



Høgskulen på Vestlandet

BIO160 Bacheloroppgave og Plakat Gruppe B - Bioingeniør

BIO160

Predefinert informasjon

Startdato:	24-03-2021 12:43	Termin:	2021 VÅR
Sluttdato:	26-03-2021 12:00	Vurderingsform:	Bestått/ikke bestått
Eksamensform:	Bacheloroppgave (skriftlig i gruppe)		
Flowkode:	203 BIO160 1 O 2021 VÅR		
Intern sensor:	Line Wergeland		

Deltaker

Naun:	Romana Cermakova
Kandidatnr.:	208
HVL-id:	580701@hvl.no

Informasjon fra deltaker

Egenerklæring *: Ja
**Inneholder besvarelsen
konfidensielt
materiale?:** Nei
**Jeg bekrefter at jeg har
registrert
oppgavetittelen på
norsk og engelsk i
StudentWeb og vet at
denne vil stå på
vitnemålet mitt *:** Ja

Gruppe

Gruppenavn: B3
Gruppenummer: 2
**Andre medlemmer i
gruppen:** Hanne Stubberud Andersen, Hege Dale

Jeg godkjenner autalen om publisering av bacheloroppgaven min *

Ja

Er bacheloroppgaven skrevet som del av et større forskningsprosjekt ved HVL? *

Nei

Er bacheloroppgaven skrevet ved bedrift/virksomhet i næringsliv eller offentlig sektor? *

Ja, Universitet i Bergen



Høgskulen
på Vestlandet

BACHELOROPPGAVE

Monocytter i Autoimmun Addisons Sykdom: antall monocytter og deres potensiale til å bli aktiverte.

Monocytes in Autoimmune Addison's Disease: amount of monocytes and their potential to become activated.

Hanne Stubberud Andersen, Romana Cermakova og Hege Dale

Bioingeniørutdanningen

Fakultet for ingeniør- og naturvitenskap (FIN), Institutt for sikkerhet, kjemi- og bioingeniørfag

Veiledere: Line Wergeland og André Sulen
26.03.21

Vi bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1.

Sammendrag

Autoimmun Addisons sykdom (AAS) kjennetegnes av autoimmunitet rettet mot celler i binyrebarken i binyrene, som igjen fører til mangel på hormonene aldosteron og kortisol. AAS deles i isolert AAS og autoimmune polyendokrine syndromer (APS-1 og APS-2). I APS er det flere risikogener som peker mot defekter i sentral og perifer toleranse. Monocytter er essensielle i det medfødte immunsystemet. Forskning viser at miljøpåvirkning trener monocytter til å bli mer aktivert. Det kan dermed være interessant å se på rollen til monocyttene i AAS. Målet for prosjektet er å undersøke antallet av monocytter og deres evne til å bli aktivert i AAS pasienter sammenlignet med friske kontroller.

For å undersøke antall av monocytter ble det etablert et monocyttopanel (CD45, HLA-DR, CD88, CD14 og CD16) for flowcytometri av heparin fullblod. Det ble benyttet kuler for absolutt kvantitering av monocytter. Isolerte monocytter ble stimulert med LPS for å se på oppreguleringen av genene TNF, IL6, CXCL10 mot ACTB. Dette ble gjort ved hjelp av qPCR og beregning av fold change (FC).

Det var ingen signifikant forskjell i antall monocytter mellom kontroll- og pasientprøver. Hos kontrollprøvene gav stimulering med LPS en signifikant økning i aktivering av monocyttene. Dette var ikke signifikant hos pasientene på grunn av stor variasjon. Det ble ikke påvist forskjell i aktivering mellom kontroller og pasienter.

Selv om t-test viste at det ikke var noe signifikant forskjell i både antall og aktivering av monocytter, observeres det likevel en lavere antall monocytter og høyere aktivering hos noen pasienter sammenlignet med kontroller.

Nøkkelord: Autoimmun Addisons sykdom, trent medfødt immunitet, flowcytometri, immunaktivering og qPCR

Abstract

Autoimmune Addison's disease (AAD) is characterised by autoimmunity directed towards cells in the adrenal cortex of the adrenal glands, which leads to a deficiency of the hormones aldosterone and cortisol. AAD is divided into isolated AAD and autoimmune polyendocrine syndromes (APS-1 and APS-2). There are several risk genes in APS that points to defects in central and peripheral tolerance. Monocytes are essential in the innate immune system. Research shows that different environmental factors train monocytes to have higher responsiveness, this is called trained innate immunity. As such it could be interesting to investigate the role of monocytes in AAD. The purpose of this project is to determine the amount of monocytes and their ability to become activated in AAD patients compared to healthy controls.

To determine the amount of monocytes, a monocyte panel (CD45, HLA-DR, CD88, CD14 and CD16) was established for flow cytometry using heparin whole blood. Counting beads were used for absolute quantification of monocytes. Isolated monocytes were stimulated with LPS to observe the upregulation of genes TNF, IL6, CXCL10 compared to ACTB. This was done with qPCR and calculation of fold change (FC).

There was no significant difference in the amount of monocytes between control and patient samples. In the control samples there was a significant difference detected in the activation of monocytes with LPS. Due to high variation between the patient samples, no significant changes of activation was found. Furthermore, there was observed no significant difference in activation of monocytes between control and patient samples.

Although the T-test showed that there was no significant difference in both the amount and activation of monocytes, a lower number of monocytes and higher activation were still observed in some patients when compared to healthy controls.

Keywords: Autoimmune Addison's Disease, trained innate immunity, flow cytometry, immune activation and qPCR.

Forord

Bacheloroppgaven er utarbeidet av Hanne Stubberud Andersen, Romana Cermakova og Hege Dale, i samarbeid med Høgskolen på Vestlandet (HVL) og Universitetet i Bergen (UiB), Klinisk institutt (K2) – Endokrinologi.

Vi vil rette en stor takk til vår interne veileder Line Wergeland (HVL) for god oppfølging og at hun alltid har vært tilgjengelig på mail og zoom. En stor takk går og til vår eksterne veileder André Sulen som har gitt oss verdifull kunnskap og hjelp på laboratoriet. Begge har vært til stor hjelp i skriveprosessen med deres gode tilbakemeldinger på alle utkastene vi har sendt.

En takk må også rettes til alle på K2 – endokrinologi som har ønsket oss velkommen inn på laboratoriet deres og hjulpet oss når vi har gått rundt og lett etter utstyr.

Vi vil også takke Turid Aarhus Braseth for god prosessveiledning, og hverandre for godt samarbeid gjennom hele prosessen.

Bergen, 26.03.21

Romana Cermakova

Romana Cermakova

Hanne S. Andersen

Hanne Stubberud Andersen

Hege Dale

Hege Dale

Innholdsfortegnelse

1.0 Innledning.....	7
1.1 Immunforsvaret	7
1.1.1 Hematopoiese.....	7
1.1.2 Det medfødte immunforsvaret	8
1.1.3 Det ervervede immunforsvaret.....	10
1.1.4 Autoimmunitet	11
1.2 Addisons Sykdom.....	12
1.2.1 Autoimmun Addisons Sykdom (AAS)	12
1.2.2 Autoimmune polyendokrine syndromer (APS)	15
1.2.3 Patogenese.....	16
1.2.4 Immundefekter i AAS	17
1.3 Monocytter og trent immunitet.....	18
1.3.1 Monocytter	18
1.3.2 Trent medfødt immunitet	19
1.4 Flowcytometri.....	20
1.4.1 Kompensering	22
1.4.2 Immunfenotyping.....	23
1.5 Real time qPCR	24
1.6 Problemstillinger	26
2.0 Materiale og metode.....	27
2.1 Prøvemateriale	27
2.2 Etske betraktninger og REK-godkjenning.....	29
2.3 Antistoff-merking av celler i fullblod.....	29
2.4 Monocyttisolering fra blod	30
2.5 RNA-isolering	31
2.6 RNA til cDNA	31
2.7 Real time qPCR	32
2.8 Gelelektroforese.....	32
3.0 Resultater.....	33
3.1 Analyse av monocytter i fullblod	33
3.1.1 Titrering av antistoff	33
3.1.2 Monocytter hos friske kontroller og pasienter med AAS	34
3.2 Aktivisering av monocytter.....	38
3.2.2 Isolering av monocytter og ekstraksjon av RNA.....	38
3.2.3 Optimalisering av qPCR	39

3.2.4 Resultat fra qPCR	41
4.0 Diskusjon.....	44
4.1 Etablering av monocyttnpanel	45
4.2 Antall monocytter i blod.....	45
4.3 Monocyttilisering.....	47
4.4 Endring i genuttrykk.....	47
5.0 Konklusjon	49
6.0 Referanser.....	50
7.0 Vedlegg	56

1.0 Innledning

1.1 Immunforsvaret

Kroppen blir kontinuerlig eksponert for en rekke mulige inntrengere, dette omfatter mikroorganismer som virus, bakterier, sopp og encellede parasitter, kalt protozoer, og flercellede parasitter. Immunforsvaret har som hovedoppgave å beskytte kroppen mot disse inntrengerne, og hindre at uønskede mikroorganismer og parasitter etablerer seg i kroppen. Immunforsvaret er helt avgjørende for vår overlevelse og har i tillegg sentrale oppgaver som å fjerne døde celler og vev, og angripe og fjerne kreftceller (1). Immunforsvaret består av flere typer spesialiserte celler og et stort antall av ekstracellulære peptider og proteiner. Cellene i immunforsvaret kalles leukocytter og produseres og utvikles gjennom hematopoiese (1).

