

# **Identifisering og fenotyping av invariable NKT-celler**

---

**5.årsoppgave i Stadium IV - medisinstudiet ved Universitetet i  
Tromsø**

**Lars K. Pedersen – MK05  
Christian Holgersen – MK05**

---

**Veileder Tor B. Stuge, Immunologisk avd, UiTø**

**Tromsø 05.06.09**

## Abstract

NKT-cellene utgjør en liten gruppe av det totale T-celleantall og uttrykker overflatemolekyler karakteristisk for både T- og NK-celler. De er aktive i en rekke ulike immunologiske funksjoner. Blant annet kan disse cellene produsere store mengder cytokiner, både pro- og antiinflammatoriske, og de kan indusere celledød ved direkte cytolytisk aktivitet på andre celler som tumorceller og infiserte celler. De kan også aktivere andre celler i immunforsvaret som T-celler, NK-celler makrofager og B-celler, og kan dermed ses på som en kobling mellom det medfødte og ervervede immunforsvaret.

En subgruppe NKT-celler uttrykker invariante T-cellereseptorer (TcR) bestående av TcR-V $\alpha$ 24,J $\alpha$ 18 og betegnes som invariante (i)NKT-celler. Det er nylig utviklet et monoklonalt antistoff, 6B11, som er rettet mot den invariante CDR3-regionen på T-cellereseptoren til iNKT-cellene, og en kan dermed isolere disse selektivt, noe som tidligere har vært vanskelig. Vi isolerte mononukleære hvite blodceller fra friske donorer, og lot disse reagere med antistoffer konjugert med fluorokromer for deretter å kjøre cellene gjennom flowcytometri. Vi brukte i våre forsøk 6B11 for å identifisere iNKT-cellene. Videre brukte vi anti-CD3 for å identifisere T-cellepopulasjonen, samt anti-CD4 og anti-CD8 for å se på fordeling av CD4 og CD8 på iNKT-cellene. I tillegg brukte vi anti-CD19, anti-CD154 og anti-CTLA4 for å se om iNKT-cellene uttrykte noen av disse overflatemolekylene som kan ses på andre celler i immunforsvaret.

I tillegg brukte vi anti-TcRV $\alpha$ 24 sammen med 6B11 for å se om dette gav en bedre seleksjon av iNKT-cellene.

Vi identifiserte populasjoner av iNKT-celler hos alle 10 donorer ved bruk av 6B11. Ved bruk av TcRV $\alpha$ 24 sammen med 6B11 fikk vi ikke samme resultater. Vi fant også at iNKT-cellene hadde et signifikant økt uttrykk av CD19 på overflaten sammenlignet med T-cellene, hvilket er overraskende da CD19 er en B-cellemarkør. Det var i tillegg to donorer som hadde tydelige populasjoner med CD19pos iNKT-celler.

Vi har funnet at det monoklonale antistoffet 6B11 er godt egnet til identifisering av iNKT-celler. Det finnes ingen tidligere rapporter om uttrykk av CD19 på NKT-celler og våre funn er derfor uventet.

# Introduksjon

## NKT-celler

NKT-celler er en distinkt populasjon av T-celler som uttrykker både NK-cellerreseptorer og T-celleantigenreseptorer (TcR), og disse cellene kan produsere både Th1- og Th2-cytokiner.

Da NKT-cellene har både egenskaper fra det medfødte immunsystem, som NK-celler, og egenskaper fra det ervervede immunsystem, som T-celler, er det foreslått at disse cellene kan være koblingen mellom de to immunsystemene. Man har per i dag ikke oversikt over den detaljerte mekanisme for aktivering og funksjon av NKT-cellene.

Til forskjell fra vanlige T-celler som binder til MHC-molekyler for aktivering, interagerer NKT-cellene med det non-polymorfe CD1d molekylet, og aktiveres av glykosphingolipid-antigener (som  $\alpha$ GalCer). Disse eksogene antigenene tas opp i antigenpresenterende celler (APC) og kobles på CD1d i intracellulære vesikler før de sendes til overflaten for presentasjon til NKT-cellene. CD1d er et MHC I-lignende molekyl som normalt uttrykkes på en rekke ulike celler som B-celler, dendritiske celler, monocytter/makrofager og epiteliale celler<sup>1</sup>.

En skiller mellom to typer av NKT-celler, type 1 og 2 (klassiske og non-klassiske), avhengig av graden av diversitet i deres T-celle reseptor. En stor del av de CD1d reaktive T-cellene uttrykker en invariant  $\alpha\beta$ TcR med V $\alpha$ 24, J $\alpha$ 18  $\alpha$ -kjede, og V $\beta$ 11  $\beta$ -kjede<sup>2</sup>. De NKT-cellene som uttrykker denne T-celle reseptoren kalles for invariante NKT-celler (iNKT), type 1 NKT-celler eller klassiske NKT-celler. Prosentvis utgjør iNKT-cellene 0,01-1% av lymfocytene<sup>3</sup>.

I tillegg til disse er det en annen populasjon av NKT-celler, kalt type 2 eller non-klassiske NKT-celler, som ikke har en fast T-celle reseptor. Disse cellene er også begrenset til å gjenkjenne antigen bundet til CD1d, men de reagerer ikke på  $\alpha$ GalCer slik som de klassiske NKT-cellene gjør<sup>4</sup>.

## Identifisering av iNKT-celler

På grunn av at NKT-cellene deler sine overflatemarkører med både NK-celler og T-celler og ikke har noe eget cellespesifikt CD-molekyl, har det tidligere vært vanskelig å identifisere de invariante NKT-cellene. Den klassiske metode for å finne iNKT-cellene har været å bruke monoklonale antistoffer mot V $\alpha$ 24 og V $\beta$ 11<sup>5</sup>. Alternativt har man brukt uttrykk av V $\alpha$ 24 og

NK-cellemarkører som CD161<sup>6</sup>, samt at en har selektert ved CD1d tetramerer med  $\alpha$ GalCer<sup>7,8</sup>, men dette har heller ikke greid å fullstendig identifisere NKT-celle populasjonen.

I dag utnytter en det faktum at det på iNKT-cellene er en konservert CDR3 region i  $\alpha$ -kjeden av T-celle reseptoren. Denne regionen er det utviklet et monoklonalt antistoff mot, kalt 6B11, som kan konjugeres med fluorokromer (FITC, Alexa 488, Biotin eller PE) for bruk ved flowcytometri<sup>9</sup>.

## **NKT-cellenes funksjoner**

NKT-cellene kan være med på å påvirke en rekke ulike immunologiske responser, inkludert autoimmunitet, tumorimmunologi, infeksjonsforsvar etc. Denne diversiteten kommer av evnen til produksjon av ulike cytokiner med ulike funksjoner, både proinflammatoriske (IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$ ) og antiinflammatoriske (IL-4, IL-10, IL-13)<sup>1,10</sup>.

I tillegg til sekresjon av ulike cytokiner kan NKT-cellene direkte aktivere andre celler. En dendritisk celle kan stimulere en NKT-celle til å uttrykke CD40L, som igjen fører til at NKT-cellen kan binde til CD40 på den dendritiske celle og stimulere den til produksjon av IL-12<sup>11</sup>. Aktivering av NKT-cellene kan også føre til aktivering av B-celler og NK-celler<sup>12,13</sup>. NKT-celler kan in vitro virke cytotoxiske<sup>14</sup>, selv om det ikke er klarlagt om virkningsmekanismen er direkte eller indirekte<sup>15</sup>.

