

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap

Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Masteroppgave 2014
60 stp

Immunmodulerende effekter av en
ikke-kommensal jordbakterie,
Methylococcus capsulatus (Bath), på
humane dendrittiske celler

Immune modulating effects of a non-
commensal soil bacterium,
Methylococcus capsulatus (Bath), on
human dendritic cells

Henriette Solberg

Forord

Arbeidet med denne masteroppgave ble utført ved Laboratoriet for molekylær cellebiologi ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) på Ås. Masteroppgaven ble utført med Professor Tor Lea og Førsteamanuensis Charlotte Ramstad Kleiveland som svært dyktige veiledere. En stor takk til Tor Lea for at jeg fikk skrive masteroppgave i hans gruppe, og en stor takk til Charlotte Ramstad Kleiveland for god hjelp i laboratoriet, med bearbeiding av resultat og ikke minst god skrivehjelp! Oppgaven kunne ikke vært realisert uten deres veiledning.

I laboratoriet har Ellen Karlstrøm vært til stor hjelp. Takk for tips og god veiledning. Takk til Katarzyna Kuczkowska og Stine Indrelid for oppmuntrende ord og deres gode humør. Takk til Lars Fredrik Moen for tilgang på artikler. En takk rettes også til Morten Jacobsen og Trine Eker Christoffersen for å vise interesse i arbeidet mitt. I tillegg vil jeg takke Elin Ørmen på mikroskopilaboratoriet for hjelp med SEM-bildene.

Mange timer har gått med i laboratoriet det siste året, og jeg vil takke Anne Flore Bakke for godt samarbeid. Til tross for lange dager på laboratoriet, har vi hatt mye moro sammen og gitt hverandre støtte og motivasjon selv om ikke resultatene ble som de skulle.

Takk til mine gode venner i Åsblæst'n. Dere har gitt meg den avkoblingen jeg har hatt behov for. Livet mitt på Ås hadde ikke blitt det samme uten dere!

En takk rettes også til min kjære romkamerat, Camilla Kristoffersen, for koselige stunder i Kilehagen etter lange dager på laboratoriet og i skriveprosessen.

En takk sendes også til venner og bekjente som har hatt troen på meg hele tiden. Dere vet hvem dere er.

Mamma og pappa. Tusen takk for at dere alltid støtter og hjelper meg.

Takk til alle.

Ås, mai 2014

Henriette Solberg

Sammendrag

Studier har vist at soyabønne-indusert enteritt i Atlanterhavslaks (*Salmo salar*) kan unngås ved å inkludere BioProtein i fôret. BioProtein er et bakteriemel som hovedsakelig består av den metanotrofe bakterien *Methylococcus capsulatus* (Bath). Denne bakterien har også vist å dempe effekten av dextransulfat (DSS)-indusert kolitt hos mus. *M. capsulatus* (Bath) er en ikke-kommensal, Gram-negativ jordbakterie som i tillegg til effekter på inflammasjonstilstander i tarmen hos mus og Atlanterhavslaks, binder sterkt til humane *in vitro* monocytt-deriverte dendritiske celler (mo-DC). Målet med denne studien har vært å studere immunmodulerende effekter av *M. capsulatus* (Bath) på humane mo-DC.

Studiene viste at ko-kultivering mellom mo-DC og *M. capsulatus* (Bath) førte til en økt ekspresjon av de ko-stimulatoriske molekylene CD80 og CD86, samt modningsmarkøren CD83 på mo-DC. Etter ko-kultivering mellom mo-DC og *M. capsulatus* (Bath) i 20 timer ble det detektert økte mengder av cytokinene interleukin (IL) -6, IL-10 og IL-12 i kultursupernatant. I en tilpasset, blandet lymfocytt reaksjon, MLR, ble det observert induksjon av T-cellerespons da T-celler kultivert sammen med mo-DC som var modnet av *M. capsulatus* (Bath).

I denne studien er også en nær slektning av *M. capsulatus* (Bath) undersøkt, samt en kommensal, probiotisk bakterie. Det viser seg at *M. capsulatus* (Bath) har større immunmodulerende effekter på mo-DC enn den kommensale, probiotiske bakterien *E.coli* Nissle 1917.

Abstract

Previous studies show that soybean-induced enteritis in Atlantic salmon can be ameliorated by adding BioProtein in the feed. BioProtein mainly constitute the methanotrophic bacterium *Methylococcus capsulatus* (Bath). This bacterium has also showed to reduce the inflammatory effects of dextran sulfate (DSS)-induced colitis in mice. *M. capsulatus* (Bath) is a non-commensal, Gram-negative soil bacterium that, in addition to anti-inflammatory effects in the intestine in Atlantic salmon and mice, binds strongly to human monocyte-derived dendritic cells (mo-DC) *in vitro*. The aim of this study was to detect immune modulating effects of the interaction between *M. capsulatus* (Bath) and human mo-DC.

This study shows that co-cultivation between mo-DC and *M. capsulatus* (Bath) induced an increased expression of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 as well as the maturation marker CD83 on mo-DC. After co-cultivation between mo-DC and *M. capsulatus* (Bath) for 20 hours, different amounts of the cytokines interleukin (IL)-6, IL-10 and IL-12 was detected in the culture supernatant. In an adapted mixed lymphocyte reaction, MLR, T cells were added to *M. capsulatus* (Bath) matured mo-DCs, and a T cell response was detected.

In this study, two other bacteria were included as well, a close relative, *M capsulatus* (Texas), and a commensal probiotic bacterium *Escherichia coli* Nissle 1917. It turns out that *M. capsulatus* (Bath) has a greater immune modulating effect than *E. coli* Nissle 1917.

Forkortelser

APC	Antigenpresenterende celle
DC	Dendrittisk celle
Mo-DC	Monocyttderivert dendrittisk celle
T-celle	T-lymfocyt
B-celle	B-lymfocyt
Th1	T-hjelpercelle 1
Th2	T-hjelpercelle 2
Treg	Regulatorisk T-celle
Th17	T-hjelpercelle 17
RA	Retinsyre / Retinoid acid
IEL	Intraepitelial lymfocyt
IEC	Intestinal epitelcelle
ILC	Medfødt lymfoid celle
GM-CSF	Granulocyttdmakrofag kolonistimulerende faktor
PRR	Pattern recognition receptor/ mønstergjenkjennede reseptor
MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern/ Mikrobe-Assosierte Molekylære Mønstre
AMP	Antimikrobielle peptid
LP	Lamina propria
SEM	Sveipeelektronmikroskop(i)
IL	Interleukin

Innhold

Forord	I
Sammendrag	III
Abstract	V
Forkortelser	VII
Innhold	1
1.0 Introduksjon	3
1.1 Immunsystemet	3
1.1.1 Mønster-gjenkjennende reseptorer	3
1.1.2 Dendritiske celler (DC)	5
1.1.3 Den immunologiske synapsen	6
1.1.4 T-effektorceller og ulike immunresponser	8
1.2 Tarmens anatomi og funksjon	10
1.2.1 Tarmepitelet	11
1.2.2 Barrierefunksjon	12
1.2.3 Tarmhomeostase	13
1.2.4 Tarmens mikrobiota	14
1.2.5 Tarmens immunsystem	15
1.2.6 Tarmens immunologi og utviklingen av toleranse	17
1.2.8 Inflammatorisk tarmsykdom	19
1.4 Studering av DC <i>in vitro</i>	20
1.4.1 Isoleringsmetoder for monocytter	20
1.4.2 Bakgrunn om bakteriene som er benyttet i studien	20
1.4.3 Målet med studien	23
2.0 Materialer og Metoder	24
2.1 Materialer	24
2.1.1 Medier til celler og bakterier	24
2.1.2 Løsninger til prøvepreparering for væskestrømscytometriske analyser	25
2.2 Metoder	25
3.0 Resultat	30
3.1 Isolering av celler	30
3.2 Ekspresjon av overflatemarkører på mo-DC	31
3.3 Blandet lymfocytt reaksjon, MLR	34

3.4 Cytokinprofiler detektert ved ELISA	35
3.5 Transkripsjonsfaktorer i prolifererende T-celler	38
3.6 Ekspresjon av RALDH enzymer	40
3.7 Binding av <i>M. capsulatus</i> (Bath) til mo-DC	40
4.0 Diskusjon.....	43
4.1 Ekspresjon av overflatemolekyler på mo-DC etter ko-kultivering med bakterier	43
4.2 Ko-kultiverte mo-DC som APC i en tilpasset MLR	45
4.3 Cytokinprofil i kultursupernatant fra mo-DC ko-kultivert med bakterier.....	46
4.4 Ekspresjon av RALDH enzymer i mo-DC.....	48
4.5 Transkripsjonsfaktorer i prolifererende T-celler	49
4.6 Binding mellom mo-DC og <i>M. capsulatus</i> (Bath)	51
4.7 Immunmodulerende effekter av ko-kultivering med <i>M. capsulatus</i> (Bath).....	51
4.8 Forslag til videre studier.....	52
5.0 Konklusjon	53
6.0 Referanser.....	54
Vedlegg 1: Utstyrliste	59
Vedlegg 2: Utvelgelse av T-celler.....	62

1.0 Introduksjon

1.1 Immunsystemet

Immunsystemet deles inn i to deler; det medfødte og det adaptive/erhvervede immunsystemet. Det medfødte immunsystemet omhandler førstelinjeforsvaret med mekaniske barrierer (hud og slimhinner i gastrointestinal trakten og luftveier) som hindrer inntrengende bakterier. I tillegg finnes antimikrobielle peptider (AMP) som regulerer bakterievekst. Om bakterier trenger gjennom denne forsvarslinjen, finnes mønster gjenkjennende reseptorer på epitelceller og medfødte immunceller som kan detektere dem. Medfødte immunceller er blant annet de fagocytterende cellene dendritiske celler (DC), makrofager og monocytter (Iwazaki & Medzhitov 2010). Disse cellene er antigenpresenterende celler som har som oppgave å presentere antigen for T-celler. T- og B-celler er de adaptive immuncellene som har reseptorer som gjør at de reagerer spesifikt mot fremmede antigener (Iwazaki & Medzhitov 2010).

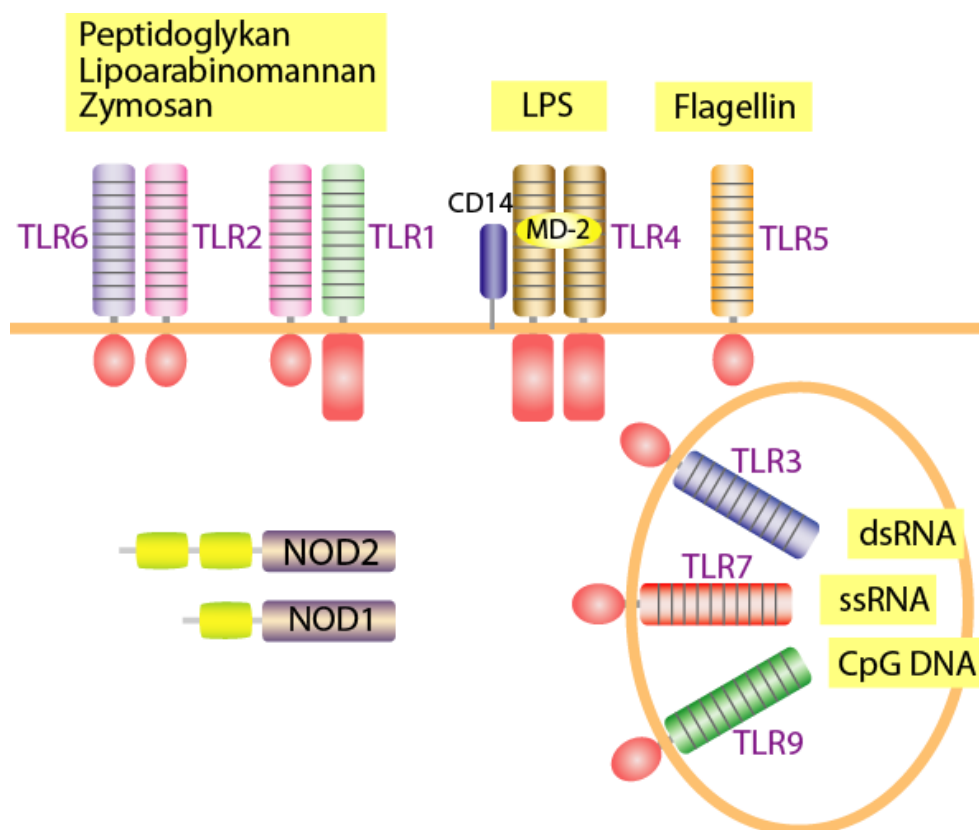
1.1.1 Mønster gjenkjennende reseptorer

Mønster gjenkjennende reseptorer, pattern recognition receptors (PRR), kjenner igjen mikrobe-assosierte molekulære mønstre (MAMP). Disse molekulære mønstrene er ikke spesifikke for patogene mikroorganismer, men gjenspeiler konserverte egenskaper hos mikroorganismer (Iwazaki & Medzhitov 2010). PRR deles inn i ulike grupper etter hvor de befinner seg; sekreerte, transmembrane og cytosoliske. Figur 1-1 viser en oversikt over ulike transmembrane og cytosoliske PRR og deres plassering. Kollektiner, fikoliner og pentraksiner er eksempler på ulike sekreerte PRRer. Disse reseptorene binder mikrobielle overflater og aktiverer komplementsystemet via den klassiske- og lektin-veien. Dette ender med opsonisering av patogenene for fagocytose av makrofager og nøytrofile (Iwazaki & Medzhitov 2010).

C-type lektinerreseptorer og Toll-lignende reseptorer (TLR) er eksempler på transmembrane PRR. Når TLR er plassert på celleoverflaten kjenner de igjen konserverte mikrobielle mønstre. Eksempler er TLR4 som kjenner igjen lipopolysakkarid, LPS, i celleveggen hos Gram-negative bakterier, mens TLR1/TLR2 og TLR2/TLR6 binder lipoteikoinsyre på overflaten hos Gram-positive bakterier. TLR finnes også på plasmamembranen i

endosomale/lysosomale organeller. Her kjenner de igjen enkelt- og dobbelt-trådet RNA (ss/ds RNA) og CpG DNA (lineært DNA med cytosin og guanin etter hverandre i lengderetningen på DNA-tråden) (Hill & Artis 2010). Uttrykket av TLR varierer hos ulike celletyper. Transmembrane reseptorer av C-type lektinreseptor-familien er Dectin-1 og Dectin 2. Disse reseptorene binder β -glukaner og mannan på celleoverflaten til sopp og bakterier (Iwazaki & Medzhitov 2010).

Den siste gruppen av PRR er de cytosoliske reseptorene. Denne gruppen PRR omhandler blant annet de nukleotid-bindende og leucinrike repetisjon-inneholdende reseptorer (NLR) som blant annet omfatter NOD1 og NOD2 reseptorer. Disse reseptorene kjenner igjen peptidoglykan (Hill & Artis 2010).



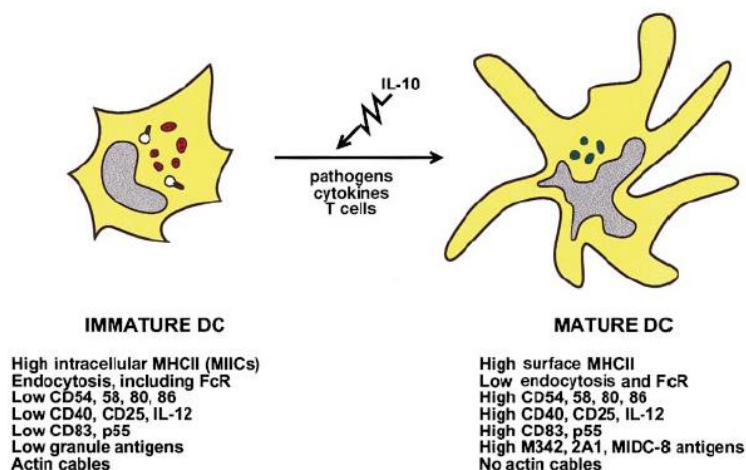
Figur 1-1: Mønsterkjennende reseptorer. Oversiktsfigur over plassering av noen av de mønsterkjennende reseptorene som binder konserverte strukturer på mikroorganismer. Det er flere celletyper som uttrykker slike reseptorer; fagocytterende celler (blant annet DC og makrofager) og epitelceller. Illustrasjon: Tor Lea.

1.1.2 Dendritiske celler (DC)

DCer er fagocytterende celler med stor evne til å ta opp og presentere antigener for T-celler. Antigenene tas opp ved fagocytose, makropinocytose eller reseptor-mediert endocytose. Videre blir antigenene prosessert til peptider og presentert i HLA klasse II-molekyler på celleoverflaten (Hubo et al. 2013). DC stammer fra hematopoietiske stamceller i beinmargen.

Humane DC deles i to hovedgrupper: plasmacytoide og myeloide DCer. Plasmacytoide DC (pDC) har som hovedoppgave å initiere antivirale responser. pDC har reseptorer som gjenkjenner av virale antigener, og produserer store mengder type 1 interferoner (IFN- α og IFN- β) etter aktivering (Hubo et al. 2013). Felles for myeloide DC (mDC) er ekspresjon av HLA klasse II-molekyler og CD11c, og at de ikke uttrykker CD14, CD15, CD19, CD20 og CD56. Videre deles mDC inn i to subpopulasjoner hvor den ene subpopulasjonen uttrykker CD1c (mDC1) og den andre subpopulasjonen uttrykker CD141 (mDC2) (Kassianos et al. 2012). Det er vist at humane CD141⁺ DC har mye TLR3 på overflaten, produserer IL-12 og IFN- β , har stor kapasitet til å krysspresentere eksogene antigener fra døde eller døende celler på HLA klasse I-molekyler og induserer en immunrespons med T-hjelpercelle 1 effektorceller (Jongbloed et al. 2010; Qian & Cao 2012). I tillegg uttrykker CD141⁺ DC ikke TLR4, og de fagocytterer ikke *E. coli* (Kassianos et al. 2012). CD1c⁺ DC uttrykker TLR4 (Kassianos et al. 2012), og i respons på *E. coli* produserer de mye IL-10, men lite IL-12, IL-6 og TNF- α . Cytokinprofilen i tillegg til ekspresjon av regulatoriske overflatemarkører (IDC og CD25) antyder at dette er tolerogene DC. Tolerogene DC er viktig for utviklingen av sentral og perifer toleranse (Qian & Cao 2012).

DCer har PRR på overflaten som binder mikroorganismer og/eller mikrobielle produkter. Når DCer blir aktivert begynner de å produsere cytokiner som aktiverer en adaptiv immunrespons (Sato & Fujita 2007). Aktiverte DC kjennetegnes av økt ekspresjon av HLA klasse II-molekyler, samt økt ekspresjon av de ko-stimulatoriske molekylerne CD40, CD80 og CD86 (Banchereau & Steinman 1998; Cella et al. 1997; Hubo et al. 2013; Sato & Fujita 2007). HLA er en forkortelse for Humant Leukocyt Antigen. Dette er molekylerne som presenterer peptidantigener for T-celler. HLA klasse I-molekyler finnes på alle kjerneholdige celler. Disse molekylerne presenterer intracellulære proteinantigener for CD8⁺ T-celler. HLA klasse II-molekyler finnes på overflaten til APC, og presenterer eksogene peptidantigener. CD8 er en modningsmarkør på DC da ekspresjonen øker etter modning (Lechmann et al. 2002). Figur 1-2 viser en oversikt over fenotypiske endringer på umodne og modne DC.



Figur 1-2: Molekyler på umodne og modne DC. Av figuren observeres en økt ekspresjon av CD83, de ko-stimulatoriske molekylerne CD80 og CD86, samt økt ekspresjon av HLA-II molekyler. Ekspresjonen hemmes av IL-10 (Banchereau & Steinman 1998).

1.1.3 Den immunologiske synapsen

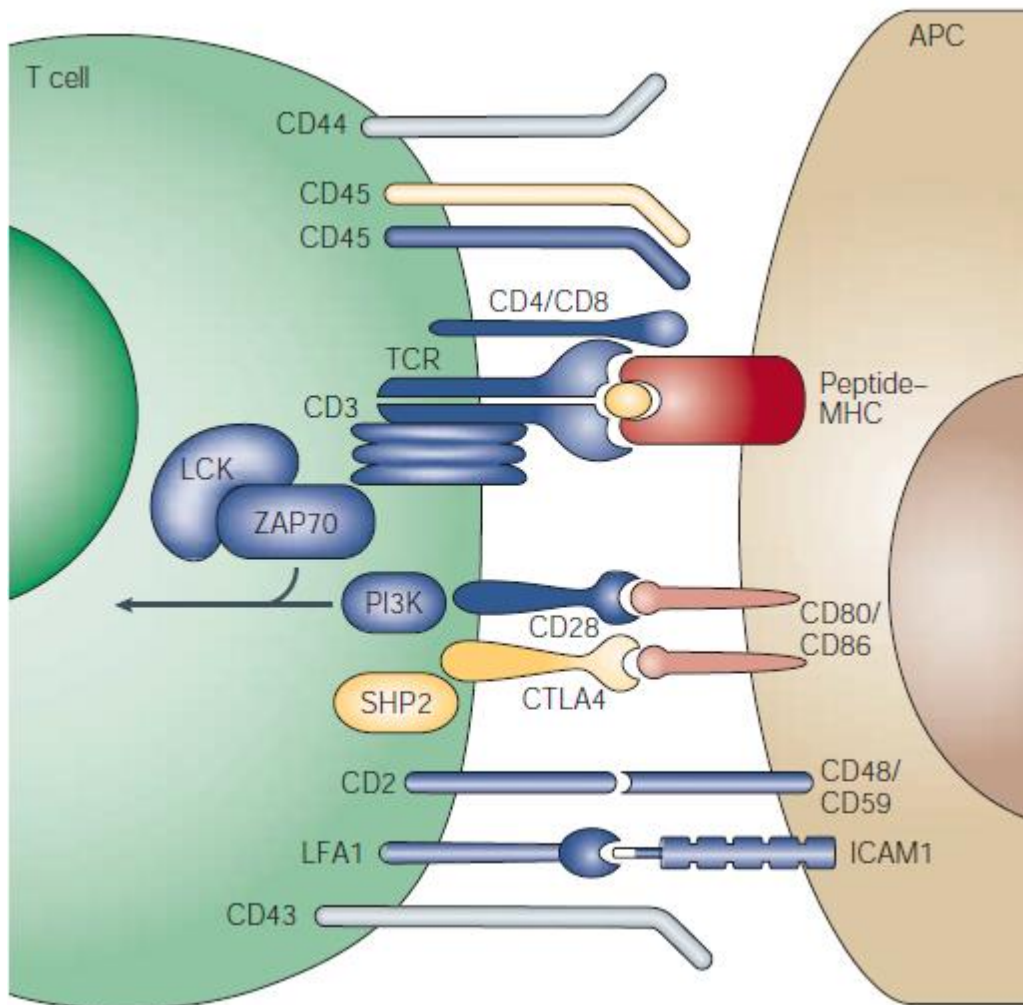
Signaloverføringen som aktiverer T-celler omtales som den immunologiske synapsen. For at T-celler skal aktiveres, krever de tre signaler (Magombedze et al. 2013). Aktiveringen av T-celler skjer i sekundært lymfoid vev, hvor T-celler møter APC. Interaksjonen mellom HLA-molekyl/antigen-komplekset og TCR/CD3-komplekset overfører første aktiveringssignalet inn i T-celler. CD3 overfører selve aktiveringssignalet og initierer en intracellulær signaleringskaskade. Hvordan denne signaleringen initieres er ikke kjent (Wang et al. 2009).

