



MALMÖ HÖGSKOLA
Hälsa och samhälle

BETYDELSEN AV INTERLEUKIN 4 RECEPTORN (IL-4R) I STIMULERING AV LYMFOM- OCH LEUKEMICELLER

EMMA SKOG

Examensarbete i
Biomedicinsk laboratorievetenskap
15 högskolepoäng
Biomedicinska analytikerprogrammet
Maj 2011

Malmö högskola
Hälsa och samhälle
205 06 Malmö

BETYDELSEN AV INTERLEUKIN 4 RECEPTORN (IL-4R) I STIMULERING AV LYMFOM- OCH LEUKEMICELLER

EMMA SKOG

Skog, E. Betydelsen av interleukin 4 receptorn (IL-4R) i stimulering av lymfom- och leukemiceller. *Examensarbete i biomedicinsk laboratorievetenskap 15 högskolepoäng*. Malmö högskola: Hälsa och Samhälle, Utbildningsområde Biomedicinsk laboratorievetenskap, 2011.

Cytokiner eller interleukiner är signalpeptider med låg molekylär vikt som reglerar många viktiga funktioner. De kan delas in i två grupper beroende på deras effekt på celler. Interleukin 4 (IL-4) till exempel kan tillhöra gruppen tillväxtfaktorer medan interleukin 6 (IL-6) kan tillhöra gruppen aktiverings- eller differentieringsfaktorer. IgM-receptorn eller B-cellsreceptorn, BCR, finns på B-celler och är membranbundna immunoglobuliner (mIg) som har två huvuduppgifter; att förmedla signaler som styr B-cellens utveckling samt att binda in antigen som sedan ska presenteras för T-celler. I studien aktiverades B-celler med antikropp mot IgM (anti-IgM) samt rekombinant IL-4. Efter stimulering analyserades IL-6 produktionen med enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Syftet med studien var att karakterisera uttrycket av IL-4 receptorn på lymfom- och leukemiceller med flödescytometri och polymeras chain reaction (PCR) samt produktion av IL-6 med ELISA. ELISA-analysen visade att två cellinjer, stimulerade Sp53 och stimulerade samt kontroller av WaC3CD5+, gav en ökning av IL-6 produktionen. Vid jämförelse med ELISA-resultaten och flödescytometri-analyserna ser man att WaC3CD5+ som producerat stora mängder IL-6, har en liten andel IL-4 receptorer på cellytan. Resultatet av PCR-analysen visar att det var framförallt Sp53 som fick höga mängder IL-4R mRNA, men även I83, U2932 och WaC3CD5+ fick positiva resultat. Resultaten i denna studie är preliminära och för att få mer säkerställda resultat krävs att alla analyser görs om ett antal gånger för att få ett mer tillförlitligt resultat.

Nyckelord: ELISA, flödescytometri, IL-4 receptor, lymfom, PCR.

THE ROLE OF INTERLEUKIN 4 RECEPTOR (IL-4R) IN STIMULATION OF LYMPHOMA AND LEUKEMIA CELLS

EMMA SKOG

Skog, E. The role of interleukin 4 receptor (IL-4R) in stimulation of lymphoma and leukemia cells. *Degree Project, 15 Credit Points*. Biomedical Laboratory Science, Malmö University: Health and Society, Department of Biomedical Laboratory Science, 2011.

Cytokines or interleukins are signal peptides of low molecular weight, which regulates many important functions. They can roughly be divided into two groups or divisions due to their effect on cells. Interleukin 4 (IL-4), for example, belongs to the group growth factors while interleukin-6 (IL-6) belongs to the group activation or differentiation factors. IgM receptors or B cell receptors, BCR, are expressed on B cells and are membrane-bound immunoglobulins (mIg) and have two main functions: to convey signals that control B cell activation and to bind antigen which will then be presented to T cells. In the study B cells were activated with antibodies against IgM (anti-IgM) and recombinant IL-4. After stimulation the IL-6 production was analysed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The purpose of this study was to characterize the expression of IL-4 receptor in lymphoma and leukemia cells by flow cytometry and polymerase chain reaction (PCR) and furthermore the production of IL-6 by ELISA. ELISA analysis showed that two cell lines, stimulated Sp53 and stimulated and control of WaC3CD5+, resulted in an increased IL-6 production. When comparing ELISA results and flow cytometry assays, it can be seen that WaC3CD5+, which produced large amounts of IL-6, has a small percentage of IL-4 receptors on the cell surface. The results of the PCR analysis shows that particularly Sp53 displayed high amounts of IL-4 mRNA, but also I83, U2932 and WaC3CD5+ were positive for IL-4 mRNA. The results of this study are preliminary, and to get more trustworthy results, all analyses have to be repeated to get more reliable results.

Keywords: ELISA, flow cytometry, IL-4 receptor, lymphoma, PCR.

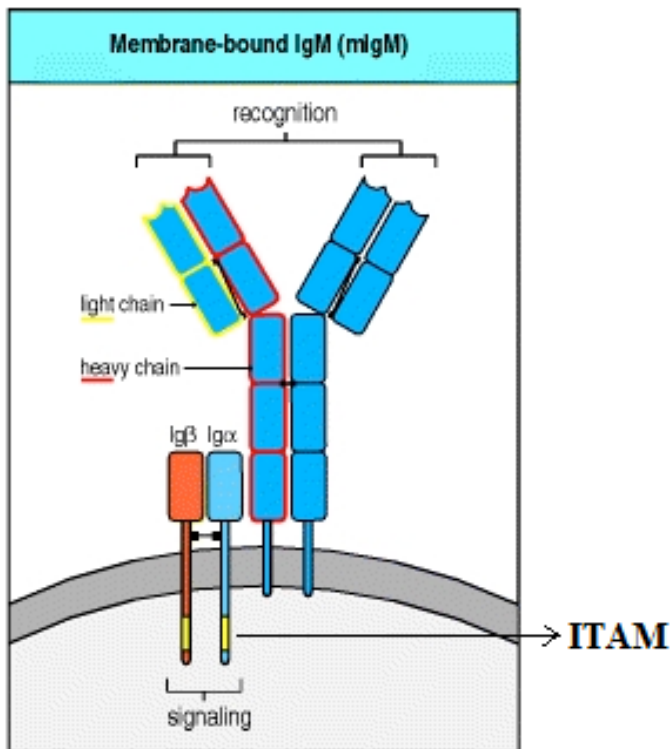
INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INLEDNING	5
Syfte	8
MATERIAL	9
Cellodling och cellräkning	9
Flödescytometrisk analys	9
Cellstimulering med anti-IgM och rekombinant IL-4	9
ELISA-analys	9
PCR-analys	10
METODER	11
Cellräkning	11
Flödescytometrisk analys	11
Cellstimulering med anti-IgM och rekombinant IL-4	11
ELISA-analys	12
Preparering av RNA till cDNA för PCR-analys	12
RESULTAT	15
Resultat ELISA-analys	15
Resultat flödescytometrisk analys	17
Resultat PCR-analys	18
DISKUSSION	19
Slutsats	20
REFERENSER	21

