

Multicolor flowcytometrisk immunfenotyping for B- cellepopulasjoner i blod- og benmargsprøver

Ingunn Østlie

Cellebiologi for medisinsk/teknisk personell
Oppgaven levert: Juni 2011
Hovedveileder: Berit Johansen, IBI

Forord

Arbeidet bak denne masteroppgaven ble gjennomført ved Avdeling for Flowcytometri på Patologiklinikken OUS, Radiumhospitalet fra 2009 til 2011. Jeg vil gjerne takke min arbeidsgiver for muligheten jeg har fått til å kombinere skolegang med min daglige jobb. Dette har også ført til en svært hektisk periode, men alt jeg har fått ut av disse to årene både av ny kunnskap og i tillegg til muligheten for utvikling av mer effektive metoder for eget laboratorium gjør at det uten tvil har vært verdt strevet.

Jeg vil først og fremst takke min faglige veileder Dr. Anne Tierens som med sin store faglige kunnskap har vært uvurdelig i dette arbeidet. Takk også til hovedveileder Berit Johansen ved NTNU som har hjulpet med praktiske spørsmål. En takk rettes også til Hematopatologigruppen med Dr. Jan Delabie i spissen som kom med innspill og hjelp underveis. Jeg vil også gjerne takke mine kollegaer ved Flowlaben. Noen har hjulpet til med uttesting, og alle har vært veldig tålmodige overfor en travel student, spesielt de siste månedene. Tusen takk til Kristin Udjus, Vivian Wang, Ravneet Gill, Staffan Eidhagen, Oddveig Kjøsnes, Thao Nguyen, Hiep Dong, Bang Tam Tran, Hong Bich Tran, Svetlana Nazarova og Anette Vefferstad.

Jeg vil også rette en takk til mine gamle kollegaer Hanne Elisabeth Lunde og Anita Mikalsen ved Avdeling for medisinsk biokjemi på Lovisenberg Diakonale Sykehus for hjelp med oppfriskning av statistiske metoder. Kristin Brandal og Ingunn Stav Johanssen - jeg hadde aldri klart meg uten dere i to lange, vindfulle høstuger i Trondheim.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke foreldre, søster og venner som jeg har hatt rundt meg denne tiden. Kjære Hans Olav har vært der for meg gjennom alle opp- og nedturer. I tillegg til god hjelp med korrekturlesing du alltid gitt meg humøret og motivasjonen tilbake i de hardeste periodene, og ventet tålmodig hjemme med sene middager. Kunne ikke gjort dette uten deg!

Oslo, juni 2011

Ingunn Østlie

Sammendrag

Denne oppgaven har hatt som mål å finne egnede multicolor antistoffkombinasjoner for identifisering av B-cellepopulasjoner i blod og benmarg ved hjelp av flowcytometrisk immunfenotyping. B-cellepopulasjoner av interesse er maligne B-cellekloner ved ulike typer B-cellelymfomer, og i tillegg normale B-cellepopulasjoner i blod som undersøkes i forhold til immunsvikttilstander. Dette innebærer å velge ut passende antistoffkloner og fluorokromer som kan benyttes sammen i antistoffkombinasjoner. For å stadfeste dette er det blitt utført titrering av alle antistoffer og annen kvalitetssikring av kombinasjonene, noe som har vært vellykket med noen få unntak. I tillegg er de nye multicolor-kombinasjonene sammenlignet med gammel metode. De to metodene viser ingen signifikant forskjell fra hverandre på 5 % nivå.

For å identifisere maligne B-cellekloner er det tatt utgangspunkt i europeiske retningslinjer utarbeidet av EuroFlow-konsortiet. Fem multicolor-kombinasjoner er testet ut og tatt i bruk, og ved hjelp av avanserte analysestrategier med spesialtilpasset softwareprogram er det oppnådd å skille mellom seks ulike typer B-cellelymfomer på grunnlag av unike immunfenotypeprofiler ut fra opptil 29 parametre. Diagnose kan settes for fire av de seks B-cellelymfomene ut fra immunfenotypeprofil.

Det er også blitt utarbeidet og tatt i bruk to multicolor-kombinasjoner for identifisering av B-cellepopulasjoner i perifert blod. Design av disse kombinasjonene er gjort med utgangspunkt i publikasjoner. Kombinasjonene har vist seg å være egnet for å skille mellom alle B-cellepopulasjoner som er nødvendige for klassifisering av ulike grupper immunsvikt. Det er i tillegg blitt etablert egne normalverdier for normale B-cellepopulasjoner i blod.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	B-celler og immunglobulin	1
1.2	B-celledifferensiering i benmarg	3
1.2.1	Mekanisme for Ig-genrearrangering	4
1.3	B-celledifferensiering i perifert vev	7
1.3.1	Lymfoid vev	7
1.3.2	B-celleaktivering	8
1.3.3	Germinalsenterreaksjoner	11
1.3.4	B-cellepopulasjoner i perifert blod	13
1.4	Immunsvikt og B-cellelymfoproliferative sykdommer	15
1.4.1	Immunsvikttilstander	15
1.4.2	B-celle lymfoproliferative sykdommer	18
1.5	Flowcytometri	21
1.5.1	Fluorescens og fluorokromer	21
1.5.2	Flowcytometri prinsipp	22
1.6	Antistoffkombinasjoner for identifisering av B-cellepopulasjoner	27
1.6.1	Multicolor antistoffkombinasjoner	28
2	Formål med oppgaven	30
3	Metoder	31
3.1	Flowcytometer og antistoffkombinasjoner	31
3.1.1	Konfigurering for LSR II	31
3.1.2	Fluorokromer og antistoffkombinasjoner	32
3.1.3	Kompensering på LSR II	33
3.1.4	Kvalitetskontroller for LSR II	34
3.2	Immunfarging	34
3.3	Titring av antistoffer	35
3.4	Fluorescence Minus One	37
3.5	Sammenligning av multicolor-kombinasjon med 4-fargepanel	37
3.6	Etablering av normalverdier for B-cellepopulasjoner i blod	38
4	Resultater	39
4.1	Titring av antistoffer	39

4.2	Fluorescence Minus One.....	45
4.3	Sammenligning av multicolor-kombinasjon og 4-fargepanel.....	47
4.4	Utprøving av antistoffkombinasjoner på pasientprøver.....	49
4.4.1	Utprøving av EuroFlow-kombinasjoner	49
4.4.2	Utprøving av CVID-kombinasjoner.....	69
5	Diskusjon	77
5.1	Valg av antistoffkloner, fluorokromer og antistoffkonsentrasjon.....	77
5.2	EuroFlow-kombinasjoner.....	81
5.3	CVID-kombinasjoner.....	83
5.4	Konklusjon og videreføring av arbeidet.....	86
	Litteraturliste.....	89
	Vedlegg.....	95

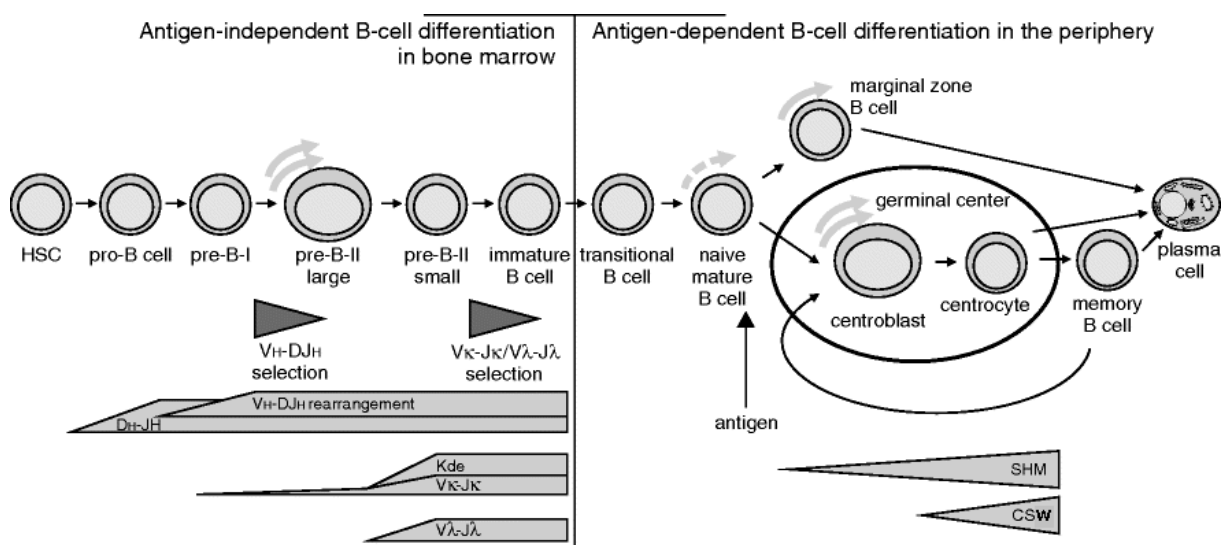
Forkortelser

AID: Aktiveringsindusert cytidin deaminase	LP: Longpass
APC: Allophycocyanin	LPL: Lymfoplasmacyttisk lymfom
APC: Antigenpresenterende celle	LPS: Lipopolysakkarid
APC-AF750: Allophycocyanin-AlexaFluor750	LST: Lymfoid screeningrør
APC-H7: Allophycocyanin-Hilite7	MALT: Slimhinneassosiert lymfoid vev
APS: Automatisk populasjonseparator	MCL: Mantelcellelymfom
BAFF-R: B-celleaktiverende faktor reseptor	MFI: Mean/median fluorescens intensitet
BC: Beckman Coulter	MHC: Hovedhistokompatibilitetskompleks
B-CLPD: B-cellelymfoproliferative sykdommer	MRD: Minimal sykdomsanalyse
BCR: B-cellereseptor	mRNA: Budbringer ribonukleinsyre
BD: Becton Dickinson	mW: milliwatt
BL: Burkitts lymfom	MZ: Marginalsone
BLNK: B-celle linkerprotein	MZL: Marginalsonelymfom
BP: Bandpass	NaCl: Natriumklorid
BSA: Bovint serumalbumin	NaN ₃ : Natriumazid
Btk: Brutons tyrosin kinase	NFκB: Nukleær faktor IgLκ-forsterker for B-celleaktivering
CAM: Celleadhesjonsmolekyler	NK-celler: Naturlige dreperceller
CAML: Calcium-modulator og cyclofilin ligand	NRS: Normalisert kaninserum
CD: Cluster of differentiation	N-nukleotider: Non-templat
CDR: Hypervariable områder	OUS: Oslo universitetssykehus
CR: Komplementreseptor	PALS: Periarteriølar lymfoid slire
C-region: Konstant region	Pax5: Paired Box-protein 5
CS&T beads: Cytometer setup and tracking beads	PBS: Fosfatbufret saltvann
CSW: Isotypeskifte	PE: Phycoerythrin
CV: Variasjonskoeffesient	PeCy7: Phycoerythrin-cyanin7
CVID: Common variable immunodeficiency	PerCP-Cy5.5: Peridinin klorofyllprotein-cyanin5.5
DAG: Diacylglycerol	PI3K: Fosfoinositid-3-kinase
DC: Dendrittisk celle	PIP: Fosfatidylinositolfosfat
DLBCL: Diffust storcellet B-cellelymfom	PLCγ2: FosfolipaseC-γ2
DNA: Deoksyribonuklinsyre	PMT: Fotomultiplikatorrør
EBF-1: Tidlig B-cellefaktor-1	P-nukleotider: Palindrom
ER: Endoplasmatisk retikulum	Pre-B-celler: Prekursor-B-celler
Fab-region: Fragment antigen-bindende region	Pre-BCR: Pre-B-cellereseptor
Fc-region: Fragment krystalliserende region	Pro-B-celler: Progenitor-B-celler
FDC: Follikulær dendrittisk celle	P-verdi: Statistisk verdi
FITC: Fluorescein isothiocyanat	RAG1/2: Rekombineringsaktiverende gener 1/2
FL: Follikulært lymfom	RSS: Rekombineringssegnalsekvenser
FMO: Fluorescence minus one	S/N-ratio: Signal-til-noise-ratio
FR: Rammeverkregion	SCF: Stamcellefaktor
FRET: Fluorescensresonans energioverføring	SD: Standardavvik
FSC: Forward scatter	SHM: Somatiske hypermutasjoner
GC: Germinalsenter	SmB: Switched memory B-cells
G-verdi: Statistisk verdi for Grubbs test	SMZL: Splenisk marginalsonelymfom
H ₀ : Nullhypotese for statistiske tester	SSC: Side scatter
HCL: Hårcelleleukemi	T/B-ALL: T/B akutt lymfoblastisk leukemi
HIV: Human immunodeficiency virus	T/B-NHL: T/B-Non-Hodgkins lymfom
HLA-DR: Humant leukocyt antigen-DR	TACI: Transmembranaktivator og CAML interaktor
HSC: Hematopoietisk stamcelle	TCR: T-cellereseptor
ICOS: Induserende kostimulator	TD: Thymus-avhengig
Ig: Immunglobulin	Tdt: Terminal deoxynukleotidyl transferase
IgH: Immunglobulin tungkjede	Th-celler: T-hjelper-celler
IgL: Immunglobulin lett kjede	TI: Thymus-uavhengig
IgLκ: Immunglobulin lett kjede Kappa	TK: Tyrosin kinase
IgLλ: Immunglobulin lett kjede Lambda	TLR: Toll-lik reseptor
IL: Interleukin	TNFR: Tumornekrosefaktor-reseptor
IP: Inositolfosfat	Treg-celler: Regulatoriske T-celler
ITAM: Immunreseptor tyrosin aktiveringsmotiv	T-verdi: Statistisk verdi for t-test
KHCO ₃ : Kaliumbikarbonat	VDJ-gensegment: Variabelt, Diversitet, Junksjonalt
KLL: Kronisk lymfatisk leukemi	VLA: Very late antigen
LAIR1: Leukocytassosiert Ig-lik reseptor-1	V-region: Variabel region
LEF-1: Lymfoid forsterkerbindende faktor-1	WHO: Verdens helseorganisasjon
L-sekvens: Ledersekvens	z-verdi: Statistisk verdi

1 Introduksjon

1.1 B-celler og immunglobulin

B-lymfocytter eller B-celler er navngitt ut fra hvor de modnes hos fugler – i organet ”Bursa of Fabricius”. Betegnelsen passer også for mennesker og mange andre pattedyr, hvor modningen foregår i benmargen. Modne B-celler skilles fra andre celletyper ved at de har immunglobulin (Ig) på overflaten som fungerer som antigenreseptorer. Alle reseptorene på en og samme B-celle har spesifisitet for samme antigen, og hvis en B-celle deler seg og gir opphav til to datterceller vil begge disse ha samme antigenspesifisitet som morcellen og som hverandre. En populasjon som har oppstått fra en enkelt B-celle kalles for en klon. Betegnelsen benyttes også derfor på B-celle neoplasier som har oppstått fra en mutert B-celle. B-celleutviklingen består av en antigenuavhengig del som foregår i benmargen, og en del som baserer seg på møte med antigen i perifert vev (se figur 1) [1].

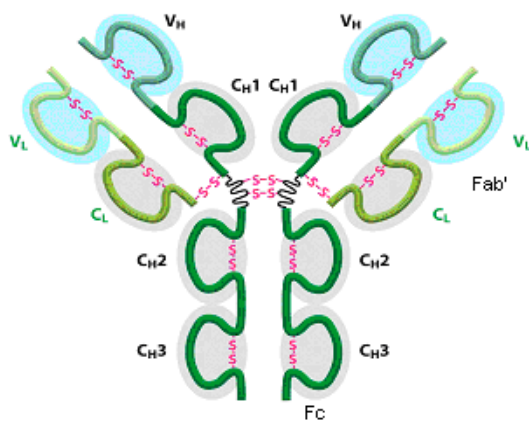


Figur 1: B-celleutvikling består av en antigenuavhengig og en antigenavhengig del. Den sentrale B-cellemodningen foregår i benmarg hvor hematopoietiske stamceller (HSC) går gjennom definerte modningstrinn med distinkte molekulære prosesser. Modne, immunkompetente B-celler migrerer deretter til perifert vev hvor de møter på antigen som trigger videre utviklings- og aktiveringstrinn og ender til slutt opp som terminalt differensierte effektorceller [2]. VDJ: Variabelt, diversitets- og junksjons-Ig-gensegment, SHM: Somatisk hypermutasjon, CSW: Isotypeskifte.

Alle leukocytter, inkludert B-celler, utvikles fra multipotente HSC i benmargen. Stamceller defineres ut fra sin evne til selvfornyng og ubegrenset deling. HSC gir opphav til avkom som differensierer langs to veier; en myeloid og en lymfoid vei. Trinnvis modning resulterer til slutt i terminalt differensierte leukocytter. Den lymfoide cellelinjen gir hovedsakelig opphav

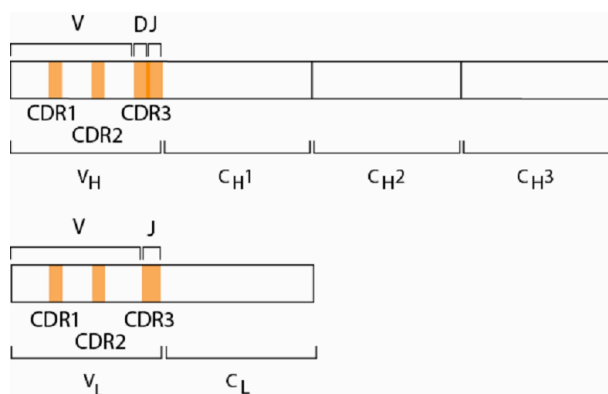
til T-celler som går til videre modning i thymus, NK-celler (naturlige dreperceller) og B-celler [1].

B-celler er de eneste cellene som produserer Ig, enten i membranbundet eller utskilt form. Ig-molekyler har to hovedfunksjoner; spesifikk binding av antigen og utøvelse av effektorfunksjoner som nøytraliserer eller eliminerer fremmed antigen. Alle Ig-molekyler har samme struktur. De består av fire peptidkjeder, to identiske lett kjeder (IgL) og to identiske tungkjeder (IgH). En IgL og en IgH danner en heterodimer, og to slike heterodimerer bindes sammen ved hjelp av disulfidbroer og utgjør et komplett Ig-molekyl (se figur 2).



Figur 2: Et Ig-molekyl består av fire polypeptidkjeder; to IgL og to IgH som er bundet sammen ved hjelp av disulfidbroer. Variabel region (V) av molekylet er ansvarlig for spesifikk binding av antigen, mens konstant region (C) utøver ulike effektorfunksjoner avhengig av isotype [1].

I N-terminal ende av IgL og IgH finnes V-regionen som definerer molekylets antigenspesifisitet. Spesielt er det variasjoner mellom ulike Ig-molekyler i de hypervariable områdene; CDR1, CDR2 og CDR3, som utgjør selve det antigenbindende setet som binder epitoper på antigener. V-region av Ig-molekylet gjennomgår i løpet av modningsprosessen en rekke rearrangeringer av gensegmenter i DNA i tidlige modningsstadier (se figur 3) [1].



Figur 3: Modell av IgL og IgH. Molekylenes V-region er satt sammen av to eller tre gensegmenter; V, D (kun hos IgH) og J. CDR1, 2 og 3 er områdene i V-region som binder antigen og er dermed også områdene med størst

aminoasyrevariasjon mellom ulike Ig-molekyler. Resten av V-regionen kalles FR-region (rammeverkregion) og har ikke den samme variasjonen [3].

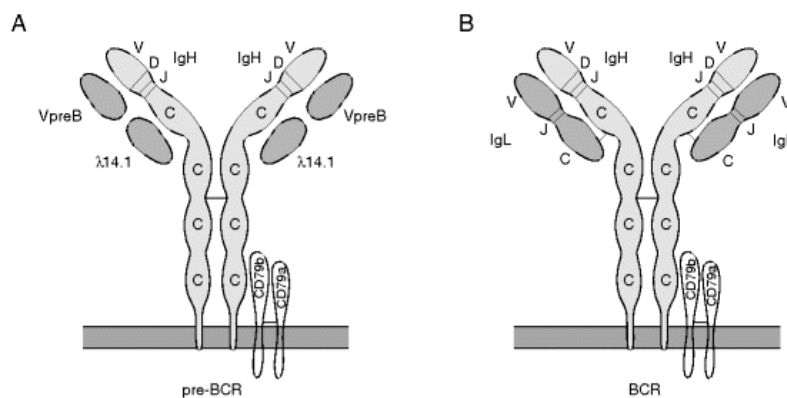
Resten av Ig-molekylet består av tre-fire C-regioner som er identiske hos molekyler av samme isotype, og bidrar med effektorfunksjoner som varierer mellom de fem ulike isotypene; IgM, IgD, IgG, IgA og IgE. Den antigenbindende regionen av Ig-molekylet kalles Fab' eller F(ab')₂ (fragment antigen bindende), mens region som ikke binder antigen kalles Fc (fragment krystalliserende). Det finnes to typer av IgL; Kappa (κ) og Lambda (λ). Et Ig-molekyl inneholder kun en av disse. Kappa/Lambda-ratio for normale B-celler er omtrent 60/40 [1].

1.2 B-celledifferensiering i benmarg

Det er identifisert fem ulike modningsstadier blant B-celleforstadier i benmarg. Dette inkluderer progenitor-B-celler (pro-B-celler), prekursor-B-I-celler (pre-B-I-celler), pre-B-II-celler, umodne og naive B-celler (se figur 1) [4]. De første cellene som kan identifiseres som B-celler kalles pro-B-celler. For at disse cellene skal utvikle seg til pre-B-I-celler, er de avhengig av spesialiserte nisjer i benmargen med et mikromiljø som tilføres av ekstracellulær matrix og stromaceller [1]. Stromaceller består av et nettverk av blant annet endotelceller, fett, osteoblaster og makrofager [5]. Stromacellene spiller to viktige roller i B-cellemodning; de interagerer direkte med pro- og pre-B-celler og sekreterer cytokiner. Pro-B-celler er avhengig av direkte celle-celle-kontakt via celleadhesjonsmolekyler (CAM) for overlevelse og videre utvikling. Binding av stamcellefaktor (SCF) på stromaceller til c-Kit reseptor på pro-B-celle aktiverer signalveier fra tyrosin kinasen (TK) c-Kit slik at pro-B-cellene prolifererer og differensierer til pre-B-I-celler. Dette trinnet er også avhengig av cytokinet interleukin-7 (IL-7) fra stromaceller som binder IL-7-reseptor og fører til en nedregulering av CAM slik at B-cellene løsner fra stromacellene [1]. IL-7 er også ansvarlig for produksjon av transkripsjonsfaktorer som PU.1, E2A og EBF-1 (tidlig B-cellefaktor-1), samt B-cellespesifikke Pax-5 (paired box-protein 5). Disse fører til økt syntese av rekombineringsaktiverende gener (RAG-1 og RAG-2) og terminal deoxynukleotidyl transferase (Tdt) som er nødvendig for å starte genrearrangering mellom D- og J-gensegmenter i IgH-lokus [6].

Rearrangering av antigenreseptor-DNA er en unik lymfoid egenskap. VDJ-rearrangering for IgH initieres i pro-B-cellestadiet med D- til J-sammensetting fulgt av V- til DJ-rearrangering tidlig i pre-B-I-stadiet. Under forutsetning av en produktiv rearrangering av IgH vil IgH μ

dukke opp på celleoverflaten sammen med en surrogat-lettkjede som sammen utgjør pre-B-cellereseptor (pre-BCR) (se figur 4a) [2]. B-cellene identifiseres på dette punktet som pre-B-II-celler. Pre-BCR signalerer innover i cellen via fosforylering av immunreseptor tyrosin aktiveringsmotiver (ITAM) på Ig α /Ig β heterodimer (CD79a/CD79b; cluster of differentiation 79a/b), som også er en del av pre-BCR, ved kryssbinding til strukturer i benmargen. Signaler generert herfra har en anti-apoptotisk virkning på B-cellene som en bekreftelse på en fungerende pre-BCR, mens celler som ikke binder vil dø av mangel på dette overlevelsessignalet. Pre-BCR-kryssbinding fører også til en kraftig proliferering. Etter hvert vil pre-B-II-cellene stoppe å dele seg, og rearrangering av IgL kan starte [7].



Figur 4: **a)** Pre-BCR består av en IgH μ -tungkjede og en surrogat-lettkjede som er oppbygd av molekylene VpreB og λ 14.1. **b)** Pre-BCR utvikles videre til BCR som har et fullstendig Ig-molekyl hvor surrogat-lettkjede er erstattet med IgL. Både pre-BCR og B-cellereseptor (BCR) har signaloverførende CD79a/CD79b heterodimer som en del av komplekset [2].

Først rearrangeres IgL κ og deretter IgL λ hvis ingen produktive rearrangeringer oppnås for IgL κ . B-cellene karakteriseres som umodne B-celler når de har et komplett sammensatt IgM-molekyl på overflaten (se figur 4b). Cellenes BCR testes for affinitet for autoantigener [2]. B-celler som binder til strukturer i benmargen får mulighet til å rearrangere IgL en gang til for å endre spesifisiteten til reseptoren. Oppnås ikke dette vil autoreaktive celler dø av apoptose, mens de som klarer seg gjennom seleksjonsprosessen (10-20 %) utvikler seg videre til transisjonelle B-celler som er klare for å forlate benmargen [1].

1.2.1 Mekanisme for Ig-genrearrangering

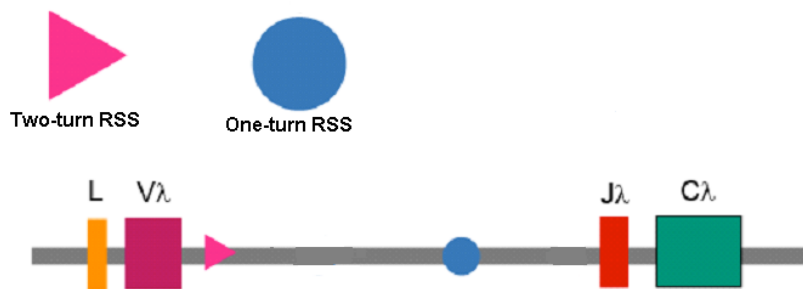
Immunsystemet har evnen til å gjenkjenne og respondere mot et ubegrenset antall fremmede antigener, selv om det aldri har møtt på disse før. Mekanismen bak dette ligger i at DNA hos B-celleforstadier inneholder flere gensegmenter som koder for en del av IgH eller IgL (se tabell 1). I løpet av modningsprosessen i benmargen stokkes gensegmentene om i et tilnærmet

tilfeldig mønster og settes sammen til et funksjonelt exon. Denne prosessen gir opptil 10^6 ulike kombinasjonsmuligheter av Ig-gener. Mangfoldet økes ytterligere (til $>10^8$) ved ulike modifikasjoner av genene [1].

	Kromosom nr.	V-segementer	D-segementer (kun hos IgH)	J-segementer	C-segementer
IgH	14q32.33	123-129	27	9	11
IgLκ	2p11.2	76	-	5	1
IgLλ	22p11.2	73-74	-	7-11	7-11

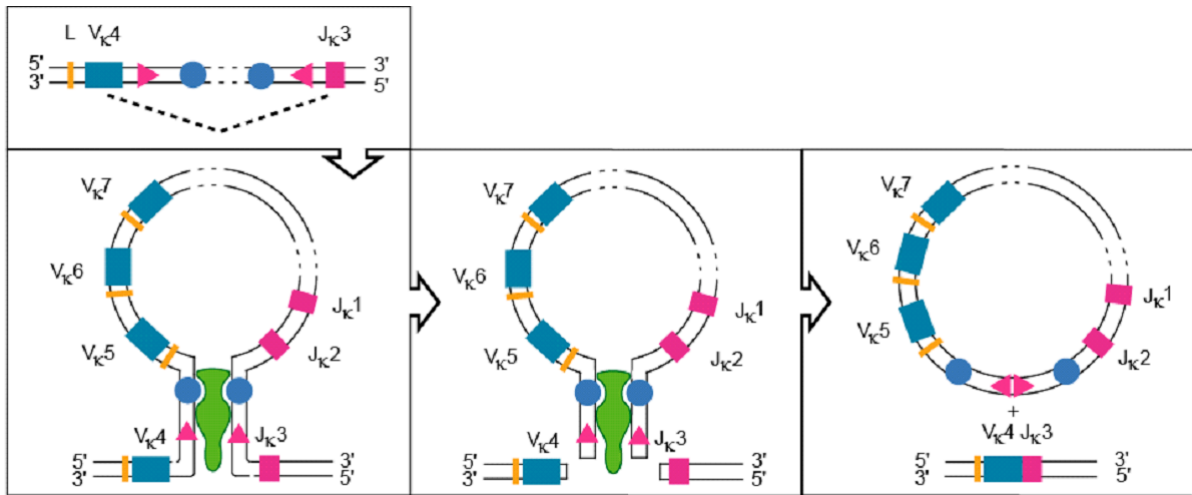
Tabell 1: Oversikt over hvilket kromosom gener for Ig-kjeder ligger på, samt antall av de ulike gensegmentene for hver Ig-kjede. Antall gensegmenter varierer grunnet alleliske polymorfismer ved insersjon/delesjon av gener [8].

Alle V-, D- og J-gensegmenter flankeres av rekombineringsignalsekvenser (RSS). Disse sekvensene tilsvarer én eller to runder av DNA-heliksen og kalles derfor henholdsvis one-turn og two-turn RSS. One-turn RSS kan kun bindes sammen med two-turn RSS. Denne faste regelen forsikrer at V(D)J-segmenter settes sammen i riktig rekkefølge (se figur 5) [1].



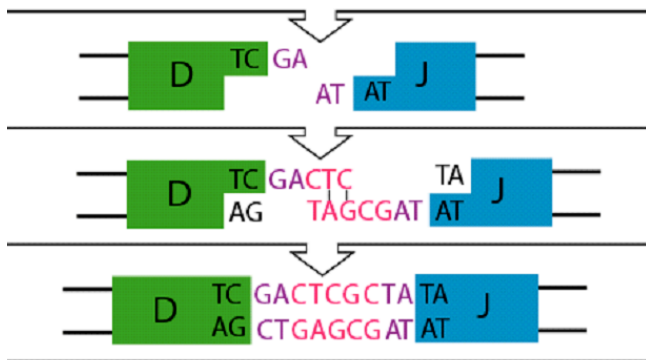
Figur 5: RSS-sekvenser flankerer gensegmenter i Ig-genet. Disse består av en heptamer- og en nonamersekvens med 12 eller 23 basepar i mellom som tilsvarer henholdsvis én eller to runder av DNA-helix, og kalles derfor respektivt one-turn og two-turn RSS. Her vises en modell av IgL λ -gensegmenter [3].

Rekombinasjonsprosessen foregår i mellomrom mellom RSS og kodende sekvenser og katalyseres av enzymer som med en fellesbetegnelse kalles V(D)J-rekombinaser (RAG-1 og RAG-2). Rekombinasjonsprosessen starter med at RAG-1 og RAG-2 gjenkjenner RSS-sekvenser, kutter begge DNA-tråder og bringer to gensegmenter nær hverandre. Segmentene liggeres sammen, og det oppnås et fullstendig mRNA som tranlateres og gir opphav til en fullstendig Ig-kjede (se figur 6) [1].



Figur 6: Figuren viser rekombinasjonsprosessen for IgLκ. RAG-1 og RAG-2 (grønn figur) gjenkjenner RSS og bringer de utvalgte gensegmentene nær hverandre. DNA mellom segmentene kuttes av og segmentene liggeres sammen. Dette resulterer i et sammenhengende VJ-segment som transkriberes som et funksjonelt exon og translateres til et IgL-molekyl. Ledersekvensen (L) guider ferdig IgL til endoplasmatisk retikulum (ER) hvor sammensetningen av det fullstendige Ig-molekylet foregår. L-sekvensen kuttes av det ferdige proteinet [3].

Kuttingen mellom to gensegmenter vil alltid skje på samme sted, mens liggeringen varierer fra gang til gang. Dette fører til et økt Ig-mangfold og ettersom sammenkoblingspunktene derfor vil inneholde forskjellige aminosyrer fra molekyl til molekyl. Koblingspunktene faller inn i CDR3-regionen av Ig-molekylet. Her vil DNA-reparasjonsenzymmer sette inn komplementære nukleotider. Innsetting av opptil 15 nukleotider i DJ- og VDJ-koblingspunktene i IgH av enzymet Tdt bidrar også til økt variasjon (se figur 7). En upresis rearrangering kan føre til at genet mister sin leseramme, og at stoppkodoner dannes på feil sted. Proteinene som produseres blir forkortet eller inaktivt ved slike ikke-produktive rearrangeringer [1].



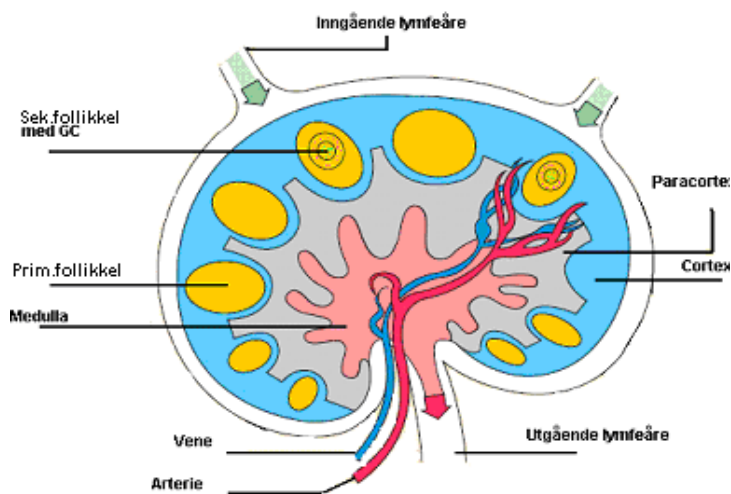
Figur 7: Ligering av rearrangerte gensegmenter er en unøyaktig prosess. Nukleotider som settes inn for å rette opp den unøyaktige sammensetningen kan være palindromnukleotider (P) som er komplementære med nukleotider på motsatt DNA-tråd i hårnålsstrukturen som dannes i prosessen (lyserøde), eller non-templatnukleotider (N) som settes på i enden av DNA-trådene av enzymet Tdt (mørkerøde) [3].

1.3 B-celledifferensiering i perifert vev

Den andre og antigenavhengige delen av B-celledifferensieringen foregår etter at modne, immunkompetente B-celler har forlatt benmargen (se figur 1).

1.3.1 Lymfoid vev

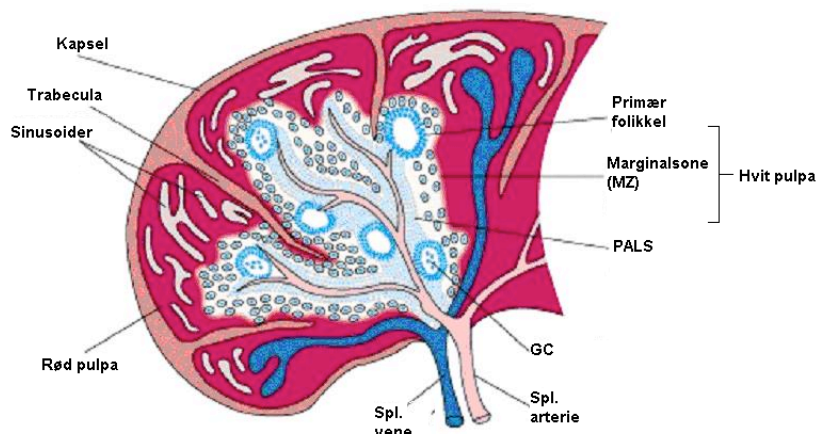
Primære lymfoide organer inkluderer thymus og benmarg hvor modning av henholdsvis T- og B-celler finner sted. Sekundært lymfoid vev omfatter lymfeknuter, milt og forskjellige slimhinneassosierte lymfoide vev (MALT). Her møter modne lymfocytter på antigen og aktiveres [1].



Figur 8: Lymfeknuter har en høyt organisert struktur med distinkte områder for ulike funksjoner. Cortex karakteriseres med B-celleaktivitet og follikkelstrukturer med germinalsentre (GC), paracortex er et T-cellerikt område, mens medulla inneholder blant annet plasmaceller. Flere lymfeårer kommer inn i en lymfeknute, mens bare én lymfeåre fører ut. En vene og en arterie er også tilknyttet lymfeknuter slik at lymfocytter kan resirkulere mellom blodomløp og vev [1].

En lymfeknute er delt inn i tre hovedregioner; cortex, paracortex og medulla, med hvert sitt spesialtilpassede mikromiljø for cellene som befinner seg der (se figur 8). Cortex utgjør det ytterste laget, og her dominerer B-celler som sammen med makrofager og follikulære dendrittiske celler (FDC) danner primære follikler. Etter møte med antigen vil sekundære follikler med GC utvikle seg. I paracortex finnes mest T-celler i tillegg til dendrittiske celler (DC) som har migrert til lymfeknuten fra vevene. Disse er profesjonelle antigenpresenterende celler (APC) med et høyt nivå av hovedhistokompatibilitetskompleks-molekyler (MHC) som presenterer prosessert antigen til T-hjelper-celler (Th-celler). Medulla inneholder plasmaceller som sekreterer Ig [1].

Milten bidrar med immunresponser mot blodbårne antigener (se figur 9). Det finnes to typer strukturer i milten; hvit pulpa og rød pulpa som skiller av en diffus marginalsone (MZ). Rød pulpa består av sinusoider hvor gamle erythrocytter ødelegges og fjernes av makrofager og fraktes til videre nedbrytning til leveren. Den hvite pulpaen omslutter forgreningene til splenisk arterie som forsyner milten med blod, og danner T-cellerik PALS (periarterioler lymfoid slire). B-cellerike primære follikler er festet til PALS. Antigen fra blod fanges opp av DC i MZ som frakter det til PALS og presenterer prosessert antigen til Th-celler [1].



Figur 9: Milten består av spesialiserte områder. Hvit pulpa står for aktivering av lymfocytter og består av T-cellerik PALS, MZ og B-cellerike follikler. Rød pulpa domineres av erythrocytter og makrofager [1].

