

Maternell mikrochimerism

- dina celler är mina celler

Anna Maria Kanold
Spec.läk, med.dr

Huvudhandledare: Prof Magnus Westgren

Bihandledare: Doc Nikos Papadogiannakis

Med.dr Mehmet Uzunel



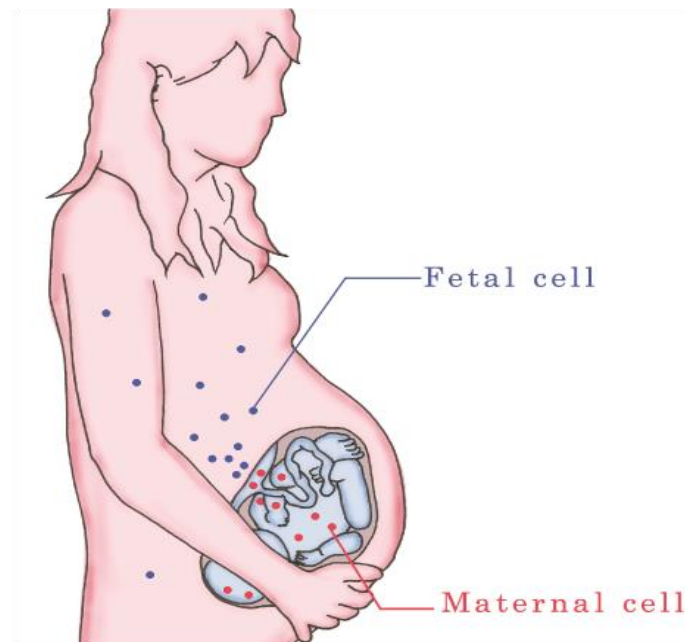


Definition mikrochimerism:

Närvaron av ett litet antal celler/DNA ($< 1\%$) i en individ vilka härstammar från en annan individ

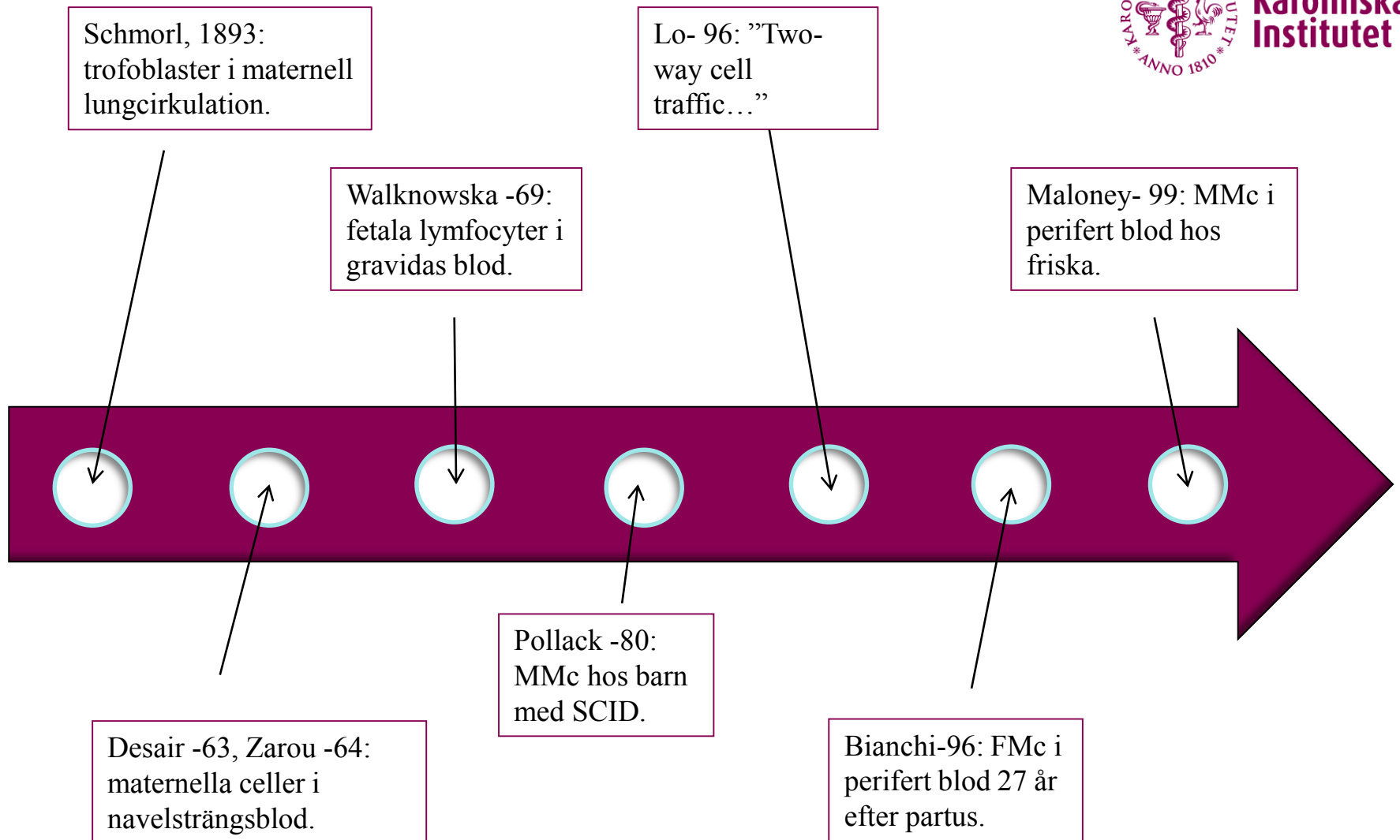
FMc = fetal mikrochimerism, fetala celler överförda till mamman