Det andre signalet overføres via ko-stimulatoriske molekyler. CD28 på T-celler bindes til CD80 eller CD86 på APC (Magombedze et al. 2013). Signalering via CD28 på T-celler fører blant annet til produksjon av IL-2, et cytokin som fremmer videre proliferasjon av primære T-celler (Hubo et al. 2013). Overføringen av signaler i den immunologiske synapsen skjer trinnvis. Interaksjonen mellom HLA klasse II-molekylet og TCR/CD3-komplekset sender det første signalet inn i T-cellen. I respons uttrykker T-cellen ut CD28 som vil binde CD80 eller CD86 om det er tilstede på APC. Om CD28 binder CD80 eller CD86 vil signal to bli sendt inn i T-cellen, og T-cellen aktiveres. Mangelen på signal to gir anerge T-celler (Schweitzer et al. 1997). T-cellene påvirkes også av inflammatoriske cytokiner i miljøet produsert av blant annet APC. Dette er med på å polarisere T-cellene ($CD4^+$ og $CD8^+$) i ulike retninger. Magombedze et al. 2013 betegner cytokinene i miljøet som signal nummer tre. Figur 1-3 viser en oversikt over noen av molekylerne som er involvert i den immunologiske synapsen.

I den immunologiske synapsen er det flere interaksjoner enn de som er beskrevet over. Binding mellom CD40 på APC og CD40 ligand (CD40L) er med i reguleringen av humoral immunitet og er viktig for differensieringen av T-celler. Når CD40 på DC blir bundet øker dette ekspresjonen av adhesjonsmolekyler og ko-stimulatoriske molekyler, i tillegg til å fremme produksjonen av cytokiner som stimulerer T-celler, blant annet IL-12 (Hubo et al. 2013). Det finnes også nedreguleringsmekanismer som bidrar til å begrense overføringen av signal to inn i T-celler. Cytotoksisk T-celle Antigen-4 (CTLA-4) er et molekyl som binder CD80 og CD86 med høyere affinitet enn CD28.

CD8 og CD4-molekylene på T-cellene er ko-resptorer for henholdsvis HLA klasse I og HLA klasse II- molekyler. Dette er årsaken til at CD4⁺ T-celler kun aktiveres av HLA klasse II-molekyler, og CD8⁺ T-celler aktiveres av HLA klasse I-molekyler.

Krysspresentasjon betyr at ekstracellulære antigener blir presentert for T-celler på HLA klasse I-molekyler som resulterer i en aktivering av CD8⁺ T-celler (Segura & Amigorena 2014). CD8⁺ T-celler utvikles til cytotoksiske T-celler som dreper cellene de er blitt aktivert av. Celledrapet gjennomføres ved å indusere apoptose. Apoptose kan induseres ved at T-cellen uttrykker Fas som binder Fas ligand (FasL) på målcellen, eller ved sekresjon av cytotoksiner. Det er primært DC som krysspresenterer antigen, men også B-celler, endotelceller og makrofager har denne evnen (Heath et al. 2004).

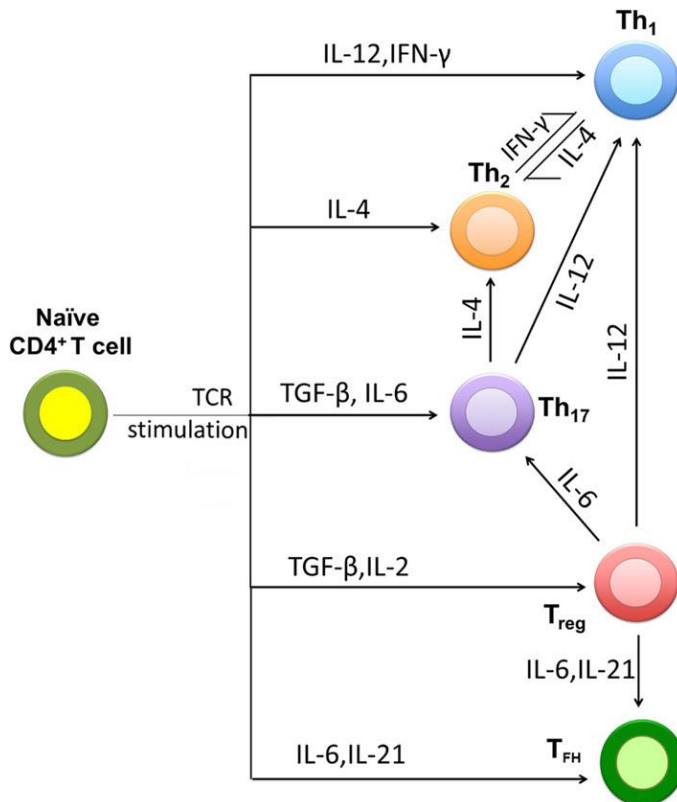


Figur 1-3: Den immunologiske synapsen. HLA-molekyler på APC interagerer med TCR/CD3-komplekset på T-celler. Bindingen blir støttet av CD4 eller CD8, avhengig av T-celle populasjonen som bindes. De ko-stimulatoriske molekylene CD80/CD86 interagerer med CD28 på T-cellen. Figuren er hentet fra (Huppa & Davis 2003)

1.1.4 T-effektorceller og ulike immunresponser

De CD4⁺ T-cellene kan differensieres til ulike effektorceller: T-hjelpercelle 1 og 2 (Th1 og Th2), induerte regulatoriske T-celler (iTreg), folikulære T-hjelperceller (Tfh) og T-hjelpercelle 17 (Th17) celler. Cytokiner og andre signalmolekyler i miljøet er viktige faktorer som er med på å bestemme differensieringen av effektorceller, men også affiniteten på interaksjonen mellom antigenet og T-cellereseptoren har betydning. Man trodde lenge at de ulike effektorcellene var terminalt differensiert, men det har i senere tid vist seg at effektorcellene kan endre fenotype. Th1 og Th2 ser ut til å være stabile fenotyper, mens Th17 og iTreg ser ut til å kunne endre fenotype avhengig av cytokinene i miljøet. Eksempler er

iTreg som kan differensieres til Th17 hvis IL-6 og IL-21 finnes i miljøet, Th17 celler som kan differensieres til IFN- γ produserende Th1-celler under påvirkning av IL-12 eller til Th2-celler som produserer IL-4 om de blir stimulert med IL-4. Figur 1-4 angir differensieringen av T-effektorceller.



Figur 1-3: Differensiering til ulike T-effektor celler. Figuren skisserer plastisiteten til T-celler. Th1- og Th2-effektorceller er stabile celler, mens Th17 celler påvirkes i større grad av cytokinene i miljøet (Magombedze et al. 2013).

En Th1-immunrespons er karakterisert av produksjon av interferon gamma (IFN- γ). Polariseringen til Th1 celler skjer via aktivering av T-box transkripsjonsfaktoren, T-bet (Magombedze et al. 2013; Nakayamada et al. 2012; Zhou et al. 2009). IL-12 får naive Th-forløperceller (prekursorceller) til å differensiere til Th1-effektorceller, og immunresponsen over i en cellemediert immunrespons (Car et al. 1999). Cytokinet skilles ut av makrofager, monocytter og DC (Fieschi & Casanova 2003; Langrish et al. 2004). Når disse cellene blir stimulert med bakterieprodukter, cytokiner fra verten eller andre stimuli som blir sekretert under en infeksjon, produserer de IL-12 i respons (Car et al. 1999). Binding av IL-12 på T-celler induserer produksjon av IFN- γ , effektormolekylet i en Th1-immunrespons (Fieschi & Casanova 2003).

Cytokiner som er med å karakterisere en Th2-immunrespons er IL- 4, IL-5 og IL-13. Disse cytokinene blir produsert av Th2-effektorcellene, og kreves for å oppnå en humoral immunitet som kontrollerer parasitter (helminter) og andre ekstracellulære patogener. For å aktivere CD4⁺ T-celler til Th2-effektorceller kreves en aktivering av transkripsjonsfaktoren GATA3 (Magombedze et al. 2013; Nakayamada et al. 2012; Zhou et al. 2009). IL-4 fungerer som repressor på ekspresjonen av IL-12 ved å inhibere uttrykket av IL-12R β2 og på den måten motvirker differensiering til Th1 celler (Zhou et al. 2009). Th1- effektorceller har også evnen til å undertrykke og motvirke differensieringen til Th2-effektorceller.

Th17-effektorceller er viktige for å fjerne ekstracellulære bakterier og sopp, særlig på slimhinneoverflater. Disse T-cellene kjennetegnes ved sekresjon av IL-17A, IL-17F og IL-22. Differensieringen til Th17-effektorceller krever aktivering av transkripsjonsfaktoren ROR- γt (retinoid-related orphan receptor). TGF-β sammen med de proinflammatoriske cytokinene IL-6, IL-21 og IL-23 er med på å indusere aktiveringen av denne transkripsjonsfaktoren (Zhou et al. 2009).

Det er funnet to hovedgrupper av regulatoriske, Foxp3⁺ T-celler. En gruppe forekommer naturlig som Treg (nTreg), og som nevnt over, de induserbare Treg-cellene (iTreg). T-cellene som omtales som nTreg er CD4⁺CD25⁺ T-celler som dannes i tymus. Det er mulig at begge typene deltar i opprettholdelsen av perifer toleranse og motvirker autoimmune tilstander.

1.2 Tarmens anatomi og funksjon

Den gastrointestinale trakten er den største overfalten hvor kommensale og patogene mikroorganismer kan trenge inn i organismen. For å unngå dette er det utviklet en spesialisert forsvarsbarriere for å regulere mikrobiotaen, motstå patogene mikroorganismer samtidig som tarmens hovedfunksjon, opptak av næringsstoffer, opprettholdes (Maynard et al. 2012). Anatomien i tarmen er tilpasset funksjonen. Nedbrytningen av næringsstoffer og absorpsjonen finner sted i tynntarmen. Effektivt næringsopptak krever en stor overfalte, og tynntarmen er derfor utstyrt med tarmtotter (villi) med børstesøm (mikrovilli). Dette medfører at overflaten i tynntarmen utgjør omlag 300m² hos et voksent menneske (Maynard et al. 2012). I tykktarmen foregår det ingen absorpsjon av næringsstoffer, kun vann og elektrolytter. Dette er grunnen til at det i tykktarmen ikke er mikrovilli. I tillegg drives bakteriell nedbrytning av komponenter

verten ikke kan bryte ned selv. Metabolitter her er blant annet kortkjedede fettsyrer og vitaminer.

1.2.1 Tarmepitelet

Det er ett enkelt lag av epitelceller som skiller innholdet i tarmlumen fra immuncellene i bindevevslaget lamina propria (LP). Epitelet utgjør derfor en mekanisk barriere mellom tarminnholdet og immunsystemet. I tynntarmen består epitelcellelaget av fem ulike typer intestinale epitelceller (IEC); enterocytter, enteroendokrine celler, Paneth celler, begerceller og mikrofolds-celler (M-celler). Enterocytter er absorptive celler som tar opp næringsstoffer fra lumen. Enteroendokrine celler er celler som sekreterer hormoner som fraktes over i blodbanen i LP. Eksempler er hormoner som deltar i reguleringen av metthet og sult. Epitelcellene i tarmen er polariserte celler med en apikal side som vender ut mot tarmlumen og en basolateral side som vender ned mot en basalmembran.

Over epitelcellene i tarmen finnes et lag med mukus. Det er begercellene som produserer mukuslaget som danner en kjemisk barriere mellom tarminnholdet og epitelcellene. Sammen med antimikrobielle peptider (AMP) produsert av Paneth celler, er dette med på å regulere interaksjonen mellom mikrobiotaen i tarmen og immunsystemet. Paneth cellene er ikke avhengig av bakterielle stimuli for å produsere AMP. AMP dannes og lagres i granula i cellene og sekreteres ved bakterielt stimuli (Maynard et al. 2012). M-celler er spesialiserte enterocytter uten mikrovilli og med mindre mukus på den apikale siden inn mot tarmlumen (Mowat 2003).

De ulike epitelcellene i tarmepitelet finnes på forskjellige steder i tarmen. Paneth cellene befinner seg i krypten, mens enterocytter dekker overflaten av villiene sammen med enteroendokrine celler og begerceller. M-cellene befinner seg på overflaten til sekundært lymfoid vev. Alle cellene i tarmepitelet kommer fra samme stamcelle (IESC) som er plassert i bunnen av kryptene (Maynard et al. 2012) se figur 1-5.

1.2.2 Barrierefunksjon

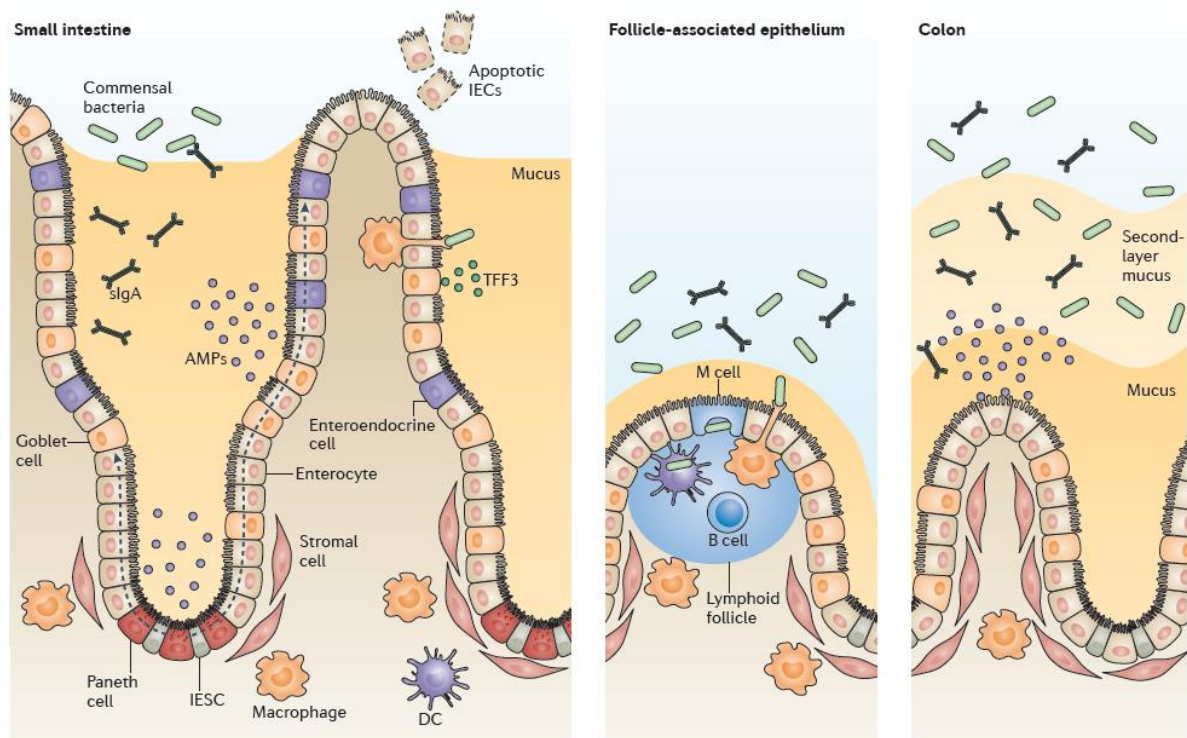
Flere faktorer er viktig for barriere funksjonen. Konstant fornyelse av epitelet, mukuslaget, tette kontaktpunkter mellom epitelcellene, produksjon og sekresjon av AMP, immunglobulin A (IgA), og det tarm-assosierte immunsystemet.

En viktig funksjon for IECer er å sanse og respondere på mikrobielle stimuli for deretter å kunne forsterke barrierefunksjonen og være med i koordineringen av en passende immunrespons (Peterson & Artis 2014). Begerceller sekreterer mukus og enterocytene kan produsere AMP, blant annet REGIII γ som binder peptidoglykan hos Gram-positive bakterier. Sammen med AMP produsert av Paneth cellene danner dette en biokjemisk barriere for mikrobiell kontakt med tarmepitelet og de underliggende immuncellene (Peterson & Artis 2014). Paneth cellene produserer α -defensiner, cathelicidin og lysozym som sekreseres i bunnen av kryptene. Disse AMPene ødelegger essensielle funksjoner hos bakteriene blant annet ødelegger defensiner og cathelicidin cellemembranen til bakteriene (Peterson & Artis 2014).

Dimerisk IgA produseres av plasmaceller i LP og blir transportert gjennom epitelcellene og sekret ut i tarmlumen. Dette samarbeidet mellom IgA-sekreserende plasmaceller og IEC gjør at antistoff (adaptive immunkomponenter) kommer i kontakt med antigener i mukus (Peterson & Artis 2014).

Andre faktorer som bidrar til å oppnå optimal barrierefunksjon er tette kontaktpunkter mellom IEC, permeabiliteten til kontaktpunktene, samt en konstant fornyelse av IEC (Peterson & Artis 2014). Den paracellulær transporten (transpost mellom epitelcellene) reguleres av cellekontaktpunktene.

I tarmen kontrolleres kontakten mellom immunsystemet og mikrobiotaen i tarmen ved å minimere direkte kontakt mellom tarmepitelet og intestinale bakterier og ved å avgrense penetrerende bakterier til utvalgte steder i tarmen og på den måten begrense eksponeringen av bakterier for immunsystemet (Hooper et al. 2012).



Figur 1-5: Epitelet og den intestinale barrieren. Ett lag med epitelceller skiller innholdet i tarmlumen fra immuncellene i lamina propria (LP). Faktorer som er med på å opprettholde barriererefunksjonen er mukuslaget, sekret IgA, antimikrobielle peptid og rask fornyelse av epitelcellene (Peterson & Artis 2014).

1.2.3 Tarmhomeostase

Tarmhomeostase innebærer immunologisk toleranse ovenfor de kommensale bakteriene i tarmen og beskyttelse ovenfor de patogene mikroorganismene. Mikrobiotaen i tarmen og verten har positiv innvirkning på hverandre (lever i et symbiotisk forhold). Mikrobiotaen danner et stabilt økosystem i verten da det hele tiden blir tilført næringsstoffer og temperaturen er stabil. Verten på sin side har nytte av metabolitter fra mikrobiotaen (kortkjedede fettsyrer og vitaminer). I tillegg bidrar mikrobiotaen med økt fordøyelse av næringsstoffer verten selv ikke kan fordøye. I tarmen bidrar mikrobiotaen med beskyttelse ovenfor patogene mikroorganismer (Maynard et al. 2012) da de kommensale bakteriene og de patogene bakteriene må konkurrere om de samme næringsstoffene.

Flere faktorer legger til rette for å opprettholde tarmhomeostase. Mukuslaget, på den apikale siden av epitelet, gjør det vanskelig for mikrobiotaen å komme i kontakt med epitelet. Om bakterier kommer i kontakt med epitelet, finnes adaptive og medfødte immunceller i LP på

den basolaterale siden av epitelet med et høyt antall regulatoriske T-celler sett i forhold til andre vev (Maynard et al. 2012). IEC deltar i opprettholdelse av tarmhomeostase ved å sekreere immunmodulerende cytokiner som påvirker DC som igjen induserer regulatoriske T-celler (Treg) (Hill & Artis 2010; Mortha et al. 2014). Ved mangel på regulatoriske T-celler vil en immunrespons settes i gang mot antigener fra mikrobiotaen i tarmen (Maynard et al. 2012). På epitelcellene i tarmen finnes PRR, og plasseringen av de aktive reseptorene er av betydning for immunresponsen som initieres. PRR på den basolaterale siden av IEC som kjenner igjen invaderende mikroorganismer. Invaderende mikroorganismer har flageller som kjennes igjen av TLR5. Under normale forhold uttrykker IEC lite eller ingen TLR2, TLR4 eller CD14-molekyler. Dette reduserer stimuleringen av mikrobiotaen i tarmen. Epitelcellene kan fremme frigjøring av beskyttende faktorer som rettes mot tarmlumen. For eksempel AMP og mukus som sekreses for å regulere mikrobiotaen i tarmen. Cytokiner og kjemokiner kan også sekreses etter simulering av PRR. Disse signalmolekylene kan fremme tarmhomeostase eller aktivere en inflammatorisk respons om den epiteliale barrieren er brutt (Maynard et al. 2012).