NKT-celler gjenkjenner og aktiveres av glykolipider fra bakterier<sup>16-18</sup> og er også involvert i immunresponsen etter binding av LPS eller CpG<sup>19</sup>. At NKT-celler gjenkjenner glykolipider fra bakterier som ikke har LPS gjør at man tenker seg at glykolipidene kan fungere som alternativer til TLR-binding av pathogen-associated molecular patterns (PAMPS)<sup>18</sup>. Siden man regner NKT-celler for å være en del av det medfødte immunforsvar kan man se på de som en kobling mellom det medfødte og ervervede immunforsvar.

## **Den føtomaternelle interfasen**

Maternelle NK-celler, makrofager, T- og NKT-celler slår seg ned i decidua helt fra begynnelsen av svangerskapet. Den lokale maternelle immunrespons er i hovedsak karakterisert av celler i den medfødte del av immunforsvaret (som NK-celler og makrofager) og man har derfor forsket mest på disse, mens man vet mindre om den ervervede del av immunforsvaret – herunder T- og NKT-celler.

Implantasjonen av embryo i decidua kan betraktes som en invasjon med vev som bærer ikke-selv markører. For å muliggjøre dette må immunresponsen dempes slik at implantatet ikke frastøtes. Under graviditet ser man en endring i immunresponsen fra en TH<sub>1</sub>- til en TH<sub>2</sub>-cytokinprofil<sup>20</sup>. Dette fører til en endring i utskillelsen av cytokiner fra de proinflammatoriske IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  og IL-2 til de antiinflammatoriske IL-10 og TNF- $\beta$ , hvilket gir mening når man samtidig vet at høye nivåer av IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  og IL-2 fører til økt abortrisiko<sup>21</sup>. Samtidig er det vist at en viss konsentrasjon av IFN- $\gamma$  er nødvendig for korrekt implantasjon og vedlikehold av decidua og det spekuleres derfor i om de immunologiske endringer under graviditet alene finner sted på grunn av endringer i cytokinprofilen<sup>22</sup>.

Under implantasjon ser man invasjon av villøse og ekstravilløse trofoblaster i decidua. Disse er vist å uttrykke CD1d. Samtidig finnes iNKT-celler i 10 ganger så høy konsentrasjon i decidua som i perifert blod. De deciduale iNKT-celler har en utpreget Th1-lignende cytokinprofil med produksjon av IFN- $\gamma$ , mens de perifere iNKT-celler har en Th2-lignende cytokinprofil med IL-4 produksjon og man tenker seg derfor at iNKT-cellene spiller en rolle i aksepten av fostret eller utviklingen av placenta<sup>23</sup>. Under graviditeten oppreguleres en rekke gener i decidua involvert i sphingolipidproduksjonen og man har i mus funnet at feil i sphingolipidmetabolismen fører til abort<sup>24</sup>. I tillegg er det i decidua høye nivåer av prosaposin som er nødvendig for loading av CD1d med glycosphingolipider<sup>25-27</sup>.

Sammenholder man ovenstående med at infeksjon og en pro-inflammatorisk cytokinprofil øker risikoen for abort hos mennesker og at aktivering av NKT-celler med  $\alpha$ GalCer fører til abort hos mus<sup>28, 29</sup> ser man at mye tyder på at NKT-celler spiller en avgjørende rolle for fullførelse av graviditeten.

## **Neonatal alloimmun trombocytopeni**

Neonatal alloimmun trombocytopeni (NAIT) er den vanligste årsak til tidlig trombocytopeni hos en ellers frisk nyfødt<sup>30</sup>. Prevalens er beregnet til ca. 1:1.000 fødsler<sup>31-33</sup> og er faren homozygot for HPA-1a er gjentakelsesrisikoen opp mot 100%.

De farligste komplikasjoner som følge av trombocytopeni er hjerneblødning og intrauterin fosterdød. Neonatal mortalitet er beregnet til 10%, mens 20% får neurologiske sekveler grunnet intrakranial blødning<sup>34, 35</sup>.

NAIT er resultat av maternell immunisering med blodplateantigener hos fosteret som er arvet fra faren. Disse blodplateantigenene vil hos moren kunne gjenkjennes som fremmed vev, og det settes i gang en immunrespons, med aktivering av maternelle B-celler som presenterer antigen på sine MHC II-molekyler. Hvordan denne aktiveringen skjer er i dag ennå ukjent.

Immuniseringen og aktiveringen av B-celler gjør at disse differensierer til å bli plasmaceller, som skiller ut store mengder IgG-antistoffer. Disse kan krysse placentabarrieren og gå over i fosterets sirkulasjon, hvor de binder de spesifikke paternelle blodplateantigenene og opsoniserer blodplatene. Denne opsoniseringen innebærer at makrofager i det retikuloendoteliale system binder den invariable Fc-del av de maternelle antistoffene på trombocytene og fjerner disse fra fosterets sirkulasjon. Resultatet av dette er trombocytopeni hos fosteret som kan manifestere seg tidlig i fosterlivet.

Det vanligste antigen som fører til utvikling av NAIT er HPA-1a, som 97,5% av den kaukasiske befolkning har<sup>36</sup>. 2,5% av de gravide er således i utgangspunktet utsatt for alloimmunisering, men bare 6-12% av de vil danne antistoffer mot HPA-1a og immuniseres<sup>36-38</sup>. Det er vist at HLA-DRB3\*0101, som finnes hos over 90% av de HPA-1a-negative kvinner<sup>36, 39</sup>, må være tilstede for utviklingen av NAIT<sup>40</sup>. At HLA-DRB3\*0101 i seg selv ikke er nok tydeliggjør at man ennå ikke har funnet årsakssammenhengen.

Det er forsket lite på NKT-cellenes rolle i forbindelse med NAIT. Som nevnt er NKT-cellene til stede i større mengder i decidua enn i resten av kroppen og spiller sannsynligvis en viktig rolle for fullførelsen av graviditeten. Samtidig kan NKT-cellene fungere som en kobling mellom det medfødte og det ervervede immunforsvar og i tillegg aktivere B-celler. Når NKT-cellene har så stor rolle i graviditeten ellers er det nærliggende å tro at de kan ha en betydning for NAIT også. Imidlertid er det forsket lite på dette, muligens fordi det frem til 6B11 ble tilgjengelig har vært vanskelig å isolere iNKT-celler på en enkel og reproducerbar måte. Nå hvor dette er blitt mulig kan man konsentrere seg om andre aspekter ved iNKT-cellene som kan være klargjørende for hvilken rolle de har i forbindelse med NAIT.

Hovedmålet med denne oppgave har vært å undersøke om 6B11 kan brukes til å identifisere iNKT-celler, samt finne frem til faktorer som kan optimalisere dette. I tillegg er det av interesse hvilke CD-molekyler man kan finne på overflaten, noe vi også har sett på.

## Materiale og metode

### *Blodmateriale:*

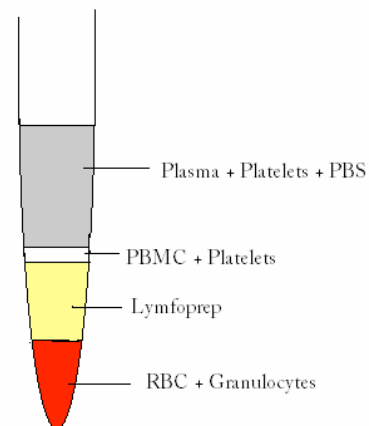
Vi brukte i våre forsøk buffy coats separert fra fullblod til friske blodgivere på Blodbanken ved Universitetssykehuset Nord-Norge. Dette er blodgivere som har sagt seg villige til at deler av deres blod brukes til forskning. Det ble ikke tatt hensyn til blodtype eller kjønn ved valg av buffy coats. Studier har tidligere vist at kvinner har en tendens til høyere nivåer av NKT-celler. Montoya et al. (2007)<sup>3</sup> fant en ikke-signifikant forskjell ( $p=0,0631$ ), mens Sandberg et al. (2003)<sup>6</sup> fant en statistisk signifikant forskjell ( $p=0,007$ ). Når det gjelder blodtype er det intet som tilsier at det skal være forskjell mellom A, B og 0.