1.1.1 Hematopoiese

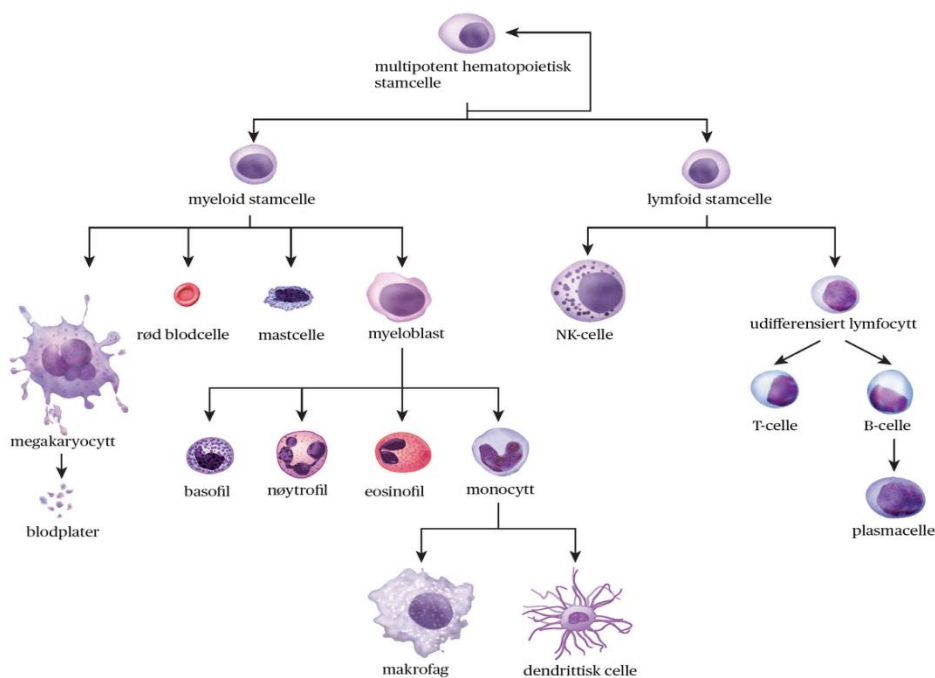
Hematopoiese er betegnelsen på dannelse, utvikling og spesialisering av celletypene i blodet som erytrocytter, leukocytter og trombocytter (Figur 1). Det omfatter proliferasjon eller celledeling, differensiering og modning. I benmargen finner en hematopoetiske stamceller (HSC) som har evne til å dele seg, og blir differensiert mot spesialiserte celler. Hvilken retning de modnes i er avhengig av signalmolekyler som er til stede i benmargen under celledelingen (2).

I fosterstadiet er blodceller produsert hovedsakelig i lever, men også i milt og lymfeknuter. Etter fødsel blir benmargen hovedsete for hematopoiese. Den skjer hovedsakelig i den røde benmargen, men andre vev som er inkludert er nyre, lever, milt, thymus og lymfeknuter (3). Hos voksne er 70% av hematopoiesen lokalisert i pelvis, ryggsøyle og brystben (2).

Hematopoietiske stamceller er multipotente stamceller som gir opphav til alle blodceller i kroppen. Gjennom stadig differensiering av HSC skapes det mer og mer differensierte forstadier av lymfoide eller myeloide celler. Disse mer differensierte forstadier kalles progenitorceller. Myeloide progenitorceller blir til celler som monocytter, og basofile-, nøytrofile- og eosinofile granulocytter. Lymfoide progenitorceller blir til NK-celler, T-celler og B-celler (2).

Cytokiner regulerer hematopoiesen. Dette er løselige glykoproteiner og viktige signalmolekyler, og de kan ha autokrin, parakrin eller endokrin virkning. Når cytokinene

virker på de cellene som produserer dem, kalles det autokrin virkning. Parakrin virkning (para = ved siden av) er når cytokinene virker på naboceller, eller målceller i nærheten. Endokrin virkning er når cytokinene eller signamolekylet fraktes rundt i blodet og virker på celler som er andre steder i kroppen (1). Cytokiner regulerer celledeling, differensiering og modning av HSC, progenitorceller og forløpercellene. Viktige cytokiner er blant annet interleukiner (IL-2, IL-3) og interferoner (INF- α). For eksempel stimulerer IL-2 til deling i retning av lymfocytter (2).



Figur 1: Hematopoiese: tradisjonell modell som viser differensiering av ulike blod celler fra HSC til modne celler (4).

1.1.2 Det medfødte immunforsvaret

Immunforsvaret deles inn i to deler, det medfødte og det ervervede immunforsvaret. Det medfødte immunforsvaret trer raskt i funksjon og er kroppens første linje forsvar mot sykdomsfremkallende inntrengere. Det deles inn i en ytre del som omfatter huden og slimhinner, og en indre del som omfatter det medfødte celledforsvaret og ikke-cellulære faktorer. Granulocytene, dendrittiske celler, monocytter og makrofager inngår i det medfødte immunforsvaret sammen med komponentene de skiller ut, komponenter i komplementsystemet, laktoferrin, interferon og akutfaseprotein (1, 5).

Dendrittiske celler, monocytter og makrofager gjenkjenner konserverte strukturer i ulike mikrobielle molekyler, også kalt patogen-assosiert molekylære mønstre (PAMPs). Disse

inkluderer blant annet lipopolysakkarid (LPS) som finnes i celleveggen til gramnegative bakterier, peptidoglykan fra den grampositive celleveggen og suktermolekylet mannose. Makrofager og dendrittiske celler gjenkjenner PAMPs ved hjelp av mønstergjenkjennende reseptorer (PRR) som befinner seg på celleoverflaten til disse cellene. PRR inkluderer blant annet toll-like reseptorer (TLRs), C-type lektin reseptor (CLRs) og NOD-like reseptor (NLRs) (6, 7).

Når PRR har blitt bundet til PAMP settes det i gang intracellulære biokjemiske kaskader som fører til aktivering av cellen. Aktiverte celler kan da fagocyttere (cellespising) og sekreere ulike cytokiner. Cytokiner som blir produsert er blant annet tumornekrosefaktor (TNF), IL-1 og IL-6. Disse cytokinene er kritiske for å få i gang rekruttering av celler til infeksjonsområdet for å videre klarere patogenet (8). Dysregulert produksjon av slike inflammatoriske cytokiner er ofte assosiert med inflammatoriske eller autoimmune sykdommer.

Nøytrofile granulocytter, dendrittiske celler og makrofager er viktige fagocytterende celler. Fagocytose innebærer at en fagocytterende celle omslutter partikler, for eksempel bakterier eller vev- og cellerester, tar materialet opp i seg, og deretter fordøyer det. Dendrittiske celler og makrofager kan videre presentere antigen fra mikroben på celleoverflaten for å aktivere det ervervede immunforsvaret (1).

Videre aktivering gjennom TLR vil også indusere uttrykk av CD80 på celleoverflaten til profesjonelle antigenpresenterende celler (APC). CD80 er et viktig ko-stimulerende molekyl, og dets tilstedeværelse er nødvendig for aktivering av naive T-lymfocytter. Ved mangel på CD80 og eller ko-stimulering vil gjenkjenning av antigener føre til anergi (7). Anergi hos T-celler er karakterisert av at de er uten evne til å utøve funksjoner i respons til antigen stimulering (9), se 1.1.3 Det ervervede immunforsvaret.

APC er celler som uttrykker HLA klasse II molekyler på overflaten, og har muligheter for å presentere antigen for CD4⁺ T-lymfocytter (8). B-lymfocytter, makrofager, langerhansceller i hud og dendrittiske celler er de typiske eksemplene på profesjonelle APC (10). APC tar effektivt opp antigen ved fagocytose eller reseptormediert endocytose (mekanisme der celler spiser og fordøyer store molekyler) og presenterer antigen på HLA klasse II molekyl ledsaget av uttrykk av ko-stimulerende molekyler. Dette fører til aktivering og videre differensiering av T-cellene. På denne måten er det medfødte og det ervervede immunforsvaret tett integrert for å sørge for optimal immunfunksjon (8).

1.1.3 Det ervervede immunforsvaret

Det ervervede immunforsvaret blir også kalt det spesifikke immunforsvaret og samvirker som sagt i stor grad med det medfødte immunforsvaret. Det består i hovedsak av ulike lymfocytter, T-celler og B-celler. Lymfocytene har spesifikke proteinstrukturer på membranoverflaten som gjør det mulig for dem å gjenkjenne spesifikke molekyler også kalt antigener, på fremmede mikroorganismer. Ved slik gjenkjenning vil spesifikke T- og B-celler aktiveres og øke i antall, mens noen B-celler vil danne antistoffproduserende celler kalt plasmaceller. Det er denne egenskapen som er opphavet til betegnelsen det spesifikke immunforsvaret (1, 5).

Plasmaceller skiller ut store mengder antistoffer (immunoglobuliner, Ig) som sirkulerer rundt i blodbanen og binder til de antigenene som stimulerte B-lymfocytene. Immunoglobulinene deles inn i fem klasser (IgA, IgE, IgD, IgG og IgM) med ulike funksjoner. I tillegg til plasma celler vil det også utvikles B-celler som kjenner igjen antigenet (minne-B-celle). Når minne-B-cellen blir stimulert igjen senere av det samme antigenet, vil cellen huske antigenet og raskt bidra til at det dannes flere plasmaceller. Plasmacellene vil igjen produsere store mengder antistoff som er rettet mot antigenet. Lymfocytene utvikler dermed immunologisk «hukommelse» når de støter på mikrober. På grunn av den immunologiske «hukommelsen» reagerer det ervervede immunforsvaret både raskere og kraftigere, hvis den samme mikroben kommer tilbake (1, 5).

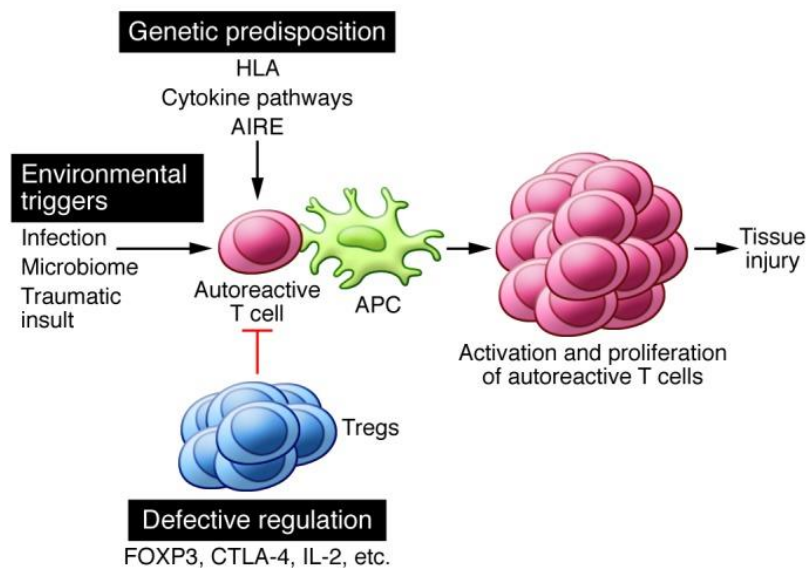
Et av de viktige særtrekkene ved ervervet immunforsvar, er å skille mellom kroppens egne antigene strukturer og det som blir kalt for fremmede strukturer. Toleranse og mangel på reaktivitet mot kroppsegne strukturer er nødvendig for å unngå autoimmune sykdommer, samtidig som reaktivitet mot alle andre strukturer må bevares. Sentral toleranse er toleranse som induseres i de primære lymfoide organene ved at selvreaktive T-celler selekteres bort. T-celler som ikke viser binding til egne HLA-molekyler, vil gjennomgå apoptose og lukes bort. Resten vil gjennomgå en negativ seleksjon, som innebærer at celler med reseptorer som gjenkjenner egne peptider presentert av egne HLA-molekyler blir fjernet (7). Videre blir noen av T-cellene i thymus omdannet til Tregs (regulerende T-celler). Tregs er celler som regulerer aktiviteten av andre lymfocytter og på denne måten demper immunreaksjoner. Det har blitt observert at Tregs klarer å inhibere T-celle deling og cytokin produksjon, og på denne måten har de en viktig rolle i å hindre utviklingen av autoimmunitet (11).