1.2.4 Tarmens mikrobiota

Den største forekomsten og diversiteten av ikke-selv antigener i kroppen er de kommensale bakteriene i tarmen (Maynard & Weaver 2009). Med trillioner av bakterier og 1000-1200 bakteriearter er genomet til mikrobiotaen 150 ganger større enn det humane genomet. Sammensetningen av mikrobiotaen varierer med alder og bakterietettheten øker nedover i tarmen, og er størst i tykktarmen (Maynard & Weaver 2009). Andre faktorer som påvirker sammensetningen av tarmfloraen er genetikk hos verten, medikamenter, diett og miljøfaktorer (Kovatcheva-Datchary et al. 2013). Mikrobiotaen utøver viktige funksjoner i utvikling av immunsystemet og i nedbrytningen av næringsstoffer i tarmen. Mikrobiotaen i tarmen har like stor metabolsk kapasitet som leveren, og kan derfor regnes som et eget organ (Sommer & Bäckhed 2013). En dysbiose i tarmfloraen er assosiert med inflammatorisk tarmsykdom, overvekt, diabetes og cøliaki (Kovatcheva-Datchary et al. 2013).

1.2.5 Tarmens immunsystem

Mikrobiotaen i tarmen representerer en konstant utfordring for immunsystemet, og det kreves en nøye regulering for å opprettholde tarmhomeostase mellom toleranse av kommensale bakterier og immunreaksjoner mot patogene mikroorganismer. Dette medfører at tarmsystemet er organet som har flest immunceller knyttet til seg. I tarmen jobber celler tilhørende det adaptive og det medfødte immunforsvaret sammen for å opprettholde tarmhomeostase.

Tilknyttet epitelet i tarmen finnes flere celletyper som tilhører det medfødte og det adaptive immunsystemet (T-celler og DC er allerede nevnt). Blant immuncellene som hører til det medfødte immunsystemet er makrofager, mastceller og medfødte lymfoide celler. Intraepiteliale lymfoide celler og B-celler er eksempler på immunceller som tilhører det adaptive immunsystemet.

Makrofager er fagocytterende celler som fjerner døende celler i tillegg er de APC og bidrar i aktiveringen av T-celler. På celleoverflaten har makrofagene reseptorer for blant annet vekstfaktorer og cytokiner. I vev blir makrofager aktivert av cytokiner i miljøet og oppnår ulike fenotyper, M1/M2. M1 makrofager blir aktivert av blant annet Th1-cytokinet IFN- γ , fremmer en Th1-immunrespons og deltar i bekjempelsen av intracellulære patogener. M2 makrofager kan videre deles inn etter cytokiner de aktiveres av. M2a aktiveres av IL-4, et Th2 cytokin, M2b aktiveres av TLR ligander og immunkompleks, og M2c makrofager aktiveres av IL-10. Felles for M2 makrofager er at de bidrar i å skyve immunresponser i en Th2-retning, og fremmer utviklingen av allergi (Martinez & Gordon 2014). Makrofager utvikles fra monocytter som vandrer ut i vev fra blod.

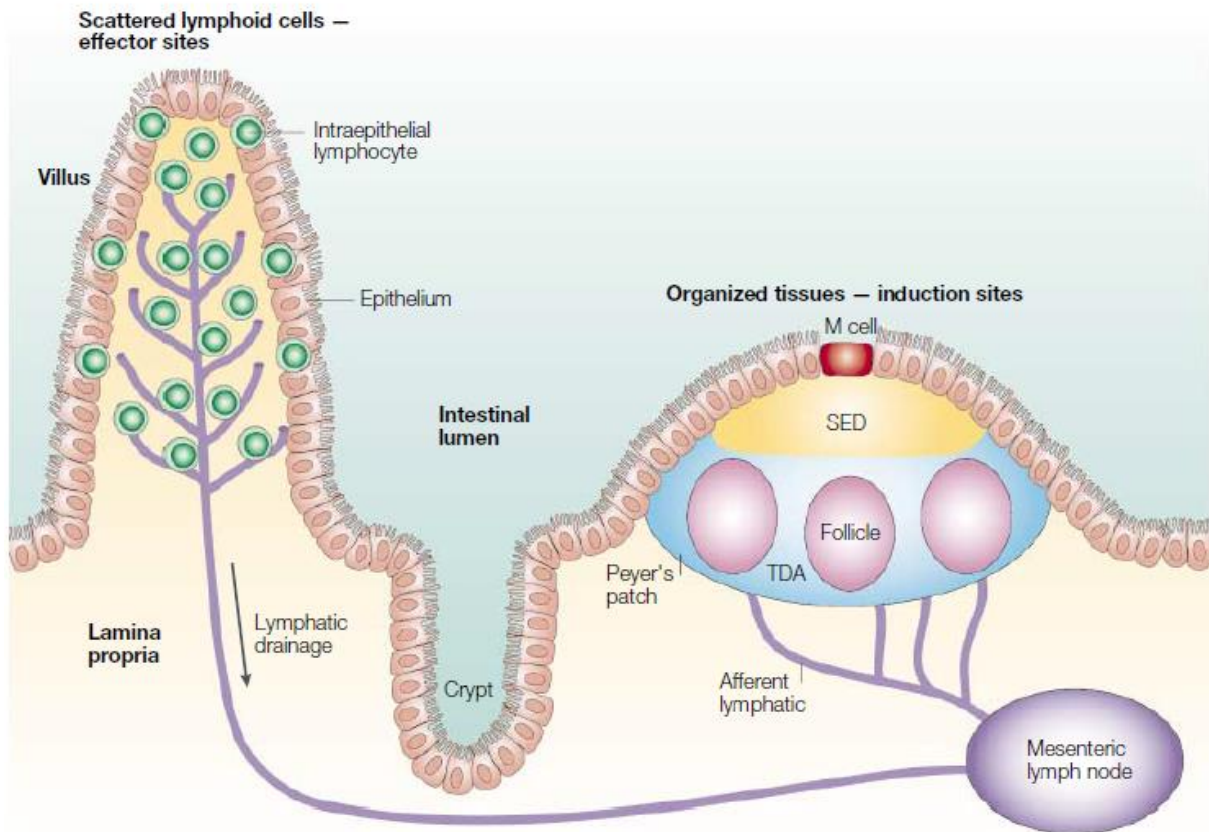
Medfødte lymfoide celler (ILC) finnes tilknyttet barrierer i tarm, hud og lunger hvor de er med i reguleringen av homeostase og inflammasjon. ILC er med å regulere barrierefunksjonen ved å produsere cytokiner i tillegg til at de er med å opprettholde homeostase via interaksjon mellom HLA klasse II-molekyler og TCR på CD4⁺ T-celler (Hepworth et al. 2013). Det finnes tre subgrupper av ILC (ILC1, ILC2 og ILC3) som ligner CD4⁺ T-effektorcellene Th1,

Th2 og Th17 i cytokiner de produserer og aktive transkripsjonsfaktorer (Peterson & Artis 2014).

Intraepiteliale lymfocytter (IEL) har en nøkkelrolle i immunsystemet i tynntarmen da IEL med $\gamma\delta$ T-celle reseptor beskytter mot invasjon av patogene mikroorganismer i mus (Edelblum et al. 2014). IEL befinner seg mellom IEC hvor de hjelper til å opprettholde integriteten til barrieren av epitelceller, hindre bakteriell translokasjon og legger til rette for reparasjon av epitelet etter skade ved å sekreere AMP (Maynard et al. 2012).

B-celler kan aktiveres til plasmaceller. Plasmaceller er de eneste cellene som kan produsere immunglobuliner (Ig). Av B-cellene som finnes i tarmen er de fleste Ig-produserende plasmaceller som produserer IgA (Hill & Artis 2010). Alle B-celler produserer identiske immunglobuliner med samme unike bindingssete. I tarmen skjer et klaseskifte som gjør at B-celler produserer IgA, og ikke IgM. B-cellene er også APC.

Assosiert med tarmen finnes store mengder lymfoid vev, gastrointestinalt-assosiert lymfoid vev (GALT). GALT består av Peyerske flekker, mesenteriske lymfeknuter (MNL) og isolerte lymfoide follikkeler (ILF). Peyerske flekker er aggregater av lymfoide celler i tynntarmen. I de Peyerske flekker er det en samling med immunceller som befinner seg under tarmepitelet. Her er det follikler av B-celler med T-celler innimellom. Dette lymfoide vevet er et avgrenset område i tarmepitelet med follikel-assosiert-epitel (FAE) på den apikale siden ut mot tarmlumen, og subepiteliaalt dom (SED), en spesialisert struktur, på den basolaterale siden. FAE med M-celler har mindre mikrovilli og mindre fordøyelsesenzymer, deltar ikke næringsopptak og har ikke Ig reseptorer og sekreterer ikke IgA (Chabot et al. 2006). I FAE finnes en type spesialiserte enterocytter. M-cellene er plassert i Peyerske flekker, ut mot tarmlumen, og har i oppgave å frakte tarminnhold (matkomponenter og mikrobiota) over den epiteliale barrieren slik at det medfødte og det adaptive immunsystemet kan overvåke mikrobiotaen i tarmen og vite hvilke bakterier som dominerer nært epitelet (Maynard et al. 2012; Mowat 2003). Immunresponsen i tarmen initieres i ett område, og har effektorområdet et annet sted. Induksjonsstedet kan være Peyerske flekker hvor M-celler tar opp antigener fra tarmlumen, mens effektorstedet er utenfor det de organiserte samlingene av sekundært lymfoid vev, for eksempel villi som er illustrert i figur 1-6.



Figur 1-6: Anatomiske strukturer i tarmen med krypter og villi, samt Peyerske flekker. Epitelcellene har mikrovilli på den apikale siden. Induksjonsstedet er sekundære lymfoide follikler hvor antigen kommer i kontakt med medfødte immunceller, mens effektorstedet er områder utenfor de sekundære lymfoide strukturerne hvor de adaptive immuncellene har sin funksjon (Mowat 2003).

1.2.6 Tarmens immunologi og utviklingen av toleranse

Det er viktig med et immunsystem som tolererer maten vi spiser og de kommensale bakteriene i tarmen, men at det induseres en immunrespons mot patogene mikroorganismer når det er nødvendig. Oral toleranse er oppnådd når proinflammatorisk respons på orale antigen blir unngått. Mekanismene rundt induseringen av oral toleranse er ikke kartlagt, men høye doser antigen gir delesjon i T-celler og/eller anerge T-celler. Lave doser antigen og gjentatte eksponeringer fører til en aktiv undertrykkelse av immunresponsen ved å indusere antigenspesifikke regulatoriske T-celler (Cassani et al. 2012). IL-10 er et viktig cytokin om man skal oppnå toleranse. IL-10 fungerer ved å hemme ulike signalveier som blir aktive av proinflammatoriske cytokiner (Hubo et al. 2013).

For å opprettholde et symbiotisk forhold med tarmfloraen, spiller de CD4⁺ regulatoriske T-cellene en viktig rolle. Det finnes flere subpopulasjoner av CD4⁺ regulatoriske T-celler, Treg som uttrykker transkripsjonsfaktoren Foxp3 og Tr1 som er Foxp3⁻. Begge subpopulasjonene av regulatoriske T-celler kan produsere IL-10 (Maynard et al. 2012). Ved homeostase induserer antigen fra mikrobiotaen regulatoriske T-celler via DC og vitamin A metabolitten retinsyre (RA) (Maynard et al. 2012), RA bidrar med å indusere ekspresjon av integrinet $\alpha_4\beta_7$ og kjemokinreseptor 9 på T- og B-celler som binder Mukosa Adressin CelleAdhesjonsMolekyl-1 (MadCAM-1) og kjemokinligand 25 (CCL25/TECK) på endotelceller i venyler i LP i tynntarmen. Dette gjør at T- og B-celler kan vandre fra venyler og ut i vevet for å utøve effektorfunksjoner (Cassani et al. 2012; Iwata et al. 2004). Tarm-assosierte DCer har dehydrogenaser som omdanner vitamin A til RA (Cassani et al. 2012). DC i GALT produserer og sekreterer RA som i tillegg til å øke ekspresjon av $\alpha_4\beta_7$ og CCR9 på T- og B-celler har en direkte effekt på aktiverte B-celler og plasmaceller ved å indusere klasseskifte og på den måten sørge for at antistoff av typen IgA blir produsert (Mora & von Andrian 2009).

Balansen mellom Treg og Th17 er avgjørende for toleransen i tarmen. Differensiering av naive T-celler til Treg og Th17 er kontrollert av cytokiner i miljøet. Begge typene effektorceller krever TGF β for differensiering (Luckheeram et al. 2012; Maynard et al. 2012). Differensiering til Th17-celler krever også IL-6. IL-6 fungerer som et proinflammatorisk cytokin ved å fremme differensieringen til Th17-celler og inhibere differensiering til Treg (Kimura & Kishimoto 2010). Th17-celler er ikke terminalt differensiert, og kan påvirkes av cytokiner i miljøet og differensieres videre til Th1 effektorceller.

Det antas at interaksjonen mellom induserbar T-celle ko-stimulator (ICOS) og ICOS ligand (ICOSL) i den immunologiske synapsen er delaktig ved induksjon av toleranse. ICOS er et molekyl som blir uttrykt på T-celler etter aktivering av TCR. Umodne DC uttrykker mye av ICOS ligand (ICOSL) på overflaten, og overfører et sterkt IOCS-signal inn i T-celler i tillegg til at interaksjonen mellom CD28 og CD80/86 er svak. Dette stabiliserer ekspresjonen av IL-10 reseptorer på stimulerte T-celler. Lave mengder IL-10 blir produsert av umodne DC og virker på IL-10 følsomme T-celler, og har en hemmende effekt på differensieringen til T-effektorceller. Den endrede T-celle polariseringen resulterer i T-celler som ikke prolifererer,

som produserer IL-10, men som ikke produserer IFN- γ . Etter flere stimuleringer differensieres disse T-cellene til regulatoriske T-celler (Hubo et al. 2013).

1.2.8 Inflammatorisk tarmsykdom

I USA og Europa øker prevalensen av inflammatorisk tarmsykdom, IBD. De to sykdommene det i hovedsak dreier seg om er Ulcerøs kolitt og Crohn's sykdom. Ulcerøs kolitt opptrer i tykktarmen og rektum, og er karakterisert av en begrenset overfladisk inflammasjon (Feng et al. 2010). Crohn's sykdom rammer hele tarmveggen (Feng et al. 2010), og kan forekomme i hele tarmen. Som oftest er siste delen av tynntarmen (terminale ileum) rammet (Feng et al. 2010; Xavier 2007). Ved IBD er toleransen til mikrobiotaen brutt, noe som fører til en lokal og systemisk inflammasjon. I tillegg er det observert en lavere diversitet i tarmmikrobiota i pasienter med IBD enn hos andre friske individer (Hill & Artis 2010). Det er observert en dysbiose (ubalanse mellom proinflammatoriske og anti-inflammatoriske bakterier) i tarmen (Rutella & Locatelli 2011). I museforsøk er det vist at genetikk i verten, samt miljøfaktorer som livsstil, diett, hygiene og mikroflora kan forårsake en dysregulering av immunsystemet, og føre til sykdom (Kayama & Takeda 2012). Pasienter med IBD avviker fra friske i cytokinproduksjon, T-celleaktivering i tillegg til at de produserer IgG antistoff mot intestinale bakterier (Hill & Artis 2010). I genetisk utsatte individer er det observert en dysregulering av immunrespons hos de CD4⁺ T-cellene i mukosa (Feng et al. 2010). Studier hos mennesker og mus tyder på at ukontrollert inflammasjon mot den intestinale mikrobiotaen er årsaken til inflammatorisk tarmsykdom (Round & Mazmanian 2010).

NOD2-signalering er viktig i opprettholdelsen av intestinal homeostase (Hill & Artis 2010). Funksjonen til NOD2 er avhengig av celletypen som uttrykker reseptoren (Cho & Abraham 2007). Mutasjoner i NOD2 (en PRR som gjenkjenner peptidoglykan) er observert i pasienter med Crohn's sykdom. NOD2 er uttrykt på IEC, Paneth celler, endotelceller og monocyttderiverte celler, blant annet DC. NOD2 induserer sekresjon av pro- og anti-inflammatoriske cytokiner og øker ekspresjonen av ko-stimulatoriske molekyler som videre induserer en økt T-cellerespons (Cho & Abraham 2007).

1.4 Studering av DC in vitro

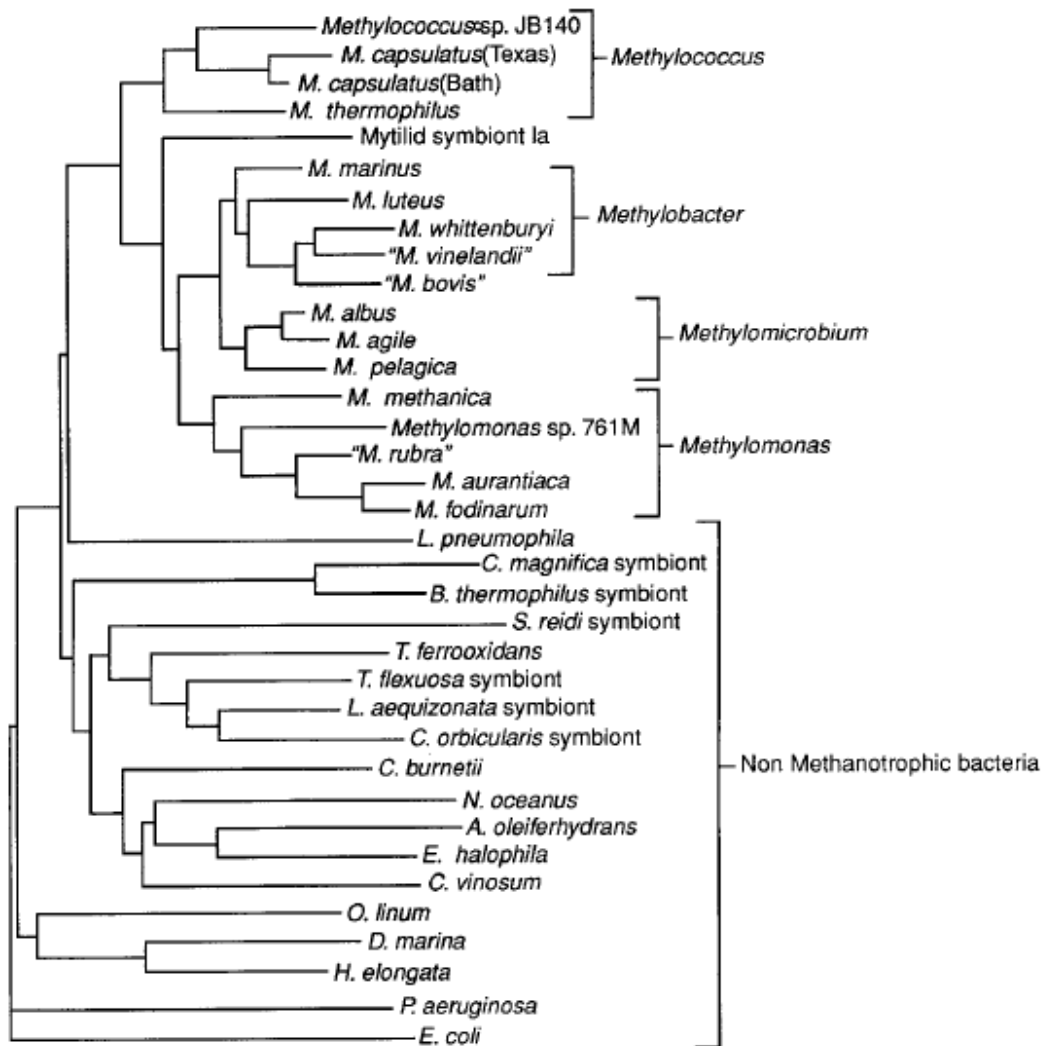
Monocytytter kan differensieres til monocytt-deriverte DC (mo-DC) i vev ved en inflammasjon eller infeksjon da det i disse områdene finnes IL-4 og GM-CSF i miljøet (Collin et al. 2013; Hubo et al. 2013; Kassianos et al. 2012). Det finnes tre ulike typer av humane CD14⁺ monocytytter; klassiske monocytytter, intermediaære monocytytter og ikke-klassiske monocytytter som skilles fra hverandre ut i fra ekspresjonen av CD14 og CD16 på overflaten (Ziegler-Heitbrock 2010). Når monocytytter differensieres, blir de til umodne myeloide DCer (Sato & Fujita 2007). Disse mo-DCene kan stimulere CD4⁺ T-celler, krysspresentere til CD8⁺ T-celler i tillegg til å produsere cytokinene IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12 og IL-23 (Collin et al. 2013).

1.4.1 Isoleringsmetoder for monocytytter

En anerkjent metode for å studere humane DC er å generere mo-DC. Monocytytter er adherente celler som binder seg til plast, og binde-egenskapen kan benyttes ved isolering av cellene. Nå er delvis magnetiske partikler tatt i bruk for isolering av ulike celletyper. Partiklene er dekket med monoklonale antistoff mot et overflatemolekyl, og de ønskede cellene blir isolert ved positiv seleksjon. En metode for å isolere monocytytter er med delvismagnetiske partikler dekket med antistoff mot CD14, da dette er et molekyl alle monocytytter har i større eller mindre grad (Ziegler-Heitbrock 2010).

1.4.2 Bakgrunn om bakteriene som er benyttet i studien

I denne studien er tre ulike bakterier blitt ko-kultivert med mo-DC: *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *Escherichia coli* Nissle 1917. Alle bakteriene er klassifisert under gammaproteobacteria i fylumet *Proteobacteria* (Hanson & Hanson 1996).



Figur 1-5: Gammaproteobakterier. Fylogenetisk tre som viser gammaproteobakterier i fylumet *Proteobacteria* (Hanson & Hanson 1996).

