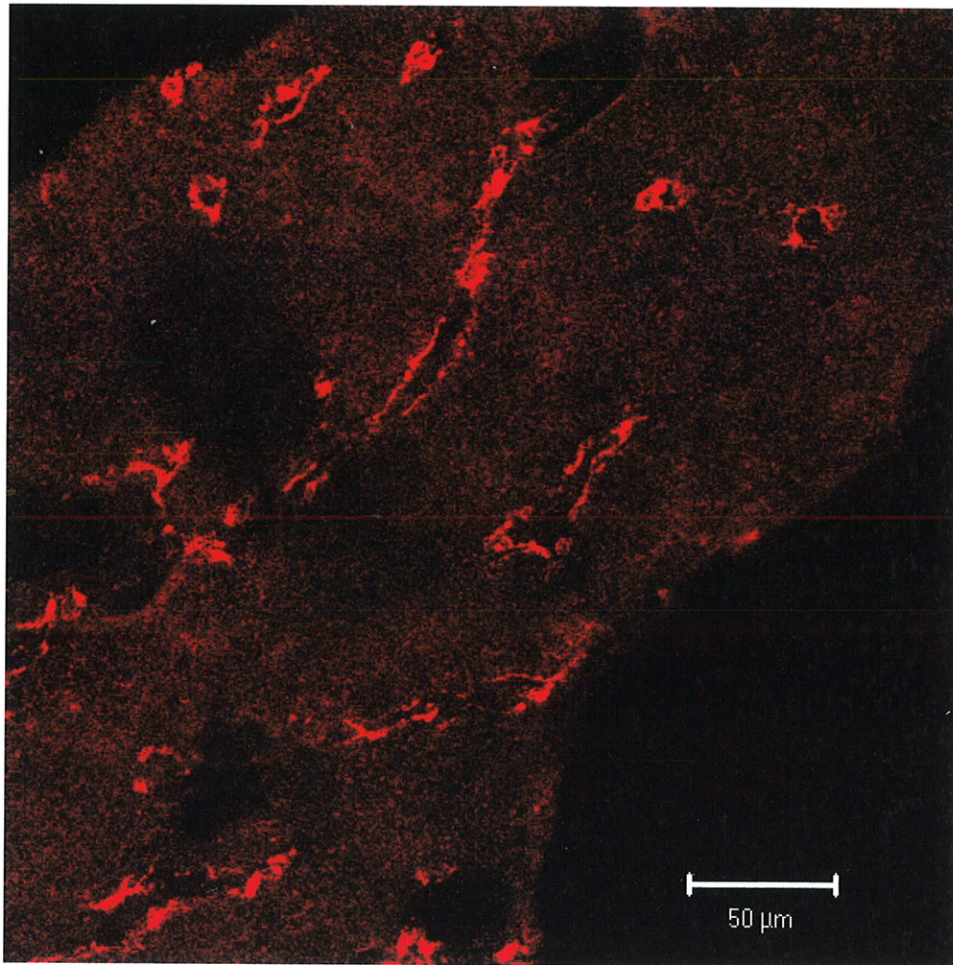


STABILIN

-uttrykk av reseptoren i beinmarg og på hematopoietiske celler



5. års oppgave stadium IV
Lisa Bjerke med. Kull 99
Veileder: Inger Marie S. Dahl
Tromsø vår 2004

	RESYME	3
	INTRODUKSJON	4
	MATERIALE	6
	METODER	6
Western Blot:		6
Indirekte fluorescensmikroskopi:		6
Flowcytometri:		7
	PROTOKOLLER FOR DE ULIKE TEKNIKKENE	7
Western blot:		7
Indirekte fluorescensmikroskopi av beinmargssnitt:		9
Flow cytometri:		11
	RESULTAT	11
Western blot:		11
Fluorescens mikroskopi		11
Flow cytometri		13
	DISKUSJON	13
Western blot:		13
Indirekte fluoresensmikroskopi		14
Flow cytometri		15
	KONKLUSJON	16
	RESULTATER WESTERN BLOT	17
	RESULTATER FRA INDIREKTE FLUORESCENSMIKROSKOPI	17
	RESULTATER FRA FLOWCYTOMETRI	18
	REFERANSELISTE	19

Resyme

Stabilin er en nyoppdaget reseptor for hyaluronan. Stabilin er påvist i sinusoidalt endotel i organer som lever, milt og lymfeknuter samt i aktiverte makrofager hos mus (1).

Hyaluronan opptrer i økte konsentrasjoner i blod ved flere patologiske tilstander, blant annet myelomatose.(2)

Formålet med oppgaven har vært å påvise uttrykk av reseptoren Stabilin i humane beinmargsprøver. Materialet består av 85 beinmargsbiosier støpt i parafin, og cellesuspensjon fra beinmarg og perifert blod. Prøvene er fra pasienter med ulike hematopoetiske lidelser samt friske kontroller. Tilleggsmateriale er fryse- og parafinsnitt fra beinmarg hos mus.

I dette arbeidet ble det brukt tre ulike metoder for å påvise Stabilin-1 og 2.

1) Western blot:

Beinmargssuspensjoner ble kjørt gjennom gel og farget med spesifikke antistoffer for Stabilin-1 og 2. Det ble påvist spesifikke bånd for Stabilin -1 og 2. Western blot kan ikke si noe om mengden protein til stede i de ulike prøvene. Utvalget var også for lite til å trekke noen konklusjoner om forskjeller mellom kontrollene og de patologiske cellesuspensjonene. Konklusjonen er at man kan påvise Stabilin-1 og 2 i human beinmarg og perifert blod.

2) Indirekte fluorescensmikroskopi:

Arbeidet gikk ut på å finne en metode til bruk på parafinfikserte beinmargssnitt fra mus, som deretter kunne appliseres til bruk på de humane beinmargssnittene. Disse skulle så undersøkes med indirekte fluorescensmikroskopi. Man klarte ikke å finne en egnet metode og det ble derfor umulig å påvise stabilin i de humane beinmargsbiosiene. På frysensnitt fra beinmarg hos mus ble det imidlertid påvist kraftig fluorescens i sinusoidene, noe som tyder på uttrykk av Stabilin-2 her. Det er teknisk ikke mulig å lage frysensnitt fra humane beinmargsbiosier til dette formål.

3)Flow cytometri:

Ble utført i samarbeid med Herlev sykehus i Danmark. Foreløpige undersøkelser fra én myelomatosepasient viser at 17 % av de maligne myelomatosecellene uttrykker stabilin-1 på overflaten. B- of T-celler fra samme pasient uttrykker ikke Stabilin. Dette funnet gjør at det blir interessant å jobbe videre med denne problemstillingen. Det gjenstår å kartlegge uttrykket hos friske kontroller. Testen må gjentas med mange flere prøver fra myelomatosepasienter før man kan trekke noen konklusjoner.