MMc = maternell mikrochimerism, maternella celler överförda till fostret



Betydelse av en liten mängd allogena celler i en individ:

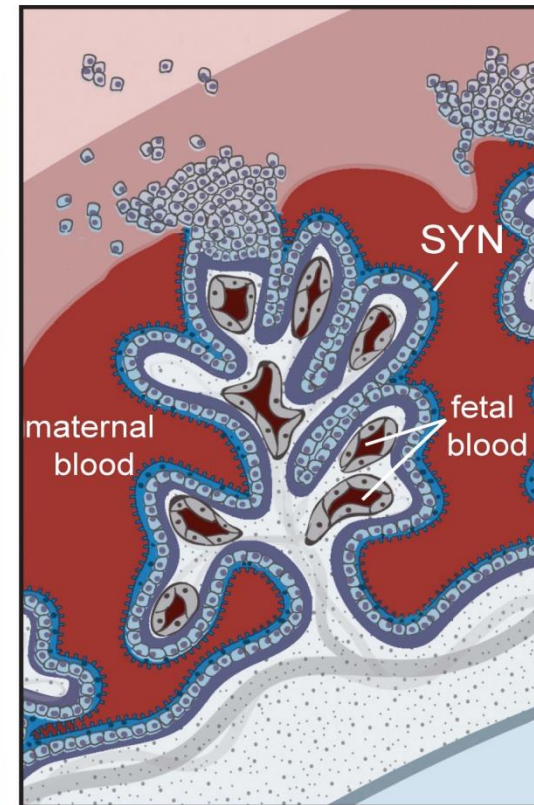
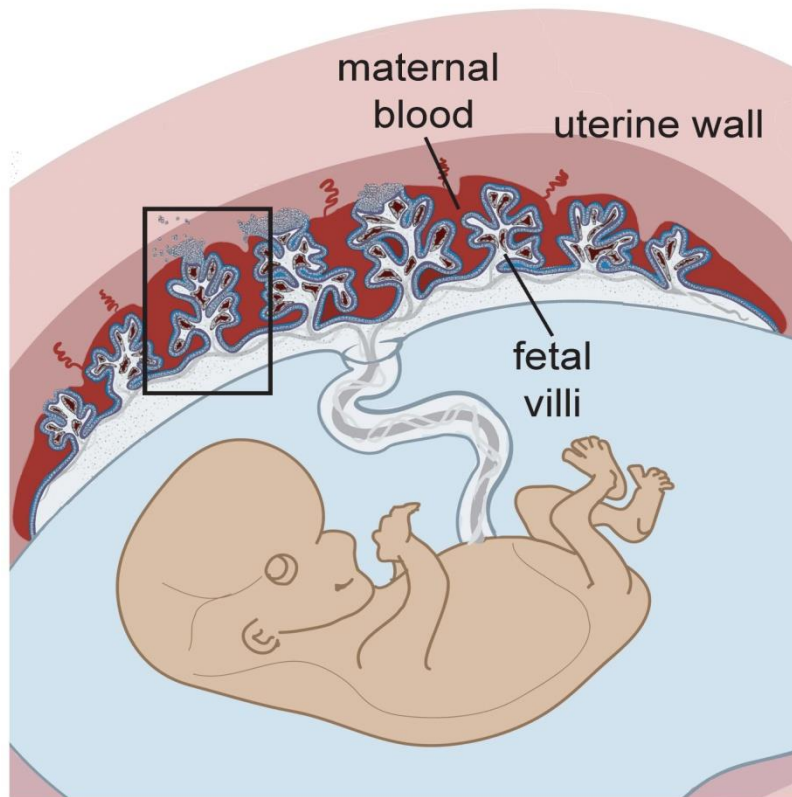
- Autoimmunitet? Lee Nelson, 1996: "Is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune?"
- Kan bidra till reparation av skadad vävnad?
- Induktion av tolerans hos foster respektive mamman under graviditet → klinisk betydelse vid transplantation



