

Skickas till: [info@stifud.se](mailto:info@stifud.se)

Ev. artiklar och publikationer skickas till:

**Stiftelsen Forskning utan djurförsök,****Gamla Huddingevägen 437, 125 42 Älvsjö**

1. Anslagstagare	
Malin Lindstedt, PhD	
Arbetsplats (fullständig postadress)	E-postadress
Avdelningen för Immunteknologi Lunds Universitet, BMC D13 22184 Lund	malin.lindstedt@immun.lth.se
2. Projektnummer	Sista redovisningsdatum (se kontraktet)
14/07	2009-08-31
3. Projekttitel (svenska)	
Studier av allergeners effekt på dendritiska celler - bas för in vitro test av kemikaliers förmåga att orsaka sensibilisering	
4. Projektet	
är avslutat <input type="checkbox"/> pågår utan <input type="checkbox"/> med <input checked="" type="checkbox"/> fortsatt stöd från Stiftelsen Forskning utan djurförsök	
5a. Kortfattad beskrivning av projektet (syfte och utförande) ca 1 A4-sida	
<p>Rapporten avser anslag (80.000 kr) som jag fick under 2007. Jag sökte anslag för anställning av en doktorand i min grupp, samt standardreagens för flödescytometri och CD-arrayer (för screening av allergeners effekt på dendritceller).</p> <p>Syftet med projektet är att identifiera de mekanismer som är involverade när allergener (kemikalier och proteiner som orsakar allergi och överkänslighet) känns igen av immunförsvarets centrala regulatorer; de dendritiska cellerna (DC). Ökad förståelse för samspelet mellan epitelceller (EC), DC och T celler vid allergisk respons, och identifiering av de specifika markörer som är involverade, är viktigt för att kunna designa ett in vitro test system för att kunna förutspå allergenicitet av nya ämnen som produceras av kemikalie, kosmetika och läkemedelsindustrin. Vår grupp ingår i ett EU projekt inom sjätte ramprogrammet som startade i Oktober 2005, och pågår till Oktober 2010, med titeln 'Novel testing strategies for in vitro assessment of allergens – Sens-it-iv' (<a href="http://www.sens-it-iv.eu">www.sens-it-iv.eu</a>). Projektet involverar 28 europeiska partners, bestående av universitet/institut, industri och olika organisationer, som har målsättningen att utveckla nya test metoder baserade på human cell linjer för analys av olika nya kemikaliers och proteiners förmåga att orsaka sensibilisering. Test systemet ska bygga på in vivo-lika humana EC- och/eller DC-linjer, odlade tillsammans för att spegla miljön i lunga och hud, och ska minska och förhoppningsvis ersätta djurförsök för detta ändamål.</p> <p>Delprojekt 1:</p> <p>För att kunna välja ut den mest optimala DC kandidaten för in vitro-testet som mest speglar in vivo-DCs karaktäriserade vi totalt 17 st tillgängliga in vivo DC populationer och in vitro DC modeller, med avseende på fenotyp och transkriptionell aktivitet. Cell typer som var inkluderade i analysen var blod CD123+ DCs, blod BDCA1+ DCs, blod BDCA3+ DCs, blod CD16+ DCs, tonsil CD123+ DCs, tonsil BDCA1+ DC s, tonsil BDCA3+ DCs, dermala DCs, epidermala Langerhans cells (LC), monocyte-derived DCs, CD34+-deriverade DCs, CD34+-deriverade LCs, CD34+ acute myeloid</p>	

leukaemia cellinje MUTZ3, MUTZ3-DCs och MUTZ3-LCs. Transkriptionsanalysen visade att de olika primära DC populationerna uttrycker specifika markörer, vilket betyder att populationerna från blod, hud och tonsill är unika och har olika funktioner i immunförsvaret. Även om in vitro modellerna av DC också uttrycker populations-specifika markörer, så speglar de i stort deras motsvarighet in vivo med avseende på essentiella DC markörer. Den mest "DC-lik" in vitro modellen MUTZ stimulerade vi sedan med olika allergen för att kunna avgöra om de även svarar "DC-lik" på ämnen som leder till sensibilisering. I de första försöket använde vi två allergiframkallande kemikalier (DNCB och cinnamaldehyde) respektive två allergiframkallande protein (gräspollenallergen Phlp5 och kvalsterallergen Derp1). För att kunna identifiera vilka DC-markörer som är involverade använde vi oss av protein microarrayer med vilka vi kunde mäta 140 humana CD antigen samtidigt (från Medsaic Pty Ltd, Australien).

