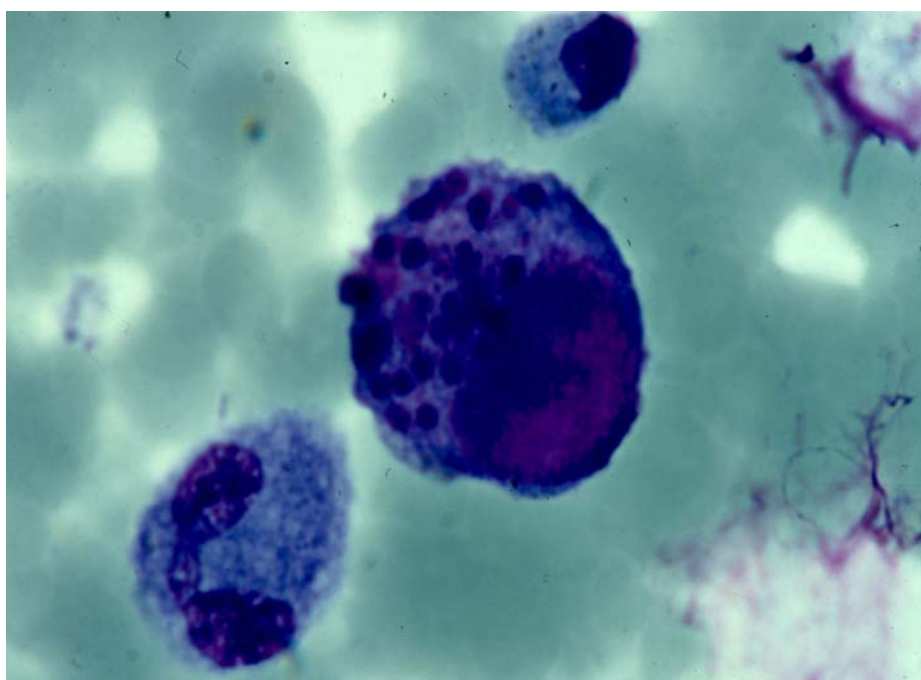


Humant cytomegalovirus og interaksjon med endotelceller

Ekspresjon av MCP-1 og fraktalkin på endotelceller ved HCMV-infeksjon



Prosjektoppgave i profesjonsstudiet i medisin,
Skrevet av: Caroline Ursin Skagemo
Kull V-01
Det Medisinske fakultet, Universitetet i Oslo

Innholdsfortegnelse

<u>INNHALDSFORTEGNELSE</u>	2
<u>1.0 FORKORTELSER</u>	3
<u>2.0 INTRODUKSJON</u>	4
<u>2.1 HISTORIE</u>	5
<u>2.2 HUMANT CYTOMEGALOVIRUS</u>	5
2.2.1 VIRIONET	6
2.2.2 TRANSMISJON OG REPLIKASJON	6
2.2.3 SMITTEVEIER OG EPIDEMIOLOGI	8
2.2.4 VEVSTROPISME	9
2.2.5 PATOGENESE OG SYKDOMSMANIFESTASJONER	9
<u>2.3 CYTOKINER</u>	12
2.3.1 KJEMOKINER	12
2.3.2 ADHESJONSMOLEKYLER	13
2.3.3 FRAKTALKIN	13
2.3.4 MCP-1	14
<u>2.4 US28</u>	14
<u>3.0 HENSIKTEN MED PROSJEKTET</u>	15
<u>4.0 MATERIALE OG METODE</u>	16
4.1 ALLOSTIMULERING AV PBMC FOR HØSTING AV SUPERNATANT	16
4.2 DYRKING AV HMEC FOR UNDERSØKELSE AV FRAKTALKIN OG MCP-1 EKSPRESJON	16
4.3 HCMV-INFEKSJON AV HMEC OG HUVEC	17
4.4 PRODUKSJON AV CYTOSPIN	18
4.5 APAAP (ALKALINE PHOSPHATASE-ANTI-ALKALINE PHOSPHATASE)-FARGING AV CYTOSPIN	18
4.7 FLOW CYTOMETRI	18
<u>5.0 RESULTATER</u>	19
5.1 CYTOSPIN	19
5.2 PCR	19
5.3 FLOW CYTOMETRI	19
5.3.1 RESULTATER FLOW CYTOMETRI HMEC, FRAKTALKIN	20

5.3.2 RESULTATER FLOW CYTOMETRI HMEC, MCP-1	20
5.3.3 RESULTATER FLOW CYTOMETRI HUVEC, FRAKTALKIN	21
5.3.4 RESULTATER FLOW CYTOMETRI HUVEC, MCP-1	21
5.4 ELISA	22
5.4.1 RESULTATER HMEC SUPERNATANT, FRAKTALKIN	23
5.4.2 RESULTATER, HMEC SUPERNATANT, MCP-1	23
5.4.3 RESULTATER HMEC LYSATER, FRAKTALKIN	24
5.4.4 RESULTATER HMEC LYSATER, MCP-1	25
5.4.5 RESULTATER HUVEC SUPERNATANT, FRAKTALKIN	25
5.4.6 RESULTATER HUVEC SUPERNATANT MCP-1	26
5.4.7 RESULTATER HUVEC LYSATER, FRAKTALKIN	26
5.4.8 RESULTATER HUVEC LYSATER, MCP-1	27
6.0 DISKUSJON	27
7.0 REFERANSER	29

1.0 Forkortelser

AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
APAAP	alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase
CMV	cytomegalovirus
DNA	deoxy ribonucleic acid
E	early
FCS	fetal calf serum
HCMV	humant cytomegalovirus
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leucocyte antigen
HMEC	human microvascular endothelial cell
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IE	immediate early
Kbp	kilo base par
L	late
LPS	lipopolysakkarid
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MIP-1 α	makrofag inflamatorisk protein 1-alfa
NK	natural killer
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction

Pp	phosphoprotein
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor

2.0 Introduksjon

Human cytomegalovirus (HCMV) – infeksjon er blant de hyppigst forekommende infeksjoner, da mer enn 70 % av den voksne befolkning har antistoffer mot dette viruset. Som andre medlemmer av herpesvirusfamilien, forblir HCMV latent i kroppen etter primærinfeksjon. Det latente viruset kan reaktiveres og på ny forårsake sykdom. Hos de fleste som infiseres med HCMV vil infeksjonen forløpe subklinisk, eller som en vanlig febersykdom. Hos noen personer, spesielt individer med svekket immunforsvar, kan HCMV forårsake livstruende infeksjoner. HCMV er i dag den viktigste årsaken til infeksjonsbetinget fosterskade. Videre er HCMV-infeksjonssykdom en svært alvorlig komplikasjon til organtransplantasjoner, benmargstransplantasjoner og ved AIDS. Det er også holdepunkter for assosiasjoner mellom HCMV-infeksjon og visse former for aterosklerose.

Patogenesen ved HCMV-infeksjon er meget kompleks. Organskaden skyldes en kombinasjon av immunologisk og direkte virusbetinget vevsskade. Endotelceller, monocytter og granulocytter er sentrale celler i patogenesen. Monocytter og granulocytter på vei gjennom kapillærveggen, kan ta opp HCMV fra endotelet, og frakte det inn i organet. På denne måten kan viruset infisere parenchymceller.

HCMV-infeksjon av endotelceller fører også til aktivering av koagulasjonssystemet og trombosering av de små kar. Nekrosen som oppstår her spesielt store konsekvenser ved HCMV-infeksjon i tarm, hvor tarmnekrose kan føre til blødende ulcera (1). HCMV innvirker også på migrasjon av glatte muskelceller i karveggen via overflatereseptoren US28. Nøkkelen til forståelsen av HCMV-infeksjonens patogenese ligger i kartleggingen av samspillet mellom HCMV og endotelcellene.

2.1 Historie

Humant cytomegalovirus (HCMV) sin betydning for medisinsk forskning har sitt opphav i sammenhengen med HCMV-infeksjon og medfødte misdannelser og fosterdød. HCMV ble oppdaget i forbindelse med undersøkelse av fostre og spedbarn som døde av en ukjent multiorgan sykdom. Denne ukjente sykdommen ble kjennetegnet av betydelig sentralnervøse, hepatiske og hematologiske abnormaliteter. I 1904 beskrev Jesionek funn av anormale celler i lungene, nyrene og leveren hos fostre som man antok hadde dødd av syfilis. Disse cellene hadde intranukleær inklusjon, omgitt av en klar sone. Senere samme år beskrev Ribbert samme type celler i nyrene til et dødfødt barn. I løpet av de neste tre årene beskrev andre patologer liknende funn, med intranukleær inklusjon, i celler tatt fra spyttkjertler, lunger, nyrer og lever hos yngre barn. Det ble allerede på denne tiden bemerket likheten mellom disse celleforandringene og de celleforandringen man fant ved andre herpesvirus infeksjoner. Begrepet cytomegali ble først brukt av Talbot og Goodpasture i 1921. Det var Mueller som først foreslo at den observerte cytopatologien måtte skyldes et perinatalt insult (2).

Videre undersøkelser i 1920-50 årene, av barn med denne cytomegali sykdommen, førte til oppdagelsen av inklusjonsceller i urinen. Dette ble etter hvert et diagnostisk verktøy for oppdagele av cytomegali hos infiserte individer. Det var først i midten av 1950-årene at man klarte å isolere HCMV i cellekulturer. Tre ulike laboratorier klarte dette på nesten samme tid. Evnen til å dyrke HCMV i cellekulturer gjorde det dermed mulig å bruke isolering av viruset i diagnostisk øyemed, lage antistoffer for serologisk testing og studere viruset in vitro.

2.2 Humant cytomegalovirus

Cytomegalovirus (CMV) er store DNA virus som er klassifisert som et medlem av Herpesviridae familien, nærmere bestemt humant herpesvirus 5. CMV har flere likhetstrekk med andre herpesvirus, som oppbygging av virionet, genomet og evnen til å etablere en persisterende og latent infeksjon hos verten. CMV tilhører subklassen beta herpesviridae, på bakgrunn av vevstropismen til spyttkjertler, valg av vert, sin lange vekstsyklus og sin langsomme spredning i cellekulturer. Det finnes forskjellige varianter av viruset, hver med evne til å infisere en spesiell dyreart, inkludert mennesker (3).

