



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Bacheloroppgave

BI301305 Bacheloroppgave

Stimulering til proliferasjon av B-lymfocytter *in vitro*
med flowcytometrisk påvisning

Kandidatnummer: 10002,10010,10017

Totalt antall sider inkludert forsiden: 57

Innlevert Ålesund, 06.06.2017

Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input checked="" type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none">• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.	<input checked="" type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å <u>betrakte som fusk</u> og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. Universitets- og høgskoleloven §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen.	<input checked="" type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input checked="" type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter NTNUs studieforskrift.	<input checked="" type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input checked="" type="checkbox"/>

Publiseringsavtale

Studiepoeng: 15

Veileder: Yanran Cao og Bente Alm

Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten ([Åndsverkloven §2](#)).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage med forfatter(ne)s godkjennelse.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved NTNU i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering:

ja nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)?

ja nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over?

ja nei

Er oppgaven unntatt offentlighet?

ja nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. [Jfr. Offl. §13](#)/[Fvl. §13](#))

Dato: 06.06.2017

Forord

Denne bacheloroppgaven ble utført av tre bioingeniørstudenter ved NTNU Ålesund. Oppgaven omhandler stimulering av B-lymfocytter *in vitro* ved hjelp av ulike kombinasjoner immunologiske faktorer. Det praktiske arbeidet ble utført ved NTNU Ålesund. Første del under sterile forhold i renrom og andre del under usterile forhold i renrom og ved analysemaskinen flowcytometeret BD Accuri C6. Det ble utført 2 pre-forsøk og 1 forsøk. I forsøket ble det brukt 5 ulike kombinasjoner med immunologiske faktorer ved inkubering i 3, 5 og 7 dager.

I løpet av de 11 ukene vi hadde til rådighet, ble 3-4 uker brukt til praktisk laboratoriearbeid inkludert forberedelse. Resten ble brukt til litteratursøk og skriving av oppgaven.

Vi vil rette en stor takk til prosessveileder Ph.D Yanran Cao som har utviklet denne spennende oppgaven, delt erfaringer og bistått med praktisk veiledning. Uten henne hadde det ikke vært mulig å gjennomføre en bacheloroppgave i et så avansert forsknings-område. Vi vil rette en stor takk til Universitetslektor Bente Alm for faglig veiledning og støtte gjennom hele prosessen. Vi vil også takke Overingeniør Heidi Engstrøm som har vært behjelpelig med utstyr og praktisk assistanse. Til slutt vil vi takke hverandre for godt samarbeid gjennom en omfattende og krevende oppgave.

Sammendrag

Hensikten med oppgaven er å undersøke hvilke kombinasjoner av immunologiske faktorer som fører til proliferasjon *in vitro* ved å benytte perifert blod. Oppformering av B-lymfocytter er et viktig redskap innen mange områder som organtransplantasjon, vaksinasjon og immunterapi. Det optimale er å velge kombinasjoner med immunologiske faktorer som gir god proliferasjon på kortest mulig tid, uten å være for kostbare. Internasjonalt er det utført en rekke studier og publisert vitenskapelige artikler som omhandler stimulering av B-lymfocytter. Gode forskningsresultater ble brukt som utgangspunkt for valg av immunologiske faktorer, konsentrasjoner og kombinasjoner. Ved å benytte perifert blod ble mononukleære celler isolert og konsentrasjon av bruksløsninger ble beregnet i forhold til celler/ml. Kulturmedium ble tilsatt immunologiske faktorer; R848 i kombinasjon med IL-2, IL-21 og CD40L. Inkubasjonstiden ble satt til 3, 5 og 7 dager basert på tidligere forskning.

Proliferasjon av B-lymfocytter ble påvist ved hjelp av flowcytometri. Ved å benytte antistoff mot CD19 viste resultatene at populasjonen av B-lymfocytter fordelte seg i tre grupper; CD19^{lav}, CD19^{intermediær} og CD19^{høy}. Prosentvis proliferasjon ble regnet ut med utgangspunkt i negativ kontroll (ustimulerte B-lymfocytter). Resultatet viste at proliferasjonen skjedde nesten utelukkende i CD19^{lav} gruppen. Alle kombinasjonene viste gode resultat ved inkubasjon i 3-5 dager. Den beste proliferasjonen viste kombinasjonen R848+IL-2 med 76.2% proliferasjon etter stimulering i 5 dager. Resultatene stemmer overens med tidligere forskningsresultat. Sett i lys av tidligere forskning som omhandler B-lymfocytter, de immunologiske faktorene og reaksjonsmønstre, er det mulig at CD19^{lav} gruppen som har vist proliferasjon er naive B-lymfocytter og kortvarige B-hukommelsesceller av klassen MZ B-lymfocytter som har proliferert og differensiert til plasmablaster.

Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse	6
Figurer	8
Tabeller.....	8
Begreper	9
1. Innledning	1
1.1 Betydning av proliferasjon og kvantifisering av B-lymfocytter	1
1.2 Prosessen frem til problemstilling	2
1.3 Problemstilling.....	3
1.4 Bakgrunn for valg av oppgaven.....	3
1.5 Oppbygning av oppgaven.....	3
2. Teori.....	4
2.1 Immunologiske faktorer	4
2.1.1 Interleukiner; IL-2 og IL-21	4
2.1.2 Differensieringsantigen 40 Ligand (CD40L)	6
2.1.3 Toll lignende reseptorer og R848.....	6
2.2 Differensieringsantigen (CD)	8
2.3 B-lymfocytter.....	10
2.3.1 B-lymfocytter i perifert blod	10
2.3.2 Ulike klasser B-lymfocytter	10
2.3.3 Aktivering av B-lymfocytter in vivo	11
2.4 Kultivering av celler in vitro	14
2.5 Flowcytometri.....	15
3. Materialer og metoder	17
3.1 Materialer	17
3.1.1 Søknad til REK/samtykkeskjema.....	17
3.1.2 Prøvemateriale.....	17
3.2 Preforsøk	17
3.3 Forsøk.....	18
3.3.1 Henting av prøvemateriale	18
3.3.2 Isolere mononukleære celler	18
3.3.3 Lysering av erytrocytter	19
3.3.4 Telling av celler.....	19
3.3.5 CFSE (karboksylfluorescein succinimidylester).....	19
3.3.6 Fortynning av celleduspensjon til kultivering	20
3.3.7 Tilsetting av kulturmedium og immunologiske faktorer.....	20
3.3.8 Høsting av lymfocytter fra cellekultur	21
3.3.9 Tilsetting av monoklonale antistoff bundet til fluorokrom	21
3.3.10 Analysing av prøver på BD Accuri C6	22
4. Resultater	24
4.1 B-lymfocytter	24
4.2 Proliferasjon av B-lymfocytter	25
4.3 Sammenligning av proliferasjonsresultater	26
4.4 Bekreftelse av CD19 ^{lav} proliferasjon.....	27
5. Diskusjon.....	29
5.1 Proliferasjon av B-lymfocytter.....	30
5.2 Sammenligning av proliferasjonsresultater	31
5.3 Bekreftelse av CD19 ^{lav} proliferasjon.....	32

5.4 Styrker og svakheter med forsøket.....	32
6. Konklusjon.....	33
7. Vedlegg.....	34
8. Referanseliste.....	46

Figurer

Figur 1. Betydningen av IL-2 og IL-21 ved proliferasjon og differensiering av B-lymfocytter.

Figur 2. Rollene til TLR ved prolifisering og differensiering av B-lymfocytter.

Figur 3. Skjematisk fremstilling av utviklingen av en hematopoietisk stamcelle

Figur 4. Aktivering av B-celler *in vivo*.

Figur 5. Skjematisk fremstilling av hovedprinsippet for flowcytometri

Figur 6. Eksempel på hvordan nærliggende bølgelengder til fluorokromer kan gi spektral interferens

Figur 7. Skjematisk fremstilling av kulturbrønner tilsatt immunologiske faktorer.

Figur 8. Avgrensing av CD19⁺ B-lymfocytter fra punktplott.

Figur 9. Proliferasjonsresultater for (a) negativ kontroll, (b) CD19^{lav}, (c) CD19^{intermediær}, (d) CD19^{høy}

Figur 10. Populasjonen CD19^{lav} i forhold til CFSE konsentrasjon.

Figur 11. Fordelingen mellom celler som uttrykker CD4 og CD45.

Figur 12. Prolifererte T-lymfocytter.

Tabeller

Tabell 1. Tabellen viser hvilke celler som uttrykker hvilke antigen

Tabell 2. Konsentrasjonen til de ulike immunologiske faktorene.

Tabell 3. Konsentrasjon av cellemarkører.

Tabell 4. Cellemarkører med tilhørende fluorokrom og detektor.

Tabell 5. Prosentandel prolifererte B-lymfocytter CD19^{lav} ved de ulike kombinasjonene av immunologiske faktorer.

Begreper

B-cellereseptor (BCR): Antigenreseptor til B-lymfocyt bestående av et immunglobulin.

B-hukommelsescelle: B-lymfocyt som har vært aktivert av et antigen.

Kimsenter (germinalt senter, GC): Områder i sekundært lymfoid vev der B-lymfocytter oppformerer, differensierer og muterer sine antistoff-gener (gjennom somatisk hypermutasjon) og foretar klasseskifte ved en antigen-respons.

Kjemokiner: Cytokiner som aktiverer og styrer rekrutteringen av leukocytter til betennelsesområder.

Klasseskifte: Endring av uttrykking av immunglobulin i B-cellereseptor til B-lymfocytter. eks. fra IgM til IgG.

Marginal sone (MZ): Området der lymfocytter, makrofager og dendrittiske celler går inn i milten. MZ finnes i grensesnittet mellom rød og hvit pulpa i milten.

Moden B-lymfocyt: B-lymfocyt som uttrykker IgM og IgD og er i stand til å respondere på et antigen. De utgjør det siste modningstrinnet i beinmargen og oppholder seg i sekundært lymfoid vev.

Naiv B-lymfocyt: Moden lymfocyt som har forlatt beinmargen men ikke vært i kontakt med antigenet den har spesifisitet for.

Nukleær translokasjon: En cellulær prosess der aktiverte protein i cytoplasma blir transportert inn i cellekjernen som del av en signal-overføringsvei for å endre cellefunksjonen (som regel genuttrykk) som respons på et signal eller tilstand.

Plasmablast: Kortlivet plasmacelle som produserer IgM ved primærrespons på et antigen.

Plasmacelle: Differensiert, antistoffproduserende B-lymfocyt. Plasmacelle uttrykker ikke immunglobulin på membranen.

Somatisk hypermutasjon (SHM): Høy mutasjonsgrad. Hos aktiverte og proliferende B-lymfocytter er mutasjonsgraden i genlokus som koder for den variable delen av Ig-molekylet omtrent en million ganger høyere enn i andre deler av arvematerialet. SHM danner grunnlag for affinitetsmodning av antistoffene.

1. Innledning

Hensikten med oppgaven er et ønske om å bidra til utvikling av en metode for best mulig stimulering til proliferasjon av B-lymfocytter *in vitro*. Som materiale benyttes perifert blod. Oppformering av B-lymfocytene gir grunnlag for videre forskning.

1.1 Betydning av proliferasjon og kvantifisering av B-lymfocytter

B-lymfocytene utøver et multifunksjonelt immunforsvar som antistoff-produsenter, antigenpresenterende celler (APC), effektorceller og regulatoriske celler. B-lymfocyttenes mange egenskaper innen immunforsvaret gjør den til et viktig redskap innen mange områder, som organtransplantasjon, vaksinasjon og immunterapi.

Ved organtransplantasjoner kan plasmaceller produsere HLA-antistoff mot et donororgan. Det er derfor viktig å oppdage og kvantifisere B-hukommelsesceller som kan differensiere til slike plasmaceller. En slik kvantifisering vil kunne bidra til å definere den immunologiske risikoen for pasienten etter en transplantasjon ¹.

Ved utvikling av nye vaksiner er det viktig å kvantifisere responsen til B-hukommelsesceller for å kunne vurdere effektiviteten. Vanligvis er det antistoffproduksjonen som vurderes, men den virkelige beskyttelsen fra vaksiner kan være framkalt av sirkulerende antistoff i kombinasjon med andre faktorer, som B- og T-hukommelsesceller. B-lymfocytter kan dessuten spille en sentral rolle i langsiktig vedlikehold av antistoff-nivået i fravær av patogene organismer, ved for eks. å fornye lageret av langlivede plasmaceller. Det er avgjørende å forstå mekanismene bak livslang antistoffproduksjon for å kunne lage bedre vaksiner i fremtiden. Det er viktig å vite om vaksinene også framkaller langsiktige stabile nivåer av B-hukommelsesceller og hvilken rolle cellene spiller ².

En av de mange egenskapene til B-lymfocytene er å opptre som tumorinfiltrerende immunceller. De kan både fremme tumorvekst ved å undertrykke antitumor immunrespons

og produsere tumor-hemmende cytokiner samt styrke tumordpende T-cellerespons. Det har vist seg at for en hel rekke krefttyper samsvarer høy tetthet av infiltrerende B-lymfocytter med bedre prognose for pasienten. Mekanismene bak akkumuleringen av B-lymfocytter i tumor-området og sammenhengen med høyere overlevelse er ikke fullt ut forstått. En forklaring er at tumorinfiltrerende B-lymfocytter uttrykker antigenpresenterende molekyler og opptre som profesjonelle APC for å dirigere T-lymfocytter til å utøve antitumor immunitet. En annen grunn kan være at B-lymfocytene differensieres til plasmaceller med en potent evne til å produsere tumorspesifikke antistoff³.

Proliferasjon og differensiering av B-lymfocytter skjer ved at reseptorene på B-lymfocytens celle- eller endosom-membran mottar signal og binder seg til ligander som setter i gang en kaskade av signaliseringer og gen-transkripsjoner inne i B-lymfocytten. Disse signalmolekylene og ligandene kan defineres som immunologiske faktorer med ulike roller i B-lymfocyttenes aktivering. Det ideelle er å tilsette immunologiske faktorer som gir best stimulering til proliferasjon av B-lymfocytter *in vitro*, der en får gode resultat innen kortest mulig tid med lavest mulig kostnad.

1.2 Prosessen frem til problemstilling

Vår praktiske veileder har publisert en vitenskapelig artikkel som omhandler blant annet stimulering av B-lymfocytter. Det var derfor nærliggende å ta utgangspunkt i hennes forskning. Resultatet i studien fra 2010 viste at en kombinasjon av CpG (ODN), CD40L og IL-21 ga best stimulering til proliferasjon og differensiering av B-lymfocytter *in vitro*⁴. Vi ønsket imidlertid å finne vår egen kombinasjon av immunologiske faktorer. En studie fra 2013 viste at en kombinasjon av R848 og IL-2 ga den beste stimuleringen hos B-lymfocytter^{5 6}.