#### Delprojekt 2:

Projektet syftade även till att samodla vår DC-lik cell linje MUTZ-3 med epitelcell (EC) linjer (Calu3 eller A549) för att kunna utveckla en in vivo-lik assay som bygger på samspelet mellan DC och EC. Vår samarbetspartner Erwin Roggen, Novozyme A/S, Köpenhamn, har arbetat med att utveckla en in vitro assay som bygger på humana EC linjer. Målet var att sammanföra våra modeller och odla DC i EC mediet för att kunna avgöra allergeners effekt på cellerna med avseende på migration, fenotyp och produktion av lösliga proteiner. Sammanfattningsvis, projektet beräknades ge svar på vilken in vitro-modell som är mest lämpad att användas i ett nytt test system för allergenicitet.

5b. Ange nyckelord (max 6 st)

Dendritiska celler, CD arrayer, epitelceller, In vitro

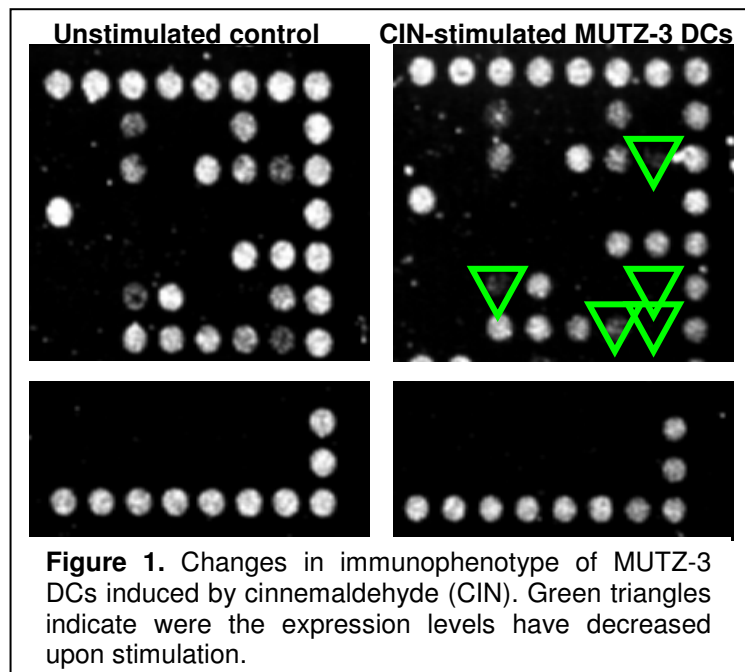
6. Kortfattad **populärvetenskaplig** beskrivning av de resultat som uppnåtts (bifoga gärna illustrationer, helst grafiska tekningar), ca ½ - max 1 A4-sida

#### Delprojekt 1:

Vi har uppfört en databas över de 17 olika DC populationernas transkriptionella aktivitet, genom användandet av RNA-arrayer med prober som täcker hela det humana genomet, och använt datan för många parallella studier. Analysen har lett till ökad information om de olika subpopulationernas unika profiler och kan användas till att delvis förklara deras olika funktioner i bl.a. allergiska immunreaktioner.

Denna del av projektet var mycket framgångsrik och vi lyckades identifiera en panel med markörer som var upp- alt. nedreglerade efter allergentillsats på MUTZ (se t.ex fig 1 för cinnamaldehyde-stimulerade MUTZ-3 celler). Eftersom tekniken

fungerade så tillfredsställande så beslöt vi att utöka panelen med fler allergen, och under 2008 screenade vi totalt 13 olika allergiframkallande kemikalier på MUTZ. Under vårterminen 2009



kommer vi att ha kört ytterligare 20 kemikalier. Vi har även parallellt med CD arrayerna analyserat MUTZ-3 med avseende på transkriptionella förändringar efter allergen stimulering, fenotyp m.h.a flödescytometri och proteomik.

Våra studier av MUTZ, med kartläggning av dess transkriptom, och dess DC-liknande fenotyp har lett till att MUTZ har blivit en av tre cell linjer inom EU projektet som vi fokuserat forskningen runt under de senaste åren. Mer än 10 grupper inom EU projektet Sens-it-iv använder nu MUTZ-3 som DC-substitut för sina in vitro tester. Vi deltar även i en ring-trial för prevalidering av MUTZ-3s potential att fungera som ett in vitro test för sensibilisering. Tre oberoende grupper gör identiska stimuleringar på MUTZ-3 celler för att analysera hur robust systemet är och dess reproducerbarhet.