Graviditet - ett immunologiskt under

1. Placenta
2. Mammans immunförsvar
3. Fostrets immunförsvar

Placenta



- Trofoblaster saknar klassiska HLA I- och II-molekyler
- Extravillus trofoblaster uttrycker istället HLA- C, - E och – G.
- HLA- G:
 - betydelse för implantation av embryot
 - betydelse för acceptans av allograft i transplantation
 - aktiverar och inhiberar immunologiska celler i decidua

Mammans immunförsvar

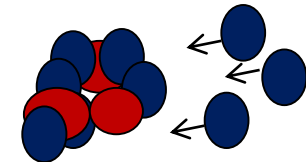
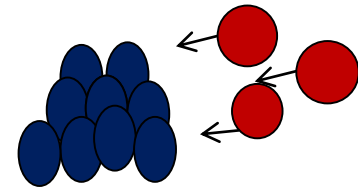
- "The Th1/ Th2 shift": Th 1 ↓ → IFN- γ , TNF- α , IL- 2 ↓
: Th 2 ↑ → IL- 4, IL- 5, IL- 10 ↑
- CD4+ CD25+ FoxP3+ (regulatoriska T celler, Tregs) celler specifika för fetala antigen ↑

- Toleransutveckling > infektionsbekämpning (?)
- Michaëlsson-06: Fetala Tceller kan stimuleras vid avsaknad av fetala Tregs
- Tregs ↑. 15-20% av CD4+ celler i lymfkörtlar hos 2:a trimester foster jmfrt med < 5% hos vuxna.
- Mold-08: Maternella alloantigen inducerar utvecklingen av fetala Tregs

MMc och autoimmunitet

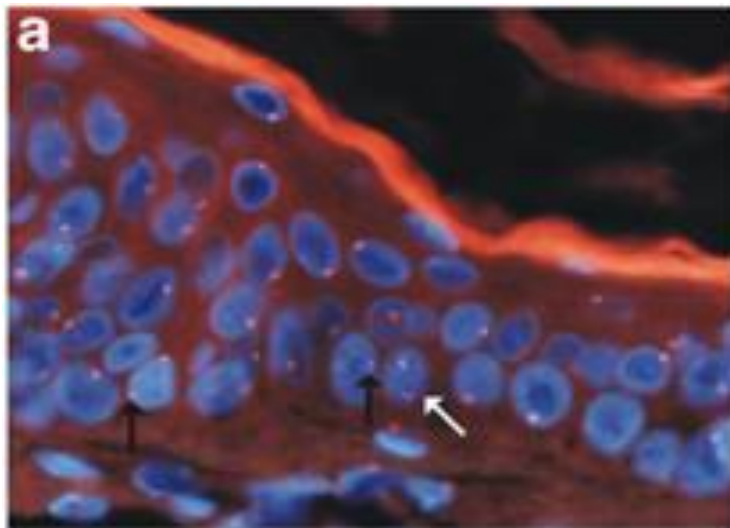
Teorier:

- Attackerar mammans celler barnets?
”graft-versus-host”-reaktion
- Är mammans celler målet för en attack?
”host-versus-graft”-reaktion
- Migrerar mammans celler till skadad vävnad för
att bidra till reparation?