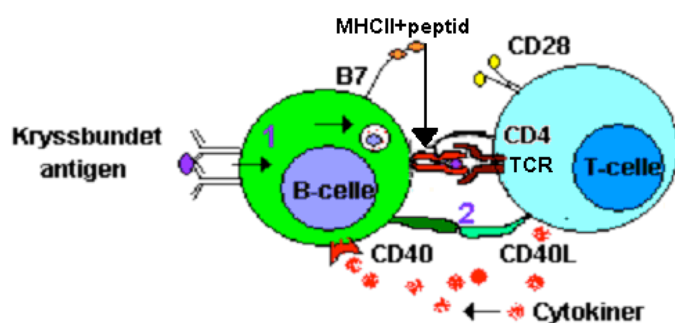
1.3.2 B-celleaktivering

B-celler som gjenkjenner antigen gjennomgår en klonal ekspansjon. Proliferingen resulterer i utvikling av effektorceller som sørger for en sterk respons, og antigenspesifikt langtidsminne via henholdsvis Ig-produserende plasmaceller og hukommelsesceller.

Thymus-avhengige (TD) og thymus-uavhengige (TI) antigener har ulike responsmønstre hos B-celler. De vanligste responsene er TD, det vil si at Th-celler er nødvendig for at B-cellene skal aktiveres, men noen antigener kan gi en respons også uten denne hjelpen. Dette foregår blant annet i miltens MZ og i lamina propria i tarmen. Slike TI-antigener deles i Type 1 og 2 som aktiverer B-celler ved ulike mekanismer. TI-2 antigener er molekyler med repeterende motiver (som polysakkarider) som resulterer i kryssbinding av Ig-molekyler. Sterkt nok signal og stimulerende cytokiner kan føre til B-celleaktivering. TI-1 antigener er polyklonale aktivatorer som kan aktivere B-celler uavhengig av antigenspesifisitet, og de er heller ikke avhengige av cytokiner fra Th-celler. Lipopolysakkarid (LPS) er en av hovedbestanddelene i celleveggen hos gram-negative bakterier og er et Type TI-1 antigen. LPS binder både til TLR4 (Toll-lik reseptor 4) fra det medfødte immunforsvaret og til overflate-Ig, som begge

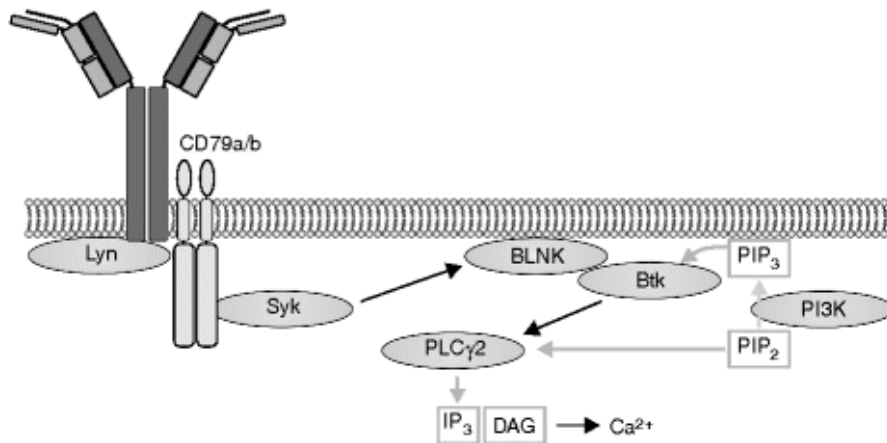
aktiverer signalveier som fører til aktivering og proliferering. TI-responsen er generelt svakere enn TD-responsen [1].

Aktivering av B-celler i TD-responser støtter seg på Th-celler, og foregår i en totrinnsprosess. Det hele starter med at Ig-molekyler kryssbindes av antigen på B-celleoverflaten etter spesifikk gjenkjennelse. Kryssbindingen står for signal 1 som fører til økt ekspresjon av MHC II og kostimulerende B7 på B-cellen. B7 binder CD28 på Th-celler og fører til videre aktivering av Th-cellen. Antigen-Ig-kompleksene på B-celleoverflaten internaliseres ved reseptormediert endocytose, og degraderes til peptider i lysosomer. Peptidene binder til MHC II-molekyler og presenteres på B-celleoverflaten. B-cellen fungerer dermed som en APC for Th-cellen. T-cellerreseptor (TCR) på T-cellen binder spesifikt til MHC-peptid på B-cellen. Ved hjelp av kostimulerende signaler (CD4) aktiveres Th-cellen fullstendig, og den oppregulerer sitt CD40L-uttrykk. Binding av CD40L til CD40 på B-celle er signal 2 for B-celleaktivering. Golgiapparat og cytoskjelett i Th-cellen migrerer mot stedet hvor cellene er bundet sammen og sørger for et polarisert utslipp av cytokiner mot B-cellen som nå har utviklet cytokinreseptorer på overflaten. Binding av blant annet IL-2 utskilt fra Th-celler gir beskjed om videre DNA-syntese, deling og differensiering (se figur 10) [1].



Figur 10: B-celler trenger både signal 1, signal 2 og cytokiner utskilt fra Th-celler for å oppnå full aktivering. Signal 1 er når antigen kryssbinder til overflate-Ig, noe som fører til økt uttrykk av kostimulerende B7 og MHC-II-peptid som presenteres til Th-celler og aktiverer disse. Th-celleene står for signal 2 gjennom CD40L-binding til CD40. I tillegg sekreterer Th-celleene cytokiner som hjelper aktiveringsprosessen videre. CD4 er koreseptor for TCR på Th-cellen [1].

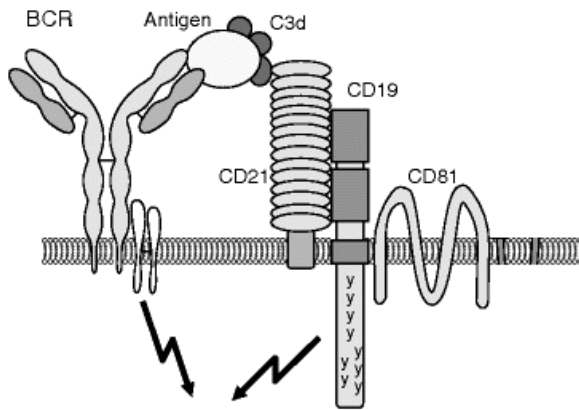
Signal 1 og 2 sender signaler innover i B-celleene som fører til en endring i genuttrykk og entring av cellyklus. Dette starter med oppbygging av et signalkompleks på cytoplasmatisk side av cellemembranen som aktiverer ulike signalveier (se figur 11).



Figur 11: Et signalkompleks bygges opp på cytoplasmatisk side av BCR ved B-celleaktivering. Src-TK Lyn fosforylerer cytoplasmatisk hale av CD79a/b og danner dermed bindingssete for TK Syk. Herfra aktiveres ulike signalveier som fører til endring i genuttrykk [2]. BLNK: B-celle linkerprotein, Btk: Brutons TK, PIP₂/PIP₃: fosfatidylinositol (4,5)-bifosfat/(3,4,5)-trifosfat, IP₃: inositol trifosfat, DAG: diacylglycerol, PI3K: Fosfoinositid 3-kinase, PLCγ2: Fosfolipase-Cγ2

Aktiveringen starter med at Lyn-TK i fosforylerer tyrosiner på cytoplasmatisk hale av CD79a/b som da fungerer som bindingsseter for andre TK og linkerproteiner. Fra disse aktiveres flere intracellulære signalveier. PLCγ2 spalter PIP₂ i IP₃ og DAG. IP₃ binder til og åpner IP₃-styrte Ca²⁺-kanaler i ER-membranen slik at Ca²⁺ strømmer ut i cytosol. DAG er bundet til innsiden av plasmamembranen og står for aktivering av flere nedstrøms signalproteiner. Signalveiene resulterer i aktivering av transkripsjonsfaktorer som fører til endret genuttrykk med proliferering og differensiering som sluttresultat [9].

B-cellekoreseptor øker signalstyrken fra BCR. Komplekset består av CD19, CD81 og CD21 (se figur 12). Kryssbinding av antigen via BCR og CD21 (som er komplementreseptor 2, CR2) fører til aktivering av PI3K-signalvei som ender med gentranskripsjon som fører til cellevekst og deling. Senere i responsen kan andre koreseptorer være med på å dempe signaler fra BCR, ved blant annet å rekruttere fosfataser som defosforylerer medvirkende TK og PIP [9].



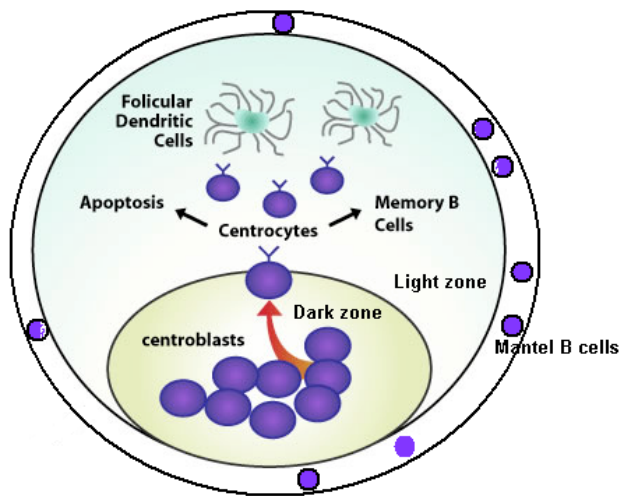
Figur 12: B-cellekoreseptorkompleks hjelper til med både å senke terskelen for signalering gjennom BCR (det vil si at færre antigenmolekyler trenger å binde for aktivering) og i tillegg med å forsterke signalet. Dette skjer gjennom fosforylering av CD19 sin cytoplasmatiske hale og kryssbinding mellom CD21 og komplementdekket antigen bundet til Ig, og videre aktivering av ulike nedstrøms signalveier [2].

B-celleaktivering foregår på definerte anatomiske steder. Når et antigen kommer inn i kroppen, konsentreres det opp i sekundære lymfoide organer. I lymfeknuter migrerer antigenspesifikke B- og Th-celler gjennom sine respektive områder og møtes på grensen mellom cortex og paracortex hvor de danner T-B-konjugater. Så fort antigenmediert B-celleaktivering har funnet sted dannes små foci av prolifererende B-celler i kanten av T-cellerik sone. Disse B-cellene differensierer til plasmaceller som sekreterer IgM og noe IgG. De fleste Ig-molekyler som produseres i en primærrespons kommer fra disse plasmacellene. Rundt sju dager etter foci-dannelsen vil noen av de aktiverte B-cellene og Th-cellene migrere til primære follikler i cortex. Folliklene utvikler seg til sekundære follikler som tilbyr et mikromiljø som favoriserer interaksjoner mellom lymfocytter og FDC, samt utvikling av et GC. Tre viktige B-celledifferensierings-hendelser skjer i GC: Affinitetsmodning, CSW, og dannelse av plasmaceller og hukommelses-B-celler. Affinitetsmodning og dannelse av hukommesceller er avhengige av GC for å gjennomføres, mens CSW og plasmacelledannelse kan også skje utenfor [1].

1.3.3 Germinalsenterreaksjoner

Små resirkulerende B-celler som var en del av den primære follikkelen presses ut under dannelsen av GC. Disse cellene vil utgjøre mantelen som omgir selve GC [10]. Innenfor disse cellene er GC inndelt i en mørk og en lys sone. Den mørke sonen består hovedsakelig av store, prolifererende centroblaster. Under den kraftige prolifereringen gjennomgår centroblastene SHM i V-region av Ig-gener, noe som endrer deres affinitet for antigen. Deretter utvikler de seg til mindre og ikke-delende centrocytter og migrerer til lys sone av

GC. Her går de gjennom CSW og seleksjon med hensyn på affinitet for antigen bundet til Fc- og CR-reseptorer på overflaten av FDC (se figur 13) [2].



Figur 13: Sekundærfollikler er organisert i et GC som består av en mørk sone med prolifererende centroblaster som gjennomgår SHM, og en lys sone med hvilende centrocytter som gjennomgår CSW og seleksjon på grunnlag av affinitet for antigen bundet til FDC. GC omslutes av en mantelsone bestående av B-celler fra den opprinnelige primærfollikkelen [11].

Binding mellom CD40 og CD40L induserer translokasjon av nukleær faktor $Ig\kappa$ -forsterker for B-celleaktivering ($NF-\kappa B$) til kjernen hvor den regulerer transkripsjon blant annet av genet for aktiveringsindusert cytidin deaminase (AID) som uttrykkes i GC-celler [2]. Dette enzymet deaminerer cytidiner i Ig-gener til uridin som da vil gjenkjennes som thymidin. DNA-reparasjonsenzymet retter opp slik at det resulterer i et AT-basepar i stedet for det opprinnelige CG-baseparet. Denne prosessen danner grunnlaget for SHM og CSW [12]. SHM er konsentrert til de rearrangerte Ig-genene i såkalte "hotspots" med den største mutasjonsfrekvensen i CDR-områdene. Mutasjonsraten er flere millioner ganger raskere enn den normale mutasjonsraten for andre gener. SHM skjer tilfeldig. Dette vil føre til at noen celler får reseptorer med høyere affinitet, og noen får reseptorer med lavere affinitet for antigen enn det de hadde i utgangspunktet. Centrocytter mottar et overlevelsessignal ved kryssbinding til FDC-bundet antigen. De cellene som ikke mottar et slikt signal vil dø. Centrocyttene konkurrerer om begrensede mengder antigen på FDC, det vil si at de som har høyest affinitet for antigen har størst mulighet for å binde og overleve [1].

Etter stimulering av antigen, kan IgH-DNA gjennomgå CSW hvor V-region kombineres med et annet av C-gensegmentene enn μ . Dette gjør at antigenspesifisiteten holdes konstant, mens Ig-molekylets effektorfunksjoner endres. Enzymet AID er nødvendig også for denne prosessen [1]. De to hovedtypene av Th-celler, Th1 og Th2, skiller ut ulike cytokiner som gjenspeiler hvilken type antigen responsen er rettet mot. I tillegg vil cytokiner produsert av

den ene Th-celletypen hemme cytokiner fra den andre, slik at den spesifikke responsen opprettholdes. Th2-celler bidrar til humorale responser gjennom aktivering av B-celler. De skiller ut cytokinene IL-4 og IL-5 som induserer skifte fra I μ til γ , ϵ eller α C-gensegment [3].

Noen av de positivt selekterte B-cellene i GC utvikler seg til langlivete hukommelsesceller som kan delta i fremtidige responser mot samme antigen, mens andre utvikler seg til plasmablaste som er et forstadium til plasmaceller. Plasmablaste sirkulerer i perifert blod på leting etter overlevelses-nisjer i benmarg eller MALT for ferdig differensiering [13]. Ulike faktorer bestemmer om en aktivert B-celle skal bli en hukommelsescelle eller en plasmacelle. CD40L på Th-celler står for signalet som fører til at post-GC B-celler differensierer til hukommelsesceller sammen med IL-2 og IL-4 [14]. Plasmacelledifferensiering fremmes av cytokinene IL-3, IL-6 og IL-10 [15]. Som beskrevet tidligere foregår den tidlige B-celleutviklingen i benmarg i spesialiserte nisjer som inneholder de kritiske faktorene for overlevelse og differensiering. Plasmaceller rekrutteres også til slike nisjer via kjemokinet CXCL12 fra stromaceller som binder CXCR4 på plasmaceller. Det begrensede antall benmargsnisjer gjør at plasmablastene må konkurrere med pro-B-celler og plasmaceller som allerede er til stede for å utvikle seg til langlivete plasmaceller som sekreterer antigenspesifikt Ig [16].

I en primær immunrespons produserer aktiverte B-celler først IgM, fulgt av CSW og IgG-økning. Hukommelses-B-celler som dannes i en primærrespons stopper å dele seg og går inn i G₀-fase av cellesyklus. Cellenes livslengde varierer, noen kan leve like lenge som individet selv. Hukommelsesceller kan skape en raskere, sterkere og mer langvarig sekundær immunrespons ved reinfeksjon av samme type antigen. Responsen er mer spesifikk ettersom cellene har gjennomgått affinitetsmodning og isotypen er tilpasset antigenet. Hukommelses-B-cellenes uttrykk av kostimulerende reseptorer og intracellulære signalmolekyler er økt og fører til at de aktiveres lettere enn naive B-celler [1].

1.3.4 B-cellepopulasjoner i perifert blod

Humane B-celler i perifert blod består av 2/3 naive og 1/3 hukommelsesceller [17]. Modne, naive B-celler resirkulerer mellom lymfoide follikler i milt og lymfeknuter, og kalles også follikulære naive B-celler [18]. De kjennetegnes ved at de ikke har gjennomgått SHM eller CSW, og at de ikke uttrykker aktiveringsmarkøren CD27. IgD-uttrykket er sterkt, og IgM uttrykkes svakere [19].

Hukommelses-B-celler kan identifiseres ved at de uttrykker CD27 [20]. Disse kan deles inn i MZ-B-celler som er IgM⁺⁺ og IgD⁺ og follikulære B-celler som oftest uttrykker Ig-isotyper andre enn IgM og IgD grunnet CSW (heretter kalt CSW-B-celler). CSW-B-celler har oppstått i follikler i milt eller lymfeknuter. De aktiveres ved binding til proteinantigener, og deltar i TD-responser med påfølgende GC-reaksjoner og dannelse av effektorceller [21]. MZ-B-celler utmerker seg ved at de kan aktiveres i både i TD- og TI-responser. IgM på overflaten av disse cellene er ofte multispesifikk med lav affinitet for antigen. De kan karakteriseres som hukommesceller fordi de har gjennomgått SHM i V-region av Ig-genet, selv om antall mutasjoner er lavere enn hos CSW-B-celler. TLR uttrykkes på overflaten som kan forsterke immunresponsen og hjelpe til med å unngå responser mot autoantigener. Cellene har dermed en funksjon som plasserer dem i mellom det medfødte og ervervete immunsystemet [19].

En annen liten sirkulerende B-cellepopulasjon kalles transisjonelle B-celler. Disse cellene har en fenotype som ligner umodne B-celler i benmarg, blant annet uttrykker de CD10 og CD38 [22]. Når de ankommer milt eller lymfeknuter vil disse cellene utvikle seg til modne, naive B-celler. Denne prosessen er i likhet med lignende prosesser i benmarg avhengig av en funksjonell BCR og et mikromiljø som gir overlevelsessignaler [19].

En annen sjelden og lite karakterisert gruppe av transisjonelle B-celler karakteriseres av lavt CD21-uttrykk i tillegg til et nedsatt CD23 og CD38-uttrykk. Mye tyder på at disse (fra nå av kalt) CD21_{lav}-B-cellene befinner seg i et tidligere modningsstadium enn de tidligere nevnte transisjonelle B-cellene ettersom de uttrykker transkripsjonsfaktoren lymfoid forsterkerbindende faktor-1 (LEF-1), som normalt er høyt uttrykt i umodne lymfocytter. I tillegg har CD21_{lav}-B-cellene en høyere andel av autoreaktivitet enn de andre transisjonelle B-cellene [23]. CD21_{lav}-B-celler utgjør en lav andel av B-celler i perifert blod hos normale individer, mens et noe større antall finnes blant annet i tonsiller og lungeslimhinner. Populasjonen er økt ved visse tilstander som ved HIV-infeksjon og noen former for immunsvikt [24].

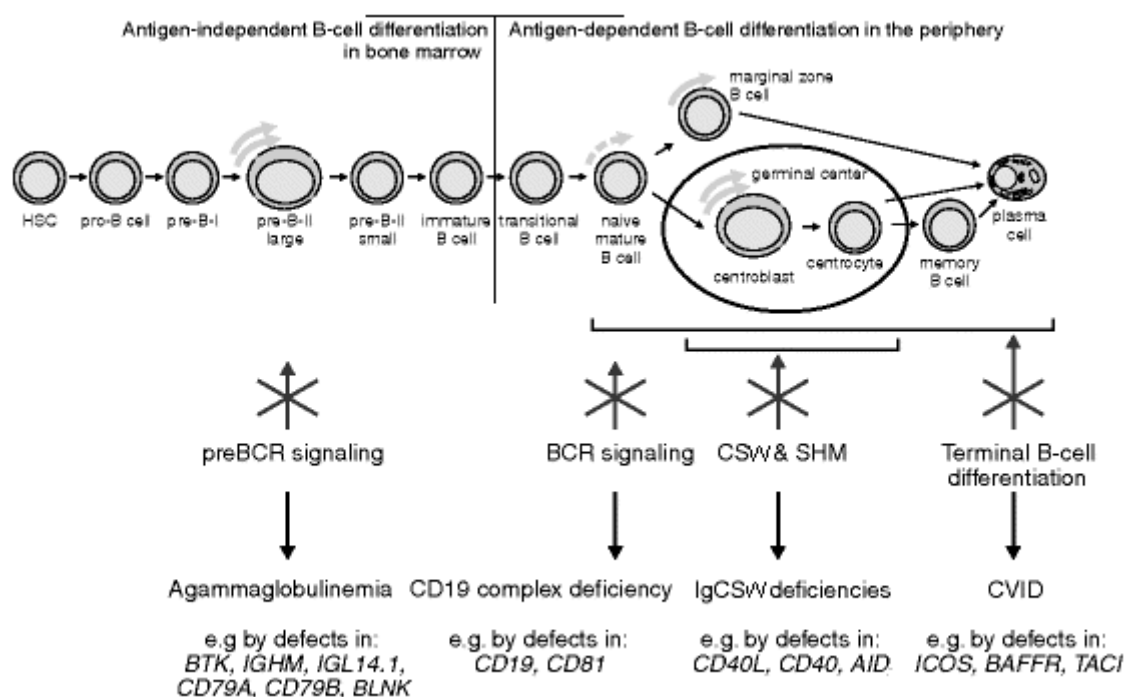
I perifert fullblod er det observert veldig få plasmaceller. Den største andelen av de få som finnes er nylagde plasmablaster som er på vei fra sekundært lymfoid vev til overlevelsesnisjer. I tillegg finnes enkelte modne plasmaceller som har blitt utstøtt av andre i konkurranse om begrensede nisjer [17, 25]. Plasmablaster uttrykker CD38 og CD27 sterkt, og har en svak ekspresjon av overflate-Ig [21].

1.4 Immunsvikt og B-cellelymfoproliferative sykdommer

Måling av B-cellepopulasjoner i perifert blod kan gjenspeile et individs immunstatus. I tillegg kan det identifiseres potensielle avvik i B-cellemodning og ulike typer av B-cellelymfoproliferative sykdommer (B-CLPD).

1.4.1 Immunsvikttilstander

Primære immunsvikttilstander består av flere undergrupper, men den største er den som innebærer mer eller mindre alvorlige former for Ig-mangel. Flere genetiske avvik er identifisert for disse tilstandene. Mutasjoner kan forekomme i alle trinn av B-cellemodningen, slik at utviklingen dermed stopper opp ved dette punktet. Sykdommens alvorlighetsgrad øker desto tidligere utviklingen blokkeres, noe som kan skyldes at senere i utviklingsprosessen har flere bestanddeler overlappende funksjoner. Slik vil tap av et enkelt protein ikke gjøre så stor skade (se figur 14) [2].



Figur 14: Immunsvikttilstander påvirker ulike stadier av B-cellemodning, noe som gjenspeiles i alvorlighetsgraden. Mutasjoner tidlig i utviklingen blokkerer videre modning. Dette inkluderer mutasjoner i bestanddeler av pre-BCR, samt tilknyttede signalmolekyler. Fullstendig fravær av serum-Ig kan observeres i slike tilstander. I senere modningsstadier er det flere proteiner som utfører de samme oppgavene. Mutasjoner i disse stadiene blir dermed ikke fullt så alvorlige, ofte mangles bare én isotype av serum-Ig. ICOS: Induserende kostimulator, BAFF-R: B-celleaktivator faktor reseptor, TAC1: transmembran aktivator og CAML interaktor [2].

Agammaglobulinemi

Denne tilstanden karakteriseres av et ekstremt lavt nivå av serum-Ig. B-celledifferensieringen blokkeres på et tidlig punkt i utviklingen. Tilstanden er oftest X-linket med mutert Btk-gen og rammer derfor mest gutter. Autosomalt recessive former finnes også, som inkluderer mutasjoner i gener til komponenter i pre-BCR eller signalproteiner i sammenheng med denne (se figur 14) [26].

CD19/CD20/CD81-mangel

Pasienter med mutasjoner i CD19-genet viser nedsatt Ca^{2+} -signalering ved stimulering gjennom BCR på grunn av nedsatt B-cellekoreseptoraktivitet (se figur 14). Tilstanden kjennetegnes av en nedsatt andel hukommelses-B-celler og lavt serum-Ig-nivå [27]. På grunn av dette viser pasientene dårlig respons på vaksinerings. Mer sjeldne mutasjoner i CD20-genet og CD81-genet fører til en tilsvarende effekt [28, 29].

Mangel på CSW-B-celler

Dette er pasienter med nedsatt nivå av IgG og IgA, ofte med et normalt antall B-celler og forhøyete IgM-nivåer. De fleste tilfellene kommer av mutasjoner i X-linket CD40L-gen hos Th-celler. Dette gjør at signal 2 i B-celleaktivering i TD-responser er fraværende, og GC vil heller ikke dannes. Mutasjoner i gener for andre bestanddeler ansvarlig for CSW er også observert for denne tilstanden (se figur 14) [30].

Common variable immunodeficiency (CVID)

Dette er en heterogen gruppe sykdommer med hypogammaglobulinemi som fellestrekk. I tillegg er en nedgang av naive CD4+ Th-celler (CD45RA+) vanlig ved denne tilstanden [31]. Tilstanden oppstår vanligvis i ung voksenalder ved tilbakevendende bakterielle luftveisinfeksjoner og dårlige respons på vaksinerings. Etiologien er stort sett ukjent [32]. Pasienter med denne sykdommen har en tendens for å få lungeinfeksjoner karakterisert av pneumokokke polysakkarider [29]. Nedsatt andel MZ-B-celler har i studier blitt assosiert med manglende TI-respons mot polysakkaridantigener, som igjen fører til en høyere andel av lungeinfeksjoner hos disse pasientene [33]. Andre studier igjen har vist at slike lungeinfeksjoner er uavhengig av andel MZ-B-celler og heller korrelerer med nedsatt konsentrasjon av IgG i serum, noe som henger sammen med andel CSW-B-celler [34].

Molekylære defekter er identifisert i kun < 10 % av undersøkte CVID-tilfeller. En nedsatt andel MZ-B-celler og CSW-B-celler kan komme av mutasjoner i gener involvert i generering av GC eller CSW. Involverte gener kan være ICOS, BAFF-R og TACI. Mutasjoner i TACI-genet kan også forekomme hos uaffektete individer, noe som tyder på en mer kompleks immunreguleringsfunksjon enn for de andre genproduktene [35]. Mutasjoner som inaktiverer BAFF-R-genet fører til at B-celleutviklingen stanser ved transisjonelle B-cellestadiet og dermed en opphopning av disse cellene i sirkulasjonen. En homozygot variant av denne mutasjonen er svært sjelden, det samme gjelder mutasjoner i ICOS-genet [36]. Mutasjoner i TACI-genet viser derimot en høy mutasjonsfrekvens [29].

En undergruppe av CVID karakteriseres av de sjeldne CD21_{lav}-B-cellene [37]. Nedsatt Ca²⁺-signalering fra BCR er også et karaktertrekk hos CD21_{lav}-B-celler, det vil si at pasienter med CVID med en økt andel av denne celletypen har en redusert evne til å aktivere Ca²⁺-avhengige signalveier. En økt andel CD21_{lav}-B-celler korrelerer også med nedsatt andel Treg-celler og økt forekomst av autoimmunitet [38].

De ulike CVID-sykdomsgruppene klassifiseres ut fra relativ andel av B-cellepopulasjoner i perifert blod. Avvik i fordelingen av naive, MZ- og CSW-B-celler kan gi en pekepinn i forhold til patogenese samt være assosiert med klinikk. I 2008 ble det publisert en konsensus for klassifikasjon; EUROClass-konsensus; ut fra to eksisterende klassifiseringsskjemaer basert på flowcytometrisk B-cellefenotyping [39].

EUROClass-konsensus

Klassifiseringssystemet skiller mellom individer med CVID som har < 1 % eller > 1 % B-celler, henholdsvis kalt gruppe B- og gruppe B+. B+ pasientene deles inn etter andel B-celler med gjennomgått CSW; over eller under 2 % (henholdsvis gruppe SmB+ og gruppe SmB- (switched memory B-cells)). En undergruppe av CVID har økt andel transisjonelle B-celler. Ut fra dette deles gruppe SmB- og SmB+ videre inn i gruppe SmB-Tr^{hi} dersom andel transisjonelle B-celler er ≥ 9 %, og gruppe SmB-Tr^{norm} hvis andelen er lavere enn 9 %. En annen inndeling av gruppe SmB- og SmB+ baserer seg på andel CD21_{lav}-B-celler. Dersom de utgjør ≥ 10 % betegnes det som gruppe SmB-/ +21^{lo}, og gruppe SmB-/ +21^{norm} ved en andel CD21_{lav}-B-celler < 10 % [31, 39].

1.4.2 B-celle lymfoproliferative sykdommer

Maligne lymfomer har i de fleste tilfeller en ukjent etiologi. Studier har i noen tilfeller vist at eksponering for visse typer løsemidler kan føre til utvikling av lymfom. Virusinfeksjoner kan også være en medvirkende faktor. Immunsvikt, autoimmunitet og kroniske infeksjoner er også blitt assosiert med lymfomutvikling [5].

Lymfoproliferative sykdommer inkluderer non-Hodgkin lymfomer (B/T-NHL), Hodgkin lymfom, akutt lymfoblastisk leukemi (B/T-ALL) og myelomatose etter WHO sin klassifisering [40]. B-NHL er en heterogen sykdomsgruppe. De ulike sykdommene kan være rasktvoksende og aggressive (høygradige) eller ha mer langsomme og snikende forløp (lavgradige). Pasienter med B-NHL kan ha symptomer som lymfadenopati og splenomegali grunnet ekstensiv proliferasjon av lymfoceller i disse organene, samt de ”klassiske” B-symptomene nattesvette, vekttap og feber. Diagnose settes ved kliniske opplysninger (anamnese), morfologiske undersøkelser, immunfenotyping, cytogenetiske og molekylærgenetiske analyser [5].

Alle modne B-cellelymfomer har rearrangerte Ig-gener og uttrykker i de aller fleste tilfeller Ig på overflaten. Translokasjoner kan føre til at gener som styrer celledeling, cellevekst og apoptose kan komme under styring av regulerende forsterkere til IgH-genet, og dermed få en unormalt høy ekspresjon eller aktivitet som igjen kan føre til kreftutvikling [5].

Ved klassifisering av ulike B-NHL tas det utgangspunkt i karakteristikker hos normale differensieringsstadier hos B-celler. Ut fra dette deles de inn etter om lymfocellene ligner naive B-celler (pre-GC neoplasier), centroblaster eller centrocytter (GC neoplasier), eller om de ligner mer på effektorceller (post-GC neoplasier) [40].

Mantelcellelymfom (MCL)

MCL-celler korresponderer med CD5+ naive B-celler som resirkulerer mellom perifert blod, primære follikler og mantelsoner i sekundære follikler, og har dermed heller ikke gjennomgått SHM i sine Ig-gener [41]. MCL klassifiseres derfor som en pre-GC neoplasi. MCL-cellene er små med ujevn kjerne og befinner seg i lymfeknuter, men er også vanlig i milt, benmarg og perifert blod. En rask spredning av cellene er vanlig [40].

Follikulært lymfom (FL)

FL består både av store, prolifererende centroblaster og mindre centrocytter som ofte vokser i et follikulært mønster i lymfeknuter, og betegnes derfor som en GC-neoplasi. Milt, benmarg og perifert blod er også ofte affisert. Jo flere prolifererende centroblaster som er til stede, desto mer aggressiv er denne lymfomtypen [40].

Burkitt lymfom (BL)

BL er det raskest prolifererende av alle B-NHL, og dermed også svært aggressivt. Cellene er gjerne mellomstore og har en rund kjerne med nukleoli. Normalt motstykke for BL-celler er GC- eller post-GC-celler, og det finnes tre kliniske varianter; endemisk BL, sporadisk BL og BL assosiert med immunsvikt [40].

Diffust storcellet B-cellelymfom (DLBCL)

DLBCL består av store lymfoide celler som viser et diffust vekstmønster. Sykdommen er en heterogen gruppe av morfologiske, immunfenotypiske og molekylærgenetiske varianter som alle har sitt distinkte sykdomsbilde. Lymfomcellene i disse tilstandene har derfor også ulikt opphav, både GC- og post-GC-neoplasier er karakterisert [40].

Marginalsonelymfom (MZL)

Dette er en type lavgradig B-NHL som er oppstått i MZ i milt (splenisk MZL) eller lymfeknuter (nodalt MZL). MZL kan også være ekstranodalt, særlig MALT affiseres i slike tilfeller. MZL-celler er små med et modent utseende. Plasmacytisk differensiering kan forekomme, i tillegg til funn av villøse lymfocytter i perifert blod. MZL-celler korrelerer med normale post-GC-celler [40].

Lymfoplasmacytisk lymfom (LPL)

LPL karakteriseres av celler i ulike differensieringsstadier som innbefatter små B-celler, plasmacytoide lymfocytter og plasmaceller. Lymfomet er saktevoksende. LPL-cellene affiserer hovedsaklig benmarg, men også lymfeknuter, perifert blod og milt, og har post-GC-lignende egenskaper [40].

Kronisk lymfatisk leukemi (KLL)

Pasienter med KLL har en opphopning av små, modent utseende B-celler i perifert blod, benmarg og lymfoid vev. Cellene har en rund kjerne og sparsomt med cytoplasma. KLL-cellers normale motstykke er B-celler som har møtt på antigen, det vil si post-GC-celler. KLL kan ha et svært mildt forløp, men også mer aggressivt noe som kommer an på uttrykk av ulike prognostiske markører [40].

Hårcelleleukemi (HCL)

HCL-celler er små og ligner normale hukommelsesceller. Forskjellen er HCL-cellenes unormale uttrykk av adhesjonsmolekyler som gir dem lange utstikkere fra celleoverflaten og et ”hårete” utseende. Disse cellene finnes i perifert blod, benmarg og milt. HCL er en lavgradig form for B-NHL [40].

Tabell 2 gir en oversikt over immunfenotypeprofil hos de ulike B-NHL.

	Immunfenotype						Genetiske avvik
	CD5	CD10	CD23	CD43	CD38	CD103	
MCL	+	-	-	+	-/+	-	t(11;14)
FL	-	+	-/+	-	+	-	t(14;18)
BL	-	+	-	+/-	++	-	t(8;14), t(2;14), t(22;14)
DLBCL	-/+	+/-	-	-/+	+	-	t(3;14), t(8;14), t(14;18)
MZL	-	-	-	-	+/-	-/+	t(11;18), trisomi 3, del7q31-32
LPL	-/+	-	-	-/+	+	-	Ingen spesifikke avvik
KLL	+	-	+	+	+/-	-	del6q, del11q, del13q, del17p, trisomi 12
HCL	-	-	-	-	-	+	Ingen spesifikke avvik

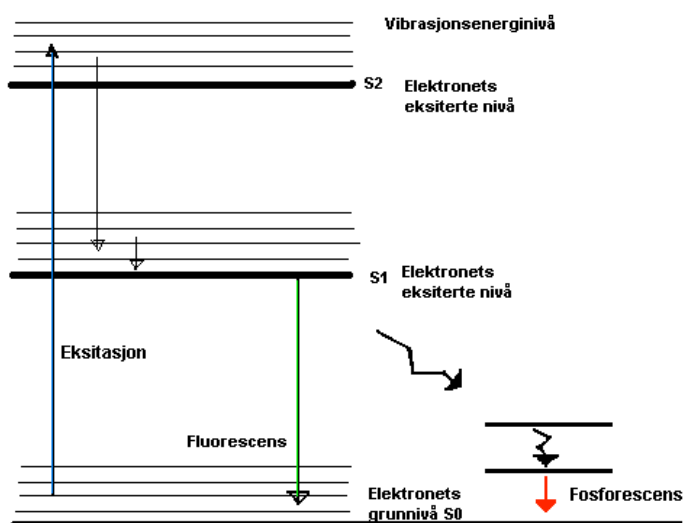
Tabell 2: Oversikt over de ulike B-cellelymfomenes immunfenotype og eventuelle genetiske avvik. Alle typene av B-NHL uttrykker pan-B-markører som CD19, CD20, CD22 og overflate-Ig, selv om uttrykk av disse kan variere i intensitet mellom de ulike sykdommene [5, 40, 42, 43, 44, 45]. For informasjon om overflatemarkører, se vedlegg 1.

1.5 Flowcytometri

Flowcytometri baserer seg på analyse av enkeltceller i suspensjon med hensyn til fysiske egenskaper og uttrykksmønstre av overflate- eller intracellulære antigener ut fra bundne fluorokromkonjugerte Ig-molekyler (heretter kalt antistoffer) som eksiteres med monokromatisk laserlys [43]. Emittert fluorescens spres og splittes opp i enkelte bølgelengder i et system av filtre og speil. Separerte lysstråler fanges opp av individuelle detektorer som sender elektriske impulser som er proporsjonale med fluorescensintensiteten. Et flowcytometers komponenter kan deles inn i tre kategorier; fluidikk og et datasystem og annen elektronikk som prosesserer oppsamlete signaler [46].