Introduksjon

Hyaluronan (hyaluronic acid: HA) er et stort polysakkarid med en enkel kjemisk struktur bestående av repeterende disakkaridenheter av N-acetyl-D-glucosamin og D-glucuronsyre festet med $\beta(1-4)$ og $\beta(1-3)$ glycosidbindinger.(3) HA er blitt påvist i alle studerte organer og kroppsvæsker hos virveldyr. HA ble tidligere sett på som et inert biologisk material. De siste 15 årene har det imidlertid blitt klart at HA er essensielt for føtal utvikling, det binder spesifikt til reseptorer og andre ekstracellulær matriks (ECM) komponenter og syntesen oppreguleres i inflammatoriske tilstander og ved celleproliferasjon (4).

Akkumulasjon av HA i ECM skjer tidlig i vevsreparasjonsprosessen . Ved visse sykdommer som rheumatoid artritt, osteoartritt, levercirrose, Werner syndrom, nyresvikt, psoriasis og ulike maligne sykdommer er nivået av HA i serum elevert (3). Biosyntesen av HA er regulert av ulike faktorer som inflammatoriske mediatorer, hormoner og vekstfaktorer. ECM i beinmarg er avgjørende for hvilken retning de hematopoietiske progenitorcellene skal utvikle seg. Hvilken betydning HA har i denne prosessen er uavklart. Maligne cellers mulighet til å overvinne kroppens forsvar og spre seg er avhengig av deres evne til å binde seg til vevets matriks, deres proliferasjonsevne, migrasjonsevne, evnen til å invadere vev og til å danne metastaser. HA kan spille en rolle i alle disse trinnene (5). HA-bindende reseptorer på cellenes overflate er viktig for celle-celle- og celle-matriks interaksjoner, og dermed for cellens evne til migrasjon og for spredning av maligne celler.

Eliminasjonen av HA i friske individer skjer hovedsakelig ved katabolisme på tre nivåer: Lokal degradering i vev der HA syntetiseres, katabolisme i lymfeknuter og opptak fra blod . Hoveddelen av HA i blodet tas opp og elimineres i leveren, det resterende tas opp i milt, nyrer og beinmarg. Opptak av HA fra blodet er viktig for å opprettholde en akseptabel blodviskositet.(3)

Det er påvist flere ulike reseptorer som binder HA. Et eksempel er CD44 på lymfocytter, som også senere er vist på myelomceller (2). RHAMM (reseptor for hyaluronic acid-mediated motility) er et annet eksempel på en HA-reseptor primært assosiert med cellemotilitet (6). I rottelever har det blitt påvist en reseptor i sinusoidene som binder HA Antistoffer mot dette proteinet har vist seg å kunne blokkere HA endocytose i endotelet i leversinusoider (3). Denne hepatiske hyaluronan-clearance-reseptoren har ved senere forsøk vist seg å være identisk med MS-1 (Mouse stabilin-1) antigen. Reseptoren kalles Stabilin og finnes i to former, Stabilin-1

og Stabilin-2. Forsøk viser at Stabilin-2 sannsynligvis hovedsakelig er lokalisert i plasmamembranen mens Stabilin-1 hovedsakelig finnes i cytoplasmiske granuler. Stabilin uttrykkes på alle former for ikke-kontinuerlig endotel, men ikke på kontinuerlig endotel. Ikke-kontinuerlig endotel finnes blant annet i sinusoidene i lever, milt, lymfeknuter og beinmarg.(1)

Stabilin-1 og Stabilin-2 er begge multidomene-proteiner med syv fascilindomener, flere epidermal growth factor-like domener og et enkelt X-linket domene. Det er det X-linkede domenet som hovedsakelig er ansvarlig for binding av HA. Proteinet har en kort transmembran region nær den C-terminale enden. Stabilin-1 har en molekylvekt på ca 275 kD, Stabilin-2 273 kD dedusert ut fra aminosyresekvensen.(1)

Det er vist at HA's nivå i serum kan anvendes som markør ved maligne lidelser, som myelomatose (4) og at konsentrasjonen av HA i plasma fra beinmarg er konstant høyere enn i plasma fra perifert blod (Dahl, C.P. 5. årsoppgave UiTØ). Differansen synes å være størst ved B-celle lidelser.

Det ville vært av stor interesse å undersøke dette nærmere.

De viktigste terapeutiske framskritt i forhold til hematopoietiske lidelser de siste år er utvikling av såkalt "target therapy", der antistoffer eller enzymhemmere setter i gang en kaskade av reaksjoner etter å ha blitt bundet til reseptorer på celleoverflaten. Å kartlegge disse reseptorene ved ulike hematologiske lidelser og i ulike stadier av hematopoietiske cellers utvikling kan derfor også være av stor klinisk betydning.

For å kartlegge stabilinreseptorens uttrykk i beinmarg og for å undersøke om de hematopoietiske cellene uttrykker denne reseptoren, eventuelt når i cellenes utvikling dette skjer, har vi valgt ulike framgangsmåter.

A) Ved hjelp av western blot ønsket vi å påvise Stabilin-1 og 2 i human beinmarg og perifert blod. Annen forskning omkring denne reseptoren har konsentrert seg om uttrykket i levervev. Vi ønsket også å se om det fantes noen klare forskjeller mellom patologiske og normale prøver.

B) Beinmargsprøver støpt i parafin som og farget for HA var tilgjengelige. Disse ble snittet. Her ønsket vi å se om uttrykk av reseptoren korrelerte med mengden HA til stede. Her manglet vi imidlertid en god metode for farging av snitt, og en del av arbeidet gikk dermed ut på å forsøke å finne en egnet metode.

C) Ved hjelp av flow cytometri ønsket vi å se hvilke hematopoietiske celler som eventuelt uttrykker Stabilin. Vi ønsket også å se om reseptoruttrykket endrer seg ved maligne blodsykdommer, da spesielt B-celle lidelser.

Materiale

Western blot:

Beinmargssuspensjoner og peifert blod fra 85 pasienter med hematopoietiske lidelser samt friske kontroller.

Indirekte fluorescensmikroskopi:

Parafinblokker med beinmargsbiosier fra 85 pasienter med hematopoietiske lidelser samt friske kontroller. Frysesnitt og parafinsnitt fra femur fra mus.

Flow cytometri:

Beinmargsceller fra pasient med myelomatose. (myelom B- og T-celler)

Metoder

Western Blot:

Prøvene ble forbehandlet og fortynnet til standard konsentrasjon på 5µg/µl. De ble deretter kjørt på SDS-PAGE geler ved 100V. Blottene ble farget med spesifikt primært antistoff og sekundært antistoff og deretter fotografert. Målet var å se etter spesifikke bånd for stabilin-1 og 2 og se om det var noen klar forskjell mellom prøvene med patologiske og friske celler.