### *Isolering av PBMC (peripheral blood mononuclear cells):*

For isolering av PBMC fra hver donor brukte vi 12 ml Lymphoprep™ (Axis-Shield PoC, Norge), og la forsiktig blanding av 15ml buffy coat og 15ml PBS (fosfate buffer saline) som et lag oppå Lymphoprep™-løsningen.

På grunn av tetthetsegenskapene til Lymphoprep™ vil innholdet i prøveglasset ved sentrifugering (15min ved 2500rpm) deles i fire ulike fraksjoner. Plasma og blodplater som har minst tetthet vil legge seg øverst, PBMC og en del plater vil legge seg som et lag over Lymphoprep™, mens de røde blodceller og granulocytene som har større tetthet enn Lymphoprep™ vil konsentreres i bunnen av prøveglasset (Fig. 1). For å få en god fordeling av de ulike cellyper er det viktig at blod og Lymphoprep ikke blandes, og det brukes derfor No-brakes-innstilling på sentrifugen, som gir forsiktig akselerasjon og deselerasjon.

PBMC pipetteres så ut og blandes med 40ml PBSA (PBS + bovine serum albumin). Dette sentrifugeres ved 1200rpm i 3min. Deretter heller en av supernatanten og gjentar prosedyren to ganger til for å vaske bort trombocytene.



**Figur 1:** Viser fordeling av ulike cellyper etter sentrifugering ved bruk av Lymphoprep.

#### *Vurdering av cellekonsentrasjon:*

Etter siste vask resuspenderte vi cellene i 10ml IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) +10% FBS, og cellene ble blandet godt ut slik at cellesuspensjonen ble homogen.

For vurdering av cellekonsentrasjon tok vi ut 10 $\mu$ L celler, og fortynnet med 90 $\mu$ L IMDM.

For telling av celler tok vi ut 10 $\mu$ L av den fortynnede cellesuspensjon, som vi la på tellekammeret. Cellene fordelte seg under dekkglasset og vi talte 4 ruter, hvor vi inkluderte "rammen" over og til venstre for ruten i tellingen. Vi multipliserte til slutt det telte celleantall med 4 for å få antall celler i 16 ruter.

På cellekammeret vi brukte utgjør 16 ruter 0,1 $\mu$ L, så for å finne konsentrasjonen i den aktuelle fortynnede suspensjon multipliserer en antall celler i 16 ruter med  $10^4$  for å få konsentrasjon i celler/ml. Denne konsentrasjonen må så multipliseres med 10 på grunn av at den utregnede konsentrasjon er konsentrasjonen i cellesuspensjon som er fortynnet ti ganger.

#### *Uthenting av celler:*

I våre forsøk brukte vi på donor 1 en million celler, mens vi fra donor 2-10 brukte 4 millioner celler per prøve.

For å ha litt ekstra materiale å gå på tok vi ut dobbelt så mange celler som vi trengte. Vi sentrifugerte så den aktuelle mengde med cellesuspensjon i 4 min ved 1400rpm. Vi helte av supernatanten og tilsatte det volum av IMDM som måtte til for å gi oss en konsentrasjon på  $4 \times 10^6$  celler/50 $\mu$ L.

#### *Reagering av celler med antistoffpanel:*

For donor 1-3 brukte vi antistoffpaneler 1-3, mens vi for donorer 4-10 brukte panel 1-4 (Tab 1).

Vi fordelte 50 $\mu$ L cellesuspensjon, med konsentrasjon  $4 \times 10^6$  celler/50 $\mu$ L, fra hver donor på 4 5ml prøverør. Deretter fordelte vi 60 $\mu$ L panel til hvert sitt rør med celler, og blandet godt. Til slutt satte vi cellene på is, og lot de stå i 30min.

#### *Klargjøring av celler for flow-cytometri:*

Vi vasket cellene med 4ml PBSA, og sentrifugerte dem i 4 min ved 1400 rpm. Vi helte av supernatanten og resuspenderte cellene i 500 $\mu$ L PBSA. Deretter satte vi dem tilbake på is.



### Oppsett av antistoffpaneler:

Vi satte opp følgende paneler med antistoff som vi lot reagere med 4 millioner celler fra hver donor.

	FL1	FL2	FL3	FL4
Panel 1	CD4 FITC 10 µL	6B11 PE 20µL	CD8 PE/A 700 2µL	CD3 APC 1µL
Panel 2	CD154(CD40L) FITC 10µL	6B11 PE 20µL	CD19 PE/A 610 1µL	CD3 APC 1µL
Panel 3	CD3 FITC 2µL	6B11 PE 20µL	CD4 PE/A 610 0,5µL	CTLA-4 APC 10µL
Panel 4	TcRVα24 FITC 10µL	6B11 PE 20µL	CD8 PE/A 700 0,2µL(fortynnet ti ganger pga mistanke om for høy kons i panel 1)	CD4 APC 2,5µL

**Tabell 1:** Tabellen angir hvilke antistoffer som ble brukt i hvert panel, og konsentrasjoner som kreves av de ulike antistoff for en prøve

For enkelthets skyld blandet vi sammen ulike paneler for 10 sett reaksjoner.

#### Panel 1:

- 100µL CD4 FITC
- 200µL 6B11 PE
- 20µL CD8 PE/A 700
- 10µL CD3 APC
- 170 µL medium
- 100µL murint serum
- Total = 600 µL(60µL pr reaksjon)

#### Panel 2:

- 100µL CD154 FITC
- 200µL 6B11 PE
- 10µL C19 PE/A 610
- 10µL CD3 APC
- 180 µL medium
- 100µL murint serum
- Total = 600µL(60µL pr reaksjon)

#### Panel 3:

- 20 µL CD3 FITC
- 200 µL 6B11 PE
- 5µL CD4 PE/A 610
- 100 µL CTLA 4 APC
- 175µL medium
- 100µL murint serum
- Total = 600µL(60µL pr reaksjon)

#### Panel 4\*:

- 70µL TcrVα24 FITC
- 140 µL 6B11 PE
- 1,4µL CD8 PE/A 700
- 17,5µL CD4 APC
- 121,1 µL medium
- 70µL murint serum
- Total = 420µL(60µL pr reaksjon)

\*Ettersom vi bare brukte panel 4 på 7 av donorene er konsentrasjonene for i panel 4 kun for 7 reaksjoner.

Som angitt inneholdt de ulike panelene forskjellige antistoffer konjugert med ulike fluorokromer, samt medium og murint serum. Det murine serum ble tilsatt panelene for å forhindre uspesifikk opptak av antistoff av mononukleære lymfocytter.

For å minimere potensielt skadelig lys- og varmepåvirkning ble antistoffpanelene lagret innpakket i aluminiumsfolie i kjøleskap mellom forsøkene, og ble oppbevart på is i isoporboks med lokk når vi hadde dem ute ved hvert forsøk.

*Flowcytometri:*

Til flowcytometrien brukte vi et Beckton Dickinson FACScalibur flow cytometer. For hver prøve telte vi 500.000 celler.