2.2.1 Virionet

HCMV virionet består av en tykk DNA holdig kjerne som er omgitt av et 100nm stor iksohedralt nukleokapsid. Kapsidet er omgitt av et amorft matriks, også kalt tegument som består av virusproteiner. En tolaget lipidmembran med glykoproteiner omslutter kapsidet. CMV virionet varierer i størrelsesorden 150-200nm. HCMV genomet består av dobbeltrådet lineært DNA bestående av ca. 230 kilobasepar.

I tillegg til komplette virioner, kan HCMV produsere betydelige mengder ikke-infeksiøse partikler. Disse partiklene kalles "dense bodies", og mangler nukleokapsid. De består av store mengder matriksproteiner, særlig pp65, omgitt av membranen (3).

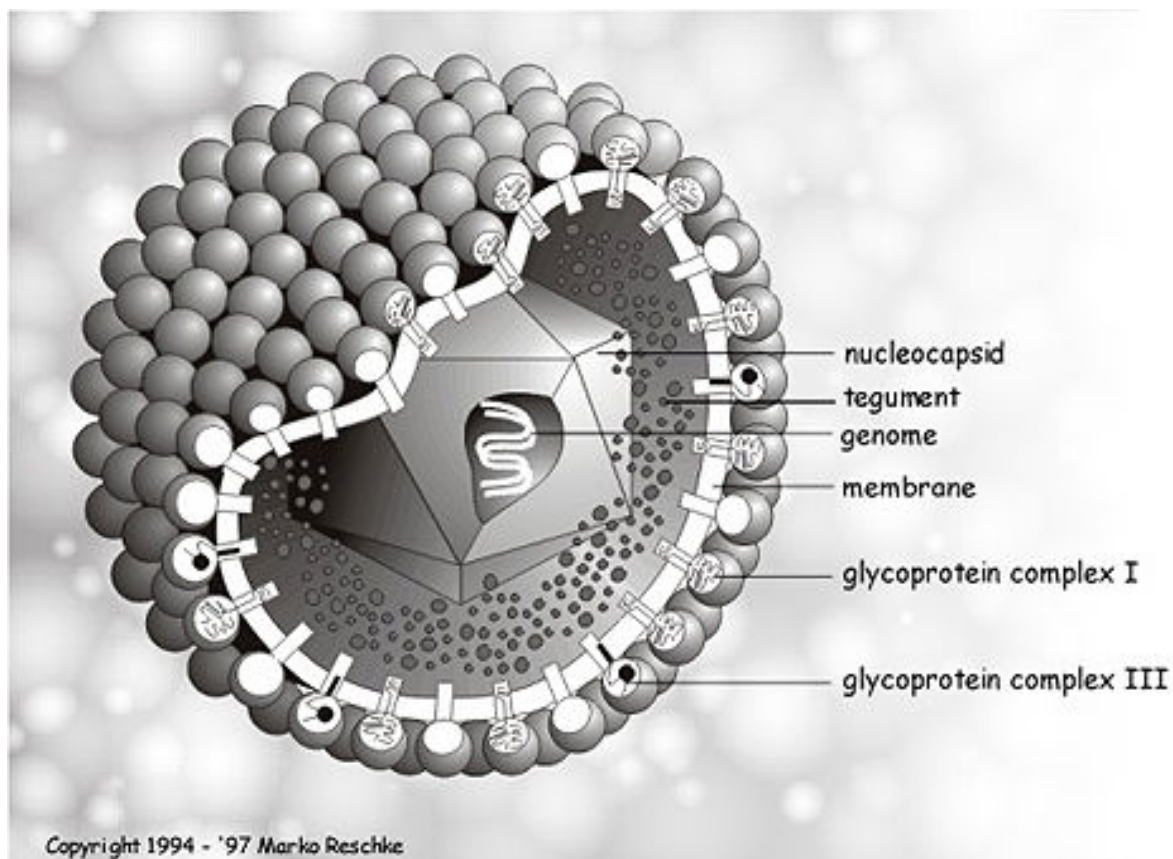


Fig.1: Bildet viser en skematisk fremstilling av HCMV virionet (4).

2.2.2 Transmisjon og replikasjon

HCMV kan infisere de fleste celletyper, men det er bare noen få celletyper som tillater produksjon av viruset in vitro. Disse cellene er bl.a. fibroblaster, endotelceller og epitelceller. I slike permissive celler forløper infeksjonen i tre faser. I første fase som kalles immediate early (IE) blir bl.a. proteinene IE-1, -2 (p72 og p86) dannet. Dette er genregulerende proteiner

som påvirker virusets og cellenes regenerasjon. I neste fase, early (E), dannes E-proteiner. Noen av E-proteinene er genregulerende mens andre har enzymaktivitet, som f. eks DNA-polymerase. I den siste fasen, late (L), dannes hovedsakelig L-proteiner. L-proteinene er strukturelle proteiner. Viruset blir satt sammen og frigjort ved eksocytose (5). En fullstendig HCMV replikasjon med IE, E og L fasene vil ta 3-5 dager in vitro.

Celler som kan ta opp virus, men ikke tillater virustranskripsjon og translasjon, kalles non-permissive. Slike infeksjoner er ikke nødvendigvis uten betydning for cellen. Både binding av virus til reseptor, og matriksproteinene som blir transportert til cellekjernen, kan indusere betydelige funksjonsforandringer i cellen (6).

I andre celler vil det dannes IE- eller E-proteiner. Disse cellene kalles semi-permissive. Noen IE-proteiner som dannes kan regulere intracellulære signalsystemer og cellulær genekspressjon.

Siden de færreste celler tillater produksjon av viruset in vitro, må en regne med at den effekten både matriksproteinene og IE-proteiner har på cellens funksjon er av stor betydning for hvordan det kliniske sykdomsbildet utvikles.

Man antar at hematopoetiske stamceller (CD34+) er stedet hvor HCMV ligger latent (7). Endotelceller i aorta kan også "gjemme" HCMV over lengre tid (8). Virus DNA ligger latent i cellekjernen til vertscellen. Ved celledeling vil også virus DNA dele seg og bli ført videre til dattercellene (9). Det er ikke kjent hva som bidrar til å opprettholde den latente tilstanden, og hva som skal til for å reaktivere viruset. De siste årene har en dog funnet at minst seks åpne leserammer i virus DNA blir transkribert ved latens (10). En antar at proinflammatoriske cytokiner, deriblant TNF- α som produseres i betennelseslesjoner, kan føre til en reaktivering av HCMV (11).

Evnen til å unngå immunresponsen ("immune escape") er en viktig forutsetning for virus' evne til å formere seg og spre seg i den infiserte organismen. HCMV har flere strategier for slik "immune escape". For det første fører HCMV infeksjon av en celle til blokkering av HLA-klasse I molekyl ekspresjon på celleoverflaten. Dermed unngår den infiserte cellen de cytotoxiske T-cellerne. Videre koder HCMV-genomet for en rekke immunregulerende proteiner. Produksjon av viruskodet HLA-E hindrer angrep av NK-celler, også her på grunn

av bortfall av HLA-klasse I molekyler (12). Viruskodet IL-10 hemmer Th1 immunitet som medieres av CD4+ lymfocytter (13). Den viruskodete kjemokinreseptoren US28, fører til binding og muligens innaktivering av kjemokiner (14;15). En slik innaktivering skulle i utgangspunktet kunne hindre aktivering av betennelsesceller. Det er nå klart at aktivering av denne reseptoren gir den infiserte cellen nye egenskaper (16). Det arbeides fortsatt med å kartlegge disse egenskapene.

2.2.3 Smitteveier og epidemiologi

HCMV smitter via direkte kontakt med kroppsvæsker som allerede er infisert. HCMV er unikt i forhold til de andre virusene i herpesviridae familien, ved at det overføres direkte fra mor til foster. Det fins tre hovedveier for denne vertikale overføring av viruset; transplacentalt, intrapartum og gjennom morsmelken. Man ser transplacental smitte hos kvinner med reaktivert infeksjon, men som hadde primærinfeksjon lenge før de ble gravide. Intrapartum smitte skyldes lokal virusutskillelse fra cervix eller vagina. Ca 10 % av kvinner har en slik lokal utskillelse av viruset ved fødselen, og dette forekommer hyppigst hos kvinner under 30 år. Den vanligste smitteveien fra mor til barn er gjennom morsmelken. En studie som fulgte barn som hadde HCMV seropositive mødre viste at 39 % av barna som var fullammet i mer enn en måned var HCMV-infiserte (17). Slik smitte er særlig et problem hos premature barn.

Man kan detektere viruset i sæd, cervixsekret, spytt, urin og tårer i måneder til år etter primærinfeksjonen. Viruset finnes også i blod, da først og fremst i leukocytene. Ved aktiv infeksjon vil HCMV også finnes i plasma. Potensielle inngangsporter for viruset vil være luftveier, svelg, genitalia, blodtransfusjon og organtransplantasjon (18). Mulighetene for overføring av HCMV er derfor mange. Fra livets første dag vil andelen av befolkningen som infiseres være jevnt stigende, slik at det i voksen alder vil være en overveiende del av befolkningen som er smittebærere (19).

Epidemiologiske studier har vist at HCMV er universalt distribuert blant mennesker i hele verden. Selv om prevalensen av HCMV smittede generelt øker med økende alder i ulike befolkningsgrupper, ser man at den gjennomsnittlige prevalensen for smitte samt alder ved primærinfeksjon varierer betydelig avhengig av sosioøkonomiske forhold. Generelt sett finner man at HCMV prevalensen er høyere og alder for primærinfeksjon er lavere, i utviklingsland

og i de lavere sosioøkonomiske grupperingene i industrialiserte land. Det ser ut til at de forskjellene en finner mellom de ulike rasene, henger sammen med sosioøkonomisk status. Man har ikke funnet holdepunkter for sesongavhengig variasjon i antall HCMV-infiserte. Man finner høyere infeksjonsrater i institusjoner, som for eksempel barnehager.