#### Delprojekt 2:

Vi utförde studier där vi samodlade epitelcellinjerna Calu-3 och A549 i kombination med MUTZ-3. Vi stimulerade EC-DC kombinationerna med kvalsterallergen Derp1 och utvärderade förändringar i fenotyp m.h.a. flödescytometri. Totalt utvärderade vi 30 olika markörer på MUTZ-3, men kunde tyvärr inte se någon fördel med att samodla cellerna med ECs med avseende på reaktivitet mot allergen. Det visade sig dock att epitelcellerna ledde till ökad viabilitet och aktivering av MUTZ-3. Vi avser att fortsätta detta projekt och studera effekten av fler allergen, och behöver därmed optimera samodlings protokollet för att undvika ospecifik aktivering av DC.

#### 7. Sammanfattning av resultatens betydelse för att ersätta/begränsa djurförsök (ge gärna konkreta exempel)

Allergi är ett stort ekonomiskt och socialt problem i samhället och upp emot 40% av alla barn i vissa befolkningsgrupper är drabbade idag. Hundratals kemikalier och proteiner orsakar kontaktallergi, rinit och astma och därmed finns det ett stort behov för identifiering och dokumentation av vilka ämnen som leder till sensibilisering. Innan kemikalier blir produkter inom kemi-, kosmetik- och läkemedelsindustrin så måste de testas i olika toxicitetstest och hittills utförs dessa försök på djurmodeller. För vissa faktorer, tex hudirritabilitet, finns validerade in vitro test att tillgå, men för sensibilisering finns inga utvecklade ännu. Inom Sens-it-iv, EU projekt inom sjätte ramprogrammet, arbetar vi för att förstå de biokemiska och immunologiska mekanismerna som är involverade i sensibilisering, för att kunna utveckla ett in vitro test som ska kunna förutspå ett ämnes allergi-framkallande förmåga. Testet ska bygga på humana cell linjer (dendritiska celler, epitelceller och T celler) och spegla miljön i lunga och hud. Fördelar med in vitro testet är naturligtvis minskad användning av djurförsök för allergitester, men även ökad relevans för människa eftersom humana cell linjer används och att dessa i många fall kan odlas utan fetalt kalvserum.

Vi har nu kommit så långt i projektet att MUTZ-3 har blivit utvald inom EU projektet att bli en av de kandidater som har bäst potential som in vitro modell och som därmed ska vara fokus under de sista delarna i projektet, som innebär metodutveckling av in vitro testet. Detta innebär att oberoende grupper analyserar MUTZ-3 parallellt för att utvärdera dess robusthet och reproducerbarhet efter allergentillsats. Om MUTZ-3 skulle klara granskningarna och fungera som en bas för ett framtida in vitro test för sensibilisering inom EU så skulle det leda till avsevärd minskning av antal djurförsök.

#### 8. Vilket är den största framgången hittills i projektet?

Att vår DC-modell MUTZ-3 verkar lovande som bas för in vitro testet och att vi kunnat identifiera en panel av biomarkörer som kan särskilja mellan allergiframkallande ämnen och vanliga "irriteranter". Denna panel kan komma att användas vid utvärdering av nyproducerade kemikaliers förmåga att orsaka allergier och i förlängningen leda till minskad mängd djurförsök.

#### 9a. Beskrivning av vad som gjorts för att validera och sprida metoden/metoderna

Pre-validering pågår inom EU projektet Sens-it-iv, se ovan. Totalt 16 olika kemikalier testas parallellt med samma protokoll av tre oberoende laboratorier.

9b. Vad mer skulle behöva göras för att metoden/metoderna ska bli spridda och praktiskt användbara?

Arbetet är planerat att pågå under hela 2009.

10. Förteckning över publikationer som projektet resulterat i

Santegoets S, Gibbs S, Kroeze K, van de Ven R, Scheper RJ, Borrebaeck CAK, de Gruijl TD, Lindstedt M. *Transcriptional profiling of human skin-resident Langerhans cells and CD1a+ dermal dendritic cells: differential activation states suggest distinct functions*. J Leukoc Biol. 2008 Jul;84(1):143-51.

Larsson K, Lindstedt M, and Borrebaeck CAK. *Functional and transcriptional profiling of MUTZ-3. A myeloid cell line acting as a model for dendritic cells*. Immunology. 2006 Feb;117(2):156-66.