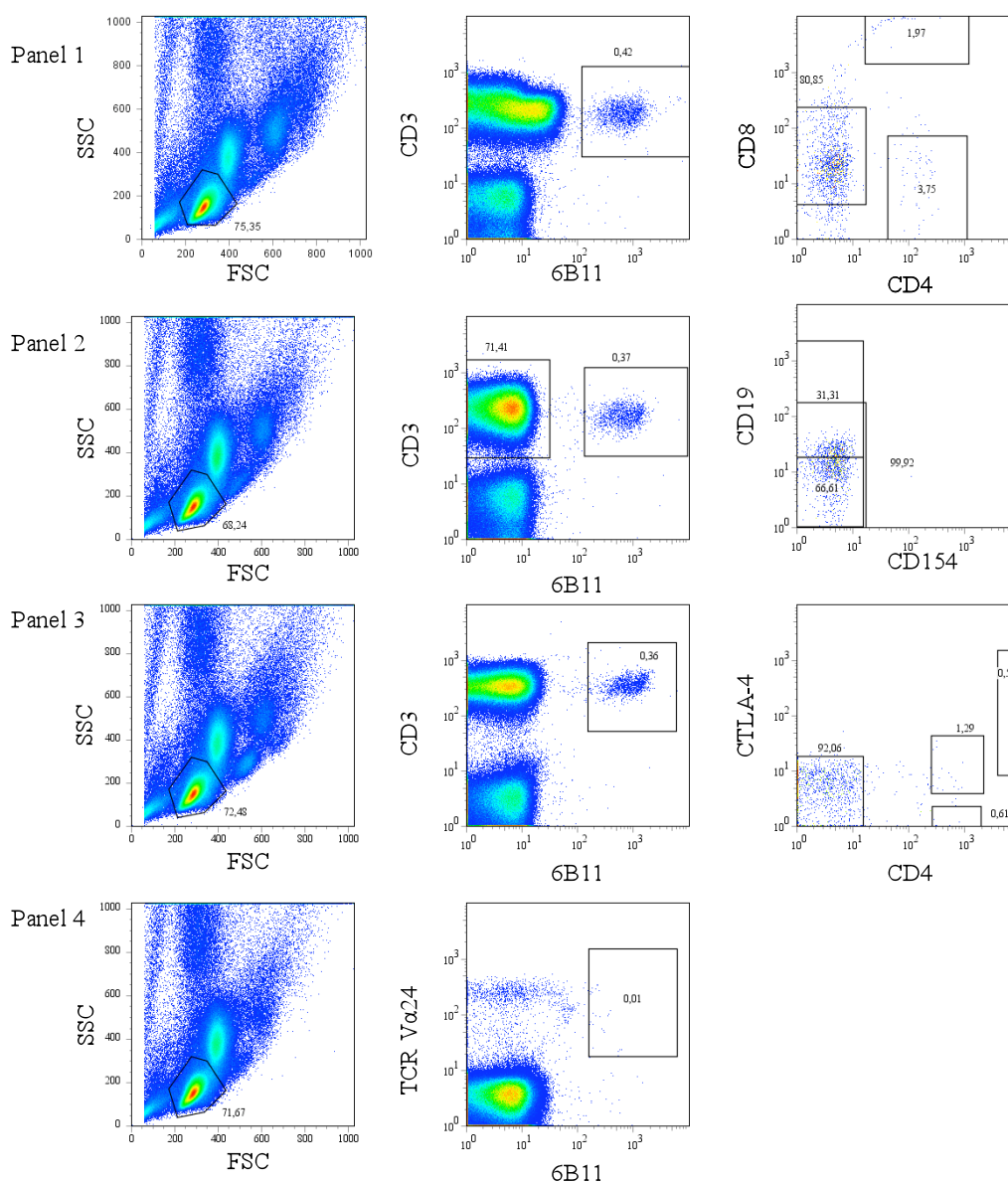
*Statistiske analyser:*

Resultater for celleantall er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  Standardavvik (SD). Sammenligninger av sett med data ble gjort ved t-test av gjennomsnitt med standardavvik for to små utvalg.  $P < 0,05$  ble regnet som statistisk signifikant.

## Resultater

Vi klarte uten problem å identifisere 6B11pos subpopulasjoner hos alle donorer ved bruk av det monoklonale 6B11-antistoffet rettet mot CDR3 regionen av  $\alpha$ -kjeden til den invariante reseptoren på iNKT-cellerne.

Det var stor grad av variasjon av antall iNKT-celler mellom de ulike donorene, hvor iNKT-cellerne utgjorde fra 0,007% til 0,51% av det totale T-celleantall, og 0,003% til 0,367% av den



**Figur 2: Gatingstrategi for flowcytometri.** Lymfocytter selekteres via FSC og SSC. Deretter er det satt en gate på 6B11pos og CD-pos celler. Siste rekke viser 6B11pos/CD3pos celler og hvilke overflatemolekyler som kan finnes på disse. De ulike populasjoner er markert med rammer og det angis hvor mange prosent de utgjør av de 6B11pos/CD3pos cellene. Alle disse figurene er fra donor 7, som hadde spesielt stor andel av iNKT-celler, men som har representative subpopulasjoner av disse.

totale mengde lymfocytter (Tab 2). Donor 7 utmerket seg med tanke på spesielt høye verdier av iNKT-celler. Med denne donoren ble gjennomsnitt og standardavvik av prosentvis antall av iNKT-celler i forhold til T-celler  $X=0,067 \pm 0,158\%$ , mens gjennomsnitt og standardavvik uten denne donoren var  $X=0,017 \pm 0,011\%$  (Tab 2).

Disse verdier, selv medregnet donor 7, er i samsvar med tidligere publiserte data som har vist en variasjon av iNKT-celler i PBMC fra 0,01-0,92% (1 %) av total mengde T-celler<sup>3</sup>.

Donor	Lymfocytter	T-celler	CD3 <sup>+</sup> 6B11 <sup>+</sup>	% fordeling av iNKT blant lymfocytter	% fordeling av iNKT blant CD3 <sup>+</sup> -celler (T-celler)
1	313618	195337	31	0,01 %	0,02 %
2	224985	164010	30	0,01 %	0,02 %
3	375612	287228	20	0,01 %	0,01 %
4	358993	262136	47	0,01 %	0,02 %
5	360927	287082	124	0,03 %	0,04 %
6	300345	208576	28	0,01 %	0,01 %
7	341192	243644	1252	0,37 %	0,51 %
8	362908	271614	26	0,01 %	0,01 %
9	328529	164260	11	0,00 %	0,01 %
10	239344	148428	30	0,01 %	0,02 %

Gjennomsnitt	320645,3	223231,5	159,9	0,05 %	0,07 %
Standardavvik				0,11 %	0,16 %
Gjennomsnitt uten donor 7				0,01 %	0,02 %
Standardavvik uten donor 7				0,01 %	0,01 %