Metoder för studier av MMc

FISH: detektera XX-celler i XY-vävnad eller blod



PCR: detektera maternella alleler i barnet

Maternell mikrochimerism och autoimmunitet

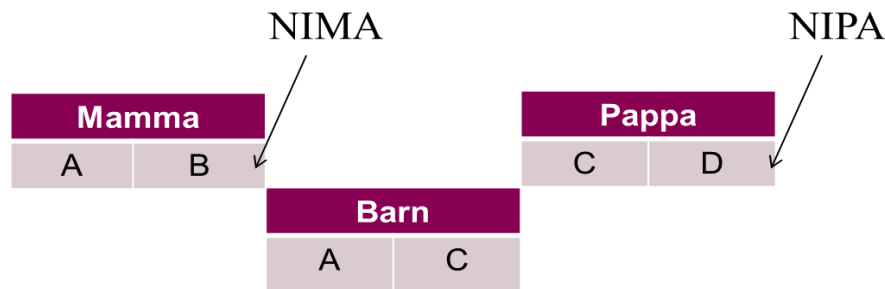
- Juvenil dermatomyositis: ökad frekvens av MMc i blod och i muskel jämfört med syskon och friska kontroller (Reed-00, Artlett-00, Artlett-01, Reed-04, Ye-12)
- Biliär atresi: ökad frekvens av MMc i lever jämfört med kontroller (Suskind-04, Kobayashi-07, Hayashida-07).
- Neonatal lupus: MMc fanns i 15/15 snitt av hjärtvävnad jämfört med 2/8 kontroller. 86% av de maternella cellerna uttryckte sacromeric α -actin (Stevens-03). Hypotes: maternella celler är målcellerna att bidra till reparation
- Typ 1 diabetes: MMc ökad frekvens i pancreas och i blod. Uttrycker insulinmarkörer. Inga immunologiska celler (Nelson-07, Vanzyl-10). Hypotes: maternella celler bidrar till reparation.
- Skleroderma: 72% MMc i blod hos sjuka, 22% hos friska (Lambert-04)

MMc och toleransutveckling under fosterlivet

- **Billingham-53:** Tolerans kan induceras under fosterlivet
- **Claas-88:** Induction of B cell unresponsiveness to noninherited maternal HLA antigens during fetal life.

NIMA (non-inherited maternal antigen)

- NIMA = den HLA allel som barnet inte har ärvt från mamman
- NIPA = den HLA allel som barnet inte har ärvt av pappan

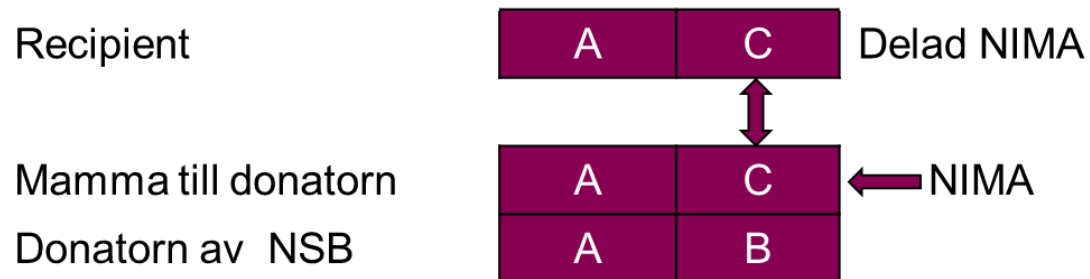


- NIMA- effekten: närvaro av MMc under fosterlivet kan leda till varaktig tolerans mot mamman