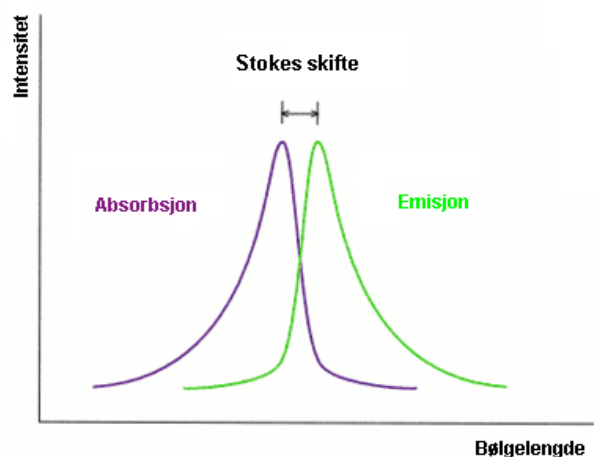
1.5.1 Fluorescens og fluorokromer

Fluorokromer er molekyler som kan absorbere synlig lys og innta et eksitert nivå, det vil si at elektronene transiteres fra sitt grunnnivå (S_0) til første eksiterte nivå (S_1) eller eventuelt til andre eksiterte nivå (S_2) (se figur 15). Innen hvert nivå får elektronene en vibrasjon som ligger høyere enn energinivåene. Denne vibrasjonen fører til et energitap uten lysemisjon i form av varme eller ved kollisjon med andre molekyler. For å komme tilbake til S_0 har molekylet flere muligheter å miste resten av energien på. Det ønskelige er at molekylet fluorescerer, ved at det som er igjen av eksitasjonsenergien emitteres som fotoner. Andre og mindre effektive måter energien kan mistes på er emisjon som fosforescens, samt intern konvertering, FRET (fluorescensresonans energioverføring), fotobleking eller fordampning (quenching) av fluorokromene [47].



Figur 15: Jablonskidiagram. Elektroner i fluorokromer inntar høyere energinivåer ved eksitasjon og avgir fluorescens når de returnerer til grunnivået [47].

Fotoner fra fluorescensemisjon vil derfor nesten alltid ha en lavere energi enn fotonene som opprinnelig ble absorbert. Bølgelengden til den emitterte fluorescensen er derfor lengre enn til lyset som eksiterte molekylet. Forskjellen på eksitasjons- og emisjonsmaksimum kalles for Stokes skifte (se figur 16). Jo større Stokes skifte, desto mer brukbart er fluorokromet for flowcytometri [47].



Figur 16: Stokes skifte er forskjellen mellom eksitasjons- og emisjonsmaksimum.

Fluorokromer som skal benyttes for flowcytometri bør være så sterke som mulig (høy ”brightness”) [48]. Hvis en celle har et svakt uttrykk av et antigen er det hensiktsmessig å velge et sterkt fluorokrom for denne markøren for å unngå falskt negativt resultat [49].

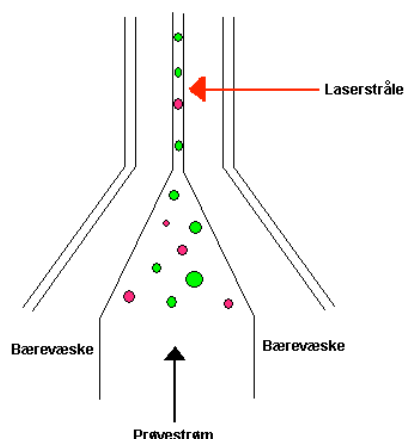
Tandemkonjugater er to fluorokromer som er bundet til hverandre. Det ene fluorokromet kalles donormolekyl og dette eksiteres av laserlyset. Energi fra donormolekylet overføres til et akseptormolekyl ettersom donormolekylets emisjonsbølgelengde overlapper med akseptormolekylets eksitasjonsbølgelengde (FRET). Donormolekylet emitterer etter energioverføringen lys ved et høyere emisjonsmaksimum enn akseptormolekylet ville gjort. Tandemkonjugater øker dermed utvalget av fluorokromer for multicolor flowcytometri [50].

1.5.2 Flowcytometri prinsipp

Fluidikk

Prøver som skal analyseres må inneholde enkeltceller i suspensjon. En isoton bærevæske settes under trykk gjennom en konisk åpning som er designet slik at det resulterer i at bærevæsken omslutter celled suspensjon ved hydrodynamisk fokusering og at cellene plasseres

enkeltvis etter hverandre i flowkammeret (se figur 17) [46]. Væskestrømmens diameter er den samme som hos cellene som måles [3].



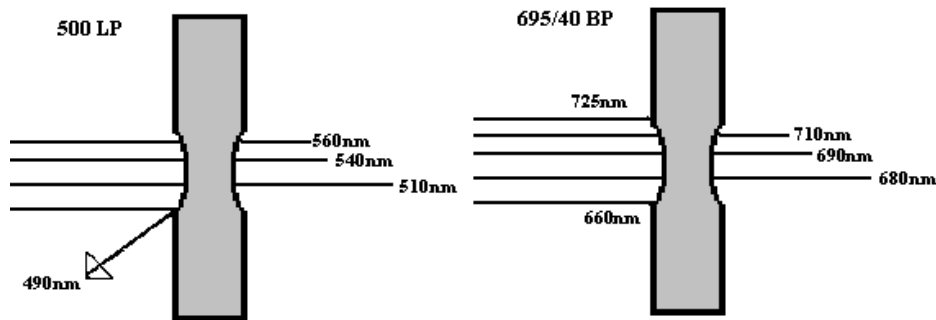
Figur 17: Inne i flowkammeret finner den hydrodynamiske fokuseringen av prøven sted [48].

Optikk

På vei gjennom flowkammeret passerer væskestrømmen en eller flere laserstråler som sender ut monokromatisk lys. Hver gang en celle passerer laserstrålen vil denne bryte strålen og spre lyset. Justering av laserstrålen i forhold til punktet den treffer cellestrømmen er svært kritisk for optimalisering og standardisering av flowcytometeret [47].

Lys som spres i forlengelsen av laserstrålen samles opp av en detektor, og dette kalles for forward scatter (FSC). Mengden lys som detekteres er tilnærmet proporsjonal med størrelsen av cellen som belyses. Lys som spres i rett vinkel (90°) til laserstrålen kalles side scatter (SSC). Dette er hovedsakelig lys som reflekteres fra cellenes interne strukturer, og sier noe om cellenes granularitet [46]. For deteksjon av lysspredning og fluorescens brukes dioder og fotomultiplikatorrør-detektorer (PMTer). Dioder har relativt lav sensitivitet, men kan detektere lys over et stort spekter og har en rask respons, og benyttes for måling av FSC. PMTer er fotosensitive elektronrør. Disse gir en sensitiv deteksjon av fluorescenssignaler og et bra skille mellom reelt signal og bakgrunnsstøy. Etter eksitasjon fra laser emitteres og spres fluorescens og måles vinkelrett på laserstrålen som for SSC. Antall detekterte fotoner tilsvarer fluorescensintensitet som kommer an på antall molekyler bundet til en celle og på fluorokromets styrke. I deteksjonskammeret ledes fluorescens av forskjellige bølglengder til separate detektorer ved hjelp av optiske filtre og dikroiske speil. Longpass-filtre (LP) fungerer som dikroiske speil som slipper gjennom fluorescens høyere enn en viss bølglengde, og reflekterer fluorescens lavere enn denne bølglengden til neste detektor. Bandpass-filtre (BP)

plassert foran hver detektor slipper gjennom fluorescens i et bestemt bølglengdeintervall (se figur 18) [48].



Figur 18: Eksempel på optiske LP- og BP-filtre. Et 500 LP-filter slipper gjennom fluorescens over 500 nm og reflekterer lys med lavere bølglengde. Et 695/40 BP-filter slipper gjennom fluorescens i intervallet 675-715 nm [48].

Kompensering

Et fluorokrom har sitt unike eksitasjons- og emisjonsspekter. Emisjonsspektrene til ulike fluorokromer kan overlappes mer eller mindre med hverandre, avhengig av hvor brede de er [43]. Lekkasje inn i andre kanaler kan reduseres med optiske filtre som stenger en del av den uønskede fluorescensen ute. I tillegg må en kompensering til, hvor det uønskede signalet trekkes fra det totale signalet i detektoren. En multicolor immunfarging vil kreve mange parvise kompenseringskontroller for å kompensere for alle fargene. Derfor gjøres kompenseringen matematisk med lineær algebra ved hjelp av softwareprogrammer, enten før eller etter oppsamling av data [49]. Utregningen baserer seg på en samling målinger av fluorescenssignaler fra enkeltfargete kontroller som transformeres til en kompenseringsmatrix. Denne uttrykker hvordan hver detektor responderer på hvert fluorokrom [51]. En bakdel ved kompensering er den lave presisjonen på målinger fra det røde området for synlig lys ettersom PMTer som detekterer fluorescens ved disse bølglengdene har en lav effektivitet. Andre unøyaktigheter ved softwarekompensering er den elektroniske omgjøringen fra lineær til logaritmisk skala, som øker med antall fluorokromer som benyttes. Valg av fluorokromer med minst mulig overlappende emisjonsspektra er derfor det beste [49].

Tandemkonjugater er spesielt vanskelige når det gjelder kompensering. Ratioen mellom akseptor- og donormolekylet kan være fra 1:3 til 1:10, noe som kan variere mellom ulike produsenter og til og med mellom ulike lot fra samme produsent. Egne kompenseringer må derfor gjennomføres for hvert enkelt tandemkonjugerte fluorokrom og bør gjentas ved

lotskifte. Lysbeskyttelse er også en kritisk faktor ettersom akseptormolekylet kan brytes ned ved lyseksponering slik at fluorescensen som sendes ut består av en større og større andel fluorescens fra donormolekylet. Dette vil registreres i kanalen som detekterer donormolekylet og gi falsk positivitet [49]. Nyere fluorokromer har derimot økt stabilitet; noen produsenter garanterer også lot-til-lot stabilitet [52].

Elektronikk

Hver måling som registreres av en PMT kalles for en "event". Dette tilsvarer i de fleste tilfeller en enkelt celle. Fluorescensen som treffer en PMT danner en strømpuls. Styrken av en slik puls er proporsjonal med antall fotoner som detekteres av en PMT. En terskelverdi er satt for å ekskludere elektronisk bakgrunnsstøy og for å sikre at kun signaler som er sterkere enn terskelverdien går til videre prosessering. Når flere lasere benyttes samtidig må signalene forsinkes ("time delay") så de kan presenteres til samme tid for samme celle [49].

Spenningspulsene passerer gjennom en analog-til-digital-omformer før de kan visualiseres som kanalverdier. FSC og SSC er lineære variabler, mens fluorescensintensitet vanligvis synliggjøres på en logaritmisk skala [43].

Analysering

Resultater fra en flowcytometrisk analyse kan framstilles grafisk på to hovedmåter; i et enkeltparameters histogram som viser frekvensen av den målte parameteren, eller i et topparameters "dot plot" med en parameter på hver akse hvor en event vises som en enkelt prikk [46]. Dataene analyseres ved å legge til regioner eller "gater" i histogrammene for å identifisere populasjoner av interesse. Gater kan settes rundt enkeltparametre, eller være en kombinasjon av flere regioner. En slik sammenkobling kan følges ved bruk av Boolean statistikk med logiske operatorer som AND, OR og NOT [43]. Nyere softwareprogrammer muliggjør visualisering av flere parametre på en gang, som for eksempel Infinicyt fra Cytognos [53].

Kvalitetssikring

Daglig kvalitetskontroll av flowcytometeret utføres for å overvåke reproduksjon av optisk justering av lasere, time delay og andre parametre for å detektere eventuell drift av laserstyrke o.a. Dette utføres ved hjelp av analyse av fluorescerende latexkuler for å overvåke dag-til-

dag-variasjon. I tillegg sørger årlig vedlikehold fra produsent for at flowcytometeret presterer tilfredsstillende [48].

I tillegg bør positive og negative kontroller utføres for de kliniske prøvene. Negative kontroller kan observeres internt i pasientprøver ved å forsikre seg om at populasjoner som er kjent negative for et antigen har tilfredsstillende bakgrunnsfarging i forhold til den positive populasjonen. Positive kontroller kan være vanskelig å oppdrive, spesielt når det gjelder antigener som er sjeldent uttrykt [46]. Standardprosedyrer for immunfarging bør benyttes for å unngå feil prøvebehandling [48].

Uønsket binding av antistoff består av flere elementer. Uspesifikk binding vil si at et antistoff via Fab'-regionen binder til en annen epitope enn det er rettet mot. Uønsket binding av antistoff kan være at antistoffenes Fc-region binder til Fc-reseptorer på overflaten av andre celletyper enn ønsket [54]. Selve fluorokromet kan også gi uønsket binding til cellebestanddelene via ladde molekylgrupper [55]. Den beste måten for å eliminere uønsket binding av antistoff er å finne optimal antistoffkonsentrasjon via antistofftitrering [56].

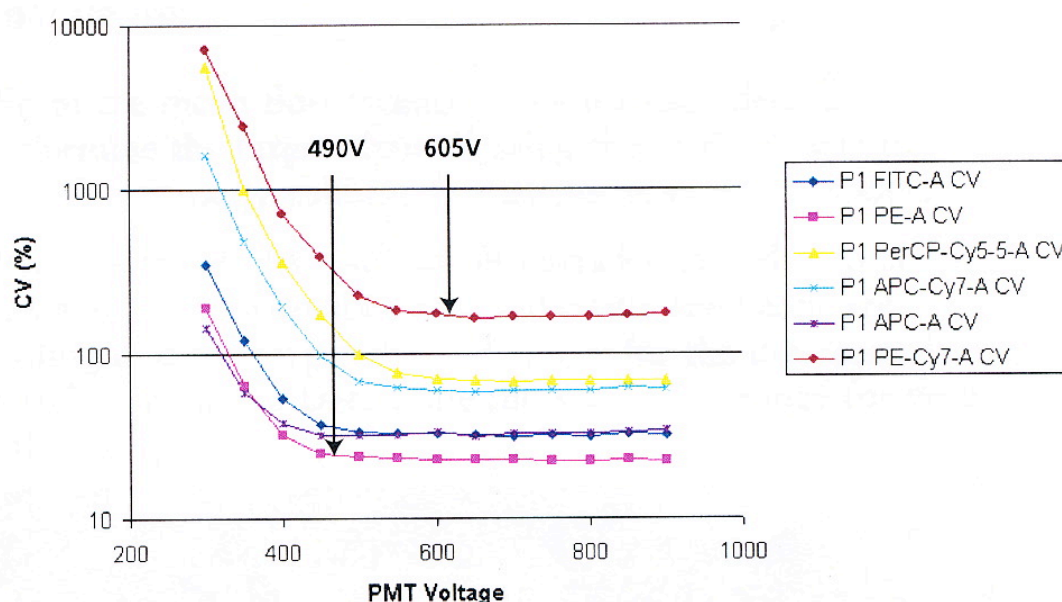
I tillegg er det vesentlig at antistoffene som benyttes tilsettes ved sin optimale antistoffkonsentrasjon. Denne konsentrasjonen kan finnes ved å titrere antistoffene, som er en strategi for å finne den høyeste diskrimineringen av celler med positivt uttrykk (ekte fluorescenssignal) fra celler med negativt uttrykk (bakgrunnsignal, "noise") av et antigen. Den optimale antistoffkonsentrasjonen betegnes dermed som den konsentrasjonen hvor signal-til-noise-ratio (S/N-ratio) er høyest og hvor mean/median fluorescensintensitetsverdiene (MFI) flater ut i et platå. Dette vil si at det er bundet antistoff til alle tilgjengelige epitoper på det aktuelle antigenet, og en metningskonsentrasjon er oppnådd. Den optimale antistoffkonsentrasjonen bør være så høy at alle epitoper har bundet antistoff, men ikke for høy ettersom mengden uønsket binding øker med konsentrasjonen. En S/N-ratio på minst 3 er minimum anbefalt for antistoffer benyttet i diagnostikk. Uønsket binding har lavere affinitet enn den spesifikke epitopebindingen og synker derfor når antistoffkonsentrasjonen går ned [57].

Optimalisering av PMT-verdier

PMTer gir en lineær respons på fluorescenssignaler kun i noen områder av lysspekteret. Jo høyere spenning som settes på detektorene, desto mer elektronisk støy blir det [48]. Det er derfor hensiktsmessig å finne de ulike detektorenes optimale spenningsverdi med lavest mulig andel støy og som skiller svak positiv fluorescens fra bakgrunnssignaler. En måte å finne de

optimale verdiene på er å registrere hvilken PMT-spenningsverdi som gir lavest variasjonskoeffesient (% CV), og dermed høyest sensitivitet for detektoren [58].

Målingene av de ulike PMT-spenningsverdiene presenteres grafisk og % CV leses av der kurven flater av i et platå. Den korresponderende PMT-spenningsverdien er minimum anbefalt spenning for den aktuelle detektoren (se figur 19). Partikler med lav fluorescensintensitet benyttes for optimalisering av PMT-verdier. For dette formålet kan SPHERO Rainbow Calibration Beads fra Spherotech benyttes [58]. Dette er partikler som inneholder en blanding av fluorokromer som kan eksiteres ved bølgelengder i området 365-650 nm [59]. Partikler med høyere fluorescensintensitet kan benyttes for overvåking av fluorescenssignalenes linearitet over tid. Signalene skal da falle innenfor det satte fluorescensvinduet [58].



Figur 19: Eksempel på avlesning av optimale PMT-verdier for de forskjellige fluorescenskanalene. I dette eksemplet er det benyttet 6-peak Rainbow Calibration Beads fra Spherotech som inneholder fluorokromer som emitterer fluorescens ved seks ulike intensiteter [58].

1.6 Antistoffkombinasjoner for identifisering av B-cellepopulasjoner

Antistoffer som brukes ved flowcytometrisk immunfenotyping er oftest monoklonale av mus-anti-humantype. For å produsere monoklonale antistoffer fusjoneres en normal antistoffproduserende plasmacelle (etter immunisering av mus med ønsket antigen) med en myelomcelle. Den resulterende hybridcellen, et hybridom, har fått de udødelige karakteristikkene til kreftcellen, og sekreterer antistoff med spesifisiteten til den normale

plasmacellen. Hybridomcellene dyrkes i kultur og produserer store mengder monoklonalt antistoff [60]. Polyklonale antistoffer til bruk for flowcytometri deriveres fra serum fra dyr immunisert med humane antigener. F(ab')₂-delen av antistoffet brukes gjerne for polyklonale antistoffer for å minimere uspesifikk binding [57].

1.6.1 Multicolor antistoffkombinasjoner

EuroFlow B-CLPD-kombinasjoner

Kategorisering av hematologiske sykdommer bygger på parametre som morfologi, immunfenotyping og genetiske data, i tillegg til kliniske opplysninger og sykdomsforløp [40]. Bethesda sin internasjonale konsensus for flowcytometrisk immunfenotyping av hematolymfoide neoplasier anbefaler at flowcytometri er en sentral del i undersøkelsen av en rekke kliniske situasjoner, som ved organforstørrelse, lymfocytose og cytopenier. Flowcytometri er en effektiv metode for bestemmelse av sykdommens tilstedeværelse og for klassifisering. I tillegg er teknikken nyttig for å finne stadiet til en nyoppdaget tilstand, minimal sykdomsanalyse (MRD), og overvåking av progresjon/tilbakegang av lymfatiske sykdommer [61].

EuroFlow-konsortiumet består av en gruppe europeiske forskningssentre og bioteknologiske firmaer som anses å ha den fremste ekspertisen innen flowcytometri. Gruppen har som mål å videreutvikle og standardisere flowcytometriske undersøkelser av hematologiske maligniteter. I 2009 ble det presentert multicolor antistoffpaneler (8-fargeeksperimenter) for ulike sykdomsgrupper [53].

Antistoffpanel for B-CLPD inneholder markører som er valgt ut med utgangspunkt i publiserte data [42, 53] og upublisert materiale fra EuroFlows egne laboratorier. Panelene settes opp med basis i overflateantigener som allerede er kjent for å ha en diagnostisk verdi i B-cellemaligniteter. Markører som reflekterer normalt modnings- og differensieringsmønster for B-celler, samt ulike homing- og adhesjonsmolekyler er inkludert i antistoffpanelet for B-CLPD. Utvidet uttesting av ulike fluorokromer er gjennomført for optimalisering av fluorescenssignalene. Åtte hovedtyper B-CLPD er tatt hensyn til i panelene. Disse inkluderer BL, KLL, DLBCL, FL, HCL, LPL, MCL og MZL [42]. Noen antigener vil skille seg fra hverandre ved at de enten uttrykker positivitet eller negativitet, mens ulik intensitet kan gi en kvantitativ forskjell mellom andre markører [43]. I prinsippet oppnås en multicoloranalyse med opptil 29 parametre hvis alle analyserte filer slås sammen [42].

Prinsippet EuroFlow benytter seg av er først å analysere lymfoid screeningrør (LST) i forkant av de fire mer målrettede kombinasjonene. Ut fra KLL-kombinasjonen kan KLL skilles fra de andre typene av B-CLPD, mens de tre øvrige kombinasjonene kan brukes for identifisering av de andre typene B-CLPD (se tabell 4, kapittel 3.1.2, for antistoffpanel for B-CLPD). Alle fem kombinasjonene inneholder ”backbone”-markører som benyttes for å identifisere B-celler og for å skille disse fra andre lymfocytter. Dette inkluderer pan-leukocytmarkøren CD45, samt B-cellelinjemarkørene CD19 og CD20, som i alle kombinasjonene er konjugert til samme fluorokrom [53]. Hensikten med backbonemarkører er at ulike filer kan slås sammen (merges) slik at alle markører som er kjørt i et panel kan undersøkes samtidig i en multidimensjonal analyse for en og samme populasjon. I tillegg kan også samme kombinasjon fra prøver fra ulike pasienter merges og sammenlignes med hverandre ved at den ene prøvens immunfenotypeprofil fungerer som et referansebilde. Analysene visualiseres i banddiagrammer eller multidimensjonelle histogrammer. Filsammenslåingen krever softwareprogrammet Infinicyt som er spesielt utviklet for denne bruken. EuroFlow-konsortiet sitt mål er å samle opp en database bestående av normale, reaktive og maligne prøver, og ut fra denne etablere referansebilder for ulike maligniteter. APS-systemet (automatisk populasjonseparator) er også en del av Infinicyt-software. Dette muliggjør visualisering av ulike populasjoner i en prøve på grunnlag av de parametrene som gir den største separasjonen mellom disse ut fra alle parametre kjørt i et panel [62].

Immunsviktkombinasjoner

I Warnatz’ publikasjon fra 2008 [21] er det beskrevet antistoffkombinasjoner som muliggjør karakterisering av B-cellepopulasjoner i perifert blod, både i normale tilfeller og hos individer med immunsviktiltstander. B-celler identifiseres ved hjelp av linjemarkører som CD19 og CD20. Opptil seks sirkulerende B-cellepopulasjoner kan detekteres ved å kombinere ulike overflatemarkører i to forskjellige kombinasjoner. For å skille mellom naive og de ulike typer hukommelses-B-celler benyttes markørene CD27, IgM og IgD. Ved å kombinere CD21, CD38 og IgM kan transisjonelle B-celler skilles fra plasmablaste og CD21_{lav}-B-celler. CD23 nevnes også som en nyttig markør for identifisering av modne B-celler [21].

2 Formål med oppgaven

Små B-cellekloner er blitt observert i blod- og benmargsprøver hos noen pasienter diagnostisert med DLBCL [63]. Hematopatologigruppen ved Patologiklinikken på OUS, Radiumhospitalet, ønsker i en større studie å karakterisere disse B-celleklonene immunfenotypisk ved hjelp av flowcytometri. Andelen av og immunfenotypen til disse små B-celleklonene varierer betydelig. En detaljert immunfenotyping tillater imidlertid å skille disse patologiske B-celleklonene fra normale og reaktive B-celler.

Denne oppgaven er et forarbeid for den større prospektive studien. Det er blitt utarbeidet multicolor-paneler med antistoffkombinasjoner for karakterisering og utvidet informasjon om B-cellepopulasjoners fenotypeprofil når det gjelder normale B-cellepopulasjoner i blod og lymfocytter i ulike typer B-CLPD sykdommer. Multicolor-panelene er utarbeidet med utgangspunkt i EuroFlow-konsortiumets anbefalinger [42, 53].

I tillegg er Laboratorium for Flowcytometri ved Patologiklinikken på OUS, Radiumhospitalet blitt forespurt av klinikere ved sykehuset om å utarbeide antistoffpaneler for diagnostisering av immunsvikttilstander. For dette arbeidet er det tatt utgangspunkt i Warnatz' publikasjon fra 2008 når det gjelder immunfenotyping [21]. Følgende eksperimenter er utført i denne oppgaven:

- Valg av kloner for monoklonale antistoffer og valg av fluorokromer. EuroFlows anbefalinger er testet ut, mens egne valg av antistoffkloner er gjort med utgangspunkt i Warnatz' publikasjon.
- Titrering av antistoffer og kvalitetssikring av antistoffkombinasjoner (sammenligning med gammel metode, fluorescens minus one).
- Etablering av normalverdier for B-cellepopulasjoner i perifert blod for eget laboratorium.
- Utprøving av antistoffkombinasjoner på normale, avvikende og maligne blod- og benmargsprøver, samt analysering og klassifisering av de ulike tilstandene i egnede softwareprogrammer.

Problemstilling:

Hvilke multicolor antistoffkombinasjoner er egnet for identifisering av B-cellepopulasjoner i normale, avvikende og maligne blod- og benmargsprøver?

3 Metoder

3.1 Flowcytometer og antistoffkombinasjoner

Alle flowcytometriske analyser utføres på LSR II fra Becton Dickinson (BD). Analyse av flowcytometridata utføres med softwareprogrammer FloJo versjon 8.8.6 fra Tree Star Inc. og Infinicyt versjon 1.5 for EuroFlow fra Cytognos.

3.1.1 Konfigurering for LSR II

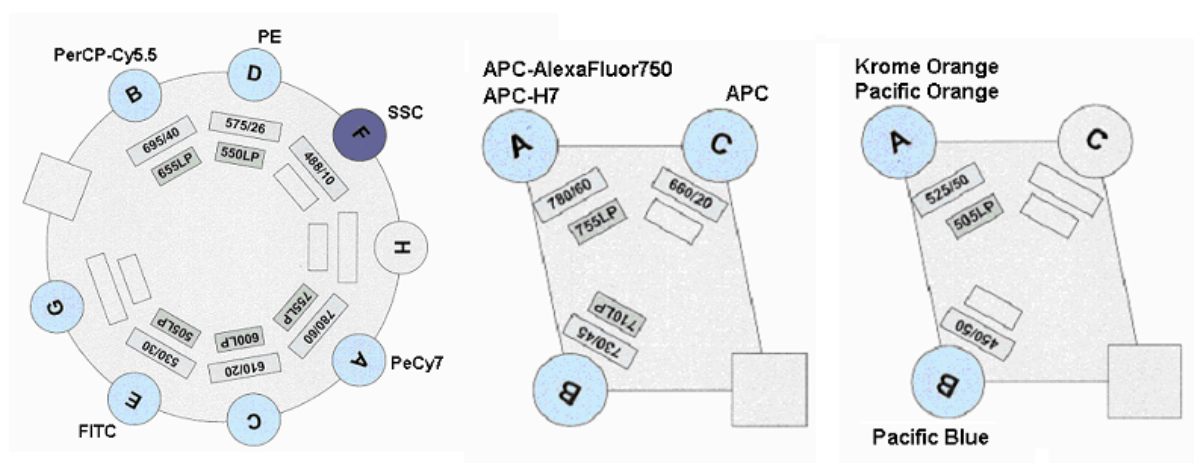
Et flowcytometers fysiske konfigurering er en kombinasjon av lasere, PMT-detektorer, optiske filtre og dikroiske speil. PMT-detektorer på LSR II er konfigurert i trigon- eller oktagonformasjon (se figur 20). PMTene står i alfabetisk rekkefølge etter hvor emittert fluorescens med den lengste bølgelengden treffer først. Kortere bølgelengder reflekteres til neste PMT via LP-filtre. Foran hver detektor er det plassert BP-filtre som slipper gjennom fluorescens av ønsket bølgelengde.

LSR II er utstyrt med følgende lasere:

Blå laser, 20 mW: 488 nm Argon laser

Rød laser, 20 mW: 635 nm HeNe laser

Fiolett laser, 25 mW: 405 nm Coherent Vioflame diodelaser



Figur 20: Konfigureringsoppsett for LSR II. Venstre: Oktagonoppsett for blå laser. Midten: Trigonoppsett for rød laser. Høyre: Trigonoppsett for fiolett laser. Emittert lys kommer inn ved firkanten. BP- og LP-filtre er plassert foran detektorene [64].

3.1.2 Fluorokromer og antistoffkombinasjoner

Fluorokromer for antistoffkombinasjoner er valgt ut fra konfigurasjon for LSR II med utgangspunkt i EuroFlows retningslinjer [53] og egne uttestinger (se tabell 3).

	Eksitasjonsmax (nm)	Emisjonsmax (nm)	PMT på LSR II	LP	BP
FITC	494	520	E	505	530/30
PE	496	578	D	550	575/26
PerCP-Cy5.5	482	695	B	655	695/40
PeCy7	496	785	A	755	780/60
APC	650	660	C	-	660/20
APC-H7	650	785	A	755	780/60
APC-AF750	650	775	A	755	780/60
Pacific Blue	401	452	B	-	450/50
Krome Orange	398	528	A	505	525/50

Tabell 3: Eksitasjons- og emisjonsmaksimum for valgte fluorokromer, og i tillegg hvilken PMT-detektor i LSR II som detekterer fluorescens fra det aktuelle fluorokromet og informasjon om BP- og LP-filterkonfigurasjon for hver PMT-detektor. FITC: Fluorescein isothiocyant, PE: Phycoerythrin, PerCP-Cy5.5: Peridinin klorofyll protein-Cyanin5.5, PeCy7: Phycoerythrin-Cyanin7, APC: Allophycocyanin, APC-H7: Allophycocyanin-Hilite7, APC-AF750: Allophycocyanin-AlexaFluor750 [65, 66, 67].

Antistoffer for multicolor-kombinasjoner for identifisering av B-cellepopulasjoner velges med utgangspunkt i EuroFlows retningslinjer (se tabell 4) [53].

	Blå laser 488 nm				Rød laser 633 nm		Fiolett laser 405 nm	
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PeCy7	APC	APC-H7 / APC-AF750	Pacific Blue	Krome Orange
LST	CD8+ Kappa	CD56+ Lambda	CD5	CD19 + TCR $\gamma\delta$	CD3	CD38	CD20 + CD4	CD45
KLL	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43	CD20	CD45
B-CLPD 3	CD31	LAIR1	CD11c	CD19	IgM	CD81	CD20	CD45
B-CLPD 4	CD103	CD95	CD22	CD19	CXCR5	CD49d	CD20	CD45
B-CLPD 5	CD62L	CD39	HLA-DR	CD19	CD27	-	CD20	CD45

Tabell 4: Fem multicolor antistoffkombinasjoner for flowcytometrisk immunfenotyping av B-CLPD med utgangspunkt i EuroFlows retningslinjer er blitt testet ut (heretter kalt EuroFlow-kombinasjoner som fellesbetegnelse for alle fem kombinasjoner). Uthevede kolonner benyttes i alle kombinasjoner og fungerer som backbonemarkører. LAIR1: Leukocytassosiert Ig-lik reseptor-1. For informasjon om overflatemarkører, se vedlegg 1. For informasjon om antistoffenes produsent og antistoffklon, se vedlegg 2.

Når det gjelder antistoffkombinasjoner for identifisering av B-cellepopulasjoner i perifert blod med hensyn på immunsvikttilstander (heretter kalt CVID-kombinasjoner) er disse designet med utgangspunkt i Warnatz' publikasjon fra 2008 når det gjelder valg av overflatemarkører. Fluorokromene i CVID-kombinasjonene er valgt til å være de samme som for EuroFlow-kombinasjonene, i tillegg til noen av antistoffklonene, inkludert backbonemarkørene (se tabell 5).

	Blå laser 488 nm				Rød laser 633 nm		Fiolett laser 405 nm	
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PeCy7	APC	APC-H7 / APC-AF750	Pacific Blue	Krome Orange
CVID 1	CD21	CD23	-	CD19	CD27	CD38	CD20	CD45
CVID 2	IgM	IgD	-	CD19	CD27	CD38	CD20	CD45

Tabell 5: To antistoffkombinasjoner for flowcytometrisk immunfenotyping av B-cellepopulasjoner i perifert blod er blitt designet og testet ut. For informasjon om overflatemarkører, se vedlegg 1. For informasjon om antistoffenes produsent og antistoffklon, se vedlegg 2.

Antistoffkombinasjonene er testet ut på normale, avvikende og maligne blod- og benmargsprøver for å finne uttrykksmønstre av overflatemarkører for de ulike B-cellepopulasjonene. Normalblod er tappet fra friske individer. For avvikende og maligne blod- og benmargsprøver er det benyttet restmateriale fra prøver sendt for flowcytometrisk immunfenotyping fra pasienter diagnostisert med de ulike tilstandene.

3.1.3 Kompensering på LSR II

Kompenseringsmatrix for LSR II beregnes automatisk av BD FACSDiva software etter analysering av Ig-kuler farget enkeltvis for hvert enkelt fluorokrom og tandemkonjugat ved optimale PMT-verdier satt ut fra Woods framgangsmetode [58]. PMT-spenningsverdier for lysspredning (FSC/SSC) settes ut fra celler fra normalblod.

Reagenser:

SPHERO Rainbow Calibration Particles, 8 peaks, Art. nr. RCP-30-5A, Spherotech

BD CompBeads Negative Control (FBS), Art. nr. 51-90-9001291

BD CompBeads Antimouse Ig, κ, Art. nr. 51-90-9001229

3.1.4 Kvalitetskontroller for LSR II

BD FACSDiva Software har et innebygget program for automatisk kvalitetskontroll av instrumentet. Kvalitetskontrollen utføres med BD Cytometer Setup & Tracking beads (CS&T beads). Dette er en blanding av polystyrenkuler med tre forskjellige emisjonsintensiteter (svak, middels og sterk) av ulike fluorokromer tilpasset LSR II sitt laseroppsett.

Kvalitetskontrollen består av to deler, Cytometer Baseline og Performance Check. Cytometer Baseline definerer en verdi som daglige Performance Check kontrollkjøringer skal måles opp mot for kontrollering av instrumentets reproduserbarhet. MFI og % CV måles for alle intensiteter i alle detektorer. Denne informasjonen brukes i algoritmer som beregner parametere som sier noe om PMTenes effektivitet, bakgrunnsstøy og annet. I tillegg settes time delay for de ulike laserne ved hjelp av CS&T-kulene. Programmet utarbeider rapporter og Levey-Jenningsplot for resultatene [68].

PMT-spenningsverdier som er bestemt ut fra Baseline Settings-prosedyre [58] verifiseres daglig ved hjelp av Rainbow Fluorescent Particles fra BD (Mid-range kuler) og avlesning av MFI-verdi for disse. Dette er partikler som inneholder en blanding av fluorokromer som eksiteres i området 365-650 nm. MFI-verdien ved den optimale PMT-spennning settes som mean-verdi i et Levey-Jenningsplot slik at resultatene kan følges fra dag til dag. Drift i laserstyrke, trykkproblemer og andre feilkilder kan fanges opp på denne måten [58, 69].

Reagenser:

BD Cytometer Setup & Tracking beads, Art. nr. 642412

Rainbow Fluorescent Particles, 3,0-3,4 µm (mid-range FL1 fluorescence), Art.nr. 556298, Sphero™, BD

3.2 Immunfarging

For immunfarging benyttes direkte fargemetode etter ”stain-lyse-wash”-prinsippet [70]. Før fargeprosedyren starter, vaskes antikoagulert blod eller benmarg to ganger med 0,9 % NaCl for å fjerne serum-Ig i tilfelle cellenes Ig-ekspresjon skal detekteres [43]. For antistoffkombinasjonene prepareres ferdige fortynningsløsninger som inneholder alle antistoffene i en kombinasjon, og som rekker til alle prøvene som skal farges med den spesifikke kombinasjonen. På denne måten blir alle antistoffene tilsatt prøvematerialet til samme tid [71]. Fargeprosedyren består av følgende trinn:

Direkte immunfarging:

Antistoff tilsettes $0,5-1,0 \times 10^6$ vasket blod eller benmarg og inkuberes mørkt ved romtemperatur i 15 minutter.

2 ml FACSLysing Solution tilsettes. Prøven inkuberes mørkt ved romtemperatur i 5 minutter.

Prøven sentrifugeres i 5 minutter ved 290 g. Supernatanten helles av.

2 ml PBS tilsettes. Prøven sentrifugeres i 5 minutter ved 290 g. Supernatanten helles av.

150 μ l FACSFlow bærevæske tilsettes. Prøven er klar for flowcytometrisk analyse.

Reagenser:

NaCl 0,9 %, B. Braun Medical AS

Aqua B.Braun Medical AS (destillert vann)

Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg, art.nr H15-002, PAA Laboratories GmbH

BD FACS Lysing Solution (10x) fortynnet med destillert vann 1:10, art.nr 349202

BD FACSFlow Sheath Fluid, art. nr. 342003

Fortynningsvæske for antistoffer:

PBS med 1 % BSA (bovint serumalbumin) og 0,08 % NaN_3

Informasjon om antistoffer benyttet i fargeprosedyrer, se vedlegg 1 og 2

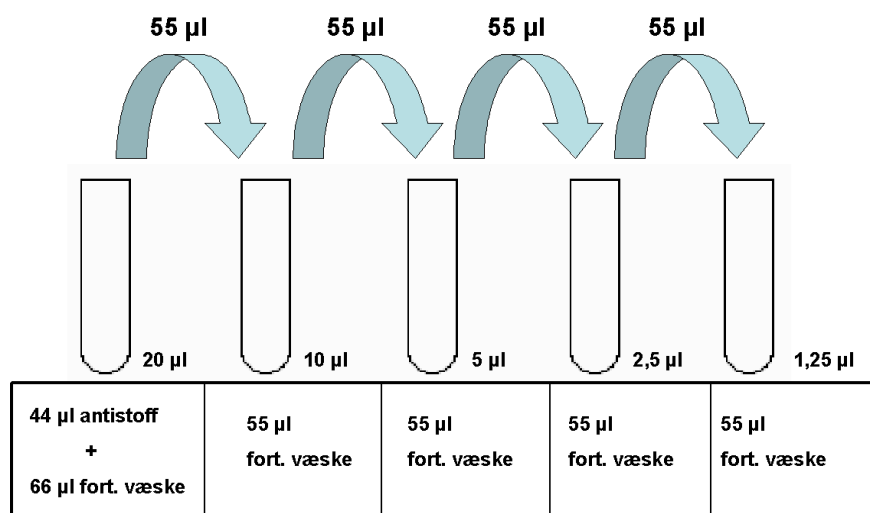
Prøvemateriale:

Antikoagulert blod/benmarg

3.3 Titrering av antistoffer

Det er anbefalt å utføre en titrering av antistoffer for å finne optimal antistoffkonsentrasjon som gir det høyeste signalet for positiv populasjon og det laveste signalet for negativ populasjon og dermed best skille mellom populasjonene, i tillegg til minst mulig uspesifikk binding [57].