I sekundære lymfoide organer vil T-celler la seg aktivere bare når det er en viss konsentrasjon av HLA/peptid til stede og antigenspresenterende celler er tilstrekkelig aktiverte. Aktivering av naive T-celler er avhengig av at antigenet fraktes til lymfeknuter og presenteres av APC, som for eksempel dendrittiske celler. En annen mekanisme for perifer T-celletoleranse er anergi. T-celleanergi oppstår dersom en T-celle mottar signal 1 (stimulering av peptid/MHC), men ikke signal 2 (ko-stimulering). En slik delvis stimulering fører til endring av T-cellen, slik at den samme cellen senere ikke er i stand til å respondere, selv ikke på antigener presentert av kostimuleringskompetente profesjonelle APC. Etter hvert vil de anerge T-cellene dø via apoptose (9).

1.1.4 Autoimmunitet

Når immunforsvaret fungerer som normalt, klarer det å skille mellom kroppsfremmede antigener og kroppens egne molekyler. Dette kalles selvtoleranse. I noen tilfeller svikter selvtoleransen, som fører til at immunforsvaret angriper kroppsegne celler og vev. Resultatet blir at celler og vev ødelegges, og funksjonen til det angrepne vevet blir nedsatt. De sykdommene som fører til at kroppens immunforsvar angriper egne celler og vev, kalles autoimmune sykdommer (auto = selv). Eksempler på autoimmune sykdommer er diabetes type 1, reumatoid artritt (leddgikt), multipel sklerose (MS), myasthenia gravis, pernisiøs anemi, og autoimmun Addisons Sykdom (AAS) (1).

Autoimmune sykdommer, som flere andre komplekse lidelser, antas å stamme fra en kombinasjon av genetiske og miljømessige faktorer. En enkel hypotese er at en mutasjon i ulike gener, se 1.2.2 Autoimmune polyendokrine syndromer (APS), resulterer i mangelfull regulering eller redusert terskel for lymfocytaktivering. Samtidig kan ulike miljøfaktorer initiere eller forsterke aktivering av autoreaktive lymfocytter. Det blir antatt at autoimmunitet vanligvis skyldes toleransebrudd hos T-celler (Figur 2). Autoreaktive T-celler kan enten forårsake autoimmun sykdom direkte, eller hjelpe B-celler med å lage autoantistoffer (12).



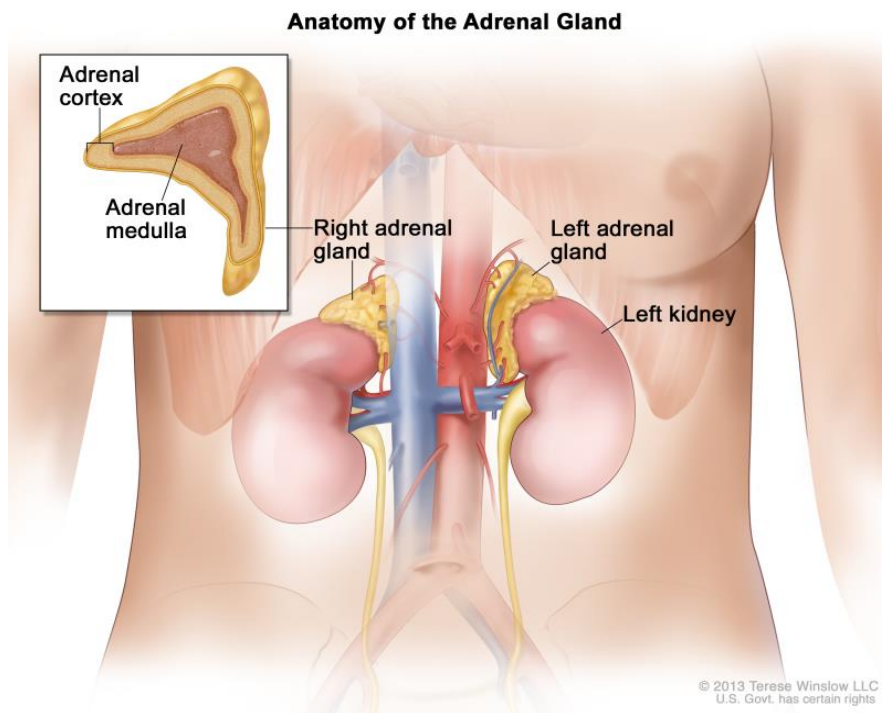
Figur 2: Genetiske predisposisjoner, miljømessige stimuli og mangelfull regulering av T-celler er grunner for utvikling av autoimmune sykdommer (12).

Autoimmune sykdommer kan deles i organspesifikke eller systemiske autoimmune sykdommer. Ved organspesifikke autoimmune sykdommer er immunresponsen rettet direkte mot et antigen som er karakteristisk for et bestemt vev eller organ. Både cellulære og antistoffmedierte mekanismer kan være involvert. Ved systemiske autoimmune sykdommer kan målantigenet være svært utbredt, eller det kan dreie seg om flere antigener som befinner seg i mange av kroppens vev og organer (7).

1.2 Addisons Sykdom

1.2.1 Autoimmun Addisons Sykdom (AAS)

Addisons sykdom skyldes redusert produksjon av glukokortikoider, primært kortisol, og mineralkortikoider, primært aldosteron, i binyrebarken. Binyrebarken er den ytterste delen av binyrene som ligger på toppen av hver sin nyre (Figur 3). Avhengig av årsak kan binyrebarksvikt deles inn i primær binyrebarksvikt og sekundær binyrebarksvikt. Primær binyrebarksvikt, er den vanligste årsaken til Addisons sykdom. Denne skyldes vanligvis en autoimmunitet rettet mot de hormonproduserende cellene i binyrebarken. Sekundær binyrebarksvikt skyldes derimot svikt i hypofysen, og resulterer i lav produksjon av adrenokortikotrop hormon (ACTH). ACTH regulerer frisettingen og syntesen av hormonet kortisol i binyrebarken, og en redusert produksjon av ACTH vil føre til redusert produksjon av hormonet kortisol (1, 13).



Figur 3: Binyrene sin anatomiske plassering. Binyrene deles inn i to endokrine kjertler, binyrebarken (adrenal cortex) og binyremargen (adrenal medulla) (14).

Primær binyrebarksvikt, eller autoimmun Addisons sykdom (AAS), er den vanligste årsaken til Addisons sykdom i I-land. I U-land derimot var tuberkulose tidligere den dominerende årsaken til Addisons sykdom. Nå, derimot er autoimmunitet ansvarlig for de fleste tilfeller i utviklingsland (13).

AAS er en sjelden og alvorlig sykdom, og kan være potensielt livstruende på grunn av hormonene sin sentrale rolle i både energi, salt- og væske homeostase i kroppen (15). Hormonet aldosteron har en sentral rolle i regulering av blodtrykk og elektrolyttbalansen, og reguleres blant annet gjennom det såkalte renin-angiotensin-aldosteron-systemet (RAAS). Nærmere forklart blir det en økt frisetting av hormonet når systemet RAAS blir aktivert ved fall i blodtrykk. Aldosteron vil så stimulere nyrene til økt reabsorpsjon av natrium, og økt sekresjon av kalium i nyrene. Sammen med natrium, reabsorberes vann og klorioner (Cl^-), som igjen fører til at blodtrykket øker (1, 5).

Glukokortikoidet kortisol, har en sentral rolle i regulering av både immunsystemet og metabolisme. Det er et livsviktig hormon, og påvirker flere forskjellige prosesser i kroppen, slik som karbohydratstoffsiftet, proteinstoffsiftet, fettstoffsiftet, stress, DNA-syntese, betennelser og virkning av andre hormoner. Regulering av syntese og frisettingen av kortisol,

styres av adrenokortikotrop hormon (ACTH), som produseres og frisettes fra hypofysen. Frisettingen av kortisol reguleres gjennom såkalt “negativ feedback”, ved at kortisol reduserer ACTH-frisettingen fra hypofysen. Nivået av kortisol har en betydelig variasjon gjennom døgnet og er høyest på morgenen, og lavest sent på kvelden (1).

Kortisol er et antiinflammatorisk molekyl. Ved vevsskade reduserer kortisol virkningen av lokale faktorer som prostaglandiner, som fremkaller en betennelsesreaksjon. I tillegg reduserer kortisol tilstrømmingen av leukocytter til betennelsesstedet. Dette reduserer risikoen for at betennelsesprosesser får et forløp som kan gi varige vevsskader (slik som ved revmatoid artritt). En høy konsentrasjon av kortisol over lengre tid, fører til nedsatt produksjon av antistoff, som er hovedårsaken til kortisol sin inhiberende virkning på immunforsvaret (1). På grunn av kortisol sin antiinflammatoriske virkning, blir glukokortikoider (GCS) ofte benyttet i behandling av akutte og kroniske inflammasjoner. Glukokortikoidenes effekt ved behandling er hovedsakelig gjennom direkte inhibering av aktiverte immunceller, slik som T-celler eller monocytter/makrofager (16).