Forsøket måtte tilpasses økonomiske og tidsmessige rammer. Vi begrenset oss til faktorer og konsentrasjoner som ga optimale resultat i studier som ble beskrevet i disse artiklene. Vi tok utgangspunkt i tidligere forskning og i de to nevnte forskningsartiklene spesielt for å forme ei passende problemstilling.

1.3 Problemstilling

Hvilken kombinasjon av immunologiske faktorer gir best stimulering til proliferasjon av B-lymfocytter in vitro ved å benytte R848 i kombinasjon med IL-2, IL-21 og CD40L? Hvilke undergrupper av de proliferte B-lymfocytene kan ha blitt stimulert, sett i lys av tidligere forskning?

Kombinasjoner ble valgt på bakgrunn av hvilke cellulære aktiverings mekanismer som skjer ved proliferasjon av B-lymfocytene. Vi valgte å sammenligne R848 i kombinasjon med IL-2 eller IL-21, med eller uten CD40L. Så langt vi har kunnskap om, er det ikke gjennomført studier med akkurat disse kombinasjonene tidligere.

1.4 Bakgrunn for valg av oppgaven

Vi valgte oppgaven fordi den virket spennende og omhandlet emne som vi er interessert i. Vi fikk muligheten til å bruke erfaringer og kunnskaper vi har tilegnet oss gjennom bioingeniørstudiet. Gjennom oppgaven har vi benyttet vår kunnskap innen fagfelt som instrumentell analyse, immunologi, cellebiologi, generell kjemi og praktisk laboratoriearbeid. Dette grunnlaget har gjort det mulig å tilegne oss nye teknikker og metoder, noe som har vært svært lærerikt og veldig spennende.

1.5 Oppbygning av oppgaven

Bacheloroppgavens oppbygging følger IMRoD-modellen, som står for “Innledning - Material og metode - Resultat - Diskusjon”. Referanser følger Vancouver modellen.

2. Teori

B-lymfocytter er en av flere celler som inngår i immunforsvaret. B-lymfocytter er en mangfoldig gruppe med ulike og kompliserte aktiveringsveier. Aktivering av disse skjer ved hjelp av immunologiske faktorer som interleukiner og ligander til B-cellerreseptor. For å undersøke B-lymfocytter er det nødvendig å dyrke cellene *in vitro*, under kontrollerte forhold. Identifisering er mulig fordi alle celler uttrykker forskjellige differensieringsantigen. Dette muliggjør identifisering av ulike populasjoner av celler herunder B-lymfocytter ved hjelp av flowcytometri.

2.1 Immunologiske faktorer

Ved aktivering av B-lymfocytter *in vivo* spiller interleukiner samt ligander til differensieringsantigen og toll-lignende reseptorer en viktig rolle. Disse immunologiske faktorene har ulike egenskaper og aktiveringsveier.

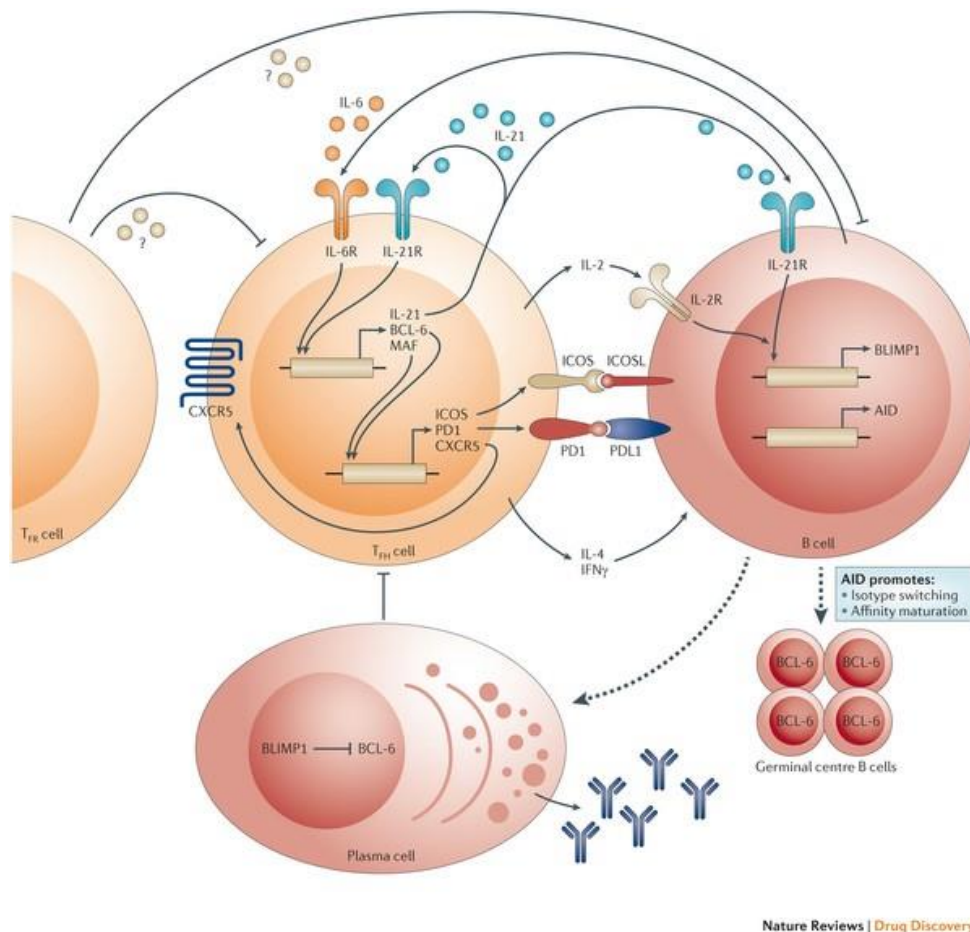
2.1.1 Interleukiner; IL-2 og IL-21

Interleukiner (IL) er en gruppe cytokiner (signalmolekyl) hovedsakelig utskilt fra CD3⁺ - og CD4⁺ T-lymfocytter. De er små protein som binder seg til membranreseptorer på mottakercellen. IL danner viktige signalveier for et stort spekter av funksjoner, herunder proliferasjon og differensiering og igangsetting av immunrespons. Hvilke IL som blir produsert er avhengig av signalene T-lymfocytten mottar fra kjemokiner og cytokiner, antigenet og antigen-presenterende celle. Disse stimuli påvirker CD4⁺T-lymfocytten til å produsere IL og differensiere til undergrupper av T-hjelperceller (T_h1, T_h2, T_h9, T_h17, T_h22 og Tfh). Disse undergruppene kan fremme ulike typer inflammasjonsrespons.

IL er gruppert i familier ut fra egenskaper og funksjoner. Gamma-kjede (γ -c) familien, som består av IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 og IL-21 er gruppert på grunnlag av den felles reseptoren γ -c. Funksjonen til disse er hovedsakelig vekst, proliferasjon og differensiering⁷.

IL i denne familien signaliserer via fellesreseptoren γ -c i kombinasjon med enten α - eller β -kjede. Bindingen mellom IL og reseptor stabiliseres og dette aktiverer Janus kinase 1 (JAK1) og JAK3. Aktivering av JAK muliggjør fosforylering av signaloverførings- og transkripsjonsaktivator-proteinene (STAT). STAT-proteinene lager dimere, går inn i cellekjernen og aktiverer transkripsjon, enten av spesifikke gener eller via mitogenaktiverede protein kinaser (MAPK) og fosfoinositid 3-kinase (PI3K). Nøkkelfunksjonen til IL i forhold til proliferasjon og differensiering av B-lymfocytter ligger i deres evne til å endre genuttrykket til transkripsjonsfaktorer ⁸.

Figur 1 viser betydningen av IL-2 for aktiveringen, proliferasjonen og differensieringen av B-lymfocytter. IL-2 blir hovedsakelig produsert av CD4⁺- og CD8⁺T-lymfocytter og signaliserer til CD4⁺- og CD8⁺T-lymfocytter, NK-celler og B-lymfocytter. IL-2 vil aktivere IL-2 reseptor (IL-2R) hos B-lymfocyttene. Dette stimulerer til proliferasjon. IL-2 kan også fungere som vekstfaktor for B-lymfocytter og stimulere transkripsjonsfaktoren B-lymfocytt-indusert modningsprotein 1 (BLIMP1). BLIMP1 vil fremme differensiering til plasmaceller og antistoff-produksjon ⁷.



Figur 1. Betydningen av IL-2 og IL-21 ved proliferasjon og differensiering av B-lymfocytter ⁹.

Figur 1 viser betydningen av IL-21 ved aktivering, proliferering og differensiering av B-lymfocytter. IL-21 fra T-hjelperceller type 17 (T_h17) kan stimulere differensiering av CD4⁺ T-lymfocytterne til follikulære T-hjelperceller (Tfh). Tfh vil sammen med IL-21 føre til oppregulering av B-celle lymfom (Bcl-6) som iverksetter gentranskripsjoner i Tfh. Bcl-6 kan uttrykkes både i Tfh og B-lymfocytter. I Tfh vil uttrykking av Bcl-6 stimulerer dannelsen av kimsenter. Differensieringsantigen på cellemembranen til T-lymfocytten vil aktiveres og binde seg til ligander på B-lymfocytten. (ICOS og PD1). Transkripsjonsprogrammet styrt av Bcl-6 vil også oppregulere utskillelsen av cytokiner fra Tfh, herunder ytterligere IL-21. IL-21 produsert av Tfh vil sammen med andre signal påvirke naive B-lymfocytter mot differensiering til enten plasmaceller eller B-hukommelsesceller. Balansen mellom BLIMP1 og Bcl-6, begge aktivert av IL-21, bestemmer differensieringen til enten plasmaceller eller hukommelsesceller i kimsenter ⁹.

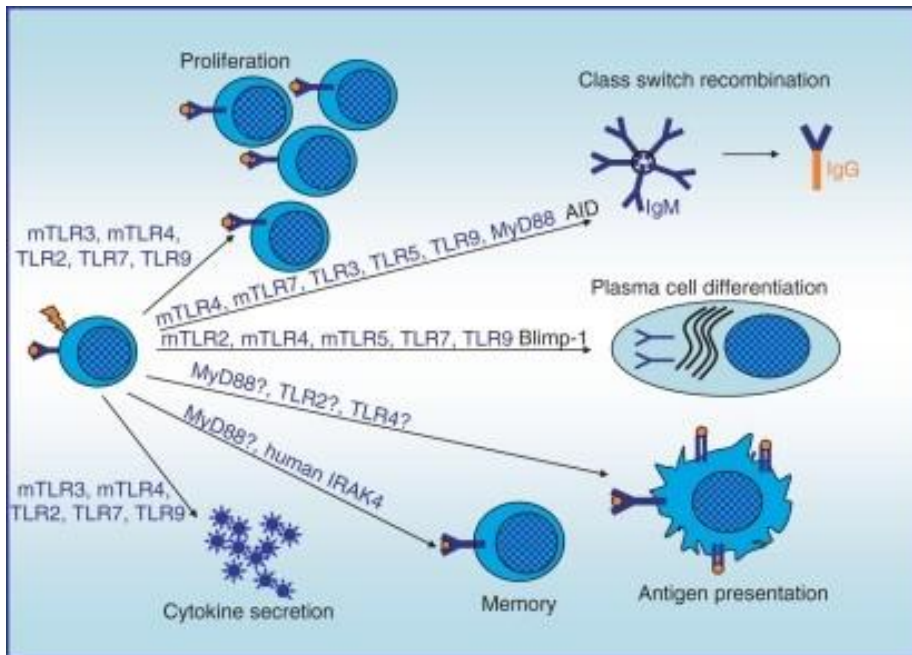
2.1.2 Differensieringsantigen 40 Ligand (CD40L)

CD40L er et protein hovedsakelig uttrykt på cellemembranen til aktiverte T-lymfocytter, men også andre cellepopulasjoner. Binding til CD40 på B-lymfocyttenes cellemembran vil utløse en hel rekke aktiviteter; proliferasjon, fremme dannelsen av kimsenter, Ig-klasseskifte, somatisk hypermutasjon (høy mutasjonsgrad, SHM) og dermed forbedring av B-lymfocyttenes affiniteten for antigenet. CD40L/CD40 interaksjonen vil fremme dannelsen av langlivede plasmaceller og B-hukommelsesceller ¹⁰.

2.1.3 Toll lignende reseptorer og R848

Toll lignende reseptorer (TLR) er transmembrane glykoprotein som befinner seg i celle- eller endosom-membranen til en rekke humane celletyper ¹¹. De er mønstergjenkjennende reseptorer og kan kjenne igjen godt beskyttede strukturelle mønster, kalt patogen-assosierte mikrobielle mønster (PAMP), utelukkende uttrykt av mikrobielle patogener. PAMP omfatter ulike bakterielle cellevegg-komponenter som lipopolysakkarid (LPS), peptidoglykan og lipopeptider, samt flageller, bakterielt DNA og viralt RNA. TLR kan også kjenne igjen skadelige molekyler fra nekrotiske celler ¹².

Alle signaliseringsveiene for TLR kulminerer i aktivering av transkripsjonsfaktor-kappaB (NF- κ B) som kontrollerer genuttrykk for en hel rekke inflammatoriske cytokiner. Aktivering av TLR i B-lymfocytter vil føre til proliferasjon, cytokin-utskillelse, differensiering og til sist utskillelse av immunoglobulin (Ig). Figur 2 viser hovedfunksjonene til TLR i B-lymfocytter ¹³.



Figur 2: Rollene til TLR ved prolifisering og differensiering av B-lymfocytter. mTLR gjelder kun B-lymfocytter i museslekten, hTLR gjelder humane B-lymfocytter, andre TLR gjelder for begge ¹³.

TLR7 og TLR9 finnes i endosom-membranen på humane B-lymfocytter og aktivering av disse reseptorene fører til proliferasjon og differensiering av B-lymfocytterne, vist i figur 2. Naive humane B-lymfocytter uttrykker få TLR, mens aktiverte og B-hukommelsesceller uttrykker mange av både TLR7 og TLR9 ¹⁴.

TLR9 gjenkjenner bestemte umetylerte CpG mønstre som finnes i mikrobielt DNA, og aktiverer immunrespons. Den immunstimulerende effekten kan etterlignes ved å bruke syntetiske oligodinukleotider som inneholder disse CpG mønstrene (CpG ODN).

