendrittiske celler uttrykker tette kontakt-proteiner. Flere av proteinenes uttrykk øker ved modning av cellene slik at de kan bryte gjennom tette kontakter som allerede er etablert mellom cellene og danne nye liknende strukturer med epitelcellene. På denne måten kan de dendrittiske cellene reagere med materialet i lumen, uten å bryte den beskyttende, ytre barrieren i tarmen (figur 3). Ved aktivering av cellene vil de deretter migrere til lymfatiske vev og presenterer antigen for T-cellene (Rescigno et al. 2001).



Figur 3: Dendrittiske celler kan strekke dendritter mellom epitelcellene og fange antigen fra lumen. Dette kan gjøres uten å ødelegge den epiteliale barrieren som dannes med epitelceller og tette kontakter. Grunnen til dette er at dendrittiske celler også uttrykker tette kontaktproteiner. Når cellene aktiveres øker deres uttrykk av occludin, som er en av hovedkomponentene i tette kontakter, slik at tette kontakt-liknende strukturer kan dannes med de omkringene epitelcellene. Senere i aktiveringen oppreguleres ZO-1 (som er et cytoplasmatisk protein knyttet til tight junction) og occludin nedreguleres slik at tette kontakter reorganiseres og cellene kan trekke seg tilbake og ned i vevet. (Rescigno et al. 2001)

De dendrittiske cellene har dermed flere funksjoner i tarmens immunsystem ved at de tar opp antigene forbindelser fra patogene bakterier som har penetrert M-cellene, eller antigene forbindelser som M-cellene har fagocyttert, i tillegg til at de selv penetrerer epitelaget og fanger opp antigen direkte fra lumen.

1.4 Aktivering av antigenpresenterende celler

Dendrittiske celler, B-celler, monocytter og makrofager er profesjonelle antigenpresenterende celler (APC) som på ulike måter vil påvirke immunforsvaret.

Dendrittiske celler er en effektiv aktivator av T-celler. B-celler kan selv endocyttere antigen T-celler på den andre siden gjenkjenner antigen i kompleks med vevsforlikelighetsantigener (MHC), presentert av APC (Banchereau & Steinman 1998).

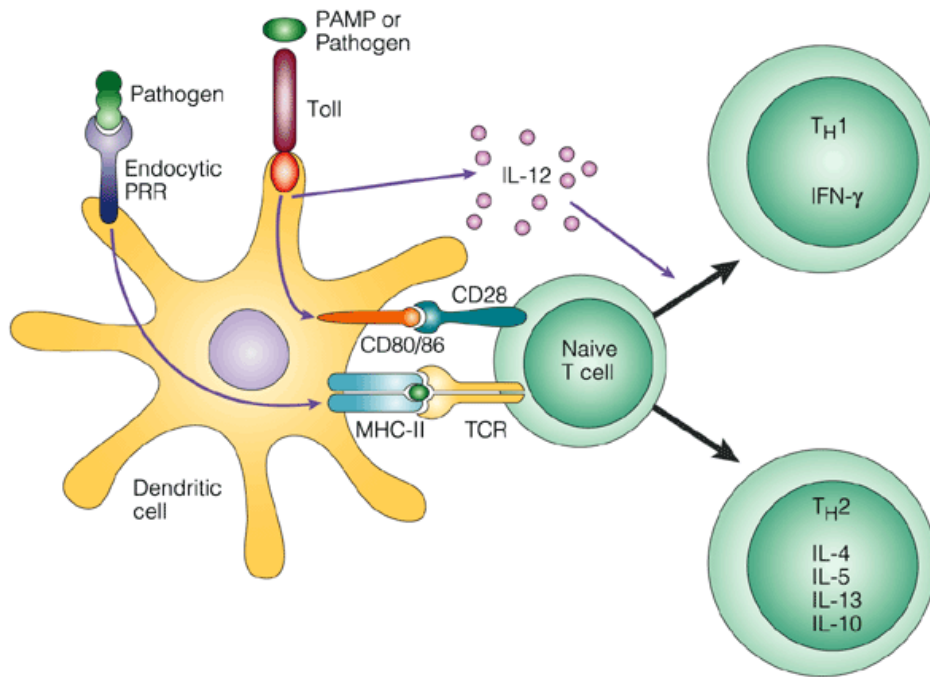
T-cellene deles i flere undergrupper. $CD4^+$ T-celler kalles T-hjelperceller T_H . Disse kan igjen deles inn i nye grupper ved aktivering, T_H1 , T_H2 og T_H17 som har forskjellige egenskaper. T_H1 produserer proinflammatoriske cytokiner som $IFN-\gamma$ og induserer produksjon av IL-12 hos dendrittiske celler. T_H2 cellene er ofte involvert i modningen av B-cellene og frigjør IL-4 som er en viktig vekstfaktor for B-cellene. T_H2 produserer også IL-10 og IL-6. T_H17 produserer IL-17 som er et proinflammatorisk cytokin, og ved autoimmune sykdommer er det ofte sett at T_H17 er med på å øke den pågående inflammasjonen (Rescigno & Di Sabatino 2009). $CD4$ og $CD25$ positive T-celler kalles T-regulatoriske celler, T_{reg} . De er med på å

kontrollere T-cellenes effektorceller og nedregulering av inflammasjonen. CD8⁺ T-celler er cytotoksiske T-celler, T_C, som ved aktivering vil indusere apoptose hos målcellen (Lea 2006; Rescigno & Di Sabatino 2009).

MHC klasse I finnes i varierte mengder på kjerneholdige celler (Lea 2006), hvor de presenterer intracellulære antigen. T_C, viser MHC klasse I restriksjon. MHC klasse II uttrykkes på APC og presenterer endosomale antigen. APC med antigen i sitt MHC klasse II molekyl, vil kunne aktivere T_H cellene (Banchereau & Steinman 1998). Ved modning av APC vil cellene få økt uttrykk av MHC klasse II ved at omsetning av molekylene nedreguleres. MHC klasse II øker sin levetid i membranen ved at ubiquitinerings av deres cytoplasmatiske hale opphører (Shin et al. 2006). MARCH1 er en ubiquitin ligase som merker MHC II molekylene (De Gassart et al. 2008).

1.5 Kostimulerende molekyler

MHC molekyler alene kan ikke aktivere T-celler. De er avhengig av to signaler, ett gjennom TCR reseptoren som binder til MCH klasse II og et signal indusert av de kostimulerende molekylene CD80 (B7-1) og CD86 (B7-2) (figur 4). Molekylene uttrykkes på aktiverte APC og binder til CD28 og CTLA-4 molekylene hos T-cellene. Uten kostimulerende molekyler til å overføre signal to, vil T-cellene gå i en anergisk tilstand slik at de ikke utvikles til effektorceller (Sharpe & Freeman 2002). Forskjellen på CD28 og CTLA-4 er at CD28 gir en forsterkende effekt på aktiveringen, slik at T-cellene kan modnes til effektorceller, i motsetning har CTLA-4 en hemmende effekt. CD28 er kontinuerlig uttrykt hos T-celler (Butte et al. 2007; Taylor et al. 2004). Signalering gjennom reseptoren fører til at cytokin- og kjemokin-produksjon øker. I tillegg vil cytokin-reseptorer og CD40 ligand, som beskrives nedenfor, oppreguleres (Mc Adam et al. 1998).



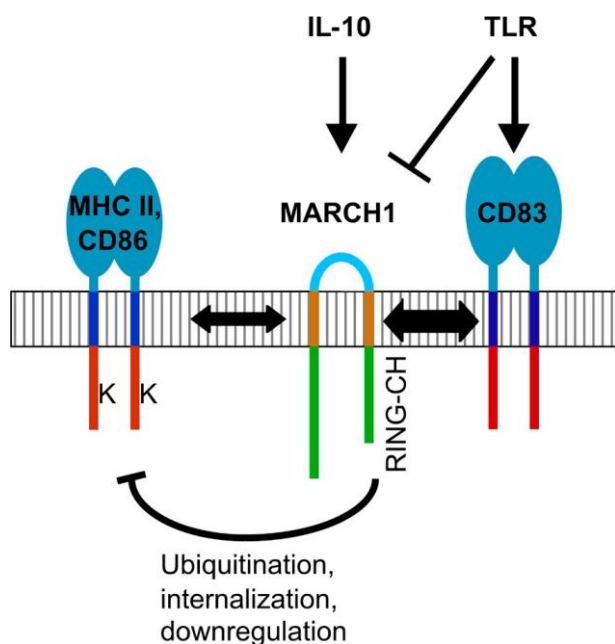
Nature Reviews | Immunology

Figur 4: Profesjonelle antigenpresenterende celler aktiverer T-celler gjennom to signaler. Et signal går gjennom MHC klasse II og et signal går gjennom CD80/86 signalisering til CD28 hos T-cellene. Aktiveringen av T-cellenes underklasse, T-hjelper cellene, kan blant annet ende opp med T_H1 eller T_H2 differensiering (Medzhitov 2001).

1.5.1 CD83

CD83 fungerer i likhet med CD86, CD80 og MHC molekylerne som en modningsmarkør for dendritiske celler (Tze et al. 2011). CD83 er også funnet uttrykt på T-celler, koblet til TCRs aktivering av NF- κ B signaleringsvei (McKinsey et al. 2000). Det er foreløpig ikke mye som er kjent om funksjonen til CD83. CD83 har en innvirkning på utviklingen av T-celler. Fravær av CD83 vil hemme utviklingen av thymocytter til $CD4^+$ T-celler (Kuwano et al. 2007). Flere studier har vist at nedregulering av CD83 uttrykk på dendritiske celler fører til reduksjon i T-celle-aktivering. Stimulering av CD83 på dendritiske celler viser seg å ha en effekt på deres modning (Aerts-Toegaert et al. 2007; Kruse et al. 2000).

MHC II og CD86 nedreguleres blant annet ved ubiquitinerings ved hjelp av MARCH1 (figur 5). Ved aktivering av cellene oppreguleres uttrykket av CD83 som har en hemmende effekt på ligasens ubiquitinerings av MHC II og CD86. Dette fører til oppregulering av disse to membranmolekylerne (Tze et al. 2011).



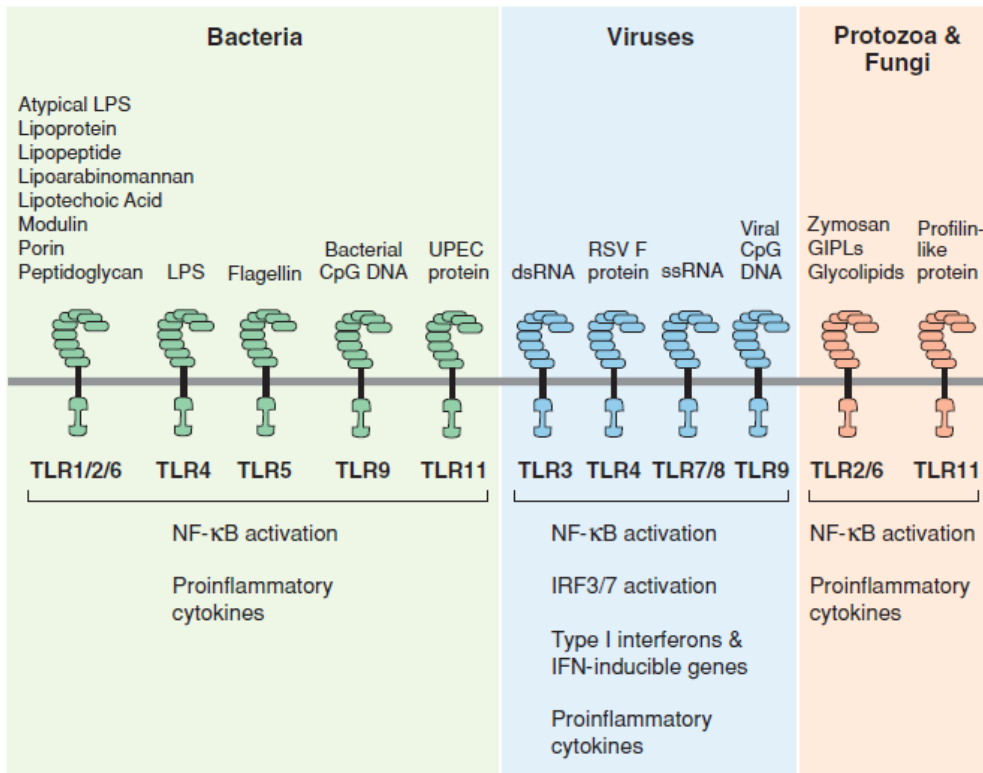
Figur 5: Aktivering av CD83 molekylet hemmer MARCH1 ligasens ubiquitinerings av MHC klasse II og CD86. Disse molekylene vil dermed oppreguleres på cellens overflate (Tze et al. 2011)

1.5.2 CD40

CD40 uttrykkes på flere leukocytter som DC, monocytter, B-celler og T-celler, også epitelceller har vist uttrykk av dette molekylet. CD40 er kjent for å indusere B-celle proliferasjon og utvikling av plasmaceller ved interaksjon med CD40 liganden, CD154. Når dendritiske celler stimuleres ved en CD40/CD40L interaksjon øker deres antigenpresenterende egenskaper ved at MHCII, CD80 og CD86 oppreguleres. Produksjonen av inflammatoriske cytokiner øker også (Ma & Clark 2009). Etter CD40/CD40L interaksjon mellom T-celler, dendritiske celler og B-celler, vil også dendritiske celler og B-celler uttrykke CD40L. Dermed kan dendritiske celler indusere B-cellenes antistoffproduksjon ved at de stimulerer B-celler med CD40L (Pinchuk et al. 1996). Dendritiske celler kan også påvirke hverandre. Ved CD40 aktivering vil et av utfallene være rekruttering av TRAF6 som aktiverer NF- κ B signaleringsvei (Ma & Clark 2009).

1.6 Aktivering av immunrespons

Immuncellene i det medfødte immunforsvaret uttrykker reseptorer som er essensielle for å detektere mikroorganismer ved en infeksjon. Mikrobielle molekyler gjenkjennes av blant annet mønstergjenkjennende reseptorer, PRR (Pattern Recognizing Receptors). Eksempler på mikrobielle molekyler er lipopolysakkarid (LPS) og virale- og bakterielle nukleinsyrer (figur 6). Typiske PRR er Toll-liknende reseptorer (TLR), Nucleotide Oligomerization Domain-like receptors (NLR) og komplimentreseptorer (West et al. 2006).



Figur 6: Tolliknende reseptorer gjenkjenner blant annet mikrobielle antigen. Figuren viser hvilke mikrobielle molekyler hver reseptor har spesifisitet for. Binding av ligand til reseptorene setter i gang en respons i cellen, blant annet aktivering av NF-κB signalvei (West et al. 2006).