**Tabell 2:** Oversikt over totale antall lymfocytter, T-celler og iNKT-celler for hver donor.

### *CD4 og CD8 fordeling på iNKT-celler*

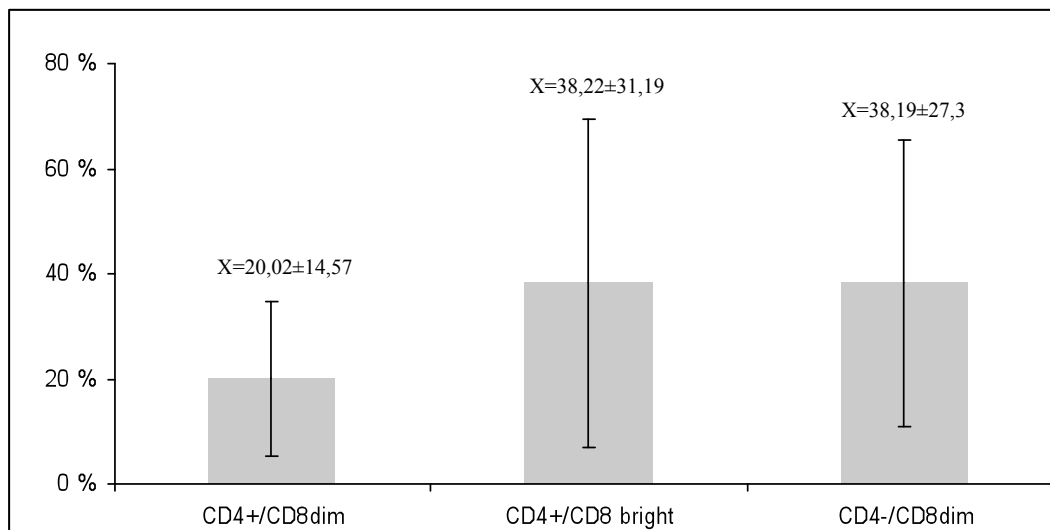
I panel 1 hadde vi en blanding av antistoffene CD3 APC, CD4 FITC, CD8 PE/A 700 og 6B11 PE.

Vi selekterte først ut lymfocytene i flow-cytometret ved å sette en gate rundt denne, og valgte videre ut de CD3pos/6B11pos lymfocytene, altså iNKT-cellene, for kun å se videre på denne populasjonen (Fig 2).

Hos alle donorer fant vi to subpopulasjoner basert på fordeling av CD4 og CD8. Det var en CD4pos/CD8dim-populasjon og en CD4pos/CD8bright-populasjon (Fig. 2 panel 1 & Tab. 2). Hos 8 av donorene fant vi en CD4/CD8dim iNKT-cellepopulasjon, mens vi bare hos en donor fant en klar CD4pos/CD8pos populasjon (Tab 3).

Tabell over CD8, CD4 subpopulasjoner av iNKT-celler:				
Donor	CD4 <sup>+</sup> /CD8dim	CD4 <sup>+</sup> /CD8 bright	CD4 <sup>-</sup> /CD8dim	CD4 <sup>+</sup> /CD8+
1	+	+	-	-
2	+	+	+	-
3	+	+	(+)	+
4	+	+	+	-
5	+	+	+	-
6	+	+	-	-
7	+	+	+	-
8	+	+	+	-
9	+	+	+	-
10	+	+	+	-

**Tabell 3:** Oversikt over subpopulasjoner av iNKT-celler basert på CD4 og CD8 uttrykk på overflaten.



**Figur 3:** Figuren viser gjennomsnittlig populasjonsstørrelse i prosent av ulike cellepopulasjoner basert på uttrykk av CD4 og CD8 på overflaten til iNKT-cellene. Standardavvik er også angitt.

#### *CD19 og CD154 uttrykk på iNKT-celler:*

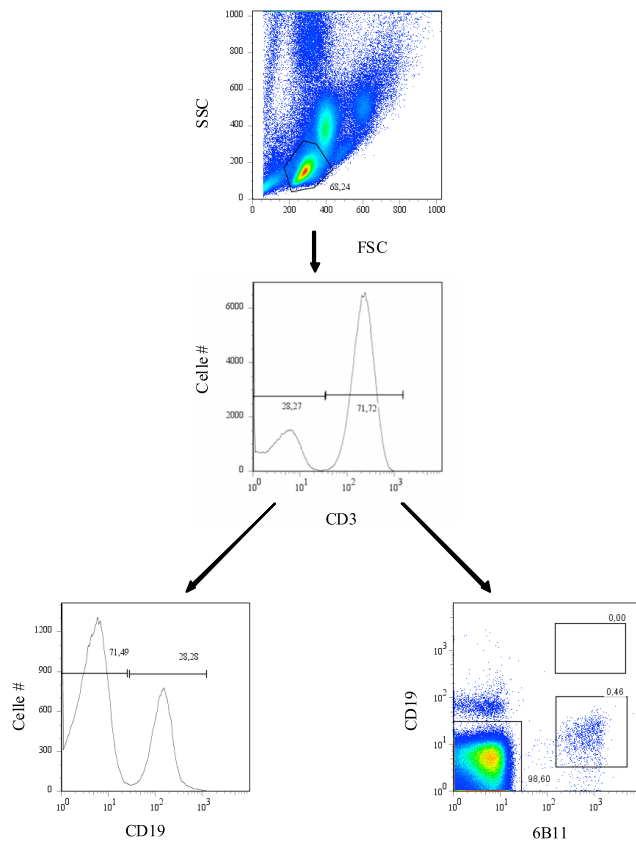
I panel 2 hadde vi CD3-APC, 6B11-PE, CD154-FITC og CD19PE/A610. Her selekterte vi også ut de 6B11pos/CD3pos cellene fra lymfocyttegaten, og vurderte grad av ekspresjon av CD19 og CD154 på iNKT-cellene. Ved vurdering av fluorescensen fant vi at iNKT-cellene hadde en relativt større ekspresjon av CD19 på sin overflate ( $X=14,821 \pm 3,97$ ), sammenlignet med de andre CD3neg/6B11neg/CD19neg-cellene (NK-celler, makrofager etc. med  $X=5,203 \pm 1,047$ ) og CD3pos/6B11neg-cellene (T-celler med  $X=4,306 \pm 0,338$ ).

iNKT-cellene hadde likevel mye lavere grad av fluorescens sammenlignet med B-cellene som er de CD3neg/CD19pos cellene ( $X=157,624 \pm 18,034$ ) (Tab. 4 og Fig. 5).

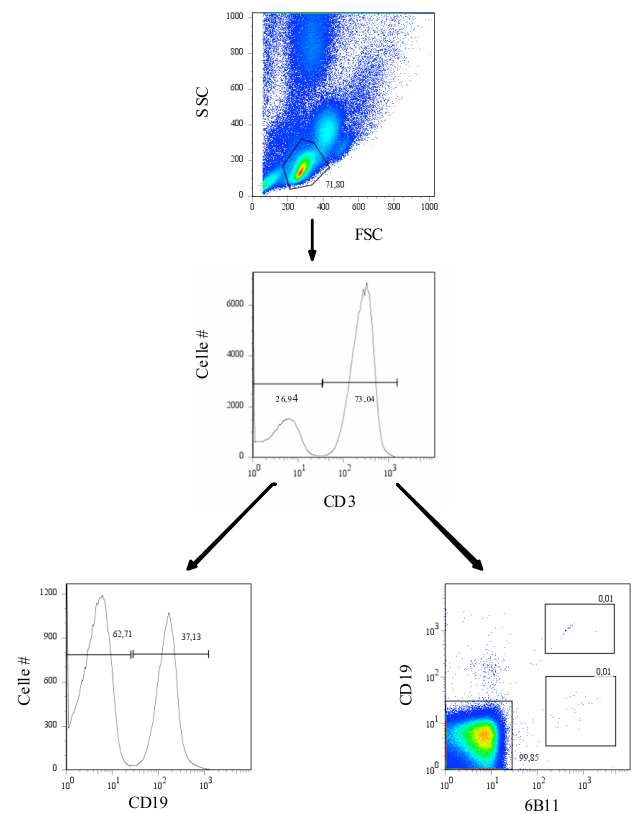
Ved t-test av gjennomsnitt og standardavvik for iNKT-cellene sammenlignet med de tre andre cellepopulasjonene fant vi signifikans på  $p<0,001$ . I tillegg fant vi at det var signifikant forskjell med  $p<0,05$  mellom T-cellene og den CD3neg/6B11neg/CD19neg-populasjonen (NK-celler, makrofager etc).