Symptomer som oppstår ved AAS er hovedsakelig basert på mangelen av gluko- og mineralkortikoider som resulterer i vekttap, blodtrykksfall og svimmelhet når man reiser seg (ortostatisk hypotensjon), hyponatremi, hyperkalemi, hypoglykemi, lymfocytose og endring i blodtelling (anemi, eosinofili). Økt sekresjon av ACTH og andre pro-opiomelanokortin peptider (POMC) stimulerer hudens pigmentceller og fører ofte til økt pigmentering av hud og slimhinner. Dette er et mer spesifikt symptom på sykdommen, i tillegg til økt saltbehov. Med unntak av hyperpigmentering og saltbehov, er symptomene på AAS nokså uspesifikke og inkluderer svakhet, tretthet, vekttap, magesmerter, depresjon og angst. Som et resultat kan det ta lang tid før diagnosen blir stilt, noe som resulterer i klinisk presentasjon med akutt livstruende binyrekrise (15).

Diagnosen AAS kan som regel stilles klinisk og videre bekreftes ved måling av kortisolnivå og ACTH. De typiske funnene er lave nivå av kortisol og kraftig forhøyet nivå av ACTH, ikke målbart nivå av aldosteron og forhøyet reninaktivitet eller reninkonsentrasjon. I tillegg benyttes måling av autoantistoffer mot enzymet 21-hydroksylase (21OH) som en markør på AAS. Enzymet 21OH, er involvert i biosyntese av steroidhormoner (gluko- og mineralkortikoider) i binyrebarken. Dersom antistoffet ikke blir påvist, letes det etter andre årsaker enn autoimmunitet, basert på klinisk status til pasienten. På grunn av binyrebarken sin

manglende evne til å produsere viktige hormoner, får pasienter med AAS substitusjonsbehandling med glukokortikoider og mineralkortikoider (13, 17, 18).

1.2.2 Autoimmune polyendokrine syndromer (APS)

AAS kan opptre isolert eller i ulike autoimmune polyendokrine syndromer (APS). Når sykdommen opptrer isolert, har pasienten kun autoimmun Addisons sykdom. APS derimot, er en mangfoldig gruppe av kliniske tilstander, og er preget av funksjonsnedsettelse av flere endokrine kjertler på grunn av tap av immuntoleranse. APS deles videre inn i autoimmun polyendokrin syndrom type 1 (APS-1) og autoimmun polyendokrin syndrom type 2 (APS-2). I Nordiske land er prevalens for AAS, 200:1000 000 (19). Prevalens for APS-1 i Norge er estimert til omtrent 1:90 000, og er mye sjeldnere enn non-APS-1 (20).

APS-1 er et monogent syndrom som er knyttet til risikogenet AIRE (Autoimmun regulator gen). AIRE har en avgjørende rolle i å etablere sentral immunologisk toleranse og forhindre autoimmunitet. Mutasjoner i genet AIRE, vil føre til defekt i sentral toleranse og utviklingen av T-celler blir forstyrret. Når en får diagnosen APS-1, er det vanlig å utvikle andre sykdommer tillegg, som oppstår ofte i ung alder. Disse sykdommene kan være kronisk candida infeksjon i slimhinner, hypoparathyroidisme eller primær binyrebarksvikt (AAS). I tillegg til disse kliniske indikatorene er flere organ spesifikke angrep vanlige, som f.eks Type 1 diabetes (T1D) (21, 22).

APS-2 er et polygent syndrom som er knyttet til ulike versjoner av risikogener som PTPN22, HLA, CTLA4, CLEC16A, BACH2 og AIRE (19, 21). I Tabell 1, er proteinene som disse genene koder for og deres funksjon presentert. Flere av genene koder for proteiner som har sin funksjon knyttet til T-celler, og har en sentral rolle innenfor både aktivering, differensiering og seleksjon. En del av disse genene peker dermed mot defekt i sentral toleranse, men kan også indikere en rolle i perifer toleranse og presentasjon av antigen. En rekke HLA-regioner er sterkt knyttet til AAS, som har en sentral rolle i å presentere peptid til T-celler. Genet AIRE er som tidligere nevnt sterkt knyttet til APS-1, men en nyere studie viser at det finnes varianter av AIRE også i non-APS-1 (13, 19). I tillegg til effekter på sentral toleranse, regulerer genet PTPN22 signalering av monocytter/makrofager, og genet BACH2 er involvert i regulering av makrofager (23, 24).

Tabell 1: Genene HLA, CTLA-4, PTPN22, BACH2, CLEC16A og AIRE som er knyttet til APS-2, med proteinnavn og funksjon. Søkemotoren UniProt ble benyttet for å finne fullt proteinnavn og funksjon (25).

Gen	Protein	Funksjon
HLA	Human leukocyt antigen	Binder peptid og presenterer peptid for T-celler.
CTLA-4	Cytotoksisk T-lymfocyt protein 4	Inhiberer T-celle aktivering.
PTPN22	Protein tyrosin fosfatase, non-reseptor type 22	Involvert i signalering som kontrollerer immunaktivitet til T-celler. Regulerer signalering i monocytter/makrofager
BACH2	Transkripsjons regulator protein	Regulerer B- og T-celledifferensiering. Regulering av makrofager.
CLEC16A	Protein CLEC16A	Modulerer autofagi og T-celle seleksjon i thymus.
AIRE	Autoimmun regulator protein	Sentral rolle i seleksjonen av T-celler i thymus. Øker uttrykket av vevsspesifikke antigen på celleoverflaten.

Selv om APS-2 er mer vanlig enn APS-1, er det uklart hvordan denne sykdommen oppstår. Pasienter med APS-2 er karakterisert med minst to av tre følgende endokrinopater: T1D, autoimmun thyroidea sykdom (AITD) og AAS (21).

Dette prosjektet vil bruke materiale fra pasienter med isolert AAS eller APS-2 og det vil derfor fokuseres mindre på APS-1.

1.2.3 Patogenese

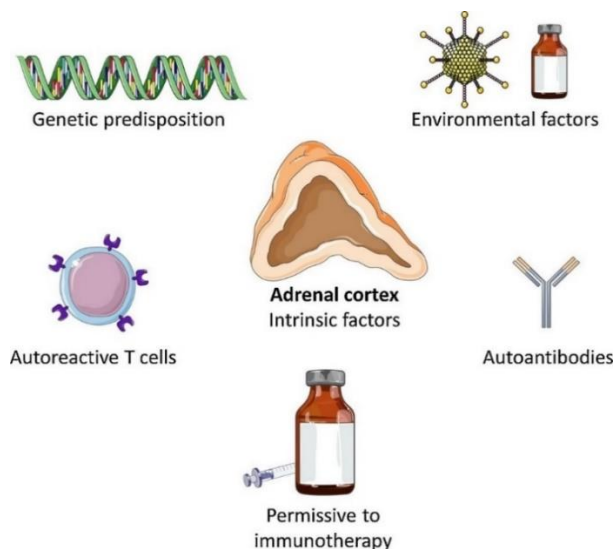
I likhet med de fleste autoimmune sykdommer, antas AAS å være forårsaket av en kombinasjon av flere uheldige genetiske varianter og miljøfaktorer. Nedenfor vises en forenklet modell av patogenesen til AAS (Figur 4) (13).

Det er flere gener som koder for immunologiske proteiner assosiert med AAS, som for eksempel HLA, AIRE, PTPN22, CTLA-4 og BACH2 (13). Selv om det er flere risikogener som er knyttet til AAS, er det fortsatt uklart hva som er den genetiske komponenten i AAS patogenese. Dette åpner for andre faktorer som for eksempel miljøbetingelser. Men selv om det er foreslått en rekke virus som mulige kandidater, er det lite kunnskap om miljøbetingelser (13).

AAS er karakterisert av en svært målrettet immunrespons mot enzymet 21-hydroksylase (21OH), og det er ofte autoantistoff mot 21OH til stede hos pasienter med AAS. Antistoff mot 21OH utgjør dermed en viktig biomarkør når autoimmunitet er den underliggende årsaken til binyrebarksvikt. Likevel antas det at 21OH-spesifikke cytotoksiske T-celler, også er ansvarlig for den faktiske destruksjonen av vevet i binyrebarken. Disse T-cellene kan også påvises

perifert i blodet, og rekrutteres mest sannsynlig til binyrebarken ved at kjemokiner blir frigitt fra cellene i binyrebarken (13).

Til slutt kan immunterapi muligens ha en virkning på AAS, som videre kan gi mer informasjon om mulige mekanismer i sykdommen. Foreløpig er det lite som er kjent i forhold til initialfasen, og etablering av betennelse og immunrespons mot binyrebarken, men et bedre innblikk i samspillet mellom miljøfaktorer, immunsystemet og cellene i binyrebarken, kan gi verdifulle ledetråder til de patogene mekanismene i AAS (13).



Figur 4: Forenklet modell av patogenesen til Autoimmun Addisons Sykdom (AAS). Bildet viser binyrebarken og kombinasjoner av faktorer som muligens er en del av patogenesen. Genetisk predisponering, miljøfaktorer, autoreaktive T-celler, autoantistoffer og immunterapi (13).

1.2.4 Immundefekter i AAS

AAS er karakterisert med sirkulerende autoantistoffer og lymfatisk infiltrasjon av binyrebarken. Autoantistoffer rettet mot binyrebarken ble identifisert for flere tiår siden, og hovedmålet for autoantistoffene ble senere identifisert som 21OH. I de siste årene har 21OH blitt etablert som et T-celle-autoantigen i AAS, og det har blitt detektert spesifikke autoreaktive T-celler mot enzymet 21OH (13).

De hormonproduserende binyrebarkcellene, er også mest sannsynlig aktive medspillere i patogenesen til AAS, siden disse cellene kommuniserer med immunforsvaret på flere måter. Binyrebarkcellene responderer på inflammasjon ved å produsere en rekke immunologiske mediatorer, slik som IL-1 β , IL-8, TNF α og CXL10 (13). Men det tenkes at også andre celler i binyrebarken spiller en slik rolle.

Som tidligere nevnt er det flere risikogener som er knyttet til APS-2, som HLA, BACH2, CTLA4, PTPN22 og AIRE (19, 21) (Tabell 1). Flere varianter av HLA er sterkt knyttet til AAS, og mutasjoner i genene PTPN22, CTLA4 og BACH2 er assosiert med en rekke autoimmune sykdommer. PTPN22 spiller også en rolle i regulering av monocytter og makrofager (23), men få studier har undersøkt denne celletypen i AAS. Monocytter modnes til makrofager i ulike typer vev, og binyrer inneholder et stort antall makrofager (26). Det er derfor trolig at aktivering av disse cellene kan spille en rolle i AAS.