TLR4 binder lipopolysakkarid som finnes i yttermembranen hos Gram-negative bakterier. TLR4 alene kan ikke binde LPS. Den er avhengig av et annet molekyl, MD-2, som sammen med TLR4 utgjør TLR4/MD-2 komplekset (Fitzgerald et al. 2004). Ligandbinding til de forskjellige TLR reseptorene vil frembringe forskjellige responser. TLR reseptorene har en cytoplasmatisk del, TIR (TOLL/IL-1 reseptor). Ved ligandbinding og aktivering av reseptorene vil et adapterprotein, MyD88 rekruttere kinasen IRAK (IL-1 reseptor associated kinase) til reseptorene. Deretter rekrutteres TNF reseptor associated factor 6, TRAF6 (Akira 2003). Rekruttering av TRAF6 til IRAK-4 (og TIRAP i noen tilfeller) resulterer i aktivering av signalveier som regulerer uttrykk av gener involvert i cytokin produksjon og kostimulerende faktorer. NF-κB er transkripsjonsfaktorene som aktiveres gjennom TLR og TRAF6 aktivering. Aktivering gjennom noen av TLR reseptorene er uavhengig av MyD88 rekruttering (Verstak et al. 2009).

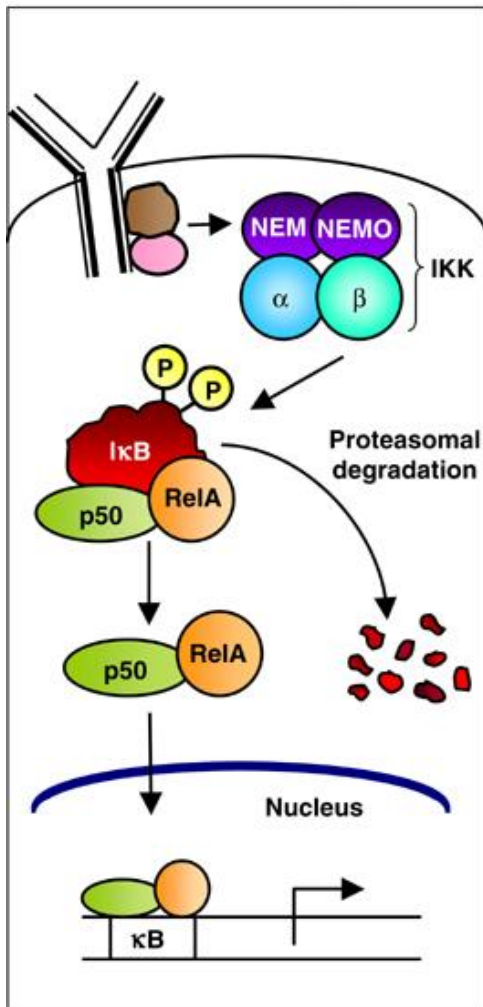
1.6.1 NF-κB

Transkripsjonsfaktor nuclear factor-kappa B, NF-κB, regulerer transkripsjon av flere gen som blant annet påvirker fysiologisk utvikling og immunrespons. Dette er proteiner som ved feil regulering kan forårsake flere sykdommer, blant annet kronisk inflammasjon,

immunsvekkelse og kreft (Courtois & Gilmore 2006). Aktivering av NF- κ B signalvei kan blant annet skje ved ligandbinding til TLR reseptorene. Aktivering kan også skje som en respons på stress og intracellulære forandringer som DNA ødeleggelse. (Hayden & Ghosh 2012).

NF- κ B protein-familien består av RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 og p52. Alle proteinene bortsett fra p50 og p52 har c-terminale transkripsjons aktiveringsdomener, såkalte TADs. Disse rekrutterer andre aktivatorer slik at målgenet uttrykkes. Ved aktivering danner proteinene homo- eller heterodimerer, som er avgjørende for en aktiv transkripsjonsfaktor. p50 og p52 mangler TADs. De kan danne heterodimerer med andre NF- κ B proteiner eller påvirke transkripsjon ved å binde til DNA som homodimerer og dermed blokkere binding av andre heterodimerer (Hayden & Ghosh 2011).

I ustimulert tilstand holdes NF- κ B dimerene inaktive ved nonkovalente bindinger til I κ B proteiner (Inhibitor of κ B kinase). Stimuli trigger konformasjonsendring hos reseptor og fører til aktivering av I κ B kinasekomplekset, IKK. Kinasene er koblet til regulatoriske proteiner, NEMO eller TAB, og danner et kinasekompleks. De regulatoriske enhetene fungerer som adapterer for kinaserekruttering. Kinasekompleksene rekrutterer og fosforylerer I κ B proteiner. De fosforylerte I κ B proteinene merkes av ubiquitin ligase for degradering. I proteasomene blir proteinene degradert slik at NF- κ B dimerene frigjøres og kan translokere til kjernen. Her vil NF- κ B proteinene binde til spesifikke κ B sekvenser på DNA og fremme en transkripsjon av de aktuelle genene (figur 7) (Hayden & Ghosh 2012).



Figur 7: Klassisk aktiveringsvei er avhengig av et regulatorisk protein NEMO, som sammen med IKK α og IKK β fosforilerer I κ B. Den blir merket for degradering og frigjør dermed NF- κ B dimere som translokteres til kjernen og fremmer transkripsjon (Gilmore 2006).

1.7 Cytokinproduksjon

Som en del av modningsprosessen for de profesjonelle antigenpresenterende cellene, fremmes produksjon av utvalgte cytokiner. Dette er med på å påvirke immunstimuleringen. Det har vist seg at dendrittske celler har en sentral rolle i polariseringen av T-hjelper cellene (Moser & Murphy 2000)

1.7.1 IL-12

IL-12 er et heterodimer bestående av p40 og p35. p40 og p35 utgjør sammen det biologiske aktive IL-12 p70. Det er et proinflammatorisk cytokin produsert av aktiverte dendrittske celler, makrofager og monocytter (Trinchieri et al. 2003).

IL-12 produksjon hos antigenpresenterende celler har en induserende effekt på T-hjelper cellene, slik at de starter polariseringen til T_H1 effektorceller (figur 3). Denne undergruppen

av T-celler starter deretter produksjon av IFN- γ og IL-2 som også er med på å differensiere flere T-celler (Lea 2006; Trinchieri et al. 2003). T_H1 cellene er med i den cellulære delen av immunforsvaret ved at de er med på å aktivere andre immunceller som makrofager og cytotoksiske T-celler (Elkins et al. 2002; Lea 2006).

1.7.2 IL-10

IL-10 er et antiinflammatorisk cytokin som nedregulerer immunresponsen på flere måter. Det er produsert av flere immunceller som makrofager, dendritiske celler, B-celler og T-celler. T_H2- og T_{reg} celler produserer IL-10 og produksjonen hemmer effektor-responsen fra T-cellene og nedregulerer dermed inflammasjonen (Couper et al. 2008).

Som nevnt ovenfor fører oppregulering av CD83 til en stabilisering og dermed en økning av MHCII og CD86 ved at ubiquitineringsen av overflatemolekylene hemmes (Figur 4). Denne ubiquitineringsen av MHCII og CD86 ved MARCH1 drives av IL-10. Økning av IL-10 vil derfor inhibere modningen av profesjonelle antigenpresenterende celler (Tze et al. 2011).

1.7.3 IL-6

IL-6 er et proinflammatorisk cytokin som produseres av flere celler, blant annet dendritiske celler, makrofager, B-celler og epitelceller. Det er flere signaler som fører til syntese av IL-6, deriblant flere cytokiner og LPS. IL-6 har vært kjent som en vekstfaktor for B-celler. (Dienz & Rincon 2009). T_H17 celler induseres blant annet av IL-6, mens T_{reg} differensiering hemmes av IL-6 (Kimura & Kishimoto 2010). Akutfase-reaktanter er en viktig del av den medfødte immunreaksjonen. IL-6 har en viktig rolle for disse reaktantene da det stimulerer produksjon (Kishimoto 2010).

1.8 Nedregulerende faktorer av immunforsvaret

Flere regulerende faktorer er nevnt ovenfor. CTLA-4 som oppreguleres ved TCR aktivering, konkurrerer mot CD28 om CD80/CD86 ligandene fra profesjonelle antigenpresenterende celler. IL-10 har en nedregulerende effekt på flere områder.

1.8.1 PD-L1/PD-1

PD-L1 (programmed death- ligand 1) er en del av B7 superfamilien sammen med blant annet CD80 og 86. PD-L1 er liganden til PD-1. PD-1 uttrykkes på T-celler, B-celler, monocytter og noen dendritiske celler. Oppreguleringen av molekylet skjer etter ett til to døgn etter antigenstimulering gjennom TCR. Uttrykket av PD-L1 oppreguleres også ved aktivering, og

er uttrykt på B-celler, T-celler og dendrittiske celler. Det finnes også uttrykk av liganden hos endotelceller i enkelte organer (Brown et al. 2010).

For at PD-1 skal ha en hemmende effekt i cellene må den være lokalisert i nærheten av TCR og CD28. Måten den nedregulerer T-celle aktivitet på er ved å hemme uttrykk av et overlevelseshemmer og hemme metabolisme av glukose (Greenwald et al. 2005). Det er ikke bare hemmende effekter som blitt observert. Det har også blitt vist at PD-L1 kan indusere en oppregulerende effekt for T-cellene (Keir et al. 2007).

1.9 BioProtein

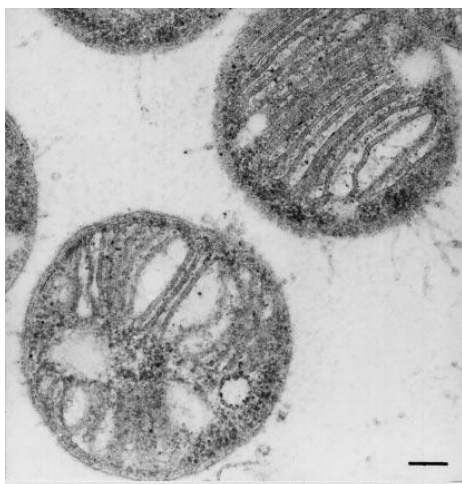
BioProtein produseres ved fermentering av naturgass med metanotrofe bakterier. 88 % av proteinet stammer fra den metanotrofe bakterien *Methylococcus capsulatus* (Bath). Ved siden av å kunne være en proteinkilde i dyrefôr er det vist at det kan hindre utviklingen av kolitt hos forsøksdyr (Romarheim et al. 2011).

Laks matet med soyabønnebasert fôr (SBM- soybean meal) utvikler en inflammasjonstilstand i tarmen som minner om kolitt hos pattedyr. Det er gjort forsøk med laks som viser at BioProtein motvirker utviklingen av inflammasjon som er indusert av SBM, og nøytraliserer dermed utviklingen av tarminfeksjon. (Romarheim et al. 2011).

Kleiveland CR., et al (manuskript under utarbeidelse) viser i en musemodell at BioProtein gitt profylaktisk, forebygger utviklingen av kolitt.

1.10 *Methylococcus capsulatus*

Methylococcus capsulatus (Bath) er en metanotrof Gram-negativ bakterie. Den bruker metan som eneste karbon-kilde. Når bakterien dyrkes i medium som inneholder kobber dannes det en indre membran med sammensatt struktur (figur 8). Dette skyldes at mengden av metan monooksygenase enzymet (MMO) øker ved tilstedeværelse av kobber, dermed øker også mengden av indre membraner fordi dette er et enzym i elektrontransportkjeden. MMO oksiderer metan til metanol og membranene er involvert i oksideringen (Fjellbirkeland et al. 1997; PRIOR & DALTON 1985).



Figur 8: *Methylococcus capsulatus* dyrket i medium med kobber. Ved tilstedeværelse av kobber dannes det innvaginering i den cytoplasmatiske membranen (Fjellbirkeland et al. 1997).

1.11 Prosjektets målsetting

Bakgrunnen for denne oppgaven er observasjonene som ble gjort i et studie utført av Kleiveland CR. et al. hvor det ble vist at BioProtein hadde en immunregulerende effekt ved tarminfeksjon hos mus. BioProtein består av 88 % *Methylococcus capsulatus*. Derfor er det interessant å undersøke om *M. capsulatus* alene har samme effekt og om det har samme egenskaper hos mennesker. Dette er spesielt interessant innenfor inflammatorisk tarmsykdom problematikken.

Dette prosjektet har tatt for seg *M. capsulatus* stimuleringssevner av det humane immunsystemet ved å danne testsystemer som måler immunaktivitet *in vitro*. Analysene innebar testing av *M. capsulatus* aktiverings-evne ovenfor dendrittiske celler og monocytter (U937 cellelinje). Grunnen til at dendrittiske celler ble brukt i dette prosjektet er fordi de har en viktig rolle i tarmens immunforsvar ved at den tar opp antigen fra tarmen og presenterer disse for T-celler.