2.2.4 Vevstropisme

Ved en primær HCMV-infeksjon er det først og fremst epitelcellene i spyttkjertler som infiseres. Dette resulterer i en persisterende infeksjon og utskillelse av viruset. HCMV kan også infisere urinveiene, særlig proksimale nyretubuli. Utskillelse av viruset i urinen er derfor vanlig. De kliniske konsekvensene av virusreplikasjonen i nyrene er liten, og det fører sjelden til nyreskade. Et unntak er nyretransplanterte pasienter, hvor HCMV-infeksjon er assosiert med glomerulær skade og fare for avstøtning av transplantatet (20).

Studier viser at HCMV infiserer et vidt spekter av vev, og ofte flere celletyper innenfor ett og samme organ. Organer som viser typisk HCMV cytopatologi er spyttkjertler, lunger, lever, pankreas, nyre, øyet, øret, placenta, GI-tractus, hjertet, ovarier, hypofysen, binyrene, tyreoidea, hjernen og huden (21;22).

Den klinisk viktigste side ved medfødt HCMV infeksjon, er virusets evne til å skade sentralnervesystemet. Dyreforsøk viser at HCMV har evnen til å infisere og skade flere celletyper i CNS. I pasientkasus hvor medfødt HCMV-infeksjon har ført til døden, har man funnet inklusjonsceller i neuroner, gliaceller, ependymceller, plexus choroideus, meningene og i vaskulært endotel. CNS lesjonene er ofte multiple, små, nekrotiske foci omgitt av et inflammatorisk infiltrat. Musemodeller utført av van den Pot et al. foreslår at HCMV infeksjon kan hemme hjernens utvikling via ulike mekanismer. Disse mekanismene er bl.a. lysis av infiserte celler, påvirkning av neuronal migrasjon, tap av neuronale stamceller og vaskulær destruksjon. Fatal HCMV-infeksjon viser ofte ødeleggelse av multiple organer og vev, i tillegg til sentralnervøs skade (23).

2.2.5 Patogenese og sykdomsmanifestasjoner

En primær HCMV infeksjon hos immunkompetente personer gir av og til et mononukleoselignende sykdomsforløp. Hos immunsupprimerte og nyfødte som har en medfødt HCMV infeksjon, kan infeksjonen føre til alvorlig sykdom og mulig død. Etter en

primærinfeksjon med HCMV, vil man være bærer av viruset resten av livet. Ved forstyrrelser i immunsystemet, som f. eks hos AIDS pasienter eller transplanterte pasienter som får immunsupprimerende behandling, vil latent HCMV kunne reaktiveres. Reaktivering av viruset hos immunkompromiterte personer vil kunne gi klinisk sykdom i form av feber, pneumoni, kolitt, retinitt, hepatitt, encefalitt og artritt. Hematologiske manifestasjoner inkluderer leukopeni, trombocytopeni, neutropeni og hemolytisk anemi. HCMV er i seg selv immunsupprimerende, og kan føre til superinfeksjon med sopp, bakterier eller protozoer (24).

HCMV er i dag den viktigste årsaken til sykdomsbetinget fosterskade. Ved infeksjoner i første trimester vil en stor del av infeksjonene føre til fosterdød. Mange av de fostre som overlever vil ha medfødt hjerneskade. I Skandinavia vil ca 0,5 % av alle nyfødte skille ut virus, som tegn på intrauterin infeksjon. Av disse vil 20 % få permanent hjerneskade. Slik fosterskade opptrer både ved primærinfeksjon og ved reaktivert infeksjon hos den gravide (25). Den organskade man ser hos intrauterint infiserte fostre skyldes først og fremst okklusjon av kar med påfølgende nekrose. De fleste organer kan være infisert.

HCMV infeksjon etter fødsel vil hos de fleste nyfødte forløpe subklinisk, eller som en vanlig febersykdom. Ved prematur fødsel, og hos nyfødte med lav fødselsvekt (< 1200g), kan HCMV-infeksjon være livstruende. Klinisk vil man kunne se trombocytopeni, neutropeni, apné og sepsisliknende symptomer hos disse barna. Videre er HCMV årsak til 5 % av mononukleose tilfellene, og kan også forårsake akutt hepatitt.

Hos pasienter med nedsatt cellemediert immunforsvar, vil HCMV kunne føre til alvorlig sykdom. Særlig gjelder dette pasienter som får immunsupprimerende medikamenter etter allogen organtransplantasjon, benmargstransplantasjon og hos HIV-pasienter.

Immunsupprimerende behandling på grunn av autoimmun sykdom vil også kunne øke sykdomstendensen som følge av HCMV-infeksjon. I en studie av 477 nyretransplanterte pasienter har man kunnet vise at 60 % av pasientene vil få en HCMV infeksjon. 2/3 av disse tilfellene vil være reaktiverte infeksjoner, men 1/3 vil være primærinfeksjoner. 25 % av pasientene med påvist HCMV-infeksjon, vil ha behandlingstrengende sykdom (26). Viktige organmanifestasjoner er benmargshemning, leukopeni, hepatitt, pneumoni og gastrointestinale sår (27). Hos pasienter med AIDS er retinitt en alvorlig manifestasjon ved HCMV-infeksjon (28).

En større andel av pasientene har symptomgivende sykdom ved en primærinfeksjon, sammenliknet med reaktivert infeksjon. Det er vist hos nyretransplanterte at 80 % av primærinfiserte vil ha symptomgivende sykdom. I samme pasientutvalg, vil 25 % av de med reaktivert infeksjon ha symptomgivende sykdom (29). Det er ukjent hva som avgjør om en HCMV-infeksjon vil utløse kliniske symptomer. Undersøkelser har vist at cytokinprofilen hos nyretransplanterte er forskjelling hos pasienter med klinisk sykdom, og de med asymptomatisk infeksjon (30).

Det er holdepunkter for at HCMVs immunmodulerende aktiviteter kan ha betydelige konsekvenser for enkelte pasientgrupper. Den immunmodulerende aktiviteten innebærer endringer i cytokinnettverket og endret ekspresjon av viktige membranmarkører, som HLA-molekyler, blodgruppe molekyler og adhesjonsmolekyler. Disse effektene bidrar antagelig til HCMV-indusert reaksjon av transplanterte organer (31) og den behandlingsresistente pneumoni man ser hos immunsupprimerte pasienter (32).

Et sentralt funn ved HCMV-sykdom er leukopeni og trombocytopeni. Dette kan skyldes to mekanismer. Først at infeksjonen forårsaker hemning av hematopoetiske stamceller. Man kan også tenke seg at infeksjonen påvirker benmargstøtteceller, og dermed gir en endret produksjon av hematopoetiske vekstfaktorer. Man har kunnet vise at HCMV infiserer stamceller (CD34+), uten å formere seg. Minst ett av de virusproteiner (pp71) som kommer inn i cellen vandrer til kjernen og hemmer cellyklus, og dermed proliferasjon og differensiering (6;33) og muligens induksjon av apoptose (34). Det er også vist at IL-10 som produseres ved HCMV-infeksjon, kan hemme proliferasjon av hematopoetiske stamceller (35).

Ved undersøkelse av andre HCMV-infiserte organer, finner en viruset i parenchymcellene, og i endotelceller. Siden HCMV som nevnt har en rekke ”immune escape” mekanismer, og i seg selv er lite cytopatogen, vil en HCMV infeksjon ofte ha et langvarig forløp. Infeksjonen av endotelceller kan føre til okklusjon av små kar, og påfølgende nekrose av omkringliggende vev. Slike HCMV-induserte nekroser finner man først og fremst i tarm, men også til en viss grad i nyrer og i leveren.

Det er tydelig at patogenesen ved HCMV-infeksjon skyldes både den direkte effekten viruset har på hver enkelt celle, i tillegg til effekten av infeksjonens immunmodulerende aktivitet.

2.3 Cytokiner

Cytokiner er en gruppe signalmolekyler som er med på å aktivere leukocytter og andre celler, og påvirker deres migrasjon over karendotel og inn i infisert vev. Cytokiner produseres av flere ulike celletyper, deriblant leukocytter. Binding av cytokiner til ulike overflatereseptorer iverksetter intracellulære signalsystemer, endrer gentranskripsjonen og dermed mulighet til å endre målcellens funksjon. Cytokiner kan påvirke celler endokrint eller autokrint. Ett cytokin kan også virke som agonist eller antagonist i forhold til andre cytokiner. Grovt sett kan man dele cytokiner inn i pro- og antiinflammatoriske, som f. eks tumornekrose faktor (TNF) α og interleukin (IL)-1 versus IL-10 og transforming growth factor (TGF) β . Cytokiner kan også brukes til å klassifisere leukocytter. CD 4+ T-hjelpeceller defineres ut i fra deres evne til å produsere IL-2 og interferon- γ , eller IL-4, IL-6, IL-10 og IL-13. Det fins tilsvarende klassifiseringsformer både for NK-celler og CD 8+ T-celler.

En av de mest undersøkte cytokinene in forbindelse med CMV-infeksjon er TNF- α , som fungerer som et proinflammatorisk cytokin. Sammen med IL-1 og IL-6 stimulerer TNF- α en kraftig cellemediert immunrespons, og er en viktig medspiller i forbindelse med å nøytralisere intracellulære patogener (36).

2.3.1 Kjemokiner

Kjemokiner er en undergruppe av cytokiner, som aktiverer og induserer kjemotakse av leukocytter. Hittil er over 50 ulike proteiner identifisert. Tidligere delte man kjemokinene inn i gruppene C, CC og CXC. Gruppetilhørigheten bestemmes av aminosyren cysteins struktur og beliggenhet i forhold til N-terminalen. De siste årene er det blitt klart at det fins flere subklasser av kjemokiner, bl.a. CX3C-klassen som omtales nedenfor. Produksjonen av kjemokiner finner sted i ulike celletyper, deriblant leukocytter. Produksjonen stimuleres av bl.a. andre cytokiner og virus.