Indirekte fluorescensmikroskopi:

Det fantes 85 patologiske beinmargsnitt fra mennesker tilgjengelig som eventuelt kunne undersøkes med henblikk på ulik uttrykk av Stabilin ved ulike hematopoietiske sykdommer. Snittene ble forbehandlet ulikt, avhengig av om det gjelder frysesnitt eller parafinsnitt. (konferer med avsnittet "Protokoller" for mer om de ulike teknikkene). Deretter farges de med

et antistoff spesifikt for Stabilin. Snittene farges på nytt med et antistoff rettet mot Fc delen på det spesifikke antistoffet. Dette sekundære antistoffet har bundet et fluorokrom. I dette forsøket ble Cy3 (Indocarbocyanine) brukt. Fluorokromet eksiteres ved en gitt bølgelengde og avgir lys i en annen bestemt bølgelengde. Dette lyset kan ses i fluorescensmikroskopet og angir hvor i snittet stabilin finnes.

Flowcytometri:

Ved flow cytometri kan det samles data fra store mengder enkeltceller i væskesuspensjon. Metoden er derfor godt egnet for analyse av blodceller. Cellene treffes en og en av laserstråler. Ved hjelp av sensorer registreres side scatter og forward scatter som forenklet sier noe om henholdsvis overflaten og størrelsen til den enkelte celle. I tillegg kan cellene farges med ulike fluorokromer bundet til spesifikke antistoffer mot overflatemarkører. Lysemisjonen registreres av sensorer. Sammenholder man disse data for hver enkelt celle kan man danne seg et bilde av hvilke celler som uttrykker hvilke reseptorer.

Protokoller for de ulike teknikkene

Western blot:

Protokoll for leukemicelle preparering og analyse

- 1) Skrap av ca 100 µl frossen cellesuspensjon med en spatel og overfør til et eppendorfrør med 200 µl RIPA buffer med protease inhibitor og vanadate.
- 2) Bland cellesuspensjonen/RIPa blandinga med en 200 µl pipettespiss med enden kuttet av.
- 3) DNA brytes opp ved at prøven dras opp i en 1 ml sprøyte med en 25/26 gauge nål. Er det mye DNA starter enn med en mindre nål for så å øke i størrelse. Ideeen er å bryte opp DNA slik at prøven senere kan appliseres på en SDS-PAGE gel.
- 4) Prøven sentrifugeres på 10000g i 20 min.
- 5) Dekanter og behold supernatanten. Kast bunnfallet. Frys prøven ved -20 grader, eller lavere, eller gå direkte til punkt 6.

- 6) Bestem proteinkonsentrasjonen ved å bruke Biorad Detergent Compatible Protein Assay. Prøvene trenger muligens å fortynnes 50-100 ganger for å komme innenfor assayets standardkurve.
- 7) Allikver alle prøvene til en endelig proteinkonsentrasjon på 5 mg/ml (i RIPA + PI + vanadate) og lagre ved -20 grader C eller lavere, eller fortsett direkte til punkt 8.
- 8) Kjør 10 µl av hver prøve (= 50 µg protein) plus 5 µl sample buffer på SDS- PAGE geler ved 100 V konstant spenning. På samme gel kjøres standard.
- 9) Overfør proteinene til nitrocellulose i blotte-apparat. Bruk 25 V og 1mA/cm² maksimalt.
- 10) Blokk membranen med 10% tørrmelk i TBS/ 0,05 % Tween -20 (=TBS-T) over natt ved 4 grader på en rokkeplattform.. Blottet kan lagres slik ved 4 grader hvis 0,01 % NaN₃ tilsettes blokkebufferen. Brukes innen 1-2 uker.
- 11) Vask blottet en gang med TBS-T
- 12) Inkuber blottet med primært antistoff i fortynning 1:100 eller lavere avhengig av antistoffet i TBS-T/10% melk i 2-4 timer ved romtemperatur.
- 13) Vask blott med TBS-T (minst 20 ml) i romtemperatur slik
 - i) 3 raske vask
 - ii) 1 x 10 min vask på rokkeplattform
 - iii) 4 x 5 min vask på rokkeplattform
- 14) Inkuber blott med sekundært antistoff (geit-anti- kanin HRP) ved 1:10000 fortynning i TBS-T/ 10% melk, 1 time ved 4 grader.
- 15) Vask blot med TBS-T (minst 20 ml) ved romtemperatur slik
 - i) 4 raske vask
 - ii) 1 x 15 min vask på rokkeplattform
 - iii) 4 x 5 min vask på rokkeplattform
- 16) Fremkall blottet med ECL. Bruk 10 ml 1,25 mM luminol med 0,1 M Trish pH 8,5. Tilsett 100 µl 6,8 mM p-coumaric syre i DMSO og 30 µl 3% H₂O₂. Bland godt og hell over blottet etter at siste vask har blitt helt av. Inkuber i et min og legg blottet i gjennomsiktig plastpose med endene avklippet.
- 17) Blottet fremkalles i Lumianalyst og resultatet lagres på data.
- 18) Blottet skylles 4 ganger i TBS-T og lagres i TBS-T/ 0,01 % NaN₃ for eventuell senere bruk.

Som positiv kontroll ble det brukt leverendotelceller fra rotte og gris som i tidligere forsøk har vist å uttrykke stabilin (3).

Indirekte fluorescensmikroskopi av beinmargssnitt:

Beinmarg fra mus av typen C57B ble anvendt. To av musene var tre måneder gamle, en var tre uker gammel. Av de tre musenes femur ble det laget både frysensnitt og parafinsnitt.

Parafinsnittene ble laget for å finne en egnet antigen-retrieveal metode som senere kunne brukes på de humane paraffin-snittene..

Musene ble avlivet med CO₂. Begge siders femur ble deretter tatt ut. Den ene femur ble lagt på PBS den andre på formalin.

Femur lagt på PBS ble deretter tatt direkte til patologisk avdeling hvor de ble støpt i blokker og frosset i flytende nitrogen. De ble deretter snittet på cryostat. Snittene ble lufttørket i en time for så å fikseres i metanol ved -20 grader celsius i 4 min. Snittene ble oppbevart i fryser ved -70 grader pakket i folie.