2.0 Materialer

2.1 Laboratorieutstyr og instrumenter

Teknikk	Utstyr/instrumenter	Produsent
Celledyrking	24 brønnsplate	BD Falcon
	75 cm ² Tissue culture flask	BD Falcon
	CO ₂ inkubator	Thermo Scientific
	Partikkelteller	Beckman Coulter
	Plastrør 15 ml	Greiner Bio-One
	Plastrør 50ml	Greiner Bio-One
Bakteriedyrking	Ecotron	Infors HT
	UV-160A	Shimadzu
	Kyvetter	Brand
Monocytt-isolering	Separator	MACS Miltenyi Biotec
	MACS kolonne	MACS Miltenyi Biotec
	Pre-separeringsfilter	MACS Miltenyi Biotec
Mikroskopi	Leica DFC 420	Leica
Sentrifuger	Megafuge	Heraeus
	Biofuge pico	Heraeus
Luciferase-assay	96-brønnsplate, hvit	Thermo Scientific
	Top Count NXT	Packard
Væskestrømscytometri	MACS Quant Analyzer	MACS Miltenyi Biotec
	MACS Quantify software	MACS Miltenyi Biotec
	96-brønnsplate	Fisher Scientific
Elisa	96 Well EIA/RIA Plate	Costar
	Sunrise Absorbance Reader	Tecan

2.2 Kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
ABTS diammonium salt	Roche
Borsyre	Sigma
Bovint serum albumin, BSA	Sigma
CD14 Micro beads	MACS Miltenyi Biotec
EDTA di sodium salt	Sigma
FeEDTA	Sigma
GM-CSF	Immunotools
Hydrogenperoksid	Sigma
IL-4	Immunotools
Jernsulfat heptahydrat	Sigma
Kaliumfosfat enbasisk	Sigma
Kaliumnitrat	Sigma
Kalsium klorid	Sigma
Kobolt(II)klorid hexahydrat	Sigma
Kobber(II)sulfat pentahydrat	Sigma
LPS, <i>Echerichia coli</i> O127:B8	Sigma
Lymfoprep	Axis Shiled
Luciferase assay system	Promega
MACS Quant kalibrator	MACS Miltenyi Biotec
Magnesiumsulfat heksahydrat	Sigma
Mangan(II)klorid tetrahydrat	Sigma
Natriumfosfat dibasisk dodecahydrat	Sigma
Natriummolybdat dihydrat	Sigma
Nikkel(II)klorid heksahydrat	Sigma
PGE2	Sigma
R-human IL-6	R&D
R-human IL-10	R&D
Sinksulfat heptahydrat	Sigma
Streptavidin HRP konjugat	R&D Systems
TNF- α	Immunotools
Tween 20	Sigma

2.3 Antistoff

Antistoff	Produsent
Mouse anti-human CD40	BD Biosciences
Mouse anti-human CD80	BD Biosciences
Mouse anti-human CD86	BD Biosciences
Mouse anti-human PD-L1	BD Biosciences
Mouse anti IL-6 Capture antibody	R&D Systems
Mouse anti IL-10 Capture antibody	R&D Systems
Goat anti IL-6 Detection antibody	R&D Systems
Goat anti IL-10 Detection antibody	R&D Systems

2.4 Medier og løsninger

Medier og løsninger	Produsent
RPMI 1640	PAA
Dulbeccos PBS	PAA
Føtalt kalveserum, FCA	PAA
Gentamicin	Bio Whittaker
Ikke-essensielle aminosyrer	PAA
Natrium-pyruvat	PAA
Monothioglycerol	Sigma
Trypsin EDTA	PAA
L-Glutamin	Fisher Scientific

2.5 Cellelinjer og bakterier

Cellelinje/bakterier	Produsent
U937	ATTC
<i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)	NCIMB

2.6 Oppskrifter

2.6.1 Cellearbeid

RPMI dyrkningsmedium	
Natrium pyruvat	1mM
Ikke-essensielle aminosyrer	5 ml
Gentamicinsulfat	25 µg/ml
Monothioglycerol	5x10 ⁻⁵ M
Føtalt kalveserum	10 %
Tilsettes en 500 ml flaske RPMI 1640	

Innfrysningsmedium
RPMI 1640 dyrkningsmedium med 20 % FCS og 20 % DMSO

Differensieringsmedium for modning av dendrittiske celler	
RPMI 1640 dyrkningsmedium	
IL-4	25 ng/ml
GM-CSF	50 ng/ml

Positiv kontroll for aktivering av dendrittiske celler	
RPMI 1640 dyrkningsmedium	
LPS	100 ng/ml
PGE2	5 ng/ml
TNF-α	15 ng/ml

2.6.2 Monocytisolering fra PBL

Monocytisoleringsbuffer

PBS

BSA 0,5 %

EDTA 2 mM

2.6.3 Elisa

Vaskebuffer

PBS

Tween 20 0,01 %

Diluent/blokkeringsløsning

PBS

BSA 1 %

Substratløsning

ABTS 0,18 mg/ml

Natriumacetat pH 4 0,1 M

3 % H₂O₂ 0,8 µl/ml

2.6.4 Bakteriedyrking

NMS medium

Kaliumnitrat 1 mg/ml

Magnesiumsulfat heksahydrat 1 mg/ml

Kalsiumklorid 0,1 mg/ml

FeEDTA 0,38 mg/ml

Natriummolybdat dihydrat 0,26 µg/ml

Kobber(II)sulfat pentahydrat 0,1 mg/ml

Jernsulfat heptahydrat 1 µg/ml

Sinksulfat heptahydrat 1 mg/ml

Borsyre	10 µg/ml
Kobolt(II)klorid hexahydrat	10 µg/ml
EDTA di sodium salt	0,5 mM
Mangan(II)klorid tetrahydrat	10 µg/ml
Nikkel(II)klorid heksahydrat	10 µg/ml
Natriumfosfat dibasisk dodecahydrat	0,716 mg/ml
Kaliumfosfat enbasisk	0,26 mg/ml
H₂O	

2.6.5 NF-κB luciferase assay

RPMI 1640 med Hygromycin B

Glutamin	2 mM
Gentamicin	0,5 µl/ml
Hygromycin B	75 µg/ml
FCS	10 %
RPMI 1640	

Sultemedium

RPMI 1640

Gentamicin	0,5 µl/ml
Glutamin	2 mM
FCS	2 %

3.0 Metoder

3.1 Dyrking av U937 cellelinje

Materialer:

U937 monocyttcellelinje, T75 celleflasker, RPMI 1640 med 10 % FBS, partikkelteller og celleinkubator.

Prosedyre:

U937 (gave fra R. Blomhoff, Universitetet i Oslo) er stabilt transfektert med reporterplasmid (Austena et al. 2009). Cellene ble dyrket i T75 celleflasker i 37 °C med 5 % CO₂. Ved splitting ble cellesuspensjonen spunnet ned ved 1300 rcf og cellepelleten resuspendert i 1 ml RPMI 1640. 20 µl av cellesuspensjonen ble fortynnet i 10 ml tellevæske. Partikkeltelleren ble stilt inn på å telle antall partikler mellom 4 og 12 µm. 1 million celler ble dyrket videre i 20 ml RPMI 1640 med 10 % FCS.

3.2 Nedfrysing av celler

Materialer:

RPMI 1640 medium, innfrysningsmedium, kryoampuller

Prosedyre:

En cellekonsentrasjon på 10 millioner/ml ble laget med RPMI medium med 20 % FCS. Innfrysningsmedium, som består av RPMI 1640 med 20 % FCS og 20 % DMSO, ble tilsatt dråpevis til avkjølt celledøsning. Forholdene var 1/2 med cellesuspensjon og innfrysningsmedium. Cellesuspensjonen ble overført til cryorør og deretter til – 80 °C fryser før de senere ble satt i nitrogentanken.

3.3 Tining av celler

Materialer:

RPMI 1640 med 10 % FCS, vannbad

Prosedyre:

Ampullen med cellesuspensjonen ble tint ved 37 °C til en ispellet var igjen. Cellene ble deretter overført til et 50 ml nuncrør med 10-30 ml medium, avhengig av antall ampuller, og sentrifugert ned ved 1300 rcf. Ønsket celleantall ble overført til en beholder med nytt medium.

3.4 NF- κ B luciferase assay

Materialer:

U937 celler, hygromycin B medium, sultemedium, Bright-Glo Luciferase assay, 8-kanalspipette, traue, mikrotiterplate, luminometer.

Prosedyre:

Blomhoffs gruppe har transfektert U937 monocytterne med et NF- κ B luciferase reporter-gen og et hygromycin B resistens-gen (Carlsen et al. 2002). Dagen før forsøket ble 3×10^5 celler/ml overført til en celleflaske med 10 ml hygromycin B medium og inkubert over natten. Dagen etter ble cellene spunnet ned og resuspendert i 8 ml sultemedium (2 % FCS). 80 μ l cellesuspensjon ble tilsatt til hver brønn og inkubert i 30 minutter i varmeskap. Deretter ble 20 μ l med stimuli tilsatt. Platen hadde en inkuberingstid på 6 timer før luciferaseaktiviteten ble målt ved å tilsette 100 μ l Bright-Glo Luciferase substrat til hver brønn og inkubere platen med substratet i 2-15 minutter. Platen ble lest av i et luminometer og intensiteten av luminescens korrelerer luciferaseaktiviteten i cellene.

3.5 Stimulering av U937 monocytter

Materialer:

RPMI 1640 medium, *M. capsulatus*

Prosedyre:

U937 cellene ble spunnet ned og resuspendert i 1 ml medium og deretter telt. 1 million celler per brønn ble overført til en 24-brønnsplate. 1 ml med bakteriesuspensjon av OD 0,2 ble tilsatt hver brønn. Til brønner med ustimulerte celler ble 1 ml medium tilsatt. Platen ble inkubert i 1 døgn. Supernatanten fra celle/bakterie suspensjonen ble brukt til videre forsøk.

3.6 Dyrking av *M. capsulatus*

Materialer: NMS medium, *M. capsulatus*, gass med 95 % metan og 5 % CO₂, rysteinkubator

Prosedyre:

10 ml NMS medium til 1 ml bakteriesuspensjon ble tilsatt i en 100 ml kolbe. Til en 100 ml kolbe ble 25 ml gassblanding med 95 % metan og 5 % CO₂ tilsatt. Bakteriesuspensjonen ble inkubert over natt i Ecotron rysteinkubator fra Infors HT ved 200 rpm og 45 °C.

3.7 Tillaging av *M. capsulatus* frysestock

Materialer:

NMS medium, flytende nitrogen, cryorør

Prosedyre:

10 ml bakteriesuspensjon ble spunnet ned og resuspendert i 1 ml NMS medium. Til hvert cryorør overførtes 100 µl av bakteriesuspensjonen og ble deretter fryst ned i flytende nitrogen. Ampullene ble videre fryst ned ved -80 grader.

3.8 Isolering av PBL fra buffy coats

Materialer:

Lymfoprep, hestekanyle, PBS, RPMI 1640 med 10 % FCS og innfrysingsmedium.

Prosedyre:

Buffy coats kommer fra friske blodgivere tappet ved blodbanken Sykehuset Østfold, Fredrikstad. Prosedyren er laget med utgangspunkt i produsentens protokoll for isolering av PBL (perifere blod-leukocytter) ved hjelp av Lymfoprep fra Axis Shield. Det er et gradientmedium som skiller mononukleære celler fra erytrocytter og andre leukocytter. 15 ml buffy coat ble tilsatt 15 ml PBS. 10 ml Lymfoprep ble sakte tilsatt i bunnen av røret, slik at Lymfoprep la seg under blodet. Rørene ble sentrifugert ved 1500 rcf i 25 minutter, uten brems. Lymfoprep skiller erytrocyttene fra leukocytene slik at det dannes flere sjikt med celler. Laget med mononukleære celler dannet et distinkt bånd over Lymfoprep som ble samlet opp og vasket med PBS 3-5 ganger for å ta bort trombocytter. Frem til 3. vask ble cellene spunnet ned ved 700 rcf i 15 min, etter det ble hastigheten økt til 1300 rcf mens sentrifugeringstiden ble redusert til 10 min. Cellene ble resuspendert til 60 millioner celler per ml i medium, deretter ble protokollen for innfrysing av celler brukt. Ampullene med celler ble oppbevart i nitrogentank.

3.9 Isolering av CD14+ monocytter fra PBL

Materialer:

MACS presepareringskolonne, MACS kolonne, CD14 MicroBeads, MACS separator, monocytisoleringsbuffer, RPMI 1640 medium med 10 % FCS, IL-4, GM-CSF, partikkelteller og 24-brønnsplate.

Prosedyre:

Monocyttene ble isolert fra PBL ved hjelp av CD14 partikler fra Miltenyi Biotec, i henhold til prosedyre fra produsenten. PBL ble tint som nevnt ovenfor, spunnet ned og telt. 80 µl monocyttiliseringsbuffer per 10^7 celler og 20 µl CD14 microbeads per 10^7 celler ble tilsatt og blandet godt. Cellesuspensjonen ble inkubert kjølig (2-4 grader) i 15 min. 1-2 ml monocyttiliseringsbuffer per 10^7 celler ble tilsatt og spunnet ned. For celleantall opp til 60-70 millioner ble én separeringskolonne brukt. Til hver separeringskolonne ble 500 µl cellesuspensjon med buffer tilsatt etter at kolonnen var blitt fuktet med 500 µl buffer. Cellesuspensjonen fikk renne gjennom før kolonnen ble vasket med 500 µl buffer tre ganger. Kolonnen ble deretter overført til et nytt rør og tilsatt 1 ml buffer som ble presset gjennom kolonnen med et stempel. Celleantallet ble telt og suspensjonen spunnet ned. Pelleten ble resuspendert i differensieringsmedium og sådd ut i en 24-brønnsplate med en tetthet på 2 millioner celler per brønn.

3.10 Differensiering av CD14⁺ monocyttter til dendrittiske celler

Materialer:

RPMI 1640 med 10 % FBS, GM-CSF og IL-4

Prosedyre:

Monocyttene som ble isolert med CD14 partikler ble differensiert i nærvær av 25 ng/ml IL-4 og 50 ng/ml GM-CSF til modningsdag 4, hvor mediet ble skiftet ut og erstattet med nytt differensieringsmedium med samme konsentrasjoner av IL-4 og GM-CSF. På modningsdag 6 ble de umodne DC tilsatt stimuli. Som positiv kontroll bruktes LPS (100 ng/ml), PGE2 (5 µg/ml) og TNF- α (15 ng/ml), celler brukt som kontroll for umodne dendrittiske celler ble tilsatt vanlig dyrkningsmedium (Christoffersen et al. 2012).

3.11 Stimulering av dendrittiske celler med *M. capsulatus*

Materialer: 24-brønnsplate, RPMI med 10 % FCS, PBS, spektrofotometer

Prosedyre:

De dendrittiske cellene ble stimulert til umodne DC, før de på 6. modningsdag ble tilsatt stimuli. *M. capsulatus* ble vasket med PBS, spunnet ned ved 4000 rcf i 10 minutter og resuspendert i RPMI 1640 medium med 10 % FCS til suspensjonen OD 0,2. Mediet i de aktuelle brønnene ble byttet ut med bakteriemediet og inkubert over natt, sammen med positiv kontroll for modning av DC og negativ kontroll for umodne DC.

3.12 Test av overflatemarkører på stimulerte DC

Materialer: anti-human CD83, anti-human CD86, anti-human CD80, anti-human CD40, anti-human PD-L1, væskestrømcytometer, PBS, mikrotiterplate, trypsin-EDTA, RPMI med 10 % FBS.

Prosedyre:

På 7. modningsdag ble cellene vasket 1-2 ganger med PBS før de ble trypsinert. Likt volum RPMI 1640 med 10 % FBS ble tilsatt for å nøytralisere trypsin. Deretter ble celsuspensjonen overført til en 96-brønns plate og vasket med PBS. Cellene ble farget med fluorkrom konjugerte antistoff etter anvisning fra produsent; 5 µl Alexa Fluor-CD86, 20 µl PE-cy5-CD83, 5 µl PE-PD-L1, 20 µl PE-CD80, 20 µl PE-CD40. Inkuberingen forgikk i 45 minutter i romtemperatur. Deretter ble cellene vasket og resuspendert i PBS. Væskestrømcytometer ble innstilt til å suge opp 100 µl prøvemateriale til hver analyse. Cellene passerer en laserstråle i en væskestrøm og emittert lys detekteres. Intensiteten av emittert lys gjenspeiler antall fluorkrommolekyler som er koblet til cellene, altså uttrykk av overflatemolekylene CD86, CD83, CD80, CD40 eller PD-L1 på cellene.