INLEDNING

Cytokiner eller interleukiner är signalpeptider med låg molekylär vikt som reglerar framförallt immunsystemets funktioner men även hematopoes och sårhäkning. De är vanligt förekommande som svar på mikroorganismers invasion i kroppen, vid allergiska reaktioner och vid immunbaserade- och inflammatoriska sjukdomar [1-2]. Endast en mycket liten koncentration av interleukiner kan påverka cellers yttre och inre miljö. Interleukiner kan verka på många olika sätt exempelvis parakrint eller autokrint. Det vill säga påverka celler lokalt på ett ställe (parakrin) eller påverka cellen som producerat interleukinen från början (autokrin) [2]. Interleukiner kan grovt delas in i två grupper och uppdelningen beror på vilken effekt de har på celler. Interleukin 4 (IL-4) till exempel kan tillhöra gruppen tillväxtfaktorer som kan stimulera celler till DNA-syntes medan interleukin 6 (IL-6) tillhör gruppen aktiverings- eller differentieringsfaktorer som kan stimulera mRNA- och proteinsyntes. Denna uppdelning är dock inte definitiv då de flesta interleukiner är pleiotropa det vill säga de påverkar celler olika beroende av celltyp och påverkan av andra interleukiner [1]. Det finns studier som visar att IL-4 kan fungera som en tillväxtfaktor för B-celler dessutom kan IL-4 ha en stor roll i utmognaden av B-celler [3].

IgM-receptorn eller B-cellsreceptorn, BCR, finns på B-celler och är membranbundna immunoglobuliner (mIg) som har två huvuduppgifter; att förmedla signaler som styr B-cellens utveckling samt att binda in antigen som sedan ska presenteras för T-celler. [1,4]. Proliferation och differentiering sker också via pre-BCR (förstadiet till BCR) och BCR hos pre-B-celler och mogna inaktiverade B-celler. När en inbindning sker fortplantas signalen genom BCR:s α - och β -kedjor som är transmembrana proteiner som innehåller sekvenser som benämns ITAM (immunoreceptor tyrosin-based activation motifs) [5]. Se figur 1 som visar ITAMs lokalisering på B-cellsreceptorn (BCR). Cellregleringen styrs av två olika sekvenser ITAM och ITIM där ITAM är den aktiverande, uppreglerade sekvensen och ITIM är den inhiberande, nedreglerande sekvensen. Fortsättningsvis kommer endast ITAM behandlas. Proteintyrosinkinaser (PTK) kommer att aktiveras och fosforilera ITAM vilket leder till ytterligare kaskadreaktioner som gör att bland annat kalciumjoner (Ca^{2+}) och proteinkinase C (PKC) frigörs. Dessa är ytterst viktiga för aktivering av olika proteinkinaser och transkriptionsfaktorer [6]. Transkriptionsfaktorer behövs vid transkriptionen när en gen (DNA-sekvens) ska avskrivas till en mRNA-kedja [1]. Dessa processer kan slutligen leda till cellmognad, cellöverlevnad, interleukinproduktion eller andra viktiga biologiska funktioner hos B-cellen [6]. IL-4 är en viktig interleukin som styr många biologiska aktiviteter. Den kan fungera som en co-stimulerande signal tillsammans med signaler genom B-cellens BCR. Signaler från IL-4 receptorn kan leda till stimulering och proliferation hos målceller samt utlösa B-cellens klassbyte från IgM till exempelvis IgG och IgE [2].



Figur 1. ITAMs lokalisation på B-cellsreceptorn (BCR). Ur Janeway, Travers, Walport och Shlomchik [2001, s. 239].

Under åren 2000 till 2006 drabbades cirka 1650 personer i olika typer av B-cellslymfom i Sverige. De vanligaste typerna är kronisk lymfatisk leukemi (KLL) och diffust storcelligt B-cellslymfom (DLBCL) medan mantelcellslymfom är en ovanligare typ [7].

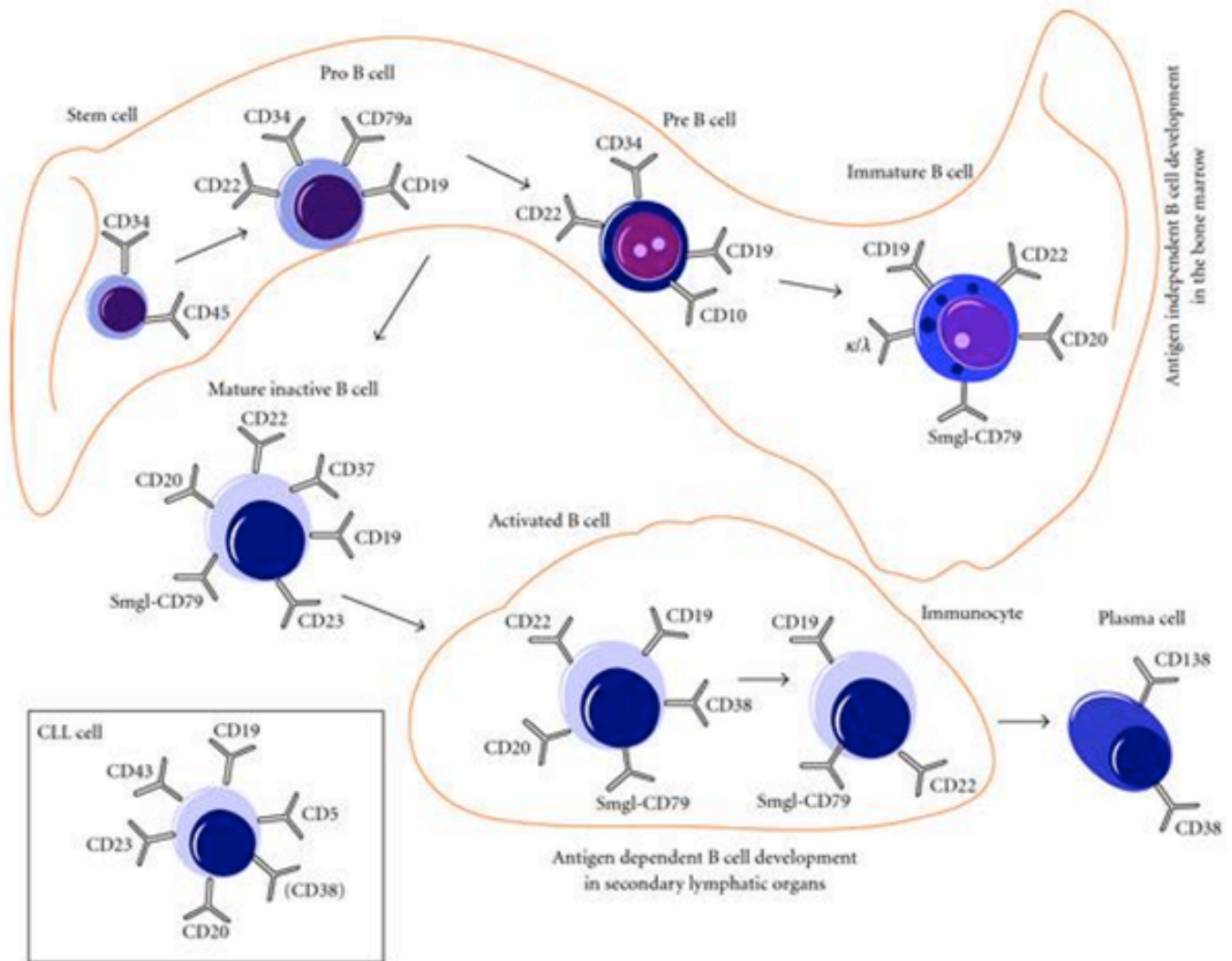
Maligna B-cellslymfom kan delas in i Hodgkins sjukdom (HD) och non-Hodgkin-lymfom (NHL). NHL kan sedan ytterligare delas in i två grupper; högmaligna och lågmaligna lymfom [8]. Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) är en aggressiv högmalign form av B-cellslymfom och den vanligaste formen av non-Hodgkins-lymfom. Den utgör cirka 30-40 % av alla NHL [9]. Varje år drabbas mellan 400-500 individer i Sverige och efter 4-6 år är överlevnaden cirka 50 % [7]. Symtomen är svullna lymfkörtlar på bland annat hals, buk och ljumskar. I cirka hälften av fallen drabbas patienterna av det så kallade B-symtomen; feber, nattliga svettningar och viktneidgång. Andra tecken är anemi och lymfocytopeni (lågt antal leukocyter i blodet) [8]. DLBCL utgörs av flera klassificeringar med skillnader i både vad gällande symtom, genetik, behandling och prognos. Genetiskt kan DLBCL delas in i två klasser; germinal center B-cells-typ (GCB) och aktiverad B-cells-typ (ABC). GCB-typen uttrycker gener som är karakteristiska för lymfocyter i germinalcenter medan ABC-typen uttrycker gener som genereras av in-vitro aktivering av B-celler. Den största skillnaden mellan dessa två klasser är att patienter med GCB-typen överlever i större utsträckning sin sjukdom än de som drabbats av ABC-typen. Studier visar att flera av generna som kopplas till överlevnad är IL-4 specifika målgener i B-celler [10].