Titreringsrekken settes opp som en fempunkts, tofolds fortynningsrekke med utgangspunkt i anbefalt antistoffkonsentrasjon fra produsent (se figur 21) [71]. Som prøvemateriale benyttes blod eller benmarg som inneholder ca $0,5-1 \times 10^6$ totale celler. Totalt volum av antistofffortynning som tilsettes prøvematerialet er konstant (50 μ l), mens mengden antistoff i de fem fortynningene halveres fra et fortynningstrinn til neste [54]. MFI-verdi registreres for positiv og eventuell negativ populasjon etter kjøring på flowcytometeret.



Figur 21: Eksempel på fempunkts tofolds titreringsrekke. Hvis anbefalt volum fra produsent er 10 µl pr test, starter fortynningsrekken ett trinn over dette, det vil si på 20 µl, og videre nedover; 10 µl, 5 µl, 2,5 µl og 1,25 µl. I det første røret prepareres en fortynning som består av 44 µl antistoff og 66 µl fortynningsvæske, til sammen 110 µl (regner med 10 % dødvolum ved pipettering). 55 µl fortynningsvæske er på forhånd tilsatt de neste fire rørene. 55 µl av fortynningen i første rør overføres til neste rør i rekken, deretter overføres 55 µl av fortynningen i andre rør til tredje rør i rekken og så videre. 50 µl av de fem ulike fortynningene tilsettes til slutt vasket prøvemateriale etter vanlig fargeprosedyre.

Antistoffer som skal benyttes for diagnostikk av B-CLPD og identifisering av normale B-cellepopulasjoner er titrert minst to ganger. I de fleste tilfeller er det benyttet normalblod som prøvemateriale hvis den aktuelle markør er til stede på normale lymfocytterpopulasjoner i blod. Noen markører finnes normalt ikke (eller er svakt uttrykt) på lymfocytter i blod hos friske individer. I disse tilfellene er det benyttet maligne celler fra pasienter med en type B-CLPD som uttrykker den aktuelle markøren.

Interne negative kontroller er cellepopulasjoner som ikke uttrykker antigenet som skal måles. Denne populasjonen vil derfor være umerket i samme prøve som den merkede, positive populasjonen, og begge populasjonene er også dermed behandlet under like forhold [54]. For noen markører finnes det ingen korresponderende intern negativ kontroll i samme prøve [72]. I slike tilfeller er det hensiktsmessig å inkludere en annen markør som kan benyttes for å ekskludere celler som ikke skal vurderes, for eksempel en cellelinjemarkør, ved gatingstrategier [54].

Grafisk fremstilling av antistoffmetning utføres i Microsoft Excel.

Prøvemateriale:

Antikoagulert blod/benmarg

3.4 Fluorescence Minus One

Den beste kontrollen for å bestemme terskelverdi for bakgrunnsfarging av en cellepopulasjon ved multicolor immunfenotyping er fluorescence minus one-metoden (FMO) [49].

Bakgrunnsfarging består av elektronisk støy i tillegg til autofluorescens som varierer mellom ulike cellepopulasjoner. Bakgrunnssignalet består også av fluorescens fra kompensering for spektral overlapp. Bakgrunnssignalet med opphav i kompensering er proporsjonalt med % CV og MFI for positiv populasjon, og også med relativ andel fluorescenssignaler som lekker inn i ("bleeding") i detektoren hvor fluorescens fra fluorokromet av interesse måles. Fluorescens som skyldes spektral overlapp kommer an på mengden kompensering. FMO-kontrollene gjenspeiler dermed den reelle økningen i % CV for negativ populasjon som den fullstendige antistoffkombinasjonen vil ha (i motsetning til enkeltfargete prøver) [54].

For en antistoffkombinasjon med åtte antistoffer benyttes åtte FMO-kontroller. FMO kontroller er prøver farget med alle antistoffer i en antistoffkombinasjon bortsett fra ett [49]. Den umerkede populasjonen i en FMO-kontroll fungerer i prinsippet som en intern negativ kontroll for denne kanalen, og kan benyttes for å sette terskelverdi mellom negativt og positivt uttrykk av den aktuelle markøren. FMO-kontroller er også nyttig for identifisering av populasjoner med positivt uttrykk av et bestemt antigen i multicolor-analyser som består av mange ulike cellepopulasjoner. Ved å sammenligne FMO-kontrollen som ikke inneholder det aktuelle antigenet med en prøve farget med full antistoffkombinasjon kan en region for positiv populasjon settes [54].

Prøvemateriale:

Antikoagulert blod/benmarg

3.5 Sammenligning av multicolor-kombinasjon med 4-fargepanel

Elleve tilfeldig valgte pasientprøver er blitt farget dobbelt med LST-kombinasjonen (8-farge) og med det tidligere benyttede lymfomscreeningpanelet (4-farge, se tabell 6). Pasientprøvene er anonymisert og nummerert fra 1-11. Cellepopulasjoner som sammenlignes er B-celler innen CD45+ celler, B-, T- og NK-celler innen lymfocytter, samt CD4/CD8-ratio for T-celler og Kappa/Lambda-ratio for B-celler.

	FITC	PE	695/40	APC
T-celler	CD7	CD8	CD3 PerCP	CD4
T-, B-, NK-celler	CD3	CD16+CD56	CD45 PerCP	CD19
B-celleklonalitet	Kappa	Lambda	CD20 PerCP-Cy5.5	CD19

Tabell 6: 4-fargepanel for lymfomscreening bestående av tre ulike kombinasjoner. Antistoffpanelet er det som ble benyttet før de nye uttestedede multicolor-kombinasjonene ble tatt i bruk. 4-fargepanelet er ikke standardisert på samme måte som de nye multicolor-panelene. Antistoffkloner og -produsenter er derfor varierende i noen av tilfellene, og dermed ikke dokumentert.

Utrekninger for sammenligning av de to antistoffpanelene er utført i Microsoft Excel.

Differanseplot settes opp for alle seks parametre. Eventuelle slengere testes ved hjelp av Grubbs test for slengere, og ekskluderes i videre analyser. Her regnes det ut en G-verdi (G_{obs}) som skal være lavere enn $G_{kritisik}$ fra tabell. Er differansene mellom metodene normalfordelte utføres parret t-test for å se om de to fargemetodene gir samme resultat på 5 % signifikansnivå ($\alpha = 0,05$). En t-test gjennomføres ved først å sette opp en nullhypotese hvor man går ut fra at det ikke er noen signifikant forskjell mellom parametre farget med de to metodene, det vil si **H_0 : 4-farge = 8-farge**. For å sjekke om H_0 er sann, regnes det ut en t-verdi (t_{obs}) fra de to datasettene som skal være lavere enn $t_{kritisik}$ fra tabell. Fra t-testen får man i tillegg en p-verdi. P-verdien er sannsynligheten for at forskjellen mellom de to datasettene, det vil si 4-farge og 8-farge, skyldes tilfeldigheter dersom nullhypotesen er sann. Hvis $p > 0,05$ beholdes H_0 , det vil si jo høyere p-verdi desto mer sikkert er det at forskjellene mellom datasettene skyldes tilfeldigheter [73].

Wilcoxon rank sum ikke-parametrisk test utføres med samme formål som parret t-test hvis differansene mellom metodene ikke er normalfordelte. Det settes opp en nullhypotese; **H_0 : 4-farge = 8-farge**, som testes ved å regne ut en z-verdi (z_{obs}) fra de to datasettene som skal være lavere enn $z_{kritisik}$ fra tabell, i tillegg ved sammenligning med en p-verdi [73].

3.6 Etablering av normalverdier for B-cellepopulasjoner i blod

Perifert blod er tappet fra 23 friske givere, og CVID 1- og 2-kombinasjoner er farget og kjørt på disse prøvene, og deretter analysert i FloJo analyseprogram for å finne andelen av de ulike B-cellepopulasjonene. Egne normalverdier er deretter blitt sammenlignet med normalverdier fra publikasjoner [21, 31].

Microsoft Excel er benyttet for utregning av median, 5. persentil og 95. persentil.

4 Resultater

4.1 Titrering av antistoffer

For de fleste antistoffene er det oppnådd en optimal antistoffkonsentrasjon for minst en av titreringsseriene ut fra den høyeste verdien for S/N-ratio hvis en intern negativ populasjon er til stede (mean eller median ratio), eller der MFI-verdiene flater i et platå av hvis ingen negativ populasjon er til stede (mean eller median metningskurve). Den optimale antistoffkonsentrasjon kan være lik som den anbefalte fra produsent (se tabell 7).

	Anbefalt kons. pr. test (µg/ml)	Optimal kons. pr. test (µg/ml)	Avlesningsmetode	Cellepopulasjoner benyttet		Antistoffpanel
				Positiv	Negativ	
CD4 Pacific Blue	Ikke oppgitt*	1,0	Mean ratio: 65	Th-celler	Andre lymf.	B-CLPD
CD10 PE	0,24	0,24	Median ratio: 72	B-celler fra FL-prøve	Andre lymf.	B-CLPD
CD19 PeCy7 (BD)	0,125	0,125	Median ratio: 119	B-celler	Andre lymf.	B-CLPD og CVID
CD20 Pacific Blue	0,5	0,5	Median ratio: 285	B-celler	Andre lymf.	B-CLPD og CVID
CD27 APC	6,0	6,0	Mean ratio: 132	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD og CVID
CD43 APC-H7	0,5	0,5	Mean FI metning (232)	T-celler	Andre lymf.**	B-CLPD
CD49d APC-H7	0,25	0,25	Median FI metning	Lymfocytter	Ingen	B-CLPD
CD79b PerCP-Cy5.5	0,25	0,25	Mean ratio: 58	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD
CD81 APC-H7	0,5	0,5	Median FI metning	Lymfocytter	Ingen	B-CLPD
IgD PE	Ikke oppgitt*	2,5	Median ratio: 364	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	CVID
TCRγδ PeCy7 (BD)	0,25	0,25	Median ratio: 488	T-celler (inkl. CD3)	Andre lymf.	B-CLPD

Tabell 7: Oversikt over titrerte antistoffer der optimal antistoffkonsentrasjon er den samme som anbefalt konsentrasjon. Alle cellepopulasjoner benyttet for titrering kommer fra perifert blod. Noen av markørene uttrykkes heterogent av flere cellepopulasjoner i en prøve. For å skille ut den populasjonen det aktuelle antistoffet skal testes på er det i slike tilfeller nødvendig å inkludere en cellelinjemarkør som CD19 eller CD3. Optimal antistoffkonsentrasjon er avlest fra grafisk framstilling av S/N-ratio eller MFI-verdi mot

antistoffkonsentrasjon. *For CD4 Pacific Blue og IgD PE finnes ingen anbefalt antistoffmengde fra produsent. **Negativ populasjon benyttes ikke ved avlesning fra metningskurve. S/N-ratio ved avlest metningsverdi står i parentes for dette antistoffet (CD43 APC-H7). For informasjon om produsent og antistoffklon, se vedlegg 2.

Den optimale antistoffkonsentrasjon kan også bli lavere enn anbefalt antistoffkonsentrasjon (se tabell 8).

	Anbefalt kons. pr. test (µg/ml)	Optimal kons. pr. test (µg/ml)	Avlesningsmetode	Cellepopulasjoner benyttet		Antistoffpanel
				Positiv	Negativ	
CD3 APC	0,25	0,125	Median ratio: 549	T-celler	Andre lymf.	B-CLPD
CD5 PerCP-Cy5.5	0,06	0,03	Median ratio: 89	T-celler	Andre lymf.	B-CLPD
CD11c PerCP-Cy5.5	0,25	0,125	Median ratio: 51	B-celler fra HCL-prøve (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD
CD19 PeCy7 (BC)	0,5	0,125	Mean ratio: 687	B-celler	Andre lymf.	B-CLPD og CVID
CD21 FITC	0,5	0,25	Median ratio: 22	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	CVID
CD22 PerCP-Cy5.5	0,25	0,125	Median ratio: 181	B-celler	Andre lymf.	B-CLPD
CD23 PE	1,0	0,5	Median ratio: 90	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	CVID
CD31 FITC	1,0	0,5	Median FI metning	B-celler (inkl. CD19)	Ingen	B-CLPD
CD38 APC-H7	0,5	0,25	Median FI metning	B-celler (inkl. CD19)	Ingen	B-CLPD og CVID
CD38 APC-AF750	0,125	0,0625	Median FI metning	B-celler (inkl. CD19)	Ingen	B-CLPD og CVID
CD39 PE	0,25	0,125	Median FI metning (38)	Lymfocytter	Andre lymf.*	B-CLPD
CD43 APC-AF750	1,0	0,25	Median ratio: 89	T-celler	Andre lymf.	B-CLPD
CD45 Krome Orange	1,0	0,5	Median FI metning	Lymfocytter	Ingen	B-CLPD og CVID
CD56 PE	0,25	0,125	Mean FI metning (23)	NK-celler	Andre lymf.*	B-CLPD
CD95 PE	0,5	0,125	Mean FI metning	Lymfocytter	Ingen	B-CLPD
CD103 FITC	0,125	0,0625	Median ratio: 13	B-celler fra HCL-prøve	Andre lymf.	B-CLPD

				(inkl. CD19)		
CD200 APC	0,25	0,125	Mean ratio: 84	B-celler fra KLL-prøve (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD
CXCR5 APC	0,1	0,05	Median ratio: 338	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD
LAIR1 PE	0,5	0,25	Median ratio: 38	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD
TCR$\gamma$$\delta$ PeCy7 (BC)	1,0	0,5	Median ratio: 1171	T-celler (inkl. CD3)	Andre lymf.	B-CLPD

Tabell 8: Oversikt over titrerte antistoffer der optimal antistoffkonsentrasjon er lavere enn anbefalt konsentrasjon. Noen av markørene uttrykkes heterogent av flere cellepopulasjoner i en prøve. For å skille ut den populasjonen det aktuelle antistoffet skal testes på er det i slike tilfeller nødvendig å inkludere en cellelinjemarkør som CD19 eller CD3. Optimal antistoffkonsentrasjon er avlest fra grafisk framstilling av S/N-ratio eller MFI-verdi mot antistoffkonsentrasjon. BC: Beckman Coulter. *Negativ populasjon benyttes ikke ved avlesning fra metningskurve. S/N-ratio ved avlest metningsverdi står i parentes for disse antistoffene (CD39 PE og CD56 PE). Alle cellepopulasjoner benyttet for titrering kommer fra perifert blod. For informasjon om produsent og antistoffklon, se vedlegg 2.

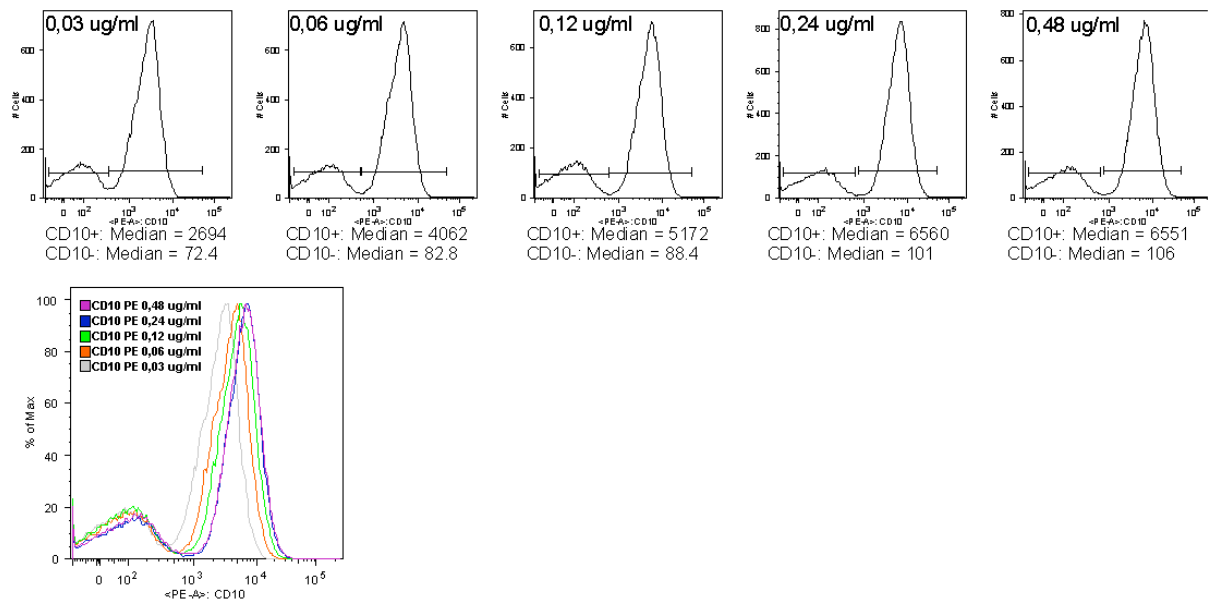
For enkelte av de titrerte antistoffene er det ikke funnet en topp for S/N-ratio eller en avflatning av metningskurven, og dermed heller ingen optimal antistoffkonsentrasjon (se tabell 9). I disse tilfellene er anbefalt mengde fra produsent benyttet. S/N-ratio ved anbefalt mengde fra produsent er oppgitt der den er tilgjengelig (ved visuelt godt skille mellom positiv og negativ populasjon, selv om ingen metningskonsentrasjon oppnås).

	Anbefalt kons. pr. test (µg/ml)	Optimal kons. pr. test (µg/ml)	Valg av antistoffkons.	Avlest S/N-ratio ved valgt kons.	Cellepopulasjoner benyttet		Antistoffpanel
					Positiv	Negativ	
CD8 FITC	0,25	0,25	Benyttet anbefalt kons.	193	T-celler	Andre lymf.	B-CLPD
CD23 FITC	1,0	1,0	Benyttet anbefalt kons.	17	B-celler fra KLL-prøve (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD
CD62L FITC	12,5	12,5	Benyttet anbefalt kons.	Metningskurve	Lymfocytter	Ingen	B-CLPD
HLA-DR PerCP-Cy5.5	0,06	0,06	Benyttet anbefalt kons.	410	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD
IgM FITC	4,0	4,0	Benyttet anbefalt kons.	8	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	CVID
IgM APC	0,06	0,06	Benyttet anbefalt kons.	98	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD
Kappa PE	0,0007	0,0007	Benyttet anbefalt kons.	10	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD
Lambda FITC	0,001	0,001	Benyttet anbefalt kons.	13	B-celler (inkl. CD19)	Andre lymf.	B-CLPD

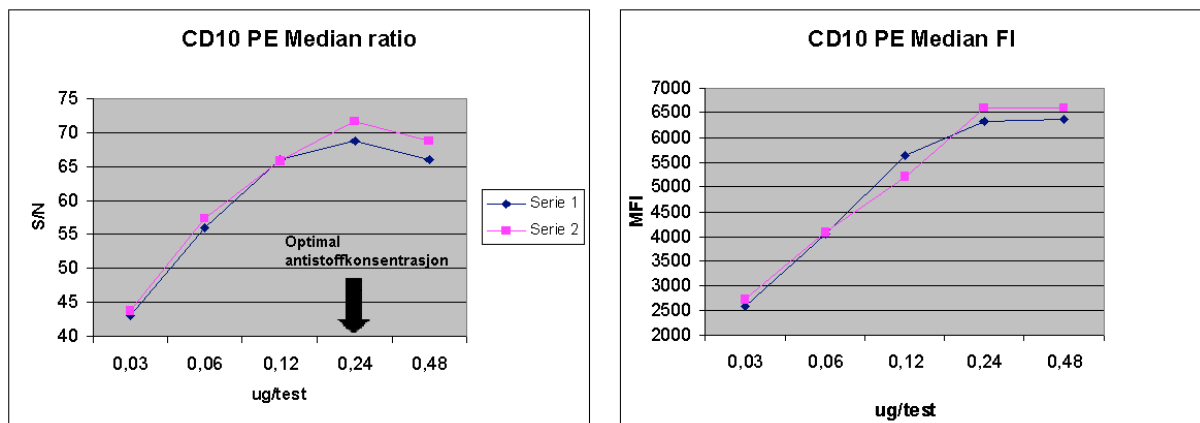
Tabell 9: Oversikt over titrerte antistoffer som ikke har oppnådd optimal antistoffkonsentrasjon verken ved avlesning av S/N-ratio eller metningskurve. Noen av markørene uttrykkes heterogent av flere cellepopulasjoner i en prøve. For å skille ut den populasjonen det aktuelle antistoffet skal testes på er det i slike tilfeller nødvendig å inkludere en cellelinjemarkør som CD19 eller CD3. For informasjon om produsent og antistoffklon, se vedlegg 2.

Antistoffene som utmerker seg med de høyeste S/N-ratioer er CD19 PeCy7 og TCR $\gamma\delta$ PeCy7 fra BC, i tillegg til CD3 APC. De laveste S/N-ratioene observeres hos CD103 FITC, Kappa PE, Lambda FITC og IgM FITC.

De tre følgende eksemplene illustrerer resultater fra titreringsrekke og grafisk framstilling av S/N-ratio og metningskurve for de ulike antistoffkonsentrasjonene. Det første eksemplet viser titrering av CD10 PE (se figur 22 og 23). I dette tilfellet er det benyttet en patologisk pasientprøve diagnostisert med FL ettersom CD10 ikke uttrykkes i høy grad av normale cellepopulasjoner i perifert blod. Anbefalt antistoffkonsentrasjon fra produsent er 0,24 µg/test.

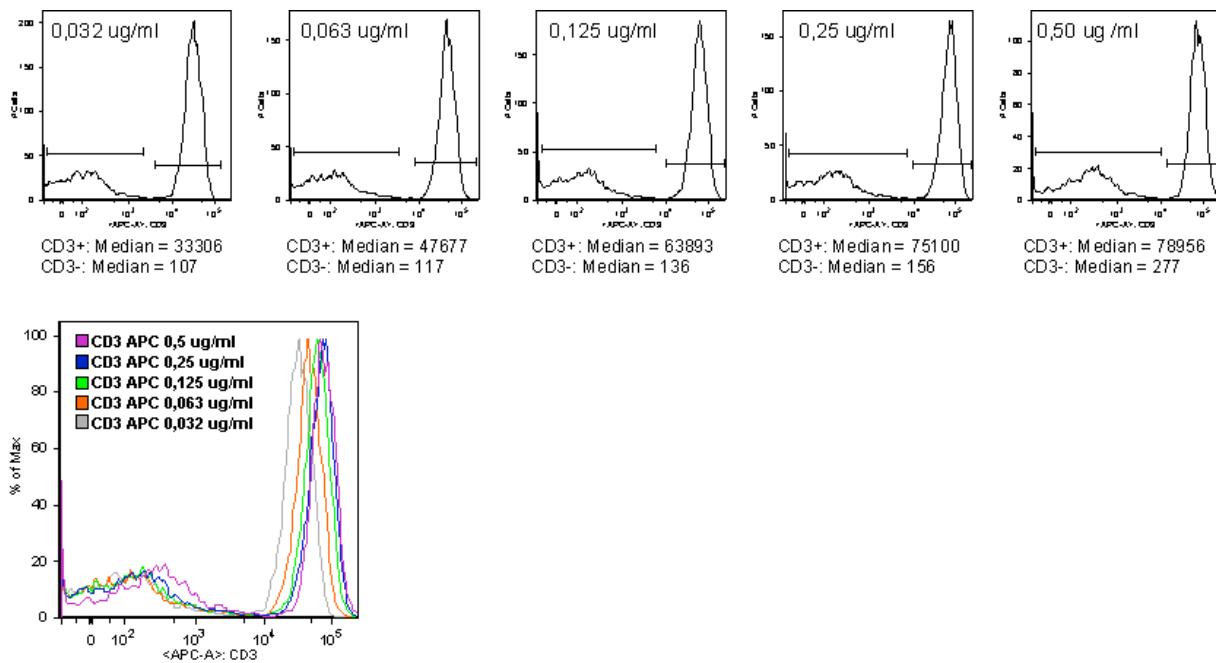


Figur 22: Fempunkts titreringsrekke med tofolds fortyning for CD10 PE gattet på lymfocytter fra prøve med FL. Kun én serie vist. Øverst vises skillet mellom positiv (CD10+) og negativ (CD10-) populasjon for hver antistoffkonsentrasjon enkeltvis, i tillegg til MFI-verdi. Det nederste histogrammet viser de fem ulike antistoffkonsentrasjonene lagt over hverandre.

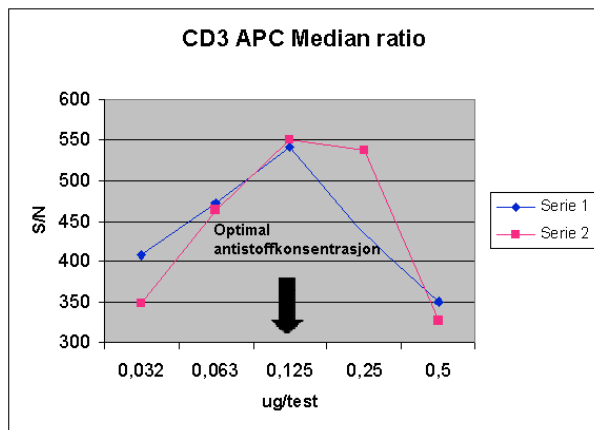


Figur 23: Titreringsresultater for to serier kjørt for CD10 PE. Optimal S/N-ratio og antistoffkonsentrasjon er avmerket på diagram til høyre. Til venstre vises metningskurve for samme antistoff. Metningskurven flater av ved optimal antistoffkonsentrasjon.

Det andre eksemplet viser resultater fra titrering av CD3 APC (se figur 24 og 25). Normale lymfocytter er benyttet for positiv og negativ populasjon. Anbefalt antistoffkonsentrasjon fra produsent er 0,25 µg/ml.

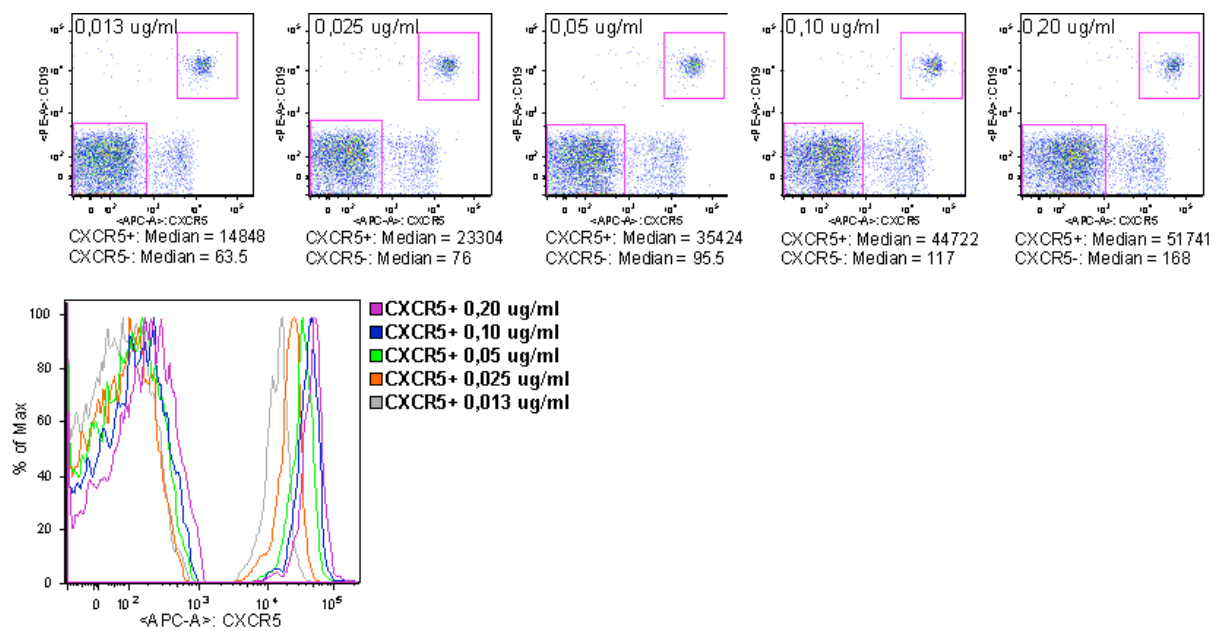


Figur 24: Fempunkts titreringsrekke med tofolds fortyning for CD3 APC gatet på normale lymfocytter. Kun én serie vist. Øverst vises skillet mellom positiv (CD3+) og negativ (CD3-) populasjon for hver antistoffkonsentrasjon enkeltvis, i tillegg til MFI-verdi. Det nederste histogrammet viser de fem ulike antistoffkonsentrasjonene lagt over hverandre.

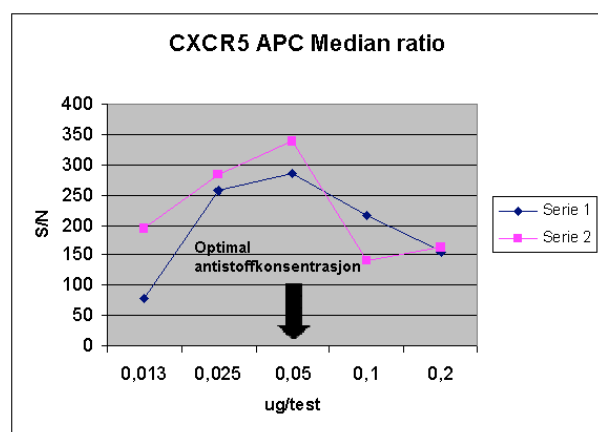


Figur 25: Titreringsresultater for to serier kjørt for CD3 APC. Optimal S/N-ratio og antistoffkonsentrasjon er avmerket.

Det siste eksemplet viser titreringsresultater for CXCR5 APC (se figur 26 og 27). CD19 er inkludert for utgating av B-celler. Positiv populasjon er dermed B-celler som uttrykker CXCR5, mens negativ populasjon er lymfocytter med et negativt uttrykk av markøren. Lymfocytter fra normalblod er benyttet. Anbefalt antistoffkonsentrasjon fra produsent er 0,1 µg/ml.



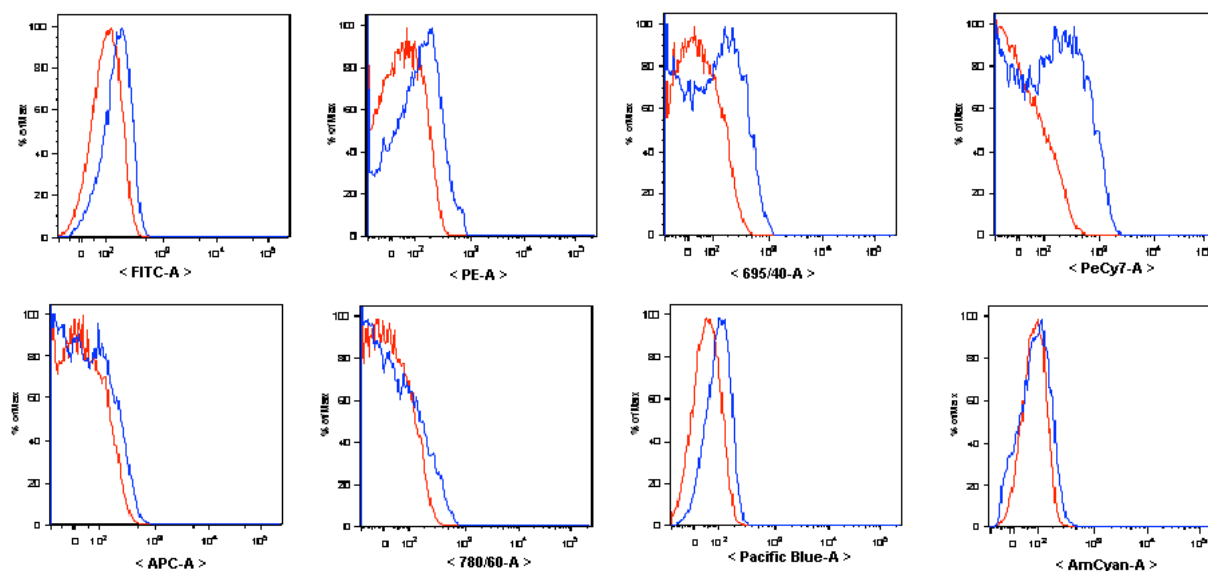
Figur 26: Fempunkts titreringsrekke med tofolds fortynning for CXCR5 APC gatet på normale lymfocytter. CD19 er inkludert for å skille CXCR5+ B-celler fra øvrige lymfocytter. Kun én serie vist. Øverst vises positiv (CXCR5+) og negativ (CXCR5-) populasjon for hver antistoffkonsentrasjon enkeltvis, i tillegg til MFI-verdi. Det nederste histogrammet viser de fem ulike antistoffkonsentrasjonene lagt over hverandre.



Figur 27: Titreringsresultater for to serier kjørt for CXCR5 APC. Optimal S/N-ratio og antistoffkonsentrasjon er avmerket.

4.2 Fluorescence Minus One

FMO-kontroller er analysert for fem EuroFlow-kombinasjoner og to CVID-kombinasjoner. FMO for LST-kombinasjon er brukt som eksempel for å vise bakgrunnsfarging mellom celler fra ufarget prøve og celler farget med FMO-metode (se figur 28 og tabell 10).



Figur 28: Sammenligning av bakgrunnsfarging for alle fluorescenskanaler mellom ufargete celler (rødt histogram) og celler farget med LST-kombinasjon (blått histogram) med FMO-metode.

	Bakgrunn ufargete celler (MFI)	Bakgrunn celler FMO (MFI)
FITC	106	173
PE	39	44
PerCP-Cy5.5	40	80
PeCy7	15	116
APC	29	69
APC-H7	5	51
Pacific Blue	45	99
Krome Orange	84	91

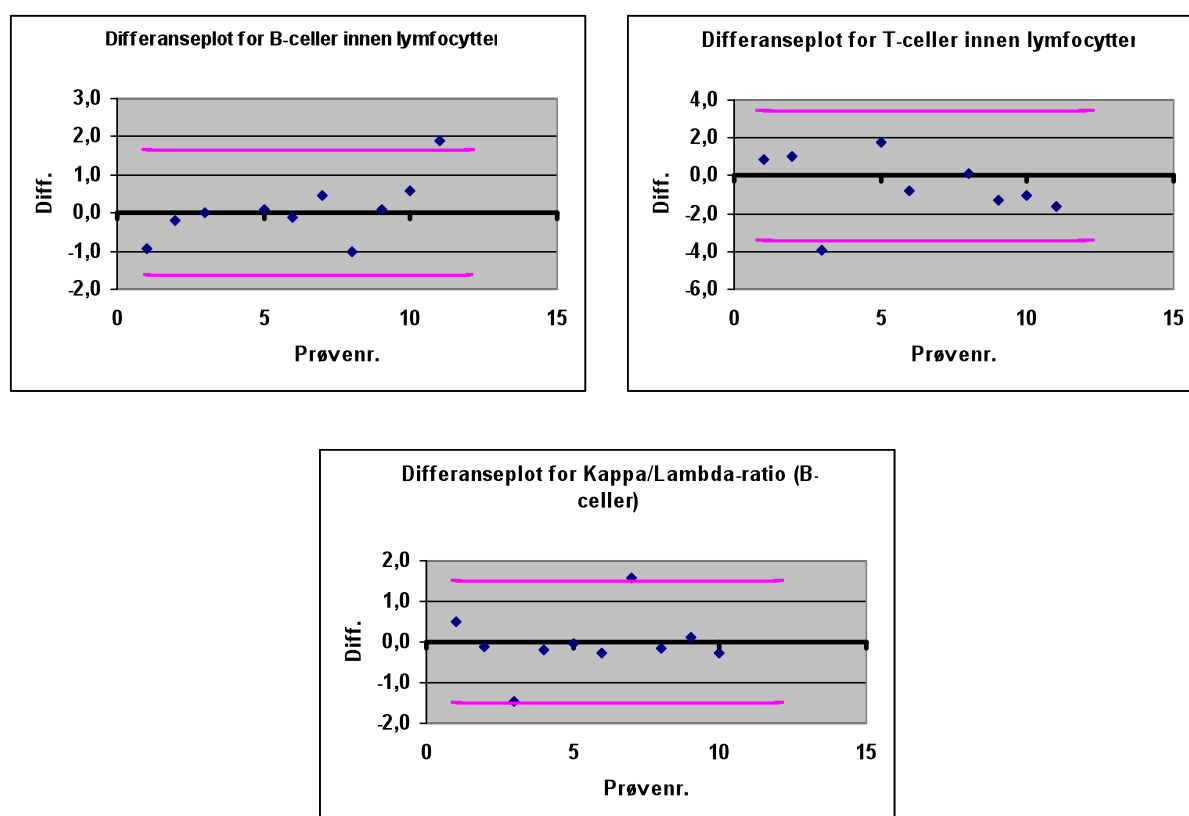
Tabell 10: MFI-verdier for bakgrunnsfarging for ufargete celler og celler farget med FMO-metode. LST-kombinasjonen vises i dette eksempelet. Se vedlegg 3 for bakgrunns-MFI-verdier for alle antistoffkombinasjoner med FMO-metode.

Bakgrunnsverdier fra FMO-metoden er høyere enn for ufargete celler i samme kanal. MFI-verdiene benyttes for å sette grense mellom celler med negativt uttrykk og positivt uttrykk for den aktuelle kanalen. % CV for bakgrunnsverdiene er den samme når det gjelder å sette regioner for populasjoner med positivt uttrykk, og FMO-metoden er derfor også benyttet for dette formålet.