TLR7 gjenkjenner nukleotider og blir aktivert av enkelttrådet RNA (ssRNA). TLR7 spiller en sentral rolle ved virusinfeksjoner. Aktivering av TLR7 vil aktivere NF-kappaB, cytokinutskillelse og immunrespons ¹².

R848 er et syntetisk framstilt guanosin derivat som har en potent evne til å iverksette immunrespons. R848 aktiverer signalveien til TLR7 hovedsakelig hos B-lymfocytter, dendrittiske celler og makrofager. Dette fremkaller nukleær translokasjon av transkripsjonsaktivatoren NF-κB samt aktivering av andre transkripsjonsfaktorer. Nukleær translokasjon er en cellulær prosess der aktiverte protein i cytoplasma blir transportert inn i cellekjernen som del av en signal-overføringsvei for å endre cellefunksjonen (som regel genuttrykk) som respons på et signal eller tilstand. Dette kan føre til økning i mRNA nivået etterfulgt av produksjon av ulike cytokiner og dermed økt immunrespons ¹⁵.

2.2 Differensieringsantigen (CD)

Leukocytter og andre celler innen immunsystemet uttrykker ulike antigen på sine cellemembraner. Disse antigenene kalles differensieringsantigen, forkortet CD (Cluster of Differentiation Antigen). CD muliggjør identifisering og isolering av leukocyttopulasjoner, undergrupper og differensiering-stadier. Identifiseringen skjer ved hjelp av monoklonale antistoff (CD-markører), en metode som har vist seg å ha stor betydning innen biomedisinsk forskning, diagnostisering og immunterapi ¹⁶.

CD nomenklaturen er godkjent av International Union of Immunological Societies og Verdens Helseorganisasjon. Mer enn 400 molekyl er hittil gitt forstavelsen CD og et tall. Monoklonale antistoff som gjenkjenner dette molekylet blir gitt samme betegnelse. For å skille antigen og antistoff, blir ofte forstavelsen "anti" gitt antistoffet.

For å beskrive undergrupper av leukocytter og lymfocytter benytter CD nomenklaturen forhøyet "+" og "-" tegn. Et "+" lagt til CD-molekylet viser at celle-populasjonen uttrykker dette molekylet på cellemembranen. Et "-" viser fravær av molekylet. Dersom et spesielt CD molekyl blir uttrykt ved ulike nivåer av ulike undergrupper, benyttes betegnelse "lav", "intermediær" og "høy", for eks. CD19^{lav} ¹⁶.

B-lymfocytter kan identifiseres ved uttrykking av CD19, CD20 eller CD22. Vanligvis benyttes CD19. Molekylet uttrykkes kun av B-lymfocytter og finnes på alle undergrupper i perifert blod. Sirkulerende plasmaceller vil uttrykke CD19^{lav} ¹⁷. Disse blir kalt plasmablaster fordi de ikke uttrykker CD138. CD138 er et kjennetegn på langlivede plasmaceller i beinmargen ¹⁸. For å differensiere undergrupper av B-lymfocytter, må en identifisere andre differensieringsantigen i tillegg til CD 19. B-hukommelsesceller er CD19⁺CD27⁺, naive B-lymfocytter CD19⁺CD27⁻, plasmablaster CD19^{lav} CD38⁺ og langlivede plasmaceller CD19⁻CD138⁺ ¹⁷.

Antigenet CD45 uttrykkes av B- og T-lymfocytter, NK-celler, makrofager, monocytter og granulocytter. CD45 er en viktig markør innenfor flowcytometri. Sammen med SSC vil CD45 i et enkelt punktplot kunne skille de viktigste leukocyttopulasjonene fra hverandre. De adskilte populasjonene kan identifiseres ut fra beliggenhet i plottet ¹⁹.

CD4 antigen uttrykkes på om lag 2/3 av sirkulerende T-lymfocytter. CD4 definerer sin undergruppe, subpopulasjon av T-lymfocytter. Etter stimulering vil CD4⁺ T-lymfocytterne utvikle seg til effektorceller, kalt hjelpeceller (TH). CD4 antigenet uttrykkes også på makrofager og monocytter ²⁰.

Tabell 1: Tabellen viser hvilke celler som uttrykker hvilke antigen

Antistoff	Antigen	Hvilke celler antigenet uttrykkes på
Anti-CD19	CD19	B-hukommelse celler, naive B-lymfocytter, sirkulerende plasmaceller (plasmablaster)
Anti-CD45	CD45	B-lymfocytter, T-lymfocytter, NK-celler, makrofager, monocytter og granulocytter
Anti-CD4	CD4	CD4 ⁺ T-lymfocytter, monocytter og makrofager

2.3 B-lymfocytter

Hematopoietiske stamceller er opphavet til B-lymfocytter. Utviklingen skjer gjennom en rekke modningstrinn i beinmargen før umodne celler slippes ut i sirkulasjon og påfølgende differensiering til modne B-celler i milten. Modne B-lymfocytter med antigenbindende IgM og IgD på cellemembranen kalles naive B-lymfocytter og slippes ut i perifert blod ²¹.

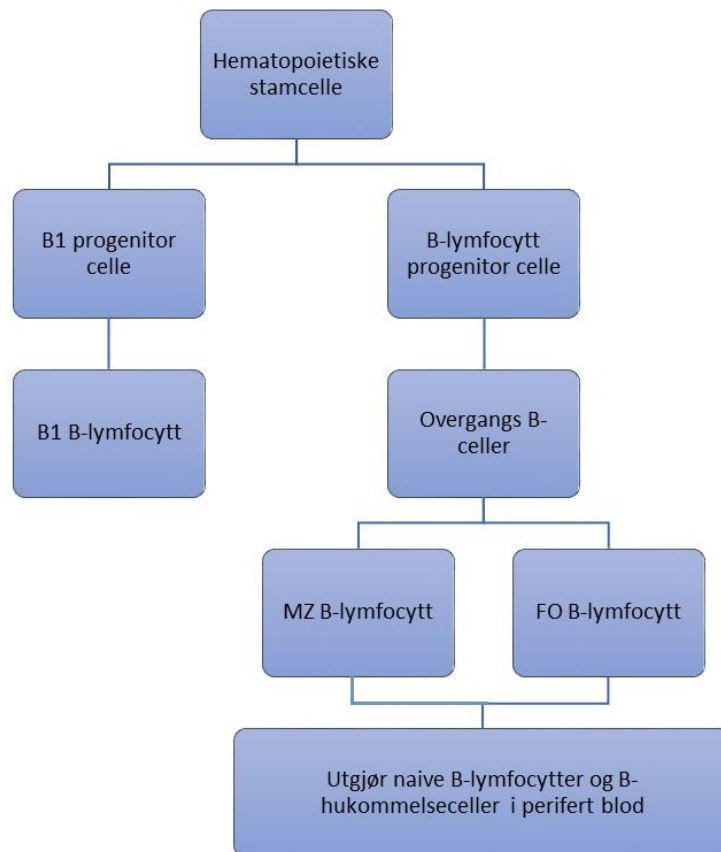
2.3.1 B-lymfocytter i perifert blod

I humant perifert blod utgjør naive B-lymfocytter omtrent 60-70% av de samlede B-lymfocytterne. Genene til immunoglobulinenes (Ig) variable regionen har ikke gjennomgått somatisk hypermutasjon (SHM) og de uttrykker samtidig IgM og IgD. B-hukommelsescellene utgjør 20-30%, de har gjennomgått SHM og halvparten av har også gjennomført Ig klasseskifte og uttrykker IgG eller IgA. Umodne B-lymfocytter utgjør omtrent 5% og plasmaceller 2% ²².

2.3.2 Ulike klasser B-lymfocytter

Det finnes tre klasser humane B-lymfocytter gruppert ut fra utvikling og lokalisering, B1, MZ og FO B-lymfocytter. I perifert blod kan disse opptre både som naive B-lymfocytter og B-hukommelsesceller. De fleste B1 B-lymfocytter utvikler seg fra hematopoietiske stamceller via progenitor B1 B-lymfocytter i fosterets lever. De forblir en selvfornyende populasjon utover neonatalperioden, med lite innvirkning fra beinmargen. De to andre klassene B-lymfocytter utvikler seg fra stamcellene til felles progenitorceller i beinmargen og videre til en type overgangs-B-celler i milten. Her deler overgangs-cellene seg i to populasjoner, MZ- og FO B-lymfocytter. Differensieringen skjer ved hjelp av signalisering fra B-cellerreseptor (BCR). Sterk signalisering aktiverer transkripsjonsfaktoren *bruton tyrosin kinase* som induserer modning til FO B-lymfocytter. Svakere signalisering aktiverer transkripsjonsfaktoren *NOTCH2* som induserer modning til MZ B-lymfocytter. Begge klassene har spesielle og overlappende funksjoner i gjenkjennelse av antigen via T-

celle –avhengige og –uavhengige signalveier og differensiering til plasmaceller som produserer kortvarig IgM- eller langvarig IgG antistoff. Både MZ og FO B-lymfocytter finnes i perifert blod. FO B-lymfocytterne er den mest tallrike, hovedsakelig ansvarlige for langvarig høy-affinitets IgG-antistoff og avgjørende for humoral immunitet som følge av vaksinasjon eller infeksjon ²³.



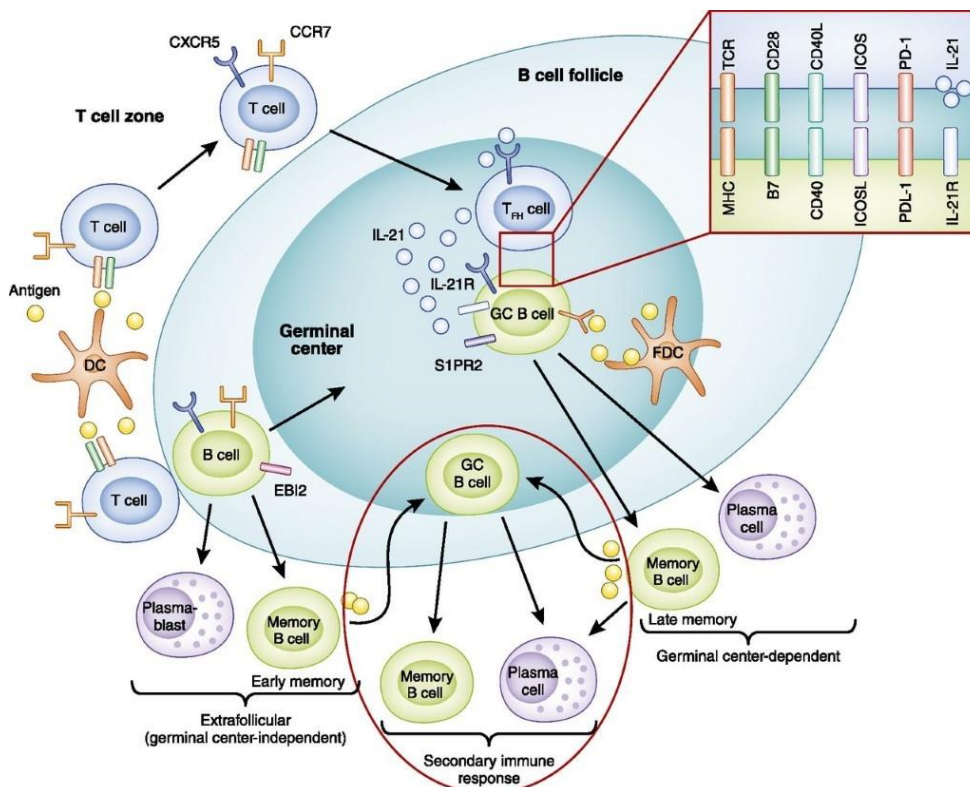
Figur 3. Skjematisk fremstilling av utviklingen av en hematopoietisk stamcelle til ulike klasser B-lymfocytter.

2.3.3 Aktivering av B-lymfocytter *in vivo*

Figur 4 viser aktiveringen av B-lymfocytter *in vivo*. Naive B-celler aktiveres gjennom samspill mellom B-celle reseptorer (BCR), Toll lignende reseptorer (TLR), cytokiner og andre hjelpesignal hovedsakelig fra CD4⁺ T-hjelperceller samt dendrittiske celler som respons på et fremmed antigen. Antigen-gjenkjennende CD4⁺ T-celler som finns i nærheten av folliklene i sekundært lymfoid vev blir også kalt follikulære T-hjelperceller (Tfh). Reseptoren CXCR5 gjør lymfocytten i stand til å migrere til de follikulære B-cellesonene ²³.

Responsen til B-cellene avhenger av type antigen; protein, karbohydrat eller fosfo-/glykolipid. Protein antigen blir hovedsakelig gjenkjent av B-cellereseptorer (BCR) på FO B-lymfocytterne. Antigenet opptas og leveres til endosomer i cellens cytoplasma. Her blir antigenet degradert til peptider som bindes til HLA-klasse II molekyl og presentert på overflaten til B-lymfocytten. Etter antigen-gjenkjennelse oppregulerer B-lymfocytten reseptorer og migrerer dypere inn i lymfeknuten. I randsonen rundt follikkelen kan den finne antigenspesifikke Tfh-lymfocytter som gjenkjenner dette HLA-klasse II peptidkomplekset og etablerer nær kontakt med B-lymfocytten²³.

Tfh stimulerer B-lymfocytten gjennom cytokiner herunder IL-2, og ved at CD40L bindes til B-lymfocytens CD40. Avhengig av kvaliteten og kvantiteten av de mottatte signal, vil B-lymfocytten enten dele seg utenfor follikkelen og differensiere til kortlivede plasmaceller, (plasmablaster) som utskiller IgM (primærrespons), eller vende tilbake til follikkelen.



Figur 4. Aktivering av B-celler *in vivo*²³.

Aktiverte B-lymfocytter med oppregulert transkripsjonsfaktor B-celle lymfom (Bcl-6) returnerer til follikkelen. Her vil FO B-lymfocytterne danne kimsenter (GC, germinalt senter) ved hjelp av sphingosin-1-fosfat reseptor 2 (S1PR2) og Tfh-lymfocytter. Bcl-6 vil aktivere B-lymfocytterne til rask proliferasjon i kimsentrene og legge til rette for at de tolererer fysiske brudd i DNA som er nødvendige for Ig-klasseskifte ²⁴.

B-lymfocytter i kimsentrene gjennomgår proliferasjon og SHM. SHM fører til at B-lymfocytterne framstår som celler med forbedret affinitet for antigen. De er i en tilstand med aktivert apoptose og konkurrerer om overlevelsessignal fra follikulære dendrittiske celler (FDC) og Tfh-lymfocytter. FDC er spesialiserte celler som har kapasitet til å oppta og uttrykke et antigen på cellemembranen i mer enn et år ²⁵.