Kjemokiner spiller en viktig rolle i forbindelse med HCMV infeksjon, både i forbindelse med spredning av viruset og immunresponsen mot viruset. Undersøkelser har vist at det er økte nivåer av kjemokinet IL-8, under HCMV infeksjoner hos organtransplanterte. Dette kjemokinet aktiverer stort sett neutrofile granulocytter og lymfocytter (36).

C-C kjemokiner kan påvirke den cellemedierte immunresponsen hos mennesker. Det er hovedsaklig monocytter og lymfocytter som aktiveres av disse kjemokinene. RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) fins i økt mengde hos lungetransplanterte med CMV pneumoni. Cerebrospinalvæsken hos HIV-infiserte med CMV encefalitt har vist økte nivåer av MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1). Man finner ikke tilsvarende økt mengde av MCP-1 ved andre former for neuropati (36).

2.3.2 Adhesjonsmolekyler

Adhesjon og migrasjon av leukocytter inn i infisert vev, er avhengig av oppregulering og utskillelse av ulike adhesjonsmolekyler fra både leukocytter og endotelceller. Dette finner sted i et bestemt kaskadeliknende mønster. Det er tre ulike grupper av adhesjonsmolekyler som er spesielt viktige i denne sammenhengen; selektiner, integriner og immunglobuliner. Regulering av disse molekylene skjer bl.a. ved hjelp av cytokiner og kjemokiner.

Adhesjonsmolekylene virker både som ankerfeste for leukocytene til endotelcellene, samtidig som de bremser ned farten til leukocytene. Dette er nødvendig for å muliggjøre migrasjonen gjennom endotelet. Det er også blitt klart at adhesjonsmolekylene, i tillegg til deres opprinnelige funksjon, virker som kosignaler for celleaktivering (36).

2.3.3 Fraktalkin

Fraktalkin tilhører en ny gruppe kjemokiner, CX3C, og kalles også CX3CL1. Fraktalkin er et membranbundet molekyl, med kjemokindomenet plassert som en ”kjærlighet på pinne”. Dette tillater presentasjon av kjemokindomenet til celler med tilhørende reseptor. Fraktalkin binder seg til den humane reseptor CX3CR1.

Undersøkelser tyder på at fraktalkin uttrykkes på modne endotelceller, og dens funksjon som membranbundet molekyl er å fremme celleadhesjon mellom endotelceller, monocytter og T-celler. Fraktalkin påvirker på denne måten leukocytmigrasjonen gjennom endotelceller ved infeksjoner. Fraktalkin kan spaltes og gi opphav til glykoproteiner, som skilles ut av cellen. Disse glykoproteinene har kjemotaktisk effekt. Fraktalkins virkning nedreguleres ved avspaltning av molekylet fra cellen.

Det høye ekspresjonsnivået av fraktalkin og andre kjemokiner i ulike organer, kan tyde på andre funksjoner enn migrasjon av modne leukocytter. Man har tenkt seg at kjemokiner muligens spiller en rolle i leukocytters morfogenese samt deres evne til mobilitet. Det undersøkes også hva som er fraktalkins rolle i vevsreparasjon og regenerasjon.

Fraktalkin bidrar til å gjøre skillet mellom kjemokiner og adhesjonsmolekyler mindre. Det ser ut som fraktalkin i seg selv kan være med å bidra til celle til celle adhesjon, og ikke bare som en igangsetter for et kaskadesystem av andre adhesjonsmolekyler (37).

2.3.4 MCP-1

MCP-1 tilhører CC-gruppen av kjemokiner, og bindes til kjemokinreseptoren CCR2. Mange celletyper uttrykker CCR2, deriblant T-celler, monocytter, basofile granulocytter, dendritiske celler og NK-celler. Disse cellene kan dermed gi en MCP-1 induisert biologisk effekt. CCR2 reseptorer uttrykkes konstitutivt på monocytter, men kun etter aktivering fra T-celler.

Lipopolysakkarid (LPS) har evnen til å nedregulere MCP-1 ekspresjonen på monocytter.

Hovedoppgavene til kjemokinet MCP-1 ser ut til å være rekruttering av mononukleære celler til inflammasjonsområder. Eksempelvis fører virusmeningitt til økte nivåer av MCP-1 i cerebrospinalvæsken. Dette fører til økt infiltrasjon av mononukleære celler til meningene. Effektene av MCP-1 er mange, og inkluderer kjemotakse, adhesjon, frigjøring av reaktive oksydenmetabolitter, arakidonsyre aktivitet, fagocytose og intracellulær død. Hos mastceller og basofile granulocytter er effektene av MCP-1 hovedsakelig kjemotakse, histaminfrigjøring samt produksjon av leukotriener. Studier viser at MCP-1 også har en kjemotaktisk effekt ovenfor T-celler (38).

2.4 US28

HCMV koder for flere reseptorer, deriblant US28. US28 er en G-proteinkoblet 7-transmembran reseptor som uttrykkes på HCMV-infiserte celler. Det er også mulig at US28 fins i virionet som transporterer viruspartiklene mellom cellene. US28 reseptoren binder flere C-C kjemokiner deriblant RANTES, MIP-1 α og MCP-1, i tillegg til fraktalkin. Av disse kjemokinene bindes fraktalkin med høyest affinitet. Man tenker seg at reseptoren US28 fremmer celle til celle kontakt ved hjelp av en human faktor som ennå ikke er kjent. HCMV

har optimalisert US28 reseptoren til å selektivt å gjenkjenne membranbundet fraktalkin på målceller (39).

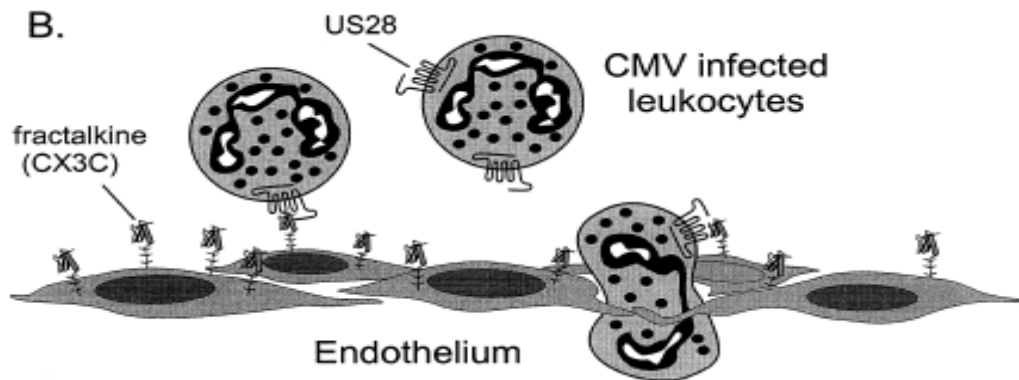


Fig 2: B: Forslag til interaksjon mellom US28 og fraktalkin for transmisjon av CMV viruset gjennom endotelceller. CMV-infiserte leukocytter uttrykker US28 på cellemembranen. Man tenker seg at interaksjon mellom infiserte celler og fraktalkin på endoteloverflaten fasiliterer virusoverføringen gjennom endotelet (40).

3.0 Hensikten med prosjektet

Den HCMV kodete reseptoren US28 har mulighet til å binde ulike kjemokiner, deriblant C-C kjemokinet MCP-1 og CX3C-kjemokinet fraktalkin. Av disse to kjemokinene bindes fraktalkin med høyest affinitet. Endotelceller kan uttrykke både fraktalkin og MCP-1. Hypotesen vår er at binding av MCP-1 og fraktalkin til US28 reseptoren på HCMV infiserte celler kan bidra til overføring av viruset fra infiserte leukocytter til endotelcellene. På den annen side kan utskilt fraktalkin og/eller MCP-1 tenkes å konkurrere med cellebundet fraktalkin og MCP-1 om binding til US28. På denne måten kan løselig fraktalkin og/eller MCP-1 tenkes å redusere overføring av HCMV fra leukocytter til endotel.

Prosjektet har til hensikt å undersøke følgende:

I hvilken grad uttrykker endotelceller kjemokinene fraktalkin og MCP-1 i normal og aktivert tilstand?

Kan infeksjon av endotelceller påvirke ekspresjon og/eller utskillelse av fraktalkin og MCP-1?

4.0 Materiale og metode

I denne studentoppgaven ble det fokusert på å utføre flere ulike laboratoriemetoder. Det ble gitt opplæring i sterilarbeid i laboratoriet, dyrkning av celler og virus og immunologiske metoder som ELISA, immuncytokjemi og flow cytometri. Undersøkelse av cytospin med henblikk på ekspresjon av virusproteiner ble gjennomført av professor dr. med Halvor Rollag, mens ELISA og PCR ble gjennomført i samarbeid med professor dr. med Fredrik Müller. Dyrking av endotelceller (HUVEC) og endotelcellelinje (HMEC), samt infeksjon av disse endotelcellelinjene med det kliniske virusisolatet HCMV 2006 ble gjennomført i samarbeid med bioingeniør Solveig Beck. I dette avsnittet er det beskrevet de ulike prosedyrene som ble gjennomført av undertegnede.

4.1 Allostimulering av PBMC for høsting av supernatant

Endotelceller ble aktivert v hj a supernatanter fra allostimulerte leukocytter. Supernatantene ble fremstilt som beskrevet. Først ble 100ml EDTA blod tappet fra to givere. Blodet ble fortynnet med isotont saltvann, sjiktet over Lymphoprep og sentrifugert i 25 minutter ved 400g. Deretter ble det lymfocyttrike sjiktet sugd opp og vasket to ganger med RPMI. Etter hver vask ble cellene sentrifugert ved 1800rpm i 10 minutter. Etter den andre vasken ble cellene resuspendert i RPMI/glutamin (uten serum) og talt.