4.3 Sammenligning av multicolor-kombinasjon og 4-fargepanel

Elleve tilfeldig utvalgte pasientprøver (nummerert fra 1-11) er farget dobbelt med LST-kombinasjon (8-farge) og med 4-fargepanel for lymfomscreening (4-farge). Prøvene er analysert og sammenlignet med hensyn på seks ulike parametre (se vedlegg 4).

Differanseplot er laget for alle seks parametre. Prosentandel B- og T-celler innen lymfocytter, samt Kappa/Lambda-ratio for B-celler har normalfordelte differanser (se figur 29).

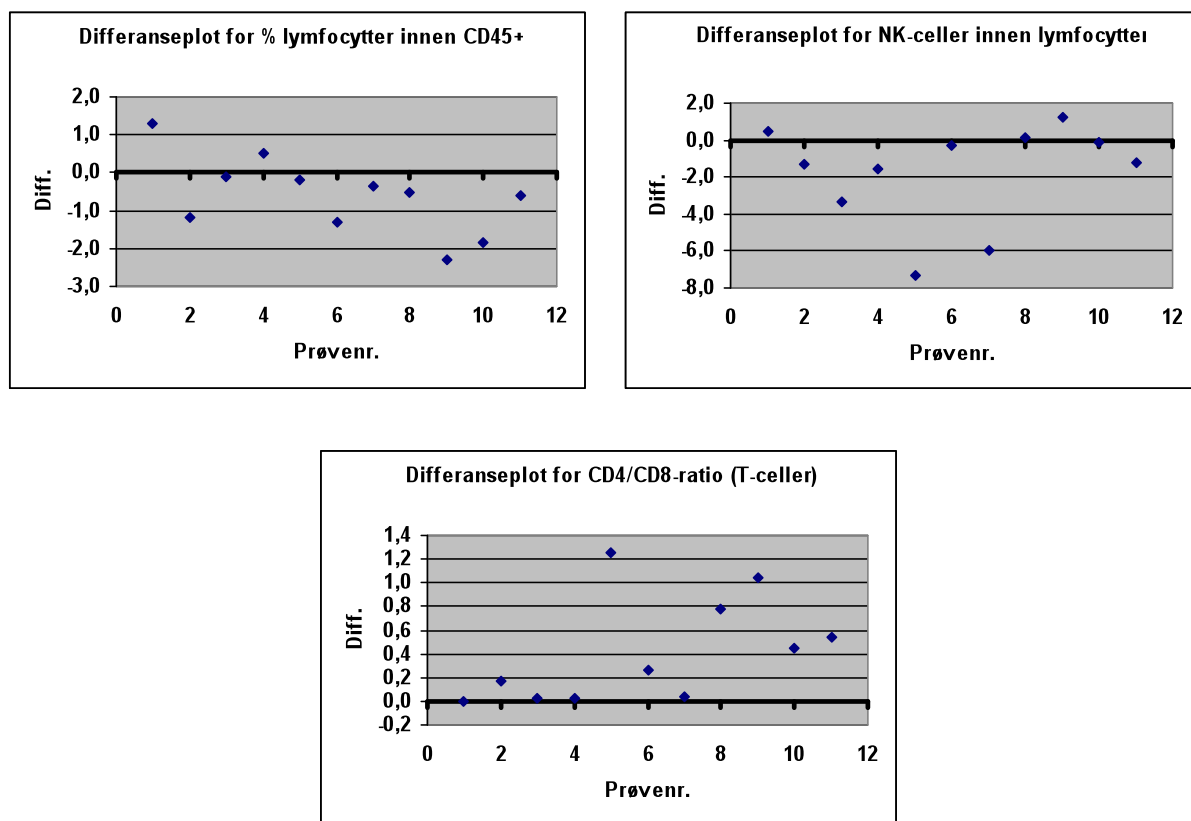


Figur 29: Differanseplot etter ekskludering av slengere for B-celler, T-celler og Kappa/Lambda-ratio farget med 4-fargemetode og 8-fargemetode. Differansene mellom metodene er normalfordelt. Rosa linjer tilsvarer ± 2 standardavvik (SD).

For disse tre parametrene er det utført parametrisk parret t-test. Én prøve er ekskludert som slenger for hver av de tre parametrene ved hjelp av Grubbs test ($G_{\text{obs}} > G_{\text{kritisk}}$), se vedlegg 4. Ut fra parret t-test med nullhypotese H_0 : **4-farge = 8-farge** observeres ingen signifikant forskjell mellom 4-farge og 8-farge på 5 % nivå. For alle de tre parametrene er $t_{\text{obs}} < t_{\text{kritisk}}$ ($p > 0,05$), og nullhypotesen beholdes (se vedlegg 4). Dette vil si at man med 95 % sikkerhet kan

si at det ikke er noen signifikant forskjell mellom 4-fargemetoden og 8-fargemetoden når det gjelder B- og T-celler innen lymfocytter, samt for Kappa/Lambda-ratio.

Når det gjelder parametrene lymfocytter innen CD45+, NK-celler innen lymfocytter og CD4/CD8-ratio for T-celler har ikke disse normalfordelte differanser mellom de to fargemetodene (se figur 30).



Figur 30: Differanseplot for lymfocytter innen CD45+, NK-celler innen lymfocytter og CD4/CD8-ratio for T-celler farget med 4-fargemetode og 8-fargemetode. Differansene er ikke normalfordelte.

For disse tre parametrene er det utført ikke-parametrisk Wilcoxon rank sum test. Ut fra nullhypotese $H_0: 4\text{-farge} = 8\text{-farge}$ observeres ingen signifikant forskjell mellom 4-farge og 8-farge på 5 % nivå. For alle de tre parametrene er $z_{\text{obs}} < z_{\text{kritisk}}$ ($p > 0,05$), og nullhypotesen beholdes (se vedlegg 4). Dette vil si at man med 95 % sikkerhet kan si at det ikke er noen forskjell mellom 4-fargemetoden og 8-fargemetoden når det gjelder lymfocytter innen CD45+, NK-celler innen lymfocytter eller CD4/CD8-ratio for T-celler.

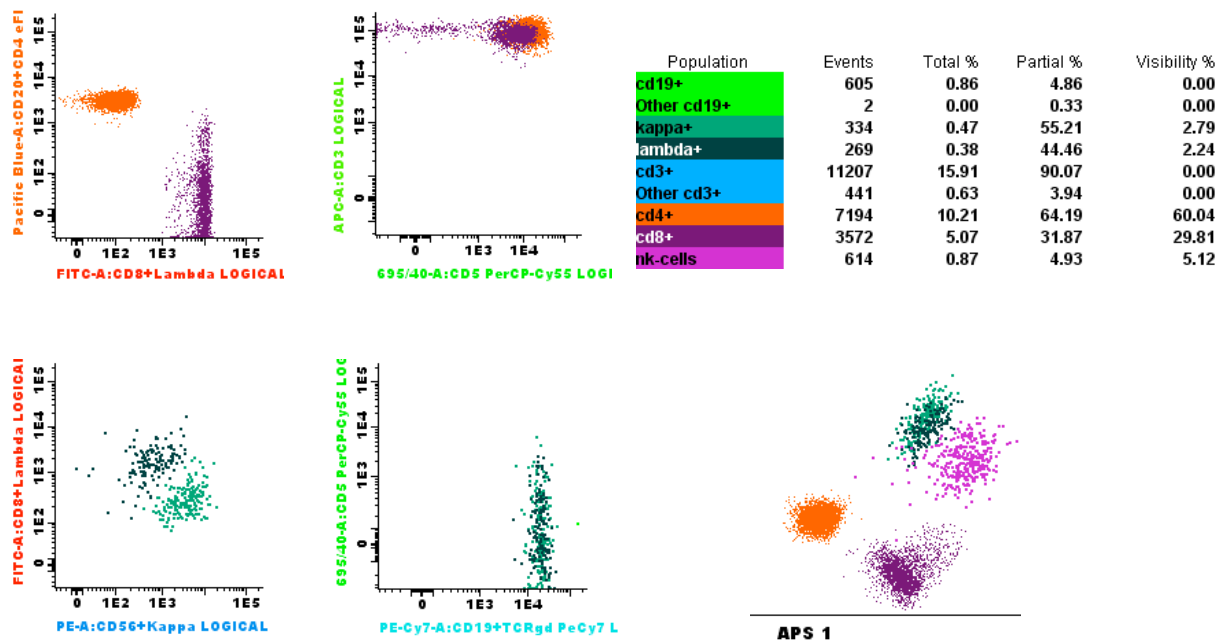
4.4 Utprøving av antistoffkombinasjoner på pasientprøver

4.4.1 Utprøving av EuroFlow-kombinasjoner

De fem EuroFlow-kombinasjonene er farget og kjørt på utvalgte prøver fra pasienter diagnostisert med ulike B-cellelymfomer, og i tillegg på en normal blodprøve. For bestemmelse av uttrykksmønstre av overflatemarkører hos de ulike B-CLPD er disse blitt sammenlignet med uttrykksmønsteret hos normale B-celler og T-/NK-celler. De ulike B-CLPD er også blitt sammenlignet mot hverandre. Infinicyt software er benyttet for analysering av de kjørte prøvene. Etter merging av de kjørte filene oppnås banddiagrammer som viser uttrykksmønstre for de ulike overflatemarkørene fra EuroFlow-kombinasjonene, samt FSC og SSC, til sammen 29 parametre. For informasjon om de ulike overflatemarkørene, se vedlegg 1.

Normal blodprøve og referansebilde

Det første eksemplet viser analyseresultater fra normalblod. Figur 31 viser ulike lymfocyttopulasjoner identifisert ut fra LST-kombinasjonen.



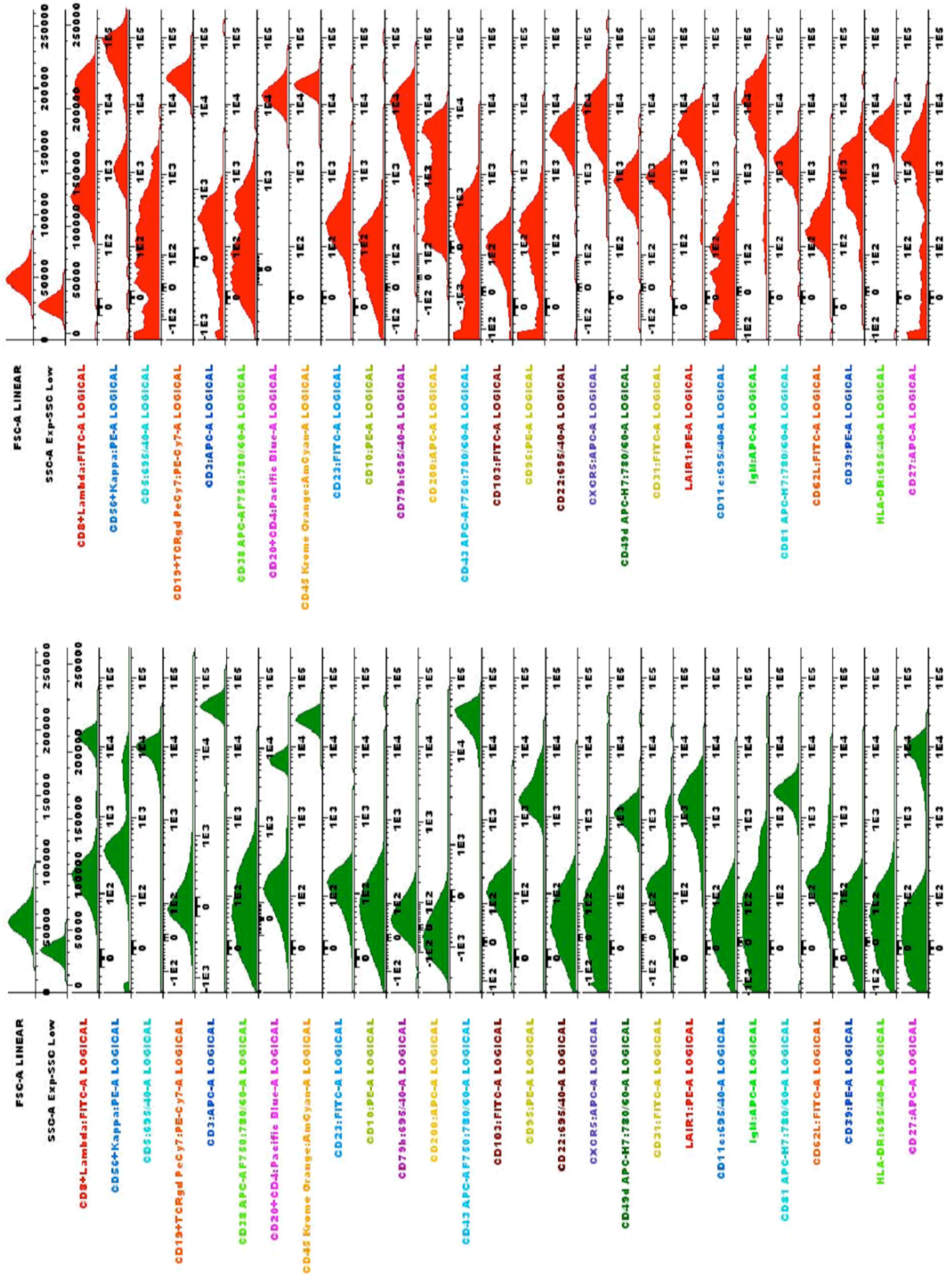
Figur 31: De to øverste dotplotene viser T-cellenes uttrykk av CD4 og CD8 (til venstre), og uttrykk av CD5 og CD3 (til høyre). Tabellen øverst til høyre viser fargekoder for de ulike lymfocyttopulasjonene og statistikk utregnet i Infinicyt software. De to dotplotene nederst til venstre gjengir B-cellenes uttrykk av Kappa og Lambda (til venstre), samt uttrykk av CD19 og CD5 (til høyre). APS-plot nederst til høyre viser B-celler, T-celler (CD4+

og CD8+) og NK-celler, og hvordan populasjonene separeres fra hverandre på grunnlag av parametre fra LST-kombinasjonen.

APS-plotet viser B-celler, CD4+ og CD8+ T-celler og NK-celler innen lymfocytter.

Populasjonene skilles fra hverandre på grunnlag av parametre med ulikt uttrykk mellom populasjonene fra høyest til lavest signifikans i følgende rekkefølge; CD3 - CD5 - CD20+CD4 - CD38 - CD19+TCR $\gamma\delta$ - CD8+Lambda - CD56+Kappa - FSC - CD45 - SSC. Det observeres at skillet mellom populasjonene gjøres ut fra T-cellemarkører (CD3, CD4, CD5, CD8), B-cellemarkører (CD20, CD19), samt markører som uttrykkes sterkt på NK-celler (CD38, CD56).

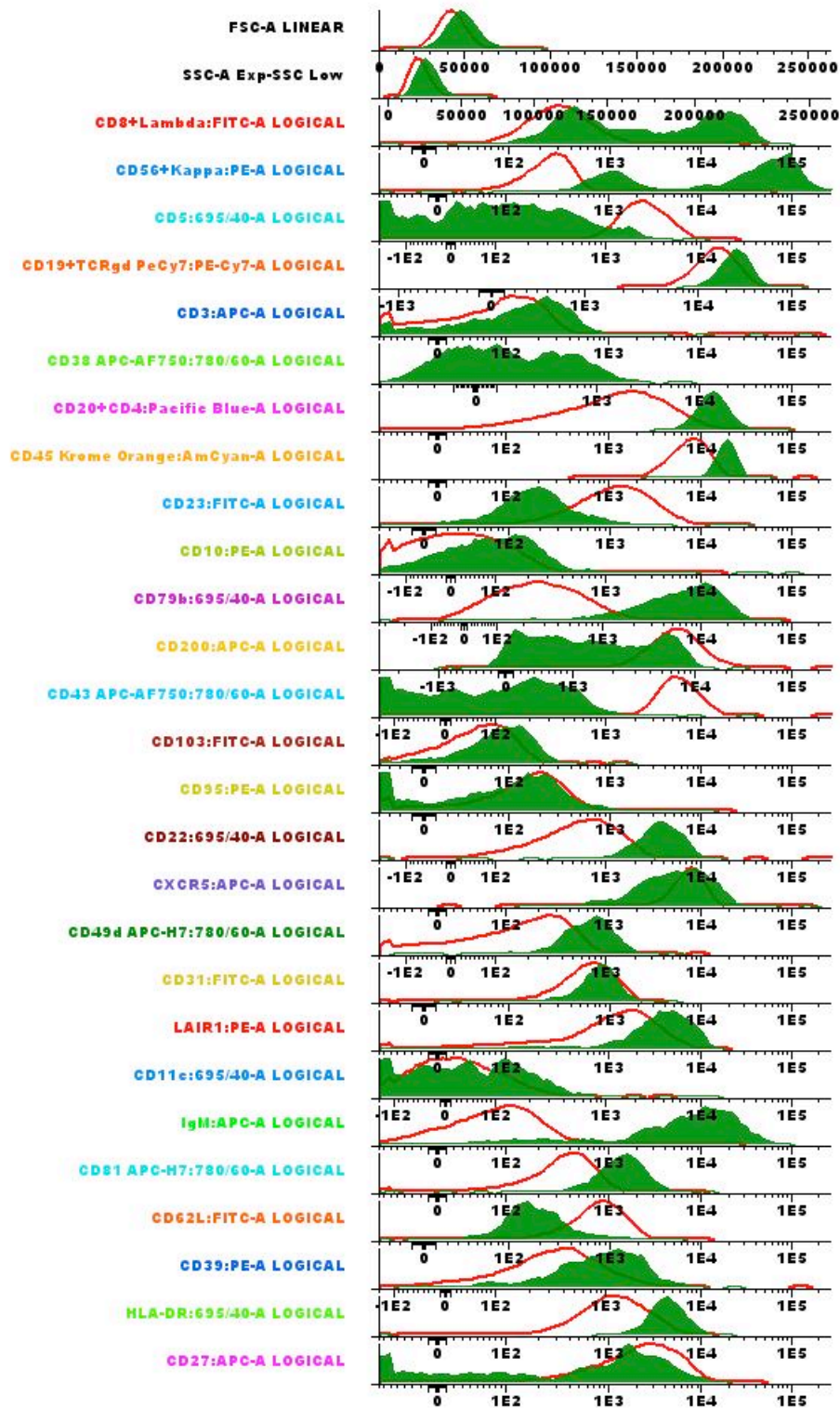
Det er også laget banddiagrammer som viser uttrykksmønstre av de ulike overflatemarkørene for normale lymfocytter for alle fem EuroFlow-kombinasjoner (se figur 32).



Figur 32: Banddiagrammet øverst viser uttrykksmønster for normale T-/NK-celler (grønne, heretter kalt øvrige lymfocytter) for overflatemarkører fra EuroFlow-kombinasjonene. Banddiagrammet nederst viser uttrykksmønster for normale B-celler (røde).

I tillegg til pan-leukocytmarkøren CD45 uttrykker normale B-celler pan-B-markører som Ig, CD19, CD20, CD22 og CD79b. Uttrykket av CD27, CD38, CD39, CD95 og CD200 er varierende mellom ulike B-celleundergrupper. Markører som uttrykkes positivt er CXCR5, CD49d, CD31, LAIR1, CD81 og HLA-DR, mens markører med svakt eller negativt uttrykk er CD5, CD10, CD11c, CD23, CD43, CD62L og CD103. T-celler uttrykker overflatemarkører som CD3, CD4, CD5, CD8 og CD43 i tillegg til andre i varierende grad.

De normale B-cellene benyttes videre som et referansebilde til sammenligning med B-celler fra andre prøver. Dette er en hjelp for å se om celler har et avvikende uttrykk av overflatemarkører, og dermed en måte for å identifisere B-CLPD. Figur 33 viser et banddiagram som eksempel på dette, hvor normale B-celler er brukt som referansebilde for B-celler fra en KLL-prøve etter at filene er merget sammen.

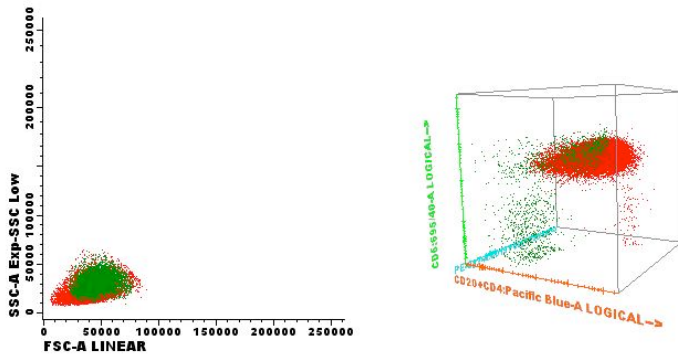


Figur 33: Normale B-celler er i dette banddiagrammet for 29 parametre brukt som referansebilde (grønne histogrammer) for B-celler fra en KLL-prøve (røde linjehistogrammer) for sammenligning av overflatemarkørens uttrykksmønster etter filene er merget sammen og lagt over hverandre i samme diagram.

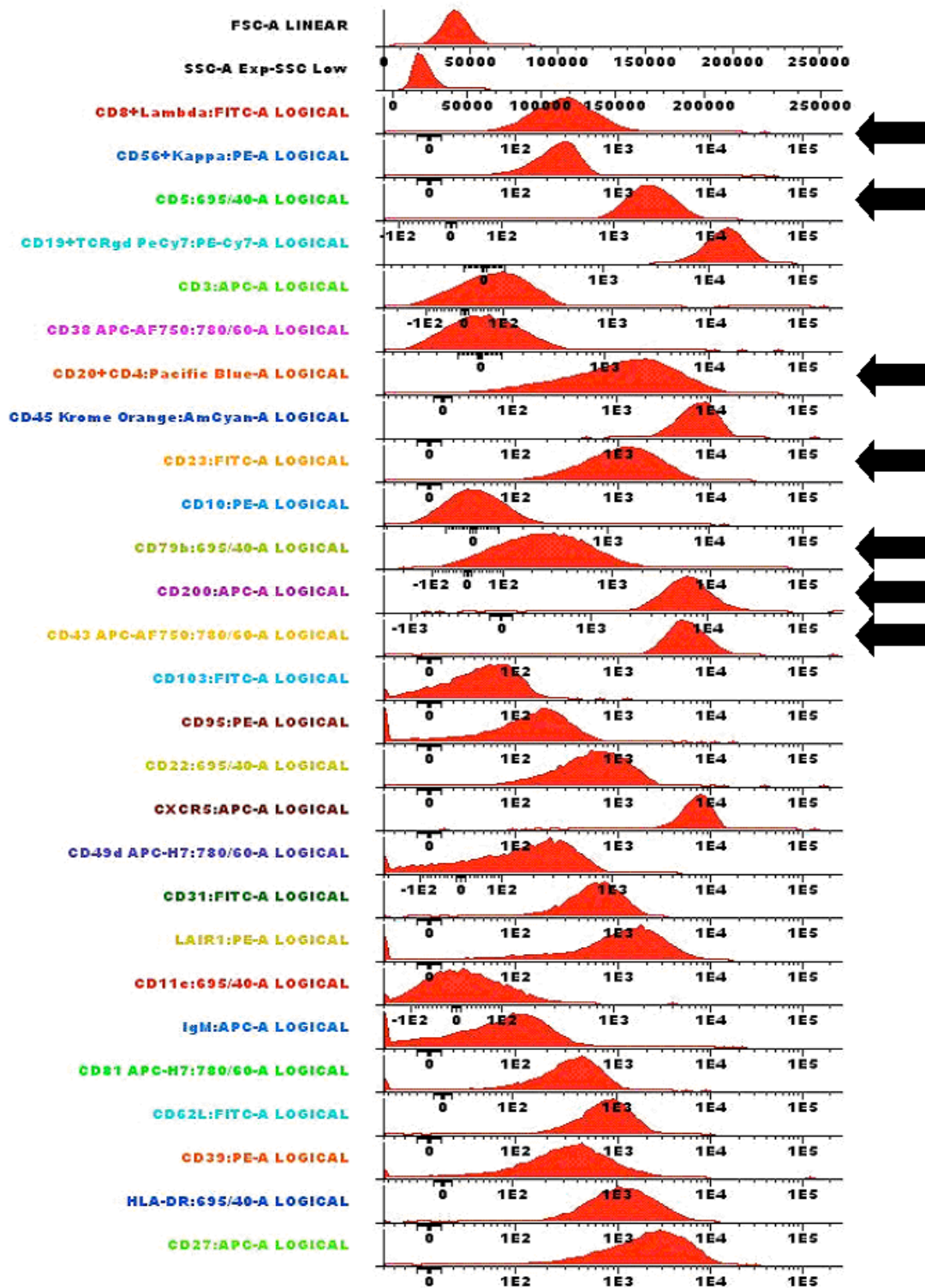
Det observeres at KLL-cellene har et annet uttrykksmønster enn de normale B-cellene når det gjelder flere markører. KLL-cellene har nedsatt uttrykk av CD20, CD22, CD45, CD49d, CD79b, CD81, LAIR1, HLA-DR og Ig, og et økt uttrykk av CD5, CD23, CD43 og CD62L i forhold til de normale B-cellene.

KLL

Neste eksempel viser dotplot, 3D-plot (se figur 34) og banddiagram av den samme KLL-prøven analysert alene uten referansebilde (se figur 35).

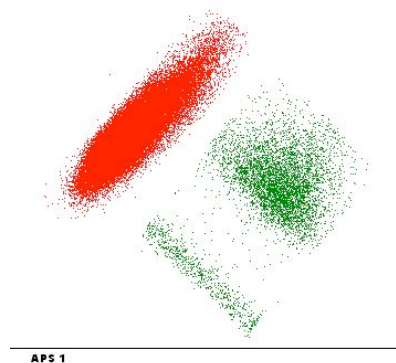


Figur 34: Til venstre er FSC/SSC-dotplot av KLL-celler (røde) og øvrige lymfocytter (grønne). Til høyre vises et 3D-dotplot av samme KLL-prøve med uttrykksmønster for CD19, CD20 og CD45.



Figur 35: Banddiagram med 29 parametre for KLL-celler. Piler viser markører som er vesentlige for diagnose. KLL-diagnosen settes på grunnlag av positivt uttrykk av CD5, CD23, CD43 og CD200, samt nedsatt uttrykk av CD20, CD79b og Ig, noe som gjør det vanskelig å bestemme IgL-restriksjon.

For KLL-prøven er det også laget et APS-plot som viser størst mulig separasjon mellom KLL-celler og øvrige lymfocytter basert på parametre fra LST-kombinasjonen (se figur 36).

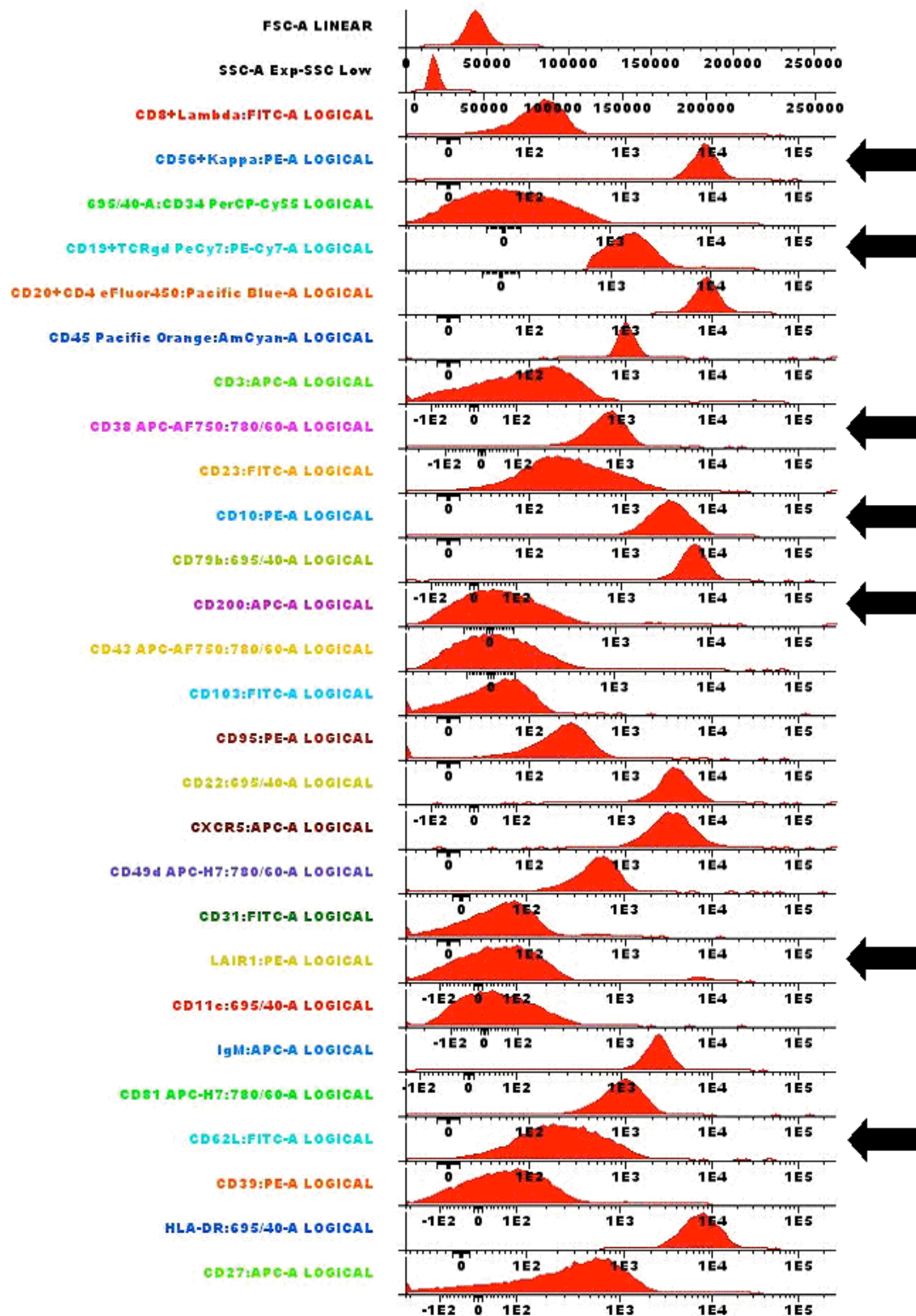


Figur 36: APS-plot for KLL-celler (røde) og øvrige lymfocytter (grønne) basert på LST-parametre.

KLL-cellene skiller seg godt fra de øvrige lymfocyttene ut fra APS-plot.

FL

Neste eksempel viser banddiagrammer fra en finnålsaspiratprøve fra pasient diagnostisert med FL (se figur 37).

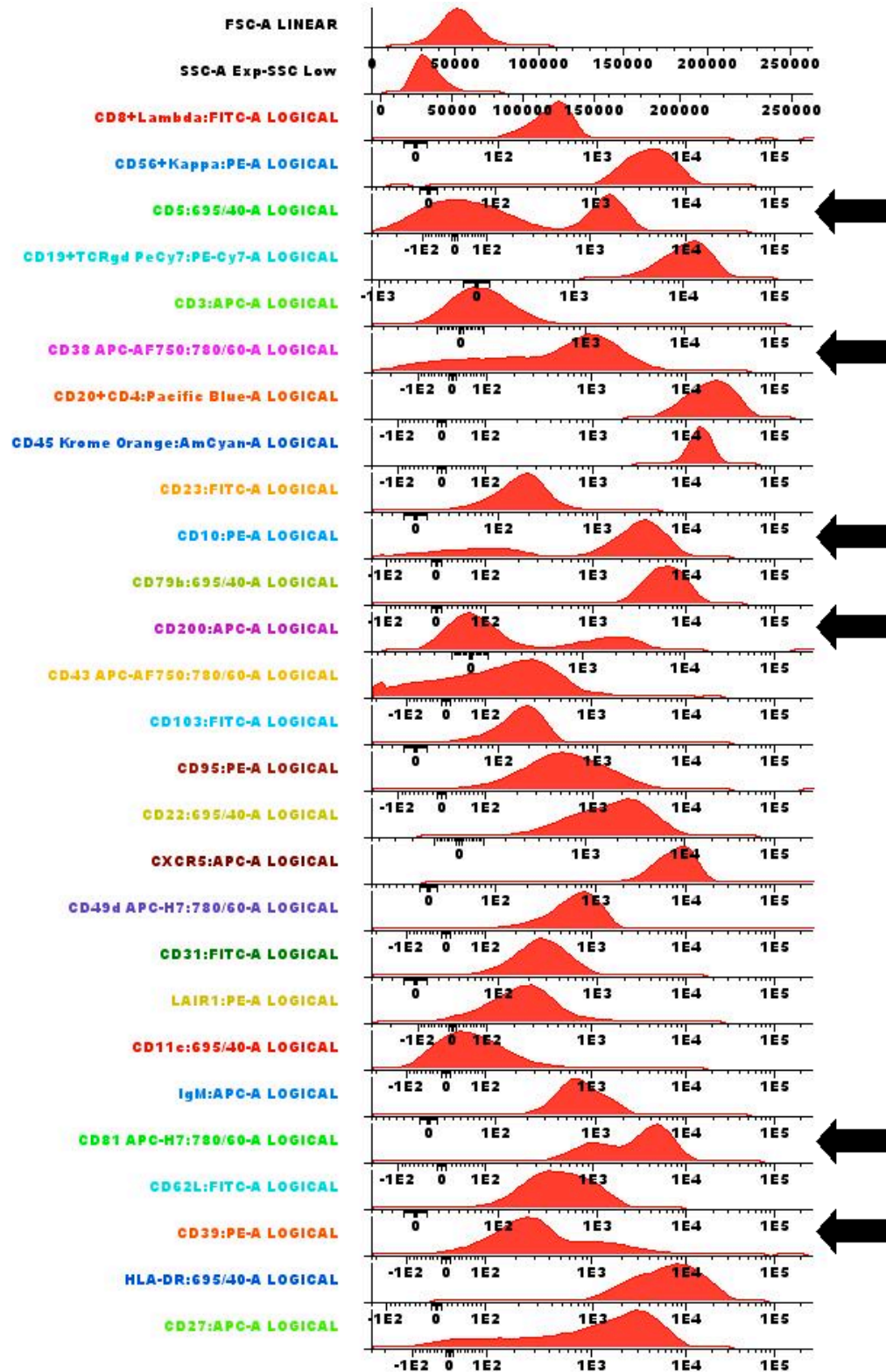


Figur 37: Banddiagram med 29 parametre for FL-celler. Piler viser markører som er vesentlige for diagnose eller skiller seg fra uttrykket til normale B-celler.

Det observeres at FL-cellene har et økt uttrykk av overflatemarkørene CD10 og CD38, mens uttrykket av CD19, CD62L, CD200 og LAIR1 er nedsatt. FL-cellene viser i tillegg Kapparestriksjon.

Biklonalt B-cellelymfom (FL og CD5+ B-celleklon)

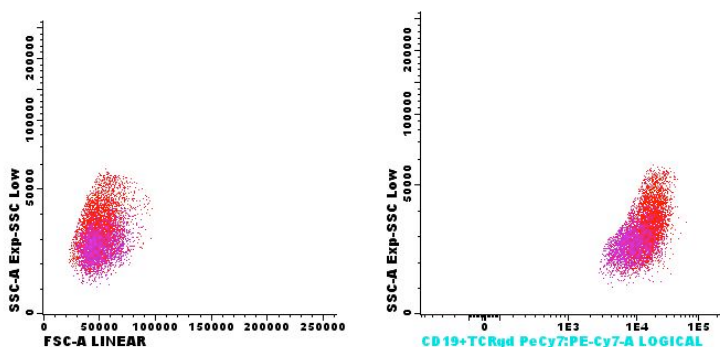
Det neste eksempelet har to ulike B-cellekloner; den ene er et FL, mens den andre er en liten CD5+ B-celleklon på 9 % som separeres fra FL-cellene ut fra immunfenotype. CD5+ klonen er ikke nærmere karakterisert. Figur 38 viser banddiagram av prøven.



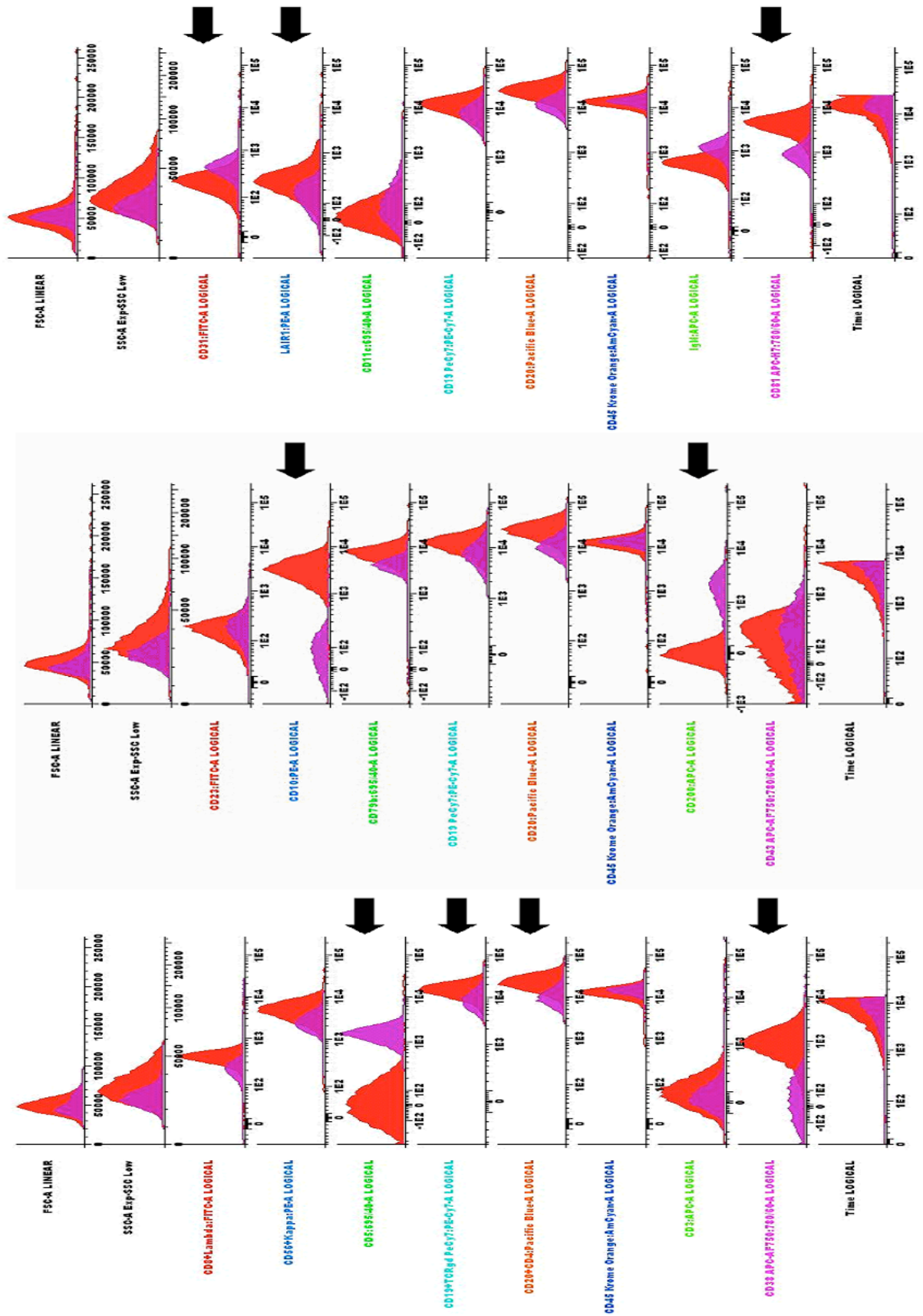
Figur 38: Banddiagram med 29 parametre for celler fra biklonalt B-cellelymfom (FL og CD5+ B-celleklon). Piler viser parametre som varierer mellom de to B-cellelymfomene.