Mantelcellslymfom (MCL) tillhör gruppen non-Hodgkin-lymfom av lågmalign typ. Den utgör cirka 2-8 % av non-Hodkin-lymfomen i USA, vilket gör den till en ovanligare form av lymfom. Den drabbar främst män i 60-årsåldern och har

liknande symtom som vid DLBCL. Diagnosen kan vara svår att ställa då den har liknande morfologiska drag som andra lymfom [11,12].

Kronisk lymfatisk leukemi (KLL) är den vanligaste formen av leukemi i västvärlden där över 30 % av leukemifallen utgörs av denna sjukdom bland vuxna individer [13]. Enligt svenska lymfomregistrets rapport för åren 2000 till 2006 har cirka 500 diagnoser av KLL ställts varje år [7]. KLL drabbar främst äldre män i 65-årsåldern och risken att drabbas av sjukdomen ökar med åldern. Före 30 års ålder är sjukdomen mycket sällsynt. Symtom uppkommer inte alltid men vanligt är förstörade lymfknotor och mjälte, lymfocytos (ökat antal lymfocyter i blodet), samt försämrat allmäntillstånd som kraftig viktnedgång och trötthet. Överlevnaden varierar inom Sverige samt om patienten är drabbad av andra sjukdomar men statistik från svenska lymfomregistret visar att överlevnaden efter sex år är cirka 50 % [7, 14].

KLL kännetecknas genom att drabba mogna B-celler och med hjälp av molekylärbiologiska tekniker som PCR (Polymeras Chain Reaction) kan drabbade B-celler inom en klon undersökas och om dessa tillhör samma klon uppvisar de samma rearrangemang av immunoglobulingenerna [14]. Detta sker då celler inom en klon uppvisar genetiskt helt lika celler eftersom de bildats från en enda cell genom celldelning [1]. Med hjälp av flödescytometrisk analys kan en mycket noggrann undersökning av till exempel B-celler i ett blodprov göras där enstaka maligna celler bland 10 000-100 000 normala lymfocyter kan detekteras. Analysen bygger på att identifiera cellers ytantigen med hjälp av fluorescerande antikroppar som kan binda in till dessa. KLL-celler uttrycker vanligtvis ytmarkörer som CD19, CD20 och CD23 i kombination med en T-cellsmarkör CD5. Det blir då dessa ytstrukturer som eftersöks med flödescytometri vid utredning om misstänkt KLL [15]. Figur 2 visar hur ytmarkörerna hos B-celler skiljer sig beroende på var i mognadsfasen cellen befinner sig i.



Figur 2. B-cellens ytstrukturer från stamcell till plasmacell, samt KLL-cell. Ur Uhrmacher, Erdfelder och Kreuzer [2010, s. 3].

Syfte

Syftet med studien är att karakterisera uttrycket av IL-4 receptorn tillsammans med B-cellsreceptorn på lymfom- och leukemiceller med flödescytometri, polymeras chain reaction (PCR) samt produktion av IL-6 med enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

MATERIAL

Vid all centrifugering om inget annat anges användes centrifug Heracus Multifuge 3s (DJB Labcare Limited, Buckinghamshire, England).

Cellodling och cellräkning

Tio cellinjer användes vid denna studie, U2946, U2932 och U2940 är DLBCL-cellinjer och kommer från Avdelning för genetik och patologi, Uppsala universitet, Uppsala, Sverige. HG3, 232B4, CorinaI, WaOsel, I83 och WaC3CD5+ är KLL-cellinjer och kommer från Professor Anders Rosén, Linköping universitet, Linköping, Sverige. Cellinjen Sp53 är mantelcellslymfom och kommer från Immunteknologi, Lunds tekniska högskola,

Lunds universitet, Lund, Sverige.

Som medium användes RPMI 1640 från Invitrogen (San Diego, California, USA) som innehåller L-Glutamine. Till detta medium tillsattes även 50 ml FCS (fetalt kalv serum) så att koncentrationen i mediet blev 10 % FCB. Även 50 µg/ml Gentamicin (Invitrogen) tillsattes som verkar antibakteriellt. Cellerna inkuberas i inkubator Hera cell från Heraeus vid 37° C och 5 % CO₂ (DJB Labcare Limited). Vid cellräkning användes 0,4 % trypan blue stain (Invitrogen) och en Bürkers räknekammare (Digital Bio, Seoul, Sydkorea).

Flödescytometrisk analys

Som primärantikropp användes mus anti-human interleukin-4 receptor (AbD Serotec, Oxford, United Kingdom) och som sekundärantikropp användes polyclonal get anti-mus Ig/FITC eller polyclonal get anti-mus Ig/PE (DAKO, Glostrup, Danmark). Buffertlösning PBS (pH 7,2) med 0,5 % BSA (Albumin, from bovine serum, Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) användes samt 5 ml flödescytometrirör (Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland). Analysen utfördes med Accuri C6 Flowcytometer (Accuri Cytometers, Ann Arbor, Michigan, USA).

Cellstimulering med anti-IgM och rekombinant IL-4

Cellinjerna stimulerades med rekombinant IL-4 0,1 µg/ml (PeproTech EC, London, England) och anti-human IgM 1 µg/ml (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA).

ELISA-analys

Vid ELISA-analysen användes mus anti-human IL-6 som fångstantikropp, biotinylerad get anti-human IL-6 som detektionsantikropp, rekombinant IL-6 som standard, Streptavidin- Horseradish-peroxidas (HRP) som binder till biotinmolekylen på detektionsantikroppen. HRP är ett enzym som bryter ner substratet till en färgad produkt som mättes med PowerWave Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, Vermont, USA). Lösningarna som användes var PBS-buffert, tvättbuffert med 0,05 % Tween®20 i PBS, blockeringsmedel med 1 % BSA i PBS, substratlösning som bestod av lika delar väteperoxid och tetrametylbenzidine (TMB) samt stopplösning som bestod av 1M svavelsyra. Allt material kommer från R&D Systems Inc (Minneapolis, Minnesota, USA) om inget annat anges.