3.13 Måling av cytokinproduksjon

3.13.1 ELISA IL-10

Materialer:

Coating antistoff (capture antibody), biotinyler antistoff (detection antibody), rekombinant humant IL-10, streptavidin HRP, ABTS, vaskebuffer, diluent, 96-brønnsplate, absorbans plateleser, RPMI 1640 med 10 % FBS.

Prosedyre:

Cytokin konsentrasjon ble målt med ELISA med prosedyre utviklet i henhold til produsenten. En 96-brønnsplate ble coatet med 100 µl av 2 µg/ml mus-anti-human IL-10 og inkubert i romtemperatur over natt. Platen ble vasket med 200 µl vaskebuffer med fire repetisjoner, som ble gjentatt etter hver inkubering i forsøket. 300 µl blokkeringsbuffer per brønn ble inkubert i en time, med et etterfølgende vasketrinn. En standard på 2 ng/ml rekombinant IL-10 ble titrert til 31,25 pg/ml, og inkubert i 2 timer sammen med prøver, blank og medium. 100 µl biotinyler geit-anti-human IL-10 med konsentrasjon på 150 ng/ml ble tilsatt til brønnene og inkubert i 2 timer. Deretter ble platen inkubert i 20 minutter med 100 µl/brønn streptavidin konjugert HRP (horseradish peroxidase) fortynnet 1:200. 8 µl hydrogenperoksid per 10 ml

ABTS, HRP-substrat, ble tilsatt rett før fremkalling, hvor 100 µl substratløsning ble tilsatt hver brønn. Når ABTS oksideres av peroksidase blir løsningen gradvis grønn. Platen ble lest av med en Tecan Sunrise absorbans plateleser ved 405 nm. Absorbansen ble avlest når høyeste standard nådde OD 1. Prøvenes OD målinger viser cytokinenes konsentrasjon i løsningene ved at transmittansen minker ved økt konsentrasjon av cytokiner.

3.13.2 ELISA IL-6

Materialer:

Coating antistoff (capture antibody), biotinyllert antistoff (detection antibody), rekombinant humant IL-6, streptavidin HRP, ABTS, vaskebuffer, diluent, 96-brønnsplate, Sunrise absorbans plateleser, RPMI 1640 med 10 % FBS.

Prosedyre:

Cytokin-produksjonen av IL-6 ble målt med samme fremgangsmåte som for IL-10, men med andre konsentrasjoner av standard og biotinyllert anti-human IL-6. Standard ble titrert fra 600 pg/ml til 9,38 pg/ml i RPMI 1640 medium. Biotinmerket anti-human IL-6 ble tillaget med en konsentrasjon på 50 ng/ml i diluent.

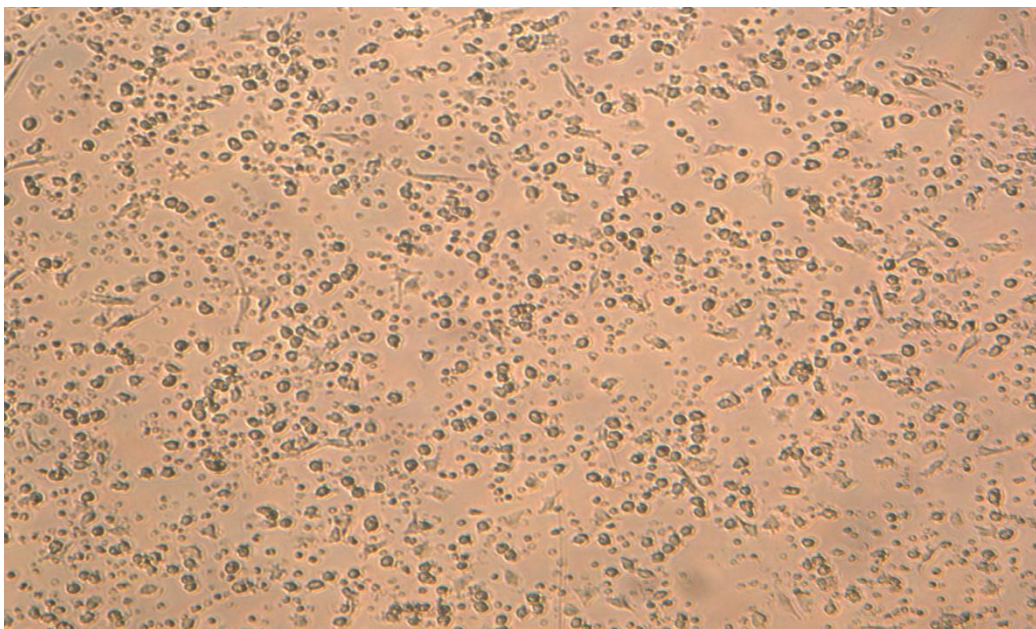
4.0 Resultater

Gjennom denne oppgaven ble det undersøkt hvilke effekter *M. capsulatus* har på humane monocytt-deriverte dendrittiske celler og den humane monocyttcellelinjen U937. Dette ble gjort med bakgrunn i den effekten som er funnet av BioProtein på forbygging av kolitt hos mus (Kleiveland CR., et al. Manuskript under utarbeidelse).

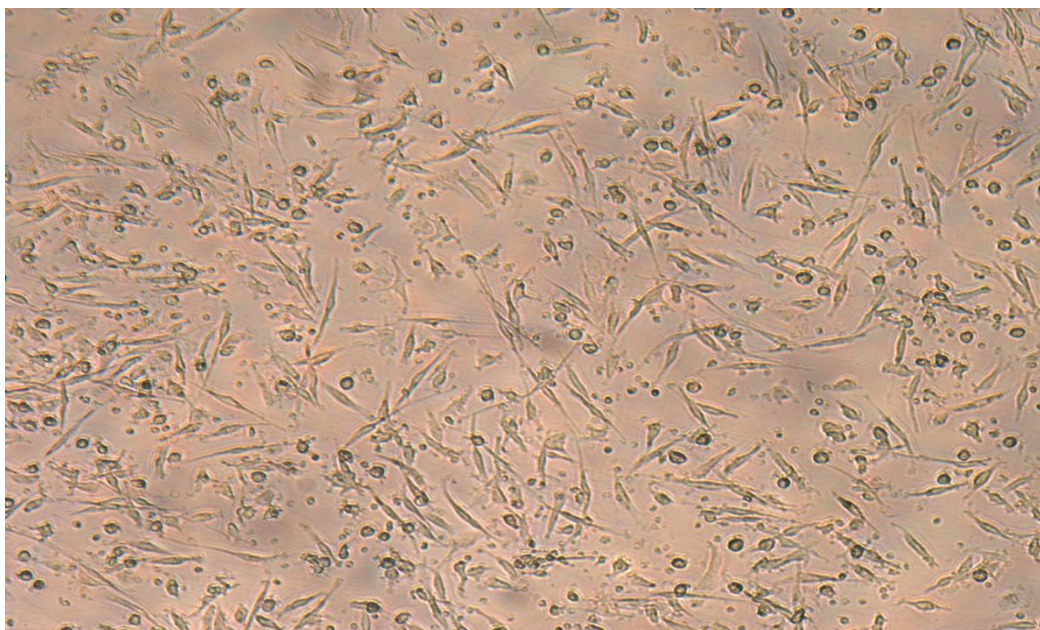
4.1 Differensiering av dendrittiske celler

Monocytter kan isoleres fra perifere mononukleære leukocytter ved positiv seleksjon av CD14⁺ celler. Ved *in vitro* dyrking i nærvær av cytokinene GM-CSF og IL-4 differensierer cellene til umodne dendrittiske celler i løpet av 6 dager.

På dag 4 begynner noen av cellene å vise morfologiske endinger i retning av dendrittiske celler (figur 9), mens andre celler fortsatt viser den runde morfologien til monocytter. Cellene viser tydelig at de har blitt differensiert på den sjette modningsdagen, med dendrittiske utløpere (figur 10).



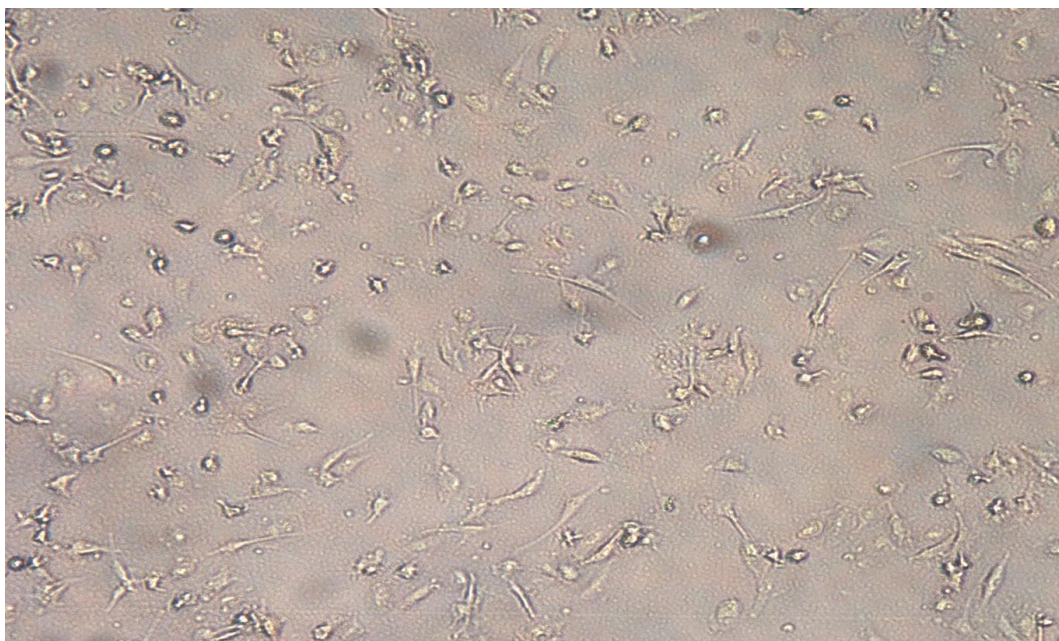
Figur 9: CD14⁺ monocytter isolert fra PBL på modningsdag 4. Cellene dyrkes i differensieringsmedium tilsatt GM-CSF og IL-4.



Figur 10: Dendritiske celler differensiert fra CD14⁺ monocyttter på modningsdag 6 før *M. capsulatus* er tilsatt.

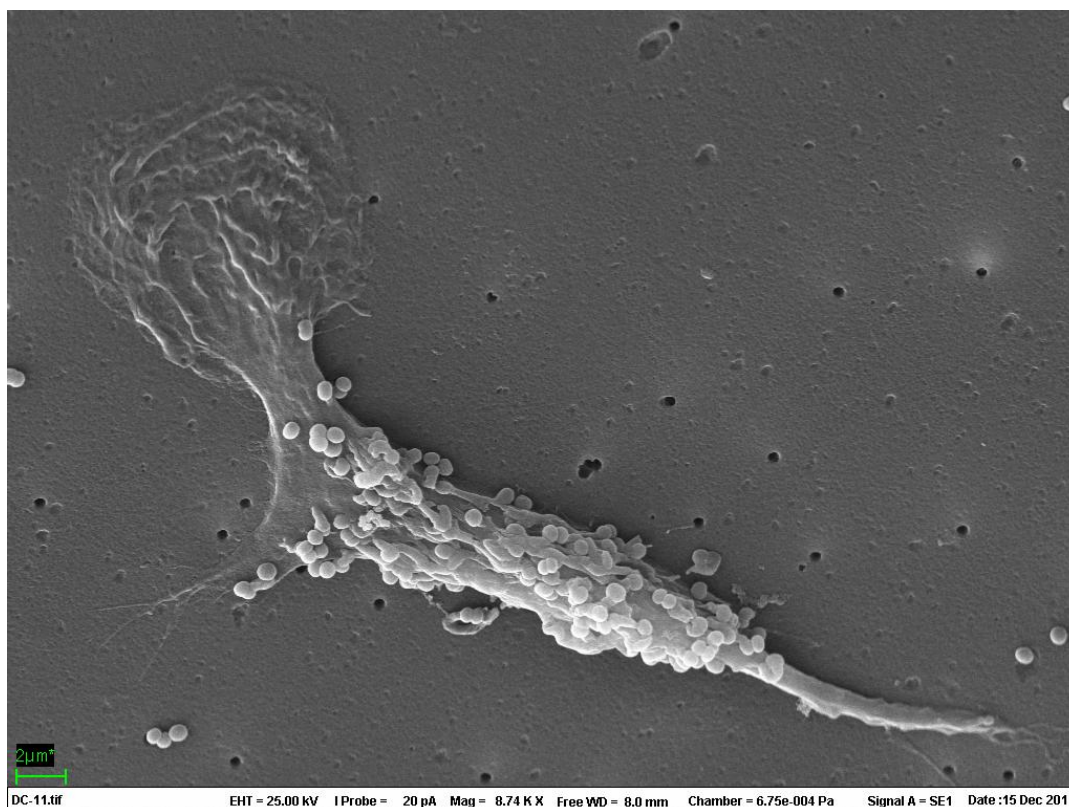
4.2 Stimulering av umodne dendritiske celler med *M. capsulatus*

Dendritiske celler har en viktig rolle i reguleringen av det medfødte og adaptive immunforsvaret. For å undersøke om *M. capsulatus* er i stand til å modne in vitro differensierte dendritiske celler fremført fra monocyttter, ble cellene kokultivert med *M. capsulatus*. Bakteriene tilsettes levende til de umodne dendritiske cellene på dag 6 etter isolering. I ett døgn ble cellene kokultivert med bakteriene, figur 11, før cellene og supernatanter ble brukt til videre analyser.



Figur 11: Dendritiske celler etter kokultivering med *M. capsulatus* i et døgn.

Bilder tatt ved SEM viser at bakteriene binder spesifikt til overflaten av de dendritiske cellene (figur 12).