For immunofarging ble følgende protokoll fulgt:

- 1) Snittene blokker 1 time i romtemperatur i PBS+10% geiteserum
- 2) Det tilsettes primært antistoff (Rabbit-anti-mouse stab2 cyt.domene P15) ved 1:200 fortynning i PBS+10% geiteserum i 1 time i romtemperatur.
- 3) Snittene vaskes 3x10 min. i PBS/0,05% Tween 20.
- 4) Det tilsettes sekundært antistoff (anti-rabbit Cy3) i 1:400 fortynning i PBS+10% geiteserum. Inkuberes 1 time i romtemperatur i mørket.
- 5) Snittene vaskes 3x10 min. i PBS med 0,05% Tween 20.
- 6) Snittet dyppes raskt i vann, vanddråper fjernes. Det tilsettes en dråpe vannbasert monteringsmedium og dekkglasset settes på.

Femur lagt på formalin ble støpt i paraffinblokker og deretter snittet. Et snitt fra hver mus ble farget med standard hematoxylin eosin farging som kontroll på beinmargsinholdet i snittene.

De parafinfixerte snittene fikk følgende behandling:

- 1) Avparafinisering: Snittene bades i xylen (10 min), 100% etanol (3 min), 96% etanol (3 min), 70 % etanol (3 min) og destillert vann (10 min) i romtemperatur og i denne rekkefølgen.
- 2) "Antigen retrieval". Her ble det brukt 2 ulike metoder.
 - a) Trypsinbehandling: Snittene ble inkubert ved 37 grader celsius i 20 min i en løsning bestående av TBS meg 6 mmol/L CaCl₂ og 1mg/ml trypsin.
Reaksjonen ble avsluttet ved at snittene ble satt i 10 min i PBS ved 4 grader celsius.
 - b) Mikrobølgebehandling i citratbuffer: Det ble laget 10mM Citratbuffer slik:
Stamløsning A: 10,51g sitonsyre (Sigma C-7129, fri syre) og 500 ml destillert vann.
Stamløsning B: 58,82g sitronsyre (Sigma C-7254 trisodiumsalt) og 2000ml destillert vann.
Stamløsningene oppbevares i kjøleskap.
3 ml stamløsning A + 197 ml stamløsning B. Volumet justeres opp til 2000ml med destillert vann. pH i området 7,0-7,3. Ferdig løsning holdbar 1 uke.
- 3) Snittene blokkes i 10 % geitserum i TBS, 1 time i romtemperatur.
- 4) Snittene inkuberes med primært antistoff (Rabbit anti-mouse, stabilin 2 cyt. domene, P15) i fortynning 1:200 i TBS/10% geitserum ved 4 grader celsius over natt.
- 5) Snittene vaskes 3 x 10 min i TBS
- 6) Snittene inkuberes med sekundært antistoff (Goat-anti-rabbit-Cy3) i fortynning 1:400 i 1 time i mørket ved romtemperatur.
- 7) Snittene vaskes 3 x 10 min i TBS
- 8) Snittene dyppes raskt i vann, overflødig vann fjernes med filterpapir. Monteres med Dako fluorescens mounting media og dekkglass.

Det ble for alle snitt laget en kontroll som ikke ble tilsatt primært antistoff for å avsløre uspesifikk binding av sekundært antistoff til fc reseptorer i snittet. Det ble også laget en kontroll som ikke var tilsatt verken primært eller sekundært antistoff for å få et bilde av autofluorescensen i snittet.

Snittene ble sett på under fluorescensmikroskop på immunologisk avdeling. De snittene der metoden hadde gitt resultater ble deretter fotografert ved bruk av Confocal laser scanning

mikroskop. Det ble tatt bilde av kontroller under de samme betingelser som snitt farget etter protokoll.

Flow cytometri:

Demonstrasjon av metode og utstyr på Herlev sykehus. Herlev fikk antistoff mot stabilin-1 og -2 fra Tromsø og utførte flowcytometri som et pilotforsøk på beinmargsprøve fra pasient med myelomatose. Det ble kjørt prøver med både stab-1 og -2. Cellene ble farget med markører spesifikke for de ulike CD antigenene på de ulike blodcellene. CD 3 og CD 19 spesifikke for henholdsvis T og B celler. Myelomceller skiller ut ved at de er CD 38 positive og CD 19 og 45 negative. Prøvene ble derfor også farget med antistoffer spesifikke for disse proteinene.

Resultat

Western blot:

Stabilin-2

Blottene viser et bånd rundt 400 kDa. Det forelå relativt lite protein degradering. Det sees bånd både for beinmargsprøvene og prøvene for perifert blod. Det er sees ingen klar forskjell mellom patologiske og normale prøver. De positive kontrollene med leverendotelceller fra gris og rotte viser spesifikke bånd ved ca 200 kDa. (fig1.1)

Stabilin-1

Her forelå mye degradering, men spesifikt bånd for Stabilin-1 ved ca 200 kDa. Det observeres ingen klar forskjell mellom beinmarg og perifert blod eller mellom de patologiske og normale prøvene. (fig 1.2)

Fluorescens mikroskopi

Målet var å påvise Stabilin ved hjelp av indirekte immunfluorescens på beinmargssnitt. Dette er tidligere blitt gjort på frysensnitt fra mus ved universitetet i Lund. Trinn en var å gjenta forsøket fra Lund. Dersom dette lyktes, ville det arbeides videre med en metode egnet for parafinsnitt fra de samme musene. I tilfelle ville vi fortsette arbeidet med å farge humane parafinsnitt fra beinmarg.

1) Frysensnitt fra mus femur.

Vanlig fluorescensmikroskop med kvikksølvlampe:

Ved alle de ulike fortynningene av antistoff ble det vist klar orange fluorescens i avlange celler som formet ringstruktur, forenelig med sinusoider i beinmarg. Andre, uidentifiserte celler viste også orange fluorescens, men med mye lavere intensitet.

Kontroll uten primært antistoff viste ingen orange fluorescens ved samme betingelser.

Kontroll uten primært eller sekundært antistoff viste ingen orange autofluorescens.

Confocal fluorescensmikroskop:

Her påvises same type sterkt lysende celler, med ikke-lysende cellekjerner (fig 2.1-2.2). I alle fortynninger er intensiteten så sterk at det tyder på overeksponering. Det er derfor umulig å si om antistoffene har bundet strukturer diffust i cytoplasma eller i granuler. Antistoffet har ikke bare bundet seg til plasmamembranen. Det kan sees binding av antistoff til andre, uidentifiserte typer celler. Her er lysintensiteten mye lavere, men heller ikke her kan det avgjøres hvilke intracellulære strukturer antistoffet har bundet seg til. Det ser ikke ut til å være en opphopning av antistoff bundet til plasmamembranen. Kontroll for uspesifikk binding og autofluorescens var negative ved samme betingelser. (Fig 2.3-2.4)

2) Farging av paraffinsnitt fra mus femur

Det ble anvendt ulike former for antigenretrieval teknikk. Ikke ved noen av metodene sees det orange fluorescens i noen celler eller strukturer. Vevsstrukturen var generelt dårligere bevart etter behandlingen enn for frysensnitt. Ved bruk av mikrobølgeovn som antigenretrieval-teknikk var vevsstrukturen ugjenkjennelig.