Santegoets S, Lindstedt M, Kroeze K, Scheper RJ, de Gruijl TD, Borrebaeck CAK and Gibbs S. *Dendritic cells and Langerhans cells derived from MUTZ-3 cells display a transcriptional profile corresponding to their in vivo counterparts*. Manuscript in prep. 2009

Lindstedt M, Santegoets S, Nelissen I, Larsson K, Lundberg K, de Gruijl TD, Gibbs S, Borrebaeck CAK. *Transcriptional profiling of 17 human dendritic cell populations and models – defining the cellular source for an in vitro test system for sensitizing compounds*. Manuscript in prep. 2009

11a. Kortfattad vetenskaplig rapport (abstract) på engelska (projektitel, syfte, utförande, och resultat), ca ½ A4-sida

Research report for the project entitled “*Studies of the effect of allergens on dendritic cells – basis for an in vitro test of the potential of chemicals and proteins to cause sensitization*”:

The objective of this project is to identify the mechanisms involved when so-called allergens (chemicals and protein causing allergy or hypersensitivity) are recognized by the central regulators of the immune response; the dendritic cells (DCs). Understanding the cellular responses to allergens, and the specific markers involved, as well as the interaction between the epithelial cells and DCs, is of utmost importance for the development of novel strategies for in vitro prediction of allergenicity. We are part of an EU funded consortium within the 6<sup>th</sup> framework, consisting of 28 European universities, institutes, companies and organizations, focusing on the development of ‘Novel Testing Strategies for In Vitro Assessment of Allergens – *Sens-it-iv*’. Risk assessment concerning the allergenicity of compounds so far essentially depends on in vivo animal models. The main goal of the *Sens-it-iv* program is to design a human cell-based assay to test the propensity of new chemicals and proteins used by the e.g. the cosmetic and pharmaceutical industries to cause allergy.

In order to select the optimal DC candidate for the assay, mimicking *in vivo* dendritic cells the most, we have characterised the available human DC populations and DC models. In total, 17 different cell types have been isolated and evaluated, by genome-wide transcriptional analysis, using microarrays, and phenotypic profiling. Cell types included in the analysis are blood, tonsillar and skin DC subpopulations, as well as the in vitro models monocyte-derived DCs, CD34+-derived DCs, CD34+-derived LCs, CD34+ acute myeloid leukaemia cell line MUTZ3, MUTZ3-DCs and MUTZ3-LCs. The transcriptional profiling displays large discrete clusters of selective gene expression in the primary DC populations, demonstrating that the populations are unique and functionally specialised. Even though the *in vitro* models also express selective patterns, they at large resemble their *in vivo* counterpart. The most suitable in vitro-derived DCs, namely the human cell line MUTZ-3, were stimulated with allergenic compound and the changes in phenotype were assessed with protein micorarrays. We have also cocultured MUTZ-3 with epithelial cell lines in order to evaluate the

added value of DC-EC interactions during allergen challenge.

The characterization of the ex vivo human DC populations and DC models has been carried out according to the plan and we are currently summarizing the results in two publications. MUTZ-3 DCs were stimulated with various chemicals and proteins causing allergy and the phenotypic changes induced by allergens (in three different concentrations) were evaluated with protein microarrays, covering 140 human CD antigens. We were able to identify a panel of markers that were up- or downregulated in MUTZ-3 DCs upon chemical or allergen exposure, as compared to control chemicals, and we are currently repeating the experiments with more allergens (additional 20 planned for 2009) to assess the reproducibility of results.

The protocols for differentiation of the monocytic cell line MUTZ-3 into DCs, have been requested and implemented by many external groups and is now on of the selected model system for evaluation of its potential to serve as an alternative test system to animal experimentation within EU (FP6 *Sens-it-iv*), currently used by >10 research groups within EU.

A ring-trial consisting of three independent groups within EU is currently ongoing for pre-validation of this assay. If our assay proves to be consistent in the ongoing pre-validation, and has potential to partially replace animal experimentation for sensitization, this project will most likely have large impact on testing procedures within EU.

No added value of growing the MUTZ-3 cells in the vicinity of epithelial cells during stimulation with allergen was noticed. In fact, the epithelial cells, without allergen challenge, induced DC activation and increased the viability.

11b. Bifoga eventuellt en vetenskaplig rapport på engelska, max 4 sidor (syfte, utförande, och resultat)