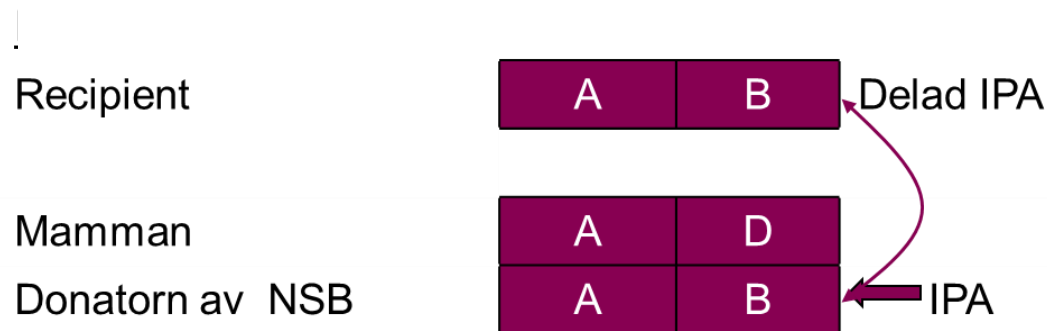
Kliniska konsekvenser av NIMA-effekten

- **Organtransplantation:** bättre transplantationsutfall när den donerade syskonjuren uttryckte NIMA jmfrt m NIPA (Burlingham-98)
- **Stamcellstransplantation:** syskondonatorer mismatchade för NIMA bättre transplantationsutfall jämfört med övriga familjemedlemmar (van Rood-02, Ichionhe-04)

- **Navelsträngstransplantation I: Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies.**
van Rood JJ et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 24;106(47):19952-7.



- **Navelsträngstransplantation II:** Indirect evidence that maternal microchimerism in cord blood mediates a **graft-versus-leukemia effect in cord blood transplantation.** van Rood JJ et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 14;109(7):2509-14.



Avhandlingens syfte:

- Det huvudsakliga syftet med avhandlingen var att studera kinetik av MMc under graviditet och dess persistens hos barn och vuxna och specifikt i relation till en autoimmun sjukdom - SLE.
-

BASIC SCIENCE: OBSTETRICS

Maternal microchimerism in human fetal tissues

Anna Maria Jonsson, MD; Mehmet Uzunel, PhD; Cecilia Götherström, PhD;
Nikos Papadogiannakis, MD, PhD; Magnus Westgren, MD, PhD

OBJECTIVE: The aim of the present study was to analyze the presence of maternal cells in human fetal tissues in the second trimester.

STUDY DESIGN: Tissues from 11 second-trimester fetuses terminated because of social reasons or because of malformations and/or trisomy were investigated. By cell sorting and polymerase chain reaction amplification, we studied the presence of maternal CD3+, CD19+, CD34+, and CD45+ in different fetal tissues and in placenta.

RESULTS: In the group of fetuses with normal karyotype and normal autopsy findings, 4 of 5 fetuses were positive for maternal microchi-

merism. In the group in which the fetuses were diagnosed with trisomy 21 and/or malformations, we found cells of maternal origin in 3 of 6 fetuses.

CONCLUSION: The results from this study indicate that maternal microchimerism is a common phenomenon in the second-trimester fetuses. Maternal cells of lymphoid and myeloid lineages and hematopoietic progenitors are widely distributed in the second-trimester fetuses.

Key words: fetus, immunology, microchimerism, pregnancy

Syfte:

- att utforska förekomsten av maternell mikrochimerism
- att karaktärisera maternella celltyper i olika vävnader från foster i andra trimestern

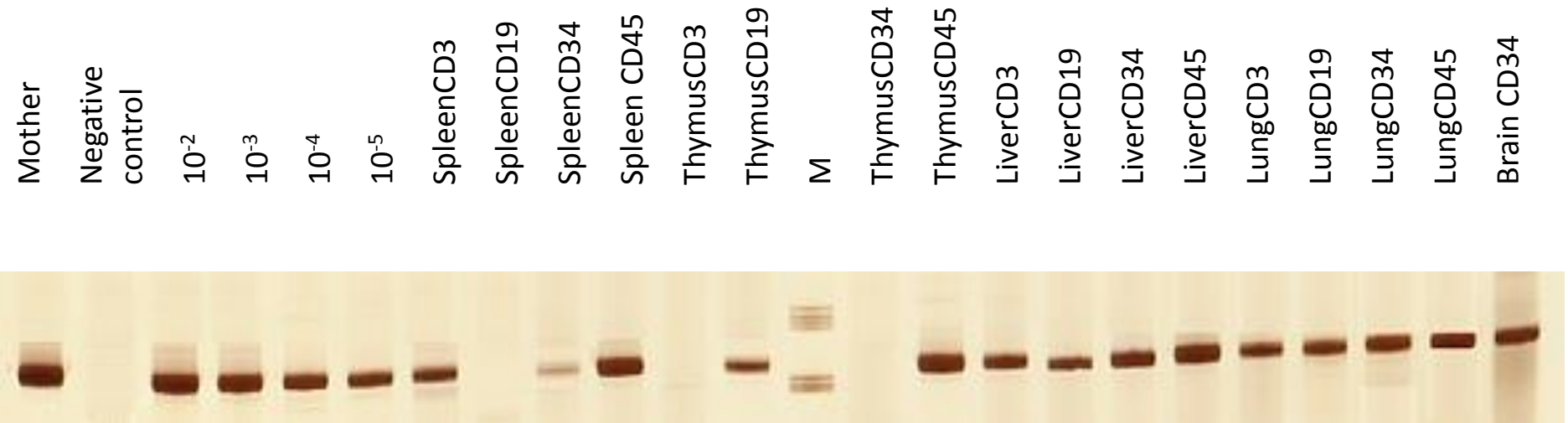
Studieobjekt:

- 5 normala foster (gestationsvecka 14-17)
- 5 foster med trisomi 21 och/eller missbildningar (gestationsvecka 15-18)
- en intrauterin fosterdöd (gestationsvecka 27)
- perifert blod från mamman

Metod:

- Cellseparation av CD3+, CD19+, CD34+ och CD45+ mha immunomagnetiska kulor i 7 fall
- HLA-typning av mor och foster med PCR
- Detektion av maternella alleler i fostervävnad med konventionell PCR mha specifika primers för mamman.

Exempel på PCR-gel



Resultat:

- Maternella celler fanns i 7 av 11 foster (gestationsvecka 14-18).
- Cellerna fanns i alla undersökta organ; lunga, thymus, njure, hjärta, lever, binjurar, hjärna, pancreas, mjälte, hjärna, gonader och placenta.
- Maternella celler detekterades i 4 av 5 normala foster, och i 3 av 6 sjuka foster
- Maternella CD3+, CD19+, CD34+ och CD45+ celler kunde detekteras i olika organ.
- Mödrarna i 6 av 7 positiva fall var multigravida (> en graviditet). Bland mödrarna till negativa fall hade 2 av 4 varit gravida tidigare.

Maternal Microchimerism in Juvenile Tonsils and Adenoids

ANNA MARIA JONSSON, NIKOS PAPADOGIANNAKIS, ANNA GRANATH, JENNY HAGGSTROM, MARIE SCHAFFER,
MEHMET UZUNEL, AND MAGNUS WESTGREN

Department of Obstetrics and Gynecology [A.M.J., M.W.]; Department of Laboratory Medicine [N.P., M.S., M.U.]; Department of Ear, Nose, Throat, and Cochlear [A.G., J.H.]; Karolinska Institute and Karolinska University Hospital, Huddinge, 141 86 Stockholm, Sweden

Syfte:

Att utforska förekomsten av maternell mikrochimerism i barns tonsiller och/ eller adenoid och i perifert blod.

Studieobjekt:

- Tonsiller och/ eller adenoid (2 st 5 mm³ av vardera tonsillen, 2 st 5 mm³ av adenoiden) från 20 stycken barn mellan 2 och 15 år
- Perifert blod från barnen och mammorna

Metod:

- Typning av mor och barn för skillnader i DNA polymorfism ("SNP" eller "INDEL") mha PCR på blod
- Detektion av maternella alleler i tonsill och/eller adenoidvävnad samt i blod med QRT-PCR mha primers specifika för mamman

Resultat:

- Maternell mikrochimerism detekterades hos 4/20 barn
- Barnen (två flickor och två pojkar) var mellan 2 och 4 år
- Koncentrationen av maternell mikrochimerism:
Vävnad: 0.02 – 0.00075 %
Blod: 0.003 – 0.007 %
- Barnen som var positiva i vävnad var också positiva i blod

A Research Study of the Association between Maternal Microchimerism and Systemic Lupus Erythematosus in Adults: A Comparison between Patients and Healthy Controls Based on Single-Nucleotide Polymorphism Using Quantitative Real-Time PCR

Anna Maria Jonsson Kanold^{1*}, Elisabet Svenungsson², Iva Gunnarsson², Cecilia Götherström^{1,3}, Leonid Padyukov², Nikos Papadogiannakis⁴, Mehmet Uzunel³, Magnus Westgren¹