Det ble også prøvd med ulike former for antistoff mot stabilin. Et av antistoffene har tidligere blitt brukt under farging av parafinsnitt fra rottelever. Ingen av antistoffene gav positivt resultat.

Flow cytometri

Forsøk på beinmargsceller fra myelompasient. Cellene ble farget på overflaten med antistoff for stabilin-1 og 2. Her ble det kun sett positive celler med stabilin-1 farging, og kun på myelomceller. Myelomcellene identifiseres ved at de er CD45 negative og CD 38 positive. Disse cellene gates ut for videre analyse (fig 3.1) 17 % av disse cellene uttrykker stabilin-1. Analyse av de samme cellene med henblikk på stabilin-2 gav negativt resultat. Myelomcellene skilles fra B- og T- celler ved at de kontrolleres mot fluorescens positiv for CD3 (T-celler) og CD19 (B-celler). Myelomcellene var negative for CD3 og CD19. (fig 3.2-3.3). Verken B-celler eller T-celler uttrykte stabilin-1 eller 2.

Diskusjon

Western blot:

Båndene rundt 200 og 400 kDa viser at det er Stabilin-1 og 2 til stede i human beinmarg og blod. Metoden sier ingenting om hvor mye protein som er til stede, annet enn et grovt mål ut fra intensiteten på båndet ,da alle prøvene er fortynnet til å inneholde samme totale proteinmengde.

Det observeres ingen klar forskjell mellom de patologiske og de normale prøvene. Man måtte uansett ha undersøkt flere normale prøver for å danne seg et inntrykk av normaluttrykket av stabilin i blod og beinmarg. Ut fra dette kunne man eventuelt ha sagt noe om forskjeller i forhold til de patologiske prøvene. Det var heller ingen forskjell mellom perifert blod og beinmarg. Ettersom andre deler av arbeidet indikerer at Stabilin hovedsakelig uttrykkes i sinusoidene i beinmarg, forklarer dette funnet av Stabilin i beinmargsprøvene. Det er vanskelig å si hvilke celler i perifert blod som uttrykker Stabilin. Til dette vil flow cytometri være en mer egnet metode, et arbeide vi nå er i gang med.

Det er usikkert hvorfor Stabilin-2 får såpass høy molekylvekt som 400 kDa, noe som er mye høyere enn vekten dedusert ut fra aminosyrefrekvensen (ca 273 kDa). Sannsynligvis skyldes dette glykosylering av proteinet etter translasjonen. I prøvene fra gris- og rotte-leverendotelceller, som ut fra tidligere forsøk har vist seg å være rike på stabilin, sees et bånd på rundt 200 kDa. Årsaken til forskjellene kan være artsspesifikke forskjeller mellom human

Stabilin og Stabilin fra de respektive dyreartene, både når det gjelder antall aminosyrer i proteinet og glykosyleringsgraden.

I prøvene som skulle farges for Stabilin-1, ble det mye degradering (fig 1.2). Årsaken ligger sannsynligvis i at prøvene ble tint før de ble tilsatt proteasehemmer, noe som har ført til degradering. Fig 1.2 illustrere hvordan båndet skulle ha sett ut uten degradering.

Indirekte fluorescensmikroskopi

Under arbeidet ble det prøvd ut ulike framgangsmåter der målet var å påvise Stabilin i human beinmarg ved hjelp av fluorescensmikroskopi. Farging direkte av parafinsnitt med humane beinmargsprøver gav ikke resultat. Ved universitetet i Lund er det påvist Stabilin i sinusoider i beinmarg hos mus i frysensnitt (ikke-publiserte resultater). Med utgangspunkt i dette forsøkte vi å finne en metode for å påvise Stabilin også i parafinsnitt fra mus.

Forsøket startet med å reprodusere funnene fra Lund ved bruk av samme protokoll på frysensnitt fra mus. Dette gav fine resultater med sterk fluorescens i celler tilsvarende sinusoidene i beinmarg. Dette er forenelig med andre studier, som har påvist Stabilin i sinusoidene i blant annet lever, milt og lymfeknuter hos mus (3). Kontroller for autofluoresens (ikke tilsatt antistoffer) og for uspesifikk binding av sekundært antistoff (ikke tilsatt primært antistoff) var negative ved de samme betingelser (fig 2.3-2.4). For å få enda mer pålitelige resultater burde cellekjernen blitt farget med egen farge, slik at vevsstrukturen hadde blitt lettere å kjenne igjen. Antistoffer spesifikke for de ulike beinmargscellene kunne vært brukt for å identifisere de ulike cellene. Dette hadde imidlertid gjort arbeidet for komplisert og tidkrevende. Her er dessuten flow cytometri en bedre metode å bruke. Videre kunne det ha vært prøvd med svakere fortykning av antistoff slik at bildene ikke ble overeksponerte. Det kunne da ha vært påvist om antistoffet bandt strukturer diffust i cytoplasma eller i granuler. Tidligere forsøk tyder på at Stabilin-2 primært finnes i plasmamembranen i endotelcellene (1). Bildene fra fluorescensmikroskopien bekrefter ikke dette, men overeksponering gjør dem, som nevnt, vanskelige å tolke.

En celletype som med rimelig grad av sikkerhet lar seg identifisere pga sin spesielle morfologi og relative størrelse er megakaryocytter. Også her er det fluorescens som tyder på antistoffbinding, men med mye lavere intensitet ved de samme betingelser. Her kan det se ut som om antistoffet har festet seg til granuler i cytoplasma. Dette kan kanskje være blodplater, men dette kan ikke påvises i vårt forsøk. Det ser ut som de fleste cellenes cytoplasma

fluoriserer svakt. Det er imidlertid umulig å skille de ulike cellene fra hverandre da de ikke er farget med cellespesifikke markører.