PCR-analys

RNA preparations-kit innehåller lysis solution, merkaptoetanol (10 µl/ml), tvättlösning, elueringsbuffert, GenElute filtrationskolonner i tuber, GenElute bindningskolonner i tuber och uppsamlingsrör som kommer från Sigma Aldrich. För att mäta RNA-koncentrationen användes NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer från Saveen Werner (Malmö, Sverige).

När RNA preparerades till cDNA användes Verso™ cDNA Kit som innehåller Verso enzymmix (innehållande reverse transcriptas), cDNA Synthesis Buffer, oligo-dT primers (500 ng/µl), hexamerer (400ng/µl), dNTP mix (5mM av varje) samt RT enhancer. Materialet för cDNA-preparering kommer från Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Centrifugen Biofuge Pico Heraeus (DJB Labcare Limited) användes.

PCR-utrustning för analysen var LightCycler® Carousel-Based System och

reagensen för PCR-analys var LightCykler® FastStart Enzyme, LightCykler® FastStart Reaction Mix SYBR Green I, magnesiumklorid 25mM och PCR- H_2O , allt kommer från Roche (Basil, Schweiz). Annat material som användes var sterila och nukleasfria pipettspetsar (VWR, West Chester, Pennsylvania, USA) och eppendorfrör (Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland).

Primers till PCR-analys var human IL-4 receptor (IL-4R) Forward och human IL-4R Reverse (Invitrogen). Som referensgen användes Human β -aktin Forward och Human β -aktin Reverse (Invitrogen). Tabell 1 ger sekvensen av primern för IL-4 receptorn samt sekvensen av primern för β -aktin.

Tabell 1. Primerparens nukleotidsekvens.

Human IL-4R Forward	Human IL-4R Reverse
AGGGCCTGGGCTCAGTGCTATA	GACATAGCACAAACAGGCAGACGGC
Human β-aktin Forward	Human β-aktin Reverse
5'CGCCAGCTCACCATGGATGATGAT3'	5'TCTCTTGCTCTGGGCCTCGTCG3'

METODER

Metoderna författaren har använt redovisas under respektive rubrik. Cellräkning utfördes före flödescytometrisk analys, cellstimulering och preparering av RNA till cDNA för PCR-analys.

Cellräkning

Cellerna räknades i Bürkers räknekammare med hjälp av trypan blue stain som färgade in döda celler i en blå färg. De levande cellernas cellmembran var ogenomträngligt för denna färg. 50 μ l celler blandades med 50 μ l trypan blue stain och 10 μ l från denna lösning sattes ut i räknekammaren. Med hjälp av ett mikroskop räknades tre A-rutor (totalt nio i en räknekammare) och ett medelvärde beräknades. Cellantalet per milliliter räknades ut och önskad cellvolym överfördes till rör för vidare analys.

Flödescytometrisk analys

Före analysen räknades cellerna i Bürkers räknekammare enligt rubrik cellräkning. Vid den flödescytometriska analysen användes en miljon celler/ml. Till rören med respektive cellinje överfördes även 5 ml PBS-buffert pH 7,2 innehållande 0,5 % BSA (bovine serum albumin). Därefter centrifugerades cellerna 300 x g i fem minuter. Supernatanten pipetterades bort och cellerna resuspenderades i 300 μ l PBS-buffert. Rören med cellinjer delades upp i tre rör per cellinje med 100 μ l i varje rör. Första röret var en kontroll som endast innehöll celler. Andra röret innehöll celler och 1 μ l sekundär antikropp som fungerade som en kontroll mot specifik bindning. Tredje röret innehöll celler samt 1 μ l primärantikropp och 1 μ l sekundär antikropp.

Den primära antikroppen tillsattes först och därefter inkuberades rören mörkt och på is i 20 minuter. Till rören tillsattes sedan 2 ml PBS-buffert och rören centrifugerades i 300 x g i fem minuter. Supernatanten pipetterades bort och

cellpelleten resuspenderades i buffertlösning. Den sekundära antikroppen tillsattes och på nytt inkuberades cellerna i 20 minuter mörkt och på is. 500 µl PBS-buffert tillsattes per rör och cellerna centrifugerades i 300 x g i fem minuter. Supernatanten pipetteras bort och ytterligare 500 µl PBS-buffert tillsätts. Cellerna analyserades därefter i flödescytometern.

Cellstimulering med anti-IgM och rekombinant IL-4

Vid cellstimuleringen användes en miljon celler per brunn och då totalt två miljoner celler per cellinje då det behövdes en kontrollbrunn och en brunn för stimulering. Cellerna centrifugerades 300 x g i fem minuter och supernatanten kasserades. 1 ml nytt medium tillsattes till varje rör. Cellinjerna sattes ut i 24-hålsplattor, 500 µl av varje cellinje i två brunnar. Till de brunnar som skulle stimuleras tillsattes 1 µl av 1 µg/ml anti-IgM och 5 µl av 0,1 µg/ml rekombinant IL-4. Cellerna inkuberades i inkubatorn i 37°C i tre dagar. Efter inkubation överfördes all cellsuspension till rör som centrifugerades vid 300 x g i fem minuter. Därefter överfördes supernatanten till eppendorfrör och förvarades vid 4°C i väntan på ELISA-analys.

ELISA-analys

Till ELISA-analysen användes supernatanten från de cellinjer som stimulerades samt dess kontroller. Innan analys preparerades en 96-brunnsplatta som täcktes med en mus-anti-human IL-6-antikroppslösning med koncentrationen 2,0 µg/ml som späts i PBS. Plattan inkuberades under en timme i inkubatorn vid 37 °C. Därefter tvättades alla brunnar noggrant tre gånger med 200 µl tvättbuffert per brunn som bestod av 0,05 % Tween®20 i PBS för att få bort antikroppar som inte bundit till plattan. Efter tvättningssteget tillsattes ett blockningsmedel som blockerade alla "fria" ytor i plasten så ingen antikropp kunde binda in till plasten och orsaka ospecifik bindning. Som blockningsmedel användes 1 % BSA (Bovint Serum Albumin) i PBS. 96-hålsplattan inkuberades därefter över natten i 4°C.

Nästa dag tvättades plattan igen på samma sätt som ovan. Som standardlösningar gjordes en seriespädning med rekombinant IL-6 standard med koncentrationerna 600 pg/ml, 300 pg/ml, 150 pg/ml, 75 pg/ml, 37,5 pg/ml, 18 pg/ml, 9 pg/ml och 0 pg/ml i 1 % BSA i PBS-buffert. Tre brunnar per koncentration av standarden (trippelprov) sattes ut med totalt 100 µl per brunn. Proven från cellstimuleringen sattes ut i två brunnar per prov (dubbelprov) med totalt 100 µl per brunn. Sedan inkuberades plattan i rumstemperatur under två timmar. Efter inkubering tvättades plattan enligt ovan och 100 µl detektionsantikropp med koncentrationen 200 ng/ml späd i 1 % BSA i PBS sattes ut till alla brunnar. Därefter inkuberades plattan igen under två timmar. Efter inkubering tvättades plattan enligt ovan och 100 µl per brunn av Streptavidin-HRP i 1 % BSA i PBS sattes ut och inkuberades under 20 minuter. Efter inkubering tvättades plattan ännu en gång enligt ovan och 100 µl substratlösning som bestod av lika delar väteperoxid och tetrametylbenzidine (TMB) tillsattes och inkuberades i 20 minuter. Därefter tillsattes 50 µl 1M svavelsyra till alla brunnar. Svavelsyran fungerade som en stopplösning. Direkt efter att stopplösningen tillsattes mättes absorbansen vid 450 nm i spektrofotometern.