29 parameters banddiagram viser at for noen av markørene finnes det to B-cellepopulasjoner som gjenspeiler det biklonale B-cellelymfomet. Dette gjelder for overflatemarkørene CD5, CD10, CD38, CD39, CD81 og CD200.

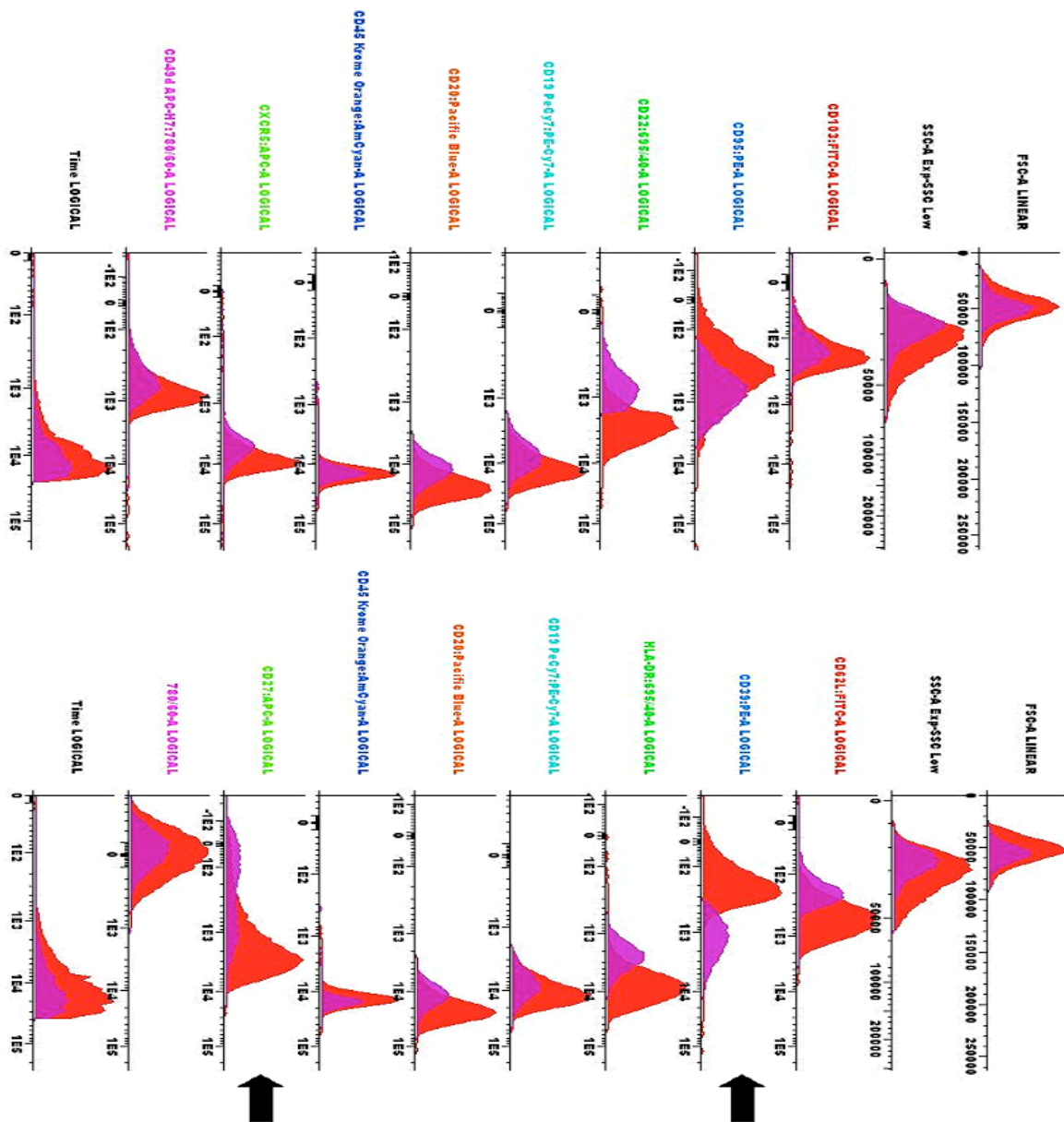
For den samme prøven er det også laget banddiagram for hver enkelt av de fem EuroFlow-kombinasjonene for FL-celler og CD5+ B-celleklon for å synliggjøre forskjellen mellom de to lymfomene bedre, samt å karakterisere immunfenotypen til de to (se figur 39-41).



Figur 39: Til venstre vises FSC/SSC-dotplot av FL-celler (røde) og CD5+ B-lymfomceller (fiolette). Til høyre vises CD19/SSC-dotplot av de samme cellene.



Figur 40: Banddiagram med ti parametre for FL-celler og CD5+ B-lymfomceller farget med LST-kombinasjon (nederst), KLL-kombinasjon (i midten) og B-CLPD 3-kombinasjon (øverst). Den nederste linjen viser tidsdiagram. Piler viser parametre som varierer mellom de to B-celleymfomene.



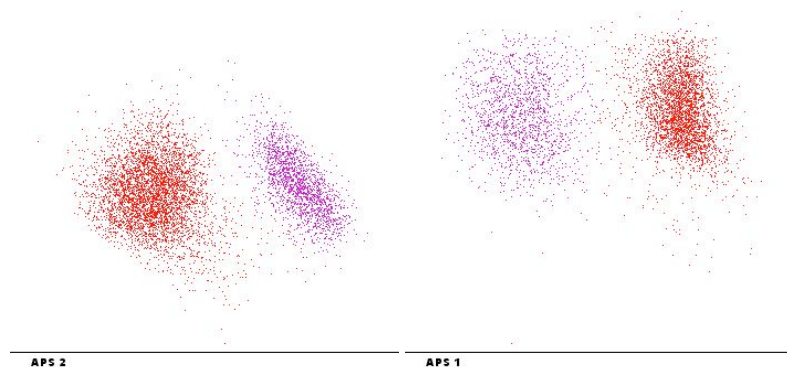
Figur 41: Banddiagram med henholdsvis ti og ni parametre for FL-celler og CD5+ B-lymfomceller farget med B-CLPD 4-kombinasjon (øverst) og B-CLPD 5-kombinasjon (nederst). Den nederste linjen viser tidsdiagram. Piler viser parametre som varierer mellom de to B-cellelymfomene.

FL-cellene i dette eksemplet har tilnærmet samme fenotypeprofil som hos FL-prøven i det foregående eksemplet. Når det gjelder den lille klonen av CD5+ B-celler uttrykker disse cellene CD5, CD39 og CD200, men ikke CD38 og CD10. CD5+ cellene har også et lavere uttrykk av CD19, CD20 og CD22 enn FL-cellene. I tillegg er uttrykket forskjellig mellom de to typene av lymfomceller for CD27, CD31, LAIR1 og CD81. Når det sammenlignes med fenotypeprofilen til andre typer B-CLPD er det ingen som gir et entydig svar på hvilken type CD5+ B-celleklonen er, men det kan være en atypisk KLL.

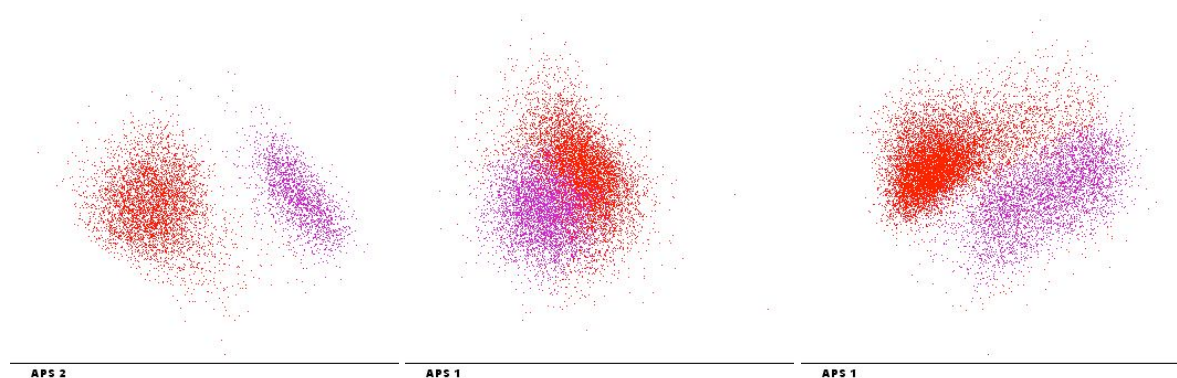
For den samme prøven med biklonalt B-cellelymfom er det laget APS-plot som benytter seg av analyserte parametre for å oppnå størst mulig separasjon mellom de to ulike populasjonene. Tabell 11 viser hvilke parametre Infinicyt-software har funnet fram til som varierer mest mellom de to populasjonene for de ulike kombinasjonene. Figur 42 og 43 viser plot fra APS-analysen.

LST	CD5-CD38-SSC-CD3-Kappa
KLL	CD10-CD200-SSC-CD79b-CD43
B-CLPD 3	CD81-SSC-CD31-IgM-LAIR1
B-CLPD 4	CD22-CD95-SSC-CD49d-CD103
B-CLPD 5	CD27-CD39-HLA-DR-CD62L-SSC

Tabell 11: Oversikt over hvilke parametre som varierer mest mellom FL-celler og CD5+ B-lymfoceller for de fem ulike EuroFlow B-CLPD-kombinasjonene. Parametrene er listet opp etter signifikans i APS-analysen (starter med parameteren som varierer mest mellom populasjonene).



Figur 42: APS-plot til venstre viser FL-celler og CD5+ B-lymfoceller farget med LST-kombinasjon, mens APS-plot til høyre viser de samme cellene farget med KLL-kombinasjon.



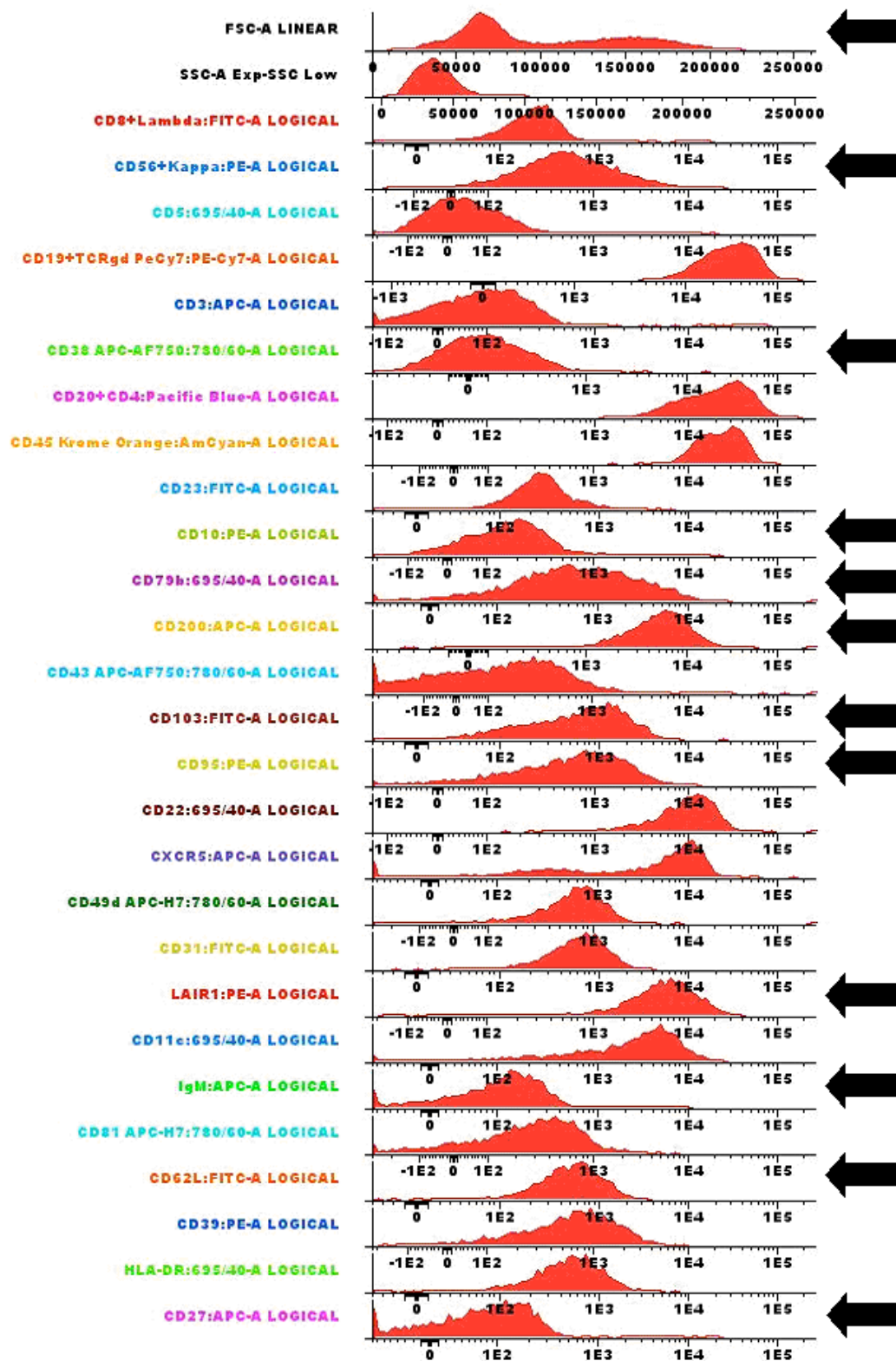
Figur 43: APS-plot til venstre viser FL-celler og CD5+ lymfoceller farget med B-CLPD 3-kombinasjon, APS-plot i midten viser de samme cellene farget med B-CLPD 4-kombinasjon, mens cellene i APS-plot til høyre er farget med B-CLPD 5-kombinasjon.

Ut fra APS-plotene observeres det at LST-, KLL- og B-CLPD 3-kombinasjonen inneholder parametre som gir et tydelig skille mellom de to B-celleklonene, mens B-CLPD 4- og 5-

kombinasjonene gir et mindre tydelig skille. Dette stemmer også overens med banddiagrammene som varierer mindre i uttrykksmønster for B-CLPD 4- og 5-kombinasjonen, spesielt for den første av kombinasjonene.

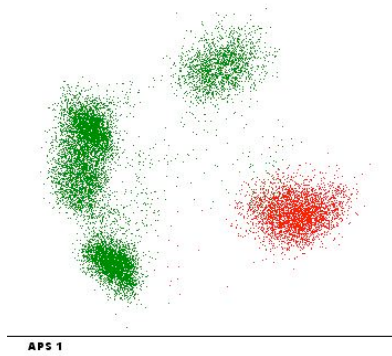
HCL

Neste eksempel viser analyse av en HCL-prøve som inkluderer banddiagram (se figur 44) og APS-plot basert på parametre fra LST-kombinasjonen (se figur 45).



Figur 44: Banddiagram med 29 parametre for HCL-celler. Piler viser markører som er vesentlige for diagnose eller skiller seg fra uttrykket til normale B-celler.

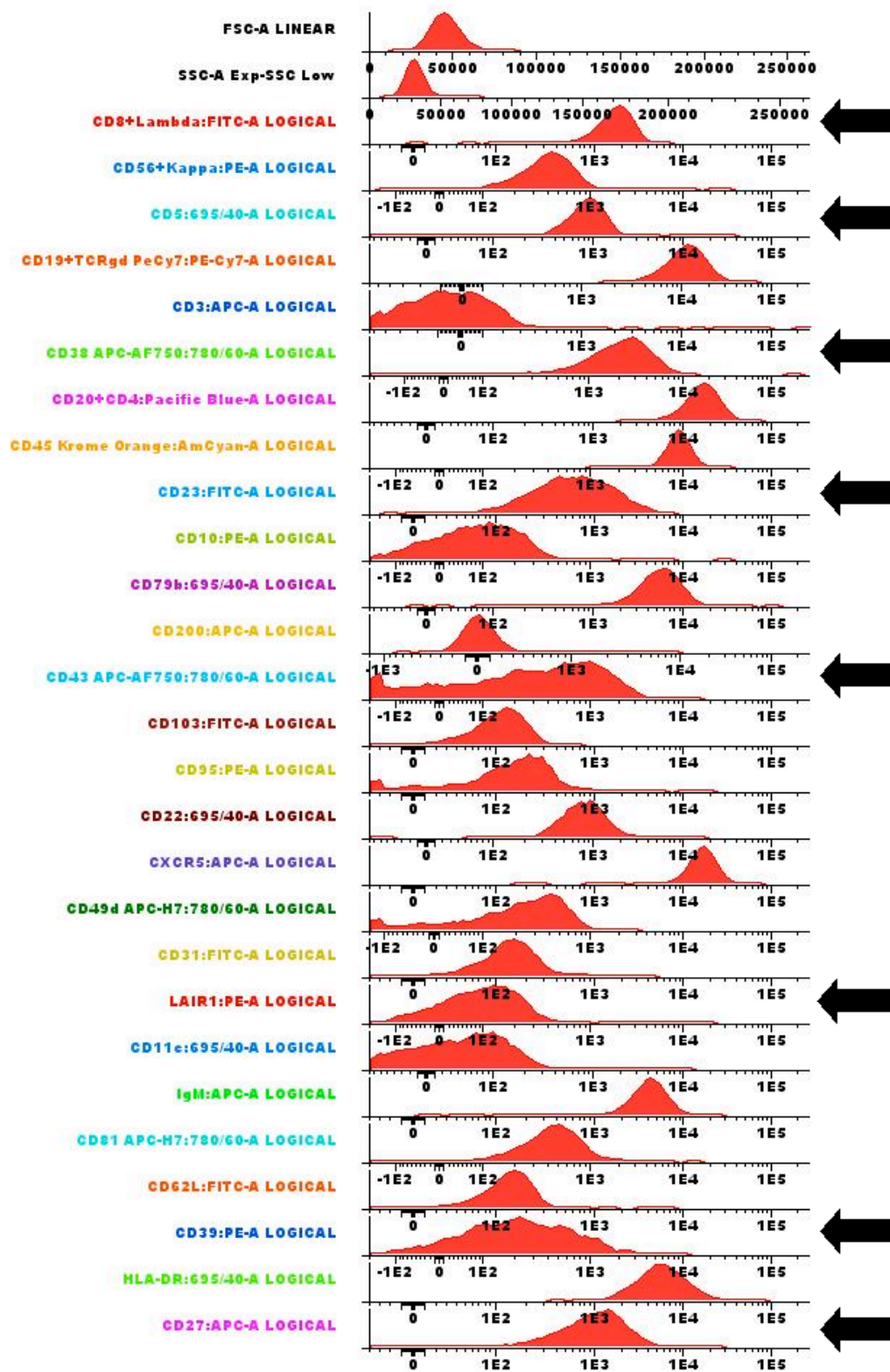
HCL-cellene har et relativt høyt FSC-signal og viser Kapparestriksjon, varierende uttrykk av CD79b, og et svakt uttrykk av CD10, CD62L, CD95, CD103, CD200 og LAIR1. IgM, CD27 og CD38 er nedsatt.



Figur 45: APS-plot for HCL-celler (røde) og øvrige lymfocytter (grønne) basert på LST-parametre. HCL-cellene skiller seg godt fra de øvrige lymfocytterne ut fra APS-plot.

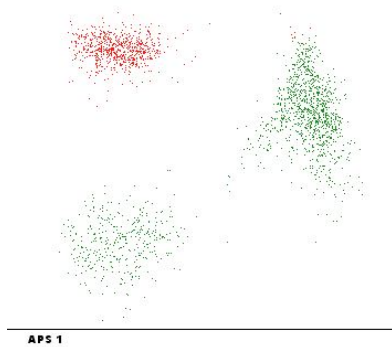
MCL

Det er også blitt farget og analysert en MCL-prøve med samme strategi som for de andre eksemplene. Figur 46 viser banddiagram, mens figur 47 viser APS-plot basert parametre fra LST-kombinasjonen.



Figur 46: Banddiagram for MCL-celler med 29 parametre. Piler viser markører som er vesentlige for diagnose eller skiller seg fra uttrykket til normale B-celler.

MCL-cellene viser Lambdarestriksjon og er CD5+. I tillegg har cellene et økt uttrykk av CD23, CD27, CD38 og CD43, og nedsatt uttrykk av CD39 og LAIR1.

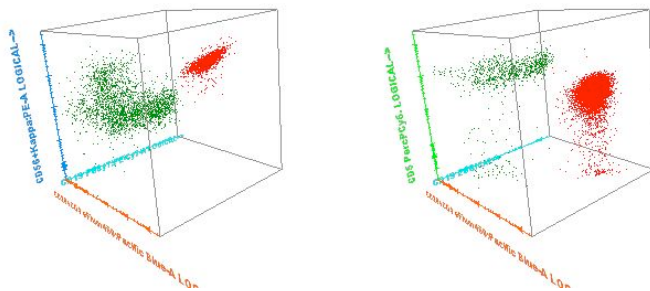


Figur 47: APS-plot for MCL-celler (røde) og øvrige lymfocytter (grønne) basert på LST-parametre.

MCL-cellene skiller seg godt fra de øvrige lymfocytene ut fra APS-plot.

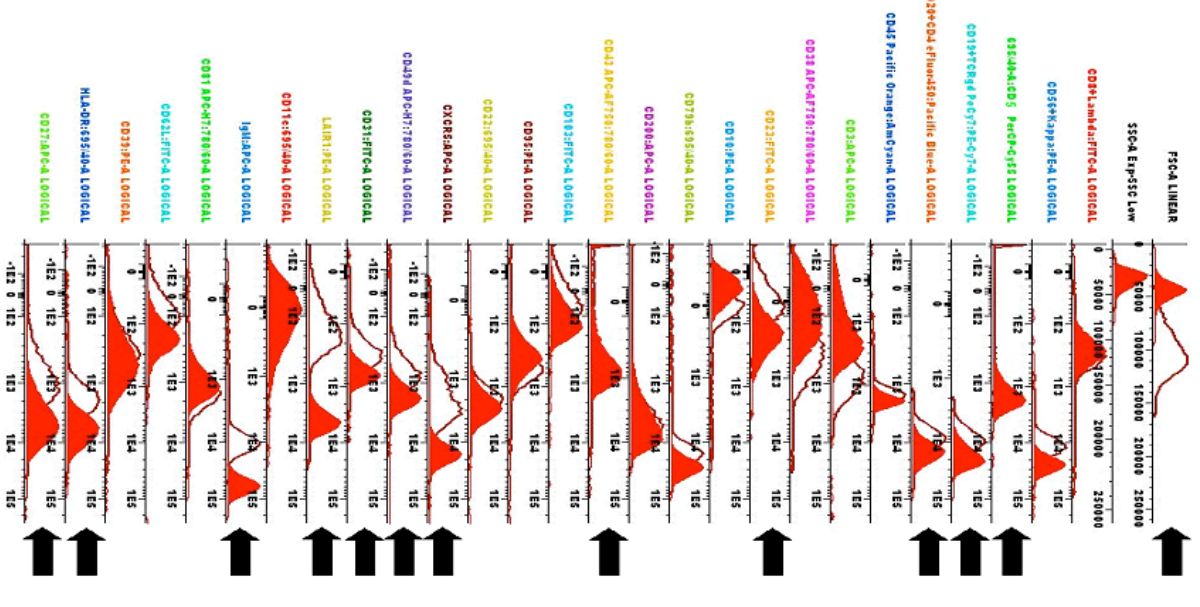
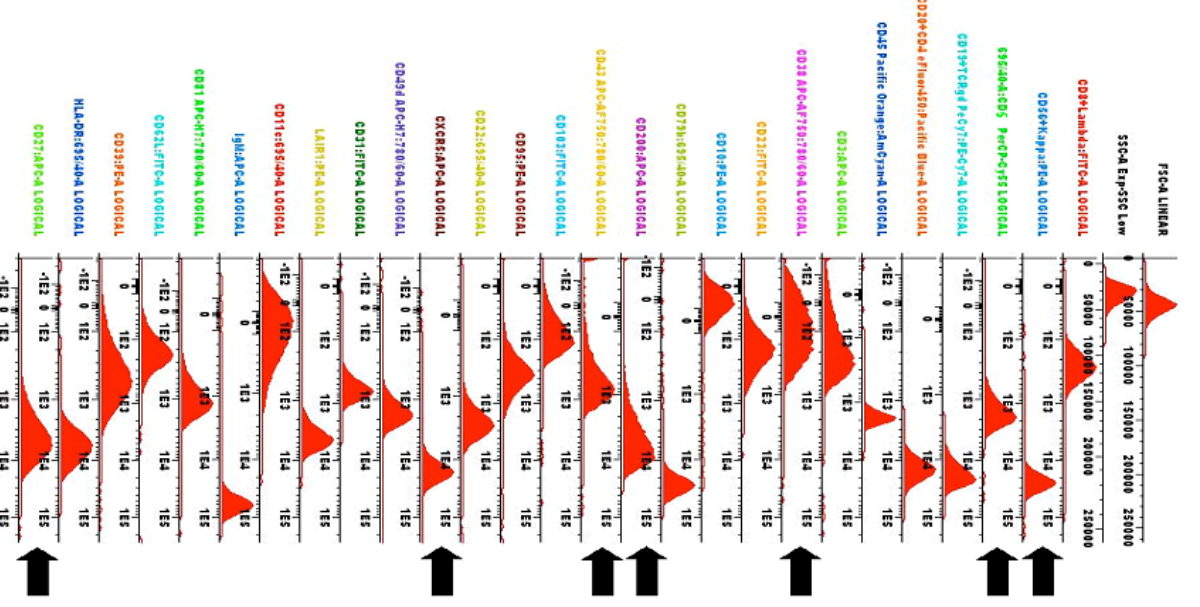
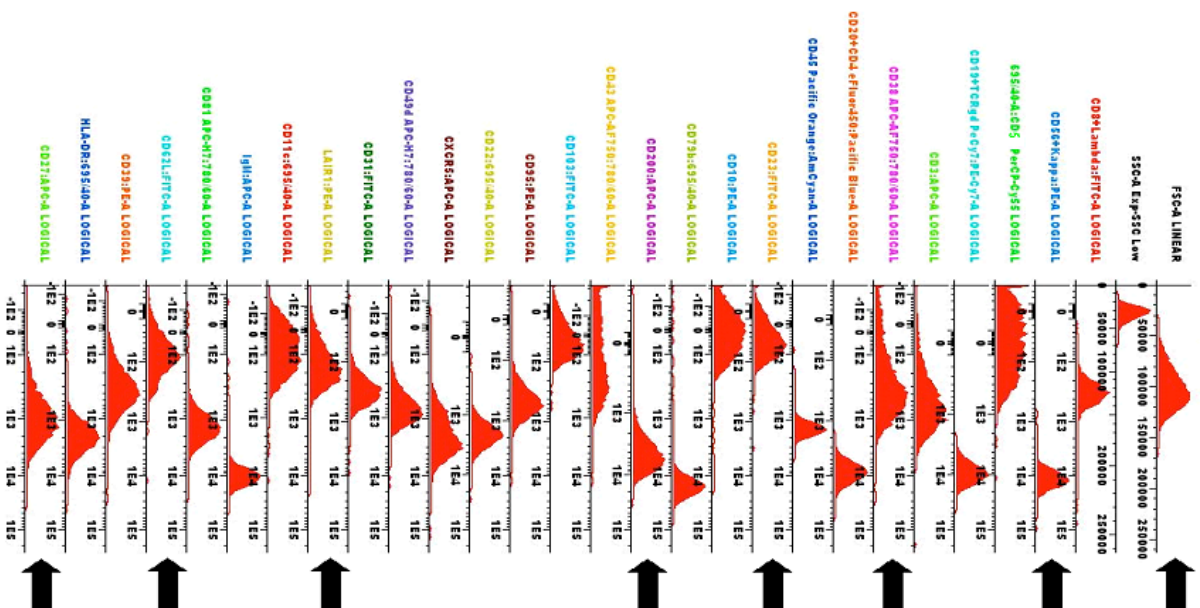
LPL og splenisk MZL

Neste eksempel viser samme analysestrategi som vist over for en LPL-prøve og en splenisk MZL-prøve (SMZL, diagnose satt ut fra biopsi). Figur 48 viser 3D-dotplot for de B-cellelymfomene.



Figur 48: 3D-dotplot for B-lymfomceller (røde) og øvrige lymfocytter (grønne). Til venstre vises LPL-prøve med uttrykksmønster av CD19, CD20 og Kappa, mens til høyre vises SMZL-prøve med uttrykksmønster av CD19, CD20 og CD5.

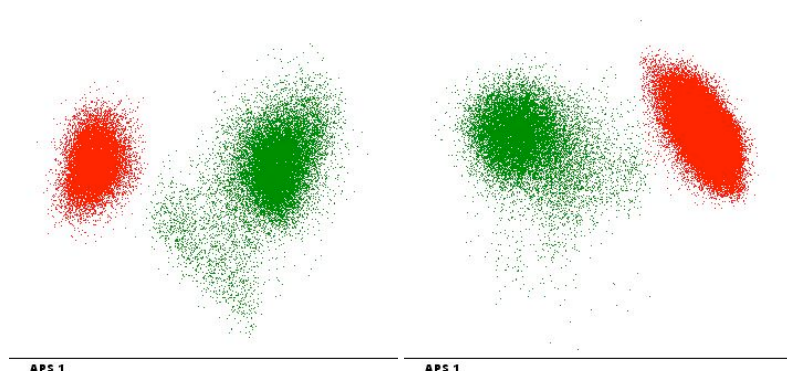
Ettersom de to typene av B-CLPD har en lignende immunfenotypeprofil vises banddiagrammer fra de to sykdommene sammen i figur 49. LPL-prøven og SMZL-prøven er i tillegg merget sammen for å sammenligne immunfenotypen til lymfomcellene fra de to sykdommene ved å benytte LPL-cellenes fenotypeprofil som referansebilde.



Figur 49: Banddiagram med 29 parametre for LPL-celler (øverst) og SMZL-celler (i midten). Piler viser markører som er vesentlige for diagnose og som skiller seg fra uttrykket til normale B-celler. Nederst er LPL-celler brukt som referansebilde (røde linjehistogrammer) for SMZL-celler (røde histogrammer) for sammenligning av overflatemarkørens uttrykksmønster etter filene er merget sammen og lagt over hverandre i samme banddiagram. Piler viser parametre som varierer mellom de to sykdommene.

LPL-cellene har et relativt høyt FSC-signal og de viser Kapparestriksjon. Cellene har et varierende uttrykk av CD38, nedsatt uttrykk av CD23, CD62L og LAIR1, samt et økt uttrykk av CD27 og CD200. SMZL-cellene viser Kapparestriksjon og har et positivt uttrykk av CD5, CD27, CD43 og CD200, og et nedsatt uttrykk av CD38 og CXCR5. Separasjon mellom de to ulike typene av B-CLPD baserer seg på forskjellig uttrykksmønster av overflatemarkører. Det observeres at de to har en relativt lik immunfenotypeprofil, men de varierer med hensyn på FSC-signal, og på intensitet i uttrykk av CD5, CD19, CD20, CD23, CD27, CD31, CD43, CD49d, CXCR5, HLA-DR, LAIR1 og overflate-Ig.

Figur 50 viser APS-plot basert parametre fra LST-kombinasjonen for LPL- og SMZL-prøven.



Figur 50: APS-plot for B-cellelymfomceller (røde) og øvrige lymfocytter (grønne) basert på LST-parametre. Til venstre vises plot fra LPL-prøven, mens til høyre vises plot fra SMZL-prøven.

B-lymfomcellene skiller seg godt fra de øvrige lymfocyttene både i LPL- og i SMZL-prøven.

4.4.2 Utprøving av CVID-kombinasjoner

Etablering av egne normalverdier for B-cellepopulasjoner i perifert blod

Informasjon om B-cellepopulasjoner i perifert blod er innhentet ved hjelp av CVID 1- og 2-kombinasjon som er farget og analysert for 23 blodprøver fra friske individer. Egne utregnete normalverdier er sammenlignet med normalverdier fra to publikasjoner [21, 31] (se tabell 12).

	B-celler innen CD45+ %	Naive B-celler %	CSW-B-celler %	MZ-B-celler %	Transisjonelle B-celler %	CD21 _{lav} B-celler %	Plasmablaster %
Kvinne 1936	5,9	81,7	6,87	7,86	1,31	3,06	0
Kvinne 1952	13,2	91,7	5,55	2,26	3,23	2,68	0,24
Kvinne 1953	8,54	81,2	9,12	7,16	1,13	5,29	0,33
Kvinne 1955	8,52	60,4	15,2	21,9	2,12	4,03	0,11
Kvinne 1958	13,9	83,6	3,84	11,4	3,29	4,06	0,22
Kvinne 1960	6,52	57	18,4	17	1,15	3,72	0,13
Mann 1960	5,61	57	17,6	20,2	0,57	6,73	0,26
Mann 1961	12,3	59	11,2	28,2	2,28	4,37	0,25
Kvinne 1962	8,79	65,4	13,8	19,3	2,34	3,81	0,9
Kvinne 1964	13,3	84,9	6,9	7,42	2,82	1,97	0
Kvinne 1967	8,13	76,1	8,16	11	1,02	6,78	0,25
Kvinne 1969	9,03	59,8	20,7	14,1	0,86	6,79	0,31
Kvinne 1970	8,47	57,6	20,3	21,3	2,94	8,65	0,28
Mann 1973	10,3	81,8	8,16	8,63	3,31	3,23	0,6
Mann 1974	11,4	67,6	8,23	23,8	2,7	4,66	0,05
Kvinne 1978	12,4	72,9	6,03	14,6	2,77	5,44	0,11
Kvinne 1978	10,5	80,5	10,7	7,8	2,05	6,15	0,31
Kvinne 1978	11,4	44,6	23,5	28,6	0,79	7,44	1,39
Kvinne 1980	22,3	91,1	3,29	5,48	2,79	3,02	0,29
Kvinne 1983	14,5	68,6	13,6	16,5	7,54	4,11	0,33
Kvinne 1985	7,58	76,3	8,41	14,6	1,27	7,2	0,24
Kvinne 1986	24,8	88,1	5,49	5,81	3,26	1,63	0,05
Mann 1996	12	92,1	3,15	4,2	2,14	2,58	0,1
Normalverdier % (median)	6 - 21,5 (10,5)	57 - 91,6 (76,1)	3,3 - 20,7 (8,4)	4,3 - 27,8 (14,1)	0,8 - 3,3 (2,3)	2,0 - 7,4 (4,1)	0 - 0,9 (0,3)
Warnatz' norm.verdier %	4,9 - 8,4	42,6 - 82,3	7,6 - 31,4	7,4 - 32,5	0,6 - 3,4	0,9 - 7,6	0,4 - 3,6
Mouillots norm.verdier % (median)	9 - 14 (11)	54 - 76 (67)	10 - 20 (15)	11 - 23 (15)	1 - 3 (2)	1 - 3 (2)	0,5 - 1 (0,9)

Tabell 12: Oversikt over 23 blodprøver fra friske individer farget med begge CVID-kombinasjoner og deretter analysert i FloJo software (median alder 42 år). CD21_{lav}-B-cellepopulasjonen er tatt fra CVID 1-kombinasjon, mens øvrige populasjoner er tatt fra CVID 2-kombinasjon. Normalverdier og median er merket med rødt. Øvre og nedre grense for normalverdiene tilsvarer 5. og 95. persentil. Tabellen viser også normalverdier (median ikke tilgjengelig) fra Warnatz' publikasjon fra 2008 (n = 54, median alder 40 år) [21], og normalverdier og median fra Mouillots publikasjon fra 2010 (n = 50, median alder 36 år) [31].

Egne normalverdier skiller seg fra normalverdiene i de to publikasjonene spesielt når det gjelder naive og hukommelses-B-celler. Når det gjelder seks av de normale individene har disse en andel naive B-celler som er høyere enn 95. persentilen for Warnatz' normalverdier, mens tolv individer ligger høyere enn Mouillots øverste grense for normalverdier. For CSW-B-celler er det åtte individer som ligger lavere enn 5. persentilen for Warnatz' normalverdier, mens det er 13 stykker som ligger under nederste grense for Mouillots normalverdier.