I frysesenitt fra mus ble det påvist Stabilin-2 i sinusoidene i beinmarg. Det er derfor klart at antigenet er til stede i snittene og at antistoffet binder dette antigenet. Resultatene lot seg imidlertid ikke reprodusere på vanlige paraffinsnitt av beinmarg fra de samme musene. På paraffinsnitt er antigenet skjult og snittene må derfor avparaffiniseres ved hjelp av xylen og alkohol. Deretter benyttes ulike antigenretrievalteknikker for å demaskere antigenene før farging med antistoff. Ved dette prosjektet ble to ulike metoder forsøkt: Antigen retrieval ved hjelp av trypsin og ved hjelp av koking i mikrobølgeovn. Det er ulemper ved begge metoder. Trypsin kan forårsake endrede epitoper og dermed vil bindingen av antistoffet bli usikker. Koking i citratbuffer i mikrobølgeovn ødelegger en del antigener og bryter ned vevsstrukturen. Farging av paraffinsnittene med antistoff etter at de var behandlet med de ulike metodene gav ingen fluorescens i sinusoidene. Dette kan tyde på at Stabilin ikke tåler denne behandlingen og degraderes i den grad at antistoffet ikke gjenkjenner antigenet. Det var ingen forskjell ved bruk av de ulike metodene. Det var heller ingen forskjell mellom de immunofargede snittene og kontroller for autofluorescens og uspesifikk binding. Det ble også prøvd med ulike typer antistoff for Stabilin (mono- og polyklonale), uten resultat. Det ble dermed ikke funnet noen god metode for å påvise Stabilin i beinmarg i paraffinsnitt. Dette gjorde det formålsløst å jobbe videre med farging av humane paraffinsnitt av beinmarg. Det er ikke mulig å lage frysesenitt av human beinmarg fordi vevet inneholder beinrabekler og dermed er for hardt til å la seg snitte uten dekalsinering.

Flow cytometri

Flow gav ingen overbevisende resultater med Stabilin-2.

Det ble funnet at en subpopulasjon av myelomatoseceller fra en pasient uttrykte stabilin-1. B- og T celler fra samme pasient uttrykte ikke stabilin-1.

Flow cytometri er en godt egnet metode for arbeid med å påvise reseptorer på blodceller. Resultatene er imidlertid avhengig av hvilke celler man plukker ut for videre undersøkelse, dvs. gating. Også her spiller styrken i lysemisjonen fra cellene truffet med laserstrålen inn. Det vil alltid være en del overlapp mellom emisjonen fra de ulike fluorocromer. Resultatet avhenger av hvilke grenser man setter for godtatte bølgelengder som regnes som en positiv celle. Det er derfor en del avgjørelser som taes av den som kjører forsøket som virker direkte

inn på resultatet, og dermed kan påvirke dette. Dette må det tas hensyn til ved tolkning av resultatene.

Prøver fra bare én pasient er ikke nok til å trekke noen konklusjoner, men er interessant i forhold til at det gir en pekepinn om hvordan man kan legge opp videre forsøk. En burde også se mer på forekomsten av stabilin uttrykk i celler fra friske personer. Først når man har fått en oversikt over normalforekomsten kan man si noe om de patologiske cellene i forhold til dette.

Konklusjon

Stabilin-1 og -2 påvises i human beinmarg og perifert blod ved hjelp av Western blot. Man kan ikke trekke andre konklusjoner enn at proteinet er til stede. Ved undersøkelse av frysesenitt fra mus finner man ved hjelp av indirekte fluorescensmikroskopi klart uttrykk av Stabilin-2 i sinusoidene, noe som samsvarer med tidligere funn i sinusoider i rottelever og milt (1). Med forbehold om artslikhet på dette området mellom mus og menneske, vil dette til dels forklare funnet av Stabilin i beinmargsprøvene kjørt i Western blot. Hvor Stabilin uttrykkes i humant perifert blod er ikke klarlagt.

Stabilin ser ut til å være et relativt ustabil protein som degraderer raskt og ikke tåler for hardhendt behandling. Dette ble erfart både ved at det ble registrert mye degradering under forbehandling av prøvene til Western blot og det at var umulig å fremstille Stabilin på parafinsnitt.

For Stabilin-1 virker pilotforsøk med flow cytometri lovende. Det gjenstår imidlertid mye arbeid for å kartlegge distribusjonen av Stabilin på normale og patologiske hematopoietiske celler samt finne ut hvilken rolle denne reseptoren spiller i forhold til HA. Det er interessant at studier har vist en økt konsentrasjon av HA hos enkelte myelomatosepasienter og at det samtidig er påvist Stabilin-1 på myelomceller fra en slik pasient. Mye arbeid gjenstår før det kan sies noe sikkert om en eventuell sammenheng mellom HAKonsentrasjoner og uttrykk av dets reseptor på cancerceller.

Resultater western blot

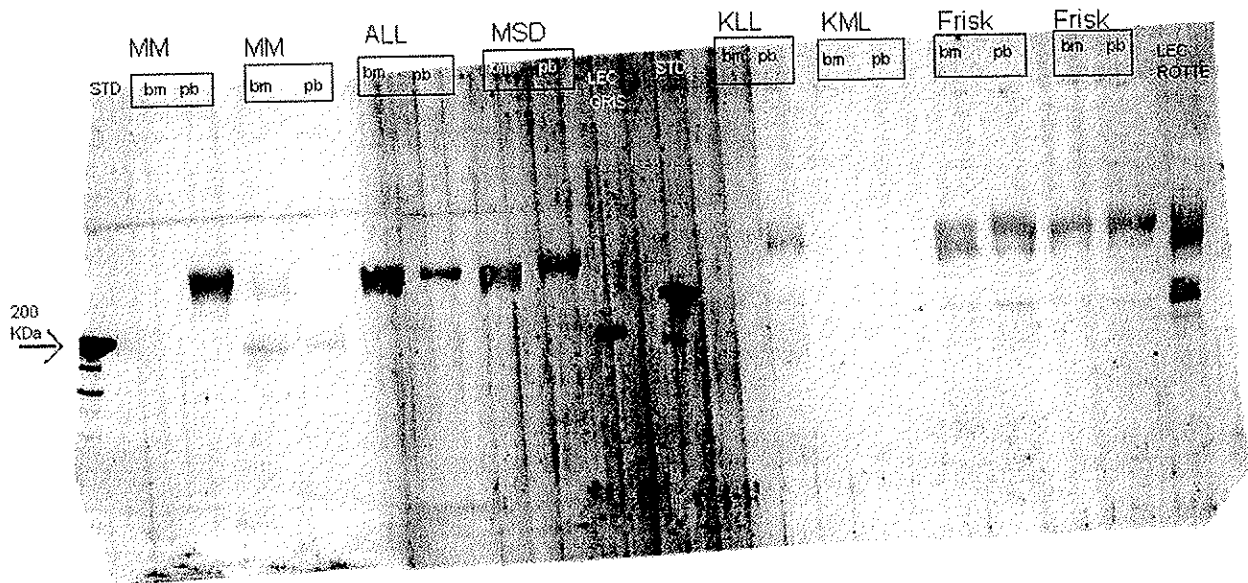


Fig 1.1
 Resultat av Western blot farget med antistoff mot stabilin-2. I de humane prøvene dannes det et bånd rundt ca 400 kDa Det er stabilin 2 til stede i de fleste prøvene. Det observeres ingen forskjell mellom prøver fra pasienter med blodsykdommer og friske kontrollere. Det observeres ingen forskjell mellom prøver fra pasienter med blodsykdommer og friske kontrollere. PB= perifert blod, BM= beinmarg, STD = standard.