B-lymfocytter med best affinitet for antigenet, tar det opp ved hjelp av BCR.

Antigenet blir prosessert og presentert for Tfh-lymfocytten. Interaksjonen mellom B-lymfocytt og Tfh skjer ved hjelp av ligander, interleukiner og reseptorer; herunder CD40/CD40L og IL-21 reseptor (IL-21R)/IL-21. Dette vil legge til rette for immunglobulinklasseskifte og B-lymfocytten kan enten vandre til beinmargen og bli langlivet plasmacelle eller hukommelsescelle klar til å reagere på en re-infeksjon, vist i figur 4. Plasmaceller utskiller 100 million antistoffmolekyl pr. sekund og kan overleve flere år i beinmargen. På denne måten oppnås langvarig humoral immunitet.

Transkripsjonsfaktoren B-lymfocytt-indusert modningsprotein 1 (BLIMP1) er sentral for differensieringen til plasmaceller, både utenfor og innenfor follikkelen. BLIMP1 uttrykkes på B-lymfocytten etter omfattende samhandling mellom Tfh og B-lymfocytten ²³.

Karbohydrat- og fosfo-/glykolipid antigen er dårlige T-lymfocytt aktivatorer. B1- og MZ B-lymfocytter som aktiveres av slike antigen får vanligvis ingen hjelp fra T-lymfocytter. Både B1 og MZ B-lymfocytter uttrykker imidlertid høye stabile nivåer av TLR, noe som gjør at de kan integrere signal fra TLR ligander som (LPS, Cytosin-fosfat-Guanin DNA (CpG) og ds eller ss RNA). B1- og MZ B-lymfocytter vil gjenkjenne disse ligandene fra patogene eller skadde celler som antigen. De vil deretter raskt differensiere til kortlivede B-hukommelsesceller og plasmaceller. Plasmacellene vil produsere IgM antistoff ²³.

MZ B-lymfocytterne vil også kunne samhandle med andre hjelperceller, som naturlige T-dreperceller (NKT), nøytrofile og dendrittiske celler. Disse vil skille ut en rekke cytokiner, blant disse IL-21 samt ko-stimulerende signal CD40L i områdene utenfor folliklene.

Denne samhandlingen tilrettelegger for begrenset SHM og Ig-klasseskifte. MZ B-lymfocytene kan også aktiveres av T-celle-avhengige proteinantigen, foreta klasseskifte, generere høy-affinitets antistoff og danne kimsenter i miltens follikler. MZ B-lymfocytene representerer derfor en mangfoldig populasjon som kan aktiveres både via T-celle-avhengige og –uavhengige signalveier.²³

2.4 Kultivering av celler *in vitro*

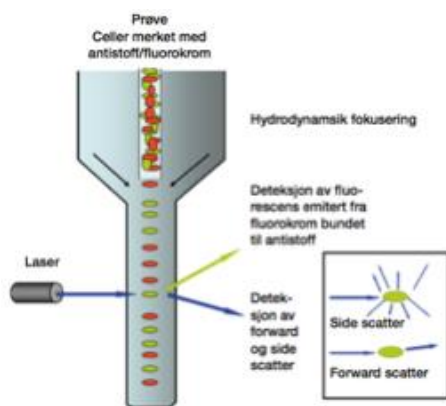
Celler som isoleres og oppformerer under kontrollerte forhold, er et viktig redskap for å kunne utføre studier på cellens funksjon. B-lymfocytter er en av celletypene som kan dyrkes *in vitro*. Forutsetningene for at cellene skal kunne proliferere, er at de kan vokse under lignende forhold som de har naturlig i kroppen. Dette gis ved å tilsette nødvendig vekstmedium, sørge for riktig pH og temperatur. Dette kan oppnås ved å dyrke B-lymfocytene i kulturmedium i en CO₂ - inkubator ved 37°C. Ved å holde en CO₂ konsentrasjon på 5%, gir dette en fysiologisk pH på ca. 7.2. Forutsetningen er at vekstmediet en tilsetter inneholder uorganiske salter som gir bufferkapasitet.

Mediet må også inneholde næringsstoff og vekstfaktorer som aminosyrer, glukose, vitaminer og blodserum/føtalt kalveserum (FCS). Normale celler (ikke kreftceller) vil kun vokse for en kort periode i cellekultur. Den første tiden venner cellene seg til de nye omgivelsene, før de vokser eksponentielt etter ca. 1-2 dager. Veksten flater ut etter ca. 7 dager, fordi dyrkingsarealet gjerne bli fullt.

Oppvekst av bakterier gir ugunstige levetilstander for B-lymfocytene, ved at det blant annet blir mangel på næringsstoffer. Dette gjør at cellene dør fremfor å proliferere. Derfor benyttes antibiotika i kulturmediet. Det er hensiktsmessig å velge bredspektret antibiotika, som f.eks. en kombinasjon av penicillin og streptomycin. Dette vil hindre oppvekst av Gram-positive og Gram-negative bakterier²⁶.

2.5 Flowcytometri

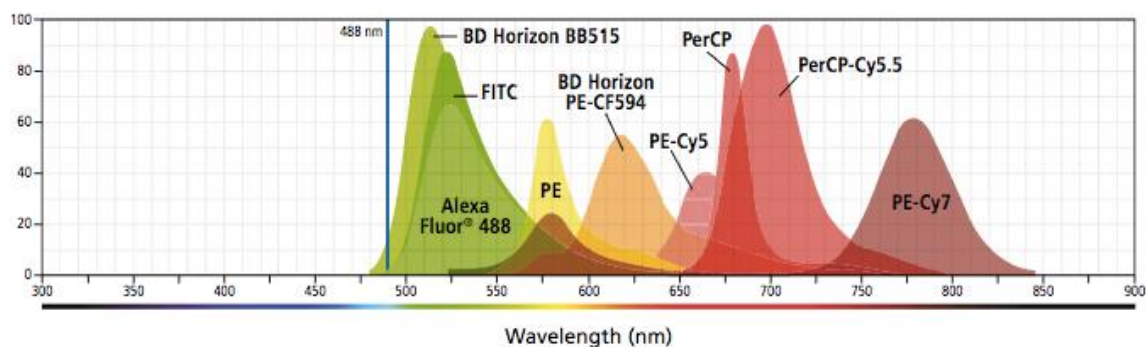
For å muliggjøre differensiering av enkeltceller, benyttes metoden flowcytometri. Identifikasjon av en spesifikk populasjon baseres størrelse, granularitet og/eller monoklonale antistoff bundet til fluorokrom. Hydrodynamisk fokusering gjør at enkeltceller kan passere den blå laseren (488 nm) til flowcytometeret som vist i figur 5. Differensiering skjer på bakgrunn av hvordan lyset endres når ei celle passer laserstrålen. Forward scatter (FSC) ligger ved null grader (± 13 grader) og registrerer lysspredning som er proporsjonal med størrelsen på cellen. Side scatter (SSC) ligger ved 90 grader (± 13 grader) og registrerer kompleksiteten til cellen ved å detektere refleksjon av granula ²⁷.



Figur 5. Skjematisert fremstilling av hovedprinsippet for flowcytometri ²⁸.

Celler kan også differensieres ved tilsette monoklonale antistoff som binder seg til CD-markører på cellene. Antistoffet som er bundet til fluorokrom absorberer lysenergi (fotoner) fra laserstrålen (488nm) og elektroner i fargestoffet eksisterer til et høyere energinivå. Når elektronene i fargestoffet går tilbake til grunntilstand vil emittert lys avgis som fluorescens ²⁹. Energien som avgis blir registrert av detektoren og gjøres om til elektriske som omformateres til lesbar data. Ved spesifikk binding vil mengde fluorescens være proporsjonal med konsentrasjonen til det fluorescerende stoffet. Flere detektorer gjør at flowcytometeret kan skille mellom flere fluorokromer i samme prøve. Hver detektor registrerer et bestemt lysområde (nm). Noen av de mest brukte fluorokromer ved bruk av blå laser med bølgelengde 488 nm, er FITC (fluoresceinisothiocyanat), PE (phycoerythrin), PE-Cy7 (phycoerythrin cyanine dye 7) og APC (allophycocyanin) de mest brukte fluorokromer ³⁰.

Ved bruk av flere fluorokromer samtidig kan ulike emisjonsspekter overlappe og gi spektral interferens. Dette vil føre til at fluorescensemisjons-signaler fra et fluorokrom treffer en detektor beregnet for å måle signal fra et annet fluorokrom som gir falskt negativt resultat. Ved å bruke både fluorokromer FITC og PE, kan disse overlappe hverandre som vist i figur 6.



Figur 6. Eksempel på hvordan nærliggende bølgelengder til fluorokromer kan gi spektral interferens ³¹.

Mengden spektral interferens er en lineær funksjon så det er mulig å korrigere den ved hjelp av en matematisk algoritme. Denne prosessen kalles kompensasjon. Med riktig kompensasjon kan resultater visualiseres og analyseres ordentlig ³²

3. Materialer og metoder

3.1 Materialer

Tillaging av stamløsninger ble gjort etter oppskrift i produktenes pakningsvedlegg.

Bruksløsninger ble laget til ønsket konsentrasjon i forhold til antall celler som ble benyttet.

Tabell med relevante produkter, leverandører, katalog nr., behandlingsmåte og oppbevaringsmetode er fremstilt alfabetisk i vedlegg 1.

3.1.1 Søknad til REK/samtykkeskjema

For å gjennomføre et etisk forsvarlig forsøk, tok vi kontakt med REK pr telefon. Siden vi utfører kvalitetssikring av en metode, var forsøket vårt ikke søknadspliktig. Blodet som ble brukt til begge pre-forsøkene og selve forsøket ble donert fra en av gruppemedlemmene. Derfor var heller ikke samtykkeskjema nødvendig ³³.

3.1.2 Prøvemateriale

For å få tilgang til B-lymfocytter tappet vi perifert blod i EDTA (Ethylen-Diamin-Tetra-Acetic-Acid) rør. Venøs prøvetaking ble utført ved NTNU Ålesund ved å benytte Prosedyre for venøs blodprøvetaking fra Ålesund Sjukehus, se vedlegg 7. 120 ml blod ble brukt i forsøket og 20 ml blod i begge pre-forsøkene.

3.2 Preforsøk

Pre-forsøk ble utført for å lære de ulike teknikkene og metodene som ble brukt. Dette innebar arbeid i sterilbenk og lære programvaren til flowcytometeret. Det ble gjennomført to pre-forsøk, med mindre mengde blod, reagens og faktorer. Metoden ble tilpasset ved å følge anbefalinger i pakningsvedlegg for materialene, i tillegg erfaringer som ble gjort under pre-forsøkene.

3.3 Forsøk

Forsøk omhandler beskrivelse av metoder som ble brukt i samme rekkefølge som den ble utført. Utarbeidet prosedyre ble fult, se vedlegg 4. Ved arbeid med cellekultur benyttet vi steril teknikk. Prosedyre for steril teknikk ble fulgt, se vedlegg 6. Del 1 (frem til inkubering med immunologiske faktorer) foregikk arbeidet inne i en sterilbenk på et renrom. Del 2 ble utført ved utsterile forhold.

3.3.1 Henting av prøvemateriale

120 ml venøst blod ble tappet i EDTA rør. Blodet som ble benyttet pr forsøk ble gitt av en og samme person, for å ta hensyn til biologisk variasjon. EDTA rørene med blod ble oppbevart i romtemperatur i ca. 30 min før videre arbeid.

3.3.2 Isolere mononukleære celler

120 ml EDTA blod ble overført i 6 x 50 ml Falcon rør, ved å bruke sterile pipetter. Blodet ble fortynnet 1:1 med PBS til en cellesuspensjon. 15 ml Biocoll ble tilsatt 8 nye 50ml Falcon rør. 30 ml av cellesuspensjon ble overført til hvert rør med Biocoll. Rørene med Biocoll og cellesuspensjon ble sentrifugert ved 2000 rpm i 20 minutter i romtemperatur uten akselerasjon og bremse. Det er viktig at bremsen ikke er på, for å unngå at laget med mononukleære cellene og plasma blander seg. Ved sentrifugering vil fullblodet bli separert i 4 lag med blodkomponenter, der mononukleære celler blir liggende i interfasen, mellom Biocoll og serum. Interfasen ble overført fra alle rørene med en steril pipette til 3 nye Falcon rør, og deretter ble interfasen vasket ved å fylle rørene $\frac{3}{4}$ med PBS og sentrifugert ved 1200 rpm i 10 min. Vaskingen fjerner uønskede blodplater og plasma komponenter. Supernatant avpipetteres og cellepellet blandes forsiktig for videre arbeid.

3.3.3 Lysering av erythrocytter

30 ml Erylysis-buffer ble fordelt til 3 Falcon rør med cellepellet. Erylysis buffer og cellepellet ble blandet godt og inkubert i 5 min i romtemperatur for å lysere gjenværende erythrocytter. Oppskrift på erylysis-buffer står beskrevet i vedlegg 3. For å stoppe reaksjonene til lyseringsbufferen ble røret tilsatt $\frac{3}{4}$ PBS og sentrifugeres ved 1200 rpm i 10 min. Supernatanten ble avpipettert. Cellepellet ble resuspendert til en ønsket konsentrasjon på 2×10^7 celler/ml.

3.3.4 Telling av celler

For å beregne fortynninger med CFSE og kulturmedium senere, er det viktig å vite antall levende celler pr milliliter blod. For å farge cellene ble 10 μ l cellesuspensjon og 10 μ l Trypan Blue overført til eppendorfrør og blandet godt til ønsket konsentrasjon på 1×10^7 celler/ml. Resten av cellesuspensjonen settes på is for å holde de mononukleære cellene i live ved å stanse deres metabolisme. 10 μ l av farget cellesuspensjon overføres til Naubaur tellekammer. De blanke, runde og skinnende cellene er i live og telles med 10x forstørrelse. To felt ble talt, (1 på hver side) med 4x4 ruter. Gjennomsnittet av antall celler regnes om til antall celler pr ml.