Serum fra to ulike CMV-negative givere ble inaktivert ved 56 °C i 30 minutter. PBMC ble deretter resuspendert i RPMI/ glutamin/10 % serum. Forholdet ble blandet til 4 mill. PBMC/ml. 20ml fra hver giver ble blandet sammen, og innkubert i to døgn i en CO₂ inkubator. Mediet ble så sentrifugert ved 1800rpm i 10 minutter. Supernatanten ble høstet og frosset ned i porsjoner à 2ml ved – 70 °C.

4.2 Dyrking av HMEC for undersøkelse av fraktalkin og MCP-1 ekspresjon

Den humane endotelcellelinjen HMEC ble splittet og satt opp i 14 brønner på 24 brett med 1 ml HMEC-medium bestående av MCDB 131 og 10ng/ml EGF, 1 µg/ml hydrokortison og 10 % FCS.

På dag 0 ble celler fra to brønner trypsinert med 0,05 % trypsin/0,53 mM EDTA. Cellene ble vasket en gang med PBS/1 % FCS. Deretter ble cellene telt og resuspendert til 2×10^6 celler/ml i PBS/1 % FCS. Vi tok ut 50 μ l celleduspensjon/rør til fire rør til flowcytometri. Deretter ble det tatt ut 200000 celler som ble sentrifugert ved 1600 rpm i 10 min. Supernatanten ble høstet, og sentrifugert på ny ved 1600rpm i 10 min. Av dette tok vi ut 1 ml, som ble fordelt på to rør (0,5ml/rør) og frosset ved -70 °C.

I de resterende 12 brønnene tilsatte vi 0,5 ml HMEC-medium sammen med 0,5 ml RPMI/10 % CMV negativt humant serum i seks brønner. I de andre seks brønnene tilsatte vi 0,5 ml HMEC-medium sammen med 0,5ml allostimulert PBMC-supernatant.

Allostimulerte og utstimulerte celler ble senere høstet på dag 1,2 og 4 for videre undersøkelse med flow cytometri og for videre høsting av supernatanter og lysater.

4.3 HCMV-infeksjon av HMEC og HUVEC

HMEC ble splittet etter tre dager og fordelt på 16 brønner med 1ml HMEC-medium per brønn. Antistoffene som ble brukt var; anti-fraktalkin (R&D MAB365) 40 μ g/ml, og anti-MCP-1 (R&D MAB279) 10 μ g/ml.

Dag 0 ble mediet fjernet og cellene ble vasket en gang med HMEC-medium. Deretter ble det tilsatt fire ulike suspensjoner. Fire brønner ble tilsatt 100 μ l HMEC-medium. Fire brønner ble tilsatt 100 μ l HMEC-medium sammen med 1 μ l anti-fraktalkin. Fire brønner ble tilsatt 100 μ l HMEC-medium sammen med 1 μ l anti-MCP-1. Fire brønner ble tilsatt 100 μ l HMEC-medium sammen med 1 μ l anti-fraktalkin og 1 μ l anti-MCP-1. Dette ble inkubert i 30min ved 37 °C og 5 % CO₂. Deretter ble alle brønnene infisert med 5pfu/celle HCMV 2006 i et volum på 62 μ l/brønn. Dette ble inkubert i fire timer ved 37 °C og 5 % CO₂.

Mediet ble fjernet etter fire timer, og cellene ble vasket to ganger med HMEC-medium. Deretter ble det tilsatt ustimulert supernatant eller allostimulert supernatant enten alene eller med anti-fraktalkin eller anti-MCP-1 i alle brønnene. Cellene ble deretter inkubert på ny i fire dager ved 37 °C og 5 % CO₂. Den fjerde dagen ble cellene høstet, og to og to duplikatbrønner ble slått sammen. Fra hver betingelse ble det høstet celler til cytopspin og supernatanter til CMV-PCR.

Samme prosedyre ble gjennomført for HUVEC, med HUVEC-medium som basis. HUVEC ble infisert med HCMV 2006 10pfu/celle i et volum på 90µl/brønn. Det ble brukt samme antistoffer i samme konsentrasjon som ved HMEC.

4.4 Produksjon av cytospin

Cellene ble vasket i med 0,5 ml versen pr. 24-brønn brett. Deretter ble cellene trypsinert med en blanding av versen og trypsin, og satt til inkubering ved 37 °C til cellene løsnet fra underlaget. De løse cellene blandet med RPMI og talt opp slik at det var 1×10^6 celler/ml. Suspensjonen ble deretter sentrifugert i 10 minutter ved 400 rpm. Etter sentrifugeringen ble suspensjonen tørket i 10-15 minutter før de ble fiksert med aceton på et objektglass. Etter ytterligere tørking i 10 minutter ble objektglassene med cytospinet frosset ned ved -70 °C.

4.5 APAAP (alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase)-farging av cytospin

Objektglass med cytospinene ble inkubert i 30 minutter med 50µl CMV-pp65 antigen (Clonlab CMV) fortynnet 1:10. Deretter ble cytospinene vasket med TBS ("Tris-buffered saline") buffer to ganger, og all væske ble fjernet med cellulosepapir. Videre ble cytospinene inkubert i 30 minutter med 50µl kanin anti-mus IgG (Clonlab CMV; APAAP Kit) fortynnet 1:50. Etter inkuberingen ble objektglassene igjen vasket to ganger med TBS buffer. Deretter ble cytospinene inkubert med 50µl APAAP kompleks (Clonlab CMV; APAAP Kit) i ytterligere 30 minutter, og vasket to ganger, som beskrevet ovenfor. Til slutt ble cytospinene inkubert med substrat (Clonlab CMV, APAAP Kit), før undersøkelse i mikroskop.

4.7 Flow cytometri

For å undersøke ekspresjonen av fraktalkin og MCP-1 på endotelcellene, ble det gjort flow cytometri. Både HMEC og HUVEC ble undersøkt i stimulert og ustimulert tilstand på dag 0, 1, 2 og 4. Ved hver betingelse ble det gjort flow cytometri fra fire rør, som hver av seg inneholdt 10000 celler og ekspresjon av fraktalkin og MCP-1 på endotelcellelinjene HMEC og HUVEC ble undersøkt. Hver betingelse ble repetert tre ganger.

5.0 RESULTATER

5.1 cytospin

Cytospinene ble brukt til å gjøre mikroskopisk kvantifisering av CMV proteiner, som tegn på intracellulær CMV produksjon. Allostimulerte og ustimulerte HUVEC og HMEC celler viste 0-10 % intracellulær produksjon av disse HCMV proteinene. Dette bekreftet at endotelcellene var infisert med HCMV.

5.2 PCR

Både HMEC og HUVEC ble undersøkt med kvantitativ CMV-PCR. Prøvene ble gjort etter 4 dagers inkubering med HCMV. Resultatet av PCR viste at det var mellom 110 000-250 000 HCMV-kopier/ml i de aktuelle prøvene. Dette sammenfaller med funnene som ble gjort ved cytospin, som bekrefter at både HMEC- og HUVEC-kulturene faktisk ble infisert med HCMV.

5.3 Flow cytometri

Flow cytometri ble gjort på dag 0, 1, 2 og 4 med begge endotelcellelinjene. Målet var å bestemme mengden fraktalkin og MCP-1 på cellenes overflate. Ekspresjon av fraktalkin og MCP-1 er vurdert i forhold til celler farget med isotype-like negative antistoffer i samme oppsett. Negative celler etter farging med anti-kjemokin antistoff ble definert som svarende til området der 99 % av kontrollcellene ble funnet. Celler som viste høyere ekspresjon enn dette ble oppfattet som positive celler. Hver prøve inneholdt ca. 10 000 celler. Langs X-aksen målte man forward scatter som et mål på hver enkelt celled størrelse, mens det langs Y-aksens ble målt side scatter som mål på cellenes kornethet. Hvert oppsett ble fremstilt med tabell og figur. (Se tab 1 og 2)

5.3.1 Resultater flow cytometri HMEC, Fraktalkin

DAG	CMV/MOCK	Stimulert/ ustimulert	MEDIAN	RANGE
0			14	12 - 22
1	Mock	Stim	12	11- 12
1	CMV	stim	7	NA
1	Mock	ustim	19	16- 22
1	CMV	ustim	7	NA
2	mock	stim	14	13- 15
2	CMV	stim	16	NA
2	mock	ustim	19	19 - 20
2	CMV	ustim	14	NA
4	mock	stim	16	14 - 17
4	CMV	stim	14	NA
4	mock	ustim	15	13 - 17
4	CMV	ustim	14	NA

Tabell 1: Ved dag 0 var det 13,5 % av cellene som uttrykte fraktalkin på celleoverflaten. Det er liten eller ingen forskjell i overflateekspressjon av fraktalkin ved allostimulering av cellene. Det synes heller ikke å være noen forskjell i ekspressjonen etter infeksjon av cellene med HCMV.

5.3.2 Resultater flow cytometri HMEC, MCP-1

DAG	CMV/MOCK	Stimulert/ ustimulert	MEDIAN i %	RANGE i %
0			6	5 - 6
1	mock	stim	5	4 - 5
1	CMV	stim	3	NA
1	mock	ustim	6	6
1	CMV	ustim	3	NA
2	mock	stim	3	1 - 5
2	CMV	stim	5	NA
2	mock	ustim	6	5 - 7
2	CMV	ustim	4	NA
4	mock	stim	8	7 - 10
4	CMV	stim	7	NA
4	mock	ustim	6	5 - 6
4	CMV	ustim	5	NA

Tabell 2: HMEC har en overflateekspressjon av MCP-1 på dag 0 på 6,3 %. Cellene viser liten til ingen endring i overflateekspressjonen av MCP-1 etter allostimulering og infeksjon med HCMV. I dette oppsettet ble det ved noen anledninger ikke undersøkt mer enn ett prøvesett, og disse er derfor merket med NA i range-kolonnen.