Hos to donorer fant vi iNKT-populasjoner med kraftig økt mengde CD19 på overflaten, svarende til 6 ganger økt fluorescens sammenlignet med B-cellene (Fig. 4b). Disse populasjonene kom i tillegg til de normale iNKT-populasjonene som er observert uten unntak for alle donorene (Fig 4a).

4a



4b



**Fig. 4: Vurdering av subpopulasjoner av lymfocytter basert på CD3 og CD19 uttrykk.**

Her er det gjort immunfluorescens av PBMC fra to donorer. Lymfocytene er delt opp i CD3pos og CD3neg. De CD3pos er videre analysert med tanke på binding til 6B11-Ab og uttrykk av CD19 på overflaten. Hos begge donorer ser man en 6B11pos populasjon.

(a) De CD3neg cellene er delt opp i to populasjoner basert på uttrykk av CD19. De CD19pos cellene er B-celler, mens de CD19neg cellene trolig er NK-celler og makrofager etc. En kan se en tydelig populasjon av 6B11pos/CD19dim celler.

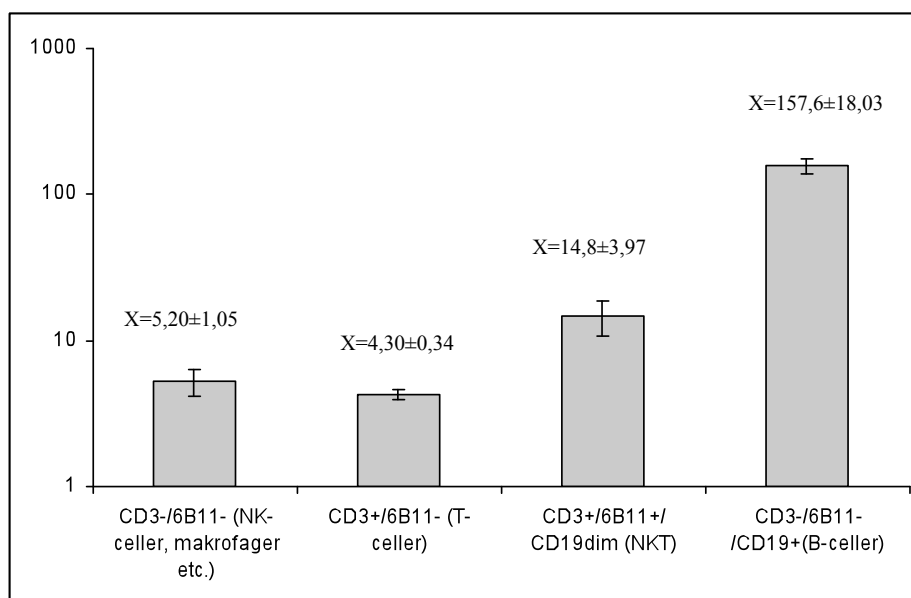
(b) Vi kan se en klart definert 6B11pos/CD19dim populasjon og en 6B11pos/CD19bright populasjon. Sistnevnte ble kun observert hos do av donorene.

Av de CD3neg cellene ser vi at de fordeler seg i to grupper basert på uttrykk av CD19, en CD19pos (B-celler) og en CD19neg (NK-celler, makrofager etc).

### Fluorescens av CD19 de ulike cellepopulasjoner.

	CD3 <sup>-</sup> 6B11 <sup>-</sup> (NK-celler, makrofager etc.)	CD3 <sup>+</sup> 6B11 <sup>-</sup> (T-celler)	CD3 <sup>+</sup> 6B11 <sup>+</sup> CD19dim(NKT)	CD3 <sup>+</sup> 6B11 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> (B-celler)	CD3 <sup>+</sup> 6B11 <sup>+</sup> CD19 bright(NKT)
Donor 1	4,37	3,96	12,69	191,51	
Donor 2	4,30	4,37	16,18	150,36	
Donor 3	4,15	4,38	9,10	161,58	
Donor 4	5,81	4,29	18,27	159,82	1055,45
Donor 5	6,53	4,61	13,76	167,87	
Donor 6	4,39	3,83	15,82	178,13	947,46
Donor 7	7,22	4,06	13,53	149,53	
Donor 8	4,61	4,87	21,29	133,26	
Donor 9	5,24	4,66	18,43	146,47	
Donor 10	5,41	4,03	9,14	137,71	
Gjennomsnitt	5,20	4,31	14,82	157,62	1001,46
Standardavvik	1,05	0,34	3,97	18,03	

**Tabell 4:** Tabellen viser de ulike cellepopulasjoner med gjennomsnittlig fluorescens for hver populasjon hos hver donor. Gjennomsnitt og standardavvik er også angitt. Ved statistisk analyse med t-test fant vi signifikant forskjell ( $p < 0,001$ ) mellom NKT-cellene og T-cellene, og mellom NKT-cellene og NK-cellene/makrofagene ( $p < 0,001$ ). Det var også signifikant forskjell mellom B-cellene og NKT-cellene ( $p < 0,001$ ) og mellom T-cellene og NK-cellene/makrofagene ( $p < 0,05$ ).



**Fig 5: Relativ median fluorescens av CD19 hos ulike cellepopulasjoner.**

Diagrammet viser gjennomsnittlig fluorescens av CD19 fra de ulike cellepopulasjoner angitt med standardavvik.

Videre fant vi ikke uttrykk av CD154 på cellene vi undersøkte (Fig 1 panel 2).



#### *CD4 og CTLA-4 på iNKT-celler*

I panel 3 hadde vi CD3-FITC, 6B11-PE, CD4-PE/A610 og CTLA4(CD40L)-APC. Også her selekterte vi ut de CD3pos/6B11pos cellene fra lymfocytgaten og vurderte uttrykk av CD4 og CTLA-4. Her fant vi hos alle donorer en klart definert CD4pos og en CD4neg cellepopulasjon, mens vi ikke fant at noen klar populasjon av CTLA4pos celler (Fig 2 panel 3).

#### *Anti-TcRV $\alpha$ 24 for merking av iNKT-celler*

I panel 4 som vi brukte fra donor 4 til og med 10 hadde vi TcRV $\alpha$ 24-FITC, 6B11-PE, CD8-PE/A. 700 og CD4-APC.

Her selekterte vi ut de CD4pos/TcRV $\alpha$ 24pos populasjonene og CD8pos/TcRV $\alpha$ 24pos populasjonene, og analyserte disse populasjonene hver for seg med henblikk på TcRV $\alpha$ 24 og 6B11. Vi fant at kun få av de TcRV $\alpha$ 24pos cellene også var 6B11pos (Fig 2 panel 4).

## Diskusjon

I denne studien har vi sett på ulike metoder for identifisering av iNKT-celler, og har vurdert uttrykk av forskjellige overflatemolekyler på iNKT-celler fra friske blodgivere. Det er tidligere brukt forskjellige metoder for deteksjon av iNKT-celler, men disse metodene har ikke vært optimale da man har vært henvist til å bruke overflatemarkører som ikke er spesifikke for iNKT. Exley et al. publiserte i 2008<sup>9</sup> en artikkel om det monoklonale antistoffet 6B11 som er rettet mot den invariante CDR3-regionen på T-cellerreseptoren til iNKT-cellene. Vi har vist at 6B11-Ab er en god markør for merking av iNKT-celler, og vi greide identifisere iNKT-populasjoner hos alle donorer. Hos donor 7 fant vi veldig høye verdier av iNKT-celler (Tab 2). Det er tidligere funnet at donorer kan skille seg ut med spesielt høye nivåer av iNKT-celler under infeksjoner<sup>6</sup> og man kan spekulere i om det samme er tilfellet her.