1.3 Monocytter og trent immunitet

1.3.1 Monocytter

Monocytter dannes ved hematopoiese i benmargen fra en felles myeloid stamfar (progenitor CMP) delt med erytrocytter, blodplater, dendritiske celler og granulocytter (27). Monocytter utgjør omtrent 5% av kjerneholdige sirkulerende celler med i normalt blod, og de sirkulerer, som granulocytene, omtrent en til tre dager i blodbanen før de vandrer ut i vevet (28). Her vil de avhengig av miljøet differensiere til makrofager eller inflammatoriske dendritiske celler. Disse cellene spiller kollektivt en viktig rolle under homeostase og ved forsvar mot patogener. Monocytter bidrar også til vevsreparasjon, og understreker ytterligere deres relevans for både helse og utvikling av sykdom (10).

Betennelsesreaksjonen forårsaker monocyttmigrasjon til infeksjonsområdet, med påfølgende differensiering av monocytter til makrofager. Makrofager kan videre differensiere til spesialiserte makrofager basert på deres beliggenhet. De kan være bevegelige, slik at de kan oppsøke fremmede inntrengere og skadete celler, eller lite bevegelige som Kupffercellene i leveren og mikroglia-cellene i hjernen. Slike makrofager er viktige renovatører som fagocytterer fremmedlegemer og døde celler (9).

Makrofagene har flere reseptorer for bakterieprodukter, for eksempel LPS-reseptorer (CD14), toll lignende reseptorer og mannosereseptorer. Når bakterieprodukter bindes til disse reseptorene, fører det til en aktivering av cellen med produksjon av proinflammatoriske cytokiner som TNF, IL-1 og IL-6. Aktiverte makrofager produserer IL-12, som fører til at CD4⁺ T-celler differensierer til en Th1 (T-hjelper celle) retning (9).

Makrofager er viktige fagocytterende celler som kan presentere mikrobielle antigen til naive T-celler, se 1.1.2 Det medfødte immunforsvaret. Makrofager eliminerer ikke bare mikrober,

men også apoptotiske celler og vevsrester. Flere reseptorer er involvert i gjenkjennelse av apoptotiske celler, deriblant CD36 og trombospondin. Makrofager har dermed en viktig rolle i reparasjon av skadet vev (9). Monocytter kan også produsere cytokiner som rekrutterer flere celler og proteiner til det berørte området og gir en betydelig immunrespons. Typer av frigitte cytokiner varierer avhengig av funksjonen. For å gjenopprette homeostase kan monocytter bidra til ombygging og helbredelse via antiinflammatoriske cytokiner (28).

1.3.1.1 Subtyper av monocytter

Det er tre godt karakteriserte klasser av monocytter hos mennesker: klassiske (CD14⁺, CD16⁻), intermediære (CD14⁺, CD16⁺) og ikke klassiske (CD14⁻, CD16⁺). Klassiske monocytter utgjør 80-90 % av monocytter mens resterende 10-20 % er delt på intermediære og ikke klassiske monocytter (27).

Klassiske monocytter er kritiske for den første inflammatoriske responsen, og de representerer en forbigående cellepopulasjon med en mangfoldig differensieringspotensial. De trafikkerer ut i vev og differensierer til makrofager i tarmen, lærhud (dermis), hjerte, bukspyttkjertelen, lunge og testikler, eller alternativt konverterer til ikke klassiske monocytter (27). Videre uttrykker klassiske monocytter en rekke med PRR og de er involvert i fjerning av mikroorganismer gjennom fagocytose (29).

Intermediære monocytter har også proinflammatoriske funksjoner, der de produserer høye verdier av IL-1, IL-6, IL-12 og TNF når stimulert. Intermediære monocytter har evne til å presentere antigener og føre til aktivering av T-celler. De fremmer spesifikt proinflammatoriske Th-17-celleresponser (29).

Ikke klassiske monocytter har blitt sett på som betennelsesdempende, da de opprettholder vaskulær homeostase. De er den første forsvarslinje som anerkjenner og klarerer patogener. Imidlertid er deres roller i kronisk sykdom mindre tydelig. De har vist seg å være beskyttende så vel som positivt assosiert med sykdomsbyrde (30).

1.3.2 Trent medfødt immunitet

Konseptet «trent medfødt immunitet» er basert på observasjonen at etter en primær infeksjon induseres det en forbedret medfødt immunrespons som respons på sekundær infeksjon eller stimulering. Denne sekundære responsen av trente medfødte immunceller er ikke bare spesifikk for antigenet som induserte den primære infeksjonen slik som ved adaptive

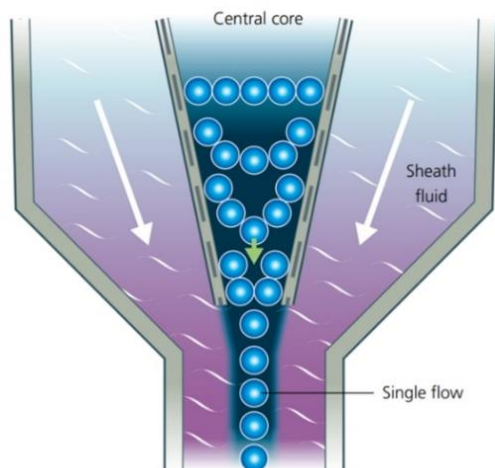
immunminneceller, men er heller en ikke-spesifikk forbedret respons på heterologe stimuli (31).

Oppdagelsen av at HSC viser en minnefunksjon, kan forklare hvorfor kortvarige immunceller som monocytter kan skaffe seg minne (31). Ulike studier viser at infeksjoner og livsstil kan resultere i trent medfødt immunitet, preget av langvarige epigenetiske effekter på HSC. De epigenetiske endringene innebærer histonmodifikasjoner av gener som koder for pro-inflammatoriske cytokiner slik som IL-6 og TNF. Det er foreløpig ukjent hvilke faktorer som er involvert i den epigenetiske modifikasjonen av HSC og om trening av stamceller også er assosiert med økt produksjon av bestemte undergrupper av monocytter (27).

Ny forskning har vist at ikke bare mikrober, men også ulike makromolekyler som komponenter i en vestlig diett, kan indusere trent immunitet. Det gjenstår å se om dette også er tilfellet i mennesker (32). Videre kan det være interessant å se om trent medfødt immunitet kan være en medvirkende faktor i ulike autoimmune sykdommer, ved å potensielt føre til mer aktivering av autoreaktive T-celler. Etersom dette er en ny teori har det ikke blitt forsket veldig mye på om dette stemmer. Dette kan være et eksempel på en ugunstig effekt av trent immunitet der inflammasjon kan føre til vevsskader og potensielt til sykdom (31).

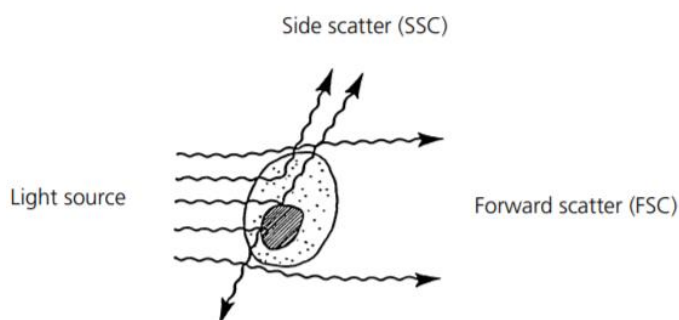
1.4 Flowcytometri

Flowcytometri er en metode der partikler blir analysert ved at de blir skilt fra hverandre i en prøve basert på størrelse og innhold i partikkelen. Partiklene kan være f.eks bakterier, trombocytter eller celler. Prøvevæsken blir sendt i en væskestrøm, omringet av sheat-væske, gjennom en flowcelle (Figur 5). Prøvematerialet og sheat-væsken blir ikke blandet. Det er fordi sheat-væsken blir sendt i en høyere hastighet enn prøvematerialet. Det skaper et drag, slik at partiklene i prøvematerialet blir sendt gjennom flowcytometeret én etter én, dette er kalt hydrodynamisk fokusering (33).



Figur 5: Hydrodynamisk fokusering: Prøvevæsken blir sendt inn i en væskestrøm, omringet av sheat-væske. Det vil ikke bli blandet, fordi sheat-væsken blir sendt i en høyere hastighet. Prøvemateriale vil dermed strømme slik at partiklene går i kø en etter en. Dette kalles hydrodynamisk fokusering (34).

Partiklene passerer enkeltvis en eller flere laserstråler. Hvordan lyset blir bøyd eller spredt gir informasjon om partikkelen. Forward scatter (FSC) forteller om partikkelens størrelse basert på hvor stor grad lyset bøyes når det treffer partikkelen (Figur 6). Store celler vil bøye lyset mer enn små celler. Side scatter (SSC) forteller om innholdet i partikkelen basert på hvordan lyset blir spredt. Celler som er mer granulert, som nøytrofile, vil spre lyset mer enn ikke granulerte celler som for eksempel lymfocytter. FSC og SSC kan sammen bli brukt til å identifisere ulike celletyper i blod (34, 35).



Figur 6: SSC og FSC: Sidescatter (SSC) er lys som blir bøyd basert på partikkelens innhold. Forward scatter (FSC) er lys som blir bøyd basert på partikkelens størrelse (35).

Partiklene en ønsker å analysere blir merket med antistoff som er konjugert med fluorokromer. Sistnevnte er molekyler som absorberer lys ved en gitt bølgelengde og emitterer lyset tilbake i en bølgelengde av lavere frekvens. Når lys treffer fluorokromet vil elektronene i molekylet bli eksitert. Det vil si elektronene går fra en lav stabil energitilstand, grunntilstand, til en høy energitilstand, eksitert tilstand. Elektronene vil så falle tilbake til grunntilstanden, når dette skjer blir det sendt ut elektromagnetisk stråling, kalt fluorescens.

Strålingen som kommer ut vil ha en bølgelengde med lavere frekvens enn bølgelengden som forårsaket eksiteringen (34).