5.3.3 Resultater flow cytometri HUVEC, Fraktalkin

Dag	CMV/MOCK	stimulert/ustimulert	MEDIAN i %	RANGE i %
0			32	13 -39
1	mock	stim	33	24 -52
1	CMV	stim	23	16 -30
1	mock	ustim	46	21 -55
1	CMV	ustim	25	17 -33
2	mock	stim	29	25 -49
2	CMV	stim	35	2 -50
2	mock	ustim	37	26 -51
2	CMV	ustim	24	20 -29
4	mock	stim	52	25 -53
4	CMV	stim	34	31 -36
4	mock	ustim	54	25 -55
4	CMV	ustim	34	30 -37

Tabell 3: HUVEC har en overflate ekspressjon av fraktalkin på dag 0 på ca. 32 %. På dag 1, 2 og 4 er det kun små endringer i overflate ekspressjonen, både i den allostimulerte og den utstimulerte gruppen. Det er heller ingen nevneverdig forskjell mellom de HCMV-infiserte og de ikke-infiserte cellene.

5.3.4 Resultater flow cytometri HUVEC, MCP-1

Dag	CMV/MOCK	stimulert/ustimulert	MEDIAN i %	RANGE i %
0			15	3 -54
1	mock	stim	3	0 -12
1	CMV	stim	9	3 -16
1	mock	ustim	3	1 -5
1	CMV	ustim	4	1 -7
2	mock	stim	5	2 -8
2	CMV	stim	5	2 -8
2	mock	ustim	11	1 -4
2	CMV	ustim	2	2 -2
4	mock	stim	6	3 -18
4	CMV	stim	4	2 -5
4	mock	ustim	4	1 -10
4	CMV	ustim	1	0 -2

Tabell 4: HUVEC har en overflate ekspressjon av MCP-1 på dag 0 på ca 15 %. På dag 1, 2 og 4 ser man at mengden MCP-1 på overflaten synker hos både de allostimulerte og de

ustimulerte cellene. Det er ingen nevneverdig forskjell mellom de HCMV-infiserte og de ikke-infiserte cellene i de to gruppene.

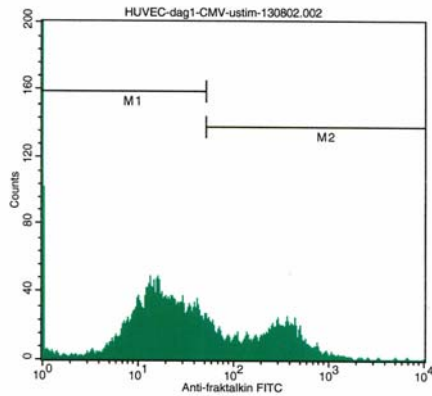


Fig 3: Eksempel på hvordan de ulike cellepopulasjonene delte seg i to ulike populasjoner ved flow cytometri. Denne figuren viser allostimulerte HUVEC celler på dag 1 med HCMV-infeksjon.

5.4 ELISA

Både fraktalkin og MCP-1 ble målt i supernatanter og lysater fra både HUVEC og HMEC på dag 0,1,2 og 4 v hj a ELISA. Supernatanten forteller om mengden utskilt fraktalkin og MCP-1 fra endotelcellene, mens lysatene forteller om den intracellulære produksjonen av fraktalkin og MCP-1. I oppsettene hvor vi så etter MCP-1, ble allostimulert supernatant fortynnet til 1:50, mens ustimulert supernatant ble fortynnet til 1:10. Prøver som ved første oppsett viste verdier over høyeste standard ble senere repetert, da fortynnet til 1:500. Alle lysater ble fortynnet til forholdet 1:2. I oppsettene hvor vi så etter fraktalkin var allostimulert og ustimulert supernatant ufortynnet, mens lysatene ble fortynnet til forholdet 1:2. Resultatene gjengis i tabell 5-12.

5.4.1 Resultater HMEC supernatant, Fraktalkin

Dag	stim/ustim	CMV/MOCK	Median (pg/ml)	Range (pg/ml)
0			min	min
1	stim	mock	min	min
1	stim	CMV	min	min
1	ustim	mock	min	min
1	ustim	CMV	min	min
2	stim	mock	min	min
2	stim	CMV	min	min
2	ustim	mock	min	min
2	ustim	CMV	min	min
4	stim	mock	min	min
4	stim	CMV	min	min
4	ustim	mock	min	min
4	ustim	CMV	min	min

Tabell 5: I endotelcellelinjen HMEC var det ikke detekterbare mengder fraktalkin i allstimulert eller ustimulert supernatant. Det var heller ingen detekterbar mengde fraktalkin i supernatantene etter HCMV infeksjon.

5.4.2 Resultater, HMEC supernatant, MCP-1

Dag	stim/ustim	CMV/MOCK	Median (pg/ml)	Range (pg/ml)
0			2425	1075-5025
1	stim	mock	45750	32200-75250
1	stim	CMV	32250	23200-41300
1	ustim	mock	2252	305-3555
1	ustim	CMV	330	260-400
2	stim	mock	52000	22250-223750
2	stim	CMV	32812	27975-37650
2	ustim	mock	4150	625-6755
2	ustim	CMV	787	620-955
4	stim	mock	34887	27500-92250
4	stim	CMV	54737	31475-78000
4	ustim	mock	6215	4230-8650
4	ustim	CMV	3580	3445-3715

Tabell 6: HMEC produserte i utgangspunktet (= dag 0) ca 2,4 ng/ml MCP-1 i supernatanten. HMEC viser i disse oppsettene ingen nevneverdig forskjell i mengden fritt MCP-1 mellom

HCMV-infiserte og ikke infiserte celler. I de allostimulerte cellene er det en betydelig økning i MCP-1 i supernatanten i forhold til de ustimulerte cellene.

5.4.3 Resultater HMEC lysater, Fraktalkin

Dag	stim/ustim	CMV/MOCK	Median (pg/ml)	Range (pg/ml)
0			1535	921-1806
1	stim	mock	1405	1322-1473
1	stim	CMV	1621	1581-1662
1	ustim	mock	1558	1065-1791
1	ustim	CMV	1380	1316-1444
2	stim	mock	1496	1385-1674
2	stim	CMV	1492	1475-1520
2	ustim	mock	1509	1485-1704
2	ustim	CMV	1593	1337-1849
4	stim	mock	1511	1420-1669
4	stim	CMV	1773	1626-1920
4	ustim	mock	1504	1413-1703
4	ustim	CMV	1526	1315-1737

Tabell 7: HMEC har i disse oppsettene et utgangspunkt på ca 1,5 ng/ml fraktalkin i lysat. På dag 1, 2 og 4 er det ingen økning i fraktalkin i allostimulerte celler, sammenliknet med ustimulerte celler. Det er heller ingen forskjell i fraktalkin i de HCMV- infiserte cellene, sammenliknet med de ikke-infiserte cellene. Fraktalkinkonsentrasjonen holder seg tilnærmet uendret på ca 1,5 ng/ml ved de ulike parametrene.

5.4.4 Resultater HMEC lysater, MCP-1

Dag	stim/ustim	CMV/MOCK	Median (pg/ml)	Range (pg/ml)
0			36	35-37
1	stim	mock	60	46-84
1	stim	CMV	70	63-76
1	ustim	mock	35	32-38
1	ustim	CMV	Min	min
2	stim	mock	60	49-74
2	stim	CMV	64	49-78
2	ustim	mock	38	35-41
2	ustim	CMV	33	32-34
4	stim	mock	46	38-64
	stim	CMV	66	46-86
4	ustim	mock	41	40-44
4	ustim	CMV	45	33-56

Tabell 8: Det er i dette oppsettet et utgangspunkt på 36 pg/ml MCP-1. Man ser at de allostimulerte cellene har en svak tendens til økt mengde detekterbart MCP-1 på dag 1, 2 og 4, sammenliknet med de ustimulerte cellene. Det er ingen nevneverdig forskjell i MCP-1 mellom de HCMV-infiserte og de ikke-infiserte cellene.

5.4.5 Resultater HUVEC supernatant, Fraktalkin

Dag	stim/ustim	CMV/MOCK	Median (pg/ml)	Range (pg/ml)
0			318	NA
1	stim	mock	1809	513-1883
1	stim	CMV	2507	1534-3481
1	ustim	mock	423	NA
1	ustim	CMV	min	min
2	stim	mock	3503	2434-4572
2	stim	CMV	3013	767-5259
2	ustim	mock	min	min
2	ustim	CMV	min	min
4	stim	mock	3547	2150-4945
4	stim	CMV	3463	1528-5398
4	ustim	mock	320	NA
4	ustim	CMV	min	min

Tabell 9: HUVEC hadde et utgangspunkt på ca. 0,3ng/ml fraktalkin. På dag 1, 2 og 4 ser man en økning i mengden detekterbart fraktalkin i de allostimulerte cellene i forhold til de

ustimulerte, som holder seg tilnærmet likt utgangspunktet. Det er ingen nevneverdig forskjell i fraktalkinkonsentrasjonen hos de HCMV-infiserte cellene i forhold til de ikke-infiserte. Der hvor fraktalkin ikke var detekterbart, er kolonnen markert med ”min”. Oppsett som kun har vært gjennomført en gang, har markeringen NA i range kolonnen.

5.4.6 Resultater HUVEC supernatant MCP-1

Dag	stim/ustim	CMV/MOCK	Median (pg/ml)	Range (pg/ml)
0			15425	14550-19750
1	stim	mock	104250	34925-129750
1	stim	CMV	61087	34925-87250
1	ustim	mock	2345	1615-3220
1	ustim	CMV	2840	2275-3405
2	stim	mock	243000	2325-306500
2	stim	CMV	77000	43900-113250
2	ustim	mock	4115	2850-5330
2	ustim	CMV	2882	2565-3200
4	stim	mock	143250	108500-178000
4	stim	CMV	165625	133250-198000
4	ustim	mock	7785	7735-9350
4	ustim	CMV	7970	7175-8765

Tabell 10: I disse oppsettene var utgangspunktet på dag 0 ca. 15,4 ng/ml MCP-1. På dag 1, 2 og 4 var det en økning i MCP-1 hos de allostimulerte cellene i forhold til de ustimulerte cellene. De ustimulerte cellene ser ut til å ha en svak nedgang i MCP-1 utover i dette oppsettet. Det er ingen entydig forskjell mellom i HCMV-infiserte og de ikke-infiserte cellene, verken i den allostimulerte gruppen eller den ustimulerte gruppen.