Klassifisering av CVID-pasienter

Fra januar til mai 2011 er 63 pasienter blitt utredet for immunsvikt ved avdeling for flowcytometri. Begge CVID-kombinasjoner er analysert for disse pasientene. Informasjon fra analysene er benyttet for klassifisering av de ulike CVID-tilfellene etter EUROClass-konsensus (se tabell 13) [39].

EUROClass-gruppe	Antall	Andel av totale (%)
B- (< 1 % B-celler)	4	6
B+ (> 1 % B-celler)	59	94
SmB- (≤ 2 % CSW-B-celler)	19	30
SmB+ (> 2 % CSW-B-celler)	40	63
CD21_{lav}-B-celler (≥ 10 %)	10	16
SmB-21^{lo}	7	11
SmB+21^{lo}	3	5
Transisjonelle B-celler (≥ 9 %)	8	12
SmB-Tr^{hi}	4	6
SmB+Tr^{hi}	4	6

Tabell 13: Klassifisering av 63 pasienter diagnostisert med CVID ut fra EUROClass-konsensus. Innen gruppe B+ deles det videre inn i grupper med hensyn på andel CSW-B-celler. I tillegg vurderes også andel CD21_{lav}-B-celler og andel transisjonelle B-celler for gruppe SmB- og gruppe SmB+.

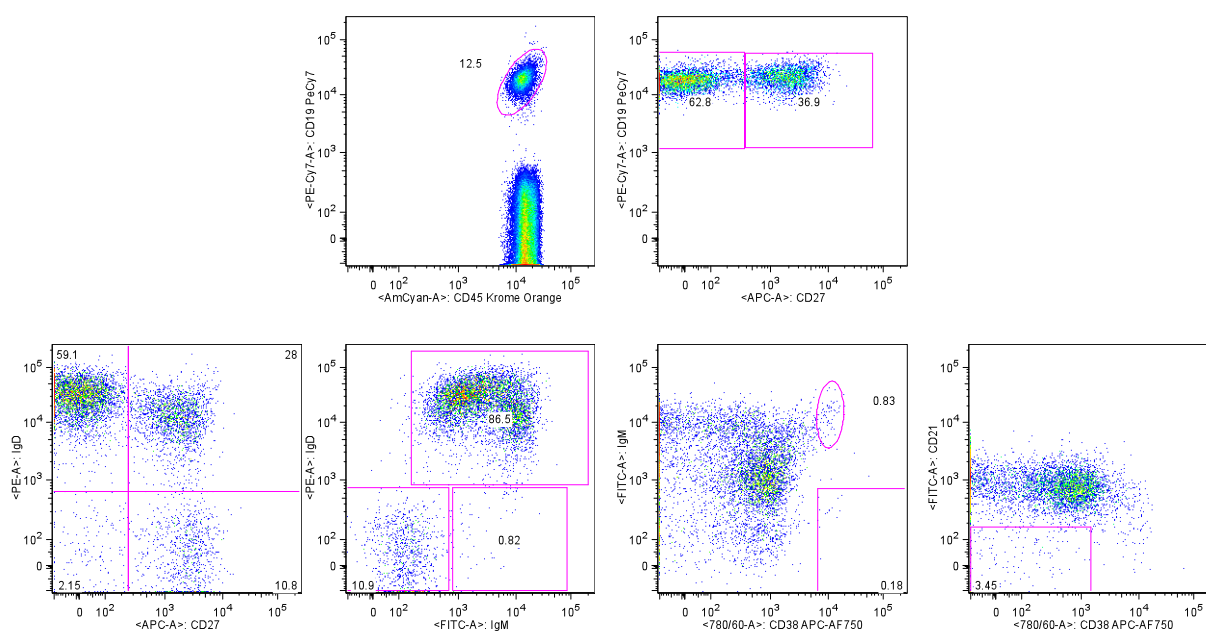
Av de analyserte pasientprøvene diagnostisert med CVID er det kun 6 % av pasientene som plasserer seg i gruppe B-, mens resten befinner seg i gruppe B+. Innen gruppe B+ er det 30 % av pasientene som tilhører gruppe SmB-, mens 63 % tilhører gruppe SmB+. Ti tilfeller er funnet med andel CD21_{lav}-B-celler ≥ 10 %, de fleste innen gruppe SmB-. Transisjonelle B-

celler $\geq 9\%$ er funnet i åtte av CVID-tilfellene, som er likt fordelt mellom gruppe SmB- og SmB+.

Eksempler på bruk av CVID-kombinasjoner

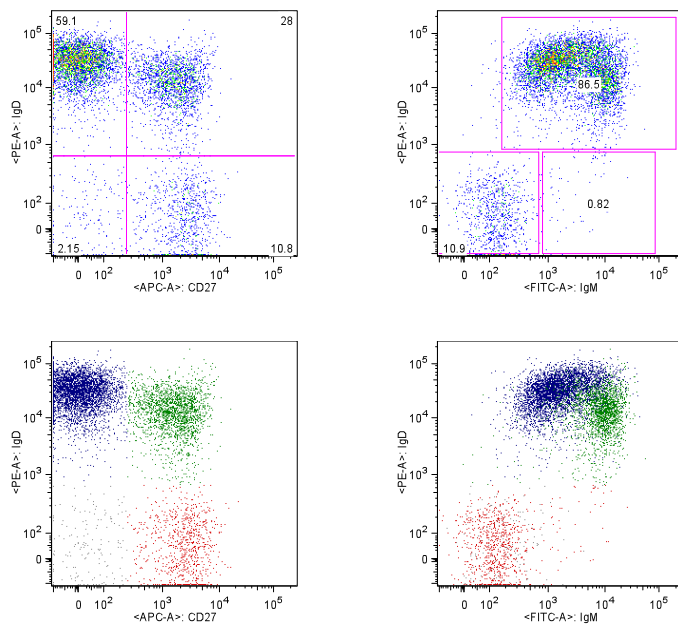
Nedenfor følger eksempler som illustrerer bruk av CVID 1- og 2-kombinasjoner på normale blodprøver og på pasientprøver sendt for utredning av CVID. Informasjon om symptomer og klinikk er hentet fra opplysninger på medsendte remisser.

Figur 51 viser analyse av CVID-kombinasjoner kjørt på en blodprøve fra et friskt individ med normal fordeling av naive B-celler, MZ-B-celler, CSW-B-celler, transisjonelle B-celler, plasmablaste og CD21_{lav}-B-celler.



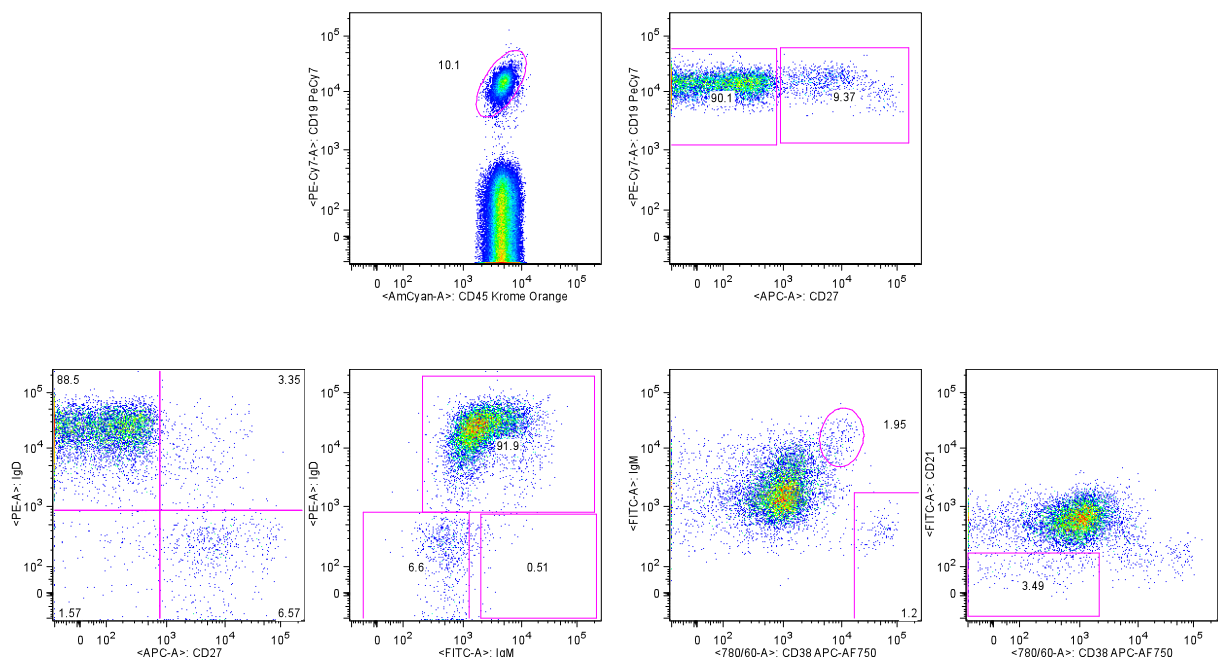
Figur 51: Eksempel fra perifert blod fra friskt individ (mann født 1961). Øverst til venstre vises utgating av totale B-celler fra CD19/CD45-dotplot, mens øverst til høyre vises fordeling av naive og hukommelses-B-celler innen totale B-celler i CD19/CD27-dotplot. IgD/CD27-dotplot nederst til venstre brukes til utgating av naive B-celler (IgD⁺⁺, CD27⁻), MZ-B-celler (IgD⁺, CD27⁺) og CSW-B-celler/plasmablaste (IgD⁻, CD27⁺/IgD⁻, CD27⁺⁺). IgD⁻/CD27⁻⁻-fraksjonen består hovedsakelig av transisjonelle B-celler. IgD/IgM-dotplot nummer to nederst fra venstre presenterer naive B-celler og MZ-B-celler (IgD⁺, IgM⁺), CSW-B-celler (IgD⁻, IgM⁻) og plasmablaste (IgD⁻, IgM^{+/-}). Som nummer tre nederst fra venstre er IgM/CD38-dotplot som benyttes for utgating av transisjonelle B-celler (IgM⁺, CD38⁺) og plasmablaste (IgM^{+/-}, CD38⁺⁺). CD21/CD38-dotplot nederst lengst til høyre viser utgating av CD21_{lav}-B-celler (CD21^{+/-}, CD38⁻).

Figur 52 viser samme eksempel som ovenfor, men gir en mer detaljert oversikt over IgM-, IgD- og CD27-uttrykk i naive B-celler, MZ-B-celler og CSW-B-celler.



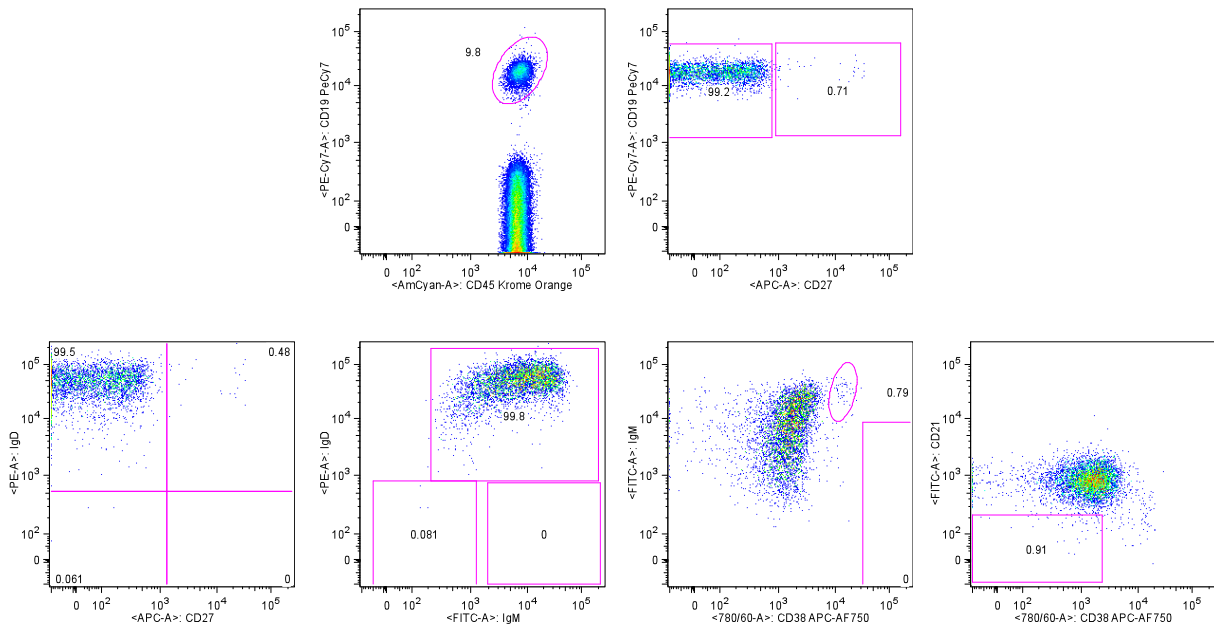
Figur 52: De to øverste dotplot er de samme som i figur 56. Nedenfor hvert av dotplotene vises de samme dotplotene med de ulike B-cellepopulasjonene farget. Det observeres at naive B-celler (blå populasjon) har sterkere IgD-uttrykk og svakere IgM-uttrykk enn MZ-B-celler (grønn populasjon). Disse to populasjonene skilles fra hverandre ved at MZ-B-celler uttrykker hukommelsescellemarkøren CD27. Dette gjelder også for CSW-B-celler (rød populasjon) som i tillegg skiller seg fra de andre to cellypene ved at de verken uttrykker IgD eller IgM.

Neste eksempel er en pasientprøve fra en 70 år gammel kvinne med IgG-verdier i nedre normalområde og tilbakevendende pneumoni. Ved analyse av CVID-kombinasjoner hadde denne kvinnen CSW-B-celleandel og MZ-B-celleandel i nedre grenseområde, i tillegg til en økt andel av plasmablaste (se figur 53). Fordeling av transisjonelle B-celler og CD21_{lav}-B-celler er normalfordelt.



Figur 53: Pasienteksempel fra 70 år gammel kvinne med nedsatt andel CSW-B-celler og MZ-B-celler, i tillegg til økt andel plasmablaste.

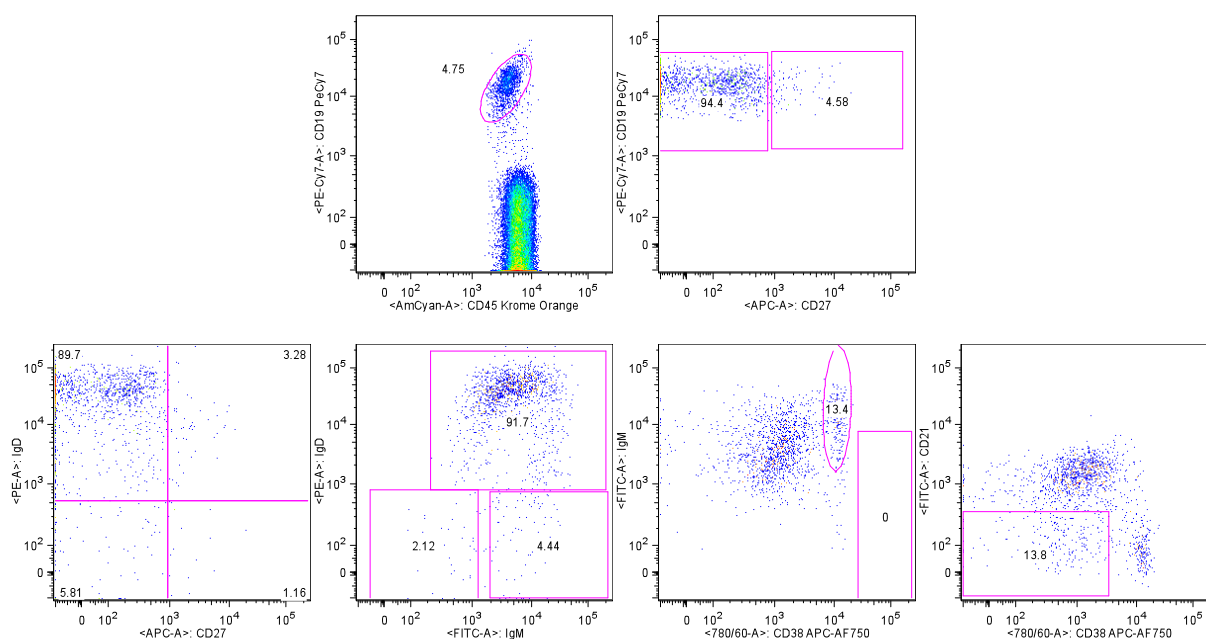
Figur 54 er et pasienteksempel fra en kvinne på 48 år som utredes for CVID på grunnlag av symptomene hypogammaglobulinemi, enteropati og hudinfeksjoner. Pasienten viser < 2 % CSW-B-celler og 0,5 % MZ-B-celler, mens fordelingen av transisjonelle B-celler, plasmablaste og CD21_{lav}-B-celler er normal.



Figur 54: Eksempel fra 48 år gammel kvinne med CVID som har nedsatt andel CSW-B-celler og plasserer seg i gruppe B+, S_mB-21^{norm}Tr^{norm} etter EUROclass-konsensus [39].

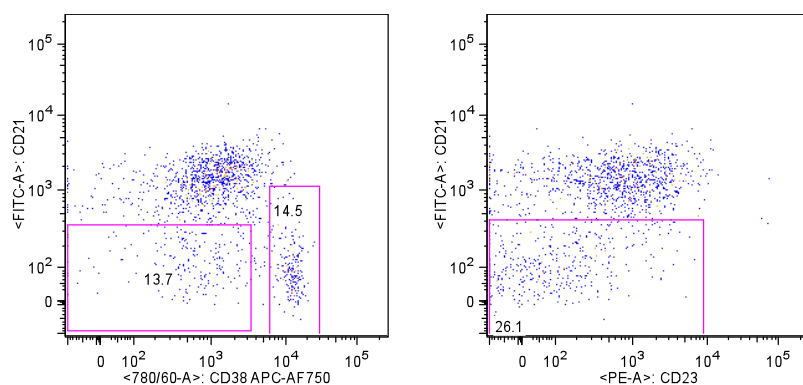
Figur 55 er et eksempel på en pasientprøve utredet for CVID. Prøven kommer fra en mann på 37 år med symptomer som hypogammaglobulinemi, autoimmun cytopeni og splenomegali.

Pasienten har < 2 % CSW-B-celler, CD21_{lav}-B-celler > 10 % og transisjonelle B-celler > 9 %.



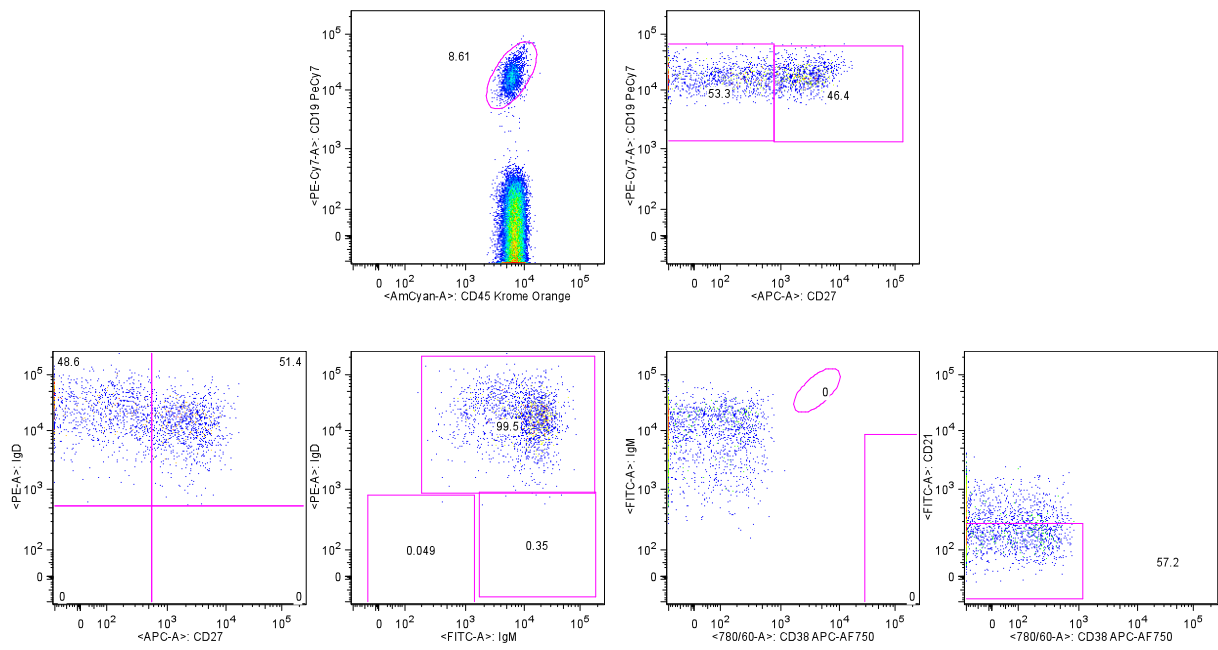
Figur 55: Eksempel fra 37 år gammel mann med CVID som har nedsatt andel CSW-B-celler, samt økt andel CD21_{lav}- og transisjonelle B-celler. Pasienten plasseres i gruppe B+, SmB-21^{lo}Tr^{hi} etter EUROClass-konsensus [39].

Neste eksempel viser samme pasient som ovenfor. Her presenteres det hvordan transisjonelle B-celler kan gates ut på en annen måte enn vist over, og i tillegg vises CD23-uttrykk for B-cellepopulasjonene (se figur 56).



Figur 56: Eksempel fra 37 år gammel mann. CD21/CD38-dotplot til venstre viser CD21_{lav}-B-celler (13,7 %) og hvordan disse kan skilles fra transisjonelle B-celler (14,5 %) på grunnlag av henholdsvis negativt og positivt CD38-uttrykk. CD21/CD23-dotplot til høyre viser fordelingen av modne resirkulerende B-celler (CD21+, CD23+), og CD21_{lav}- og transisjonelle B-celler (CD21-/intermediær, CD23-).

Figur 57 er et pasienteksempel fra en 35 år gammel mann med < 2 % CSW-B-celler og en normal andel MZ-B-celler. I tillegg har mannen en andel CD21_{lav}-B-celler på mer enn 10 %. Kliniske opplysninger er ikke oppgitt.



Figur 57: Eksempel fra 35 år gammel mann med CVID som har nedsatt andel CSW-B-celler, samt økt andel CD21_{lav}-B-celler. Mannen har en normal andel MZ-B-celler. Etter EUROClass-konsensus klassifiseres dette tilfellet som gruppe B+, SmB-21^{lo}T^{norm} [39].

5 Diskusjon

5.1 Valg av antistoffkloner, fluorokromer og antistoffkonsentrasjon

EuroFlow-konsortiumet sin målsetting er at alle laboratorier som utfører flowcytometri skal bruke de samme standardiserte antistoffkombinasjonene i diagnostikk av B-CLPD. Dette betyr at for å følge deres anbefalinger bør ingen av antistoffklonene eller fluorokromene som er anbefalt byttes ut [53]. Euroflow-konsortiumet har gjennomført et svært grundig arbeid for å finne antistoffkloner som kan benyttes sammen, og stabile fluorokromer som ikke interagerer med andre reagenser. Dette arbeidet vil fortsette inn i fremtiden ettersom nye antistoffer og fluorokromer stadig utvikles. Derfor har vi valgt å teste ut antistoffkloner for B-CLPD-kombinasjonene etter EuroFlow sine anbefalinger i de aller fleste tilfeller. Siden EuroFlows standardprosedyrer for prøvepreparering ennå ikke er publisert, har vi brukt våre egne laboratorieprosedyrer for immunfarging som utgangspunkt.

Det finnes enkelte avvik fra EuroFlows anbefalinger for antistoffkloner og fluorokromer. Dette gjelder for CD19 PeCy7, CD38 APC-H7, CD43 APC-H7, CD45 Pacific Orange, CD56 PE og TCR $\gamma\delta$ PeCy7 (se tabell 14).

EuroFlows retningslinjer	Produsent/klon	Erstattet med	Produsent/klon
CD19 PeCy7	BD/SJ25C1	CD19 PeCy7	BC/J3119
CD38 APC-H7	BD/HB7	CD38 APC-AF750	BC/LS198-4-3
CD43 APC-H7	BD/IG10	CD43 APC-AF750	BC/DFT1
CD45 Pacific Orange	Invitrogen/H130	CD45 Krome Orange	BC/J.33
CD56 PE	Cytognos/C5.9	CD56 PE	BD/NCAM16.2
TCR $\gamma\delta$ PeCy7	BD/11F2	TCR $\gamma\delta$ PeCy7	BC/CDS10EUR144

Tabell 14: Antistoffkloner som er blitt erstattet fra EuroFlows opprinnelige anbefalinger.

I framtiden overveies det å skifte ut antistoffkloner med anbefalte kloner og fluorokromer fra EuroFlows anbefalinger ettersom dette er en betingelse for å benytte seg av EuroFlows database.

CD45 Pacific Orange fra Invitrogen er blitt erstattet med CD45 Krome Orange fra BC. Dette er fordi BP-filteret i LSR II sin konfigurering er uegnet for deteksjon av fluorokromet Pacific

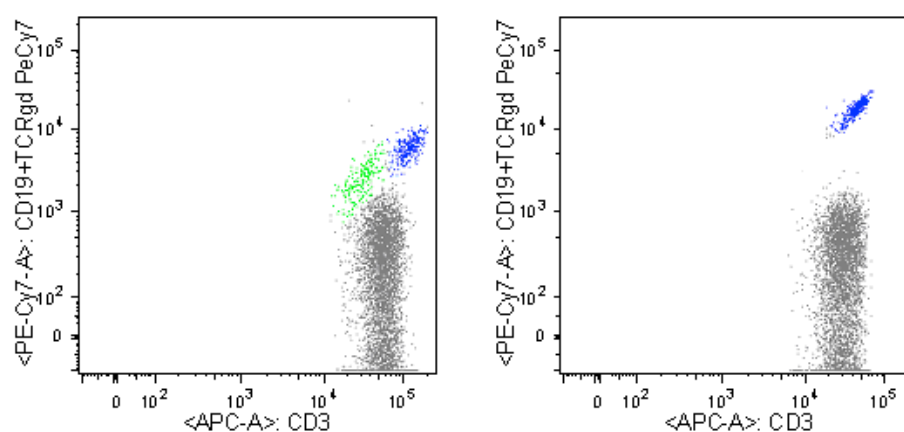
Orange. BP-filteret i gjeldende konfigurering slipper gjennom fluorescens i bølglengdeintervallet 500-550 nm, mens emisjonsmaksimum for Pacific Orange er på 551 nm [67]. Krome Orange med emisjonsmaksimum 528 nm er derimot godt egnet med nåværende konfigurering. For å følge EuroFlows anbefalinger bør det vurderes å skifte BP-filter i framtiden.

For CD56 PE er antistoffklon C5.9 fra Cytognos i utgangspunktet anbefalt fra EuroFlow. I og med at vi har gode erfaringer med bruk av antistoffklon NCAM16.2 fra BD er denne derfor valgt i stedet.

CD19 PeCy7 og TCR $\gamma\delta$ PeCy7 er erstattet med tilsvarende konjugater fra BC.

Antistoffklonene fra BC oppnår en høyere S/N-ratio enn antistoffklonene fra BD. Studier har vist at PeCy7-konjugater fra BC trenger mindre kompensering i PE-kanalen enn for PeCy7-konjugater fra andre produsenter. De viser også en mindre andel fotobleking ved lyseksposering over tid enn det som er tilfelle for andre produsenter, det vil si at PeCy7 fra BC har en høyere stabilitet, noe som også gjelder lot-til-lot-variasjon [52].

Vi har observert forekomst av uspesifikke signaler i tillegg til det ekte signalet ved immunfarging med TCR $\gamma\delta$ PeCy7. Det uspesifikke signalet vises som svake CD3-positive, skråstilte signaler og gjelder ved bruk av begge antistoffkloner, men er mer uttalt for TCR $\gamma\delta$ PeCy7 fra BD enn tilsvarende fra BC (se figur 58).



Figur 58: CD3/TCR $\gamma\delta$ -dotplot til venstre viser ekte signal (blå populasjon) og uspesifikt signal (grønn populasjon) av T-celler farget med TCR $\gamma\delta$ PeCy7 fra BD. Samme dotplot til høyre viser T-celler farget med TCR $\gamma\delta$ PeCy7 fra BC. Ingen uspesifikk farging observeres her. T-celler farget med TCR $\gamma\delta$ PeCy7 fra BC har også sterkere intensitet enn med tilsvarende antistoff fra BD. Grå populasjon tilsvarer øvrige T-celler.

CD38 APC-H7 fra BD er erstattet med CD38 APC-AF750 ettersom CD38 APC-H7 ikke var tilgjengelig fra produsent ved uttesting og det derfor var nødvendig med et alternativt

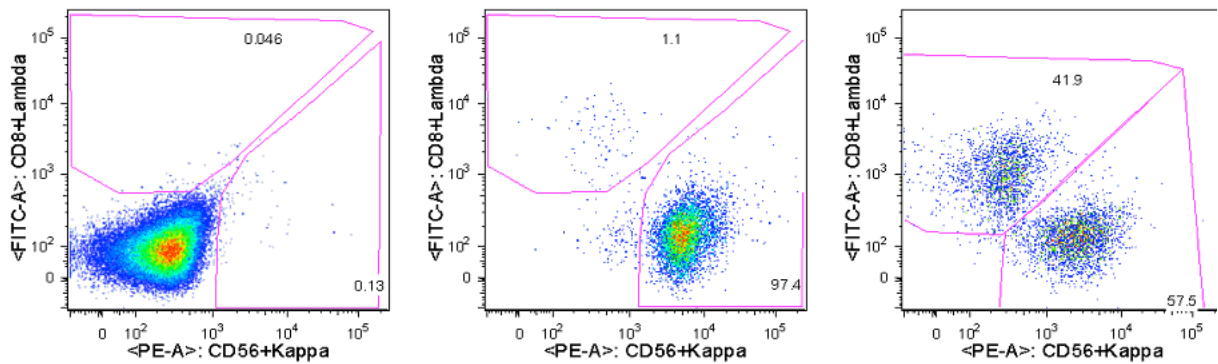
antistoff. Det samme problemet oppsto for CD43 APC-H7 hvor CD43 APC-AF750 er benyttet i noen av tilfellene.

Ved flowcytometrisk immunfenotyping brukes som regel monoklonale antistoffer med unntak av antistoffer som binder immunglobulin tungkjede IgM og IgD, samt lettkjede Kappa og Lambda. I diagnostiske laboratorier tilrådes det å benytte seg av CE-merkede antistoffer. Selv om produsenten ofte oppgir en optimal antistoffkonsentrasjon for immunfarging, er det likevel nødvendig med titrering før antistoffene tas i bruk [54, 57].

For en optimal titrering er det vesentlig å bruke en høy cellekonsentrasjon og et lavt volum av antistoff som vil motvirke uspesifikk binding. S/N-ratioen for et antistoff skal ha en så høy verdi som mulig for å kunne skille mellom positiv og negativ populasjon. Det er vanlig å sette akseptabel S/N-ratio for et antistoff som skal benyttes i diagnostikk som > 3 [57]. Det finnes også eksempler på at S/N-ratioen i slike bruksområder anbefales å være > 9 [74]. Et antistoff betegnes som å være av god kvalitet hvis optimal antistoffmengde er lavere enn $1 \mu\text{g}/\text{test}$, og regnes for å være suboptimalt ved antistoffmengde $> 3 \mu\text{g}/\text{test}$. Alternative antistoffprodusenter eller –kloner bør vurderes dersom et antistoff ikke innfrir disse kravene [57].

Selv om det i denne oppgaven er oppnådd å finne en optimal antistoffkonsentrasjon for de fleste titrerte antistoffene, er det åtte antistoffer som vi med våre metoder ikke har klart å oppnå en optimal titer for, verken ved S/N-ratio eller metningskurve. Dette gjelder CD8 FITC, CD23 FITC, CD62L FITC, HLA-DR PerCP-Cy5.5, IgM FITC, IgM APC, Kappa PE og Lambda FITC. Anbefalt antistoffkonsentrasjon fra produsent er valgt for disse.

For polyklonale Kappa PE og Lambda FITC fra Cytognos er det ikke funnet noen optimal antistoffkonsentrasjon. S/N-ratio ved anbefalt konsentrasjon er for Kappa og Lambda henholdsvis 10 og 13, noe som er i det lave området til de beskrevne anbefalingene. Vi har observert varierende intensitet i uttrykket av Kappa og Lambda både i normale B-celler og i ulike B-CLPD. Dette gjelder spesielt for KLL som karakteriseres av en svak Ig-ekspresjon. Det har derfor i flere tilfeller ikke vært mulig å antyde noen IgL-restriksjon (se figur 59).

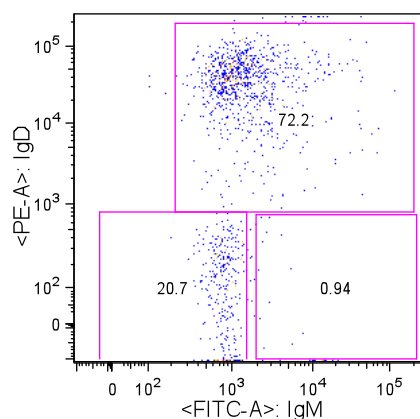


Figur 59: Eksempel på Kappa/Lambda-farging fra KLL-prøve (til venstre) med svak intensitet, fra MCL-prøve (i midten) med høyere intensitet, og fra normalprøve (til høyre) med normal intensitet.

Lavt IgL-uttrykk på normale B-celler kan skyldes høy andel av serum-Ig som binder opp tilsatt anti-Kappa eller anti-Lambda. For å fjerne serum-Ig vaskes alle prøver to ganger med 0,9 % NaCl før immunfarging. På grunn av de utilfredsstillende resultatene for KLL og hos noen normale blodprøver, overveies det å teste ut polyklonale antistoffer fra andre produsenter.

To av antistoffene (CD62L FITC og CD27 APC) utmerker seg med en betydelig høyere antistoffkonsentrasjon per test enn de andre (henholdsvis 12,5 og 6,0 µg/test), noe som også er anbefalt konsentrasjon fra produsent. Dette vil si at et stort antall antistoffmolekyler må binde for å få et detektbart signal, noe som antagelig kan skyldes at disse antistoffene er tatt fra kloner som binder sin epitope med suboptimal affinitet [57]. I praksis har de to antistoffene derimot vist seg å fungere tilfredsstillende, selv om de i prinsippet har en høyere konsentrasjon enn anbefalt.

Flere versjoner av polyklonalt F(ab')₂ IgM FITC er testet ut, både goat-anti-human fra eBioscience og rabbit-anti-human fra Dako, men ingen av disse har med våre metoder gitt tilfredsstillende resultater selv om det sistnevnte er i bruk i dag. Det observeres for høy bakgrunnsfarging i enkelte tilfeller som gjør det vanskelig å skille mellom positiv og negativ populasjon (se figur 60).



Figur 60: CSW-B-celler nederst til venstre skal være negative for IgM, men det observeres at bakgrunnsfargingen har samme IgM-intensitet som de naive B-cellene i gaten rett ovenfor som er ekte IgM-positive. Dette gjør at det blir vanskelig å sette skille mellom IgM-negative CSW-B-celler og IgM-positive plasmablaste i gaten nederst til høyre.

Det har i tillegg ikke vært mulig å oppnå optimal antistoffmengde for IgM FITC. For å minske andel uspesifikk binding av antistoff, er det blitt blokkert med NRS (normalisert kaninserum) før IgM FITC tilsettes. Blokkeringen har ingen synlig virkning. I tillegg er det utført ytterligere forsøk som innebærer ulike vasketrinn, men dette har heller ikke vært vellykket (resultater ikke vist) [75]. Videre uttesting av IgM FITC fra flere produsenter bør utføres. Eventuelt kan det vurderes å bytte over til IgM konjugert til et sterkere fluorokrom, som for eksempel APC [57]. I en slik situasjon kan CD27, som i dag er konjugert til APC, i stedet benyttes som FITC-konjugert. Et eksempel på CD27 FITC fra Dako er benyttet i Warnatz' publikasjon, og denne kan i framtiden testes ut for COVID-kombinasjonene [21].

5.2 EuroFlow-kombinasjoner

Prinsippet til EuroFlow-konsortiumet er blitt fulgt i dette arbeidet. Dette innebærer analyse av en screeningkombinasjon i forkant av mer målrettede antistoffpaneler, i dette tilfellet B-CLPD-paneler. Mange av overflatemarkørene som er inkludert i disse panelene har kjent funksjon både hos normale B-celler og hos lymfoide motstykker til disse, mens andre igjen har et ukjent uttrykksmønster. En av EuroFlow sine målsetninger er å finne uttrykksmønster for disse lite kjente markørene når det gjelder ulike B-CLPD, og eventuelt også om noen av dem har overlappende funksjon og dermed kan utelukkes. En økt kunnskap innen dette området vil gjøre det lettere å skille mellom ulike B-CLPD i framtiden ved bruk av flowcytometri. En økt bruk av flowcytometri i slik diagnostikk vil også minske andelen invasive inngrep hos pasienten, siden metoden ofte krever kun en perifer blodprøve for å sette en diagnose [42].

LST-kombinasjonen benyttes som en screening for lymfoproliferative sykdommer. Ut fra denne kombinasjonen oppnås det informasjon om de ulike lymfoide cellelinjer, inkludert B-celler. Overflateuttrykk av CD45, CD19, CD20, CD5 samt Kappa og Lambda forteller noe om B-cellenes modningsstadium, om markørene gjenspeiler et normalt eller malignt uttrykk, og om B-cellenes klonalitet. LST- og KLL-kombinasjonen har vist seg å være tilstrekkelig for diagnostisering av KLL. KLL-kombinasjonen inneholder mange av markørene som tidligere er blitt benyttet for identifisering av KLL, som CD20, CD43, CD23 og CD79b, og også nye markører som hjelper til i differensialdiagnosen med andre typer B-CLPD [42].