3.3.5 CFSE (karboksylfluorescein succinimidylester)

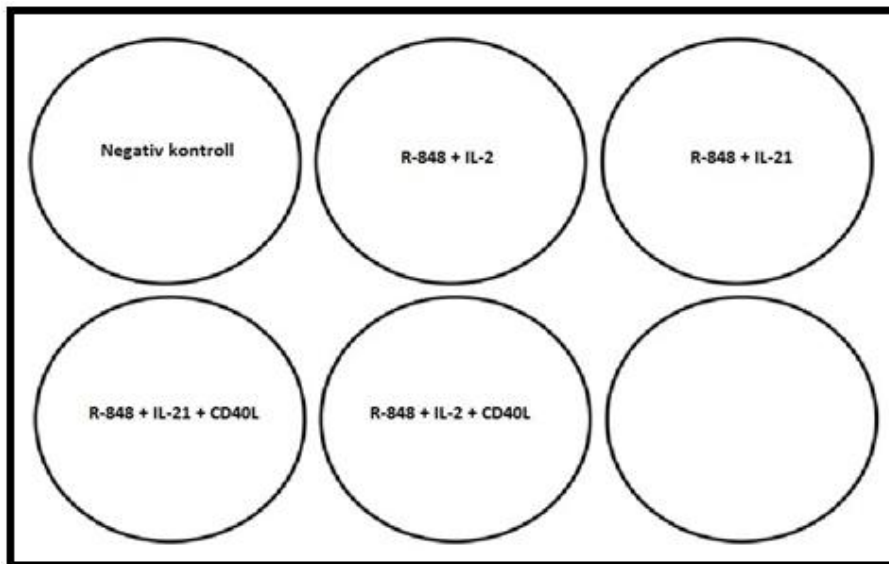
Etter telling ble cellesuspensjonen som ble oppbevart på is sentrifugert ved 1200 rpm i 10 min i romtemperatur. Supernatanten ble avpipettert og cellepellet ble tilsatt CFSE/RPMI 1640 suspensjon til en konsentrasjon på 1 μ M. Cellesuspensjonen ble inkubert i 10 min ved 37 grader og 5% CO₂. Tilsetning av RPMI 1640 i stedet for PBS, gir en lymfocytene bedre levevilkår under inkubasjon. For å stoppe fargereaksjonen fylte vi rørene $\frac{3}{4}$ opp med en blanding av kald RPMI 1640, 10% FCS og antibiotika. CFSE er et fluoriserende fargestoff som brukes til å dokumentere lymfocytproliferasjon. Overskudd av CFSE molekyler som ligger fritt i løsningen, vil binde aminogrupeer til proteiner når det blir tilført 10% FCS.

3.3.6 Fortynning av cellesuspensjon til kultivering

For å vaske bort overflødig farge (CFSE), ble rørene sentrifugert i 1200 rpm i 10 min. Supernatanten ble avpipettert. Kulturmiks med RPMI 1640, 10% FCS og 1% antibiotika ble tilført celledellet til en ønsket konsentrasjon på 8×10^6 celler/2ml.

3.3.7 Tilsetning av kulturmedium og immunologiske faktorer

3 Falcon 6 brønners brett ble merket med dag (3, 5 og 7 dager). Til alle platene ble fordelingen av immunologiske faktorer merket som vist på figur 7.



Figur 7. Skjematisk fremstilling av kulturbrønner tilsatt immunologiske faktorer.

2 ml av cellesuspensjonen (kulturmiks og lymfocytter) ble fordelt til 15 brønner. Til hver merket brønn ble det tilsatt en konsentrasjon av immunologiske faktorer basert på antall lymfocytter pr ml, se tabell 2. Stamsløsninger og bruksløsninger til de ulike immunologiske faktorene ble utarbeidet og presentert i vedlegg 2.

Tabell 2. Konsentrasjon til de ulike immunologiske faktorene

Immunologisk faktorer	Konsentrasjon
R848	1 µg/ml
IL-2	10 ng/ml
IL-21	50 ng/ml
CD40L	0,5 µg/ml

Immunologiske faktorer ble jevnt fordelt i cellesuspensjonen og brettene ble satt til inkubasjon i sterilt CO₂ inkubatorskap ved en temperatur på 37 grader Celsius og CO₂ nivå på 5,2% med 100% luftfuktighet.

3.3.8 Høsting av lymfocytter fra cellekultur

Etter inkubasjon i 3, 5 og 7 dager tok vi ut brettet som tilhørte den respektive dagen og lot andre brett stå uberørt frem til dagen de ble analysert. For å høste prolifererte B-lymfocytter fra cellesuspensjonen, ble suspensjonen blandet godt i hver brønn med pipette langs kantene og bunnen for å få en homogen løsning. 500 µl av blandet cellesuspensjonen ble overført til riktig merkede polystyren rør. For å vaske lymfocytene ble cellesuspensjonen fylt opp $\frac{3}{4}$ med PBS og sentrifugert ved 1200 rpm i 10 min i romtemperatur. Supernatanten ble dekantert ved å snu polystyren røret opp ned. Siste dråpen ble fjernet ved å presse enden av røret på et tørkepapir uten å vende det tilbake. På den måten ble all supernatant fjernet, uten at lymfocytter gikk tapt.

3.3.9 Tilsetning av monoklonale antistoff bundet til fluorokrom

50µl med 5% FCS ble tilsatt alle rør og blandet forsiktig før inkubering i 10 min i romtemperatur. FCS inneholder proteiner som blokkerer for uspesifikk binding av Fc delen til antistoffene. Mengde antistoff ble tilsatt alle rør ved å følge tabell 3.

Tabell 3. Konsentrasjon av cellemarkører

Cellemarkør	Konsentrasjon
Anti-CD19	20µl
Anti-CD45	5µl
Anti-CD4	5µl

Antistoffene og cellesuspensjonen ble blandet forsiktig og inkubert i kjøleskap i 40 minutter. For å vaske bort overflødig FCS og antistoff etter inkubasjon, ble rørene fylt med $\frac{3}{4}$ PBS og sentrifugert ved 1200 rpm i 10 min i romtemperatur. Supernatant ble dekantert ved å vende røret opp ned som tidligere beskrevet. Cellepellet ble resuspendert med 300 µl PBS og blandet forsiktig. Cellesuspensjonen ble oppbevart mørkt og blandet med vortex rett før analysering. Analyseringen med første røret startet med en gang.

3.3.10 Analysering av prøver på BD Accuri C6

Analysering av prøver ble utført på flowcytometeret BD Accuri C6. Ved hver analysering ble prosedyre for oppstart og avslutning fulgt, se vedlegg 5. Alle analyser ble lagt inn i samme fil for å kunne sammenligne resultatene. Ved analysering ble anbefalte innstillinger fra prosessveileder fulgt:

- 100000 events (antall celler)
- Slow (hastighet på aspirering av cellesuspensjon)
- 80 000 (Threshold ved FSC-H)

Flushback og tørking med linsepapir ble gjennomført mellom hver analysering for å unngå kontaminering. Vår praktiske veileder hjalp oss med avgrensning (gating), overføring og kompensering for å få lesbar data og hindre spektral interferens. Threshold ble satt til 80 000 for å ekskludere elektronisk støy og ødelagte celler. Erytrocytter og granulocytter er allerede ekskludert under bearbeidelse av lymfocytter.

BD Accuri C6 Software differensierer cellene ved hjelp av FSC (forward scatter) og SSC (side scatter) i tillegg til 4 fluorescens detektorer. Signalet til de ulike Fluorokromer blir

registert ved detektoren og digitalisert og presentert i punktplott. Et punkt i plottet representerer en celle. Plasseringen av punktet bestemmes av i hvilken grad cellen binder cellemarkører. Oversikt over hvilke cellemarkører som analyseres i de ulike detektorene, vises i tabell 4.

Tabell 4: Cellemarkører med tilhørende fluorokrom og detektor.

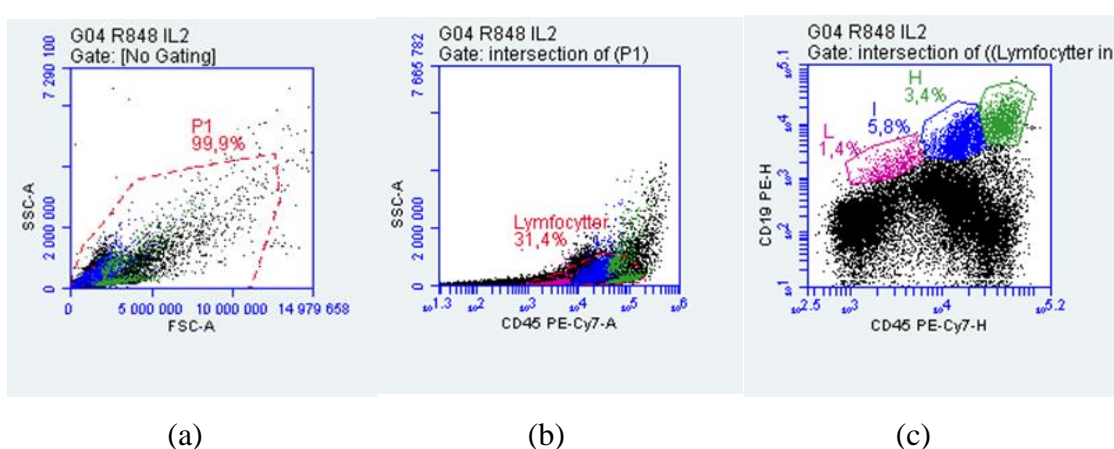
Cellemarkør	Fluorokrom bundet til cellemarkør:	Detektor
CFSE	FITC	FL1
Anti-CD19	PE	FL2
Anti-CD45	PE-Cy7	FL3
Anti-CD4	APC	FL4

4. Resultater

Fremstilling av resultatet gjøres ved kombinasjon av 6 parametere; FSC, SSC, FITC, PE, PE-Cy7 og APC. Det er mulig å avgrense populasjoner med celler og overføre disse i forskjellige punktplott og histogrammer.

4.1 B-lymfocytter

Figur 8 viser hvordan vi har avgrenset CD19⁺ B-lymfocytter fra punktplott.



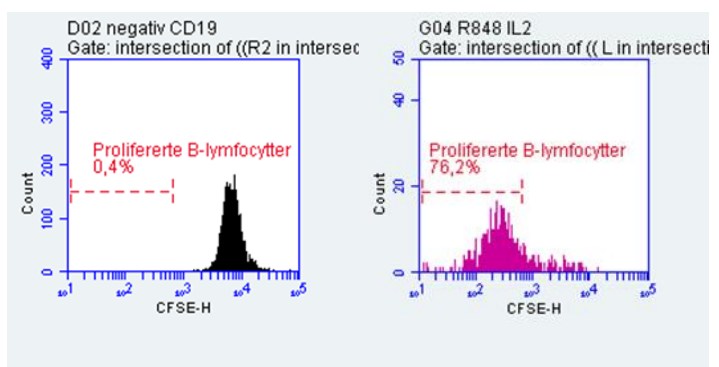
Figur 8. Avgrensning av CD19⁺ B-lymfocytter fra punktplott

Punktplottet i figur 8 (a) viser fordeling av cellene etter parametrene FSC (x-aksen) og SSC (y-aksen). FSC fordeler cellene basert på størrelsen til cellene, mens SSC fordeler cellene etter granulariteten til cellene. Hele cellepopulasjonen blir avgrenset (gattet) med P1 (99,9 %) for å kunne overføre de fleste cellene videre til punktplott i figur 8 (b). Videre blir cellene fordelt basert på SSC (y-aksen) og CD45 positive leukocytter (x-aksen). CD45 uttrykkes på B-lymfocytter, T-lymfocytter, NK-celler, makrofager, monocytter og granulocytter. Granulocytter er allerede ekskludert ved bearbeiding av mononukleære celler. B-lymfocytter har lite granula og vil derfor legge seg lavt i punktplottet i forhold til SSC. Lymfocytter er avgrenset til 31,4% av cellene for å ekskludere andre leukocytter. Lymfocytene overføres til punktplottet som vist i figur 8 (c). Cellene fordeles basert på CD19⁺ lymfocytter (y-aksen) og CD45⁺ lymfocytter (x-aksen). CD19 er uttrykt på B-lymfocytter og positive celler vil derfor ligge i øvre sjiktet i punktplottet. Figur 8 (c) viser at 3 populasjoner er klart CD19⁺ CD19^{lav} (L) med rosa farge, CD19^{Intermediær} (I) med blå

farge og CD19^{Høy} (H) med grønn farge. CD19^{lav} utgjør 1,4%, CD19^{Intermediær} utgjør 5,8% og CD19^{Høy} utgjør 3,4% av den totale lymfocytt-populasjonen.

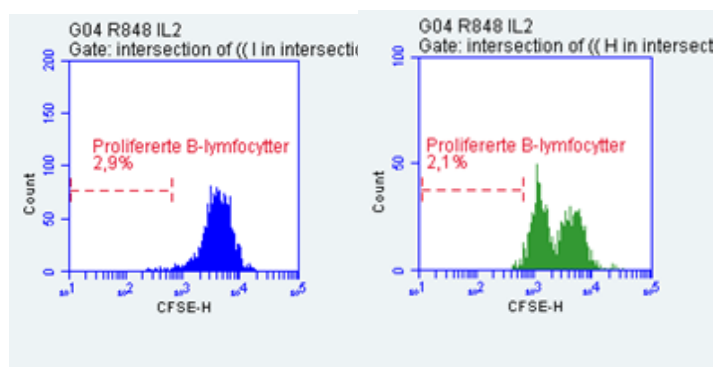
4.2 Proliferasjon av B-lymfocytter

Negativ kontroll og CD19- lymfocytter blir presentert for å vise sammenhengen mellom reduksjon av CFSE fargeintensitet innad i cellepopulasjonene. Grafene i figur 9 baseres på avgrensningene L, I og H fra figur 8 (c). Grafene fremstilles med CFSE (x-aksen) og antall celler (count). Avgrensning for proliferasjonsområde er satt ut i fra negativ kontroll som omfatter hele B-lymfocytt populasjonen. Proliferasjon blir påvist ved reduksjon i fargeintensitet, altså en venstreforskyvning av cellepopulasjonen langs x-aksen. For hver generasjon vil fargeintensiteten halveres. Den prosentvise proliferasjon regnes ut fra mengde celler som befinner seg i avgrenset område. Resultatene vises i figur 9.



(a)

(b)



(c)

(d)

Figur 9. Proliferasjonsresultater for (a) negativ kontroll, (b) CD19^{lav}, (c) CD19^{intermediær}, (d) CD19^{høy}

Negativ kontroll (a) viser en samlet smal populasjon med høy fargeintensitet. CD19^{lav} (b) viser betydelig proliferering med 76,2%. CD19^{Intermediær} (c) og CD19^{Høy} (d) har lavest proliferasjon med kun 2,9 % og 2,1%. Resultatet viser at B-lymfocytterne som blir stimulert til proliferasjon befinner seg hovedsak i CD19^{lav} populasjon. På bakgrunn av dette gikk vi videre med denne populasjonen.