Syfte:

- Att utforska associationen mellan systemisk lupus erythematosus (SLE) hos vuxna och förekomsten av maternell mikrochimerism i perifert blod.
- Att undersöka om maternell mikrochimerism persisterar

Studieobjekt:

- 32 (30 kvinnor och två män) patienter med SLE och deras mammor selekterades från en stor genetisk studie av SLE från 90-talet. Medelåldern var 32 år (18-52).
- Samtliga studieobjekt uppfyllde minst fyra stycken av 1982 års "American College of Rheumatology Criteria for SLE".
- Samtliga kvinnor i studien hade uppgivit sig som 0-gravida.
- Friska kontroller utgjordes av 17 bröder till patienterna samt ytterligare 12 obesläktade män. Kontrollernas medelålder var 29 år (10-54).

Artikel III

Metod:

- Typning av mor och barn för skillnader i DNA polymorfism mha PCR
 - Detektion av maternella alleler i blod hos patienter och kontroller med QRT-PCR mha primers specifika för mamman
-

Resultat:

- Två (6%) patienter var positiva för maternell mikrochimerism i blod
- medelkoncentrationen var 0.004%
 - en (3%) kontroll var positiv
- koncentrationen var 0.004%
 - Ingen skillnad fanns i förekomst av maternell mikrochimerism hos patienter och kontroller (p-värde= 0.65)
 - Ingen av de positiva individerna var längre positiv vid uppföljning 16 år efter den första blodprovstagningen.
-

Artikel III

Konklusion:

- SLE hos vuxna är inte associerat med maternell mikrochimerism i blod
 - Maternell mikrochimerism kan variera över tid
-

Cellular subsets of maternal microchimerism in umbilical cord blood

Authors:

Anna Maria Jonsson Kanold MD, Magnus Westgren MD, PhD, Cecilia Götherström PhD

Manuscript

Syfte:

- Att undersöka förekomsten av maternell mikrochimerism i navelsträngsblod efter vaginala förlossningar och efter kejsarsnitt
- Att karaktärisera de maternella cellpopulationerna
- Att undersöka om avnavlingstiden har någon betydelse för förekomsten av maternell mikrochimerism i blod

Bakgrund:

- Transplantation av navelsträngsblod (nsb) utgör idag ett gott alternativ till annan stamcellstransplantation
- Maternella celler i nsb har studerats tidigare (frekvens 0-100%) men endast ett par studier har inkluderat typ av maternella celler
- Två studier har nyligen gjort gällande att maternell mikrochimerism hos donatorn kan vara av fördel för recipienten:
 - **Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies.** van Rood JJ et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 24;106(47):19952-7.
 - **Indirect evidence that maternal microchimerism in cord blood mediates a graft-versus-leukemia effect in cord blood transplantation.** van Rood JJ et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 14;109(7):2509-14.
- Avnavlingstiden vid förlossningar har förlängts

Studieobjekt:

- nsb från 44 normala, fullgångna graviditeter med noterad avnavlingstid
- 24 vaginala förlossningar
- 20 kejsarsnitt

Metod:

- Cellseparation av CD3+, CD19+, CD33+, CD34+ och CD56+ mha immunomagnetiska kulor
- Typning av mor och barn för skillnader i DNA polymorfism mha PCR
- Detektion av maternella alleler i nsb med QRT-PCR mha primers specifika för mamman

Artikel IV

Resultat:

- 5/44 fall var positiva för maternell mikrochimerism (11%)
- Maternell mikrochimerism detekterades i fritt DNA, i CD34+ och CD56+ fraktionen
- Koncentrationen maternell mikrochimerism: 0.01-1.5%
- 4/5 av de positiva fallen var förlösta med kejsarsnitt
- Avnavlingstiden bland de positiva fallen var kortare (37+/-13 s) jämfört med de negativa fallen (54+/-26 s)
- 4/5 (80%) av mammorna i den positiva gruppen hade varit gravida tidigare jämfört med 21/39 (54%)

Konklusion:

- Maternella CD34+ och CD56+ celler finns i navelsträngsblod
- Andelen maternella celler i nsb kan bero på förlossningssätt och/ eller avnavlingstid
- Den funna mängden maternella celler i nsb kan ha betydelse vid transplantation