5.4.7 Resultater HUVEC lysater, Fraktalkin

Dag	stim/ustim	CMV/MOCK	Median (pg/ml)	Range (pg/ml)
0			2451	2295-2845
1	stim	mock	2615	2350-2615
1	stim	CMV	2772	2715-2830
1	ustim	mock	2115	1398-2291
1	ustim	CMV	2239	2233-2245
2	stim	mock	2508	2616-2705
2	stim	CMV	2893	2674-3113
2	ustim	mock	2338	2207-2565
2	ustim	CMV	2734	2623-2846
4	stim	mock	3011	2698-3064
4	stim	CMV	3034	2770-3298
4	ustim	mock	2279	1771-2789
4	ustim	CMV	2905	2811-3000

Tabell 11: HUVEC har som utgangspunkt ca 2,4 ng/ml fraktalkin på dag 0. Utover i forsøket er det ingen nevneverdig endring i fraktalkin, verken mellom de allostimulerte og ustimulerte cellene eller mellom de HCMV-infiserte og ikke-infiserte cellene.

5.4.8 Resultater HUVEC lysater, MCP-1

Dag	stim/ustim	CMV/MOCK	Median (pg/ml)	Range (pg/ml)
0			50	NA
1	stim	mock	551	540-1074
1	stim	CMV	716	618-814
1	ustim	mock	44	NA
1	ustim	CMV	48	NA
2	stim	mock	567	355-744
2	stim	CMV	552	337-768
2	ustim	mock	60	57-62
2	ustim	CMV	25	NA
4	stim	mock	272	113-337
4	stim	CMV	229	156-303
4	ustim	mock	117,5	116-119
4	ustim	CMV	101,5	100-103

Tabell 12: I dette oppsettet var utgangspunktet på dag 0 ca. 50 pg/ml MCP-1. På dag 1 og 2 ser man ingen endring i MCP-1 hos de ustimulerte cellene. Det er en svak økning på dag 4 hos de ustimulerte cellene. De allostimulerte cellene har en økning i mengden detekterbart MCP-1 på dag 1, 2 og 4. Det er ingen nevneverdig forskjell i mengden MCP-1 hos HCMV-infiserte cellene vs ikke-infiserte celler. Oppsett som er gjennomført en gang har NA markert i range kolonnen.

6.0 Diskusjon

I denne studentoppgaven hadde vi til hensikt å se nærmere på endotelcellers produksjon og ekspresjon av de HCMV US28-bindende kjemokinene fraktalkin og MCP-1 i normal tilstand, og etter aktivering med allostimulert PBMC supernatant. I tillegg ville vi undersøke om infeksjon av endotelcellene med HCMV førte til endring av produksjon og/eller ekspresjon av fraktalkin og MCP-1. For å undersøke overflateekspresjon av fraktalkin og MCP-1, tok vi i bruk flow cytometri. ELISA ble brukt for å undersøke mengden fraktalkin og MCP-1 i supernatanter og lysater fra endotelcellene. Supernatantene gjenspeiler endotelcellenes utskillelse av kjemokinene, mens lysatene gjenspeiler endotelcellenes endogene produksjon av kjemokinene. I våre forsøk ble det anvendt primære endotelceller (HUVEC) samt

endotelcellelinjen HMEC. Begge celletypene ble dyrket og senere høstet på dag 0, 1, 2 og 4 etter infeksjon med HCMV eller mock. Flow cytometri ble gjort på begge celletyper under like betingelser, dvs. med og uten allostimulering og med og uten HCMV infeksjon. Vi benyttet oss av det kliniske virusisolatet HCMV 2006 i denne oppgaven. Dette virusisolatet har tidligere vært anvendt ved flere studier ved instituttet. HCMV-infeksjon i cellene ble bekreftet ved påvisning av viral nukleinsyre med PCR og ved påvisning av virusproteiner med immuncytokjemi.

Allostimuleringen brukt i dette forsøket kom fra to CMV negative givere. Slik allostimulering fører til aktivering av leukocytter (monocytter og lymfocytter) fra de to givene slik at cellene produserer et panel av cytokiner og andre faktorer. Når endotelcellene utsettes for en slik supernatant vil de bli aktivert og dette var ment å etterlikne cytokinprofilen ved infeksjon in vivo. Det viste seg at det var vanskeligere å dyrke frem endotelceller i den allostimulerte gruppen, i forhold til den ustimulerte gruppen. Allostimuleringen kan ha hatt en cytotoxisk effekt på cellene.

En svakhet ved forsøkene var at det ble gjort relativt få repetisjoner av hver enkel betingelse. Under forsøkene ble det fokusert på å gjøre flere oppsett med ulike betingelser, i stedet for flere repetisjoner av noen få utvalgte betingelser. Tanken bak dette var å få størst mulig læringsverdi av ulike laboratorieteknikker for undertegnede. Med få repetisjoner er det vanskelig å konkludere i forhold til de hypotesene vi ønsket å undersøke og resultatene lar seg ikke statistisk behandle. HMEC og HUVEC er endotelceller med ulike egenskaper. HUVEC er den celletypen som mest likner in vivo tilstanden i menneskekroppen, mens HMEC er en cellelinje som står lenger fra forholdene in vivo. På den annen side er HMEC lettere å dyrke og behandle i laboratoriet.

Våre studier viste at både HMEC og HUVEC til en viss grad uttrykte fraktalkin og MCP-1 på overflaten, men at denne membranekspresjonen ikke syntes å bli påvirket av cellulær aktivering eller HCMV-infeksjon. I cellelysater vil man gjenfinne summen av hhv fraktalkin og MCP-1 intracellulært og i cellemembranen. I overensstemmelse med observasjoner gjort ved bruk av flow cytometri, kunne vi påvise både fraktalkin og MCP-1 i cellelysater, både i HMEC og HUVEC. Aktivering av endotelet syntes ikke å ha innvirkning på konsentrasjonen av fraktalkin og MCP-1, med unntak av MCP-1 i HUVEC, der aktivering førte til gjennomgående høyere verdier.

Aktivering av endotelet førte til betydelig økt konsentrasjon av MCP-1 i supernatanter, både fra HMEC- og HUVEC-kulturer. Det samme var tilfelle for fraktalin i supernatanter fra HUVEC-kulturer, mens fraktalkin i supernatant fra HMEC-kulturer ikke var målbart. Begge typene av endotelceller uttrykte kjemokinene fraktalkin og MCP-1 i normal tilstand og etter aktivering. Disse cellene kan derfor være i stand til å binde HCMV-infiserte celler via den virale resptoren US28.

Aktivering av endotelcellene førte i særlig grad til økt utskillelse av både fraktalkin og MCP-1 uten at cellulært innhold (lysate) eller ekspressjon syntes å endre seg vesentlig. Slik økt utskillelse der infeksjon pågår kan tenkes å føre til at løslig fraktalkin og MCP-1 binder US28 på leukocytter og dermed hemmer opptak av HCMV i endotelcellene. HCMV-infeksjon av endotelcellene så ikke ut til å påvirke cellenes utskillelse, produksjon eller overflateekkspressjon av fraktalkin eller MCP-1.

Som del av videre studier knyttet til disse problemstillingene, ville det være aktuelt å studere interaksjon mellom på forhånd HCMV-infiserte leukocytter og endotelceller under ulike aktiveringsbetingelser med påfølgende undersøkelser av endotelet med henblikk på opptak av HCMV. Deretter kunne det samme gjentas under tilstedeværelse av blokkerende antistoffer mot hhv fraktalkin og MCP-1.

7.0 Referanser

- (1) **STREBLOW DN, SODERBERG-NAUCLER C, VIEIRA J, SMITH P, WAKABAYASHI E, RUCHTI F ET AL. THE HUMAN CYTOMEGALOVIRUS CHEMOKINE RECEPTOR US28 MEDIATES VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL MIGRATION. CELL 1999; 99(5):511-520.**
- (2) **LELAND DS. CLINICAL VIROLOGY. 2006.**
- (3) **MONA HOLBERG-PETERSEN. INTERACTION BETWEEN HUMAN CYTOMEGALOVIRUS AND HOST CELLS. EFFECT ON CELLULAR FUNCTIONS RELATED TO ANTIMICROBIAL HOST DEFENCE. 2006.**
- (4) **MARCO RESCHKE. BIOGRAFIX . 1997.**
REF TYPE: ART WORK
- (5) **STENBERG RM, KERRY JA. CYTOMEGALOVIRUS GENES: THEIR STRUCTURE AND FUNCTION. SCAND J INFECT DIS SUPPL 1995; 99:3-6.**