4.3 Sammenligning av proliferasjonsresultater

Tabell 5 fremstiller prosentvis fordeling av den prolifererte populasjon CD19^{lav} fra figur 8 (c). Proliferasjonen har samme avgrensning som forklart i kapittel 4.2. Tabellen viser proliferasjonen til de ulike kombinasjonene med immunologiske faktorer for dag 3, 5 og 7.

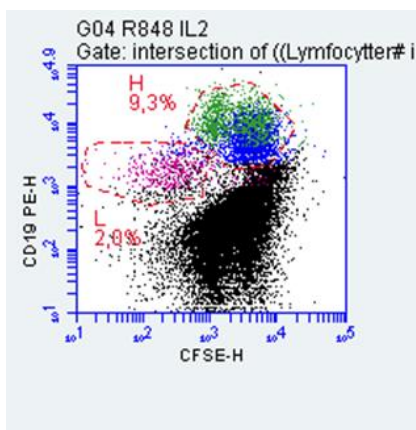
Kombinasjon 1 (R848 + IL-2) ga best proliferasjon av B-lymfocytter med 76,2% ved inkubasjon i 5 dager. Forskjellen i proliferasjon var liten mellom alle de ulike kombinasjonene, både med og uten CD40L. Proliferasjonen viste heller ingen store endringer når IL-2 ble erstattet med IL-21. Optimal inkubasjonstid var 5 dager for alle kombinasjonene, bortsett fra kombinasjon 3, som viste best proliferasjon etter 3 dager. Etter 7 dager viste proliferasjonen nedgang for alle kombinasjonene.

Tabell 5. Prosentandel prolifererte B-lymfocytter CD19^{lav} ved de ulike kombinasjonene av immunologiske faktorer

Nr	Immunologiske Faktorer	Prosentandel prolifererte B-lymfocytter (%)		
		Dag 3	Dag 5	Dag 7
1	R848 + IL-2	69,5	76,2	66,4
2	R848 + IL-21	70,7	72,1	66,5
3	R848 + IL-21 + CD40L	74,3	68,2	65,0
4	R848 + IL-2 + CD40L	71,2	75,9	69,8

4.4 Bekreftelse av CD19^{lav} proliferasjon

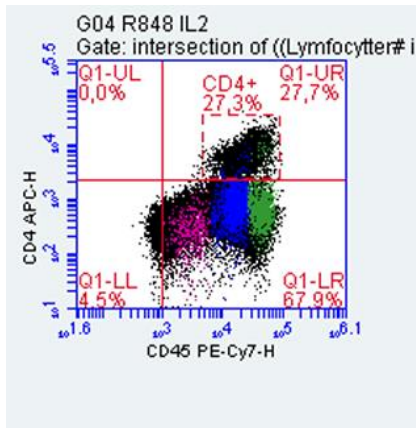
Ved å sammenligne CD19^{lav} populasjonen med CFSE, er det mulig å bekrefte at CD19^{lav} har proliferert. Avgrensingene ble overført fra figur 8 (b). Punktplott fremstiller CD19 (y-aksen) og CFSE konsentrasjonen (x-aksen).



Figur 10. Populasjonen CD19^{lav} i forhold til CFSE konsentrasjon.

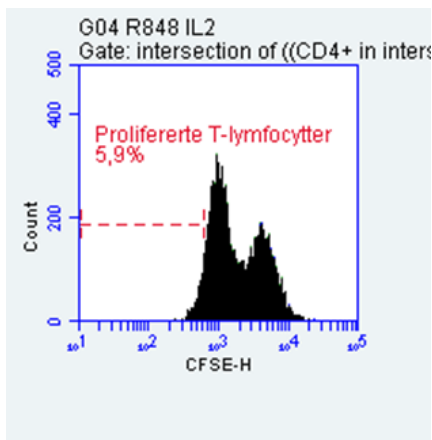
Figur 10 viser to populasjoner CD19⁺ lymfocytter. Den lave (L) består av kun CD19^{lav} fra figur 8 (c) og viser avtakende CFSE konsentrasjon. Dette bekrefter proliferasjon av B-lymfocytter i CD19^{lav}. Den høye (H) populasjonen består av CD19^{Intermediær} og CD19^{Høy} fra figur 8 (c), viser høy CFSE konsentrasjon, som bekrefter liten proliferasjon. Den lave populasjonen utgjør 2,0 %, mens den høye gruppen utgjør 9,3% av lymfocytene.

For sikre at vi ikke har stimulert CD4⁺ T-lymfocytter, overførte vi avgrensingene fra punktplott figur 8 (b) overført til figur 10. Hensikten er å se forholdet mellom celler som uttrykker CD4 (y-aksen) og CD45 (x-aksen). CD4 uttrykkes på CD4⁺ T-lymfocytter, monocyttter og makrofager.



Figur 10. Fordelingen mellom celler som uttrykker CD4 og CD45.

Figuren viser at $D19^{lav}$, $CD19^{intermediær}$ og $CD19^{Høy}$ ikke uttrykker CD4. For å se om vi har stimulert $CD4+$ T-lymfocytter til proliferasjon, ble $CD4+$ populasjonen avgrenset og overført til figur 11. Her fremstilles CFSE fargeintensitet (x-aksen) og antall celler (count). Avgrensning til prolifererte T-lymfocytter er identisk med negativ kontroll, beskrevet i kapittel 4.2.



Figur 11. Prolifererte T-lymfocytter

Figur 11 viser at $CD4+$ T-lymfocytter ikke har blitt stimulert til noe betydelig proliferasjon. Fargeintensiteten til CFSE ble ikke redusert etter inkubasjon med immunologiske faktorer, sammenlignet med negativ kontroll som vist i kapittel 4.2.

5. Diskusjon

Ved å sette sammen nye kombinasjoner av kjente immunologiske faktorer som har gitt dokumentert effekt hver for seg, var det ønskelig å se om de kan stimulere B-lymfocytter på en mer effektiv måte. B-lymfocytter er en mangfoldig gruppe med mange ulike aktiveringveier. De ulike kombinasjonene hadde til hensikt å dekke et bredt spekter av disse aktiveringveiene og dermed oppnå god proliferasjon av B-lymfocytene fra perifert blod.

Vårt forsøk laget et miljø for kultivering av B-lymfocytter *in vitro*, der de immunologiske faktorene i interaksjon med T-lymfocytter stimulerte til proliferasjon. Ifølge studien til Cao & al. i 2010 er tilstedeværelse av T-lymfocytter essensielt for god proliferasjon av B-lymfocytter ⁴.

Effekten av CFSE svarte ikke til forventningene. Årsakene til dette kan skyldes både for lav konsentrasjon av tilsatt CFSE men også for kort inkuberingstid med dette fargemolekylet. Pakningsvedlegget anbefalte å inkubere lymfocytter i 20 min med CFSE. I forsøket ble det derimot benyttet en inkuberingstid på 10 min. etter anbefaling fra prosessveileder.

Seperasjonen med tanke på CD45 PE-Cy7 svarte ikke helt til forventningene. Optimalt ønsket vi bedre seperasjon mellom de ulike populasjonene. En mulig årsak til dette kan være at fluorokromet kan ha blitt utsatt for lyseksponering som gir svakere fluoriserende signal ved analysering.

5.1 Proliferasjon av B-lymfocytter

Resultatene viste betydelig proliferasjon i en liten andel B-lymfocytter, CD19^{lav}. Den største andelen B-lymfocytter viste nesten ingen proliferasjon. Det er sannsynlig at de valgte kombinasjonene ikke har stimulert et bredt spekter av aktiveringsveier. Det er mulig at de prolifererte B-lymfocytterne har tilnærmet like egenskaper og evne til å proliferere ved stimulering med de immunologiske faktorene. Forsøket brukte B-lymfocytter fra perifert blod der både naive B-lymfocytter og B-hukommelsesceller kan ha blitt stimulert. Det er vanskelig å vurdere hvilke av disse to gruppene, eller eventuelt begge, som har blitt aktivert. Flere studier, blant annet Simchoni & al. i 2015, har påvist liten proliferasjon hos naive B-lymfocytter stimulert med TLR ligander *in vitro*, men god proliferasjon stimulert med IL-21 og CD40L³⁴. Det er grunn til å sette spørsmålstegn ved om naive FO B-lymfocytter lot seg stimulere av de immunologiske faktorene i vårt forsøk. Naive FO B-lymfocytter har få TLR og forsøket tilførte ikke et proteinantigen som kunne ha aktivert den naive FO B-lymfocytten sin B-cellereseptor. Dersom disse ble stimulert, må signaliseringen fra IL-21 og CD40L være sterk nok til å simulere kimsentrene og aktivere T-lymfocytterne.

Langlivede B-hukommelsesceller er antigenspesifikke. Det er tvilsomt om disse lar seg stimulere uten nettopp det antigenet hukommelsescellen har spesifisitet for.

MZ B-lymfocytter uttrykker mange TLR og kan raskt integrere signal fra TLR ligander som R848. I perifert blod er MZ B-lymfocytterne i mindretall. Sett i lys av disse vurderingene, kan CD19^{lav} i vårt forsøk være MZ B-lymfocytter. Dette kan være både naive og kortvarige hukommelsesceller som uttrykker IgM.

5.2 Sammenligning av proliferasjonsresultater

IL-21 og CD40L er viktige aktører i proliferasjonen av B-lymfocytterne i kimsentrene. For at disse *in vitro* skal kunne simulere aktiveringsveiene *in vivo*, må kvaliteten og kvantiteten på signalene fra IL-21 samt CD40L sin evne til å binde CD40 på B-lymfocytten, være tilstrekkelig gode. Marasco & al. i 2016 viste at både naive B-lymfocytter og B-hukommelsesceller prolifererte med en kombinasjon av stimuleringsfaktorene IL-21, CD40L og TLR ligand³⁵. Sett i lys av denne studien burde kombinasjonen R848, IL-21 og CD40L vist en langt høyere proliferasjon hos B-lymfocytterne enn de andre kombinasjonene i vårt forsøk. Grunnen til dette er at kombinasjonen ville stimulere alle aktiveringsveiene hos B-lymfocytterne for både naive B-lymfocytter og B-hukommelsesceller. Imidlertid viste kombinasjonen R848, IL-21 og CD40L ikke høyere, men raskere proliferasjon enn de andre kombinasjonene i vårt forsøk. Raskere proliferasjon kan muligens effektivisere forskningsmetoder.

CD40L bidro ikke som forventet til proliferasjon av B-lymfocytterne. En mulig årsak kan være systematisk feil ved tilsetning av faktoren før inkubering. En annen årsak kan være at konsentrasjonen til stamløsningen eller bruksløsningen ble fortynnet eller regnet feil. En tredje årsak kan ha vært en for lav tilsatt konsentrasjon av denne faktoren. Dette støttes av studien til Hawkins & al. som i 2013 stimulerte B-lymfocytter med kun faktoren CD40L. Studien kom fram til at stimuleringssevnen til CD40L var svært følsom for konsentrasjoner. Lave konsentrasjoner førte til dårlig proliferasjon og celledød.³⁶ Konsentrasjonen av CD40L i vårt forsøk var langt lavere enn det studien vurderte som tilstrekkelig for å oppnå god proliferasjon hos B-lymfocytterne.

Simuleringen av aktiveringsveiene i kimsentrene er avhengig av både CD40L og IL-21. Når CD40L svikter, vil IL-21 simulere aktivering av B-lymfocytter utenfor kimsentrene. IL-21 vil her ha lignende rolle og medvirkning til proliferasjon som IL-2. Dette kan forklare liten variasjon i proliferasjon mellom de ulike kombinasjonene av immunologiske faktorer i vårt forsøk.

5.3 Bekreftelse av CD19^{lav} proliferasjon

Vårt forsøk bekreftet at den prolifererte populasjonen uttrykte CD19^{lav} og ikke CD4. Dette betyr at det er B-lymfocytter som har proliferert. Ulike studier har vist varierende resultater med hensyn til hvilke differensieringsstadier de prolifererte B-lymfocytene befinner seg i. Ifølge Marasco & al. i 2016 vil både naive B-lymfocytter og B-hukommelsesceller differensiere til plasmablaste ved stimulering uten proteinantigen *in vitro*³⁵. Sett i lys av denne studien, samt det faktum at plasmablaste uttrykker CD19^{lav}, kan B-lymfocytene i vårt forsøk ha proliferert til plasmablaste.

5.4 Styrker og svakheter med forsøket

En styrke med forsøket er at en nøyaktig prosedyre ble utarbeidet gjennom to pre-forsøk og fulgt i selve forsøket. Erfaring og detaljert prosedyre burde bidra til korrekt utførelse av selve forsøket.

Det ble benyttet en brønn for hver kombinasjon av immunologiske faktorer og cellesuspensjon for hver analysedag. Alle B-lymfocytene hadde derfor like forhold upåvirket av utenforliggende faktorer fram til analysering. Dette medvirket til sammenlignbare resultater.

Forsøket benyttet både fluorokromene FITC (i CFSE) og PE (i anti-CD19 og anti-CD45) i samme analysering. Disse kan gi spektral interferens. Kompensering ble utført med assistanse fra prosessveileder og gjennom utprøving. Dette skulle gi oss gode forutsetninger for å tolke data riktig.

En svakhet med forsøket er at det er umulig å si med sikkerhet at cellesuspensjonen har unngått kontaminering før analysering. Videre om de aspirerte B-lymfocytene utgjorde et representativt utvalg av de stimulerte B-lymfocytene.

Begrenset tid og økonomi gjorde det ikke mulig å analysere daglig utvikling, noe som ville gi en bedre og mer detaljert oversikt over proliferasjonen.

6. Konklusjon

Vårt forsøk har vist proliferasjon av B-lymfocytter *in vitro* ved stimulering med de valgte immunologiske faktorene. Imidlertid viste proliferasjonen liten forskjell mellom de ulike kombinasjonene. Det er mulig at disse hadde for liten variasjon i sammensetning. CD40L ser ut til å ha liten effekt på proliferasjonen. Årsaken kan være for lav konsentrasjon av denne faktoren. En relativt liten gruppe B-lymfocytter ble stimulert til proliferasjon. Det er grunn til å anta at denne gruppen har tilnærmet like egenskaper og evne til å proliferere med de valgte faktorene. Det er usikkert om det er naive B-lymfocytter, B-hukommelsesceller eller begge grupper som er stimulert til proliferasjon. Den prolifererte gruppen uttrykte, i likhet med plasmablaster, CD19^{lav}. Det er imidlertid usikkert om det finnes flere differensieringsstadier av B-lymfocytene i denne gruppen.