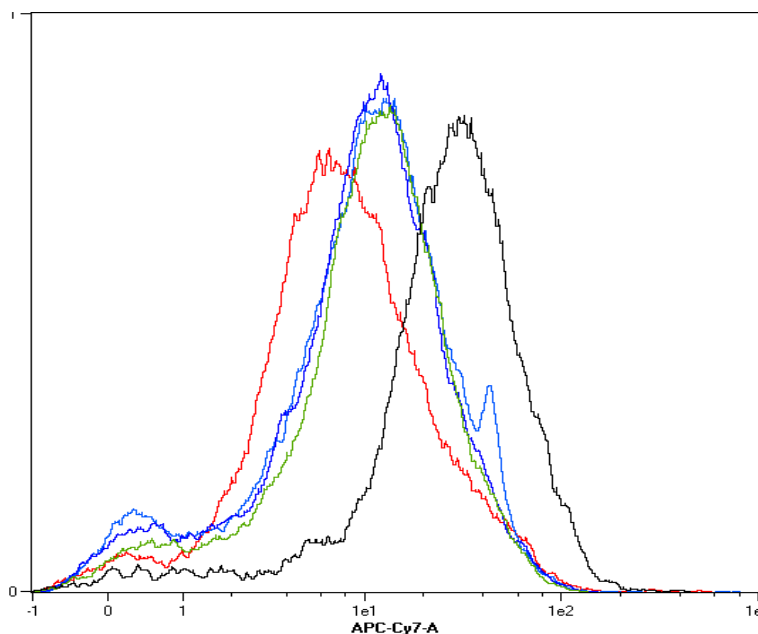
Figur 12: SEM bilde av dendritiske celler etter kokultivering med *M. capsulatus* i 3 timer.

4.3 Test av overflatemarkører på dendrittiske celler stimulert med *M. capsulatus*

For å undersøke om *M. capsulatus* induserer aktivering av dendrittiske celler ble umodne dendrittiske celler, fremført fra monocytter, kokultivert med *M. capsulatus* i 24 timer og undersøkt for ekspresjon av ulike overflatemolekyler med væskestrømscytometri.

4.3.1 CD86

CD86 er et kostimulerende molekyl uttrykt på aktiverte dendrittiske celler. Molekylet er viktig for T-celleaktivering og vi ønsket derfor å undersøke om *M. capsulatus* stimulerer oppregulering av CD86 ekspresjon ved å kokultivere dendrittiske celler med *M. capsulatus*. Cellene ble farget med Alexa Fluor konjugert anti-human CD86, og analysert med væskestrømscytometri.



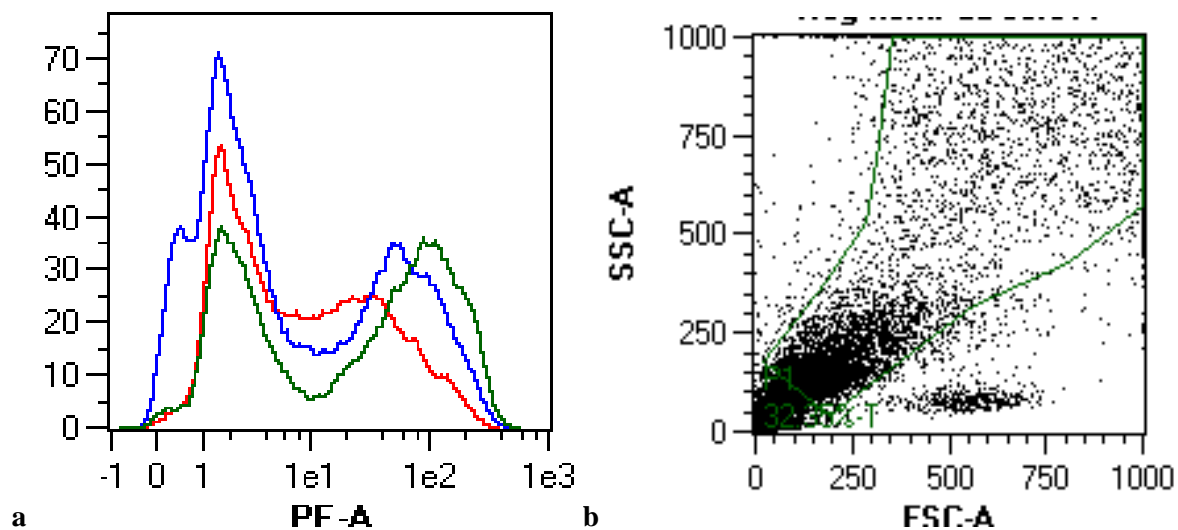
Figur 13: Dendrittiske celler stimulert med *M. capsulatus*. Blå graf viser uttrykk av CD86 hos dendrittiske celler etter stimulering med bakterier dyrket i medium uten kobber. Grønn graf viser stimulering med bakterier dyrket med kobber. Svart graf viser intensiteten av uttrykt CD86 hos DC stimulert med TNF- α , PGE2 og LPS. Den røde grafen viser uttrykk av CD86 hos umodne celler. Intensiteten av emittert signal leses av på x-aksen. Jo lenger til høyre grafene ligger, jo flere CD86 molekyler er uttrykt på cellene. n=3.

Figur 13 viser en oppregulering av CD86 molekyler hos dendrittiske celler som er kokultivert med *M. capsulatus*, i forhold til umodne celler. Det ble brukt to bakteriesuspensjoner til denne analysen, bakterier dyrket i nærvær og fravær av kobber. Som vist i figur 13 er det ingen forskjell i CD86 ekspresjon mellom umodne dendrittiske celler stimulert med bakterier dyrket

i fravær og nærvær av kobber. Dette viser at kokultivering av umodne dendrittske celler med *M. capsulatus* fører til økt uttrykk av det kostimulerende molekylet CD86.

4.3.2 CD80

Med bakgrunn i *M. capsulatus* egenskaper til å oppregulere CD86 ønsket vi også å undersøke om *M. capsulatus* var i stand til å oppregulere CD80. Sammen med CD86, er CD80 et kostimulerende molekyl med samme ligandspesifisitet for CD28 hos T-celler (figur 4). Dendrittske celler ble farget med PE konjugert anti-human CD80 og analysert på væskestrømcytometer.

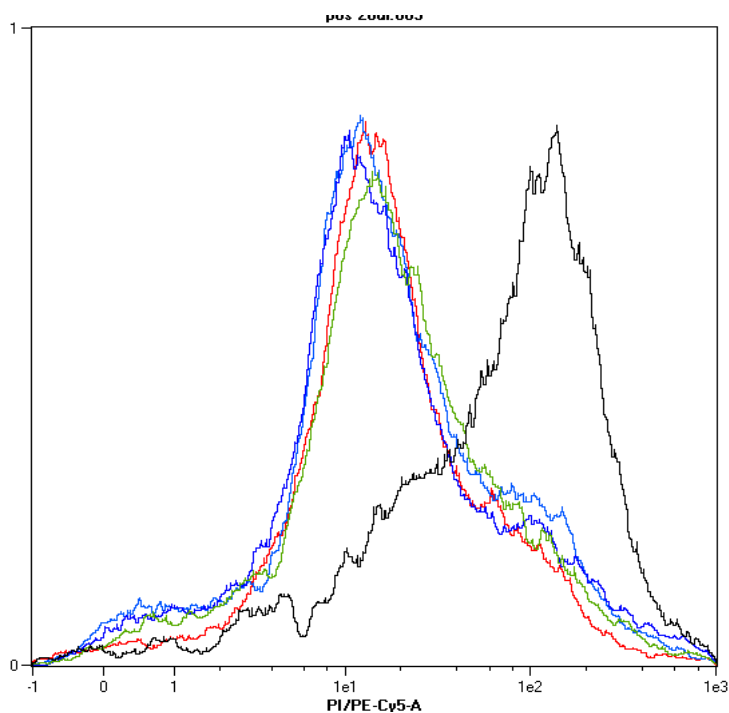


Figur 14: a) Dendrittske cellers uttrykk av CD80. Den grønne grafen representerer uttrykk av CD80 hos celler stimulert med LPS, TNF- α og PGE2. Den blå grafen representerer CD80 uttrykt på celler stimulert med *M. capsulatus*, og den røde grafen representerer umodne celler. n=2. b) Figur b viser et dotplott av negativ kontroll. Dette for å fremstille hvordan ufargede celler har blitt gatet bort i den endelige figuren vist i 14a).

Celler kokultivert med *M. capsulatus* i 24 timer viser svak oppregulering av uttrykt CD80 i forhold til umodne celler i noen av analysene. Andre analyser viste ingen oppregulering i forhold til umodne celler. Figur 14 b) viser hvordan ufargede celler har blitt gatet bort, slik det er vist i figur 14 a).

4.3.3 CD83

CD83 er et overflatemolekyl som oppreguleres ved aktivering av dendrittske celler. Vi ønsket derfor å undersøke om *M. capsulatus* stimulerer oppregulering av denne modningsmarkøren ved å kokultivere dendrittske celler med bakterien. Dendrittske celler ble farget med PE-Cy5 konjugert anti-human CD83 og analysert med væskestrømcytometri.

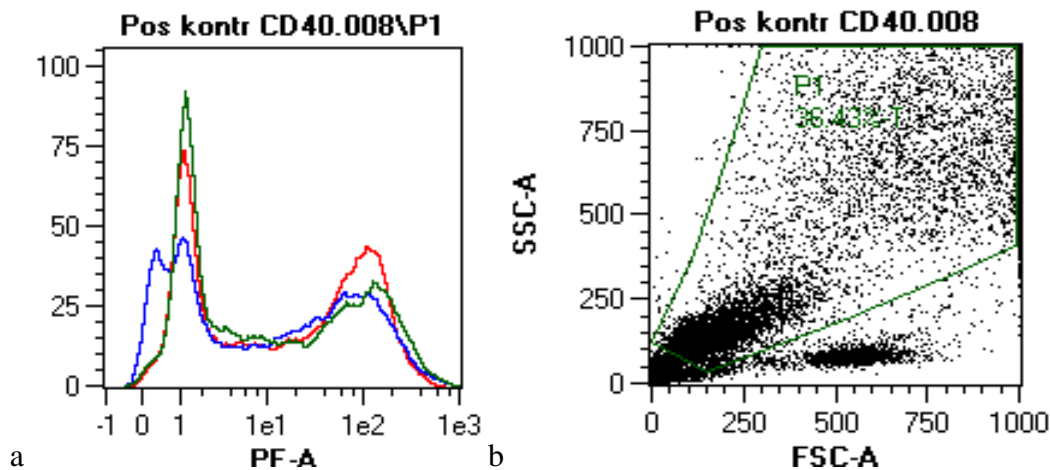


Figur 15: Uttrykk av CD83 hos dendritiske celler stimulert med *M. capsulatus*. Svart graf viser uttrykk av CD83 hos celler stimulert med TNF- α , LPS og PGE2. Den røde grafen viser uttrykk av CD83 hos umodne celler. De blå grafene viser uttrykk av CD83 hos celler som er stimulert med bakterien. n=3.

Figur 15 viser at *M. capsulatus* ikke stimulerer oppregulering av CD83 hos celler som ble kokultivert med bakterien.

4.3.4 CD40

Da *M. capsulatus* ikke stimulerer oppregulering av CD83 valgte vi å undersøke andre markører som oppreguleres ved aktivering av dendritiske celler. CD40 er et overflatemolekyl som øker ekspresjon ved aktivering av cellene (Hellman & Eriksson 2007). Dendritiske celler ble kokultivert med *M. capsulatus* for å undersøke om bakterien induserer oppregulering av CD40 hos dendritiske celler. Dendritiske celler ble farget med PE-konjugert anti-human CD40 og analysert på væskestrømcytometer.



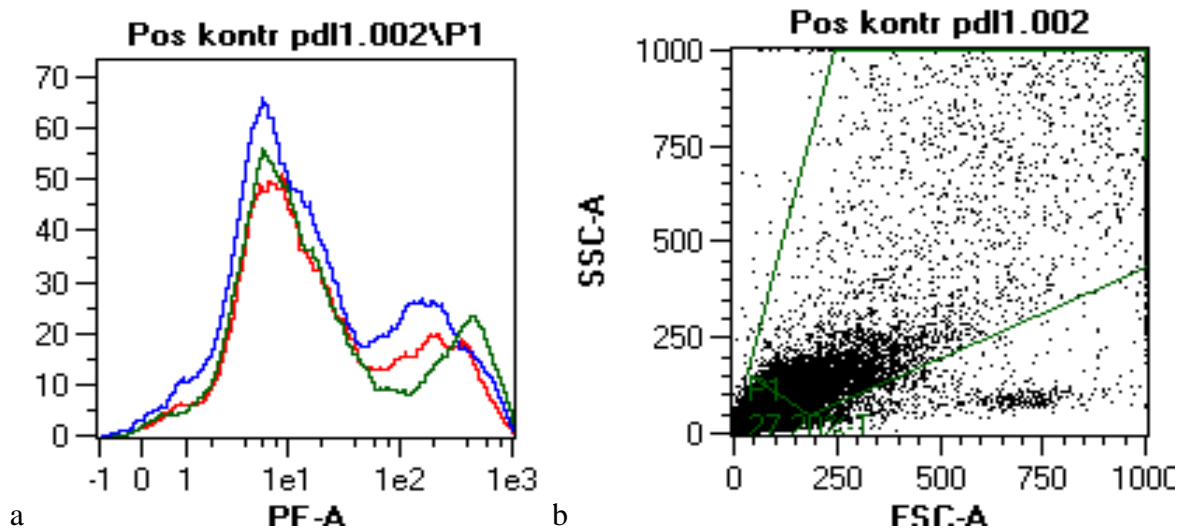
Figur 16: a) Uttrykk av CD40 hos dendritiske celler. Grønn graf tilsvarer CD40 uttrykk hos celler stimulert med LPS, TNF- α og PGE2. Rød graf viser uttrykt CD40 ligand hos ustimulerte celler. Blå graf viser CD40 uttrykk hos celler stimulert med *M. capsulatus*. b): Dotplott av positiv kontroll som viser hva som har blitt gatet bort. n=2.

Analysene viser at CD40 uttrykket er likt på stimulerede og ustimulerede celler. Figur 16 a) viser at stimulering av celler med *M. capsulatus* viser lik intensitet av CD40 fluorokromet som umodne og modne celler.

4.3.5 PD-L1

PD-L1 er en ligand som hemmer T-celle aktiviteten ved å hemme uttrykk av overlevelsesgen (Greenwald et al. 2005). Ved aktivering av dendritiske celler øker uttrykket av PD-L1, derfor ønsket vi å undersøke om *M. capsulatus* har evne til å indusere oppregulering av molekylet ved å kokultivere monocytt-deriverte dendritiske celler med bakterien. Dendritiske celler ble farget med PE konjugert anti-human PD-L1 og analysert med væskestrømscytometri.