- (6) **SINDRE H, ROLLAG H, DEGRE M, HESTDAL K. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INDUCED INHIBITION OF HEMATOPOIETIC CELL LINE GROWTH IS INITIATED BY EVENTS TAKING PLACE BEFORE TRANSLATION OF VIRAL GENE PRODUCTS. ARCH VIROL 2000; 145(1):99-111.**
- (7) **SINDRE H, TJOONNFJORD GE, ROLLAG H, RANNEBERG-NILSEN T, VEIBY OP, BECK S ET AL. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS SUPPRESSION OF AND LATENCY IN EARLY HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS. BLOOD 1996; 88(12):4526-4533.**
- (8) **FISH KN, SODERBERG-NAUCLER C, MILLS LK, STENGLEIN S, NELSON JA. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS PERSISTENTLY INFECTS AORTIC ENDOTHELIAL CELLS. J VIROL 1998; 72(7):5661-5668.**
- (9) **SINDRE H, TJOONNFJORD GE, ROLLAG H, RANNEBERG-NILSEN T, VEIBY OP, BECK S ET AL. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS SUPPRESSION OF AND LATENCY IN EARLY HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS. BLOOD 1996; 88(12):4526-4533.**
- (10) **LANDINI MP, LAZZAROTTO T, XU J, GEBALLE AP, MOCARSKI ES. HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO PROTEINS OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS LATENCY-ASSOCIATED TRANSCRIPTS. BIOL BLOOD MARROW TRANSPLANT 2000; 6(2):100-108.**
- (11) **PROSCH S, DOCKE WD, REINKE P, VOLK HD, KRUGER DH. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS REACTIVATION IN BONE-MARROW-DERIVED GRANULOCYTE/MONOCYTE PROGENITOR CELLS AND MATURE MONOCYTES. INTERVIROLOGY 1999; 42(5-6):308-313.**
- (12) **ULBRECHT M, MARTINOZZI S, GRZESCHIK M, HENGEL H, ELLWART JW, PLA M ET AL. CUTTING EDGE: THE HUMAN CYTOMEGALOVIRUS UL40 GENE PRODUCT CONTAINS A LIGAND FOR HLA-E AND PREVENTS NK CELL-MEDIATED LYSIS. J IMMUNOL 2000; 164(10):5019-5022.**
- (13) **KOTENKO SV, SACCANI S, IZOTOVA LS, MIROCHNITCHENKO OV, PESTKA S. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS HARBORS ITS OWN UNIQUE IL-10 HOMOLOG (CMVIL-10). PROC NATL ACAD SCI U S A 2000; 97(4):1695-1700.**
- (14) **BILLSTROM MA, LEHMAN LA, SCOTT WG. DEPLETION OF EXTRACELLULAR RANTES DURING HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION OF ENDOTHELIAL CELLS. AM J RESPIR CELL MOL BIOL 1999; 21(2):163-167.**
- (15) **BODAGHI B, JONES TR, ZIPETO D, VITA C, SUN L, LAURENT L ET AL. CHEMOKINE SEQUESTRATION BY VIRAL CHEMORECEPTORS AS A NOVEL VIRAL ESCAPE STRATEGY: WITHDRAWAL OF CHEMOKINES FROM THE ENVIRONMENT OF CYTOMEGALOVIRUS-INFECTED CELLS. J EXP MED 1998; 188(5):855-866.**
- (16) **STREBLOW DN, SODERBERG-NAUCLER C, VIEIRA J, SMITH P, WAKABAYASHI E, RUCHTI F ET AL. THE HUMAN CYTOMEGALOVIRUS CHEMOKINE RECEPTOR US28 MEDIATES VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL MIGRATION. CELL 1999; 99(5):511-520.**

- (17) DWORSKY M, YOW M, STAGNO S, PASS RF, ALFORD C. CYTOMEGALOVIRUS INFECTION OF BREAST MILK AND TRANSMISSION IN INFANCY. **PEDIATRICS** 1983; 72(3):295-299.
- (18) PASS RF. EPIDEMIOLOGY AND TRANSMISSION OF CYTOMEGALOVIRUS. **J INFECT DIS** 1985; 152(2):243-248.
- (19) SKAR AG, HODDEVIK G. PREVALENCE OF CYTOMEGALOVIRUS ANTIBODIES IN NORWEGIAN KIDNEY-TRANSPLANT RECIPIENTS AND THEIR LIVING DONORS. A COMPARATIVE STUDY OF TWO DIFFERENT METHODS. **ACTA PATHOL MICROBIOL IMMUNOL SCAND [B]** 1984; 92(1):1-5.
- (20) ZAIA JA. EPIDEMIOLOGY AND PATHOGENESIS OF CYTOMEGALOVIRUS DISEASE. [REVIEW] [25 REFS]. **SEMINARS IN HEMATOLOGY** 27(2 SUPPL 1):5-10; DISCUSSION 28-9, 1990.
- (21) PASS RF. EPIDEMIOLOGY AND TRANSMISSION OF CYTOMEGALOVIRUS. **J INFECT DIS** 1985; 152(2):243-248.
- (22) ZAIA JA. EPIDEMIOLOGY AND PATHOGENESIS OF CYTOMEGALOVIRUS DISEASE. [REVIEW] [25 REFS]. **SEMINARS IN HEMATOLOGY** 27(2 SUPPL 1):5-10; DISCUSSION 28-9, 1990.
- (23) ZAIA JA. EPIDEMIOLOGY AND PATHOGENESIS OF CYTOMEGALOVIRUS DISEASE. [REVIEW] [25 REFS]. **SEMINARS IN HEMATOLOGY** 27(2 SUPPL 1):5-10; DISCUSSION 28-9, 1990.
- (24) ZAIA JA. EPIDEMIOLOGY AND PATHOGENESIS OF CYTOMEGALOVIRUS DISEASE. [REVIEW] [25 REFS]. **SEMINARS IN HEMATOLOGY** 27(2 SUPPL 1):5-10; DISCUSSION 28-9, 1990.
- (25) AHLFORS K, IVARSSON SA, HARRIS S. REPORT ON A LONG-TERM STUDY OF MATERNAL AND CONGENITAL CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN SWEDEN. REVIEW OF PROSPECTIVE STUDIES AVAILABLE IN THE LITERATURE. **SCAND J INFECT DIS** 1999; 31(5):443-457.
- (26) SAGEDAL S, NORDAL KP, HARTMANN A, DEGRE M, HOLTER E, FOSS A ET AL. A PROSPECTIVE STUDY OF THE NATURAL COURSE OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION AND DISEASE IN RENAL ALLOGRAFT RECIPIENTS. **TRANSPLANTATION** 2000; 70(8):1166-1174.
- (27) SAGEDAL S, NORDAL KP, HARTMANN A, DEGRE M, HOLTER E, FOSS A ET AL. A PROSPECTIVE STUDY OF THE NATURAL COURSE OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION AND DISEASE IN RENAL ALLOGRAFT RECIPIENTS. **TRANSPLANTATION** 2000; 70(8):1166-1174.
- (28) AUKRUST P, FROLAND SS, KVALE D, EGGE K, FARSTAD IN, HOLTER E ET AL. [SYMPTOMATIC CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN PATIENTS WITH ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME]. **TIDSSKR NOR LAEGEFOREN** 1991; 111(28):3379-3384.

- (29) SAGEDAL S, NORDAL KP, HARTMANN A, DEGRE M, HOLTER E, FOSS A ET AL. A PROSPECTIVE STUDY OF THE NATURAL COURSE OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION AND DISEASE IN RENAL ALLOGRAFT RECIPIENTS. *TRANSPLANTATION* 2000; 70(8):1166-1174.
- (30) SAGEDAL S, NORDAL KP, HARTMANN A, DEGRE M, HOLTER E, FOSS A ET AL. A PROSPECTIVE STUDY OF THE NATURAL COURSE OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION AND DISEASE IN RENAL ALLOGRAFT RECIPIENTS. *TRANSPLANTATION* 2000; 70(8):1166-1174.
- (31) EVANS PC, COLEMAN N, WREGHITT TG, WIGHT DG, ALEXANDER GJ. CYTOMEGALOVIRUS INFECTION OF BILE DUCT EPITHELIAL CELLS, HEPATIC ARTERY AND PORTAL VENOUS ENDOTHELIUM IN RELATION TO CHRONIC REJECTION OF LIVER GRAFTS. *J HEPATOL* 1999; 31(5):913-920.
- (32) DE MAAR EF, KAS-DEELEN AM, VAN DER MARK TW, THE TH, TEGZESS AM, PLOEG RJ ET AL. CYTOMEGALOVIRUS PNEUMONITIS AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION IS NOT CAUSED BY PLUGGING OF CYTOMEGALIC ENDOTHELIAL CELLS ONLY. *TRANSPL INT* 1999; 12(1):56-62.
- (33) SINDRE H, TJOONNFJORD GE, ROLLAG H, RANNEBERG-NILSEN T, VEIBY OP, BECK S ET AL. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS SUPPRESSION OF AND LATENCY IN EARLY HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS. *BLOOD* 1996; 88(12):4526-4533.
- (34) SINDRE H, ROLLAG H, OLAFSEN MK, DEGRE M, HESTDAL K. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INDUCES APOPTOSIS IN THE HEMATOPOIETIC CELL LINE MO7E. *APMIS* 2000; 108(3):223-230.
- (35) MIELCAREK M, GRAF L, JOHNSON G, TOROK-STORB B. PRODUCTION OF INTERLEUKIN-10 BY GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR-MOBILIZED BLOOD PRODUCTS: A MECHANISM FOR MONOCYTE-MEDIATED SUPPRESSION OF T-CELL PROLIFERATION. *BLOOD* 1998; 92(1):215-222.
- (36) NORDOY I. CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN THE ADULT IMMUNOCOMPROMISED PATIENT. 2000.
- (37) SCHALL T. FRACTALKINE -- A STRANGE ATTRACTOR IN THE CHEMOKINE LANDSCAPE. *IMMUNOL TODAY* 1997; 18(4):147.
- (38) KRISHNASWAMY G, KELLEY J, YERRA L, SMITH JK, CHI DS. HUMAN ENDOTHELIUM AS A SOURCE OF MULTIFUNCTIONAL CYTOKINES: MOLECULAR REGULATION AND POSSIBLE ROLE IN HUMAN DISEASE. [REVIEW] [138 REFS]. *JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH* 1999;(2):91-104.
- (39) KLEDAL TN, ROSENKILDE MM, SCHWARTZ TW. SELECTIVE RECOGNITION OF THE MEMBRANE-BOUND CX3C CHEMOKINE, FRACTALKINE, BY THE HUMAN CYTOMEGALOVIRUS-ENCODED BROAD-SPECTRUM RECEPTOR US28. *FEBS LETT* 1998; 441(2):209-214.
- (40) KLEDAL TN, ROSENKILDE MM, SCHWARTZ TW. SELECTIVE RECOGNITION OF THE MEMBRANE-BOUND CX3C CHEMOKINE, FRACTALKINE, BY THE HUMAN

**CYTOMEGALOVIRUS-ENCODED BROAD-SPECTRUM RECEPTOR US28. FEBS LETT
1998; 441(2):209-214.**