Preparering av RNA till cDNA för PCR-analys

En miljon celler per cellinje tvättades två gånger med PBS, vid varje tvätt centrifugerades cellerna i 300 x g i fem minuter. Till lyslösningen tillsattes 10 µl merkaptoetanol per 1 ml lyslösning och cellerna lyserades med 250 µl lysis

solution. Lysatet filtrerades i GenElute filtrationskolonn och centrifugerades i 12 000 x g i två minuter. Därefter preparerades RNA:t för inbindning genom att 250 µl 70 % etanol tillsattes i rören. All celllysat pipetterades över i en GenElute bindningskolonn och kolonnerna centrifugerades 12 000 x g i 15 sekunder. Vätskan som trängde igenom kasserades och 500 µl tvättlösning tillsattes till varje rör som återigen centrifugerades 12 000 x g i 15 sekunder. Kolonnen där RNA hade bundit in överfördes till ett rent rör och en tvättlösning innehållande etanol tillsattes och rören centrifugerades 300 x g i fem minuter. Vid det tredje tvättsteget tillsattes ytterligare 500 µl av tvättlösningen innehållande etanol och rören centrifugerades 12 000 x g under två minuter. RNA:t som bundit in elueras ut från kolonnen genom att 50 µl elueringslösning tillsattes till varje rör. Den eluerade RNA-koncentrationen mättes med en Nanodrop spektrofotometer för att få en uppfattning om hur stor mängd RNA som renats fram. Cellinjers RNA-koncentration presenteras i tabell 2.

Tabell 2. Koncentrationen av hela det erhållna RNA:t.

Cellinje	RNA-koncentration (ng/µl)
I83	145
232B4	62,1
U2932	54,1
HG3	50,2
Sp53	42,7
CorinaI	62,3
WaC3CD5+	364,4
U2932	52,0
WaOsel	89,3

Vid preparering av RNA till cDNA gjordes en reaktionsmix för varje cellinjes RNA-template enligt tabell 3. Därefter tillsattes 5 µl RNA-template från respektive cellinje till nya rör. Rören sattes ner i en värmeplatta med temperaturen 42° C i 30 minuter där cDNA-syntes skedde. Efter 30 minuter inaktiverades tillverkningen av cDNA då rören sattes i en värmeplatta med temperaturen 95° C.

Tabell 3. Innehållet i reaktionsmixen samt volymen av respektive komponent som behövdes till varje prov av respektive cellinjes RNA-templat för cDNA-tillverkning.

Komponent i reaktionsmixen för cDNA	Volym av respektive komponent (µl)
5X cDNA syntesbuffert	4
dNTP Mix	2
Random hexamers	1
RT Enhancer	1
Verso Enzyme Mix	1
PCR H ₂ O	6

Inför PCR-analysen späddes cDNA:t 1:5 med dubbeldestillerat vatten. Primerkoncentrationerna späddes till 10 µM/l med dubbeldestillerat vatten. PCR-

reaktionsmix blandades så att slutvolymen per reaktion blev 7,5 µl. Se tabell 4 för volymen av de olika komponenterna i PCR-mixen. PCR-mixen tillbereddes för varje primerpar på is därefter placerades glaskapillärer i en kylplatta, två glaskapillär för varje prov (dubbelprov) samt blank (dubbeldestillerat vatten istället för cDNA). Som kontroll användes en primer för β-aktin, en housekeeping-gen som fungerade som kontroll då den uttrycks konstant för varje cellinje. 7,5 µl av PCR-mixen pipetterades till varje glaskapillär, därefter pipetterades 2,5 µl cDNA till respektive kapillär. Glaskapillärerna förslöts och centrifugerades vid 12 000 x g i 10 sekunder. Därefter placerades kapillärerna i PCR-maskinen och reaktionerna startades.

Tabell 4. PCR-mixens innehåll samt volymen av vardera komponent för en reaktion.

PCR-mix innehåll	Volym (µl)
Master mix	1
Primer 1 Forward	0,5
Primer 2 Reverse	0,5
Magnesiumklorid	1,2
Dubbeldestillerat vatten	4,3

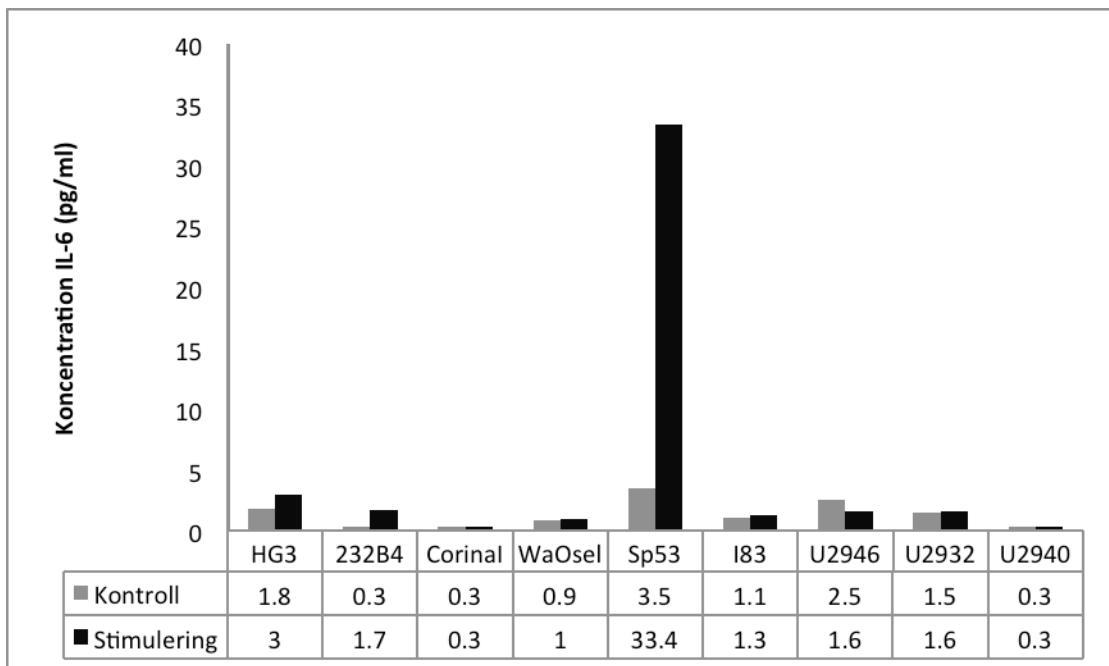
RESULTAT

Nedan visas resultatet av ELISA-analys, flödescytometrisk analys samt PCR-analys under respektive rubrik.