Det observeres ingen statistisk signifikant forskjell på 5 % nivå mellom prøver farget med LST multicolor-kombinasjon og prøver farget med tidligere benyttet 4-fargepanel for lymfomscreening. Det er dermed 95 % sikkert at de nye multicolor-panelene gir samme resultat som de gamle 4-fargepanelene. To markører fra det gamle 4-fargepanelet mangler i LST-kombinasjonen, det vil si T- og NK-cellemarkørene CD7 og CD16. På den andre siden bidrar LST-kombinasjonen med CD38 og TCR $\gamma\delta$ som manglet i de gamle panelene. Disse markørene kan betraktes som mer nyttige i og med at man kan fange opp plasmacelleneoplasier og TCR $\gamma\delta$ + T-cellemaligniteter på et tidligere tidspunkt. Screening med LST-kombinasjonen innebærer kun farging av ett rør, i motsetning til tre rør i det gamle panelet. Dette fører til en økt effektivitet når det gjelder tidsbruk og andre ressurser.

Alle fem EuroFlow-kombinasjoner er blitt kjørt og analysert for utvalgte prøver fra pasienter diagnostisert med ulike typer B-CLPD. Fenotypeprofilene for de ulike B-CLPD i EuroFlows uttestinger er i deres publikasjon angitt som MFI-verdier, slik at uttrykket for de ulike markørene vurderes relativt i forhold til hverandre. For enkelte av markørene er det observert en betydelig grad av heterogenitet. Størrelsen på måleområdet varierer derfor mellom de ulike markørene, og et typisk uttrykksmønster av en markør er ikke alltid mulig å bestemme [42]. Eksemplene i denne oppgaven er blitt sammenlignet med de publiserte dataene. Sammenligningen gir kun en pekepinn ettersom MFI-verdiene ikke direkte kan sammenlignes dersom ikke de benyttede flowcytometerne har identisk konfigurering.

KLL-, HCL-, og LPL-prøven samt begge FL-prøvene i oppgavens eksempler har tilnærmet samme fenotypeprofil som de samme B-CLPD i EuroFlow sine uttestinger. MCL-eksemplet i denne oppgaven skiller ut ved at den uttrykker CD23, noe som kan forekomme hos en liten andel av denne typen B-CLPD. CD23-uttrykket er assosiert med en bedre prognose enn for MCL som ikke uttrykker markøren [76]. LAIR1-uttrykket er også noe nedsatt i MCL-eksemplet enn rapportert for MCL. Et negativt LAIR1-uttrykk forbindes med GC- og post-GC-celler, så et negativt uttrykk hos MCL-celler er motsigende i og med at denne typen B-CLPD er derivert fra pre-GC-celler [40]. Den spleniske MZL-prøven har derimot et positivt uttrykk av LAIR1, som vanligvis viser et nedsatt uttrykk hos MZL. Selv om B-celler som har vært innoen et GC i prinsippet ikke skal uttrykke LAIR1, har markøren også vist en andel av heterogenitet innen ulike B-celleundergrupper. Dette kan muligens forklare det inkonsekvente uttrykksmønsteret hos de to B-cellelymfomene, ettersom det kommer an på hvilken type B-celle lymfomet i utgangspunktet har sprunget ut fra [77]. SMZL-prøven i oppgaven uttrykker også CD5, noe som er beskrevet i < 20 % av SMZL [78].

Böttcher et. al. betegner fire av EuroFlow-markørene som spesielt viktige i differensialdiagnosen mellom ulike typer B-CLPD. De peker på CD200 som har et høyt uttrykk hos KLL og HCL, og et negativt uttrykk hos MCL. Ettersom de andre typene av B-CLPD har et varierende uttrykk av CD200, er det ikke mulig å identifisere én sykdomsgruppe ut fra en enkelt overflatemarkør. LAIR1 er nyttig for å skille mellom FL som har et lavt uttrykk og MCL som har et sterkere uttrykk. Alle FL som hittil er farget med EuroFlow-kombinasjonene har vist et negativt LAIR1-uttrykk. I tillegg er i følge Böttcher et. al. CD5 positiv hos KLL og MCL, og vanligvis negativ hos andre typer B-CLPD. CD10 er vanligvis positiv hos GC- og post-GC-lymfomer som FL, BL samt en undergruppe av DLBCL. CD10-positivitet kan også sees ved HCL [40, 42].

For å skille mellom de ulike typene B-CLPD kan det være nyttig å se på hvor sterkt en markør uttrykkes i en type B-CLPD i forhold til et annet, i stedet for kun vurdere om markøren er til stede eller ikke. Dette viser seg i eksemplet hvor LPL-cellenes immunfenotypeprofil er brukt som referansebilde for SMZL-prøven. De to prøvene kan lett skilles fra hverandre når de er lagt over hverandre i samme banddiagram. På den andre siden uttrykker de stort sett de samme overflatemarkørene, men med forskjellig intensitet. En sikker diagnose kan derfor ikke settes ved bruk av banddiagram. Dette er heller ikke mulig ved hjelp av APS-software, som publisert av Böttcher et.al. [42].

Multidimensjonell analyse som APS-plotene i Infinicyt gir også opphav til en måte å skille mellom de ulike B-CLPD på. Antall markører i en analyse definerer hvor mange dimensjoner det blir. På grunnlag av alle markørene som analyseres for en type B-CLPD finner softwareprogrammet ut hvilke markører som varierer mest og som dermed bidrar til å skille en type B-CLPD fra et annet ved å gi cellepopulasjonen fra den spesifikke sykdommen en unik posisjon i APS-plotet [42].

5.3 CVID-kombinasjoner

Når det gjelder antistoffkombinasjonene som er testet ut i Warnatz' publikasjon varierer disse en del fra CVID-kombinasjonene i denne oppgaven. I og med at det er valgt å inkludere fluorokromoppsett og backbonemarkører fra EuroFlow-kombinasjonene også i CVID-kombinasjonene øker dette antall markører fra fire i Warnatz' antistoffpaneler til sju i våre paneler. Dette fører til økt renhet for B-cellepopulasjonene ved at totale lymfocytter gates ut ved hjelp av CD45 i forkant av utgating av B-celler fra CD19. CD19-gaten kan dobbeltsjekkes ved hjelp av CD20 for å se at B-cellegaten er ren. Samtidig tillater

backbonemarkørene at filer fra to kjørte antistoffkombinasjoner kan merges sammen til én fil, og dermed få økt informasjon om en populasjon grunnet økt antall markører. I tillegg er CD23 inkludert i CVID-kombinasjonene. Denne markøren er ikke inkludert i Warnatz' antistoffpanel, men er nevnt i artikkelen som en måte å skille mellom modne B-celler som uttrykker markøren og transisjonelle og CD21_{lav}-B-celler som ikke uttrykker CD23 [21].

En tsjekkisk publisering fra 2009 [79] har også testet ut antistoffkombinasjoner for identifisering av B-cellepopulasjoner i perifert blod, spesielt med hensyn på CVID. Her benyttes CD24 til utgating av transisjonelle B-celler i et CD24/CD38-plot for CD27 negative B-celler. CD24 er ikke inkludert i våre CVID-kombinasjoner ettersom dette ikke er nødvendig. Transisjonelle B-celler kan identifiseres ut fra både CD21/CD38-plot og fra IgM/CD38-plot, og i tillegg identifiseres ved backgating med hensyn på CD23-uttrykk. Publikasjonen nevner at en begrensende faktor for deres studie var mangel på antistoffer mot pan-B-cellemarkører konjugert til "nye" typer fluorokromer sterke nok for identifisering av de ønskede markørene. Multicolor antistoffkombinasjoner øker også antall populasjoner som identifiseres. I motsetning til Warnatz, har ikke den tsjekkiske forskningsgruppen inkludert IgD. Denne markøren er nyttig for å observere forskjell i IgD-uttrykk mellom naive follikulære B-celler og MZ-B-celler, og å skille MZ-B-celler fra CSW-B-celler [21, 53, 79].

Laboratoriets egne etablerte normalverdier for B-cellepopulasjoner i perifert blod sammenlignet med normalverdier fra de to nevnte publikasjonene varierer for flere av populasjonene. Dette gjelder spesielt for naive B-celler hvor median ligger høyere enn for de to andre. Median på 76,1 for normale individer i egne utregnede verdier tilsvarer median for individer med CVID med infeksjonskomplikasjoner i Mouillots publisering. I tillegg er nedre normalgrense for CSW-B-celler lavere enn normalgrensene i både Mouillots og Warnatz' publisering. Grunner for dette er vanskelig å forklare, men uttesting av flere normale individer med større variasjon i alder og kjønn kan med fordel utføres. En studie har vist at fordelingen av normale B-cellepopulasjoner i blod varierer signifikant mellom menn og kvinner. Det kan derfor være hensiktsmessig å etablere kjønns spesifikke normalverdier [35].

63 pasientprøver diagnostisert med CVID er klassifisert etter EUROClass-konsensus. Fordelingen av de ulike pasientgruppene kan sammenlignes med fordelingen i publisert data ut fra 303 CVID-pasienter [39]. 6 % av pasientene plasserer seg i gruppe B- i denne oppgaven mot 10 % i den nevnte publikasjonen. Denne gruppen ekskluderes ettersom en B-celleandel på < 1 % gjør det svært vanskelig å analysere ulike B-celleundergrupper videre. Blant de resterende pasientene viser 30 % av disse en alvorlig nedsatt andel CSW-B-celler (≤ 2 %).

Wehr et.al. har funnet en andel på 58 % i den samme gruppen (SmB-), det vil si en del høyere enn for våre tilfeller. Lav andel CSW-B-celler er den viktigste klassifiseringsparameteren for CVID-tilstander, og kan tyde på nedsatt evne til GC-dannelse [35, 39]. Fordelingen av pasienter med økt andel transisjonelle B-celler samsvarer mellom de to studiene, det samme gjelder for andel CD21_{lav}-B-celler innen smB- gruppen. Andel CD21_{lav}-B-celler innen SmB+ er lavere i denne oppgaven enn i publikasjonen [39].

For flere av de 63 pasientene er kliniske opplysninger ukjente eller mangelfulle, slik at det blir vanskelig å klassifisere prøvene etter de ulike kriteriene fra Mouillots publikasjon som innebærer infeksjoner og sekundære komplikasjoner som autoimmunitet, lymfoprolifisering samt enteropati. Alvorlighetsgraden av CVID øker etter som de kliniske komplikasjonene progressivt kommer til [31]. Nedsatt andel CSW-B-celler er en av de vanligste defektene i CVID, noe som bekreftes også i denne oppgavens undersøkelser. En alvorlig nedsatt andel CSW-B-celler er assosiert med granulomatøs sykdom, splenomegali eller autoimmune sykdommer, og komplikasjonene blir mer uttalt desto lavere andel CSW-B-celler [80]. Økt andel av CD21_{lav}-B-celler assosieres også med autoimmunitet, mens transisjonelle B-celler $\geq 9\%$ ikke syntes å være linket til noen av de kliniske komplikasjonene [31].

Ved mistanke om CVID kjøres det bestandig i tillegg til CVID-kombinasjonene en 4-farge T-cellekombinasjon med antistoffer mot blant annet CD4 og CD45RA for å finne andel naive Th-celler (resultater ikke vist). Nedsatt andel naive Th-celler sammen med en nedsatt andel regulatoriske T-celler (Treg-celler) har vist seg å følge nedsatt andel CSW-B-celler i de mer alvorlige CVID-tilfellene som viser lymfoprolifisering og autoimmunitet. Den lave andelen naive Th-celler i slike tilfeller kan settes i sammenheng med et økt CD95-uttrykk, som igjen kan gi økt sensitivitet for aktivering av apoptose [31].

Blant pasienteksemplene i denne oppgaven er det en prøve fra en pasient som mangler CSW-B-celler fullstendig, mens andelen av MZ-B-celler er normal (se figur 57). Grunnen til at ikke MZ-B-cellene er nedsatt selv om CSW-B-cellene er nedsatt er uviss, spesielt når ingen kliniske opplysninger er tilgjengelige for pasienten. Det kan være en mulighet at slike pasienter har en defekt i komponenter ansvarlig for CSW, noe som kan føre til at IgM+ hukommelsesceller hopper seg opp i sirkulasjonen [35]. Den samme pasienten har også et økt antall CD21_{lav}-B-celler som kan gi sekundære komplikasjoner som nevnt tidligere.

5.4 Konklusjon og videreføring av arbeidet

For dette arbeidet har målet vært å finne egnete multicolor antistoffkombinasjoner for identifisering av B-cellepopulasjoner i blod og benmarg ved hjelp av flowcytometrisk immunfenotyping. B-cellepopulasjoner av interesse har vært maligne B-cellekloner ved ulike typer B-CLPD, og i tillegg normale B-cellepopulasjoner i blod som er blitt undersøkt i forhold til immunsviktilstander.

Det er i denne oppgaven oppnådd å skille mellom seks ulike typer av B-CLPD ved hjelp av markører fra de fem EuroFlow-kombinasjonene. Fire av disse kan også diagnostiseres med den spesifikke type B-CLPD ut fra immunfenotypeprofil. I framtiden vil det utføres videre arbeid med merging av multicolor antistoffkombinasjoner kjørt på maligne pasientprøver og APS-analyse av disse for å øke kunnskapen i forhold til uttrykksmønster av overflatemarkører. Mer erfaring behøves for å kunne sette en diagnose ut fra en enkelt prøve, og arbeid med å bygge opp en database av referansebilder for de ulike B-CLPD vil gjøre analysene lettere å tolke. EuroFlow arbeider også med å bygge opp en referansedatabase med kjente fenotypeprofiler av B-CLPD, og denne kan benyttes hvis man opprettholder de strenge kvalitetskravene som er nødvendig for å muliggjøre at flere laboratorier skal benytte seg av denne tjenesten. Dette innebærer blant annet å benytte eksakt de samme antistoffkloner og fluorokromer som EuroFlow anbefaler. Utbytting av de aktuelle antistoffene, samt mulig endring av flowcytometerets konfigurering er en forutsetning for dette. Når EuroFlow-konsortiet i framtiden publiserer sine preparerings- og fargeprosedyrer, vil dagens laboratorieprosedyrer også tilpasses disse.

Videre arbeid vil gjennomføres med hensyn til optimalisering av CVID-kombinasjonene, da spesielt i forhold til IgM FITC. En erstatning av dette antistoffet konjugert til et annet fluorokrom kan føre til økt S/N-ratio. Dette innebærer en redesign av CVID-kombinasjonene.

I og med at også T-celler påvirkes i CVID-pasienter, vil det i framtiden bli utarbeidet multicolor antistoffpaneler også i forhold til dette. Disse bør inkludere markører som gir informasjon om andel CD4⁺ naive og ulike typer hukommelses-T-celler, samt andel Treg-celler.

CVID-kombinasjonene har vist seg å være egnet for å identifisere normale B-cellepopulasjoner i perifert blod, som inkluderer totale B-celler, CSW-B-celler, MZ-B-celler, naive B-celler, transisjonelle B-celler, CD21_{lav}-B-celler og plasmablaste. CVID-

kombinasjonene er dermed også nyttige for klassifisering av ulike COVID-tilstander. Egne normalverdier er laget for fordelingen av normale B-cellepopulasjoner i perifert blod, men ettersom spesielt verdiene for CSW-B-celler ligger lavere enn normalverdier i andre publikasjoner, bør prøver fra flere friske individer samles inn før disse tas i bruk.

Litteraturliste

Forsidebildet av et GC er tatt herfra:

<http://www.med.uio.no/dlo/mikro/index.php?articleID=3390>

[1] Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby Immunology 6th Edition, W.H. Freeman & co 2007

[2] Van der Burg M, van Zelm M et.al., Dissection of B-cell development to unravel defects in patients with a primary antibody deficiency, Adv. in Exp. Medicine and Biol. 2011;697:183-196

[3] Lea T., Immunologi og immunologiske teknikker 3. utgave, Fagbokforlaget 2006

[4] Nagasawa T, Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development, Nat Rev Immunol 2006;6:107-116

[5] Evensen SA, Brinch L, et.al., Blodsykdommer 6. utgave, Gyldendal akademisk 2008

[6] Hillion S, Rochas C et.al., Signaling pathways regulating RAG expression in B lymphocytes, Autoimmun Rev 2009;8:599-604

[7] Hess J, Werner A et.al., Induction of pre-B cell proliferation after de novo synthesis of the pre-B cell receptor, Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:1745-1750

[8] Ghia P, Rosenquist R, Davi F, Immunoglobulin gene analysis in chronic lymphocytic leukemia, Wolters Kluwer Health Italy Ltd 2009

[9] Alberts B, Johnson A et.al., Molecular Biology of the Cell 5th Edition, Garland Sciences 2008

[10] Liu YJ, Johnson GD et.al., Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses, Immunology Today, 1992;13, No.1: 17-21

[11] <http://www.niehs.nih.gov/research/atniehs/labs/lmg/sh/index.cfm> (redigert)

[12] Odegard VH, Schatz DG, Targeting of somatic hypermutation, Nat Rev Immunol 2006;6(8):573-583

[13] Radbruch A, Muehlinghaus G et.al., Competence and competition: The challenge of becoming a long-lived plasma cell, Nat Rev Immunol 2006;6:741-750

[14] Liu YJ, Banchereau J, Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B-cells, Seminars in Immunology, 1997;Vol 9: 235-240

[15] Arpin C, Déhanet J et.al., Generation of memory B cells and plasma cells in vitro, Science 1995;268:720-722

[16] Tokoyoda K, Zehentmeier S et.al., Organization and maintenance of immunological memory by stroma niches, Eur J Immunol 2009;39:2095-2099

- [17] Caraux A, Klein B et.al., Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells, *Haematologica* 2010;95(6):1016-1020
- [18] Perez-Andres M, Paiva B et.al., Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic, *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2010;78B (Suppl.1):47-60
- [19] Carsetti R, Rosado MM et.al., Peripheral development of B cells in mouse and man, *Immunol Rev* 2004;197:179-191
- [20] Klein U, Rajewsky K et.al., Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells, *J Exp Med* 1998;188:1679-1689
- [21] Warnatz K, Schlesier M, Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency, *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2008;74B:261-271
- [22] Marie-Cardine A, Divay E et.al., Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation, *Clin Immunol.* 2008;127(1):14-25
- [23] Suryani S, Fulcher DA et.al., Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells, *Blood* 2010;115(3):519-528
- [24] Rakhmanov M, Keller B et.al., Circulating CD21^{low} B-cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B-cells, *PNAS* 2009;vol 106, no 32:13451-13456
- [25] Mei HE, Yoshida T et.al., Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses, *Blood* 2009;113:2461-2469
- [26] Conley ME, Dobbs AK et.al., Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts, *Annu Rev Immunol* 2009;27:199-227
- [27] van Zelm MC, Reisli I et.al., An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene, *N Engl J Med* 2006;354(18):1901-1912
- [28] van Zelm MC, Smet J et.al., CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency, *J Clin Invest* 2010;120(4):1265-1274
- [29] Eibel H, Salzer U et.al., Common variable immunodeficiency at the end of a prospering decade: towards novel gene defects and beyond, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:526-533
- [30] Allen RC, Armitage RJ et.al., CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome, *Science* 1993;259(5097):990-993
- [31] Mouillot G, Carmagnat M et.al., B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease, *J Clin Immunol* 2010;30:746-755
- [32] Conley ME, Notarangelo LD, Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID and ESID, *Clin Immunol* 1999;93:190-197
- [33] Carsetti R, Rosado MM et.al., The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency, *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:412-417

- [34] Tangye SG, Good KL et.al., Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells?, *J Immunol* 2007;179:13-19
- [35] Sanchez-Ramon S, Radigan L et.al., Memory B cells in common variable immunodeficiency: clinical associations and sex differences, *Clinical Immunology* 2008;128:314-321
- [36] Warnatz K, Salzer U et.al., B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans, *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:13945-13950
- [37] Warnatz K, Wehr C et.al., Expansion of CD19(hi)CD21(lo/neg) B cells in common variable Immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune cytopenia, *Immunobiology* 2002;206:502-513
- [38] Foerster C, Voelxen N et.al., B cell receptor-mediated calcium signaling is impaired in B lymphocytes of type Ia patients with common variable immunodeficiency, *J Immunol* 2010;184:7305-7313
- [39] Wehr C, Kivioja T et.al., The EUROClass trial: Defining subgroups in common variable immunodeficiency, *Blood* 2008;111:77-85
- [40] Swerdlow S, Campo E et.al., WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2008
- [41] Hummel M, Tamaru J et.al., Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle, *Blood* 1994;84:403-407
- [42] Böttcher S, Rawstron A et.al., Diagnosis and Classification of mature B-cell Malignancies, *Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010 Hoofdstuk 27* (van Dongen et.al.), *Afd. Immunologie, Erasmus MC Rotterdam*, 2010
- [43] de Tute RM, Flow Cytometry and its use in the diagnostics and management of mature lymphoid malignancies, *Histopathology* 2011;58:90-105
- [44] Deneys V, Mazzon AM et.al., Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormal lymphocytes, *Journal of Immunological Methods* 2001;253:23-36
- [45] Matos DM, Rizzatti EG et.al., Adhesion molecule profiles of B-cell non-Hodgkin's lymphomas in the leukemic phase, *Brazilian Journal of Med. and Bio. Research* 2006;39:1349-1355
- [46] Keren DF, Hanson CA, Hurtubise PE, *Flow Cytometry and Clinical Diagnosis*, ASCP Press 1994
- [47] Shapiro HM, *Practical Flow Cytometry 4th Edition*, John Wiley&Sons, 2003
- [48] Ormerod M, *Flow Cytometry Practical Approach 3rd edition*, Oxford University Press 2000
- [49] Baumgarth N, Roederer M, A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping, *Journal of Immunological Methods* 2000;243:77-97

- [50] Greer JP, Wintrobe MM, Wintrobe's clinical hematology, Lippincott Williams & Wilkins, 2008
- [51] JW Tung, Parks DR et.al, New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data, *Clinical Immunology* 2004;110:277-283
- [52]<http://www.coulterflow.com/bciflow/documents/CYTO/Variations%20in%20Tandem%20Dyes.ppt>
- [53] van Dongen JJM, Lhermite L et.al., Euroflow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes, Handout at 14th EHA Congress, Berlin 2009
- [54] Hulspas R, O’Gorman MRG et.al., Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry, *Cytometry Part B* 2009;76B:355-364
- [55] Lanza F, Healy L et.al., Structural and functional features of the CD34 antigen: An update, *J Biol Regul Homeost Agents* 2001;15:1-13
- [56] Srivastava P, Sladek TL et.al., Streptavidin-based quantitative staining of intracellular antigens for flow cytometric analysis, *Cytometry* 1992;13:711-721
- [57] Stewart CC, Stewart SJ, Titering antibodies, *Current protocols in cytometry* 4.1.1-4.1.13, John Wiley & sons, Inc. 1997
- [58] Wood B, Establishing optimum baseline PMT gains to maximize resolution on BD Biosciences digital flow cytometers, Application Note BD 2005
- [59]<http://www.spherotech.com/new%20downloadable%20notes/Rainbow%20Calibration%20Particles%202008-2009.pdf>
- [60] Köhler G, Milstein C, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 1975;256:495 - 497
- [61] Stetler-Stevenson M, Davis B, et.al., 2006 Bethesda international consensus conference on flow cytometric immunophenotyping of hematolymphoid neoplasia, *Cytometry Part B (Clinical cytometry)* 2007;72B:3
- [62] Lecrevisse Q, Costa ES et.al., Infinicyt: Multidimensional analysis of flow cytometric data, *Nieuwe ontwikkelingen in de Medische Immunologie 2010 Hoofdstuk 26* (van Dongen et.al.), Afd. Immunologie, Erasmus MC Rotterdam, 2010
- [63] Tierens AM, Holte H et.al., Low levels of monoclonal small B cells in the bone marrow of patients with diffuse large B-cell lymphoma of activated B-cell type but not of germinal center B-cell type, *Haematologica* 2010;95(8):1334-1341
- [64] BD LSR II User’s Guide, Becton, Dickinson and Company, 2006
- [65] BD Multicolor Flow Cytometry, Spectrum Guide, <http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrumguide/index.jsp>
- [66]<http://www.coulterflow.com/bciflow/documents/CYTO/CYTO%202010%20Multi-Color.ppt>
- [67]<http://www.coulterflow.com/bciflow/documents/CYTO/P346%20ISAC%20Krome%20Range%20Poster%20rev%203.pdf>

- [68] Pakningsvedlegg BD Cytometer Setup and Tracking Beads, BD Biosciences 06/2007, 23-9141-01
- [69] Technical Data Sheet, Rainbow Fluorescent Particles, 3,0-3,4 µm (mid-range FL1 fluorescence), Sphero™, BD Biosciences 2008, 556298 Rev. 8
- [70] Braylan R, Benson N et.al., Analysis of neoplastic leukocyte surface antigens in unfractionated blood, *Ann NY Acad Sci* 1986;468:160-170
- [71] Purvis N, Stelzer G, Multi-platform, multi-site instrumentation and reagent standardization, *Cytometry* 1998;33:156-165
- [72] O’Gorman MRG, McNally A et.al., A rapid whole blood lysis technique for the diagnosis of moderate or severe leukocyte adhesion deficiency (LAD), *Ann NY Acad Sci* 1993;667:427-430
- [73] Miller JN, Miller JC, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* 4th edition, Pearson Education Ltd 2000
- [74] Shankey TV, Forman M et.al., An optimized whole blood method for flow cytometric measurement of ZAP-70 protein expression in chronic lymphocytic leukemia, *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2006;70B:259-269
- [75] Stewart CC, Nicholson JKA, *Immunophenotyping*, Wiley-Liss 2000
- [76] Kelemen K, Peterson LC et.al., CD23+ mantle cell lymphoma: A clinical pathologic entity associated with superior outcome compared with CD23- disease, *Am J Clin Pathol* 2008;130:166-177
- [77] Van der Vuurst AR, Clevers H et.al., Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling, *Eur J Immunol* 1999;29:3160-3167
- [78] Kojima M, Sato E et.al., Characteristics of CD5-positive splenic marginal zone lymphoma with leukemic manifestation; clinical, flow cytometry, and histopathological findings of 11 cases, *J Clin Exp Hematopathol* 2010;50(2):107-112
- [79] Kalina T, Stuchly J et.al., Profiling of polychromatic flow cytometry data on B-cells reveals patients’ clusters in common variable immunodeficiency, *Cytometry Part A* 2009;75A:902-909
- [80] Chapel H, Lucas M et.al., Common variable immunodeficiency disorders: Division into distinct clinical phenotypes, *Blood* 2008;112:277-286
- [81] Jackson DE, Gully LM, et.al., Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) is associated with a naïve B-cell phenotype in human tonsils, *Tissue Antigens* 2000;56(2):105-116
- [82] Best CG, Kemo JD et.al., Murine B-cell subsets defined by CD23, *Methods* 1995;8(1):3-10

Vedlegg

Vedlegg 1: Informasjon om overflatemarkører

	Molekyl	Normalt uttrykk	Funksjon
CD3	Polypeptid; γ -, δ -, ϵ -kjeder	Thymocytter, T-celler, NKT-celler	Signaloverførende enhet for TCR
CD4	Glykoprotein	Th-celler, Treg-celler, monocytter/makrofager	Koreseptor for aktivering av Th-celler
CD5	Glykoprotein	T-celler, naive mantel-B-celler	Regulerer T/B-celleprolifisering
CD8	Hetero/homodimer; $\alpha\alpha$ eller $\alpha\beta$ -kjede	Cytotoksiske T-celler	Koreseptor
CD10	Metalloprotease	B/T-celleprekursorer, transisjonelle B-celler, GC-celler, nøytrofile, monocytter	Spalter betennelses-peptider
CD11c	α -kjede av integrin CR4	Noen B/T-celler, monocytter/makrofager, granulocytter	Adhesjonsmolekyl, CR- og homingreseptor
CD19	Membranprotein, enkeltkjede	Alle B-cellemodningsstadier, FDC	Del av B-cellekoreseptor
CD20	4-transmembrant glykoprotein	B-celler fra umodne B-celler	Regulerer B-celleaktivering og -differensiering
CD21	Glykoprotein, enkeltkjede	Modne B-celler, FDC	Del av B-cellekoreseptor, CR2-reseptor
CD22	Glykoprotein, enkeltkjede	Modne B-celler, intracellulært hos pro/pre-B-celler	Nedregulerer B-celleaktivering, adhesjonsmolekyl
CD23	Glykoprotein, homotrimer, lectin	Modne B-celler, monocytter	Regulerer IgE-syntese, trigger cytokinutslipp fra monocytter
CD27	Medlem av TNFR-familien	Modne thymocytter, NK-celler, aktiverte T/B-celler, hukommelses-B-celler	Kostimulator i T/B-celleaktivering
CD31	Medlem av Ig-superfamilien	Mantel-B-celler, endotelceller, monocytter, nøytrofile	Adhesjonsmolekyl i transendotelial migrering
CD38	Glykoprotein, enkeltkjede	B-celler, aktiverte T-celler, plasmaceller	NAD glykohydrolase, regulerer aktivering og proliferering
CD39	2-/3-transmembrant glykoprotein	Mantel-B-celler, ikke i GC,	Adhesjonsmolekyl

		makrofager, DC	
CD43	Sialoglykoprotein	Alle leukocytter unntatt hvilende B-celler	Danner barriere mot interaksjon med andre celletyper (sialinsyre)
CD45	Mange ulike isoformer	Alle hematologiske celler unntatt erytroide celler	Tyrosin fosfatase ansvarlig for mange cellulære prosesser som B/T-celleaktivering
CD49d	α -kjede av integrin VLA-4	T/B-celler, monocytter og mange andre	Adhesjonsmolekyl, homingreseptor
CD56	Glykoprotein, enkeltkjede	NK-celler, noen T-celler	Adhesjonsmolekyl
CD62L	L-selektin, glykoprotein, enkeltkjede	B-celler, naive T-celler, monocytter, granulocytter	Adhesjonsmolekyl, homingreseptor
CD79b	Glykopeptid, heterodimer med CD79a	B-celler	Signaloverførende del av BCR
CD81	Tetraspaninprotein	Alle hematologiske celler unntatt erytrocytter, trombocytter og nøytrofile	Del av B-cellekoreseptor
CD95	Medlem i TNFR-familien, glykoprotein, enkeltkjede	Aktiverte B/T-celler, monocytter, nøytrofile	Fas-antigen, medierer apoptose
CD103	Integrin $\alpha E\beta 7$, glykopeptid	Intraepiteliale lymfocytter	Adhesjonsmolekyl, homingreseptor
CD200	Glykoprotein, enkeltkjede	Thymocytter, B-celler, DC	Immunregulerende rolle
CXCR5	G-proteinkoblet transmembranprotein	Modne B-celler	Kjemokinreseptor, homingreseptor
HLA-DR	MHC II-molekyl, heterodimer	Profesjonelle APC, aktiverte B-celler	Presenterer prosessert antigen til Th-celler
LAIR1	Glykoprotein i Ig-superfamilien	Noen B-celler, T/NK-celler, thymocytter	Immunregulerende rolle
TCR$\gamma\delta$	Homodimer glykoprotein	Intraepiteliale T-celler	Uttrykkes av ca 5 % av normale T-celler

[1, 42, 43, 44, 81, 82]

Vedlegg 2: Informasjon for uttestede antistoffer

	Fluorokrom	Produsent	Produktnr.	Klon	Konsentrasjon µg/ml	Anbefalt kons. µg/test
CD3	APC	BD	345767	SK7	50	0,25
CD4	Pacific Blue	BD	558116	RPT-T4	200	-
CD5	PerCP-Cy5.5	BD	341109	LF17F12	3	0,06
CD8	FITC	Cytognos	CYT-8F8-50	UCH-T4	50	0,25
CD10	PE	BC	A07760	ALB1	12	0,24
CD11c	PerCP-Cy5.5	BD	646784	S-HCL-3	50	0,25
CD19	PeCy7	BD	341113	SJ25C1	25	0,125
CD19	PeCy7	BC	IM3628U	J3-119	50	0,5
CD20	Pacific Blue	eBioscience	57-0209	2H7	25	0,5
CD21	FITC	BC	IM0473U	BL13	25	0,5
CD22	PerCP-Cy5.5	BD	340981	S-HCL-1	50	0,25
CD23	FITC	Dako	F7062	MHM6	100	1,0
CD23	PE	Dako	R7108	MHM6	100	1,0
CD27	APC	BD	337169	L128	1200	6,0
CD31	FITC	BD	555445	WM59	50	1,0
CD38	APC-H7	BD	646786	HB7	100	0,5
CD38	APC-AF750	BC	A86049	LS198-4-3	12,5	0,125
CD39	PE	BD	555464	TÜ66	12,5	0,25
CD43	APC-H7	BD	646787	IG10	100	0,5
CD43	APC-AF750	BC	A89307	DFT1	100	1,0
CD45	Pacific Orange	Invitrogen	MHCD 4530	HI30	200	1,0
CD45	Krome Orange	BC	A96416	J.33	100	1,0
CD49d	APC-H7	BD	646788	9F10	50	0,25
CD56	PE	BD	345812	NCAM16.2	12	0,25
CD62L	FITC	BD	347443	SK11	625	12,5
CD79b	PerCP-Cy5.5	BD	646790	SN8	50	0,25
CD81	APC-H7	BD	646791	JS-81	100	0,5
CD95	PE	BD	555674	DX2	25	0,5
CD103	FITC	BD	550259	Ber-ACT8	6,25	0,125
CD200	APC	eBioscience	17-9200	OX104	12,5	0,25
CXCR5	APC	R&D Syst.	FAB190A	51505	10	0,1

HLA-DR	PerCP-Cy5.5	BD	552764	L243	3	0,06
IgD	PE	eBioscience	2032-09	Goat-anti-human	500	-
IgM	FITC	eBioscience	2022-09	Goat-anti-human	250	-
IgM	FITC	Dako	F0058	Rabbit-anti-human	400	4,0
IgM	APC	BD	551042	G20-127	3	0,06
Kappa	PE	Cytognos	CYT-KAPPAPE	Anti-human	0,13	0,0007
LAIR1	PE	BD	550811	DX26	25	0,5
Lambda	FITC	Cytognos	CYT-LAMBF	Anti-human	0,20	0,001
TCR$\gamma\delta$	PeCy7	BD	342899	11F2	50	0,25
TCR$\gamma\delta$	PeCy7	BC	IM99512	CDS 10EUR144	100	1,0

Liste over produsenter

Beckman Coulter, Brea CA, USA

Becton, Dickinson & co, Franklin Lakes NJ, USA

Cytognos, Salamanca, Spania

Dako, Glostrup, Danmark

eBioscience, San Diego CA, USA

Invitrogen, Carlsbad CA, USA

R & D Systems, Minneapolis MN, USA

Vedlegg 3: MFI-verdier for bakgrunnsfarging ut fra FMO-metoden

	LST	KLL	B-CLPD 3	B-CLPD 4	B-CLPD 5	CVID 1	CVID 2
FITC	173	154	100	98	66	131	130
PE	44	38	62	70	51	61	101
PerCP-Cy5.5	80	71	94	106	62	-	-
PeCy7	116	26	22	30	78	61	74
APC	69	35	48	50	56	31	24
APC-H7/ APC-AF750	51	80	48	60	-	26	24
Pacific Blue	99	61	124	102	102	81	79
Krome Orange	91	85	41	48	44	109	106

Vedlegg 4: Sammenligning 4-farge og 8-farge

Tallverdier for 4-fargemetode og 8-fargemetode målt på seks parametre i elleve prøver, i tillegg til observert og kritisk verdi fra statistiske tester. Prøver som er ekskludert som slengere i parret t-test ut fra Grubbs test er merket med rødt.

Prøve nr.	% Lymfocytter innen CD45+		% B-celler innen lymfocytter		% T-celler innen lymfocytter	
	4-farge	8-farge	4-farge	8-farge	4-farge	8-farge
1	94,9	96,2	4,6	3,7	93,0	93,9
2	17,6	16,4	14,1	13,9	72,7	73,7
3	4,2	4,1	0,7	0,7	66,2	62,3
4	4,4	4,9	7,7	14,5	75,3	59,0
5	13,9	13,7	10,9	11,0	52,2	54,0
6	21,6	20,3	4,8	4,7	54,8	54,0
7	1,7	1,3	4,2	4,7	53,5	60,5
8	21,6	21,1	10,8	9,8	77,5	77,6
9	22,8	20,5	1,5	1,6	90,7	89,4
10	9,5	7,6	12,0	12,6	81,7	80,7
11	67,7	67,1	62,2	64,1	25,4	23,8
$G_{obs} > G_{kritisk}$	-		3,1 > 2,3		2,7 > 2,3	
$t_{obs} < t_{kritisk}$	-		-0,34 < 2,26		-0,24 < 2,26	
p-verdi	-		0,74		0,81	
$Z_{obs} < Z_{kritisk}$	-0,56 < 1,96		-		-	
p-verdi	> 0,05		-		-	
Prøve nr.	% NK-celler innen lymfocytter		CD4/CD8-ratio (T-celler)		Kappa/Lambda-ratio (B-celler)	
	4-farge	8-farge	4-farge	8-farge	4-farge	8-farge
1	1,3	1,7	0,2	0,2	1,5	2,0
2	13,1	11,8	2,8	3,0	1,3	1,4
3	29,8	26,5	0,8	0,9	1,1	2,6
4	14,1	12,5	0,1	0,2	1,1	1,3
5	34,2	26,9	0,7	2,0	1,3	1,4
6	38,6	38,3	2,3	2,6	1,2	1,5
7	34,5	28,5	0,5	0,6	4,0	2,4
8	10,7	10,8	2,4	3,1	1,2	1,4

9	7,3	8,6	2,7	3,8	1,7	1,6
10	5,2	5,1	1,1	1,5	1,3	1,6
11	11,6	10,4	2,1	2,6	397,2	329,3
G_{obs} > G_{kritisk}	-		-		3,3 > 2,3	
t_{obs} < t_{kritisk}	-		-		-0,57 < 2,26	
p-verdi	-		-		0,58	
Z_{obs} < Z_{kritisk}	-0,49 < 1,96		-1,61 < 1,96		-	
p-verdi	> 0,05		> 0,05		-	