Analysene viser at PD-L1 er uttrykt på umodne dendritiske celler, og at uttrykket øker ytterligere ved stimulering med LPS, TNF- α og PGE2, men ikke ved kokultivering med *M. capsulatus* (figur 17 a).

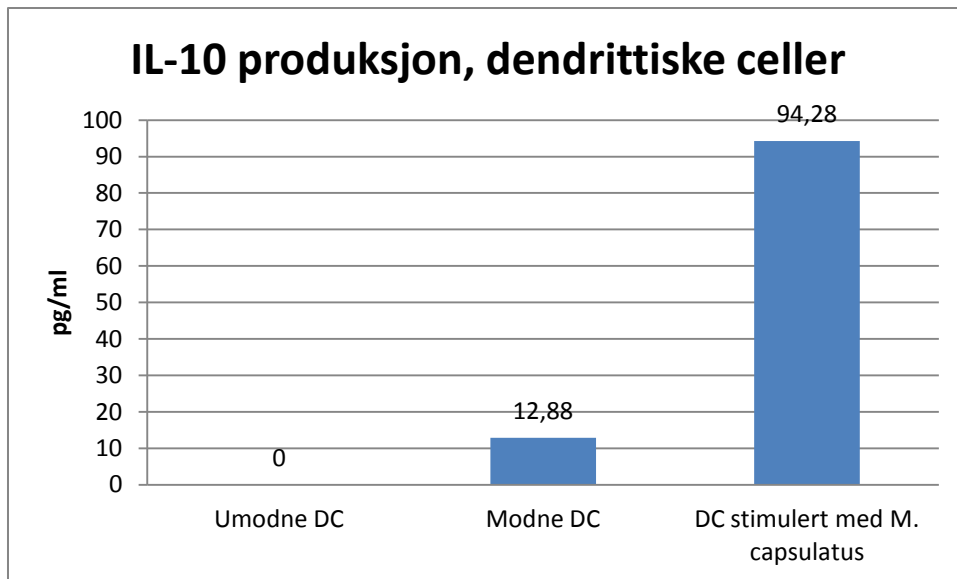


Figur 17: a) Uttrykk av PD-L1 hos dendrittiske celler. Grønn graf tilsvarer PD-L1 uttrykk hos celler stimulert med LPS, TNF- α og PGE2. PD-L1 uttrykk hos umodne celler er representert ved rød graf. Blå graf tilsvarer PD-L1 uttrykt hos celler stimulert med *M. capsulatus*. n=3. b) Dotplott av celleprøve som viser hvordan døde/ufargede celler har blitt gatet bort.

4.4 Cytokinproduksjon

4.4.1 IL-10

IL-10 er et anti-inflammatorisk molekyl med regulerende egenskaper i immunforsvaret. Enkelte bakterier induserer IL-10 produksjon hos dendrittiske celler. Vi ønsket å undersøke om *M. capsulatus* stimulerer IL-10 produksjon hos dendrittiske celler. Supernatanter fra dendrittiske celler stimulert med *M. capsulatus* ble undersøkt for innhold av IL-10, ved hjelp av ELISA.

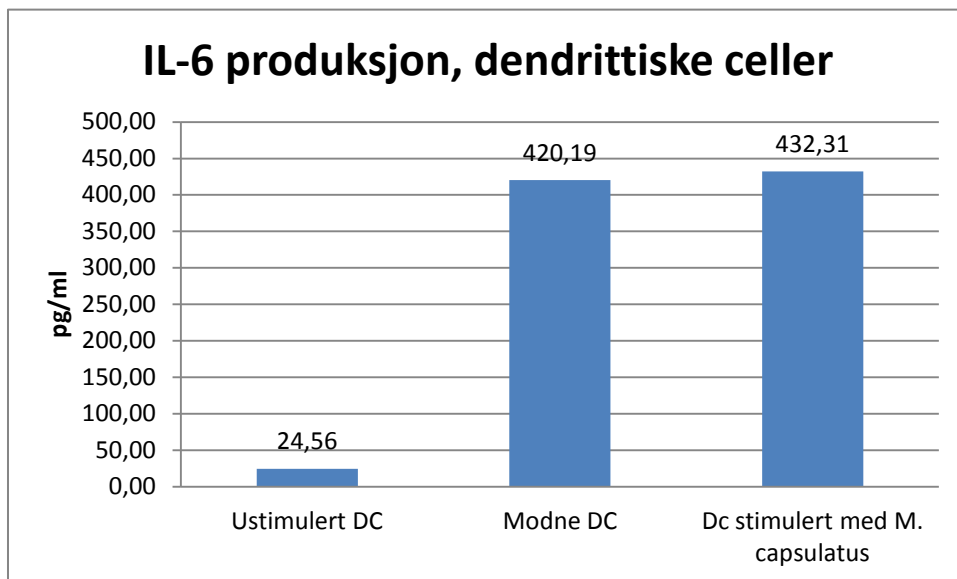


Figur 18: produksjon av IL-10 hos dendrittiske celler. Diagrammet viser gjennomsnittlig konsentrasjon av sekret IL-10 fra umodne dendrittiske celler, dendrittiske celler stimulert med LPS, TNF- α og PGE2, og dendrittiske celler stimulert med *M. capsulatus*. n=5

Figur 18 viser at IL-10 innholdet i supernatanter fra celler kokultivert med *M. capsulatus* (94,28 pg/ml \pm 39,93) er signifikant høyere enn i supernatanter fra ustimulerte celler (0 pg/ml). Supernatanter fra modne dendrittiske celler hadde konsentrasjon på 12,88 pg/ml (standard avvik 19,42).

4.4.2 IL-6

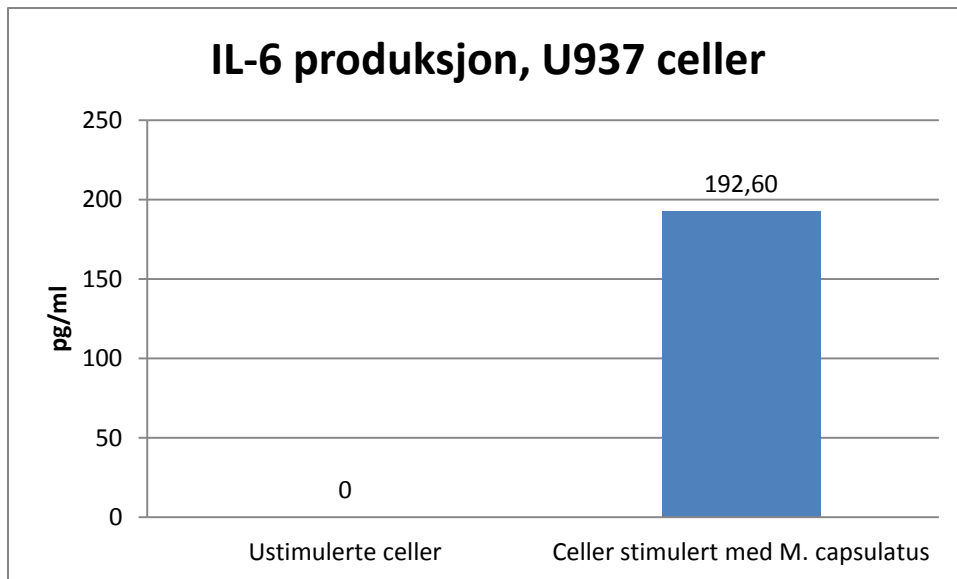
Vi ønsket også å undersøke om *M. capsulatus* stimulerer produksjon av IL-6 da nivåene av cytokinet ofte er forhøyet ved IBD. Dette er et proinflammatorisk cytokin som er viktig ved stimulering av medfødt- og adaptivt immunforsvar. Nivåene av IL-6 ble undersøkt i supernatanter til modne og umodne dendrittiske celler i tillegg til celler kokultivert med *M. capsulatus*.



Figur 19: Gjennomsnittlig konsentrasjon av IL-6 sekret fra umodne dendritiske celler, dendritiske celler stimulert med LPS, TNF- α og PGE2, og dendritiske celler stimulert med *M. capsulatus*. Standard avvik er 109,27 for celler stimulert med *M. capsulatus*, 142,82 for modne celler og 31,177 for umodne celler. n=5

Figur 19 viser at IL-6 innholdet i supernatanter fra celler kokultivert med *M. capsulatus* (432,31 pg/ml \pm 109,27) er signifikant høyere enn umodne celler (24,46 \pm 31,18). Det er ingen signifikant forskjell i IL-6 produksjon hos dendritiske celler kokultivert med *M. capsulatus* og celler stimulert med LPS, TNF- α og PGE2. Supernatanter fra celler stimulert med LPS, TNF- α og PGE2 hadde IL-6 konsentrasjon på 420,19 (\pm 142,82).

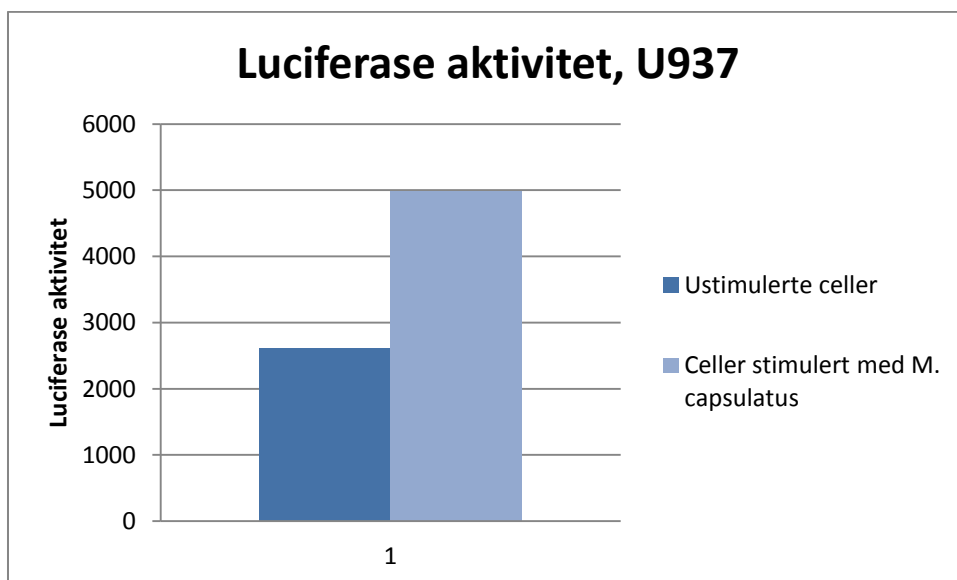
Cytokinproduksjonen ble også undersøkt i supernatanter fra monocytt cellelinjen U937. Hos ustimulerte celler ble det ikke detektert IL-6, mens det i kultursupernatant fra monocytter kokultivert med *M. capsulatus* ble detektert et gjennomsnitt på 192,60 pg/ml (figur 20).



Figur 20: Produksjon av IL-6 hos monocyttecellerlinjen U937. Supernatanter fra stimulerte celler hadde en gjennomsnittskonsentrasjon på 192,6 pg/ml. Standardavviket er 71,1.

4.5 NF- κ B luciferase assay

Monocyttecellerlinjen U937 er stabilt transfektert med et luciferase reporterplasmid der NF- κ B promotoren er koblet til transkripsjon av luciferase. Vi ønsket å undersøke om *M. capsulatus* induserer NF- κ B aktivering hos monocytterne. Cellene ble stimulert med *M. capsulatus* i 6 timer før det ble tilsatt substrat for luciferase for å undersøke enzymaktiviteten. Enzymaktiviteten av luciferase kan korreleres til aktiviteten av NF- κ B i cellene.



Figur 21: Figuren viser luciferaseaktivitet hos U937 monocytter, transfektert ned NF- κ B luciferase reporter-gen, kokultivert med *M. capsulatus* og ustimulerte U937 monocytter. n=3

Figur 21 illustrerer økningen av luciferaseaktivitet i forhold til ustimulerte celler. Celler kokultivert med *M. capsulatus* viser signifikant høyere luciferase-aktivitet i forhold til ustimulerte celler.

5.0 Diskusjon

Inflammatorisk tarmsykdom er en kompleks sykdom som påvirkes av flere faktorer og mye om sykdommens årsak er fortsatt ukjent. BioProtein, som består av 88 % *M. capsulatus*, er vist til å ha en dempende effekt på enteritt hos laks. Hensikten med denne oppgaven var å undersøke om *M. capsulatus*' påvirker aktivering og modning av dendrittiske celler og monocytter. Det er ikke kjent at det tidligere har blitt gjort undersøkelser med denne metanotrofe jordbakterien i humane systemer.

I tarmens immunforsvar har dendrittiske celler en aktiv rolle ved at de penetrerer epitelcellelaget med dendritter for å fange opp antigen, samtidig som cellene på basolateral side av epitelcellene tar opp antigen som er transcyttert av epitelcellene. Ved IBD er det registrert nedsatt epitelial barriere som gjør at bakteriene kan trenge inn i vevet og dermed aktivere dendrittiske celler. Cellene har deretter muligheter til å stimulere det adaptive immunforsvaret ved å presentere antigen til T-celler. Dendrittiske cellers viktige rolle ved aktivering av immunforsvaret er grunnen til at cellene er brukt til *in vitro* analyser i denne oppgaven.

Umodne dendrittiske celler ble fremført fra CD14⁺ positive monocytter isolert fra PBL, ved kultivering i nærvær av GM-CSF og IL-4. I løpet av 6 dager hadde monocyttene differensiert til umodne dendrittiske celler, med tydelig endret morfologi (figur 10). En cocktail av stimuli, med TNF- α , PGE2 og LPS, som det er kjent at fører til modning av dendrittiske celler ble brukt som positiv kontroll (Christoffersen et al. 2012), mens *M. capsulatus* ble kokultivert med de dendrittiske cellene i ett døgn. Cellene ble videre analysert for ekspresjon av overflatemarkører og supernatantene ble undersøkt for endringer i cytokinproduksjon.

5.1 Overflatemarkører

For å undersøke om *M. capsulatus* stimulerer aktivering av dendrittiske celler ble flere overflatemolekyler analysert. CD86 ble undersøkt på bakgrunn av molekylets viktige rolle ved T-celle aktivering. Dendrittiske celler stimulert med cocktailen for positiv kontroll viser økt uttrykk av CD86, sammenliknet med umodne dendrittiske celler (figur 13). I innledende forsøk ble det brukt to bakteriesuspensjoner av *M. capsulatus*, en i nærvær og en i fravær av kobber. *M. capsulatus* dyrket i kobber viser en økning av cytoplasmatiske membraner (figur 13), og det ble derfor undersøkt om dette hadde en innvirkning på *M. capsulatus*' evne til å

aktivere dendritiske celler. Dendritiske celler stimulert med *M. capsulatus* oppregulerer uttrykk av CD86 i forhold til umodne celler, men det ble ikke vist noen forskjell på stimulering med bakterier dyrket med og uten kobber. I videre undersøkelser er *M. capsulatus* dyrket i nærvær av kobber.