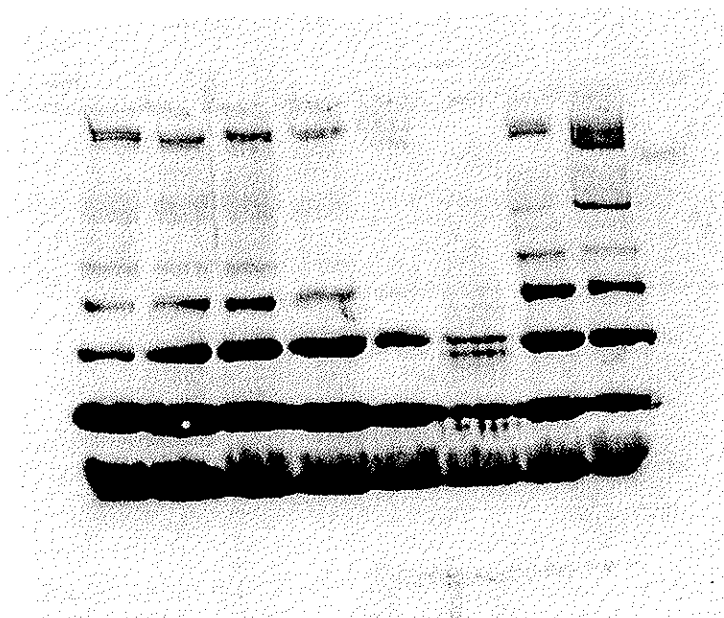


Fig 1.2
 Western blot farget med stabilin-1. Det øverste båndet på ca 200 kDa representerer stabilin i bånd 1-4 og 7-8. De øvrige båndene med lavere molekylvekt representerer degradasjonsprodukter. Alle prøvene er fra friske kontrollere. Bånd 1 og 2 er hhv PB og BM fra samme person som fig 1.3

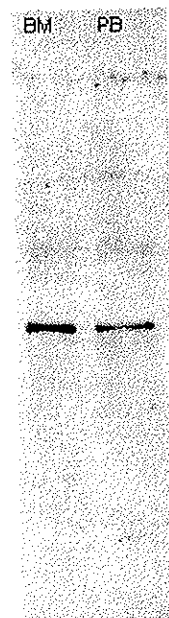


Fig 1.3 (Lånt fra Peter McCourt) Viser bånd av Stabilin-1 rundt 200 kDa, uten degradering.

Resultater fra indirekte fluorescensmikroskopi

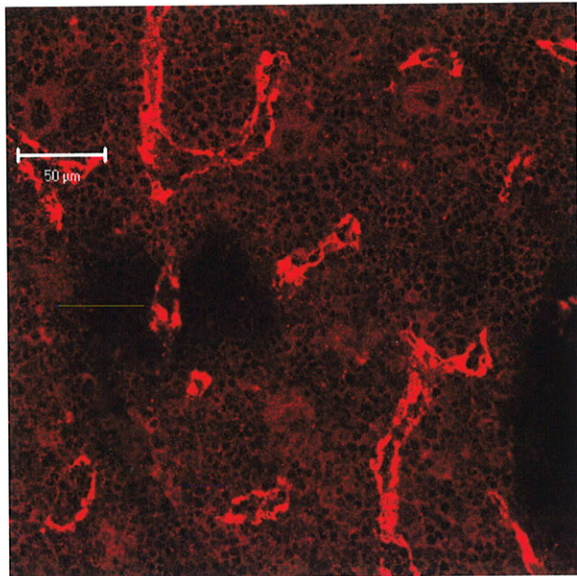


Fig. 2.1
Frysesnitt av beinmarg fra mus immunofluorescensfarget for å påvise stabilin-2. Bildet viser sterk fluorescens i sinusoidene.

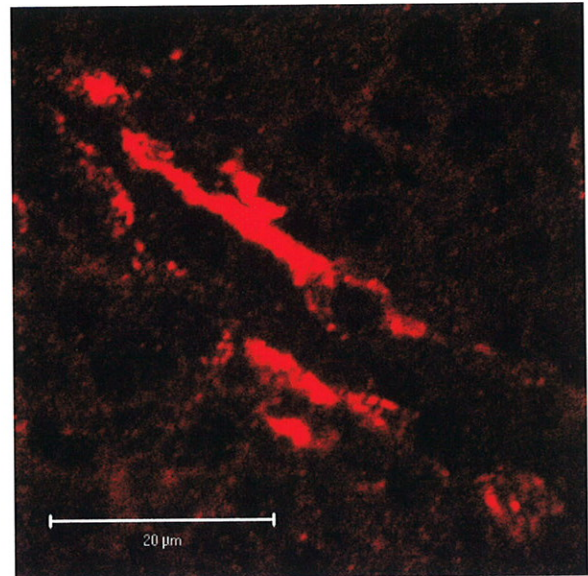


Fig 2.2
Bildet viser det samme som fig.2.1, men i større forstørrelse. Her ses en endotelcelle i sinusoiden med diffus farging av hele cytoplasma. Kjernen framstår som sort. Bildet er noe overeksponert.

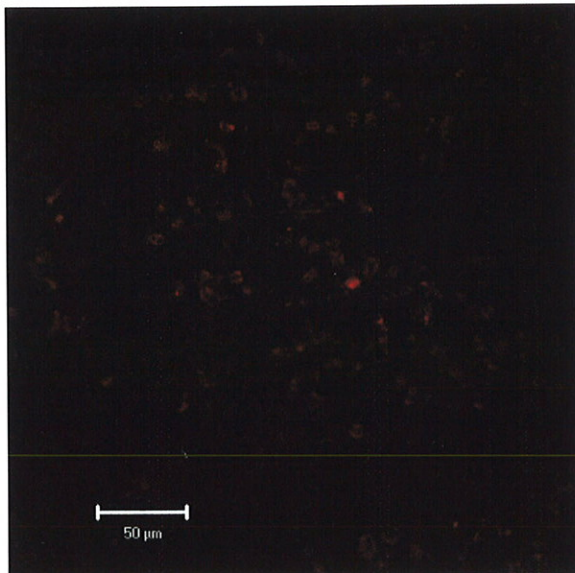


Fig 2.3
Kontroll. Snitt farget uten primært eller sekundært antistoff. Viser bare autofluorescens i vevet. Autofluorescensen er lav.