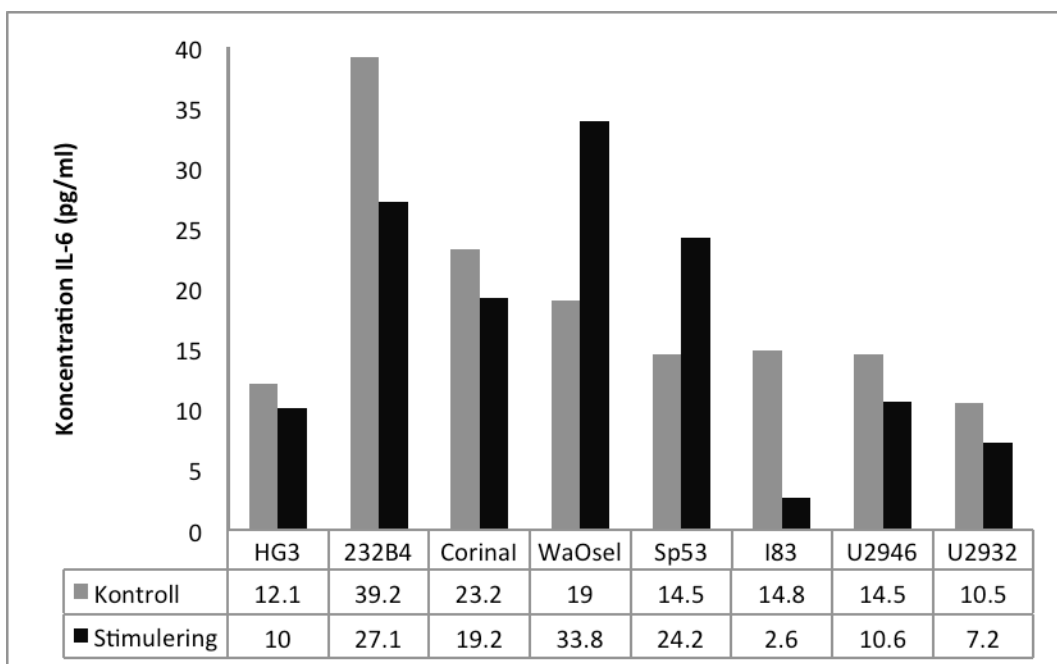
Resultat ELISA-analys

Med hjälp av spektrofotometern Power Wave Microplate Spectrophotometer analyserades cellsuspensionerna vid 450 nm. ELISA-analysen utfördes vid tre olika tillfällen och vid samtliga körningar gjordes dubbelprover av varje cellinje.

I figur 1 redovisas resultaten från den första ELISA-analysen. I figuren under stapeldiagrammet finns exakta numeriska värden beskrivna för att ge en snabb överblick av de ingående resultaten. "Kontroll" i figuren är de celler som inte stimulerats med antikroppar och "Stimulering" är de celler som har stimulerats med anti-IgM och rekombinant IL-4. Figur 2 visar resultatet för den andra ELISA-analysen.



Figur 1. Produktionen av IL-6 utan (kontroll) och med stimulering för respektive cellinje.



Figur 2. Produktionen av IL-6 utan (kontroll) och med stimulering för respektive cellinje.

Den tredje ELISA-analysen gav ett resultat även för WaC3CD5+ som vid de två tidigare analyserna fått för hög absorbans för att kunna ge ett säkerställt resultat. Vid den tredje ELISA-analysen fick cellinjen dock spädas 1:5. Koncentrationen av IL-6 för WaC3CD5+ blev för icke stimulerade kontrollceller 763,3 pg/ml och för stimulerade celler 738,3 pg/ml (visas ej).

WaC3CD5+ stimulerades vid ett tillfälle med både anti-IgM och rekombinant IL-4 samt stimulering med endast anti-IgM. Skillnaderna mellan de olika

stimuleringarna blev mycket liten med endast en blygsam ökning i IL-6 produktionen hos de celler som endast stimulerades med anti-IgM (visas ej).

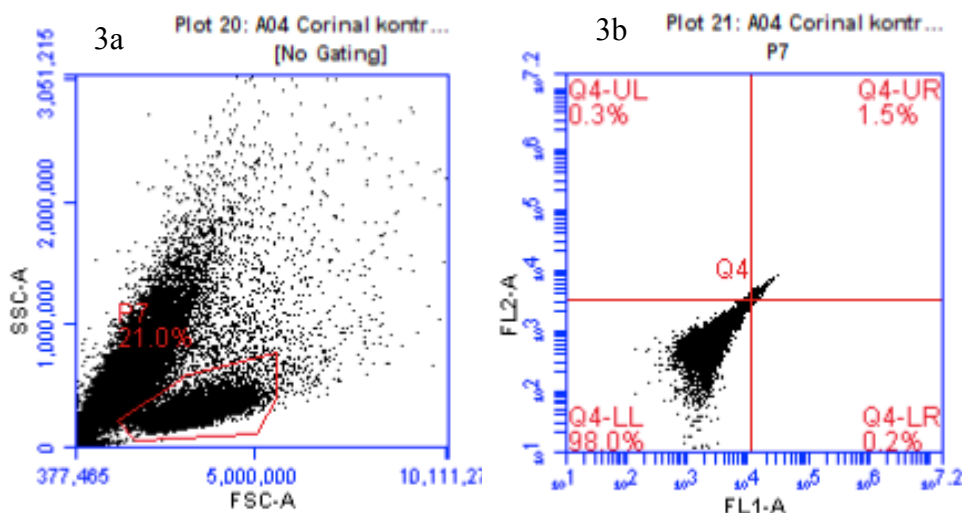
Resultat flödescytometrisk analys

Vid den flödescytometriska analysen har primärantikroppar mot IL-4 receptorn tillsatts till cellinjerna samt en fluorokromkonjugerad sekundärantikropp riktad mot primärantikroppen. Fluorokromen på sekundärantikroppen kommer vid analysen avge fluorescens som kan detekteras med Accuri C6 Flowcytometer. Det är endast de celler som har primär- och sekundärantikropp inbundna som avger fluorescens och räknas som positiva. Resultatet redovisas i tabell 5.

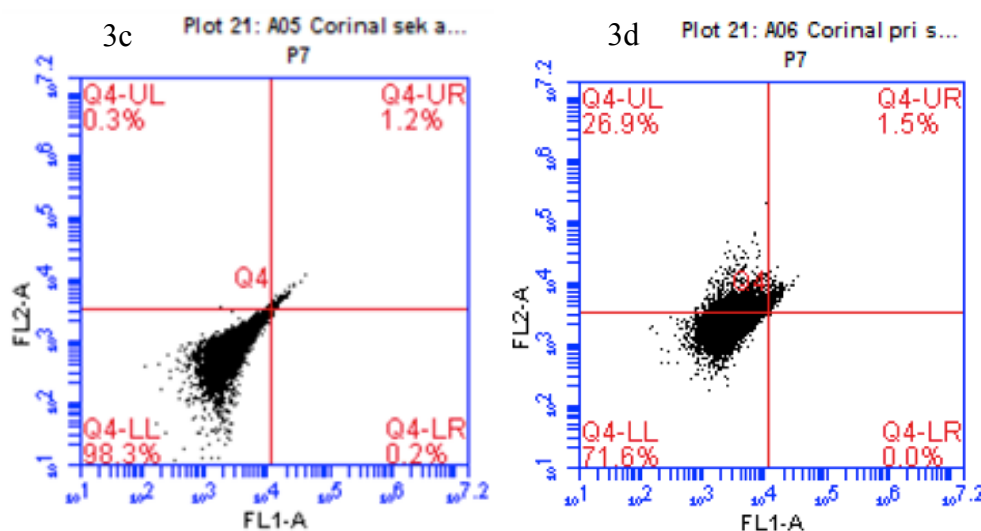
Tabell 5. Andelen positiva celler för respektive cellinje.