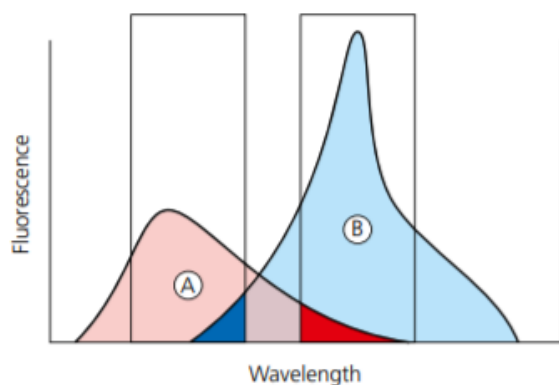
Optiske filtre bestemmer hvor spesifikt og hvilke bølgelengder som blir detektert av flowcytometeret. Det er fire typer filtre: longpass (LP) transmitterer bølgelengder som er over en spesifikk bølgelengde, shortpass (SP) er det motsatte av LP slik at alle bølger kortere enn den bestemte bølgelengden blir transmittert, bandpass (BP) transmitterer lys innenfor et spesifikt område og Notch er det motsatte av BP der lyset utenfor et spesifikt område blir transmittert (34, 35).

Etter en analyse vil en kunne lage to-dimensjonale plott og histogrammer, som plasserer cellene etter deres lysbrytende egenskaper og nivå av antistoffbinding (33). Disse plottene blir laget og «gattet» med programmer som FlowJo, slik at en kan få ut for eksempel antallet av en spesifikk cellepopulasjon. «Gating» er å avgrense et området på plottet for å se videre på ønsket cellepopulasjon, ved å gjøre dette vil en eliminere uønskede partikler, dubletter og celler (34).

1.4.1 Kompensering

Ved analyse av en prøve farget med flere antistoffer vil det kunne være behov for å kompensere. Dette er fordi emisjon fra de ulike fluorokromene kan interferere i kanaler det ikke hører til. Interfereringen skaper en overlapp mellom to ulike fluorokromer, som gjør det vanskelig å måle korrekt mengde emittert fluorescens. Fluorescens kompensasjon blir benyttet i instrumentets dataprogram der det regnes ut hvor mye et fluorokrom vil interferere (i %), også kalt «spillover» (34). Dataprogrammet vil beregne hvor mye det skal kompenseres for basert på målinger gjort med enkeltfargede kontroller. Overlapp er en av begrensningen til flowcytometri, da det setter grenser for hvor mange antistoff som kan benyttes om gangen (33, 36).

Et eksempel på overlapp (Figur 7) er mellom to ulike fluorokromer som skal avgi emisjonslys til to ulike kanaler. På grunn av at fluorokromene har en overlapp i feil kanal, vil det gi ut et resultat som ikke er reelt. For å korrigere dette må en kompensere for overlappen i dataprogrammet til instrumentet.



Figur 7: Eksempel på overlapp: A og B i histogrammet representerer fluorokromer som ha to ulike kanaler. De to mørke områdene er hvor hver av fluorokormene avgir emisjon som interfererer med feil kanal. Overlappen vil gi ut resultatet som ikke representerer det faktiske resultatet. Slik overlapp må kompenseres for ved hjelp av dataprogrammet som tilhører instrumentet (34).

1.4.2 Immunfenotyping

I flowcytometrisk immunfenotyping blir cellene farget med antistoffer konjugert med fluorokromer. Disse antistoffene binder seg til antigen uttrykt på celleoverflaten. Antigen på blant annet leukocytter, makrofager og endotelceller har blitt satt i et nomenklaturesystem kalt Cluster of Differentiation (CD) (37). Ved dette prosjektet er det antistoffer for CD-markørene CD45, HLA-DR, CD88, CD14 og CD16 som blir benyttet. CD45 er en markør som dekker flere celletyper. CD45 finnes på alle hematopoetiske celler unntatt erytrocytter og blodplater. Antigenet har en rolle i aktivering av celler. Det finnes flere isoformer av CD45, og de fleste hematopoetiske celler uttrykker en eller flere isoformer (38).

HLA-DR er en markør for APC, og uttrykkes hos monocytter, makrofager, B-lymfocytter og dendritiske celler. HLA-DR-molekylet er et klasse II molekyl som presenterer antigen til T-celle reseptoren på T-hjelperceller. Aktiverte T-celler kan også uttrykke HLA-DR (7, 39). CD88 heter også C5a reseptor og er med i komplementsystemet. Den uttrykkes blant annet hos monocytter, makrofager, granulocytter og mastceller. CD88 er blitt foreslått som en ekstra monocyttmarkør for å ekskludere dendritiske celler (40).

Markøren CD14 uttrykkes sterkt hos monocytter, men kan også uttrykkes hos makrofager, nøytrofile granulocytter og dendritiske celler. CD14 er en ko-reseptor sammen med TLR4 og MD-2, og binder til LPS som nevnt tidligere (41). CD16 er en markør som uttrykkes hos Natural killer celler (NK-celler), makrofager, monocytter og nøytrofile. Monocyttene som uttrykker CD16 er intermediære og ikke klassiske monocytter, som nevnt i 1.3.1.1 Subtyper

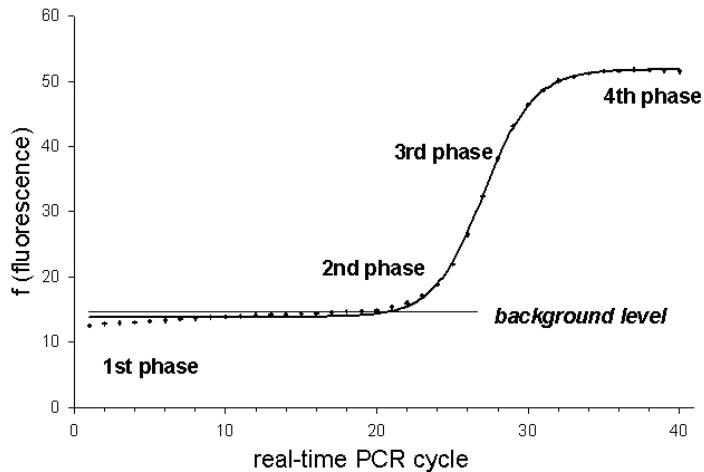
av monocytter. Ved å bruke denne markøren vil en kunne skille de CD16+ monocyttene fra de CD16- klassiske-monocyttene. Det er vist i studier at monocytter som er positiv for både CD14 og CD16, uttrykker høyere nivå av HLA-DR (42).

1.5 Real time qPCR

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en metode hvor DNA blir amplifisert. Prøvene som skal brukes i PCR må inneholde templat-DNA, buffer, forward- og revers primere, deoksyribonukleosidtrifosfater (dNTP) og DNA-polymerase. PCR-analysen foregår i tre trinn. I første trinn blir DNA denaturert ved 95°C. Dobbelthelixen blir da åpnet opp. Temperaturen senkes til 60°C for å få primerene til å binde seg den komplementære DNA-tråden. Temperaturen heves så til 72°C for å få polymerasen til å syntetisere nye DNA-tråder. Denne syklusen blir gjentatt 30-40 ganger før analysen er ferdig (43).

I tillegg til konvensjonell PCR finnes også kvantitativ sanntids-PCR, også kalt real time qPCR (qPCR). Prinsippene for dem er like, men ved qPCR vil en kunne følge med på analysen underveis. Amplifiseringen og detektering vil skje samtidig, takket være fluorescenssignaler som er proporsjonale med mengde PCR-produkt (44). De finnes ulike fluorescerende stoffer som kan benyttes i qPCR, to av dem er SYBR Green og TaqMan (45, 46). SYBR Green er molekyler som binder til dobbelt trådet DNA (dsDNA) og avgir fluorescens når bundet. Fluorescens emisjon er proporsjonalt med mengden dsDNA i prøven. Disse molekylene kan brukes for ulike gen, da de ikke binder til spesifikke gensekvenser. TaqMan er prober med et fluorescerende molekyll (Reporter dye) i 5' enden og et ikke-fluorescerende molekyll (Quencher dye) i 3' enden. Når proben binder seg til mål sekvensen vil Reporter dye bli separert fra proben og avgi fluorescerende signaler. Probene er laget for spesifikke sekvenser, som gjør at en kan skille mellom ulike sekvenser under amplifikasjon.

qPCR deles opp i fire faser (46): lineær fase, tidlig eksponentiell fase, eksponentiell fase og platåfase (Figur 8). Lineær fase er det første 10-15 syklusene for reaksjonene begynner, og fluorescens emisjon ikke gir høyere signal en bakgrunnsstøy. I tidlig eksponentiell fase har fluorescens emisjon blitt høyere en bakgrunnsstøy. Ved den eksponentielle fasen vil amplifikasjon være mest optimal, og PCR-produkt kan ved ideelle forhold dobles etter hver syklus. Når komponentene i en reaksjon blir begrenset og fluorescens signaler ikke lenger øker er platåfasen nådd (46, 47).



Figur 8: De ulike fasene for en PCR amplifikasjonskurve (48). Lineær fase (1st phase) er 10-15 sykluser før reaksjonene starter, og fluorescens emisjon ikke har høyere signal en bakgrunnsstøy. Tidlig eksponentiell fase (2nd phase) er når fluorescens emisjon er blitt høyere en bakgrunnsstøy. Eksponentiell fase (3rd phase) er når amplifikasjon er optimal, og PCR-produkt kan dobles ved hver syklus. Platåfase (4th phase) er når komponenter til reaksjoner er begrenset (46).

Målingene som kan hentes ut etter qPCR er uttrykt som Cq-verdier (kvantifiserings syklus). Denne verdien er antall qPCR sykluser som en prøve har gått gjennom for å nå terskelen (47). Når bakgrunnsstøy er lavere en emisjonssignalet er terskelen nådd. Høy Cq indikerer lavt uttrykk av ønsket gen, lav Cq indikerer høyt uttrykk. Cq-verdiene benyttes til å beregne «Fold Change» (FC). FC er et forholdstall som forteller om ønsket gen er blitt uendret, opp- eller nedregulert. Positiv FC betyr at det er oppregulert, negativ betyr nedregulert. Gener det skal beregnes FC for, må beregnes opp mot gener som ikke opp- eller nedreguleres ved stimulering (46). Slike gener kan være ulike «housekeeping» gener.

Formelen for beregning av FC:

$$2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Formel 1: Beregning av FC. Der Δ (delta) er et matematisk uttrykk som beskriver differansen mellom to tall. Videre står $\Delta\Delta Cq$ for differansen mellom ΔCq (behandlet prøve) og ΔCq (gjennomsnitt for ubehandlet prøve). Der ΔCq står igjen for differansen mellom Cq (gen vi ønsker å se på) og Cq («housekeeping gene») (50).