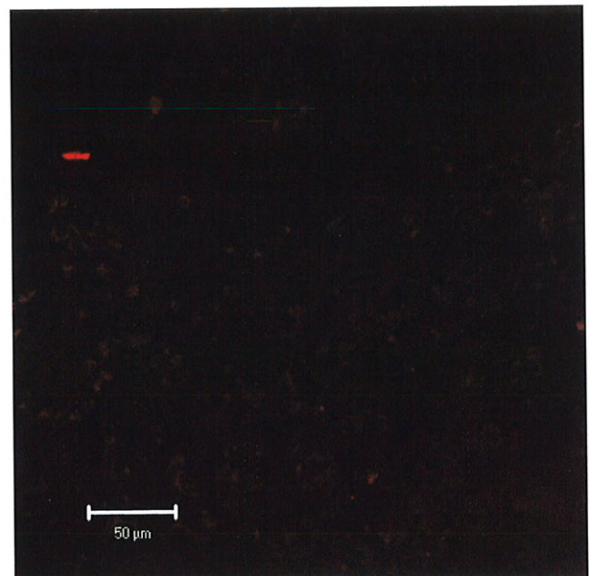


Fig 2.4
Kontroll. Snitt farget uten primært antistoff. Viser kun autofluorescens i vevet, ingen uspesifikk farging. Sammenlign med fig 2.3

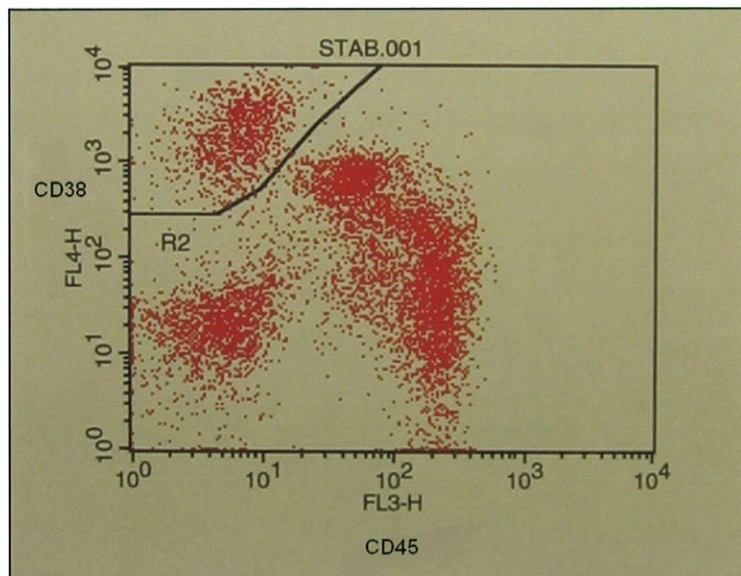


Fig 3.1
Viser gate 2. Typiske myelomceller som kjennetegnes ved at de er CD38 positive og CD45 negative markeres slik at andre data for disse cellene kan analyseres.

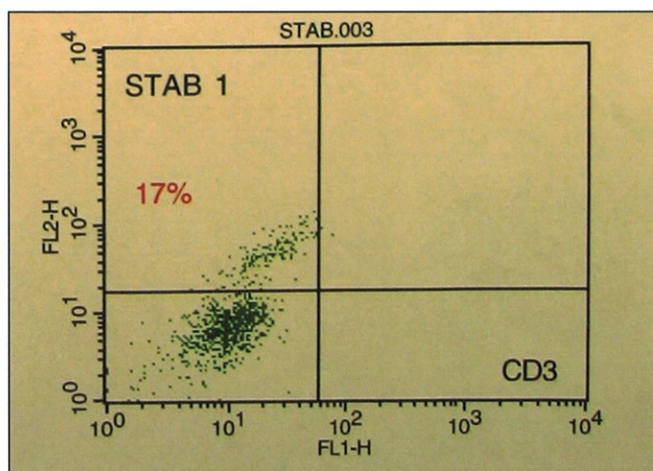


Fig 3.2
Viser fluorescens fra stabilin-1 langs Y-aksen og fluorescens fra flouorochrom bundet spesifikt til CD3 langs x-aksen. 17% av myelomcellene i gate 2 uttrykker stabilin-1. Cellene er CD3 negative, noe som skiller dem fra normale T-celler.

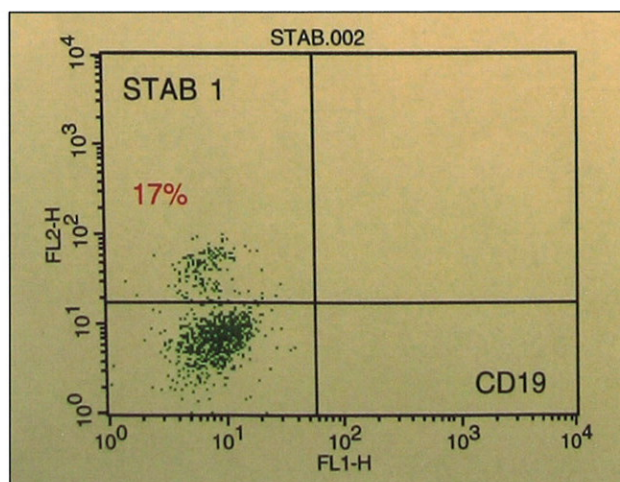


Fig 3.3
Fluorescens for stabilin-1 langs Y aksen og CD19 langs X-aksen. Viser at 17% av mylomcellene er stabilin-1 positive. Cellene er samtidig CD19 negative noe som skiller dem fra normale B-celler.

Referanseliste

- 1) Politz, O., Gratchev, A., McCourt, P.A., Schledzewski, K., Guillot, P., Johansson, S., Svineng, G., Franke, P., Kannicht, C., Kzhyshkowska, J., Longati, P., Velten, F.W., Johansson, S. and Goerdt, S. (2002) Stabilin-1 and -2 constitute a novel family of fascicilin-like hyaluronan receptor homologues. *Biochem. J.* 362, 155-164
- 2) Dahl, I.M.S., Turesson, I., Holmberg, E., Lilja, K. (1999) Serum hyaluronan in patients with multiple myeloma: Correlation with survival and Ig Concentration. *Blood*, vol 93, no 12, 4144-4148
- 3) McCourt, P.A., Smedsrød, B.H., Melkko, J. and Johansson, S. (1999) Characterization of a hyaluronan receptor on rat sinusoidal liver endothelial cells and its functional relationship to scavenger receptors. *Hepatology* 30, 1276-1286
- 4) Fraser, J.R.E., Laurent, T.C. et al. (1997) Hyaluronan: clinical perspective of an old polysaccharide. *J Intern Med* 242, 23-24
- 5) Delpech, B., Girard, N., Bertrand, P., Courel, M.N., Chauzy, C. and Delpech, A. (1997) Hyaluronan: fundamental principals and application in cancer. *J Intern Med* 242, 41-48
- 6) Fraser, J.R.E., Laurent, T.C. and Laurent, U.B.G. (1997) Haluronan: Its nature, distributin, functions and turnover. *J Intern Med* 242, 27-33