1.4.2.1 *Methylococcus capsulatus* (Bath) og *Methylococcus capsulatus* (Texas)

Methylococcus capsulatus er en Gram-negative, metanotrof bakterie som benytter metan som karbon-og energikilde. Energien og karbonet blir hentet ut fra metangass gjennom flere oksidasjonstrinn. Metan blir oksidert til metanol for så å bli oksidert videre til formaldehyd, maursyre og tilslutt CO₂ (Hanson & Hanson 1996).

***M. capsulatus* (Bath).** I cellemembranen har bakterien mye proteiner og LPS (Romarheim et al. 2013). Det har blitt spekulert i om LPS i celleveggen til *M. capsulatus* (Bath) er noe annerledes enn hos andre Gram-negative bakterier etter en studie gjort på mennesker (Skogstad et al. 2005). Det er observert ved inkorporering av BioProtein (som hovedsakelig

består av *M. capsulatus*) i fôret til Atlanterhavslaks (*Salmo salar*), utvikles det ikke soyeboønnemel-indusert enteritt (Romarheim et al. 2011). Dempende effekter på immunsystemet er også blitt observert i mus. Kleiveland et al. 2013 observerte at det å tilsette *M. capsulatus* (Bath) i fôret til mus (C57BL/6N) med og uten DSS-indusert kolitt hadde flere effekter. Blant annet redusert sykdomsaktivitet og histologisk inflammasjon, lavere nivåer av inflammatoriske markører i tarmen, redusert infiltreringen av og aktiviteten til nøytrofile granulocytter. I tillegg ble det observert dypere krypter med et økt antall prolifererende celler (Kleiveland et al. 2013). *In vitro*-studier viser at bakterien binder sterkt til humane mo-DC. Hvilke molekyler som er involvert i bindingen er fortsatt ukjent.

M. capsulatus (Texas).

En annen metanotrof bakterie, *M. capsulatus* (Texas), har ikke dokumenterte effekt på kolitt. Denne bakterien binder heller ikke like godt til humane mo-DC. Genomalignment mellom *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) viser 93,9 % likhet (Kleiveland et al. 2012).

1.4.2.2 E. coli Nissle 1917

E. coli Nissle 1917 er en Gram-negativ, probiotisk stav bakterie. I 1917 ble *E. coli* Nissle 1917 oppdaget av Albert Nissle 1917 (Sonnenborn & Schulze 2009). Denne probiotiske bakterien har senere vist seg å ha positive helseeffekter på pasienter med inflammatorisk tarmsykdom (IBD) (Sonnenborn & Schulze 2009). *E. coli* Nissle 1917 er den aktive komponenten i Metaflor® som blant annet brukes mot dysfunksjon i tarmen (Sonnenborn & Schulze 2009). Når T-celler blir stimulert av *E. coli* Nissle 1917 ses en signifikant reduksjon i evnen til å ekspandere etter stimulering med antigen (Sturm et al. 2005). Grabig et al. har funnet ut at *E. coli* Nissle 1917 påvirker det medfødte immunsystemet via TLR2 og TLR4 signalering (Grabig et al. 2006). Sturm et al. har beskrevet at *E. coli* Nissle 1917 modulerer cellesyklus hos T-celler og proliferasjonen via TLR2 (Sturm et al. 2005).

Probiotiske bakterier ser ut til å kunne bidra i å fjerne patogene organismer fra tarmen. Disse bakteriene kan hindre vekst av Gram-positive og Gram-negative organismer ved å produsere substanser som reagerer med enkelte patogene organismer, eller ved å hindre at patogene mikroorganismer fester seg til epitelet og på den måten bidra til at de fjernes fra tarmen (Drakes et al. 2004).

1.4.3 Målet med studien

Vi blir konstant eksponert for mikroorganismer fra miljøet hvor vi befinner oss. I menneskekroppen finnes ti ganger flere bakterier enn celler (Sekirov et al. 2010), og antallet bakteriofager er ennå høyere. Hele 70 % av de lavmolekylære forbindelsene som finnes i humant serum kommer fra bakteriell nedbrytning av næringsstoffer i tarmen. Mikrobiotaen i tarmen har stor innvirkning på kroppen, og flere store forskningsprosjekter (MetaHIT og Human Microbiome Project) er satt i gang for å studere mikrobiotaen i tarm.

Målet med denne studien er å studere immunmodulerende effekter av *M capsulatus* (Bath) på humane mo-DC sammenlignet med to andre gammaproteobakterier. En nær slektning, *M. capsulatus* (Texas), og den probiotiske bakterien *E.coli* Nissle 1917, en kommensal bakterie.

2.0 Materialer og Metoder

2.1 Materialer

Vedlagt ligger utstyrliste, vedlegg 1

2.1.1 Medier til celler og bakterier

RPMI-1640 medium med føtalt kalveserum (FCS) (Modifisert RPMI)

500 ml RPMI-1640 ble tilsatt natrium pyruvat (1mM), ikke-essensielle aminosyrer (1X), gentamycin sulfat (25 µg/ml) eller penicillin-streptomycin (1X), monothioglyserol (25 µg/ml) og føtalt kalveserum (10 %).

Innfrysningsmedium til MNC

Modifisert RPMI med 20 % DMSO

LB medium til dyrking av E. coli Nissle 1917

20g LB Broth/l destillert vann. Mediet ble autoklavert.

Nitrat Mineral Salt Medium (NMS Medium) til dyrkning av M. capsulatus (Bath og Texas)

500 ml NMS medium består av 50 ml 10 x NMS (KNO₃ (0,1 g/ml), MgSO₄ X 6H₂O (0,1 g/ml), CaCl₂ (0,1 g/ml)) tilsatt 0,05 ml FeEDTA (0,038 g/ml), 0,5 ml NaMoO₄ x 2H₂O (0,26 g/l), 0,5 ml Trace elements (CuSO₄ X 5H₂O (200 g/l), FeSO₄ X 7H₂O (500 g/l), ZnSO₄ X 7H₂O (400 g/l), H₃BO₃ (15 g/l), CoCl₂ x 6H₂O (50 g/l), 0,5M EDTA dinatrium salt, MnCl₂x 4H₂O (20 g/l), NiCl₂ x 6H₂O (10 g/l) og 5 ml fosfatbuffer (Na₂HPO₄ X 10H₂O (71,6 g/l) og KH₂PO₄ (26 g/l)). pH ble justert til 6,8 med NaOH. Mediet ble sterilfiltrert.

Differensieringsmedium til CD14⁺ monocytter

Modifisert RPMI tilsatt 25 ng/ml IL-4 og 50 ng/ml GM-CSF.

Modningscocktail umodne CD14⁺ monocytt-deriverte dendritiske celler

Modifisert RPMI tilsatt 5 µg/ml PGE₂, 15 ng/ml TNF-α og 100 ng/ml LPS

Isoleringsbuffer CD14⁺ monocytter

PBS med 1,5 % BSA og 2mM EDTA. Løsningen ble sterilfiltrert.

2.1.2 Løsninger til prøvepreparering for væskestrømscytometriske analyser

Blokkeringsløsning

PBS med 5 % FCS da overflatemarkører ble detektert og PBS med 2 % FCS ble brukt til blokkering ved deteksjon av transkripsjonsfaktorer i T-celler.

2.2 Metoder

Isolering av mononukleære celler (MNC) fra Buffy Coat

En buffy coat ble fordelt likt på fire sentrifugerør (50 ml) som inneholdt 25 ml PBS (steril). Det ble tilsatt 10 ml Lymphoprep[®] i bunnen av hvert av rørene ved hjelp av en sprøyte og hestekanyle. Rørene ble sentrifugert ved 350 rcf i 20 minutter uten brems. Etter sentrifugering ligger MNC i sjiktet over Lymphoprep[®]. MNCene ble overført til nye rør og vasket med RPMI medium til det meste av tromocytterne var fjernet. Cellene ble talt med Beckmann Coulter Z1, resuspendert i innfrysningsmedium og modifisert RPMI, fordelt på ampuller og fryst inn ved -80°C og overført til nitrogentanken dagen etter.

Isolering av CD14⁺ monocytter ved bruk av MircoBeads og differensiering til umodne dendritiske celler

Fryste MNC ble tint og overført til sentrifugerør med modifisert RPMI, og sentrifugert (350 rcf, 10 minutter). Cellene ble talt og resuspendert i 80 µl isoleringsbuffer/10⁷ celler, videre ble det tilsatt 20 µl MicroBeads/10⁷. Celler og MicroBeads ble inkubert 15 minutter på is (4 °C). Cellene ble vasket med 5-6 ml isoleringsbuffer, sentrifugert og resuspendert i 500 µl isoleringsbuffer/10⁸ celler. Til isoleringen ble MACS Separation Columns samt ekstra filtre, Pre- Separation Filter, benyttet. Kolonnen ble festet i en magnet, og det ble satt et oppsamlingsrør under kolonnen. Kolonnene ble ekvilibrert med 500 µl isoleringsbuffer, deretter ble cellene tilsatt, før kolonnen ble vasket med 500 µl isoleringsbuffer x 3. Cellene ble eluert ved å ta kolonnen ut av magneten, plassere den over et nytt oppsamlingsrør og

deretter ble det tilsatt 1 ml isoleringsbuffer. Et stempel ble deretter presset ned i kolonnen slik at den tilsatte isoleringsbufferen og cellene i kolonnen ble eluert ut. De CD14⁺ cellene ble platet ut med en tetthet på $1,5-2 \cdot 10^6$ celler/brønn på en 24-brønners plate. Deretter ble de inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i seks døgn før cellene ble modnet. Differensieringsmediet ble byttet på dag tre.

Isolering av monocytter ved adheranse til plast og differensiering

MNC ble tint, vasket i modifisert RPMI og telt for så å bli platet ut med en tetthet på $6-7 \cdot 10^6$ celler/brønn på en 24-brønners plate. Platen ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ natten over. Dagen etter ble mediet fjernet. Celler som ikke hadde adherert til plasten ble vasket ut med 1 ml modifisert RPMI/brønn. Det ble dunket litt på sidene av platen for at celler som ikke hadde adherert ordentlig til plasten skulle løsne. Deretter ble det tilsatt 1 ml med differensieringsmedium/brønn og cellene ble inkubert videre i seks døgn. Differensieringsmediet ble byttet på dag tre.

Preparering av prøver til væskestrømscytometri

DCene ble vasket med PBS (1 ml/brønn), tilsatt trypsin-EDTA (200 µl/brønn) og inkubert noen minutter ved 37 °C og 5 % CO₂. Da 2/3 av cellene hadde løsnet fra plasten ble det tilsatt 1-2 ml modifisert RPMI til hver av brønnene. Mo-DCene ble overført til 15 ml sentrifugerør, sentrifugert (350 rcf, 10 minutter), resuspendert og talt. Mo-DCene ble sentrifugert, og pelleten ble resuspendert i modifisert RPMI og ble platet ut i en 96-brønners plate (V-format) (100 000 – 200 000 mo-DC/brønn). 96-brønners platen ble sentrifugert (350 rcf, 3 minutter) og vasket x 3 med PBS (200 µl/brønn). Deretter ble det tilsatt 100 µl blokkeringsløsning og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur. Videre ble blokkeringsløsningen fjernet før cellene ble inkubert med direkte konjugerte antistoff (20 µl/brønn eller 5 µl/brønn + 15 µl PBS, avhengig av produsent) i en time ved romtemperatur. Deretter ble mo-DC vasket med PBS x 3 før de ble fiksert i 20 minutter med 4 % paraformaldehyd (200 µl/brønn) ved romtemperatur. Deretter ble prøvene analysert med et MACSQuant Analyser væskestrømscytometer.

Modning og stimulering av DC

Etter differensiering ble brønnene med DCer som skulle modnes tilsatt modningscocktail eller en av bakteriene *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917. Det ble tilsatt 10^8 bakterier/brønn. Av *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) ble det laget en suspensjon fra en overnattekultur med OD $0,27 \pm 0,02$ ved bølgelengde, $\lambda = 440$ nm i modifisert RPMI målt på et Shimadzu UV-160A spektrofotometer. *E. coli* Nissle 1917 ble preparert som beskrevet under «inaktivering av *E. coli* Nissle 1917». DCene ble inkubert ved 37°C med 5 % CO_2 i 20 timer.

Inaktivering av E. coli Nissle 1917

En overnattekultur av *E. coli* Nissle 1917 ble spunnet ned ved 3345 rcf i 10 minutter, og deretter vasket to ganger med PBS. Videre ble det laget en suspensjon med bakterier (10^8 bakterier/ml) i modifisert RPMI. For å finne riktig antall bakterier ble det brukt et Shimadzu UV-160A spektrofotometer hvor OD ble justert til OD = $0,22 \pm 0,02$ ved $\lambda = 600$ nm. 15 ml av bakteriesuspensjonen ble overført til en petriskål og UV-bestrålt i 60 minutter i GelDoc 1000 for bakteriell inaktivering.

Undersøkelse av RALDH enzymer ved ALDFLOUR

Protokollen i pakningsvedlegget ble fulgt. For mo-DC ble det ved titrering funnet at ved en cellekonsentrasjon på $3 \cdot 10^5 - 4 \cdot 10^5$ gav størst forskjell mellom farget og ufarget prøve. Denne cellekonsentrasjonen ble derfor brukt videre i forsøk. Ulike inkuberingstider ble også testet, og inkubering i 60 minutter ved 37°C gav det beste resultatet.

Tilpasset blandet lymfocytreaksjon (MLR)

$1 \cdot 10^4$ CD14⁺ monocytter/brønn ble platet ut i en 96-brønners plate. Cellene ble differensiert i fem døgn hvor differensieringsmediet ble byttet halvveis. Bakterier; *M. capsulatus* (Bath) OD: $0,027 \pm 0,02$ (10^8 bakterier/ml), *M. capsulatus* (Texas) OD: $0,027 \pm 0,02$ (10^8 bakterier/ml), og *E. coli* Nissle 1917 OD: $0,022 \pm 0,02$ (10^8 bakterier/ml), samt modningscocktail og modifisert RPMI ble tilsatt på dag fem. T-celler ble tilsatt på dag seks, $1 \cdot 10^5$ T-celler/brønn. Ko-kultiveringen mellom mo-DCene, bakterier/modningscocktail og

T-celler ble inkubert i fem døgn før det ble tilsatt 0,005 mCi thymidin/brønn. Etter 24 timer ble platen høstet.

Isolering av T-celler ved hjelp av nylonsøyle

Nylonsøylen ble fuktet med modifisert RPMI. Deretter ble det tilsatt modifisert RPMI med MNC til kolonnen. MNC ble inkubert på nylonsøylen i 30-40 minutter ved 37 °C. Etter inkubering ble T-cellene eluert med noen ml med modifisert RPMI.

Detektering av transkripsjonsfaktorer i prolifererende T-celler

CD14⁺ monocytyter ble platet ut i en 24 brønners plate med en tetthet på $1 \cdot 10^5$ celler/brønn og differensiert i fem døgn hvor differensieringsmediet ble byttet halvveis i inkuberingstiden. På dag fem ble det tilsatt bakterier (*M. caspulatus* (Bath), *M. caspulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917) og modningscocktail. På dag seks ble det tilsatt $1 \cdot 10^6$ T-celler/brønn. Etter inkubering med T-celler i fem døgn ble supernatanten med T-celler høstet og transkripsjonsfaktorer i T-cellene ble detektert med fluorokrom-konjugerte antistoff. For å oppnå et optimalt resultat ble protokollen «one-step protocol: intracellular (nuclear) proteins» benyttet. Ulikt fra protokollen var serumet for blokkering. Det ble brukt FCS og ikke mus eller rotteserum.

Preparering av prøver til Sveipeelektronmikroskopi (SEM)

CD14⁺ monocytyter ble platet ut på filter innsatser ($5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ celler/ filterinnsats) som ble satt i brønner på en 24-brønners plate. Cellene ble differensiert på filteret i seks døgn hvor differensieringsmediet ble byttet på dag tre. Under differensieringen sto filterene i brønner med differensieringsmedium, men kun differensieringsmediet i filterkoppene ble byttet.

Etter inkubering med bakterier ble cellene ble først vasket 4-5 ganger med PBS for å vaske vekk overflødig bakterier. Deretter ble de fiksert i 30 minutter med 4 % paraformaldehyd i PBS. Mo-DC ble vasket x 2 med PBS før dehydrering. Først ble cellene tilsatt 50 % EtOH i PBS i 3 x 5 minutter, deretter 3 x 5 minutter med 70 % EtOH i PBS, og tilslutt 2 x 5 minutter absolutt etanol. Mo-DC ble oppbevart i absolutt etanol til kritiskpunkt tørkingen fant sted.

Under kritiskpunkt tørkingen ble absolutt EtOH byttet gradvis ut med CO₂ (l). Da all alkoholen var byttet ut med CO₂ (l), ble trykket redusert og temperatur økt slik at CO₂(l) ble CO₂(g). Filtrene fra filterinnsatsene ble skåret ut, overført til aluminiumstubber, dekket med gull/palladium og tatt bilde av. Også de modnede cellene ble det tatt bilde av. Disse cellene ble differensiert i seks døgn og modnet i ett døgn før de ble inkubert tre timer med bakterier.

Enzym-Linked Immunosorbent Assay, ELISA

Supernatant fra mo-DC ble avpippetert etter modning i 20 timer, og cytokinprofilen ble undersøkt ved hjelp av ELISA. Anbefalt prosedyre fra leverandørene for de ulike ELISA-kitene ble fulgt frem til fremkalling. Til fremkalling ble det brukt 100 µl/brønn av en løsning bestående av 12,5 ml ABTS (90 mg/ml i natriumacetat) og 10 µl 3 % H₂O₂. Reaksjonene ble ikke stoppet. ELISA-platene ble lest av når OD for standarden med høyest konsentrasjon hadde en verdi på ca 1,2. For IL-6 ble parede antistoff fra ImmunoTools benyttet, og for IL-10 og IL-12 deteksjon ble kitene IL-10 900-K21 og IL-12 900-K96 fra PeproTech benyttet.

3.0 Resultat

3.1 Isolering av celler

Positiv seleksjon med MicroBeads® og adhesjon til plast er to metoder for isolering av monocytter. Utbyttet og fenotypen til celler isolert ved de to metodene ble undersøkt. Både umodne og modne mo-DC ble undersøkt for ekspresjon av overflatemarkørene som er viktige i aktiveringen av T-celler. De ko-stimulatoriske molekylene CD80 og CD86, modningsmarkøren CD83, HLA klasse II-molekyler og CD1a som presenterer antigen for T-celler. I tillegg ble CD11c, en markør for myeloide celler, og CD141, markører for en subpopulasjon av myeloide DC, detektert. Umodne mo-DC ble sammenlignet med mo-DC modnet med en modningscocktail bestående av LPS, PGE2 og TNF- α .

Fenotypisk var cellene isolert med de to metodene nokså like, og kun en markør var avvikende etter modning. En økt ekspresjon av CD141 ble observert etter modning i cellene isolert med MicroBeads, mens ekspresjonen var uendret hos cellene isolert ved direkte adhesjon til plast. Et lavere utbytte av isolerte celler ble observert ved direkte adhesjon til plast.

Andelen CD14⁺ celler ble sammenlignet i cellepopulasjonene isolert ved de to metodene. Mononukleære celler (MNC) isolert fra buffy coat ble farget med fluorokrom-konjugerte antistoffer mot CD14. Kun 7 % av de MNCene var CD14⁺. Etter isolering ved adhesjon til plast var 10 % av cellene CD14⁺. Supernatanten som ble fjernet før differensieringstrinnet ble funnet å inneholde 5 % CD14⁺ celler. Utbyttet av CD14⁺ celler isolert ved bruk av MicroBeads fra samme blodgiver var 41 %. Cellene isolert ved MicroBeads® har isoleringspartikler bundet til CD14-molekylene på overflaten. Dette vil trolig påvirke deteksjonen av CD14⁺ celler med anti-CD14 antistoffer. Det er derfor stor mulighet for at dette fører til falske negative celler.

På bakgrunn av dårlig utbytte etter isolering ved direkte adhesjon til plast ble det besluttet å isolere CD14⁺ monocytter ved bruk av MicroBeads videre i arbeidet. Fra leverandøren er det oppgitt at binding til CD14-molekylene ikke påvirker cellene, da CD14 ikke har noe intracellulært domene.

3.2 Ekspresjon av overflatemarkører på mo-DC

For å undersøke om ko-kultivering med bakterier påvirket mo-DCers funksjon som APC, ble endring i ekspresjon av de samme overflatemolekylene som ved isoleringsforsøket detektert. Umodnede mo-DC var negativ kontroll, og positiv kontroll var mo-DC ko-kultivert med modningscocktail (LPS, TNF- α og PGE2). Endringer i ekspresjon av overflatemolekyler ble undersøkt på mo-DC etter 20 timer ko-kultivering med bakteriene; *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917. Figur 3-1 og 3-2 viser representative resultater for hver av de undersøkte overflatemolekylene.

Økt ekspresjon av HLA klasse II-molekyler.