CD4 og CD8 er overflatemolekyler presentert på T-celler og iNKT-celler. I T-celleutviklingen i thymus går T-cellene fra å være dobbeltpositive CD4pos/CD8pos til å bli enkelt positive, det vil si enten CD4pos eller CD8pos. CD4pos celler interagerer med MHC-II-molekyler og vil dermed bli T<sub>H</sub>-celler som kan aktivere makrofager (TH<sub>1</sub>) og B-celler (TH<sub>2</sub>). De CD8pos cellene interagerer med MHC-I-molekyler som finnes på alle celler i kroppen, og vil indusere apoptose hos celler som presenterer antigen på MHC-I som gjenkjennes av T-celle reseptoren.

Montoya et al. viste i 2007<sup>3</sup> fire ulike subpopulasjoner basert på CD4 og CD8 uttrykk på iNKT-celler. Det var CD4pos, CD8pos, CD4pos/CD8pos og CD4neg/CD8neg. I våre forsøk greide vi ikke fullstendig å reprodusere disse resultatene, og vi har derfor i stedet valgt å betegne våre populasjoner ut fra grad av fluorescens som CD4pos/CD8dim (10 av 10 donorer), CD4pos/CD8bright (10 av 10 donorer), CD4neg/CD8dim (8 av 10 donorer) og CD4pos/CD8pos (1 av 10 donorer) (Fig 2 panel 1).

Betegnelsen CD8dim ble valgt for å skille mellom populasjoner med forskjellige grad av reaktivitet med antistoffreagensene (Fig 2 panel 1).

Det er mulig at CD4pos/CD8bright populasjonen ikke er reell, og er resultat av feil registrering i flowcytometeret. Selv om de fluorokromene som er satt opp mot hverandre (FITC og PE/A700) ligger langt fra hverandre i emisjonsspektrum, kan det være at CD8bright cellene har så kraftig fluorescens at de likevel gir utslag i FL1 detektoren. Hvis dette er tilfelle er det i realiteten en CD4neg/CD8bright-populasjon det er snakk om.

En annen mulighet som kan forklare CD4pos/CD8bright-populasjonen er at det er feil på antistoffet vi har brukt, eller at det er skadet slik at det gir emisjon på kortere bølgeleng-

der enn normalt, og dermed gir utslag i FL1 detektoren. PE/A700 er et konjugat av PE og Alexa 700 – førstnevnte har to emisjonstopper, hvorav den ene ligger nær FITC sin på 488 nm. Dette er den mest sannsynlige forklaring.

Im et al. (2008)<sup>41</sup> har vist at det i hovedsak er CD8 $\alpha$ -homodimerer på iNKT-cellene, og kun få CD8 $\alpha\beta$ -heterodimerer. I våre forsøk har vi brukt anti-CD8 $\alpha$  som kan gjenkjenne og binde CD8 $\alpha$ -kjede alene og CD8 $\alpha\beta$ -heterodimer. På grunn av dette kan vi ikke si noe om fordeling av CD8 $\alpha$  vs. CD8 $\beta$  på de iNKT-cellene som vi har undersøkt.

CD19 er et overflatemolekyl på B-celler og er delaktig i aktivering av disse ved å være en del av B-celle-koreseptorkomplekset. Dette koreseptorkomplekset består av CR2, som binder komplementære komponenter på et patogen, CD81, som har ukjent funksjon, og CD19 som er den signalerende del av reseptoren. CD19 fungerer ved at en intracellulær del av fosforyleres ved aktivering. Det fosforylerte CD19 kan så binde intracellulære signalmolekyler og gi ytterligere signaler til cellen om aktivering. Ettersom CD19 kun har funksjon som signaloverføringsmolekyl kan det tenkes at også andre celler i immunforsvaret bruker dette proteinet.

Vi fant at iNKT-cellene hadde et signifikant økt uttrykk av CD19 sammenlignet med T-celler, NK-celler og makrofager etc. Dette er et funn som ikke tidligere er publisert, og det er derfor usikkert hvilken betydning CD19 har for iNKT-cellene. Man kan forestille seg at det virker på samme måte som hos B-cellene, det vil si at det overfører signaler fra celleoverflaten til innsiden av cellen, som ledd i aktivering av iNKT-cellene. Vi fant også at 2 av de 10 donorene hadde tydelige CD19<sup>bright</sup>-populasjoner (Fig 3b) med mye kraftigere fluorescens sammenlignet med B-cellene. Funksjonen til disse cellepopulasjonene er heller ikke kjent, men en kan tenke seg at dette er subpopulasjoner av aktiverte iNKT-celler, med oppregulert CD19 som følge av aktivering.

Det må også bemerkes at vi kunne observere en CD19<sup>pos</sup>-populasjon blant CD3<sup>pos</sup> celler (Fig 3a, 3b). Disse cellene kan være andre subpopulasjoner av iNKT-celler som ikke har den invariante TcRV $\alpha$ 24, men kan også være andre uspesifiserte CD3<sup>pos</sup> celler. Dette er et interessant funn som heller ikke tidligere er beskrevet, men denne cellepopulasjonen ble ikke videre analysert grunnet liten relevans for vår oppgave.

CD154(CD40L) er et molekyl som finnes på CD4-T<sub>H</sub>1 celler. Det er viktig i B-celleaktivering, hvor CD40 på B-cellen binder CD40L på T-cellen etter at T-celle reseptoren har gjenkjent antigen på MHC-II på B-cellen. CD154 uttrykkes normalt på aktiverte T-celler.

Vi fant ikke uttrykk av CD154 (CD40L) på iNKT-cellene fra våre donorer. Dette strider mot tidligere publiserte data<sup>11</sup> som har vist at iNKT-celler uttrykker CD40L og at uttrykket øker når cellene blir aktiverte. Vi fant heller ikke noen forskjell i uttrykk av CD154 mellom de donorene som hadde en CD19bright subpopulasjon av iNKT-celler og de andre donorene, noe som kan tyde på at iNKT-cellene hos disse donorene ikke var aktiverte likevel. Man kan heller ikke se bort fra at antistoffet vi har brukt mot CD154 har vært ødelagt og dermed gitt gale resultater.

CTLA4 er et overflatemolekyl som normalt kan finnes på regulatoriske T-celler. Funksjonen er å binde til B7 på antigenpresenterende celler (APC) som presenterer selv-antigen som gjenkjennes av T-celle reseptoren til den regulatoriske T-cellen. Denne interaksjonen vil gi dannelse av cytokiner som hindrer andre non-regulatoriske T-celler å bli stimulert av den samme antigenpresenterende cellen. Dermed er CTLA4 viktig for å hindre aktivering av autoimmune T-celler og dannelsen av autoimmune tilstander. CTLA4 er ikke tidligere beskrevet hos iNKT-celler, og vi fant i våre forsøk heller ikke at CTLA4 var uttrykt på iNKT-cellene fra våre donorer.