På bakgrunn av erfaringer fra forsøket har vi følgende forslag til videre studier.

Et av disse er å variere konsentrasjoner og sammensetning av immunologiske faktorer. Dette vil gi mer informasjon om optimale kombinasjoner. Det kan også være interessant å isolere naive B-lymfocytter og B-hukommelsesceller for å måle eventuelle forskjeller i proliferasjon mellom disse. Et forsøk der en benytter flere CD-markører i tillegg til CD19 vil kunne identifisere differensieringsstadiene til gruppen som har vist proliferasjon. Dette forutsetter flere kanaler på flowcytometeret. Det kan også være verdifullt å ta i bruk analysemetoder som ELISPOT for å vurdere antigenspesifikke B-hukommelsesceller og ELISA for antistoffmålinger etter tilført proteinantigen.

7. Vedlegg

Vedlegg 1 – Utstyr og reagenser.....	s 35
Vedlegg 2 – Konsentrasjon immunologiske faktorer.....	s 36
Vedlegg 3 – Oppskrift på erylisisbuffer.....	s 37
Vedlegg 4 - Kultivering av celler <i>in vitro</i>	s 38-40
Vedlegg 5 - Prosedyre for kvalitetskontroll og vasking.....	s 41
Vedlegg 6 – Sterilteknikk.....	s 42-44
Vedlegg 7 – Prosedyre for venøs blodprøvetaking.....	s 45

Vedlegg 1

Utstyr/reagenser	Leverandør	Katalog nr som Korresponderer med leverandør	Renhetsgrad	Oppbevart frem til bruk
Antibiotika (Penicillin-streptomycin)	Thermofisher	15140148	Steril	Fryst
APC Mouse Anti-Human CD4	BD Pharmingen	561840	Steril	Kjøleskap
Biocoll	Biochrom	L 6113	Steril	Kjøleskap
CD40L	PeproTech	310-02	Steril	Fryst
Decontamination solution	BD Accuri	653160	Usteril	Romtemperatur
CFSE	Invitrogen	C34570	Steril	Fryst
Cleaning Solution	BD Accuri	653169	Usteril	Romtemperatur
Erylysis buffer	Oppskrift Se vedlegg 4	-----	Filtrert	Kjøleskap
Falcon rør (50 ml)	VWR	89039-658	Steril innvending	Romtemperatur
Fetalt kalveserum (FCS)	Clontech	631101	10% filtrert 5% usteril	Kjøleskap
Filter	VWR	28145-477	Steril	Romtemperatur
IL-2	PeproTech	200-02	Steril	Fryst
IL-21	PeproTech	200-21	Steril	Fryst
Trypan blue	Sigma	T8154	Usteril	Romtemperatur
Mikroskop (fasekontrast)	Motic AE31	-----	Usteril	Romtemperatur
Multitwell (6 well)	BDbiosciences	353046	Steril	Romtemperatur
PBS	Invitrogen	003002	Autoklarvert	Romtemperatur
PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD45	BD Pharmingen	557748	Steril	Kjøleskap
PE Mouse Anti-Human CD19	BD Pharmingen	561741	Steril	Kjøleskap
RPMI 1640	Thermofisher	11875093	Steril	Kjøleskap
R848	InvivoGen	tlrl-r848	Steril	Fryst
6 peak beads	BD Accuri	653145	Steril	Kjøleskap
8 peak beads	BD Accuri	653144	Steril	Kjøleskap

Vedlegg 2

Konsentrasjoner og fortyninger immunologiske faktorer og CFSE					
Faktor/ løsninger	CD40L	IL-21	R848	IL-2	CFSE
Mengde	10µg	2µg	500µg	10µg	2 amp.a 500µg
Løst i	100µl PBS	20µl ddH ₂ O	500µl ddH ₂ O	100µl 100mM eddiksyre	90µl DMSO pr. ampulle
Stamløsning	0.1µg/µl	0.1µg/µl	1µg/µl	0.1µg/µl	5mM
Volum 1 ampulle	10µl	1µl	10µl	5µl	1µl
Fortynning	-----	-----	-----	5µl (1 amp.) fortynnes i 95µl PBS= 5ng/µl	1µl (1 amp.) fortynnes i 1ml PBS = 5µM og deretter i 9ml ren RPMI til 0.5µM
Volum 1 brønn	2ml	2ml	2ml	2ml	
Fra stamløsning til 1 brønn	10µl (1 amp.)	1µl (1 amp.)	2µl fra 1 amp.	---	-----
Fra fortynning til 1 brønn	-----	-----	-----	4µl	-----
Bruks-løsning	0.5µg/ml	50ng/ml	1µg/ml	10ng/ml	0.5µM

Vedlegg 3

Erylysisbuffer 1 liter

8,29g NH₄CL

1g KHCO₃

45,2mg EDTA

1L dH₂O

Oppskrift ble gitt fra prosessveileder. 1 liter med erylysisbuffer ble tillaget. 45 ml med erylysisbuffer ble filtrert til og oppbevart i falcon rør i kjøleskapet frem til bruk.

Vedlegg 4

Kultivering av celler *in vitro*

Del 1: forberedelse skjer under sterile forhold

1. 20 ml EDTA blod overføres i 45 ml Falcon tube. Skyll rørene med PBS for å få med alle cellene.
2. Fortynn EDTA blod 1:1 med PBS
3. Tilsett 15 ml Biocoll i 8 x 45 ml Falcon tube.
4. Tilsett 30 ml cellesuspensjon i hver Falcon tube. Hell cellesuspensjonen sakte for å unngå at lagene blander seg.
5. Sentrifuger Falcon tubene ved 2000 rpm i 20 min uten bremse (ny sentrifuge må en også slå av akselerasjon).
6. Overfør interfasen i nye Falcon tube. Interfasen vil si det hvite bandet mellom Biocoll og serum/PBS som består av de mononukleære cellene vi ønsker å isolere.
7. Fyll opp $\frac{3}{4}$ av tuben med PBS
8. Sentrifuger ved 1200 rpm i 10 min
9. Avpipetter supernatanten og bland forsiktig for å få cellene opp fra bunnen
10. Tilsett til sammen 30 ml Erylysis-buffer og bland ved å dra røret over stativet
11. Inkuber 5 min i romtemperatur
12. Fyll opp $\frac{3}{4}$ av tuben med PBS
13. Sentrifuger ved 1200 rpm i 10 min
14. Avpipetter supernatanten
15. Tilsett så 60ml PBS til cellepellet (det opprinnelige volum blod er 120ml)
16. 10 μ l cellesuspensjon overføres i et alliqottrør og resten settes på is for å holde cellene i live ved å stanse metabolismen.
17. 10 μ l Trypan blue tilsettes cellesuspensjonen for å utelukke de døde cellene fra tellingen. (ønsker konsentrasjon rundt 1 000 000 celler/ml. Kan være mellom 250 000 – 2 500 000 celler/ml).
18. Pipetter så 10 μ l av de fargede cellene over til et Neubauer tellekammer.
19. Tell de blanke, skinnende, jevn runde og store cellene i mikroskopet med 10X forstørrelse. Det telles 2 store felt (firekanter) - 1 på hver side, der 1 felt inneholder 4x4 små ruter.
20. Sentrifuger cellesuspensjon ved 1200 rpm i 10 min

21. Avpippeter supernatanten
22. Cellepellet skal fortynnes med CFSE/RPMI 1640 slik at konsentrasjonen blir 1×10^7
23. Inkuber i 10 min ved 37 grader
24. Tilsett 10-20ml ?? med blanding av kald RPMI medium, 10% FCS og antibiotika
25. Ta ut celler til direkte antistofftilsetning og analysering på flowcytometer. 1-1.5 mill.celler pr.rør
26. Sentrifuger ved 1200 rpm i 10 min
27. Fjern supernatant
28. Fortynn cellesuspensjonen med blanding av RPMI, 10% FCS og antibiotika til
29. Overfør 2 ml av fortynnet cellesuspensjon til ønsket brønner
30. Tilsett stimuleringsfaktorer

Immunologisk faktorer	Konsentrasjon
R848	1µg/ml
IL-2	10 ng/ml
IL-21	50 ng/ml
CD40L	0,5 µg/ml

31. Inkuber ved 37 grader, 5% CO₂ i 3, 5 og 7 dager

Del 2: Etter inkubasjon: usterile forhold

32. Merk rør med analysene en skal utføre med stimuleringsfaktor og antistoff.
33. Bland cellesuspensjon i brønnene langs kanten og bunnen, for å få med aggregat som faller på bunnen.
34. 5-700 µl celler overføres til riktig merkede rør
35. Fyll røret $\frac{3}{4}$ fullt med PBS og sentrifuger ved 1200 RPM i 10 min ved 20 grader
36. Fjern supernatanten ved å snu røret opp ned slik at væsken renner ut. Sett røret på tørkepapir uten å vende røret tilbake slik at siste dråpen av supernatanten fjernes.
37. Tilsett 50µl av 5% FCS for å hindre uspesifikk binding til Fc delen av antistoffene man skal farge med. Bland forsiktig.
38. Inkuber i 10 min i romtemperatur

39. Tilsett anbefalt mengde med antistoff og bland forsiktig

Cellemarkør	Konsentrasjon
Anti-CD19	20µl
Anti-CD45	5µl
Anti-CD4	5µl

40. Inkuber celleduspensjonen i kjøleskap i 30-40 min

41. Fyll røret $\frac{3}{4}$ fullt med PBS og sentrifuger ved 1200 RPM i 10 min ved 20 grader

42. Fjern supernatanten som beskrevet tidligere

43. Fortynn cellene med 300µl PBS og bland med vortex

44. Analyser cellene raskest mulig. Oppbevar rørene mørkt fram til analysering og vortex hvert enkelt rør rett før analysering. Om cellene ikke analyserer med en gang, oppbevares de også kjølig.

Vedlegg 5

Prosedyre for kvalitetskontroll og vasking BD Accuri ved oppstart og før avslutning

1. Start maskinen ved å trykke på start knappen. Start BD Accuri ved å trykke på start knappen (tar 6-7 min å starte opp)
2. Åpne vaskeprogrammet ved å gå inn på følgende: Dokument – Wash and validation – Template
3. Lagre filen med: wash and validation, dato, tid
4. A1 cleaning solution 5 min «on fast»
5. A2 decontamination solution 5 min «on fast»
6. A3 milliQwater 5 min on fast
7. A4 8 peak beads 10000 events on slow (Backflush og tørk med linsepapir)
8. A5 6 peak beads 10000 events on slow (Backflush og tørk med linsepapir)
9. A6 milliQwater 5 min on fast

Sjekkliste for godkjenning av vask/kontroll

- R1 skal være over 80 % (unngå to populasjoner)
- A4 (8 peak beads) skal være 8 separerte topper i plot
- A5 (6 peak beads) skal være 6 separerte topper i plot
- CV (variasjonskoeffisienten) skal være under 5%, hvis den er over må en slå opp i manualen og følge instruksene der.
- Sjekk backflush (dråper-stråle-dråper)

Vedlegg 6

CONTENTS

- 1.0 PURPOSE
- 2.0 REFERENCES
- 3.0 DEFINITIONS
- 4.0 RECOMMENDED GOWNING APPAREL/PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT
 - 5.1 PROCEDURE
 - 5.2 GOWNING
 - 5.3 CLEANROOM ENTRY
 - 5.4 CLEANROOM ACTIVITY
 - 5.5 CLEANROOM EGRESS
- 6.0 PROGRAM APPROVAL AND REVIEW

1.0 PURPOSE

This standard provides recommended gowning requirements and instruction for Cleanrooms.

2.0 REFERENCES

Fisher Scientific – Cleanroom Protocols

http://www.fishersci.com/ecomm/servlet/cmstatic?storeId=10652&href=Scientific/scientificStandard/Product_sServices/Cleanroom/sc_std_Cleanroom_080206_1530.jsp&store=Scientific&segment=scientificStandard

3.0 DEFINITIONS

Cleanroom – A room that is maintained virtually free of contaminants, such as dust or bacteria, used in laboratory work and in the production of precision parts for electronic or aerospace equipment (also called white room).

4.0 RECOMMENDED GOWNING APPAREL/PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT

	ISO 6 (FED 209E)
Hairband	•
Hood	
Bear d	•
Face Mask	
Frock	
Coverall/ Cleanroom	•
Boots	•
Gloves	•

The table above lists recommended gowning apparel per class of cleanroom.

Additionally, use chemical splash goggles or safety glasses for eye protection; for operations that may involve splashing, include a face shield.

Thick butyl rubber, neoprene, nitrile, or polyethylene gloves may be appropriate.

Check glove manufacturer for recommendations on a suitable glove for the specific chemical. Ensure that personal protective equipment is worn at all times while in the cleanroom.

PROCEDURE

The procedure must be read carefully before entering the cleanroom. Contact person for the room: Ann-Kristin Tveten, A410, Phone: 926 42 666/ 70 16 15 16

GOWNING

1. Use the unclean racks for jackets, scarfs, hats before gowning
2. Keep gowning area clean and adhere to cleanroom safety policies at all times.
3. Ensure that all jewelry (including rings and watches) is covered by protective wear and does not interfere with research.
4. Continue to put on coveralls (or frock/lab coat). NOTE: Make sure that the coverall/lab coat is clean
5. Step over gowning tape to controlled area. Put on the following:
 - a. Cleanroom shoes
 - b. Pair of gloves
 - c. Wear safety glasses/splash goggles if necessary.
6. It is recommended to change garments (coveralls or frock/lab coat) weekly. If garments are heavily soiled or damaged then replace immediately. Garments may be changed at a higher frequency if specified by a research department or group.
 - a. It is recommended that gloves be changed at least once per work session.
 - b. Disinfect gloves (a) prior to entering an aseptic area, (b) regularly during operations, and (c) before contact with an aseptically gowned person.

CLEANROOM ENTRY

1. DO NOT BRING LIVE BIOLOGICAL MATERIAL INTO THE ROOM. Make sure that any biological contaminants are contained/inactivated before entering the room.
2. Any item brought into the cleanroom must be thoroughly wiped down with an approved cleanroom wipe and solution such as 10% chlorine, alcohol (IPA) and DI water.
3. Seek approval before bringing tool boxes including contents, chemicals, instruments, etc. into cleanroom. Wipe down completely before entry.
4. All supplies must enter the cleanroom either through the (a) gowning area; (b) Material Pass-through; or (c) Equipment Transfer room (if available).
5. Unbox equipment, parts, etc. and remove packaging before bringing them into the cleanroom.
6. Keep wood, pencils, cardboard, non-cleanroom rated paper, or materials that

generate particulates out of the cleanroom.