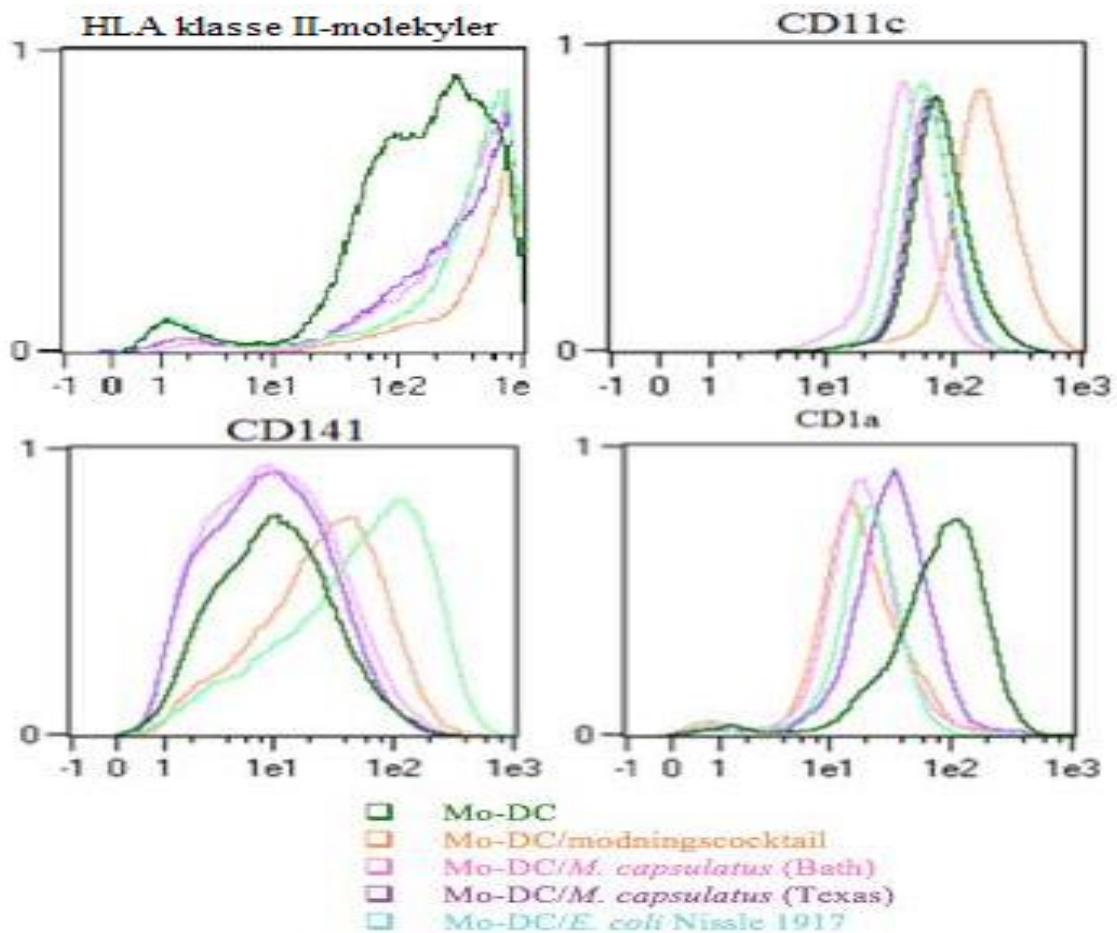
Ko-kultivering med bakterier fører til en økt ekspresjon av HLA klasse II-molekyler (figur 3-1). Ekspresjonen er undersøkt i tre oppsett med CD14⁺ monocyttler hentet fra tre ulike blodgivere. Bakteriene øker ekspresjonen av HLA klasse II-molekyler på mo-DC i like stor grad, og det er ikke observert noen individuelle variasjoner mellom oppsettene.

Ekspresjonen av CD11c påvirkes ulikt av bakterier og modningscocktail.

Markøren ble undersøkt i fire oppsett. Det er individuelle variasjoner mellom oppsettene, men i alle oppsett observeres en økt ekspresjon etter behandling med modningscocktail. Ko-kultivering med bakterier endrer ikke ekspresjonen av CD11c (figur 3-1).

***E. coli* Nissle 1917 øker ekspresjon av CD141.**

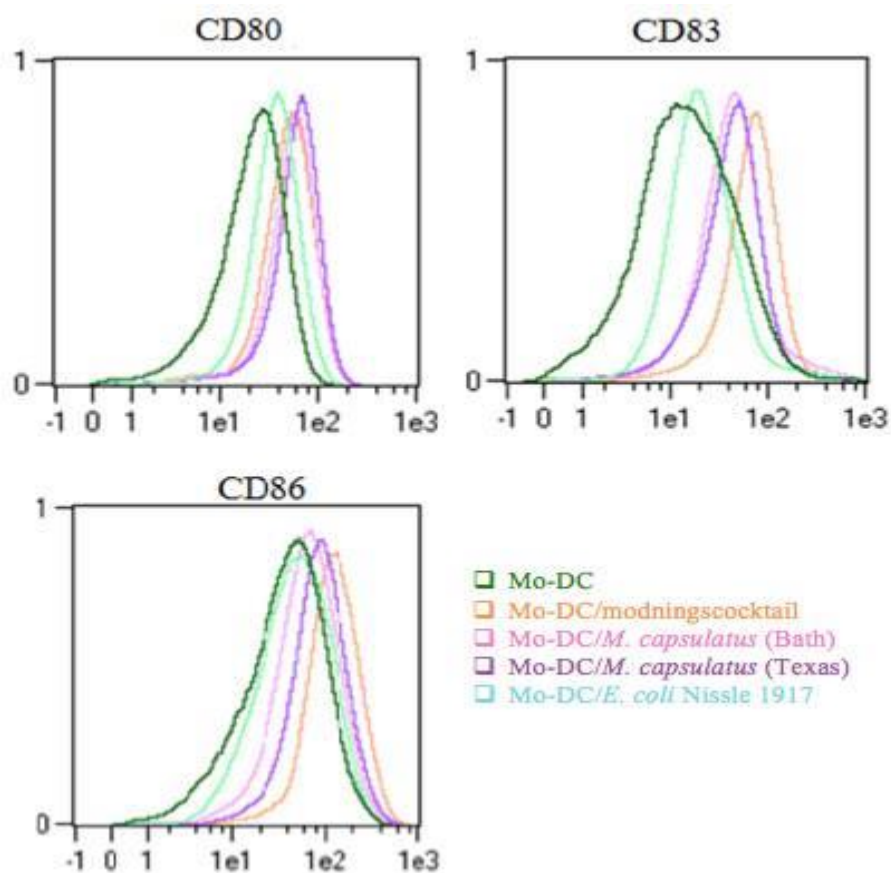
CD141 blir oppregulert på mo-DC stimulert med *E.coli* Nissle 1917 og modningscocktail. Ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917 fører til størst økning i ekspresjonen av CD141. *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) påvirker ikke ekspresjonen (figur 3-1).



Figur 3-1: Endring i ekspresjon. Endring i ekspresjon av overflatemolekylene HLA klasse II, CD11c, CD141 og CD1a etter ko-kultivering med bakteriene *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917, modningscocktail (LPS, PGE2 og TNF- α) og modifisert RPMI i 20 timer. Histogrammene som er presentert er et representativt utvalg fra 3-4 oppsett med mo-DC derivert fra CD14⁺ monocyttter fra forskjellige blodgivere.

Nedregulering av CD1a.

Som vist i figur 3-1 virker ko-kultivering med bakteriene og modningscocktailen negativt på ekspresjonen av CD1a. Mo-DC fra tre ulike blodgivere er undersøkt, og graden av nedreguleringen varierer hos de ulike blodgiverne. Tendensen i de tre oppsettene er at ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) nedregulerer ekspresjonen i like stor grad som positiv kontroll. Ko-kultivering med *M. capsulatus* (Texas) gir også en nedregulering, men markøren nedreguleres ikke like mye som etter ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath). Ekspresjonen av CD1a nedreguleres etter ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917, men graden av nedregulering varierer mellom oppsettene.



Figur 3-2: Endring i ekspresjon av overflatemarkører. Ekspresjonen av CD80, CD83 og CD86 øker etter ko-kultivering med bakteriene *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas). Ko-kultivering *E. coli* Nissle 1917 gir liten økning i ekspresjonen av CD80, men ingen endring i ekspresjonen av CD83 og CD86. Histogrammene viser representative resultater av fire ulike oppsett som er studert. Det er benyttet CD14⁺ monocyttter fra forskjellige blodgivere i de fire oppsettene.

Økt ekspresjon av CD80 etter ko-kultivering med bakteriene og modningscocktailen.

En økt ekspresjon av CD80 ble observert på mo-DC etter ko-kultivering med bakterier. CD80 ekspresjon etter ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917 varierer, men er økt i alle fire oppsettene. Etter ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) øker ekspresjonen av CD80 like mye som ved inkubering med modningscocktailen (figur 3-2).

CD86 oppreguleres i mindre grad enn CD80.

En økt ekspresjon av CD86 observeres etter ko-kultivering med bakteriene. *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) øker CD86 ekspresjonen i like stor grad som modningscocktailen. Økningen i CD86 ekspresjonen er mindre enn økningen i ekspresjonen

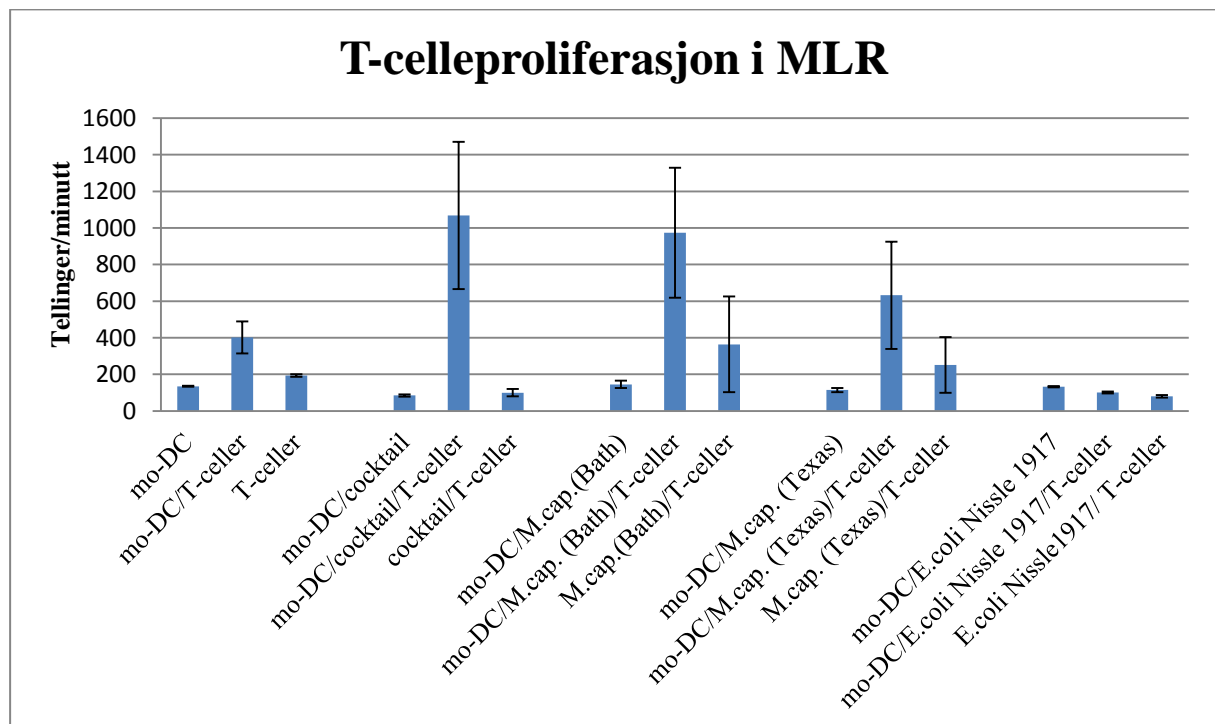
av CD80 (figur 3-2). Ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917 gir ingen endring i CD86 ekspresjonen i de fire oppsettene som er gjennomført.

Økt CD83 ekspresjon.

En kraftig økning i ekspresjonen av CD83 observeres etter 20 timer inkubering med modningscocktailen. Ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) gir også en økning i ekspresjonen, men ikke i like stor grad som den positive kontrollen. Vi finner ingen endring i CD83 ekspresjonen etter ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917 (figur 3-2).

3.3 Blandet lymfocytt reaksjon, MLR

Det ble det satt opp en tilpasset MLR for å undersøke om endringer i ekspresjon av overflatemarkører etter ko-kultivering med de ulike bakteriene påvirket mo-DCers evne til å indusere en T-celle respons. Gjennomsnittet med standardfeil av gjennomsnittet (SFG) av T-celleproliferasjonen fra tre oppsett er presentert i figur 3-3.

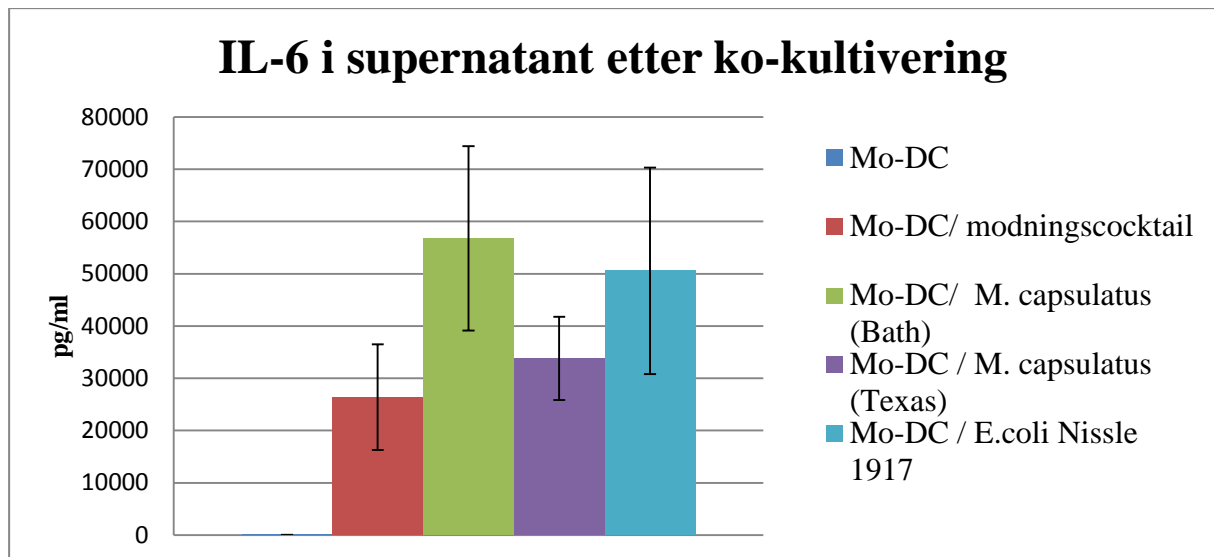


Figur 3-3: T-celleproliferasjon i en tilpasset MLR (gjennomsnitt ± SFG). Mo-DCene ble etter ko-kultivering med bakterier, modningscocktail og modifisert RPMI tilsatt T-celler med forholdet 1:10. Etter fem dager ble cellene pulset med thymidin, og etter ytterligere 24 timer ble thymidininkorporeringen målt. Ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) induserte størst endring i T-celleproliferasjonen av de ulike bakteriene. *E. coli* Nissle 1917 induserer ikke T-celle proliferasjon. Ingen av forskjellene er statistisk signifikante ($P > 0,05$).

Når lymfocytter fra forskjellige personer blandes i en MLR, induseres T-celleproliferasjon på bakgrunn av HLA-uforlikelighet. CD14⁺ monocytter ble differensiert for deretter å bli ko-kultivert med bakterier. Etter et døgn i ko-kultur med bakterier eller modningscocktail, ble mo-DC tilsatt T-celler i et 1:10 forhold. Mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) gir høyest T-celle proliferasjon av bakteriene med en 5 x økning av T-celleproliferasjon sett i forhold til bakgrunnen (mo-DC og T-celler). Mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Texas) øker T-celleproliferasjonen 3 x sett i forhold til bakgrunnen. T-celleproliferasjonen halveres etter ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917. Det ble utført en T-test som ga $p > 0,05$ i T-celleproliferasjonen mellom mo-DC ko-kultivert med de ulike bakteriene. Det er derfor ingen signifikante forskjeller i T-celleproliferasjonen i de aktiverte T-cellene.

3.4 Cytokinprofiler detektert ved ELISA

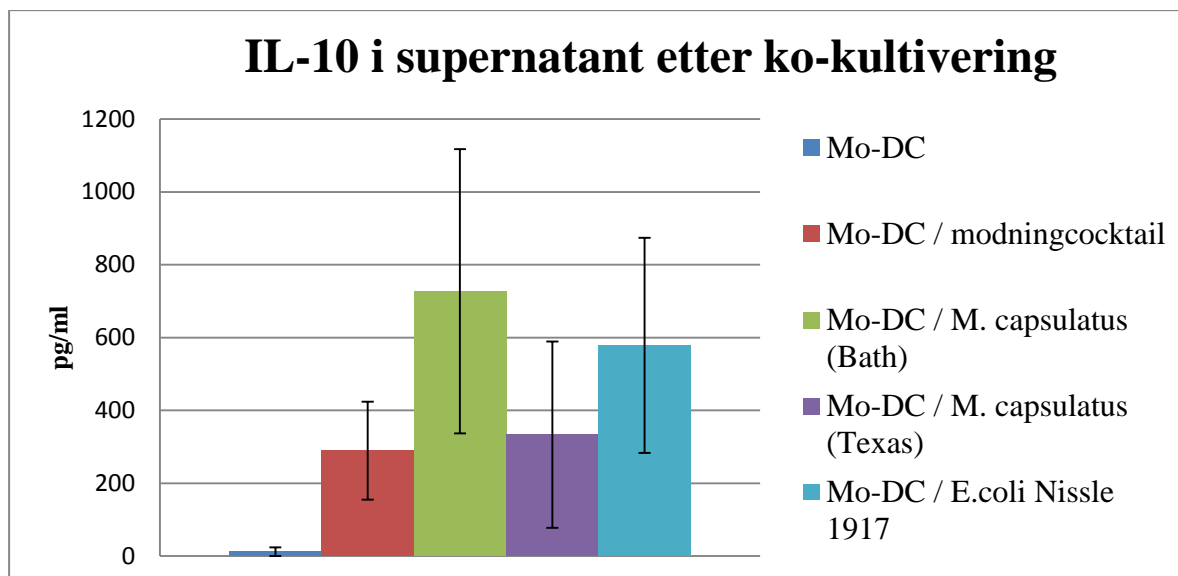
Cytokiner sekreses av mo-DC som et resultat av bakteriell påvirkning. I arbeidet med å kartlegge de immunmodulerende effektene *M. capsulatus* (Bath) har på humane mo-DC, ble det detektert cytokiner i supernatant etter ko-kultivering mellom mo-DC og bakteriene. Da det ble påvist at T-celler proliferer når de kom i kontakt med mo-DC som er blitt ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath og Texas), var det interessant å detektere cytokiner for å få en idé om hvilken subpopulasjon de prolifererende T-cellene tilhørte. IL-6 er et cytokin som fungerer som vekstfaktor for T-celler og fremmer differensieringen av Th17-celler (Luckheeram et al. 2012), IL-12 er et cytokin som polariserer T-celler i en Th1 retning, og IL-10 er et cytokin som er med i reguleringen av immunresponser (Saraiva & O'Garra 2010). Resultatene presentert i figurene 3-4, 3-5 og 3-6 er gjennomsnittet av flere oppsett med SFG.



Figur 3-4: Sekresjon av IL-6. Mengden IL-6 (gjennomsnitt \pm SFG) i supernatant fra mo-DC etter ko-kultivering med bakterier, modningscocktail og modifisert RPMI. Det er ingen signifikante forskjeller i sekresjonen hos de mo-DCene etter ko-kultivering med de ulike bakteriene da er $p > 0,05$. Resultatene vist i denne figuren er gjennomsnittet fra seks til ti ulike oppsett med mo-DC fra ulike blodgivere.

Alle mo-DC som hadde blitt ko-kultivert med bakterier sekret IL-6. Mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) sekret 57 ng/ml, mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Texas) sekret 34 ng/ml og mo-DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 sekret 51 ng/ml IL-6. T-tester viser at det ikke er noen statistisk signifikante forskjeller i mengden IL-6 sekret etter ko-kultivering med de ulike bakteriene.

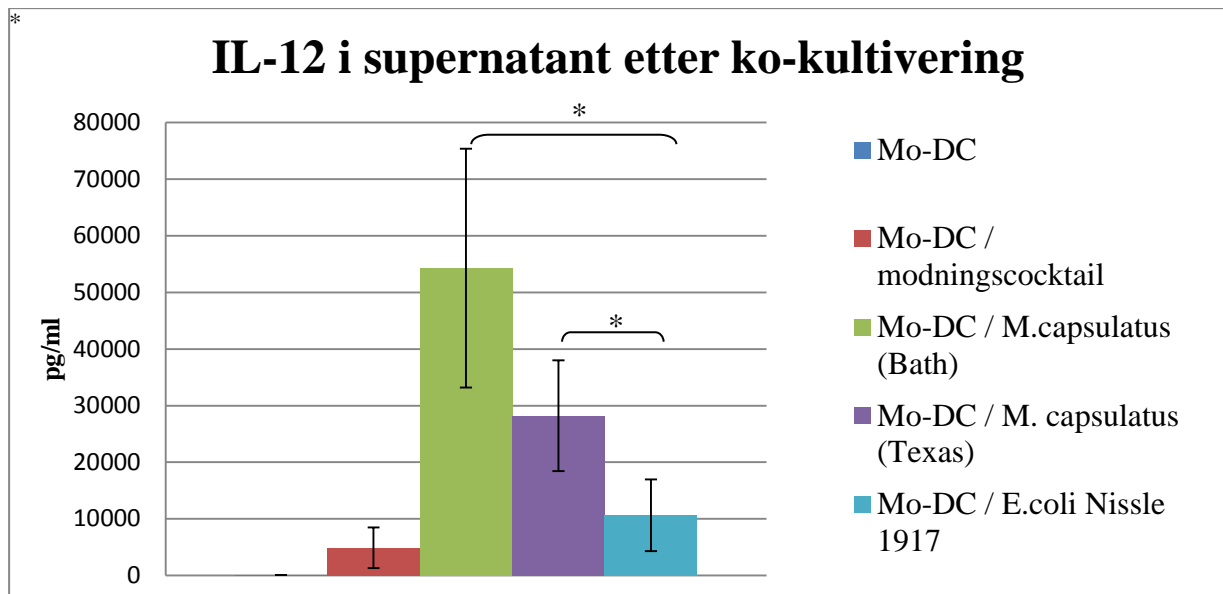
Basert på observasjoner fra dyreforsøk hvor *M. capsulatus* (Bath) ser ut til å ha en anti-inflammatorisk effekt (Kleiveland et al. 2013; Romarheim et al. 2013) ble det besluttet å detektere IL-10 i supernatant etter ko-kultivering mellom bakterier og mo-DC. IL-10 er et cytokin som er med i reguleringen av ulike immunresponser da det undertrykker proinflammatoriske responser og begrenser skade på vevet under inflammasjon (Luckheeram et al. 2012).