Cellinje	Procent positiva celler
HG3	18,4 %
232B4	9,4 %
Corinal	26,9 %
WaOscl	11,0 %
Sp53	8,3 %
I83	0,8 %
U2946	0,3 %
U2932	6,5 %
WaC3CD5+	1,1 %

Figur 3a-b och 3c-d visar ett exempel på hur resultatet kan presenteras vid en flödescytometrisk analys. I detta fall är det cellinjen Corinal som visas. Varje prick i figurerna motsvarar en cell. Figur 3a visar FSC eller forward scatter som mäter cellens storlek samt SSC eller side scatter som mäter cellens granularitet. Figur 3b visar resultatet för provet där inga antikroppar har satts till och fungerar som kontroll. Figur 3c presenterar om det skett någon ospecifik inbindning, till detta prov har endast sekundärantikroppar tillsatts. Denna figur ska likna 3b för att utesluta ospecifik bindning. Figur 3d visar ett starkt positivt resultat där celler inkuberats med både primärantikropp och sekundärantikropp. Cellerna som presenteras i kvadratens vänstra hörn i figur 3d är positiva och har IL-4 receptorn på sin cellyta. Andelen celler som är positiva är 26,9 % och visas i kvadratens översta hörn till vänster.



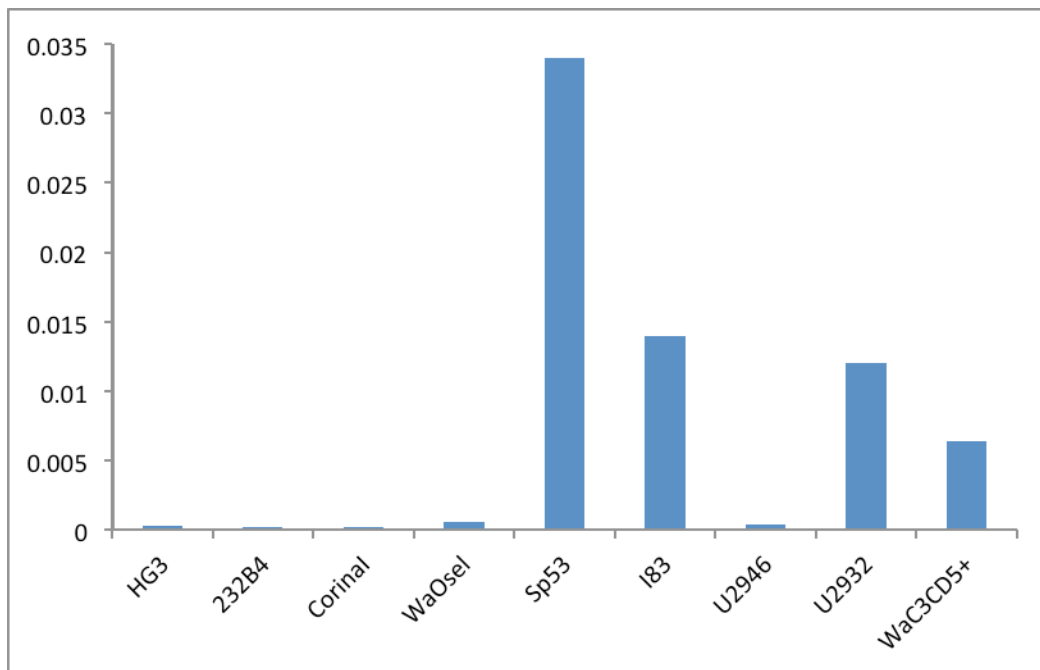
Figur 3a-b. Ett exempel på hur cellinjen CorinaI kan presenteras vid en flödescytometrisk analys, där figur 3a visar FSC (forward scatter) samt SSC (side scatter). Inom omringat området finns B-celler medan området utanför visar skräp. Figur 3b visar hur cellerna placeras när inga antikroppar tillsätts.



Figur 3c-d. Ett exempel på hur cellinjen CorinaI kan presenteras vid en flödescytometrisk analys där cellerna i figur 3c endast har fått sekundärantikroppar tillsatta. Figur 3d visar ett starkt positivt resultat där celler inkuberats med både primärantikropp och sekundärantikropp.

Resultat PCR-analys

Varje cellinjes mRNA som renades fram omvandlades till stabilt cDNA som kan användas och amplifieras vid en PCR-analys. Cellerna var ostimulerade när mRNA:t renades fram. Målet med PCR-analysen var att få reda på den relativa mängden mRNA för IL-4 receptorn. Med hjälp av housekeeping-genen β -aktin som har samma uttryck oavsett stimuli kan ett relativt värde beräknas fram som en kvot. Proverna analyserades med PCR-utrustningen LightCycler®Carousel-Based System, vid ett försök. Varje cellinjes kvot från försöket presenteras i figur 4.



Figur 4. Den relativa mängden IL-4R mRNA av respektive cellinje.

DISKUSSION

Denna studie har undersökt hur interleukin 4 (IL-4) tillsammans med B-cellsreceptorn, BCR (IgM-receptorn), kan påverka lymfom- och leukemicellers produktion av IL-6 och om det finns något samband mellan cellernas mängd av IL-4R på cellmembranet och hög utsöndring av IL-6. Dessutom var syftet även att få en relativ uppfattning om mängden IL-4R på mRNA-nivå och se om den kan kopplas till proteinnivån av IL-4R på cellmembranet.

Tio cellinjer har valts ut till försöken där HG3, 232B4, Corinal, WaOsel, I83 och Wa3CD5+ är KLL-cellinjer medan U2946, U2932 och U2940 är DLBCL-cellinjer. Sp53 tillhör gruppen mantelcellslymfom.

Som positiv kontroll användes U2932 samt Sp53. Dessa cellinjer producerar höga mängder IL-6 vid stimulering via IL-4-receptorn och B-cellsreceptorn (BCR). Dock har U2932 inte visat detta i resultaten. I både författarens resultat samt andra studenters resultat har detta uppmärksamats. Troliga förklaringar till detta kan vara att cellinjen har förväxlats med en annan cellinje eller så har cellinjen förändrats och är inte längre mottaglig för påverkan av kombinationen IL-4 och IgM. Dock har Sp53 visat de förväntade värdena och kan därför användas som en positiv kontroll.

Produktionen av IL-6 som påvisats med ELISA har gett två utstickande cellinjer, Sp53 som förväntat gett en rejäl ökning vid nästan varje körning samt Wa3CD5+ som vid varje ELISA producerat stora mängder IL-6 både hos kontrollceller och stimulerade celler. Denna cellinje har producerat ibland 100 gånger mer IL-6 än hos andra cellinjer. Detta tyder på att IL-4 inte påverkar cellinjen till att stimulera IL-6 utan andra faktorer styr dess produktion. Då cellinjen stimulerades med endast anti-IgM skapades en liten, kanske obetydlig,

ökning av IL-6 än hos kontrollen och stimuleringen med rekombinant IL-4 och anti-IgM. En hög IL-6 produktion har kopplats ihop med cytostatikaresistens i flera tumörtyper. Betyder detta att WaC3CD5+ är svårare att döda med cytostatika än de andra cellinjernas celler som producerar mindre IL-6? I nuläget finns inget svar på frågan men kliniska läkemedelsprövningar har visat blandade resultat där det testas om IL-6-inhiberande cytostatika kombinerat med anti-IL-6-terapi kan minska cellernas aggressivitet [16].