1.6 Problemstillinger

I APS er det flere ulike versjoner av risikogener som er knyttet til sykdommen (eksempel HLA, PTPN22 og AIRE), og noen av disse peker mot defekter i sentral toleranse. I tillegg er det noen av risikogene som kan indikere en rolle for perifer toleranse og presentasjon av antigen (13). Monocytterne er immunceller som sirkulerer i blodbanen før de vandrer ut perifert til vevet og differensieres primært til makrofager. Monocytter og makrofager er sentrale komponenter i det medfødte immunsystemet, og er involvert i regulering av initiering og utvikling av flere inflammatoriske sykdommer (49). En tidligere studie har vist en relativ reduksjon i intermediære monocytter i blodet til APS-1 pasienter. Det er uvisst om dette er tilfellet i APS-2 pasienter. Det er dermed foreslått at monocytter potensielt har en perifer rolle i AAS (50).

Ny forskning har vist at trent immunitet kan forekomme blant monocytter, og introduserer et nytt nivå av hukommelse i immunsystemet vårt. Miljøpåvirkning kan altså trene monocytter til å bli mer aktivert når de gjenkjenner fremmede mikrober. Dette kan potensielt være involvert i regulering av perifer toleranse, men det er uvisst om monocytter i AAS er primet på en slik måte (31, 51).

Bakgrunnen for oppgaven er å studere monocytter i autoimmun Addisons sykdom, som igjen kan føre til bedre forståelse for sykdommen og potensielt gi bedre behandling for pasientgruppen. Følgende problemstillinger undersøkes:

1. Har AAS pasienter mer eller mindre monocytter i blod sammenlignet med friske kontroller? For å undersøke dette ble det etablert et monocyttopanel for flowcytometri.

2. Har monocytter fra AAS større potensiale til å bli aktiverte/inflammatoriske sammenlignet med celler fra friske kontroller? Dette innebærer etablering og kvalitetskontroll av qPCR-analyse for aktuelle gener.

2.0 Materiale og metode

2.1 Prøvemateriale

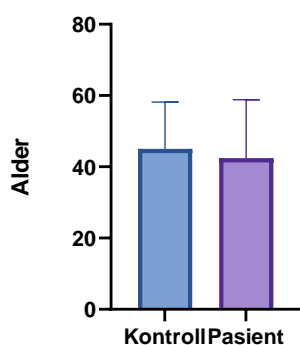
I dette prosjektet ble det anvendt fullblod tappet på heparinrør fra friske blodgivere og pasienter med AAS (isolert eller APS-2). Prøvene er anonyme og blir angitt som kontroll og pasientprøver i oppgaven. Informasjon om kjønn og fødselsår er oppgitt i tabell 2 og tabell 3.

Tabell 2: Utvalg av kontroller og pasientprøver for analyse på Flowcytometer. Kjønn er forkortet med M for mann, og K for kvinne.

Prøve	Kjønn	Fødselsår
Kontroll 1	K	1972
Kontroll 2	M	1974
Kontroll 3	K	1971
Kontroll 4	K	1987
Kontroll 5	K	1994
Kontroll 6	K	1953
Kontroll 7	K	1981
Pasient 1	K	1986
Pasient 2	M	1986
Pasient 3	K	1998
Pasient 4	K	1987
Pasient 5	K	1950
Pasient 6	K	1980
Pasient 7	K	1963

Utvalget i tabell 2 blir også vist visuelt i figur 9. Det ble utført T-test for å vurdere om det er en signifikant forskjell i alder mellom kontroll- og pasientprøver. Søylediagram (Figur 9) og t-test ble utført i programmet GraphPad Prism. Dette programmet ble benyttet for alle søylediagram og t-tester vist i 3.0 Resultater.

Utvalg av kontroll- og pasientprøver



Figur 9: Utvalg av kontroll- og pasientprøver i søylediagram for Flowcytometri. Alder på y-aksen og kontroll- og pasientprøver på x-aksen.

Setter opp hypotese for T-test. Signifikansnivå (α) = 0,05.

Nullhypotese (H_0): Det er ingen signifikant forskjell i utvalget mellom kontroll- og pasientprøver.

Alternativ hypotese (H_1): Det er en signifikant forskjell i utvalget mellom kontroll- og pasientprøver.

Etter utført T-test ble p-verdi beregnet til 0,75. Siden $0,75 > 0,05$, beholdes nullhypotesen. Det er ingen signifikant forskjell i utvalget mellom kontroll- og pasientprøver.

For qPCR ble det benyttet fire nye kontrollprøver (kontroll 8-11), mens de samme pasientprøvene fra tabell 2 (prøve 3, 4 og 5) ble benyttet (Tabell 3). Det var ikke noe signifikant forskjell i alder mellom kontroll- og pasientprøver benyttet for qPCR (vedlegg 2). I tillegg var det observert at pasienten 5 var betraktelig eldre enn resten av kontroll- og pasientgruppen.

Tabell 3: Utvalg av kontroll- og pasientprøver for analyse på qPCR. Kjønn er forkortet med M for mann, og K for kvinner.

Prøve	Kjønn	Fødselsår
Kontroll 8	K	1992
Kontroll 9	K	1998
Kontroll 10	M	1979
Kontroll 11	K	1999
Pasient 3	K	1998
Pasient 4	K	1987
Pasient 5	K	1950

2.2 Etiske betraktninger og REK-godkjenning

For forskningsprosjekter er det krav om at det må være godkjent på forhånd av den Regionale Komiteen for Medisinsk og Helsefaglig Forskningsetikk (REK). Det er for å forsikre om at prosjekter følger gjeldende lovverk. REK-godkjenning for K2-endokrinologi er: 2018/1417-Immunologiske og genetiske årsaker til organspesifikke autoimmune sykdommer. Godkjenningen er for virksomheten til gruppen som arbeider på K2-endokrinologi, dette prosjektet faller under godkjenningen.

Denne godkjenningen er koblet sammen med Register for Organspesifikke Autoimmune Sykdommer (ROAS) og tilhørende biobank. Hensikten med ROAS er å forstå hvordan organspesifikke sykdommer oppstår, finne bedre diagnostiske metoder, skape nye og forbedrede behandlinger, bedre oppfølging og spre kunnskap om sykdommene. Slike prosjekter kan gjøre det bedre for både nåværende og fremtidige pasienter. Samtykke, opplysninger og blodprøver blir hentet inn når pasient er på poliklinisk besøk. Det er for å skape minst mulig ulemper for deltakelse, siden pasienten allerede skal dit. Samtykke fra pasient blir gitt ved at pasient blir informert og kan da velge å signere samtykkeerklæringen til ROAS (vedlegg 1).

2.3 Antistoff-merking av celler i fullblod

For å etablere et flowpanel for monocytter i blod ble antistoffene først titrert for å finne optimal farging av cellene. Det ble overført 100 μ L fullblod til FACS rør, som videre ble farget med antistoff. Informasjon om antistoffer benyttet, er vist i tabell 4 nedenfor. Det ble gjennomført en enkel farging med antistoffene CD45, CD14, CD88, HLA-DR og CD16. Optimal konsentrasjon av antistoffene ble bestemt gjennom antistofftitrering (Tabell 6 i resultatdel).

Etter titrering ble optimal konsentrasjon av alle antistoffer kombinert for fullfarging. For å identifisere positiv populasjon ble det også tillaget «fluor minus one» (FMO) for alle antistoffer. FMO er prøver som er farget med alle antistoffene som skal benyttes, bortsett fra ett av antistoffene.

Deretter ble rørene inkubert i mørket i 15 minutt. Etter inkubering ble det tilsatt 900 μ L 1xlysing solution (BDbiosciences, cat: 349202) til hvert rør. Rørene ble vortexet og inkubert ytterligere i 15 minutt. Videre ble det tilsatt kvantiteringskuler, som senere ble benyttet for å

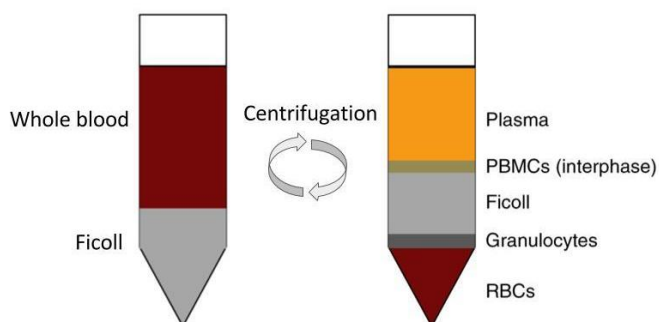
beregne antall monocytter. Kvantiteringskuler eller «Countbright beads» (Thermo Fisher Scientific, cat: C36950) ble vortextet i 30 sekund og 50 µL ble tilsatt til hvert rør, utenom ufarget kontroll. Til slutt ble prøvene analysert på BD LSRFortessa™ Flowcytometer.

Tabell 4: Utvalgte antistoff for farging av fullblod. Antistoffer med klon-navn og tilhørende fluorokrom, produsent, katalognummer og fortyning benyttet.

Antistoff	Klon-navn	Fluorokrom	Produsent	Katalognummer
CD45	2D1	BV785	Biolegend	368527
HLA-DR	L243	FITC		307604
CD88	S5/1	APC/Fire™ 750		344316
CD14	MSE2	PE		301806
CD16	3G8	Brilliant Violet 605™		302040

2.4 Monocytisolering fra blod

Resterende blod som ble tappet på heparinrør ble benyttet for å isolere monocytter. Det ble tilsatt 5 mL Ficoll-Plaque (Ficoll-Plaque PLUS density gradient media, GE Healthcare Sciences, 500mL bottle 17144003) i to 15 mL rør. Blodet ble først fortynt i 10 mL PBS (Sigma, cat: D8537-500mL) (1:2 fortyning) og deretter lagt forsiktig opp på Ficoll i 15 mL rør. Videre ble rørene sentrifugert ved romtemperatur ved 1800 rpm i 25 minutter uten brems eller akselerasjon. PBMC-fraksjon fra begge rør ble samlet med en pipette og overført til nytt rør og fylt opp med PBS (Figur 10). Røret ble da sentrifugert ved romtemperatur ved 1200 rpm i 7 minutt. Vask med PBS ble gjentatt. Supernatant ble deretter fjernet etter sentrifugering ved 1200 rpm i 7 min, og cellepelleten ble løst i 30 µL isoleringsbuffer. Isoleringsbuffer ble tillaget ved å tilsette 5 g BSA (Sigma, cat: A7030-100G) og 800 µL EDTA (Invitrogen, cat:AM9260G) i 1 L PBS.