Figur 3-5: Sekresjon av IL-10. Mengden IL-10 (gjennomsnitt \pm SFG) detektert i supernatant fra ni til ti ulike oppsett med hvor mo-DC er derivert fra CD14⁺ monocytt fra ulike blodgivere. Det er ingen signifikante forskjeller i sekresjonen av IL-10 da $p > 0,05$.

Mengden (pg/ml) IL-10 sekret er lavere enn mengden (pg/ml) IL-6 og IL-12 for alle mo-DC. Søylediagrammet i figur 3-5 angir IL-10 sekret etter ko-kultivering med de ulike bakteriene, og viser samme «mønster» som søylediagrammet for sekresjon av IL-6. Ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) gir høyest sekresjon (727 pg/ml), etterfulgt av *E. coli* Nissle 1917 (579 pg/ml) og *M. capsulatus* (Texas) (333 pg/ml). For IL-10 er det ingen signifikante forskjeller i sekresjonen hos de ko-kultiverte mo-DCene etter ko-kultivering med bakterier da T-tester gav $p > 0,05$.

Da det ble detektert lave verdier av IL-10, og teorien om en regulatorisk T-cellerespons ble svekket, ble det undersøkt om IL-12 var til stede i de samme supernatantene. IL-12 er et viktig cytokin i polariseringen av CD4⁺ T-celler i en Th1 retning. Det er ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) som får mo-DC til å sekreere mest IL-12 (54 ng/ml). Forholdet mellom mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917 er endret. Etter ko-kultivering med *M. capsulatus* (Texas) sekreerer mo-DC 28 ng/ml, i motsetning til mo-DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 som sekreerer 11 ng/ml, se figur 3-6. Det er ikke en signifikant forskjell i mengden IL-12 sekret av mo-DC etter ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas). Det er en statistisk signifikant forskjell i mengden IL-12 som er sekret etter ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath og Texas) sett i forhold til mengden IL-12 sekret etter ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917 ($p < 0,05$).

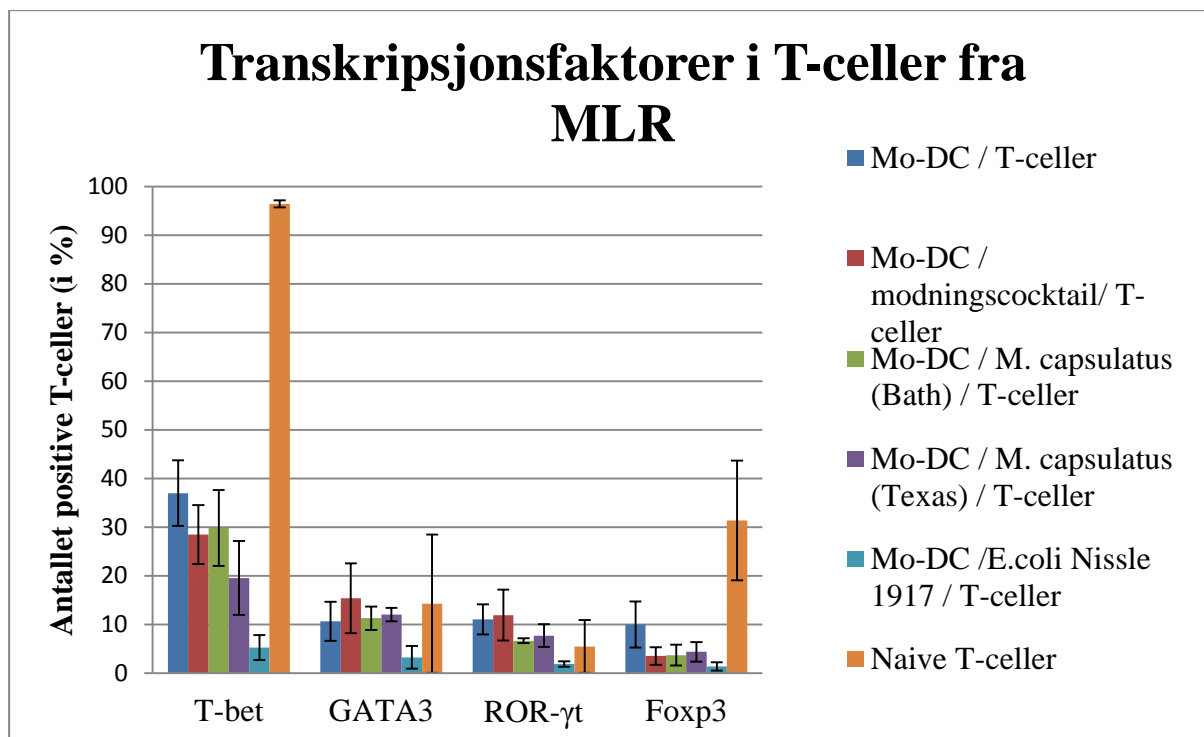


Figur 3-6: Sekresjon av IL-12. Mengden IL-12 i fire til ti oppsett (gjennomsnitt \pm SFG). Forskjell i sekresjonen mellom mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) sett i forhold til mo-DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 da $*p < 0,05$.

De mo-DCene ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) sekretet mest av alle de detekterte cytokinene. Mo-DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 sekretet mer IL-6 og IL-10 enn mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Texas). Det ble detektert signifikant mindre IL-12 etter ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917 enn etter ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath og Texas). Dataene som er presentert i figur 3-4, 3-5 og 3-6 er et gjennomsnitt fra flere blodgivere, og på grunn av store individuelle variasjoner er det store standardavvik.

3.5 Transkripsjonsfaktorer i prolifererende T-celler

På bakgrunn av cytokinprofilen i supernatantene, samt MLR resultatene som viste at mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) induiserte en T-cellerespons, ville vi undersøke hvilke subpopulasjoner de prolifererende T-cellene tilhørte. Dette ble gjort ved å undersøke ekspresjonen av transkripsjonsfaktorene T-bet, Foxp3, ROR- γ t og GATA3. Resultatet vist i figur 3-7 er gjennomsnittet av tre oppsett med SFG. Naive T-celler ble også undersøkt slik at endringer i aktive transkripsjonsfaktorer før og etter aktivering i MLR skulle være mulig å observere.



Figur 3-7: Aktive transkripsjonsfaktorer i T-celler fra tilpasset MLR. Antallet T-celler (%) som er positive for de ulike transkripsjonsfaktorene i naive T-celler, T-celler i kultur med negativ og positiv kontroll og i kultur med mo-DC etter ko-kultivering med bakterier (gjennomsnitt \pm SFG). For T-bet er det en statistisk signifikant forskjell i antallet positive T-celler mellom de naive og T-cellene ko-kultivert med mo-DC og bakterier, modningscocktail eller modifisert RPMI.

T-bet er den dominerende transkripsjonsfaktoren. Antallet T-bet⁺ T-celler synker fra 97 % hos de naive T-cellene til 37 % etter ko-kultivering med mo-DC. Etter ko-kultivering med modningscocktail synker antallet T-bet⁺ T-celler ytterligere til 28 %. Antallet T-bet⁺ T-celler ko-kultivert med mo-DC og *M. capsulatus* (Bath) var 30 %, 20 % T-bet⁺ T-celler etter ko-kultivering med mo-DC og *M. capsulatus* (Texas) og 5 % T-bet⁺ T-celler etter ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917. Det er statistisk signifikant forskjell mellom antallet T-bet⁺ T-celler i de naive T-cellene og de T-cellene som er ko-kultivert med mo-DC og bakterier, modningscocktail, eller modifisert RPMI da $p < 0,05$.

For GATA3 er det kun statistisk signifikans mellom T-celler ko-kultivert med mo-DC og *E. coli* Nissle 1917 og T-celler ko-kultivert med mo-DC og *M. capsulatus* (Texas) ($p = 0,03$).

For ROR- γ t er det statistisk signifikant forskjell i antallet positive T-celler etter ko-kultivering med mo-DC og T-celler ko-kultivert med mo-DC og *E. coli* Nissle 1917 ($p=0,04$). Det er også en signifikant forskjell mellom T-celler ko-kultivert med mo-DC og *E.coli* Nissle 1917 og T-celler ko-kultivert med mo-DC og *M. capsulatus* (Bath) ($p= 0,003$).

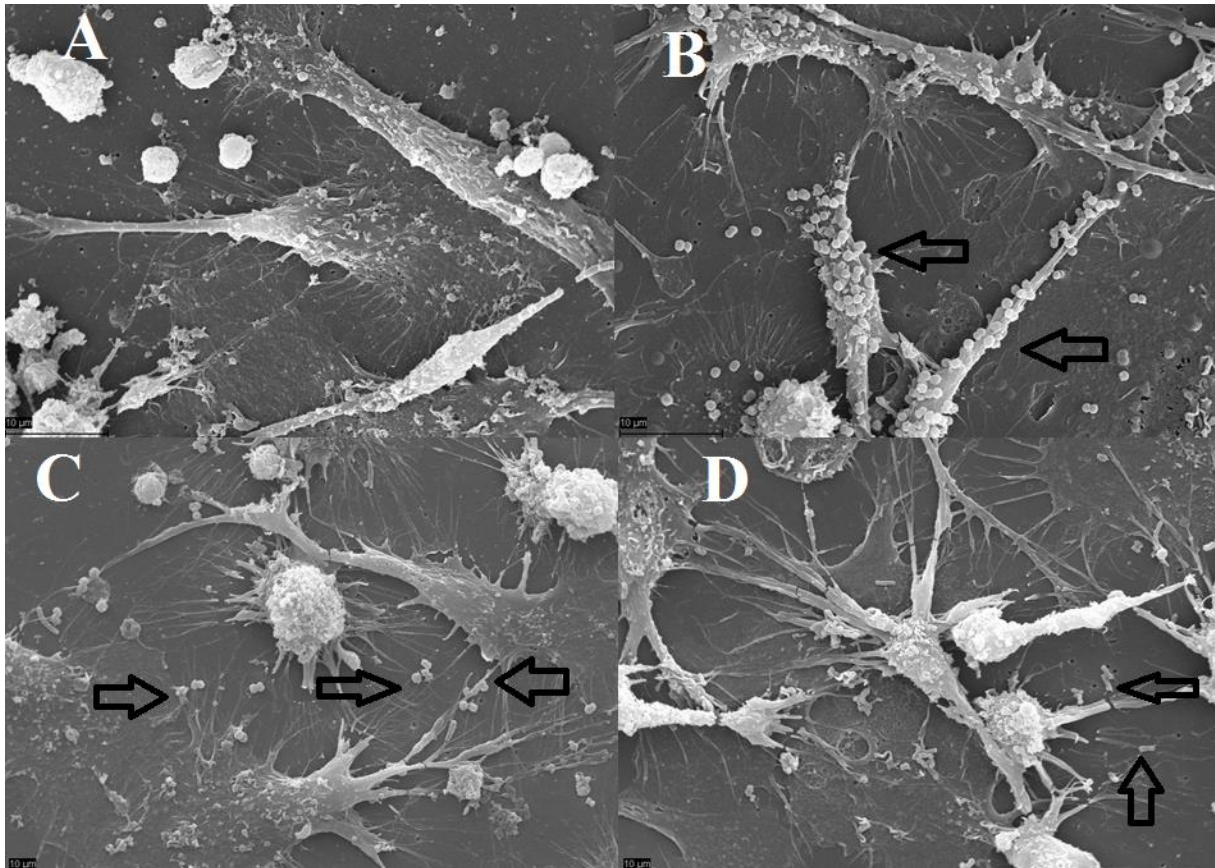
Ingen signifikante forskjeller mellom antallet Foxp3⁺ T-celler detekteres.

3.6 Ekspresjon av RALDH enzymer

For utvikling av toleranse i tarmen er vitamin A metabolitten RA viktig. For å finne ut om ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) har noen sammenheng med aktiviteten til enzymene nødvendige i vitamin A metabolismen, ble RALDH enzymaktiviteten målt. Det ble gjort seks oppsett med mo-DC fra ulike blodgivere, men ingen tendens ble observert. *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) påvirker enzymaktiviteten i lignende grad, men hvordan enzymaktiviteten hos de ko-kultiverte mo-DCene er i forhold til positiv og negativ kontroll varierer mellom oppsettene. For mo-DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 observeres ingen tendens i forhold til positiv og negativ kontroll eller i forhold til mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas).

3.7 Binding av *M. capsulatus* (Bath) til mo-DC

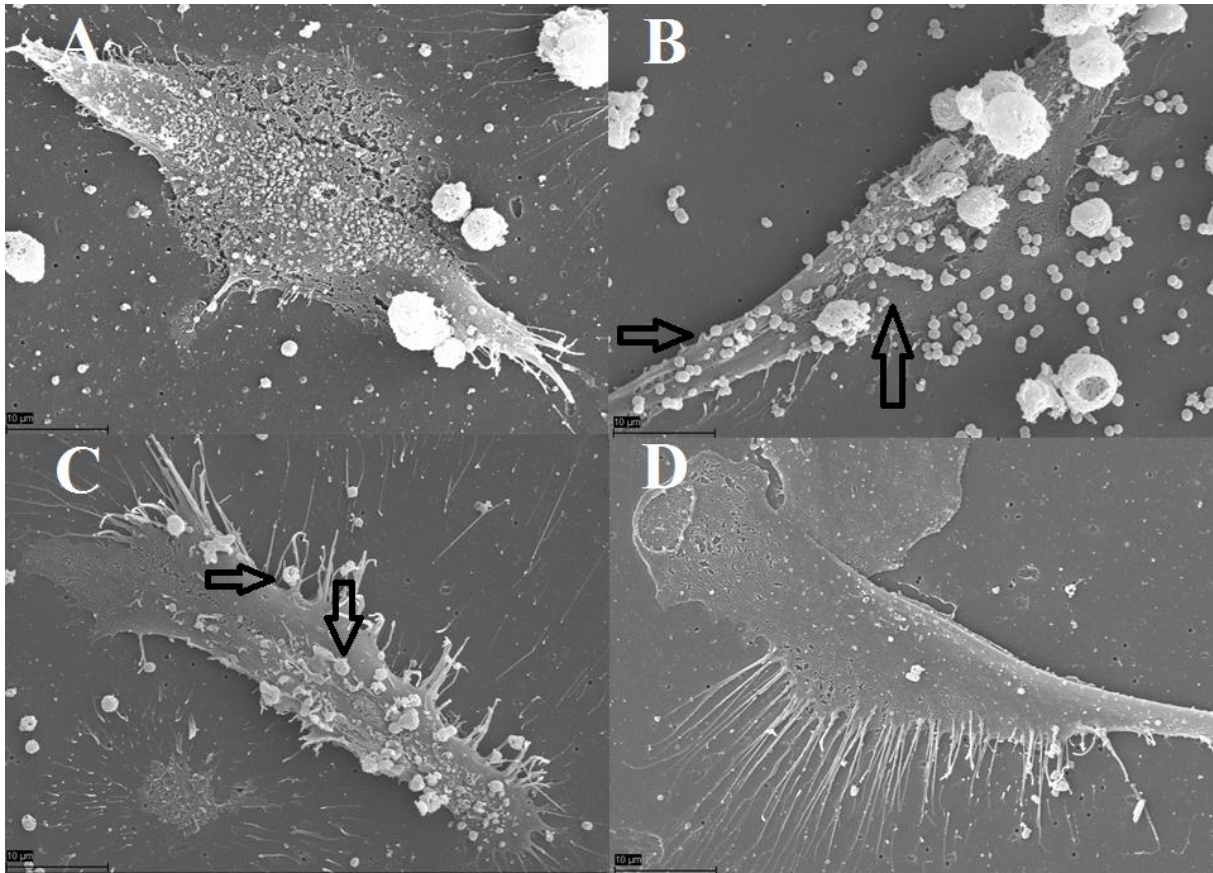
Tidligere undersøkelser har vist at *M. capsulatus* (Bath) binder sterkt til humane mo-DC. Nye SEM-bilder ble tatt i forbindelse med denne studien for å reprodusere disse resultatene. Det ble også tatt SEM bilder av modnede mo-DC etter inkubering med bakterier for å se om modningsprosessen påvirket binding mellom mo-DC og *M. capsulatus* (Bath).



Figur 3-8: SEM-bilder av mo-DC med og uten bakterier etter tre timer inkubering. A mo-DC uten bakterier, **B** mo-DC inkubert med *M. capsulatus* (Bath), **C** mo-DC inkubert med *M. capsulatus* (Texas), **D** mo-DC inkubert med *E. coli* Nissle 1917

SEM-bildene i figur 3-8 bekrefter at *M. capsulatus* (Bath) binder sterkt til humane mo-DC, og at *M. capsulatus* (Texas) binder i mye mindre grad. *E. coli* Nissle 1917 binder ikke de mo-DCene.

For å se om modning med modningscocktail hadde noe påvirkning på bindingen mellom mo-DC og *M. capsulatus* (Bath), ble mo-DC modnet ett døgn med modningscocktail før bakteriene ble tilsatt og inkubert i tre timer. Figur 3-9 viser SEM-bilder av de modne mo-DCene med og uten tilsatte bakterier.



Figur 3-9: SEM-bilder av modne mo-DC tilsatt bakterier. Mo-DC ble modnet ett døgn med modningscocktail før cellene ble inkubert med bakterier i tre timer. **A** modnede mo-DC uten bakterier, **B** modnede mo-DC inkubert med *M. capsulatus* (Bath), **C** modnede mo-DC inkubert med *M. capsulatus* (Texas), **D** modnede mo-DC inkubert med *E. coli* Nissle 1917.

Det ble observert under arbeidet med overflatemarkørene at mo-DC som hadde blitt tilsatt modningscocktail satt dårlig fast til plasten. Etter kun noen få sekunder etter tilsetning av trypsin-EDTA løsnet de modnede mo-DCene fra plasten. Under takningen av SEM-bilder av de modnede mo-DCene ble det observert lite celler på filterene hvor det var modne mo-DC. På filterene hvor modne mo-DC var tilsatt *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917 var det også lite mo-DC. Det var flere celler og bakterier til stede på filteret hvor modnede mo-DC var ko-kultivert *M. capsulatus* (Bath). Dette til tross for lik preparering i forkant av bildetakingen.

Figur 3-9 viser at det fortsatt er *M. capsulatus* (Bath) som binder best av bakteriene til de modnede mo-DCene. Ingen bakterieceller av *E. coli* Nissle 1917 er å se på bilde 3-9D. *M. capsulatus* (Texas) binder i lavere grad til de modnede mo-DCene enn det *M. capsulatus* (Bath) gjør.

4.0 Diskusjon

Ved å inkludere *M. capsulatus* (Bath) som en del av foret til mus med DSS-indusert kolitt oppnås en nedgang i typiske kolitt-assosierte parametere, som for eksempel redusert sykdomsaktivitet og histologisk skåring av inflammasjon, lavere infiltrering av nøytrofile granulocytter og lavere nivå av inflammatoriske markører i tarmen (Kleiveland et al. 2013). I Atlanterhavslaks (*Salmo salar*) har BioProtein positive effekter på soyabønnemel-indusert enteritt (Romarheim et al. 2011; Romarheim et al. 2013). Senere studier viser også at *M. capsulatus* (Bath) binder spesifikt til humane mo-DC (ikke publiserte data). I denne studien har vi undersøkt hvordan ko-kultivering mellom mo-DC og *M. capsulatus* (Bath) påvirker ekspresjon av overflatemolekyler og cytokinproduksjonen til de humane mo-DCene. Effekten av ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) ble sammenlignet med en to andre gammaproteobakterier. En nær slektning, *M. capsulatus* (Texas), og *E. coli* Nissle 1917. De sistnevnte bakteriene viser binding til humane mo-DC i liten grad.

4.1 Ekspresjon av overflatemolekyler på mo-DC etter ko-kultivering med bakterier

Ved ko-kultivering mellom bakterier og mo-DC vil konserverte bakterielle strukturer interagere med PRR på de umodne mo-DCene. Disse interaksjonene fører til en modning av mo-DC, og endring i fenotypen. Overflatemarkørene som er blitt undersøkt i denne studien er overflatemolekyler som er markører for modning og molekyler som er viktige for aktivering av T-celler.

HLA klasse II-molekyler og CD1a. HLA klasse II-molekyler og CD1a er overflatemolekyler som er viktige i presentasjonen av antigener for T-celler, og dermed i initieringen av en adaptiv immunrespons. En økning i HLA klasse II-molekyler ekspresjonen gir mo-DC en økt evne til å presentere peptidantigener for CD4⁺ T-celler. Observasjoner i denne studien samsvarer med litteraturen som beskriver en oppregulering av HLA klasse II-molekyler på modnede DC (Cella et al. 1997). Samtidig observeres en nedsatt ekspresjon av CD1a etter ko-kultivering med bakterier. Da CD1a er et molekyl som presenterer lipidantigener for T-celler, ser det ut til at modning med modningscocktail nedsetter mo-DCers evne til å presentere lipidantigener, men øker muligheten mo-DCene har til å presentere peptidantigener.