7. Poly bags may be employed for carrying essential items for research into the cleanroom.

CLEANROOM ACTIVITY

1. Do not move equipment between cleanroom areas
2. Work in your assigned workingspace
3. Do not borrow equipment without approval
4. Limit the use of cell phone
5. Activity - **Do not:**
 - a. run or make fast movements
 - b. touch, rub, or scratch scalp, skin, hair, or eyes
 - c. write on walls, gloves, equipment, or garments
 - d. Sand, drill, file, or weld. However, specialized sawing in a controlled area may be allowed (e.g., dicing saw in the VSoE Photonics Lab)
6. Apparel - **Do not:**
 - a. remove any piece of cleanroom apparel
 - b. remove articles from underneath cleanroom garment
 - c. wear (i) garments that shed lint or fibers; (ii) contaminated, soiled, or torn cleanroom garments; (iii) shorts, midriff tops, tank tops, or hats; (iv) open-toe shoes, sandals, or fabric-covered shoes; and (v) any jewelry if it will compromise safety attire or interfere with cleanroom research or activities
 - d. re-use disposable gloves
7. Do not prepare or consume food or drink. Do not use tobacco
8. Do not wear or apply cosmetics.
9. Do not wear contact lenses.
10. Do not work in the cleanroom if coughing or sneezing.

CLEANROOM EGRESS

1. Enter gowning/control area to remove gowning. Discard gloves in a labeled trash can. NOTE: Do not exit area without removing gloves first.
2. Remove articles in reverse order i.e., safety glasses/splash goggles, boots, arm sleeves (optional), coveralls, and hood. Exit control area.
3. Place reusable garments, shoes and coverall/ lab coat on a hanger on the cleanroom site of the room.
4. Exit the cleanroom facility.

6.0 PROGRAM APPROVAL AND REVIEW

Date	10/05/20	By: Ann-Kristin Tveten
Date		By:

Vedlegg 7

Utdrag fra prosedyre fra blodprøvetaking ved Ålesund Sykehus (Helse Møre og Romsdal)

Hensikt

Å sikre at all blodprøvetaking ved Ålesund sjukehus blir utført etter gjeldende retningslinjer.

Utstyr

Blodprøvetakingsrør Kanyler for venepunksjon Lancetter til kapillær prøvetaking 70 % isopropanol (feks. Alkotip) Tørre kompresser, tupfere Plaster Staseslange
Prøvetakingskorg/traller Kanyleavfallsbokser

Prøvetaking

- Lag til utstyret som skal brukes.
- Vurder prøvetakingssted - om mulig i samråd med pasienten. Dersom pasienten får intravenøs behandling, benyttes den ledige hånden eller en fot.
- Må et intravenøst drypp stenges, skal det gå minst 10 minutter før det kan tas prøve. NB! Unngå å bruke den siden som det evt. går infusjoner som inneholder lipider, da må drypp være avstengt i 1 time før det kan taes prøve. Se eget punkt om prøvetaking i forbindelse med infusjoner.
- Bruk så lite stase som mulig. Slipp opp stasen mens huden vaskes.
- Vask med sprit (70 % isopropanol/Alkotip). La tørke 15-20 sekunder.
- Når vi tar blodkultur skal stikkstedet vaskes 3 ganger med 70 % isopropanol (feks. Alkotip). Gummien på blodkulturflaska skal også vaskes med isopropanol. La det lufttørke ca. 1 minutt. Blodkultur skal i utgangspunktet **ikke** tas fra arteriekran. Se avsnittet Prøvetaking til blodkultur.
- Ta prøvene etter anbefalt rekkefølge, se vedlegget Rør-rekkefølge
- Ved prøvetaking til koagulasjonsprøver må røret fylles helt. Brukes det veneprøvesett (butterfly) må det taes et kasteglass først.
- For å unngå stikkskader/blodsøl skal kanyleholder brukes.
- Alle rørene blandes sakte opp-ned, fem-ti ganger med en gang de tas ut av holderen. Dersom det brukes blodvippe (Triomix), skal prøvetaker sørge for at tilsvarende blanding oppnås.
- Legg en tørr kompress over stikkstedet og dra kanyla ut. Komprimer med den ene hånda mens du sikrer kanyla. Dette kan gjøres ved: - bruk av sikkerhetskanyle - at kanyle sikres direkte i avfallsboks
- Kanyle med påskrudd holder kastes i avfallsboks
- Kompressen festes med tape. Sjekk at det ikke blør før du forlater pasienten.
- Rørene merkes straks etter prøvetaking, se prosedyren {{EQSDocument 3023 new}}.
- Alt brukt prøvetakingsutstyr behandles med forsiktighet og skal kastes i kanyleavfallsbokser etter bruk.
- Dersom prøvetaker mislykkes to ganger, bør det vurderes om en annen skal overta. Maks. antall stikk bør ikke overstige tre ganger.

8. Referanseliste

- 1** Karahan G.E., Eikmans M., Anholts J.D.H., Claas F.J., Heidt S., Polyclonal B cell activation for accurate analysis of pre-existing antigen specific memory B cells. *Clinical Experimental Immunology* [elektronisk artikkel] 2014 Juli [hentet 2017-04-05]; volum 177 (1): 333-340 Tilgjengelig fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4089183/>
- 2** Crotty S., Aubert R.D., Glidewell J., Ahmed R. Tracking human antigen specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *Journal of Immunological methods* [elektronisk artikkel] 2004 Mars [hentet 2017-04-05]; volum 286(1-2): 111-122 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087226>
- 3** Li Y., Yuan S., Deng J., Harnessing B Cells for Cancer Immunotherapy. *Journal of Medical Oncology and Therapeutics* [elektronisk artikkel] 2016 Juli, [hentet 2017-04-05]; volum 1(1): 6s. Tilgjengelig fra: <http://www.alliedacademies.org/articles/harnessing-b-cells-for-cancer-immunotherapy.html>
- 4** Cao Y., Gordic M., Kobold S., Lajmi N., Meyer S., Bartels K., Hilderbrandt Y., Leutkens T., Ihloff AS., Kröger N., Bokemeyer C., Atanackovic D., An optimized assay for the enumeration of antigen-specific memory B cells in different compartments of the human body. *J Immunol Methods* [elektronisk artikkel] 2010 Mars [hentet 2017-05-18]; volum 358(1-2):56-65 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20302874>
- 5** Jahnmatz M., Kesa G., Netterlid E., Buisman AM., Thorstensson R., Ahlborg N., Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J Immunol Methods* [elektronisk artikkel] 2013 Februar [hentet 2017-03-28]; volum 391 (2013) 50-59 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454005>
- 6** Walch P., Freidrich D., Williams J., Smith R., Stewart T., Carter D. et al. Optimization and qualification of a memory B-celle ELISpot for the detection of vaccine-induced memory responses in HIV vaccine trials. *J Immunol Methods* [elektronisk artikkel] 2013 Mai [hentet 2017-03-28]; volum 394 (2013) 84-93 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707324>
- 7** Akdis M., Burgler S., Crameri R., Eiwegger T., Fujita H., Gomez E., Klunker S., Meyer N., O'Mahoney L., Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, function and roles in diseases *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [elektronisk artikkel] 2011 Mars [hentet 2017-05-19]; volum 127(3):701-721 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377040>
- 9** Spolski R., Leonard W.J. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential *Nature Reviews Drug Discovery* [elektronisk artikkel] 2014 April [hentet 2017-05-19]; volum 13: 379-395 Tilgjengelig fra: <http://www.nature.com/nrd/journal/v13/n5/full/nrd4296.html>
- 10** Elgueta R., Benson M., deVries V., Wasiuk A., Guo Y., Noelle R., Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* [elektronisk artikkel] 2009 Mai [hentet 2017-05-21]; volum 229(1): 152-172 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826168/>.
- 11** Blander M., Sander L.E. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat *Nature Reviews Immunology* [elektronisk artikkel] 2012 Mars [hentet 2017-05-16]; volum 12:215-225 Tilgjengelig fra https://www.nature.com/nri/journal/v12/n3/box/nri3167_BX1.html
- 12** Toll-like receptors, *In vivo* 2012 [hentet 2017-04-12] Tilgjengelig fra: <http://www.invivogen.com/review-tlr>
- 13** Bekeredjian-Ding I., Jengo G. Toll-like receptors – sentries in the B-cell response *Immunology* [elektronisk artikkel] 2009 Nov. [hentet 2017-05-15]; volum 128(3):311-323 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2770679/>

-
- 14** Browne E.P. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors *Immunology* [elektronisk artikkel] 2012 Aug. [hentet 2017-05-18]; volum 136(4):370-379 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3401975/>).
- 15** NIH U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information Pubchem Resiquimod [hentet 2017-05-15] Tilgjengelig fra: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resiquimod#section=Top>
- 16** Engel P., Boumsell L., Balderas R., Benussan A., Gattei V., Horejsi V., Jin B., Malavasi F., Mortari F., Schwartz-Albiez R., Stockinger H., van Zelm M., Zola H., Clark G., CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology *J Immunol* [elektronisk artikkel] 2015 Nov. [hentet 2017-05-26]; volum 195(10): 4555-4563 Tilgjengelig fra: <http://www.jimmunol.org/content/195/10/4555>).
- 17** Warnatz K., Schlesier M., Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency Cytometry part B [elektronisk artikkel] 2008 Juni [hentet 2017-05-26]; volum 74B(5): 261-271. Tilgjengelig fra: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.20432/full>
- 18** Caraux A., Klein B., Paiva B., Bret C., Schmitz A., Fuhler G., Bos N., Johnsen H., Orfao A., Perez-Andres M., Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138⁻ and CD138⁺ plasma cells. *Haematologica* [elektronisk artikkel] 2010 Juni [hentet 2017-05-26]; volum 95(6): 1016-1020 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2878802/>
- 19** Kessler A., Identifying Leukocytes In Whole Blood By Flow Cytometry Using Anti-CD45-APC Abert Einstein College of Medicine [elektronisk artikkel] 2017 Feb. [hentet 2017-05-26] Tilgjengelig fra: <http://www.biocompare.com/Product-Reviews/332652-Identifying-leukocytes-in-whole-blood-by-flow-cytometry-using-anti-CD45-APC/>
- 20** Cruse J., Lewis R., Atlas of immunology, 3 utg. Boca Raton: Taylor and Francis Group; 2010. 940s.
- 21** Moens L., Tangye S., Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Frontiers in Immunology* [elektronisk artikkel] 2014 Feb. [hentet 2017-03-31]; volum 5:65s. Tilgjengelig fra:
- 22** Perez-Andres M. & al. Human Peripheral Blood B cells Compartments: A Crossroad in B-Cell Traffic. *Cytometry B Clin Cytom* [elektronisk artikkel] 2010 Aug. [hentet 2017-04-11];78(1): 47-60. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839338>
- 23** Hoffman W., Lakkis L.G., Chalasani G., B cells, Antibodies, and More *Clin J Am Soc Nephrol* [Elektronisk artikkel] 2016 Jan: [hentet 2017-04-21]; 11(1): 137-154. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4702236/>).
- 24** Crotty S., Johnston R., Schoenberger S., Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation *Nat immunol* [elektronisk artikkel] 2010 Feb. [hentet 2017-05-19]; volum 11(2): 114-120 Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864556/>).
- 25** MacLennan, I.C.M. Germinal Centers *Annual Review of Immunology* [elektronisk artikkel] 1994 April [hentet 2017-05-11]; volum 12:117-139. Tilgjengelig fra: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.iy.12.040194.001001>).
- 26** Freshney R., Culture of Animal Cells: A manual of basic technique. 5.utg. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. 642s.
- 27** Practical Flow Cytometry Shapiro HM, 4.utg. Hoboken, New Jersey: John Wiley and sons; 2003

-
- 28** Flowcytometri i klinisk praksis Mona H. Fenstad, Anne D. Rø. Bioingeniøren nr 10, 2012. S.14-18. lastet ned: 3.05.17
<https://www.bioingenioren.no/contentassets/7374cb802ccf4dc69258d79a06a1a5ef/flowcytometri-i-klinisk-praksis.pdf>
- 29** Thermofisher [hentet 2017-05-15] Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html>
- 30** Jahan-Tigh R., Ryan C., Obermoser G., Schwarzenberger K., Flow Cytometry Journal of Investigative Dermatology [elektronisk artikkel] 2012 Okt. [hentet 2017-05-04]: Vol. 132(10): 1-6 Tilgjengelig fra: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15354877>
- 31** Fluorochrome/Laser Reference Poster, BD biosciences [Internett] 2015 [hentet 2017-05-23] Tilgjengelig fra https://www.bdbiosciences.com/documents/multicolor_fluorochrome_laser_chart.pdf
- 32** An Introduction to Compensation for Multicolor Assays on Digital Flow Cytometers, BD biosciences [elektronisk artikkel] 2009 Aug. [hentet 2017-05-23] Tilgjengelig fra https://www.bdbiosciences.com/documents/Compensation_Multicolor_TechBulletin.pdf
- 33** REK, regional committes for medical and health research ethics [hentet 2017-05-23] Tilgjengelig fra: https://helseforskning.etikk.no/reglerogrutiner/soknadsplikt/sokerikkerek?p_dim=34999
- 34** Simchoni N., Cunningham-Rundles C., TLR7- and TLR9-Responsive Human B Cells Share Phenotypic and Genetic Characteristics J Immunol [elektronisk artikkel] 2015 April [hentet 2017-05-18]; volum 194(7):3035-3044 Tilgjengelig fra: <http://www.jimmunol.org/content/194/7/3035.long>
- 35** Marasco E., Farroni C., Cascioli S., Marcellini V., Scarsella M., Giorda E., Mortari E., Leonardi L., Scarselli A., Valentini D., Cancrini C., Duse M., Grimsholm O., Carsett R., B-cell activation with CD40L or CpG measures the function of B-cell subset and identifies specific defects in immunodeficient patients European Journal of Immunology [elektronisk artikkel] 2016 Nov. [hentet 2017-05-30]; volum 47(1): 131-143 Tilgjengelig fra: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201646574/full>
- 36** Hawkins E., Turner M., Wellard C., Zhou J., Dowling M., Hodgkin P., Quantal and graded stimulation of B lymphocytes as alternative strategies for regulating adaptive immune responses Nature Communications [elektronisk artikkel] 2013 Sept. [hentet 2017-05-31]; volum 4 : 15s. Tilgjengelig fra: <https://www.nature.com/articles/ncomms3406>