Vid vidare tolkning av ELISA-resultaten har vid enstaka analyser en rejäl höjning av IL-6 produktionen observerats hos HG3 och WaOsel men i andra analyser är höjningen obetydlig. I de andra cellinjerna som till exempel CorinaI, I83, U2946, 232B4 och U2932 har en betydande höjning aldrig kunnat observeras i någon av analyserna.

Vid jämförelse av ELISA-resultaten och flödescytometrianalyserna syns det direkt att WaC3CD5+ som producerat stora mängder IL-6, inte har stor andel IL-4 receptorer på cellytan. Detta verkar stämma överens med ELISA-resultaten då de stimulerade cellerna förväntas öka produktionen av IL-6 då de stimuleras av rekombinant IL-4. Men om cellerna inte har några IL-4 receptorer kommer ingen stimulering kunna ske. Vid jämförelse med de cellinjer som inte gett någon höjning av IL-6 i de stimulerade proven med deras andel IL-4 receptorer verkar resultaten stämma överens även här, I83, U2946, U2932 har låg andel IL-4 receptorer. Dock skiljer sig två cellinjer från mängden; 232B4 och CorinaI. Dessa cellinjer visar låg produktion av IL-6 men hög andel IL-4 receptorer. I CorinaI cellinjen har 26,9 % av cellerna IL-4 receptorer på cellytan. Det borde bli en högre mängd IL-6 men som tidigare har berättats så styrs en B-cellantigensaktivering av komplexa processer där många faktorer påverkar cellens slutliga uttryck, som till exempel att bilda IL-6. Kanske har signalen inte varit tillräcklig stark eller så har en stor del av cellerna inte mått bra vid inkuberingen efter cellstimuleringen vilket gjort att de inte kunnat producera IL-6. En annan anledning kan vara att receptorn ej fungerar korrekt vilket gör att en IL-6 produktion inte kan startas [5].

Sp53 var en av de cellinjer med högst andel IL-4 receptorer på cellytan tillsammans med HG3 och WaOsel. Sp53 har gett höga produktioner av IL-6 nästan varje gång, HG3 och WaOsel vid enstaka tillfällen vilket kan kopplas ihop med deras höga andel IL-4 receptorer enligt flödescytometrianalysen.

Målet med PCR-analysen var att få reda på den relativa mängden mRNA för IL-4 receptorn och sedan jämföra mRNA-uttrycket med proteinuttrycket. Författaren har använt sig av en housekeeping-gen istället för standardprover då detta kan ge lika goda resultat som användning av standardprover, dock kan aldrig ett exakt värde erhållas [17]. Resultatet av PCR-analysen visar att det var framförallt Sp53 som fick höga mängder IL-4R mRNA, men även I83, U2932 och WaC3CD5+ fick positiva resultat. De andra cellinjernas relativa mängd var låg och obetydlig. Det är dock förvånande att CorinaI inte hade högre relativ mängd IL-4R mRNA då cellinjen hade 25 % positiva celler i flödescytometrianalysen. På samma sätt hade HG3 en relativt hög andel positiva celler men låg relativ mängd IL-4R mRNA. Generellt borde en hög mängd IL-4R mRNA ge hög andel IL-4 receptorer och omvänt en låg mängd IL-4 mRNA borde ge låg andel IL-4 receptorer. Detta kan åskådliggöras hos U2946 som har låg andel IL-4R samt en låg mängd IL-4R mRNA.

Slutsats

Resultaten i denna studie är preliminära och för att få mer säkerställda resultat krävs att alla analyser görs om ett antal gånger för att få ett mer tillförlitligt resultat. Dessutom kan ytterligare studier behövas där endast B-cellsreceptorn stimuleras och som sedan kan jämföras med resultaten från IL-4 receptorn. Det framtida värdet av studien tillsammans med andra studier inom ämnet leder förhoppningsvis till ökad förståelse av skillnader och likheter mellan olika lymfom- och leukemiceller.

REFERENSER

1. Agger, R., Andersen, V., Leslie, G. & Aasted, B. (2006). *Immunologi*. Studentlitteratur: Lund.
2. Skinnider, B. & Mak, T. (2002). The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood Journal*. 99:4283-4297.
3. Sarosjek, K., Nechushtan, H., Xiaoqing, L., Rosenblatt, J. & Lossos, I. (2009). Interleukin-4 Distinctively Modifies Responses of Germinal Center-like and Activated B-cell-like Diffuse Large B-cell Lymphomas to Immuno-chemotherapy. *Br J Haematol*. 147(3): 308-318.
4. Niir, H. & Clark, E. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature Reviews Immunology*, 2:945-956.
5. Campbell, K. (1999). Signal transduction from the B cell antigen-receptor. *Current Opinion in Immunology*, 11:256-264.
6. Billadeau, D. & Leibson, P. (2002). ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 109:161-168.
7. Svenska Lymfomregistret Rapport för år 2000-2006
><http://www.ocsyd.se/VP-verksamhet/Kvalitetsreg/SvenskalymfomregistretRapport2000-2006.pdf><
110419
8. Glimelius, B. (1999). Maligna lymfom. I: Gahrton, G. & Lundh, B. (Eds) *Blodsjukdomar, lärobok i hematologi*. Natur och kultur: Stockholm.
9. Alizadeh, A., Eisen, M., Davis, E., Ma, Chi., Lossos, I., Rosenwald, A., Boldrick, J., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J., Yang, L., Marti, G., Moore, T., Hudson, J., Lu, L., Lewis, D., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W., Greiner, T., Weisenburger, D., Armitage, J., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M., Byrd, J., Botstein, D., Brown, P. & Staudt, L. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403:503-511.
10. Lu, X., Nechushtan, H., Ding, F., Rosado, M., Singal, R., Alizadeh, A. & Lossos, I. (2005). Distinct IL-4-inducible gene expression, proliferation, and intracellular signaling in germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large-cell lymphomas. *Blood journal*, 105:2924-2932.

11. Hankin, R. & Hunter, S. (1999). Mantle Cell Lymphoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 123:1182-1188.
12. Barista, I., Romaguera, J. & Cabanillas, F. (2001). Mantle-cell lymphoma, *Lancet Oncology*, 3:141-148.
13. Wren, C., Moriarty, H., Marsden, K. & Tegg, E. (2009). Cytogenetic investigations of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 198: 155-161.
14. Juliusson, G. (1999). Kronisk lymfatisk leukemi. I: Gahrton, G. & Lundh, B. (Eds) *Blodsjukdomar, lärobok i hematologi*. Natur och kultur: Stockholm.
15. Uhrmacher, S., Erdfelder, F. & Kreuzer K-A. (2010). Flow Cytometry and Polymerase Chain Reaction-Based Analyses of Minimal Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Advances in Hematology*, 2010:1-11
16. Emmenegger, U. & Kerbel, R. (2010). Chemotherapy counteracted. *Nature*, 468:637-638.
17. Livak, K. & Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, 25:402-208.