Ekspresjonen av CD1a reguleres uavhengig av modning (Gogolak et al. 2007). Da ekspresjonen av CD1a nedreguleres etter ko-kultivering med bakterier og i den positive kontrollen spekulerte vi i om CD1a var en modningsmarkør, noe Gogolak et al. 2007 avviser. De molekylære mekanismene som er med i reguleringen av CD1a er ikke kjent, men ekspresjonen varierer etter mikromiljøet de mo-DCene befinner seg i. Gogolak et al. 2007 legger frem resultater som viser en sammenheng mellom lipoproteiner, aktivering av peroksisom-proliferator-aktivert reseptor-gamma (PPAR- γ), differensiering og funksjonelle egenskaper ved CD1a⁺ og CD1a⁻ mo-DC. De CD1a⁺ mo-DCene produserte signifikant mer IL-12 og mindre IL-10 enn CD1a⁻ mo-DC (Gogolak et al. 2007)

CD80 og CD86. CD80 og CD86 er ko-stimulatoriske molekyler som overfører signal to i den immunologiske synapsen mellom APC og T-celler. Ko-kultivering med bakterier og modningscocktail resulterte i et økt uttrykk av CD80 og CD86 (figur 3-2). Ekspresjonen av CD80 økte mer enn ekspresjonen av CD86. CD80 er sett på som en mer pålitelig markør for modne humane DC da dette molekylet er tilstede i mindre grad på umodne DC enn CD86 (Hubo et al. 2013). *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) fører til større endring i ekspresjonen av disse molekylene enn ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917.

CD83. CD83 er en markør for modne DCer. Ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) fører til økt CD83 ekspresjon, mens ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917 gav kun en svak økning i ekspresjonen i noen eksperimenter. Økningen i ekspresjonen av CD80 og CD83 etter ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) indikerer at disse bakteriene er mer effektive enn *E. coli* Nissle 1917 til å indusere modning av mo-DC.

CD141. CD141 er en markør for en subgruppe myeloide DC (mDC2) som er assosiert med en Th1-immunrespons (Qian & Cao 2012). CD141⁺ DC finnes blant annet i blod og lymfeknuter (Segura & Amigorena 2014). *E. coli* Nissle 1917 øker ekspresjonen av CD141, mens *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) ikke har noen effekt på ekspresjonen.

CD11c. Induksjon av modning med en cocktail bestående av LPS, TNF- α og PGE2 fører til økt ekspresjon av CD11c, mens ko-kultivering med bakterier ikke fører til endring i ekspresjonen. Hos mus blir denne markøren nedregulert når DC blir aktivert via TLR3, TLR4 og TLR9 agonister, mens det på humane mo-DC ikke ble detektert noen nedsatt ekspresjon (Singh-Jasuja et al. 2013).

Ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917 gir en annen fenotype hos mo-DC. Når mo-DC ko-kultiveres med *E. coli* Nissle 1917 oppnås en annen fenotype enn om mo-DC ko-kultiveres med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas). Ved ko-kultivering mellom mo-DC og *E. coli* Nissle 1917 oppnås en lavere ekspresjon av CD83, CD80 og CD86 enn om mo-DC er ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath og Texas). For seks av de syv studerte overflatemarkørene har ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath og Texas) lik effekt. Unntaket er CD1a hvor *M. capsulatus* (Bath) reduserer ekspresjonen i større grad enn *M. capsulatus* (Texas).

Effekten av ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917 varierer mer mellom oppsettene enn effektene av ko-kultiveringen med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas). En mulig årsak til denne variasjonen kan skyldes at monocyttene som er differensiert er hentet fra ulike blodgivere. En annen mulig årsak er at *E. coli* Nissle 1917 inaktiveres ved UV-bestråling i minst 60 minutter for å hindre bakterievekst under ko-kultiveringen. I de ulike oppsettene har denne bestrålingstiden variert, og UV-bestrålingen har vart lenger enn 60 minutter. *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) har ikke blitt bestrålt da disse ikke viser vekst under ko-kultivering.

4.2 Ko-kultiverte mo-DC som APC i en tilpasset MLR

På bakgrunn av økt ekspresjon av ko-stimulatoriske molekyler ble det satt opp en tilpasset blandet lymfocytt reaksjon, MLR, for å undersøke mo-DCers evne til å indusere en T-cellerespons etter ko-kultivering med bakterier. Mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) induserer en kraftig T-celle proliferasjon noe som viser at mo-DC er modnet til å bli effektive APC i samme grad som mo-DC etter modning med modningscocktailen. Mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Texas) gir også en T-celle proliferasjon, mens

mo-DC ko-kultivert med UV-inaktivert *E. coli* Nissle 1917 ikke stimulerer til T-celleproliferasjon. De tre bakteriene viser ulik evne til å modne mo-DC til effektive APC. *E. coli* Nissle 1917 er en probiotisk bakterie, og det er forventet at denne bakterien vil påvirke mo-DC annerledes enn *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas). Probiotiske bakterier påvirker ikke DC slik at de kan indusere en allogen T-celle proliferasjon (Drakes et al. 2004). Denne observasjonen er i overensstemmelse med observasjoner i denne studien.

At ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) ikke gir like effektive APC, ser ikke ut til å kunne forklares ut i fra de studerte overflatemarkørene. Da det kun er graden av nedsatt ekspresjon av CD1a som avviker etter ko-kultivering, tyder det på at andre molekyler i den immunologiske synapsen reguleres kan påvirkes ulikt av ko-kultivering med de to bakteriene.

4.3 Cytokinprofil i kultursupernatant fra mo-DC ko-kultivert med bakterier

Cytokiner er signalmolekyler som sendes ut av celler for å kommunisere med nærliggende celler i miljøet. Kommunikasjonen kan virke autokrint (på cellen som sekreter cytokinet) og/eller parakrint (på andre nærliggende celler i miljøet). Cytokiner i miljøet er omtalt som et tredje signal i aktiveringen av T-celler (Magombedze et al. 2013). Sekretede cytokiner er derfor indikatorer på effekter man kan forvente å se *in vitro* i modellsystemer. Når mo-DC ko-kultiveres med *M. capsulatus* (Bath), *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917 begynner mo-DC å sekretere cytokiner. Det ble detektert mest av de såkalte proinflammatoriske cytokinene IL-6 og IL-12, og lavere mengder av det anti-inflammatoriske cytokinet IL-10.

IL-6 blir produsert av flere celletyper (Rincón et al. 1997). Cytokinet fungerer som en vekstfaktor for T-celler (Kishimoto 1989), og er et viktig cytokin som påvirker naive T-celler til å differensiere til Th17-effektorceller (Luckheeram et al. 2012). Hos noen celletyper (monocytter og fibroblaster) fremmer LPS sekresjonen av IL-6 (Kishimoto 1989). Alle bakteriene benyttet i denne studien er Gram-negative og uttrykker LPS. Det er derfor forventet sekresjon av IL-6. Store forskjeller i sekresjon av IL-6 kan komme av ulik LPS hos bakteriene som stimulerer cellene ulikt, eller at flere molekyler er innblandet i sekresjonen av dette cytokinet.

IL-6 kan inhibere ekspresjonen av HLA klasse II-molekyler, CD40, CD80, CD86 samt produksjonen av IL-12 og på den måten undertrykke modning av DC (Park et al. 2004). Mo-DC ko-kultivert med *E. coli* Nissle 1917 sekreert fem ganger mer IL-6 enn IL-12. I tillegg ble det ikke observert en like stor økning i ekspresjonen av ko-stimulatoriske molekyler på mo-DC som på mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas). Forholdet mellom IL-6 og IL-12 sekresjonen hos mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) er henholdsvis 1,05 og 1,2. Det kan ikke utelukkes at IL-6 er en medvirkende årsak den lave ekspresjonen av overflatemolekyler på mo-DC ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917.

IL-10 er et viktig regulatorisk cytokin som sekreses av blant annet regulatoriske T-celler. Cytokinet inhiberer modning av DC *in vitro* (Park et al. 2004) ved å nedregulere ekspresjonen av HLA klasse II-molekyler og de ko-stimulatoriske molekylerne CD80 og CD86 på DC (Amodio & Gregori 2012). IL-10 fremmer differensiering av IL-10 produserende regulatoriske T-celler, inhiberer utviklingen av Th1-immunrespons, og har en hemmende effekt på Th2-effektorceller og utviklingen av allergiske reaksjoner (Saraiva & O'Garra 2010). Drakes et al. 2004 viser at sekresjonen av IL-10 er lavere enn sekresjonen av IL-12 etter ko-kultivering i et døgn mellom DC derivert fra beinmarg i mus og probiotiske bakterier. Om de probiotiske bakteriene og DCene blir ko-kultivert i tre døgn, er cytokinprofilen endret til en høyere IL-10 sekresjon i forhold til IL-12 sekresjon. I denne studien har bakteriene gått i kultur med mo-DC i seks døgn og sammen med mo-DC og T-celler i fem døgn, og det er ikke blitt tatt ut prøver underveis. Vi kan derfor ikke si noe hvorvidt forholdet mellom IL-10 og IL-12 endres i løpet av ko-kultiveringsperioden. Det kan ikke utelukkes at IL-10 har en videre påvirkning på mo-DCers ekspresjon av overflatemolekyler og cytokinprofil. En økt sekresjon av IL-10 hemmer sekresjonen av IL-12. IL-10 induserer antigen-spesifikk toleranse ved å hindre aktivering og modning av APC og dermed hindre T-celleproliferasjon (Drakes et al. 2004).

IL-12 sekreses hovedsakelig av APC, og dette cytokinet er med å bestemme hvilken adaptiv immunrespons som initieres. IL-12 virker positivt på produksjonen av IFN- γ og får CD4⁺T-celler til å differensiere til Th1-effektorceller (Hamza et al. 2010). Modningscocktailen

bestående av LPS, PGE2 og TNF- α er forventet å modne mo-DCer og føre til IL-12 sekresjon. Landi et al. 2011 hevder at modningscocktailen har en signifikant effekt på økningen i transkripsjonen av gener relatert til en Th1-immunrespons sammenlignet med mo-DCer modnet med bare LPS eller TNF- α (Landi et al. 2011). DCers produksjon av IL-12 etter stimulering med LPS er ikke permanent. Kort tid etter modningen er initiert indueres en Th1-polarisering i T-celler, og de samme DCene kan induere en polarisering til Th2-effektorceller eller T-hukommelsesceller på et senere tidspunkt (Langenkamp et al. 2000).

Ko-kultivering mellom mo-DC og *M. capsulatus* (Bath) fører til høyest produksjon av de ulike cytokinene sammenlignet ko-kultivering med *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917. Mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) sekreerer 75 ganger mer IL-12 enn IL-10. Ko-kultivering med *M. capsulatus* (Texas) gir 85 ganger høyere sekresjon av IL-12 enn IL-10, mens dette forholdstallet etter ko-kultivering med *E.coli* Nissle 1917 er 18. Da mengden IL-12 detektert er mye større enn mengden IL-10 detektert, kan det forventes at *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) kan bidra til polarisering i en Th1-retning. Vi har imidlertid ikke hatt mulighet for karakterisering av en fullstendig cytokinprofil slik at det er vanskelig å konkludere med at disse to bakteriene vil påvirke mo-DC til Th1-polariserte celler.

Det er observert at mo-DC er fagocytterende celler (Kassianos et al. 2012). SEM-bilder tatt i tidligere studier viser at *M. capsulatus* (Bath) blir endocyttert av mo-DC etter ko-kultivering en time (upubliserte data). Det samme gjelder for *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917. På bakgrunn av disse resultatene kan det ikke utelukkes at også intracellulære mønstergjenkjennende reseptorer og andre reseptorer er ansvarlige for cytokinproduksjon og forandringer i ekspresjon av overflatemolekyler. Det er lite trolig at LPS og interaksjonen med TLR4 alene er årsak til de immunmodulerende effektene som observeres.

4.4 Ekspresjon av RALDH enzymer i mo-DC

På grunn av de positive effektene *M. capsulatus* (Bath) har på enteritt hos Atlanterhavslaks og kolitt hos mus ble det undersøkt om *M. capsulatus* (Bath) har effekt på evnen DCer har til å omdanne vitamin A. Vitamin A metabolitten RA er viktig for differensieringen av regulatoriske T-celler i tarmen og bidrar til induksjon av immunologisk toleranse.

Ekspressjonen av aldehyd dehydrogenaser, enzymer som er med i vitamin A metabolismen, ble undersøkt med ALDEFLUOR™. Våre resultater viste at *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) påvirker enzymaktiviteten til RALDH på samme måte.

Det er ingen klare tendenser mellom mo-DC ko-kultivert med *M. capsulatus* (Bath) og økt RALDH aktivitet. Dette kan bety at det er andre faktorer i *in vivo* i dyremodellene ligger til grunn for den anti-inflammatoriske effekten av *M. capsulatus* (Bath). På den annen side kan disse resultatene brukes til å underbygge deteksjonen av høyere IL-12 enn IL-10 sekresjon som angir en Th1-immunrespons.

4.5 Transkripsjonsfaktorer i prolifererende T-celler

Da det ble observert at T-cellene som ble tilsatt de tilpassede MLRene prolifererte, ønsket vi å finne ut hvilke subpopulasjoner de prolifererende T-cellene tilhørte. De fire transkripsjonsfaktorene som karakteriserer T-effektorcellene Th1 (T-bet), Th2 (GATA3), Th17 (ROR- γ T) og Treg (Foxp3) ble detektert. Blant de ustimulerte T-cellene ble det detektert 96 % T-bet⁺, 14 % GATA3⁺, 5 % ROR- γ T⁺ og 31 % Foxp3⁺ T-celler. Da det prosentvise antallet overstiger 100 %, betyr det at T-celler kan være positive for mer enn en transkripsjonsfaktor. Det var overraskende at nær 100 % av de ustimulerte T-cellene var T-bet⁺. En rimelig tolkning vil være at de isolerte T-cellene ikke er naive T-celler, men celler som på en eller annen måte er blitt aktivert *in vivo*.

Det observeres at antallet positive T-celler synker etter ko-kultivering i en variant av en MLR. Mulige årsaker til dette kan være at T-celler positive for en eller flere transkripsjonsfaktorer dør i løpet av ko-kultiveringsperioden. Men hvorfor det er flest positive T-celler etter ko-kultivering med mo-DC (totalt 69 %), som ikke sekreterer cytokiner, er det ingen god forklaring på. Det forventes at 5-10 % av de tilsatte T-cellene vil kunne bli aktivert av de fremmede HLA klasse II-molekylene, med peptidantigener i gropen, på mo-DC. Dette er grunnen for at det forventes en økning i antallet positive T-celler etter ko-kultivering med mo-DC og modningscocktail/bakterier.

Etter ko-kultivering observeres fortsatt flest T-bet⁺ T-celler, men antallet positive T-celler reduseres betraktelig. Da de naive T-cellene ble ko-kultivert med mo-DC, ble antallet T-bet⁺ T-celler redusert til 37 %. Antallet T-bet⁺ T-celler ble ytterligere redusert etter å ha vært i kultur med mo-DC ko-kultivert med modningscocktail/bakterier. Etter ko-kultivering med mo-DC og *E. coli* Nissle 1917 var det kun 5 % T-bet⁺ T-celler som blir detektert. Bakteriene induerte IL-12 produksjon i mo-DC. Siden IL-12 polariserer T-celler i en Th1-retning, er det ikke overraskende at T-bet er den mest dominerende transkripsjonsfaktoren.

For alle de fire transkripsjonsfaktorene som er detekter, avviker resultatet etter ko-kultivering med *E. coli* Nissle 1917. Totalt er 11 % av T-cellene som er gått i kultur med *E. coli* Nissle 1917 og mo-DC positive for en eller flere transkripsjonsfaktorer. Dette tallet er 58 % etter ko-kultivering med *M. capsulatus* (Bath) og 52 % etter ko-kultivering med *M. capsulatus* (Texas). Det er tydelig at T-cellene responderer ulikt etter ko-kultivering med mo-DC og *E. coli* Nissle 1917 sett i forhold til ko-kultivering med mo-DC og *M. capsulatus* (Bath og Texas).

Det er mye usikkerhet rundt disse resultatene, og mye av usikkerheten er knyttet til utvelgelsen av cellene som skulle analyseres. Vi ønsket å studere de prolifererende T-cellene fra de tilpassede MLR oppsettene, og omlag halvparten av T-cellene analysert på væskestrømscytometeret ble valgt bort på bakgrunn av cellestørrelse (den minste og minst granulerte cellepopulasjonen) (se bilde 3 i vedlegg 2). De naive T-cellene (bilde 1 i vedlegg 2) ligger nære x-aksen, mens T-celler etter aktivering med kuler med anti-CD3/28 på overflaten (bilde 2 i vedlegg 2) viser endringer i cellepopulasjonen. Bilde 4 i vedlegg 2 viser et eksempel med T-celler fra en tilpasset MLR. I bilde 3 og 4 i vedlegg 2 observeres det en populasjon av celler som ligger parallelt med x-aksen (markert med piler). Det er mulig resultatet hadde blitt annerledes om disse cellene også var fjernet, og ikke hadde blitt analysert.

Andre celler kan også påvirke resultatet. DC kan være Foxp3⁺, og det kan ikke utelukkes at noen mo-DC har løsnet fra platen og blitt analysert sammen med T-cellene. En måte å eliminere denne feilkilden på er å dobbeltfarge cellene med antistoff mot CD3 eller CD4, da det er T-celler og hovedsakelig de CD4⁺ T-cellene man vil undersøke. Regulatoriske T-celler er Foxp3⁺, CD25⁺ og CD4⁺. For å være helt sikker på at Treg-celler undersøkes kan alle disse

tre markørene detekteres. T-celler kan som nevnt ha flere aktive transkripsjonsfaktorer, og dobbeltfarginger mot transkripsjonsfaktorer burde vært inkludert.

4.6 Binding mellom mo-DC og M. capsulatus (Bath)

Tidligere observasjoner viser at *M. capsulatus* (Bath) binder sterkt til umodne humane mo-DC. Vi undersøkte derfor om modningsprosessen ville påvirke binding mellom *M. capsulatus* (Bath). SEM-bildene viser det at *M. capsulatus* (Bath) binder seg best av bakteriene både til umodne mo-DC og til modne mo-DC (figur 3-8 og 3-9). Dette viser at strukturen *M. capsulatus* (Bath) binder seg til, fortsatt er tilstede på overflaten til mo-DC etter modning.

Binding til mo-DC er ikke en egenskap hos alle gammaproteobakterier. *E. coli* Nissle 1917 ser ikke ut til å uttrykke de nødvendige molekylerne som inngår i binding, og *M. capsulatus* (Texas) ser ut til ha enkelte av de egenskapene. Det er klare forskjeller i binding mellom mo-DC og *M. capsulatus* (Texas) og mo-DC og *M. capsulatus* (Bath) etter inkubering i tre timer. Det ble også tatt SEM-bilder etter ko-kultivering i to døgn (data ikke vist). Mo-DC hadde fortsatt et høyt antall *M. capsulatus* (Bath) bundet til seg. Selv om antallet *M. capsulatus* (Texas) bundet til mo-DC var lavere enn antallet *M. capsulatus* (Bath), var ikke forskjellen like stor som etter inkubering i tre timer. Om *M. capsulatus* (Bath) og *M. capsulatus* (Texas) binder seg til samme strukturer på overflaten av mo-DC, der det rimelig å tro at de binder med ulik affinitet.

4.7 Immunmodulerende effekter av ko-kultivering med M. capsulatus (Bath)

Observasjoner fra dyreforsøk viser at *M. capsulatus* (Bath) har en anti-inflammatorisk effekt på tarmbetennelse. *M. capsulatus* (Bath) binder seg også sterkt til umodne mo-DC. Vi ville undersøke om denne interaksjonen kunne ha en immunmodulerende effekt som kunne være med på å forklare de anti-inflammatoriske egenskapene til *M. capsulatus* (Bath). I dette *in vitro*-systemet av monocytt-deriverte dendritiske celler er kun tre cytokiner og syv overflatemarkører studert, og der er ikke tilstrekkelig med data for å konkludere med hvilken type adaptiv immunrespons som initieres. Selv om det ikke kan konkluderes med noen adaptiv immunrespons, er det ingen tvil om at *M. capsulatus* (Bath) har immunmodulerende

effekter på humane mo-DC. De humane mo-DCene blir gode APC som induserer en T-cellerespons.

4.8 Forslag til videre studier

Studiene som presenterer positive effekter av *M. capsulatus* (Bath) i dyremodeller har benyttet seg av bakterien i form av pulver/mel. Det er ikke undersøkt om levende bakterier har lik effekt. Derfor burde ekspresjon av overflatemarkører og cytokiner i supernatant vært utført etter ko-kultivering mellom mo-DC og *M. capsulatus* (Bath) i form av pulver. Dette for å undersøke om effekten er lik mellom intakte levende bakterier og døde bakterier i form av pulver.

For å få et større innblikk i den immunologiske synapsen og aktiveringen av T-celler burde flere ko-stimulatoriske molekyler vært detektert. Eksempler er CD40 på mo-DC og CTLA-4 på T-celler er interessante å studere. CD40 er med i aktiveringen av T-celler, mens CTLA-4 virker hemmende på utviklingen av T-celleresponser ved å binde CD80/CD86 med høyere affinitet enn CD28. Protokollen for deteksjon av aktive transkripsjonsfaktorer i T-celler burde optimaliseres slik at det er de prolifererende T-cellene som undersøkes. Dette sammen med deteksjon av flere cytokiner fra ko-kultivering og fra tilpasset MLR vil kunne gi et større grunnlag for å si mer konkret hvilken adaptiv immunrespons som initieres i dette modellsystemet. Eksempler på cytokiner er TGF- β etter ko-kultivering mellom bakterier og mo-DC, og IL-2, IL-17, IL-4 og IL-23 fra tilpasset MLR. Da det er observert at cytokinprofilen endres over tid, kunne det vært interessant å undersøke om forholdet mellom IL-10 og IL-12 endres etter ko-kultivering mellom mo-DC og bakterier i tre døgn.