Overflatemarkøren CD86 er et viktig kostimulerende molekyl. Zeuthen et al. viste i sine studier at Gram-negative tarmbakterier har større potensial til å stimulere til oppregulering av CD86 og andre modningsmarkører på dendritiske celler, enn det Gram-positive melkesyrebakterier har (Zeuthen et al. 2006). Christoffersen et al. (2012) viste at både patogen-, probiotisk- og kommensal stamme av tarmbakterien *Enterococcus faecalis* stimulerer dendritiske celler til å oppregulere CD86, uten at noen stamme-forskjell ble observert (Christoffersen et al. 2012).

Disse tidligere studiene viser at aktivering av dendritiske celler fører til oppregulering av CD86 ved interaksjon med både kommensale, probiotiske og patogene bakterier. Intensiteten av oppreguleringen ser ikke ut til å avhenge av bakteriens egenskaper i tarmen. Det kan se ut til at Gram-negative viser større stimuleringspotensial til oppregulering av CD86 uttrykt på overflaten enn Gram-positive. Dette kan skyldes at Gram-negative bakterier stimulerer andre PRR reseptorer enn Gram-positive bakterier. LPS som finnes i yttermembranen hos Gram-negative celler stimulerer Toll-liknende reseptor 4 (figur 6), noe Gram-positive ikke kan. *M. capsulatus* er Gram-negativ og inneholder dermed LPS i sin yttermembran. For å undersøke om *M. capsulatus* stimulerer oppreguleringen av CD86 i like stor grad som det er vist for andre Gram-negative bakterier, må analysen gjøres sammen med bakterier som det er kjent fører til aktivering av dendritiske celler.

Sammen med CD86, er CD80 et viktig kostimulerende molekyl. MHC klasse II med antigen i sin grop stimulerer T-celler, men for å oppnå aktivering er T-cellene avhengig av enda et signal som oppnås ved CD80/CD86 interaksjon med CD28 (figur 4). Vi ville derfor undersøke om *M. capsulatus* viser samme oppregulerende egenskaper for CD80, som det vi så ved CD86. Undersøkelsene av CD80 ekspresjon viste oppregulering av overflatemolekylet hos dendritiske celler som ble kokultivert med *M. capsulatus* i forhold til umodne dendritiske celler (figur 14). Selv om CD80 og CD86 har like roller ved en immunrespons er det likevel rapportert at oppreguleringen ved stimulering av immunceller med bakterier ikke alltid er lik (Nolan et al. 2009). Boele et al. har undersøkt effekten av ulike patogene bakterier som *E.coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* med flere, og alle bakteriene stimulerte

oppregulering av CD80, CD86 og CD83 hos dendrittiske celler. Det ble også funnet forskjeller i stimuleringspotensiale hos Gram-negative og Gram-positive bakterier, ved at dendrittiske celler stimulert med Gram-negative bakterier hadde et høyere uttrykk av modningsmarkørene (Boele et al. 2009). Probiotiske bakterier stimulerer også oppregulering av CD80 hos dendrittiske celler (Gad et al. 2011).

Studiene viser altså at det for oppregulering av CD80 heller ikke skilles mellom bakteriens positive eller negative påvirkning i tarmen. CD80 oppreguleres ved stimulering av patogene så vel som probiotiske bakterier. Begge de kostimulerende molekylerne CD80 og CD86 blir altså oppregulert ved kokultivering av *M. capsulatus*. Det har ikke blitt gjort liknende undersøkelser med bakterier som *M. capsulatus* tidligere. Bakteriesammensetningen i det probiotiske produktet, VSL#3, har blitt rapportert å ha hemmende effekt på kolitt. VSL#3 består av probiotiske Laktobacillus-, Bifidobacterium- og Streptokokk stammer. Disse er også vist å kunne stimulere dendrittiske cellers oppregulering av CD80 og CD86 (Drakes et al. 2004; Gad et al. 2011; Shibolet et al. 2002). Ut i fra våre undersøkelser kan vi se at kokultivering av dendrittiske celler med *M. capsulatus* gir cellene evne til å kunne overføre signal 2 ved antigenpresentering og aktivering av T-celler (figur 4).

Vi ønsket også å undersøke om *M. capsulatus* aktiveringsevner påvirker andre overflatemolekyler som er kjent at øker ekspresjon ved aktivering av dendrittiske celler. Undersøkelsene av CD83, som er en modningsmarkør for dendrittiske celler, viste ingen oppregulering av molekylet hos celler som ble kokultivert med *M. capsulatus* i 24 timer, sammenliknet med umodne celler. Flere har vist at oppregulering av CD83 ofte følger oppregulering av CD86 ved stimulering av dendrittiske celler med både patogene-, kommensale-, og probiotiske bakterier (Boele et al. 2009; Christoffersen et al. 2012; Zeuthen et al. 2006). Dendrittiske celler med blokkert eller nedregulert CD83 uttrykk er vist å redusere T-cellers proliferasjon ved at de hemmer T-cellers produksjon av IFN- γ . IFN- γ som produseres av T_H1 T-cellene er med på å styre differensieringen av T-celler (Aerts-Toegaert et al. 2007; Lechmann et al. 2005).

Modningsmarkøren CD83 skiller seg ut fra CD80 og CD86 ved at den ikke oppreguleres ved kokultivering med *M. capsulatus*. Dette kan være en av *M. capsulatus*' regulerende egenskaper. Evnen til å hemme T-cellers prolifering viser at CD83 har viktige stimulerende egenskaper ved aktivering av immunforsvaret. Dette er konsekvenser av totalt fraværende uttrykk av CD83 på cellene. Mye er fortsatt ukjent rundt CD83s funksjoner i immunforsvaret,

så for å bekrefte eller avkrefte om graden av manglende CD83 uttrykk i dette tilfellet kan hemme T-celleresponsen, må det gjøres ytterligere analyser hvor en undersøker interaksjonen med *M. capsulatus* stimulerende dendritiske celler og T-celler.

M. capsulatus viser ikke egenskaper til å oppregulere modningsmarkøren CD83, vi ønsket derfor å undersøke CD40 som også er kjent at oppreguleres ved aktivering av dendritiske celler. Analysene av overflatemarkøren CD40 på dendritiske celler viste ingen oppregulering ved kokultivering med *M. capsulatus* eller ved stimulering med cocktail for positiv kontroll. Figur 16 a) viser at uttrykk av CD40 på umodne dendritiske celler er den samme som hos modne dendritiske celler. Oppreguleringen ser ut til å skje på et tidligere stadium ved bruk av denne differensieringsprotokollen. Zeuthen et al. brukte i deres studier et annet forhold av IL-4 og GM-CSF ved differensieringen av CD14⁺ monocytter, og uttrykket av CD40 hos umodne dendritiske celler var da lavere. De fant da oppregulering av CD40 ved stimulering med blant annet *E.coli* (Zeuthen et al. 2006). I egne analyser kunne et annet forhold av differensieringsfaktorer blitt brukt for å undersøke om *M. capsulatus* har påvirkning på oppregulering av dette molekylet.

PD-L1 er en ligand som er vist å ha negativ effekt på aktiveringen av T-celler og er oftest sett på som en regulerende faktor i immunforsvaret (Greenwald et al. 2005). Hos pasienter med IBD er ekspresjonen av PD-1/PD-L1 økt på mononukleære celler sett i forhold til mononukleære celler fra friske individer (Kanai et al. 2003). På bakgrunn av studier som viser at blokkering av PD-L1 reduserer inflammasjon ved kolitt i mus, er det foreslått at PD-L1 kostimulering kan forårsake inflammasjon i tarmen (Dong et al. 2007; Kanai et al. 2003). Vi ønsket å undersøke hvorvidt *M. capsulatus* stimulerer oppregulering av PD-L1 hos dendritiske celler da det er kjent at ekspresjonen av PD-L1 ofte øker ved aktivering av cellene (Brown et al. 2010; Gad et al. 2011). Vi har vist at umodne dendritiske celler fremført fra CD14⁺ monocytter er positive for PD-L1, men kokultiveringen med *M. capsulatus* tilfører ikke økt ekspresjon av liganden. Figur 17 a) viser at uttrykket av PD-L1 allerede er høyt hos umodne dendritiske celler, og bare cocktailen med stimuli for positiv kontroll inducerer en økning av ekspresjon. Gad et al. rapporterer oppregulering av PD-L1 ved stimulering med både Gram-positive og Gram-negative tarmbakterier, deriblant sammensetningen av probiotiske bakterier VSL#3 som er vist å ha hemmende effekt på kolitt. Dette er sett i forhold til umodne dendritiske celler (Gad et al. 2011). En annen konsentrasjon av differensieringsfaktorer ble brukt i Gads studier, slik at endring av konsentrasjonen av differensieringsfaktorer i denne oppgaven kunne gi lavere uttrykk av PD-L1 hos umodne

dendritiske celler slik at en eventuell oppregulering ved kokultivering med *M. capsulatus* kunne blitt identifisert.

5.2 NF- κ B

Monocyttcellelinjen U937 som ble brukt er transfektert med et luciferase reporterplasmid med NF- κ B promotor (Austena et al. 2009). U937 celler som ble kokultivert med *M. capsulatus* induserer luciferase-aktivitet som er signifikant høyere enn hos ustimulerte celler.

Enzymaktiviteten var nærmere dobbelt så høy for *M. capsulatus* stimulerende celler enn for ustimulerte celler (figur 21). Enzymaktiviteten av luciferase kan korreleres til NF- κ B luciferase-aktiviteten i cellene. NF- κ B signalvei kan aktiveres gjennom flere reseptorer. Figur 6 viser at samtlige TLR-reseptorer har mulighet til å aktivere NF- κ B når de selv aktiveres ved ligandbinding. *M. capsulatus* er en Gram-negativ bakterie med LPS i yttermembranen og har dermed mulighet til å aktivere cellene blant annet gjennom TLR4 reseptoren. Denne analysen viser at *M. capsulatus* har aktiverende egenskaper på U937 monocytter, og som det er beskrevet nedenfor, deretter kan indusere produksjon av cytokiner som IL-6.

5.3 Cytokinproduksjon

Supernatantene fra stimulerende dendritiske celler og U937 monocytter ble brukt for å måle cytokinproduksjon hos cellene ved bruk av ELISA. IL-6, sammen med andre proinflammatoriske cytokiner som IL-12 og TNF- α , er ofte oppregulert hos pasienter med IBD. Produksjonen av IL-6 øker i utbruddsfasene av sykdommen. Det er foreslått at IL-6 kan brukes som en markør for å overvåke sykdomsutviklingen hos IBD pasienter (Mudter & Neurath 2007). Vi ønsker derfor å undersøke om *M. capsulatus* induserer produksjon av IL-6 hos dendritiske celler og monocyttcellelinjen U937. Figur 19 og 20 viser at gjennomsnittlig konsentrasjon i supernatantene fra dendritiske celler var 432,31 pg/ml og 192,60 pg/ml for U937 cellene. Det ble brukt dobbelt antall dendritiske celler i forhold til U937 monocytter. Konsentrasjonene fra celler kokultivert med *M. capsulatus* var signifikant høyere enn ustimulerte celler. Karlsson et al. stimulerende dendritiske celler og monocytter med Gram-negative og Gram-positive kommensale bakterier. Gram-negative bakterier, blant annet *E. coli*, ble vist å stimulere større konsentrasjoner av IL-6 enn det Gram-positive bakterier gjorde (Karlsson et al. 2004). I Karlssons studie sekreterte monocytter større konsentrasjoner av IL-6 enn dendritiske celler, mens det i egne studier ble sekretert omtrent like konsentrasjoner av IL-6 når en tar hensyn til antall celler som ble brukt. Monocyttene som ble stimulert med *M.*

capsulatus er celler fra en cellelinje, U937. I Karlssons studie ble brukt monocytter isolert fra PBL.

IL-10 er et anti-inflammatorisk cytokin, som er kjent å nedregulere immunresponsen. Det er vist at noen IBD pasienter har mutante IL-10 gen (Franke et al. 2008; Linde et al. 2003). Disse funnene sammen med studiene som viser at mus med fraværende IL-10 eller IL10-R utvikler kolitt understreker at IL-10 er viktig ved regulering av tarmens immunforsvar (Glocker et al. 2011). Vi ønsket å undersøke hvorvidt *M. capsulatus* er i stand til å stimulere IL-10 produksjon hos dendritiske celler. Supernatantene fra dendritiske celler kokultivert med *M. capsulatus* hadde en gjennomsnittskonsentrasjon av IL-10 på 98,28 pg/ml (figur 18). Dette er signifikant høyere enn IL-10 konsentrasjon fra ustimulerte celler, og celler stimulert med cocktail for positiv kontroll. Det ble ikke detektert IL-10 i supernatanter fra monocyttcellelinjen U937. Den probiotiske bakterien *E. coli* Nissle induserer IL-10 produksjon hos dendritiske celler, og kan indusere IL-10 konsentrasjoner på 1-3 ng/ml avhengig av bakteriekonsentrasjon (Gad et al. 2011). Antall dendritiske celler per ml medium var 2 millioner, altså likt celleantall som det ble brukt i egne studier. Antall bakterier tilsatt var 3×10^6 til 3×10^9 . VSL#3 derimot induserer ikke IL-10 produksjon (Gad et al. 2011). Selv om IL-10 er et anti-inflammatorisk cytokin viser disse studiene at induksjon av IL-10 ikke er en betinget egenskap ved probiotiske bakterier, som både VSL#3 og denne *E. coli* stammen er. IL-10 er kjent for å hemme T-celle aktivering, og det er vist at både T_H1 og T_H2 produserte cytokiner reduseres ved tilstedeværelse av IL-10 (Joss et al. 2000). Produksjonen av IL-10 induert av *M. capsulatus* er betraktelig lavere i forhold til det som induseres av *E. coli* Nissle og det som ble brukt i Joss' studie (50 ng/ml), og om denne konsentrasjonen er høy nok for å virke autokrint ved nedregulering av egne modningsmarkører eller nedregulering av T-celleaktivitet vises ikke av denne analysen alene. Analysen viser derimot at *M. capsulatus* har evne til å påvirke anti-inflammatoriske faktorer hos dendritiske celler, som kan være viktig ved regulering av inflammasjon.