Da vi i panel 4 forsøkte å identifisere iNKT-cellene ved bruk av anti-TcRV $\alpha$ 24 greide vi ikke å finne iNKT-populasjonene som vi hadde sett tidligere for hver av donorene (Fig 1 panel 1-4). Man skulle forvente å se en like klar populasjon som kan ses for hvert av de andre panele-ene. I stedet finner vi kun enkeltceller som er TcRV $\alpha$ 24pos/6B11pos. Siden det er vist at alle humane iNKT-celler har TcRV $\alpha$ 24<sup>2</sup> må vårt resultat være feil.

Dette kan det være flere grunner til. For det første kan det være at epitopene som anti-TcRV $\alpha$ 24 og 6B11-Ab binder ligger for nært hverandre på  $\alpha$ -kjeden til T-celle reseptoren på iNKT-cellene. Dermed vil anti-TcRV $\alpha$ 24 fortrenge og utkonkurrere 6B11, slik at vi bare får utslag på TcRV $\alpha$ 24 og ikke 6B11. Ønsker man å utelukke at konkurranse skal påvirke resultatet er en mulighet å endre protokollen slik at man tilsetter antistoffene sekvensielt. Hvis 6B11 tilsettes først, vaskes av og anti-TcRV $\alpha$ 24 deretter tilsettes bør man kunne se en 6B11pos/TcRV $\alpha$ 24pos cellepopulasjon. En annen årsak som dessverre ikke kan utelukkes er at det er noe feil med hele panelet.

Disse resultater hadde vært interessante å vurdere opp mot det man kan finne hos gravide, spesielt for å se om de som har født barn med NAIT har andre nivåer av iNKT-celler. I og med at man har funnet at donorer med infeksjoner i kroppen har høyere nivåer av iNKT-celler

som følge av immunresponsen kan man spekulere om gravide også har høyere nivåer pga. endringer i immunforsvaret under graviditeten. Er det flere iNKT-celler til stede under graviditeten kan det være med på å forklare aktiveringen av B-cellene ved NAIT, noe man per i dag ikke har noen god forklaring på.

En mulig rolle for iNKT-cellene ved NAIT er at antigenpresenterende celler (APC) i decidua tar opp paternelle blodplateantigener (HPA) som presenteres på overflaten til fostrets trombocytter. Siden CD1d på APC'en presenterer glykoproteiner for iNKT-cellene vil disse kunne aktiveres og dermed føre til en kaskade som til slutt fører til destruksjon av fostrets trombocytter.

1. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 2005;23:877-900.
2. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> T cells in mice and humans. *J Exp Med* 1994;180:1097-106.
3. Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* 2007;122:1-14.
4. Boyson JE, Aktan I, Barkhuff DA, Chant A. NKT cells at the maternal-fetal interface. *Immunol Invest* 2008;37:565-82.
5. Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4<sup>-</sup> T cells. *J Exp Med* 1994;180:1171-6.
6. Sandberg JK, Bhardwaj N, Nixon DF. Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment. *Eur J Immunol* 2003;33:588-96.
7. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000;192:741-54.
8. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 2002;195:625-36.
9. Exley MA, Hou R, Shaulov A, et al. Selective activation, expansion, and monitoring of human iNKT cells with a monoclonal antibody specific for the TCR alpha-chain CDR3 loop. *Eur J Immunol* 2008;38:1756-66.
10. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:557-68.
11. Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, et al. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 1999;189:1121-8.
12. Carnaud C, Lee D, Donnars O, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 1999;163:4647-50.
13. Nishimura T, Kitamura H, Iwakabe K, et al. The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 2000;12:987-94.
14. Takahashi T, Nieda M, Koezuka Y, et al. Analysis of human V alpha 24<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> NKT cells activated by alpha-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:4458-64.
15. Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol* 2000;165:2665-70.
16. Mattner J, Debord KL, Ismail N, et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 2005;434:525-9.
17. Sriram V, Du W, Gervay-Hague J, Brutkiewicz RR. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. *Eur J Immunol* 2005;35:1692-701.
18. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, et al. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* 2006;7:978-86.

19. Paget C, Mallevaey T, Speak AO, et al. Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. *Immunity* 2007;27:597-609.
20. Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J Immunol* 1996;156:644-52.
21. Tangri S, Raghupathy R. Expression of cytokines in placentas of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions. *Biol Reprod* 1993;49:850-6.
22. Ashkar AA, Croy BA. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod* 1999;61:493-502.
23. Boyson JE, Rybalov B, Koopman LA, et al. CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13741-6.
24. Mizugishi K, Li C, Olivera A, et al. Maternal disturbance in activated sphingolipid metabolism causes pregnancy loss in mice. *J Clin Invest* 2007;117:2993-3006.
25. Kang SJ, Cresswell P. Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nat Immunol* 2004;5:175-81.
26. Zhou D, Mattner J, Cantu C, 3rd, et al. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 2004;306:1786-9.
27. Sun Y, Witte DP, Grabowski GA. Developmental and tissue-specific expression of prosaposin mRNA in murine tissues. *Am J Pathol* 1994;145:1390-8.
28. Boyson JE, Nagarkatti N, Nizam L, Exley MA, Strominger JL. Gestation stage-dependent mechanisms of invariant natural killer T cell-mediated pregnancy loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4580-5.
29. Ito K, Karasawa M, Kawano T, et al. Involvement of decidual V $\alpha$ 14 NKT cells in abortion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:740-4.
30. Burrows RF, Kelton JG. Fetal thrombocytopenia and its relation to maternal thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1993;329:1463-6.
31. Dreyfus M, Kaplan C, Verdy E, Schlegel N, Durand-Zaleski I, Tchernia G. Frequency of immune thrombocytopenia in newborns: a prospective study. Immune Thrombocytopenia Working Group. *Blood* 1997;89:4402-6.
32. Durand-Zaleski I, Schlegel N, Blum-Boisgard C, Uzan S, Dreyfus M, Kaplan C. Screening primiparous women and newborns for fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia: a prospective comparison of effectiveness and costs. Immune Thrombocytopenia Working Group. *Am J Perinatol* 1996;13:423-31.
33. Doughty HA, Murphy MF, Metcalfe P, Waters AH. Antenatal screening for fetal alloimmune thrombocytopenia: the results of a pilot study. *Br J Haematol* 1995;90:321-5.
34. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1989;1:363-6.
35. Kaplan C, Morel-Kopp MC, Clemenceau S, Daffos F, Forestier F, Tchernia G. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: current trends in diagnosis and therapy. *Transfus Med* 1992;2:265-71.
36. Kjeldsen-Kragh J, Killie MK, Tomter G, et al. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 2007;110:833-9.
37. Decary F, L'Abbe D, Tremblay L, Chartrand P. The immune response to the HPA-1a antigen: association with HLA-DRw52a. *Transfus Med* 1991;1:55-62.
38. Williamson LM, Hackett G, Rennie J, et al. The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PlA1, Zwa) as determined by antenatal screening. *Blood* 1998;92:2280-7.

39. L'Abbe D, Tremblay L, Filion M, et al. Alloimmunization to platelet antigen HPA-1a (PIA1) is strongly associated with both HLA-DRB3\*0101 and HLA-DQB1\*0201. *Hum Immunol* 1992;34:107-14.
40. de Waal LP, van Dalen CM, Engelfriet CP, von dem Borne AE. Alloimmunization against the platelet-specific Zwa antigen, resulting in neonatal alloimmune thrombocytopenia or posttransfusion purpura, is associated with the supertypic DRw52 antigen including DR3 and DRw6. *Hum Immunol* 1986;17:45-53.
41. Im JS, Kang TJ, Lee SB, et al. Alteration of the relative levels of iNKT cell subsets is associated with chronic mycobacterial infections. *Clin Immunol* 2008;127:214-24.