Videre er det observert at mo-DC modnet med modningscocktail er dårlig festet underlaget, og at modning med bakterier ikke har denne effekten. Det er også observert at modnede mo-DC inkubert med *M. capsulatus* (Bath) i tre timer er bedre festet til underlaget enn modnede mo-DC inkubert med *M. capsulatus* (Texas) og *E. coli* Nissle 1917. Det kunne derfor vært interessant å se hvordan ko-kultiveringen påvirker ekspresjonen av celleadhesjonsmolekyler.

5.0 Konklusjon

Tarmens immunsystem er komplekst med celler fra det medfødte og det adaptive immunsystemet som jobber sammen for å indusere toleranse og opprettholde tarmhomeostase. I *in vitro* modellsystemet som er benyttet i denne studien, er kun interaksjonen mellom *M. capsulatus* (Bath) og humane mo-DC studert, mens effektene i ulike dyremodeller er et resultat av samspill mellom mange ulike celler og andre faktorer (barrierefunksjon, mikrobiota m. m).

Det spesielle med *M. capsulatus* (Bath) er at det er en ikke-kommensal bakterie som ikke er patogen, men som har en dempende effekt på betennelsestilstander i tarmen i mus og Atlanterhavslaks. I denne studien observeres det at denne bakterien har større immunmodulerende effekter enn en kommensal bakterie (*E.coli* Nissle 1917) på humane mo-DC. Da *E. coli* Nissle 1917 er brukt i behandling av IBD, og er den aktive komponenten i Metaflor®, kan det ikke utelukkes at *M. capsulatus* (Bath) også kan ha en effekt på mennesker med IBD. For å kartlegge potensialet til *M. capsulatus* (Bath) kreves flere undersøkelser.

6.0 Referanser

- Amodio, G. & Gregori, S. (2012). Human tolerogenic DC-10: perspectives for clinical applications. *Transplantation Research*, 1 (14): 3-10.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245-252
- Car, B. d., Eng, V. M., Lipman, J. M. & Anderson, T. D. (1999). The Toxicology of Interleukin-12: A Review. *Toxicologic Pathology*, 27 (1): 58-63.
- Cassani, B., Villablanca, E. J., De Calisto, J., Wang, S. & Mora, J. R. (2012). Vitamin A and immune regulation: Role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance. *Molecular Aspects of Medicine*, 33: 63-76.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. & Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC II complexes on dendritic cells. *Nature*, 388: 782-787.
- Chabot, S., Wagner, J. S., Farrant, S. & Neutra, M. R. (2006). TLRs Regulate the Gatekeeping Functions of the Intestinal Follicle-Associated Epithelium. *The Journal of Immunology*, 176 (7): 4275-4283.
- Cho, J. H. & Abraham, C. (2007). Inflammatory Bowel Disease Genetics: Nod2. *Annual Review of Medicine*, 58 (1): 401-416.
- Collin, M., McGovern, N. & Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 140: 22-30.
- Drakes, M., Blanchard, T. & Czinn, S. (2004). Bacterial Probiotic Modulation of Dendritic Cells. *Infection and Immunity*, 72 (6): 3299-3309.
- Edelblum, K., Singh, G., El Bissati, K., McLeod, R., McCormick, B. & Turner, J. (2014). Intestinal epithelial barrier dysfunction protects against pathogen translocation during initial infection (1111.2). *The FASEB Journal*, 28 (1 Supplement).
- Feng, T., Elson, C. O. & Cong, Y. (2010). Microbiota: dual-faceted player in experimental colitis. *Gut Microbes*, 1 (6): 388-391.
- Fieschi, C. & Casanova, J.-L. (2003). The role of interleukin-12 in human infectious diseases: only a faint signature. *Eur. J. Immunol*, 33: 1461-1464.
- Gogolak, P., Rethi, B., Szatmari, I., Lanyi, A., Dezso, B., Nagy, L. & Rajnavolgyi, E. (2007). Differentiation of CD1a⁻ and CD1a⁺ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR γ . *Blood*, 109 (2): 643-652.
- Grabig, A., Paclik, D., Guzy, C., Dankof, A., Baumgart, D. C., Erckenbrecht, J., Raupach, B., Sonnenborn, U., Eckert, J., Schumann, R. R., et al. (2006). *Escherichia coli* strain Nissle 1917 Ameliorates Experimental Colitis via Toll-Like Receptor 2- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Pathways. *Infection and Immunity*, 74 (7): 4075-4082.

- Hamza, T., Barnett, J. B. & Li, B. (2010). Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (3): 789-806.
- Hanson, R. S. & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60 (2): 439-471.
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M. N., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R. & Villadangos, J. A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological Reviews*, 199 (1): 9-26.
- Hepworth, M. R., Monticelli, L. A., Fung, T. C., Ziegler, C. G. K., Grunberg, S., Sinha, R., Mantegazza, A. R., Ma, H., Crawford, A., Angelosanto, J. M., et al. (2013). Innate lymphoid cells regulates CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*, 498: 113-117.
- Hill, D. A. & Artis, D. (2010). Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annual Review of Immunology*, 28 (1): 623-667.
- Hooper, L. V., Littman, D. R. & Macpherson, A. J. (2012). Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*, 336: 1268-1273.
- Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K. & Jonuleit, H. (2013). Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *frontiers in Immunology*, 4: 1-14.
- Huppa, J. B. & Davis, M. M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*, 3: 973-983
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C. & Song, S. (2004). Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T-Cells. *Immunity*, 21: 527-538.
- Iwazaki, A. & Medzhitov, R. (2010). Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science*, 327: 291-295.
- Jongbloed, S. L., Kassianos, A. J., McDonald, K. J., Clark, G. J., Ju, X., Angel, C. E., Chen, C.-J. J., Dunbar, P. R., Wadley, R. B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 207 (6): 1247-1260.
- Kassianos, A. J., Hardy, M. Y., Ju, X., Vijayan, D., Ding, Y., Vulink, A. J. E., McDonald, K. J., Jongbloed, S. L., Wadley, R. B., Wells, C., et al. (2012). Human CD1c (BDCA-1)+ myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-regulatory phenotype and function in response to Escherichia coli. *European Journal of Immunology*, 42 (6): 1512-1522.
- Kayama, H. & Takeda, K. (2012). Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. *International Immunology*, 24 (11): 673-680.
- Kimura, A. & Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, 40 (7): 1830-1835.

- Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood*, 74: 1-10.
- Kleiveland, C. R., Hult, L. T. O., Kuczkowska, K., Jacobsen, M., Lea, T. & Pope, P. B. (2012). Draft Genome Sequence of the Methane-Oxidizing Bacterium *Methylococcus capsulatus* (Texas). *American Society for Microbiology*, 194 (23): 6626.
- Kleiveland, C. R., Olsen, L. T., Spetalen, S., Kaldhusdal, M., Christoffersen, T. E., Bengtsson, O., Romarheim, O. H., Jacobsen, M. & Lea, T. (2013). The Noncommensal Bacterium *Methylococcus capsulatus* (Bath) Ameliorates Dextran Sulfate (Sodium Salt)-Induced Ulcerative Colitis by Influencing Mechanisms Essential for Maintenance of the Colonic Barrier Function. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (1): 48-56.
- Kovatcheva-Datchary, P., Tremaroli, V. & Bäckhed, F. (2013). The Gut Microbiota. I: Rosenberg, E., DeLong, E., Lory, S., Stackebrandt, E. & Thompson, F. (red.) *The Prokaryotes*, s. 3-24: Springer Berlin Heidelberg.
- Landi, A., Babiuk, L. A. & van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2011). Dendritic cells matured by prostaglandin E2-containing cocktail can produce high levels of IL-12p70 and are more mature and Th1-biased than dendritic cells treated with TNF- α or LPS. *Immunobiology*, 216: 649-662
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 1 (4): 311-316.
- Langrish, C. L., McKenzie, B. S., Wilson, N. J., Malefyt, R., Kastelein, R. A. & Cua, D. J. (2004). IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 202: 96-105.
- Lechmann, M., Berchtold, S., Hauber, J. & Steinkasser, A. (2002). CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *TRENDS in Immunology*, 23 (6): 273-275
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. (2012). CD4⁺T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012: 1-12.
- Magombedze, G., Reddy, P. B. J., Eda, S. & Ganusov, V. V. (2013). Cellular and population plasticity of helper CD4⁺ T cell responses. *Frontiers in Physiology*, 4: 1-9.
- Martinez, F. O. & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Reports*, 6 (13) 1-13.
- Maynard, C. L. & Weaver, C. T. (2009). Intestinal Effector T Cells in Health and Disease. *Immunity*, 31: 389-400.
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D. & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489: 231-241.
- Mora, J. R. & von Andrian, U. H. (2009). Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Seminars in Immunology*, 21 (1): 28-35.

- Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S. P., Belkaid, Y. & Merad, M. (2014). Microbiota-Dependent Crosstalk Between Macrophages and ILC3 Promotes Intestinal Homeostasis. *Science*, 343 (6178) 1249288-1 - 1249288-7.
- Mowat, A. M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 3: 331-341.
- Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y. & O'Shea, J. J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. *Current Opinion in Immunology*, 24: 279-302.
- Park, S.-J., Nakagawa, T., Kitamura, H., Atsumi, T., Kamon, H., Sawa, S.-i., Kamimura, D., Ueda, N., Iwakura, Y., Ishihara, K., et al. (2004). IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation through STAT3 Activation. *The Journal of Immunology*, 173 (6): 3844-3854.
- Peterson, L. W. & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature*, 14: 141-153.
- Qian, C. & Cao, X. (2012). Naturally occurring CD1c⁺ human regulatory dendritic cells: Immunoregulators that are expanded in response to E. coli infection. *European Journal of Immunology*, 42 (6): 1388-1392.
- Rincón, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E. & Flavell, R. A. (1997). Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4 producing CD4⁺ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 185 (3): 461-469.
- 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.
- Romarheim, O. H., Landsverk, T., Mydland, L. T., Skrede, A. & Øverland, M. (2013). Cell wall fractions from *Methylococcus capsulatus* prevent soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 402–403 (0): 13-18.
- Round, J. L. & Mazmanian, S. K. (2010). Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *PNAS*, 107 (27): 12204-12209
- Rutella, S. & Locatelli, F. (2011). Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 17 (33): 3761-3775.
- Saraiva, M. & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature*, 10: 170-181.
- Sato, K. & Fujita, S. (2007). Dendritic Cells-Nature and Classification. *Allergology International*, 56: 183-191.
- Schweitzer, A. N., Borriello, F., Wong, R. C. K., Abbas, A. K. & Sharpe, A. H. (1997). Role of Costimulators in T Cell Differentiation: Studies Using Antigen-Presenting Cells Lacking Expression of CD80 or CD86. *The Journal of Immunology*, 158: 2713-2722.
- Segura, E. & Amigorena, S. (2014). Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunology Letters*, 158: 73-78.

- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 90 (3): 859-904.
- Singh-Jasuja, H., Thiolat, A., Ribon, M., Boissier, M.-C., Bessis, N., Rammensee, H.-G. & Decker, P. (2013). The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology*, 218 (1): 28-39.
- Skogstad, M., Eduard, W., Holme, J., Qvenild, T. & Einarsdottir, E. (2005). Short term changes in lung function, leukocytosis in blood, and lachrymal fluid among bacterial single cell protein workers after an episode with high exposure to endotoxins. *Occup Environ Med*, 62: 576-580.
- Sommer, F. & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nature*, 11: 227-238.
- Sonnenborn, U. & Schulze, J. (2009). The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 - features of a versatile probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 21: 122-158.
- Sturm, A., Rilling, K., Baumgart, D. C., Gargas, K., Abou-Ghazalé, T., Raupach, B., Eckert, J., Schumann, R. R., Enders, C., Sonnenborn, U., et al. (2005). *Escherichia coli* Nissle 1917 Distinctively Modulates T-Cell Cycling and Expansion via Toll-Like Receptor 2 Signaling. *Infection and Immunity*, 73 (3): 1452-1465.
- Wang, Y., Becker, D., Vass, T., White, J., Marrack, P. & Kappler, J. W. (2009). A Conserved CXXC Motif in CD3 ϵ Is Critical for T Cell Development and TCR Signaling. *PLoS Biol*, 7 (12): e1000253.
- Xavier, R. J., Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 488: 427-434.
- Zhou, L., Chong, M. M. W. & Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, 30: 646-655.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P.J. M., Liu, Y., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116 (16): e74-e80.

Vedlegg 1: Utstyrliste

Celler:	Karakteristikk:	Levrandør:
Humane mononukleære celler	Isolert fra buffy coat	Sykehuset Østfold

Bakterieart:	Stamme:	Leverandør:
<i>Methylococcus capsulatus</i>	Bath	NCIMB
<i>Methylococcus capsulatus</i>	Texas	NCIMB
<i>Escherichia coli</i>	Nissle 1917	Gave fra Ardeypharm GmbH Herdecke, Tyskland

Medium og utstyr til celledyrking/ celleisolering:	Produsent:
RPMI 1640 <ul style="list-style-type: none"> • Natriumpyruvat • Ikke-essensielle aminosyrer • Gentamysin sulfat/penicillin-streptomycin • Monothioglyserol • Inaktivert føtalt kalveserum 	PAA, Biochrom, Life Technologies PAA PAA Bio Whittaker/Sigma SIGMA PAA
Dulbecco's PBS/HyClone Phosphate Buffered Saline <ul style="list-style-type: none"> • EDTA • Albumin løsning, 35% i DPBS 	PAA/ Thermo Scientific MERCK SIGMA
Lymphoprep™	Fresenius Kabi Norge AS for Axis-Shield PoC AS
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec
MACS® Separation Columns	Miltenyi Biotec
Pre- Separation Filter 30µm	Miltenyi Biotec
DMSO	MERCK
Leuko-pak Leukocyte filert, nylonull til isolering av T-celler	Leica DCF 420,

Medium til bakterier:	Produsent:
LB Broth	SIGMA
NMS-medium: <ul style="list-style-type: none"> • KNO₃ • MgSO₄ x 6H₂O • CaCl₂ (vannfri) • FeEDTA • NaMoO₄ x 2H₂O • CuSO₄ X 5H₂O • ZnSO₄ x 7H₂O • H₃BO₃ • CoCl₂ x 6H₂O • EDTA di natrium salt 	SIGMA FLUKA Analytical SIGMA SIGMA SIGMA SIGMA SIGMA SIGMA SIGMA SIGMA

<ul style="list-style-type: none"> • $MnCl_2 \times 4H_2O$ • $NiCl_2 \times 6H_2O$ • $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ • KH_2PO_4 	SIGMA SIGMA SIGMA SIGMA
---	----------------------------------

ELISA:	Produsent:
IL-6 kit ELISA	ImmunoTool
IL-10 Kit 900-K21	PeptoTech
IL-12 Kit 900-K96	PeptoTech
Albumin fra bovint serum	Sigma
Tween 20	Sigma
Streptavidin-HRP	SouthernBiotech
ABTS	Roche
H_2O_2	Sigma
ELISA plater 96 Well EIA/ RIA plates	Costar

Utstyr, antistoff og reagenser til væskestrømscytometri:	Produsent:
Alexa Fluor® 700 anti-human CD1a	BioLegend
Pacific Blue™ anti-human CD11c	BioLegend
PE Mus Anti- Human CD80 /anti-human CD80 FITC	BD Pharmingen™ /ImmunoTool
PE-Cy™ 5 Mus Anti-Human CD83	BD Pharmingen™
Alexa Fluor® 700 Mus Anti-Human CD86	BD Pharmingen™
PE anti-human CD141	BioLegend
FITC Mus Anti-Human HLA DR, DP, DQ	BD Pharmingen™
CD14 APC human	Miltenyi Biotec
Trypsin-EDTA	GE Healthcare
Anti-human/mus ROR- γ t	eBioscience
Anti-human/mus Gata-3	eBioscience
Anti-human/mus T-bet	eBioscience
Anti-Foxp3	eBioscience
ALDEFLUOR kit	STEMCELL Technologies
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience
MASQuant Storage SOLUTION	MACSQuant
MASQuant Washing Solution	MACSQuant
MASQuant Running Buffer	MACSQuant
MicroWell plate	NUNC

Reagenser og utstyr til dyrkning, dehydrering og preparering av celler til SEM:	Produsent:
Absolutt alkohol prima	Kemetyl

Parafomaldehyd	SIGMA
Cell Culture Insert 24 Well 0,4µm Pore Size (filter)	BD Falcon
Coating av gull/palladium på aluminiumstubber	Polaron SC 7640, BioRad
Sveipeelektronmikroskop	Zeiss EVO-50-EP fra Carl Zeiss SMT Ltd.

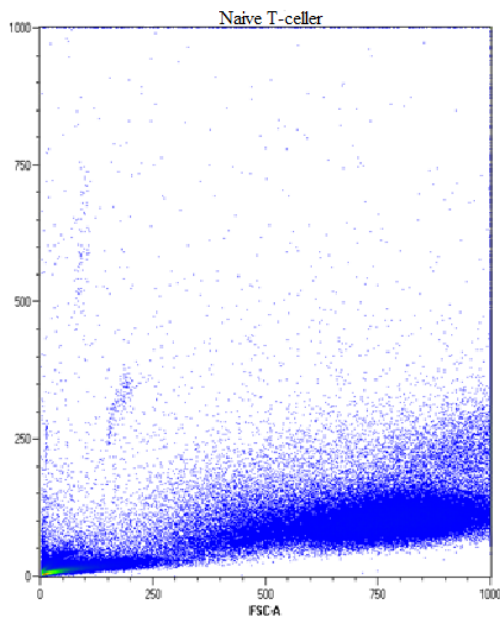
Cytokiner:	Produsent:
GM-CSF	ImmunoTool
IL-4	ImmunoTool
Prostaglandin E ₂	SIGMA
TNF- α	ImmunoTool
LPS	SIGMA
Tween 20	SIGMA

Maskin:	Produsent:
Celleteller	Beckmann Coulter Z1
Væskestrømscytometer	MACSQuant Analyzer
ELISA avleser	Tecan sunrise
Spektrofotometer	Shimadzu UV-160A
UV bestråler	GelDoc 1000
Teller av MLR plater	TopCount NXT, Packard
Høstemaskin, MLR plater	Packard Matrix micromate 196
Kritiskpunkt tørker	BAL-TEC CPD 030 BAL-TEC AG
Sentrifuge	Megafuge 1.0 og BIOFUGE pico, Heraeus
Autoklav	HIRAYAMA Autoclave

Til celledelling med Beckmann Coulter Z1 er prøvene blitt fortynnet 1:5000 i Coulter® Isoton® II Diluent fra Beckman Coulter

Vedlegg 2: Utvelgelse av T-celler

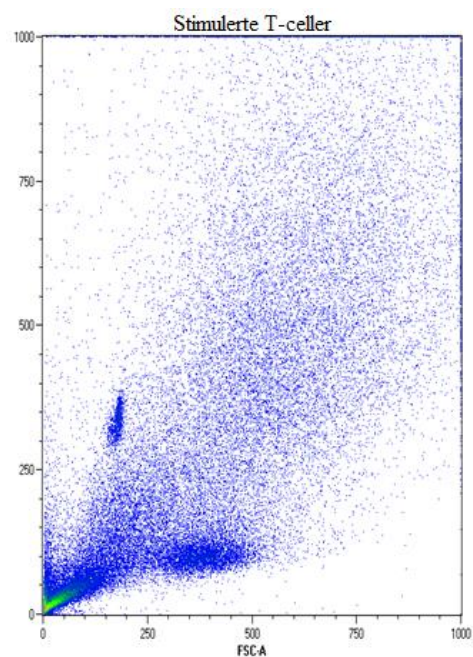
Bilde 1: Naive T-celler

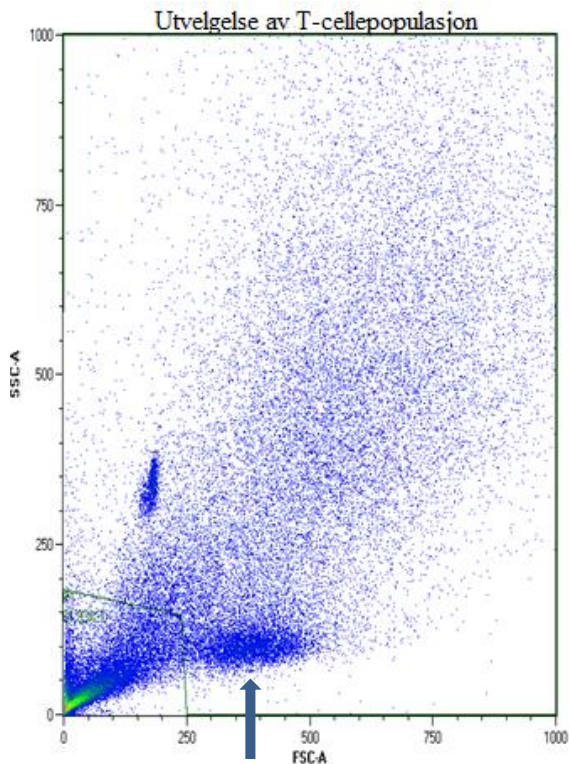


På dette bildet vises naive T-celler, og hvordan de ligger i plottet når de sorteres cellestørrelse og granulering.

Bilde 2: Stimulerte T-celler

På dette bildet vises T-cellepopulasjonen fra samme blodgiver etter stimulering med kuler med anti- CD3 og anti-CD28.





Bilde 3: Utvelgelse av T-cellepopulasjon

Utvelgelsen av T-cellene som ligger til grunn for figur 3-7. Cellepopulasjonen med de minste og minst granulerte cellene (vist i den avgrensede populasjonen nederst til venstre på bildet) fjernes og resten av cellene er blitt analysert.

Bilde 4: Eksempel med celler fra en tilpasset MLR.

På dette bildet vises et eksempel med T-celler fra en tilpasset MLR. Den samme populasjonen nederst i hjørnet er valgt bort, og det er kun cellene som ligger spredt i plottet som er analysert for aktive transkripsjonsfaktorer.