Forholdet mellom antiinflammatorisk IL-10 og proinflammatorisk IL-12 blir ofte sammenliknet for å se hvilke immunpåvirkninger bakterien kan indusere. I tillegg er det kjent at IBD pasienter ofte har forhøyede konsentrasjoner av IL-12 (Mudter & Neurath 2007). IL-10/IL-12 forholdet ble undersøkt i Gads' studier som viser at både VSL#3 og *E. coli* Nissle induserer produksjon av IL-12, som er kjent for å polarisere T_H1 celler. *M. capsulatus* induserte ikke IL-12 produksjon hos dendritiske celler (data ikke vist), det gjorde heller ikke den positive kontrollen. Kleiveland CR et al. (manuskript under utarbeidelse) stimulerte

umodne dendritiske celler, fremført med samme fremgangsmåte som for denne oppgaven, med Gram-Positive bakterier. Det ble detektert IL-12 i supernatanter fra cellene. Karlsson et al. tilsatte IFN- γ sammen med bakterieløsningen i sine studier, dette induserte IL-12 sekresjon hos celler stimulert med bakterier med potensial til å indusere IL-12 produksjon (Karlsson et al. 2004). Analysen bør gjentas med stimuli med kjente egenskaper for å indusere IL-12 produksjon for å se at cellene har potensial for dette.

5.4 Konklusjon og viderearbeid

Kort oppsummert ble det i denne oppgaven vist at *M. capsulatus* stimulerer oppregulering av de kostimulerende molekylerne CD80 og CD86 i yttermembranen hos dendritiske celler. Dette er modningsfaktorer som muliggjør aktivering av T-celler ved antigenpresentasjon. Undersøkelsen av overflatemolekylet CD83 viste at *M. capsulatus* ikke induserer oppregulering av molekylet. Dette er et interessant funn da T-celle prolifereringen kan hemmes om CD83 er fraværende på dendritiske celler. Cytokin-analysene viser at *M. capsulatus* induserer både proinflammatorisk- og antiinflammatorisk cytokinproduksjon hos dendritiske celler.

Videre vil det være interessant å sammenlikne *M. capsulatus* egenskaper med bakterier med kjente egenskaper, for å undersøke om dette er karakteristiske egenskaper for *M. capsulatus*. Det vil også være interessant å undersøke hvordan T-celle aktiveringen vil utarte seg i nærvær av antigenpresenterende celler som er kokultivert med *M. capsulatus*.

Referanser

- Aerts-Toegaert, C., Heirman, C., Tuyaerts, S., Corthals, J., Aerts, J. L., Bonehill, A., Thielemans, K. & Breckpot, K. (2007). CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. *European Journal of Immunology*, 37 (3): 686-695.
- Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 15 (1): 5-11.
- Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol*, 8 (6): 411-420.
- Austena, L. M., Carlsen, H., Hollung, K., Blomhoff, H. K. & Blomhoff, R. (2009). Retinoic acid dampens LPS-induced NF- κ B activity: results from human monoblasts and in vivo imaging of NF- κ B reporter mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20 (9): 726-734.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392 (6673): 245-252.
- Boele, L. C. L., Bajramovic, J. J., de Vries, A.-M. M. B. C., Voskamp-Visser, I. A. I., Kaman, W. E. & van der Kleij, D. (2009). Activation of Toll-like receptors and dendritic cells by a broad range of bacterial molecules. *Cellular Immunology*, 255 (1-2): 17-25.
- Brown, K. E., Freeman, G. J., Wherry, E. J. & Sharpe, A. H. (2010). Role of PD-1 in regulating acute infections. *Current Opinion in Immunology*, 22 (3): 397-401.
- Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. (2007). Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity*, 27 (1): 111-122.
- Carlsen, H., Moskaug, J. Ø., Fromm, S. H. & Blomhoff, R. (2002). In Vivo Imaging of NF- κ B Activity. *The journal of Immunology*, 168 (3): 1441-1446.
- Chassaing, B. & Darfeuille-Michaud, A. (2011). The Commensal Microbiota and Enteropathogens in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 140 (6): 1720-1728.e3.
- Christoffersen, T. E., Jensen, H., Kleiveland, C. R., Dørum, G., Jacobsen, M. & Lea, T. (2012). In vitro comparison of commensal, probiotic and pathogenic strains of *Enterococcus faecalis*. *British Journal of Nutrition*, FirstView: 1-11.
- Clayburgh, D. R., Shen, L. & Turner, J. R. (2004). A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest*, 84 (3): 282-291.
- Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The journal of Immunology*, 180 (9): 5771-5777.
- Courtois, G. & Gilmore, T. D. (2006). Mutations in the NF- κ B signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, 25 (51): 6831-6843.
- De Gassart, A., Camosseto, V., Thibodeau, J., Ceppi, M., Catalan, N., Pierre, P. & Gatti, E. (2008). MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (9): 3491-3496.
- Dienz, O. & Rincon, M. (2009). The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clinical Immunology*, 130 (1): 27-33.
- Dong, C., Nurieva, R. & Martin-Orozco, N. (2007). Co-stimulation Regulation of Immune Tolerance and Autoimmunity
- Immune Regulation and Immunotherapy in Autoimmune Disease. I: Zhang, J. (red.), s. 121-138: Springer US.
- Drakes, M., Blanchard, T. & Czinn, S. (2004). Bacterial Probiotic Modulation of Dendritic Cells. *Infection and Immunity*, 72 (6): 3299-3309.
- Elkins, K. L., Cooper, A., Colombini, S. M., Cowley, S. C. & Kieffer, T. L. (2002). In Vivo Clearance of an Intracellular Bacterium, *Francisella tularensis* LVS, Is Dependent on the p40 Subunit of Interleukin-12 (IL-12) but Not on IL-12 p70. *Infection and Immunity*, 70 (4): 1936-1948.

- Fasano, A. & Shea-Donohue, T. (2005). Mechanisms of Disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2 (9): 416-422.
- Fedorak, R. N., Dieleman, L. A. & Madsen, K. L. (2011). Prebiotics, Probiotics, Antibiotics, and Nutritional Therapies in IBD
- Inflammatory Bowel Disease. I: Cohen, R. D. (red.) *Clinical Gastroenterology*, s. 123-150: Humana Press.
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C. & Golenbock, D. T. (2004). Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes and Infection*, 6 (15): 1361-1367.
- Fjellbirkeland, A., Kleivdal, H., Joergensen, C., Thestrup, H. & Jensen, H. B. (1997). Outer membrane proteins of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Archives of Microbiology*, 168 (2): 128-135.
- Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T. H., Sventoraityte, J., Nikolaus, S., Mayr, G., Domingues, F. S., Albrecht, M., Nothnagel, M., Ellinghaus, D., et al. (2008). Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet*, 40 (11): 1319-1323.
- Gad, M., Ravn, P., Sjøborg, D. A., Lund-Jensen, K., Ouwehand, A. C. & Jensen, S. S. (2011). Regulation of the IL-10/IL-12 axis in human dendritic cells with probiotic bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 63 (1): 93-107.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25 (51): 6680-6684.
- Glocker, E.-O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N. & Grimbacher, B. (2011). IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1246 (1): 102-107.
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. (2005). THE B7 FAMILY REVISITED. *Annual Review of Immunology*, 23 (1): 515-548.
- Hanauer, S. B. (2006). Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12 (5): S3-S9.
- Hayden, M. S. & Ghosh, S. (2011). NF- κ B in immunobiology. *Cell Res*, 21 (2): 223-244.
- Hayden, M. S. & Ghosh, S. (2012). NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes dev.*, 26: 203-234.
- Hellman, P. & Eriksson, H. (2007). Early Activation Markers of Human Peripheral Dendritic Cells. *Human Immunology*, 68 (5): 324-333.
- Joss, A., Akdis, M., Faith, A., Blaser, K. & Akdis, C. A. (2000). IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *European Journal of Immunology*, 30 (6): 1683-1690.
- Kanai, T., Totsuka, T., Uraushihara, K., Makita, S., Nakamura, T., Koganei, K., Fukushima, T., Akiba, H., Yagita, H., Okumura, K., et al. (2003). Blockade of B7-H1 Suppresses the Development of Chronic Intestinal Inflammation. *The Journal of Immunology*, 171 (8): 4156-4163.
- Karlsson, H., Larsson, P., Wold, A. E. & Rudin, A. (2004). Pattern of Cytokine Responses to Gram-Positive and Gram-Negative Commensal Bacteria is Profoundly Changed when Monocytes Differentiate into Dendritic Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 59 (6): 628-628.
- Keir, M. E., Francisco, L. M. & Sharpe, A. H. (2007). PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Current Opinion in Immunology*, 19 (3): 309-314.
- Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474 (7351): 307-317.
- Kimura, A. & Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, 40 (7): 1830-1835.
- Kishimoto, T. (2010). IL-6: from its discovery to clinical applications. *International Immunology*, 22 (5): 347-352.
- Kruse, M., Rosorius, O., Krätzer, F., Bevec, D., Kuhnt, C., Steinkasserer, A., Schuler, G. & Hauber, J. (2000). Inhibition of Cd83 Cell Surface Expression during Dendritic Cell Maturation by

- Interference with Nuclear Export of Cd83 mRNA. *The Journal of Experimental Medicine*, 191 (9): 1581-1590.
- Kuwano, Y., Prazma, C. M., Yazawa, N., Watanabe, R., Ishiura, N., Kumanogoh, A., Okochi, H., Tamaki, K., Fujimoto, M. & Tedder, T. F. (2007). CD83 influences cell-surface MHC class II expression on B cells and other antigen-presenting cells. *International Immunology*, 19 (8): 977-992.
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3. utg. Bergen: Fagbokforlaget.
- Lechmann, M., Kotzor, N., Zinser, E., Prechtel, A. T., Sticht, H. & Steinkasserer, A. (2005). CD83 is a dimer: Comparative analysis of monomeric and dimeric isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329 (1): 132-139.
- Linde, K. v. d., P., C. B. P., L., A. S., A., C. M. M., F., J. S. H., H., P. W. J. & W., M. d. R. F. (2003). A Gly15Arg Mutation in the Interleukin-10 Gene Reduces Secretion of Interleukin-10 in Crohn Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 38 (6): 611-617.
- Ma, D. Y. & Clark, E. A. (2009). The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Seminars in Immunology*, 21 (5): 265-272.
- MacDonald, T. T. & Monteleone, G. (2005). Immunity, Inflammation, and Allergy in the Gut. *Science*, 307 (5717): 1920-1925.
- Mc Adam, A. J., Schweitzer, A. N. & Sharpe, A. H. (1998). The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunological Reviews*, 165 (1): 231-247.
- McDole, J. R., Wheeler, L. W., McDonald, K. G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K. A., Newberry, R. D. & Miller, M. J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 483 (7389): 345-349.
- McKinsey, T. A., Chu, Z.-L., Tedder, T. F. & Ballard, D. W. (2000). Transcription factor NF- κ B regulates inducible CD83 gene expression in activated T lymphocytes. *Molecular Immunology*, 37 (12-13): 783-788.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 1 (2): 135-145.
- Moser, M. & Murphy, K. M. (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*, 1 (3): 199-205.
- Mudter, J. & Neurath, M. F. (2007). IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: Pathophysiological role and clinical relevance. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13 (8): 1016-1023.
- Nolan, A., Kobayashi, H., Naveed, B., Kelly, A., Hoshino, Y., Hoshino, S., Karulf, M. R., Rom, W. N., Weiden, M. D. & Gold, J. A. (2009). Differential Role for CD80 and CD86 in the Regulation of the Innate Immune Response in Murine Polymicrobial Sepsis. *PLoS ONE*, 4 (8): e6600.
- O'Hara, A. M. & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*, 7 (7): 688-693.
- Pabst, O. & Mowat, A. M. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol*.
- Pinchuk, L., Klaus, S., Magaletti, D., Pinchuk, G., Norsen, J. & Clark, E. (1996). Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *The Journal of Immunology*, 157 (10): 4363-4370.
- PRIOR, S. D. & DALTON, H. (1985). The Effect of Copper Ions on Membrane Content and Methane Monooxygenase Activity in Methanol-grown Cells of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of General Microbiology*, 131 (1): 155-163.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.-P. & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2 (4): 361-367.
- Rescigno, M. & Di Sabatino, A. (2009). Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 119 (9): 2441-2450.
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P. & Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol*, 6 (5): 507-514.
- Romarheim, O. H., Øverland, M., Mydland, L. T., Skrede, A. & Landsverk, T. (2011). Bacteria Grown on Natural Gas Prevent Soybean Meal-Induced Enteritis in Atlantic Salmon. *The Journal of Nutrition*, 141 (1): 124-130.

- Round, J. L. & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9 (5): 313-323.
- Saladin, K. S. (2010). *Anatomy and physiology*. Fifth utg. New York: McGraw-Hill.
- Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2 (2): 116-126.
- Shibolet, O., Karmeli, F., Eliakim, R., Swennen, E., Brigidi, P., Gionchetti, P., Campieri, M., Morgenstern, S. & Rachmilewitz, D. (2002). Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats. *Inflammatory Bowel Diseases*, 8 (6): 399-406.
- Shin, J.-S., Ebersold, M., Pypaert, M., Delamarre, L., Hartley, A. & Mellman, I. (2006). Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature*, 444 (7115): 115-118.
- Taylor, P. A., Lees, C. J., Fournier, S., Allison, J. P., Sharpe, A. H. & Blazar, B. R. (2004). B7 Expression on T Cells Down-Regulates Immune Responses through CTLA-4 Ligation via R-T Interactions. *The journal of Immunology*, 172 (1): 34-39.
- Trinchieri, G., Pflanz, S. & Kastelein, R. A. (2003). The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses. *Immunity*, 19 (5): 641-644.
- Tze, L. E., Horikawa, K., Domaschek, H., Howard, D. R., Roots, C. M., Rigby, R. J., Way, D. A., Ohmura-Hoshino, M., Ishido, S., Andoniou, C. E., et al. (2011). CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *The Journal of Experimental Medicine*, 208 (1): 149-165.
- Verstak, B., Nagpal, K., Bottomley, S. P., Golenbock, D. T., Hertzog, P. J. & Mansell, A. (2009). MyD88 Adapter-like (Mal)/TIRAP Interaction with TRAF6 Is Critical for TLR2- and TLR4-mediated NF- κ B Proinflammatory Responses. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (36): 24192-24203.
- West, A. P., Koblansky, A. A. & Ghosh, S. (2006). Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22: 409-37.
- Zeuthen, L. H., Christensen, H. R. & Frøkiær, H. (2006). Lactic Acid Bacteria Inducing a Weak Interleukin-12 and Tumor Necrosis Factor Alpha Response in Human Dendritic Cells Inhibit Strongly Stimulating Lactic Acid Bacteria but Act Synergistically with Gram-Negative Bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13 (3): 365-375.