Figur 10: Isolering av PBMC-fraksjon. Viser rør med fortynt fullblod og ficoll før sentrifugering, og videre plasma, PBMC-fraksjon, ficoll, granulocytter, og erytrocytter (RBCs) etter sentrifugering (52).

Det ble benyttet et «Classical monocyte isolation» kit (MiltenyiBiotec, cat: 130-117-337) for å spesifikt isolere monocyttene i prøven. Monocyttene ble isolert fra de andre cellene ved negativ seleksjon, der monocyttene blir eluert. Resterende celler vil være festet til de magnetiske kulene, og blir ikke eluert når de tilsettes til LS-kolonnen. Produsentens prosedyre ble fulgt hele veien.

LS-kolonne (MiltenyiBiotec, cat:130-042-401) ble plassert i magnetisk felt og det ble tilsatt 3 mL isoleringsbuffer til kolonnen. Cellesuspensjonen ble da tilsatt til kolonne, og kolonnen ble vasket med isoleringsbuffer samtidig som eluatet ble samlet i nye rør. Røret ble etterfylt med isoleringsbuffer og sentrifugert ved romtemperatur ved 1200 rpm i 7 minutt. Etter sentrifugering ble supernatant kastet og cellene ble resuspendert i 0,5 mL DMEM-medium (GIBCO, cat:31330-038). Komplet DMEM/F-12 medium ble tillaget ved å tilsette 50 mL FBS (Fetal Bovin serum) (GIBCO, cat:16000-044) og 5 mL PS (penicillin/streptomycin) (SIGMA, cat: P0781-100 mL) til DMEM medium.

Det ble tatt av 10 µL til celledelling i mikroskop, for å tilse at det var minst 200 000-300 000 celler i prøvene. Resten av cellesuspensjonen ble fordelt på to 5 mL rør og inkubert i inkubator over natten. LPS (Invitrogen, cat:00-5976-93) ble tilsatt neste dag til det ene røret (LPS konsentrasjon 0,1 ng/mL) og inkubert i inkubator i 6 timer. Deretter ble det tilsatt 3 mL kald PBS og rørene ble sentrifugert ved 1500 rpm i 7 minutt.

2.5 RNA-isolering

Etter sentrifugering ble supernatant kastet og cellepelleten løsnet. Det ble benyttet et kit (Qiagen, cat:74104) for RNA-isolering. Produsenten sin prosedyre ble fulgt hele veien. Ekstrahert RNA ble målt ved hjelp av et spektrofotometer, NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), og en konsentrasjon på over 20 µg/mL ble brukt for videre tillaging av cDNA.

2.6 RNA til cDNA

Det ble brukt et RNA til cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, cat:11766050) for danning av cDNA fra RNA. Produsentens prosedyre ble fulgt hele veien. cDNA-syntesen ble gjort på Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Cat:4375786).

2.7 Real time qPCR

cDNA ble fortynnet til 3 ng/ μ L, slik at ønsket mengde cDNA kunne bli pipettert for qPCR-reaksjon. PowertrackTM SYBRTM Green Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, cat: A46109) ble benyttet til qPCR. Det ble benyttet 6 ng templat per reaksjon, 0,5 μ M forward og revers primer. Primerene er bestilt fra produsentene og designet ved bruk av NCBI verktøyet Primer-BLAST (Tabell 5). Verktøyet vil også kunne beregne lengden på qPCR-produktene.

Tabell 5: Primere benyttet i qPCR. Primerene er laget ved bruk av NCBI verktøyet Primer-BLAST. Verktøyet hjelper å designe spesifikke og unike sekvenser for ønsket gen, og en får primere som binder kun til det genet. Sekvensen blir sendt til produsent som produserer primeren. Ved bruk av Primer-BLAST vil en også kunne hente ut lengden som en skal få på qPCR-produktene.

Produsent	Primer	Sekvens	Produktlengde (bp)
Sigma Aldrich / Merck Life Science AS	ACTB-F	ACAGAGCCTCGCCTTTGCC	70
	ACTB-R	GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG	
Eurogentec	TNF F	TAG-CCC-ATG-TTG-TAG-CAA-ACC	136
	TNF-R	ATG-AGG-TAC-AGG-CCC-TCT-GAT	
	IL6-F	CAT-CCT-CGA-CGG-CAT-CTC-AG	162
	IL6-R	ACC-AGG-CAA-GTC-TCC-TCA-TTG	
	CXCL10-F	CCA-CGT-GTT-GAG-ATC-ATT-GCT	152
	CXCL10-R	TGC-ATC-GAT-TTT-GCT-CCC-CT	

PCR ble utført i 384-brønners plate med 6 μ L Master Mix-Primer blanding og 4 μ L Yellow Sample buffer-templat DNA. Det ble laget duplikater av hver reaksjon. qPCR analyse ble kjørt på QuantStudioTM 5 Real-Time PCR System, 384-Well (Thermo Fisher Scientific, Cat. A28140). Resultat fra qPCR ble til slutt overført til Excel-ark for å beregne FC for LPS stimulert prøve og ustimulert prøve.

2.8 Gelelektroforese

For gelelektroforese ble det laget 1% agarose gel, der 0,5 g Agarose (GE Healthcare, Lot: 10283835) ble blandet med 50 mL 1X TBE. Det ble varmet til kokepunkt, slik at pulver var oppløst. GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Cat. 41003, Lot: 18G1231) ble tilsatt i lunken, men varm, agarose blanding i avtrekk. Gel ble støpt og satt til side. Når gel var klar, ble den satt i kjørekammer og 1X TBE-buffer ble tilsatt.

I qPCR-produkt ble det tilsatt 1 μ L loading buffer (50% glycerol, 0,4% Bromfenol blå og 0,8% Xylene cyanol i 200 mM EDTA). Størrelsesmarkør Generuler 1 kb (Fisher Scientific,

Lot: 00131190) ble satt i første brønn (3 µL), deretter ble qPCR-produkt (5 µL) ble tilsatt i valgte brønner. Gel ble kjørt på 200 V, 220 mA i 30 minutter.

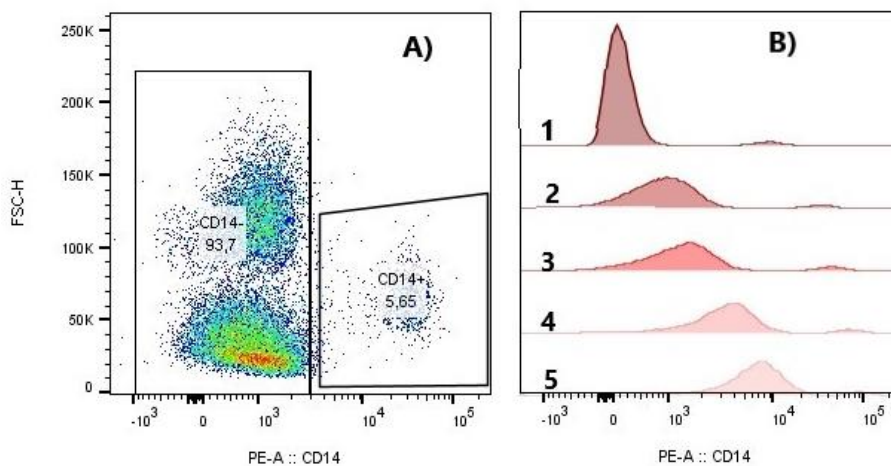
3.0 Resultater

3.1 Analyse av monocyter i fullblod

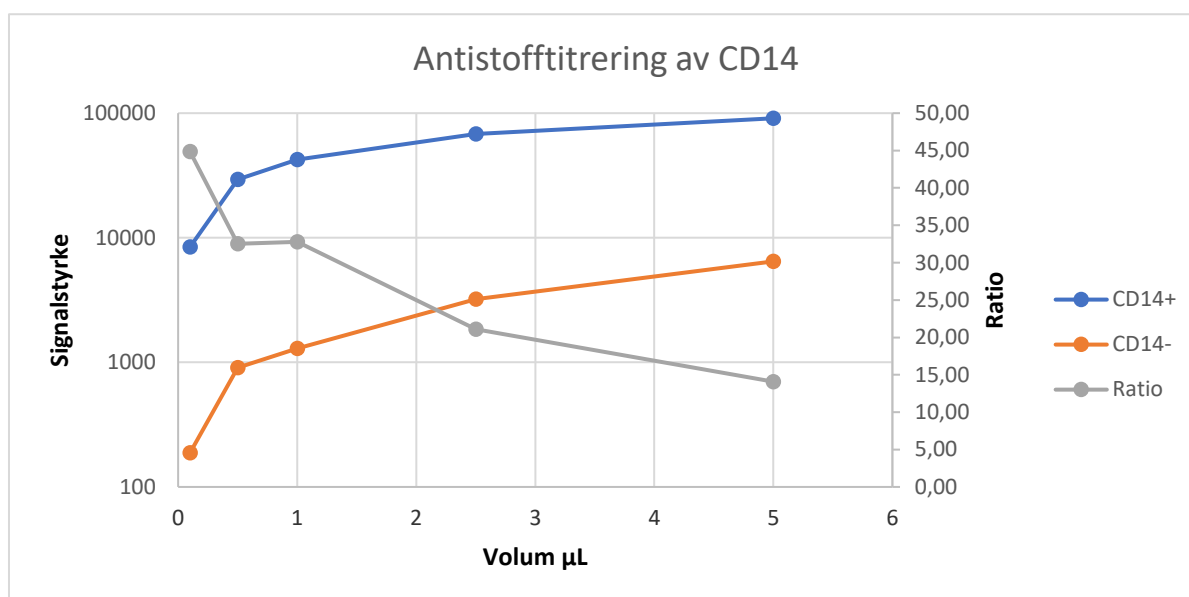
3.1.1 Titrering av antistoff

Det ble utført antistofftitrering for å bestemme optimal konsentrasjon av antistoff for analyse på flowcytometer. Produsent har oppgitt anbefalt mengde av antistoff (5 µl ufortynnet) som kan benyttes for analyse på flowcytometer, men det er ofte nødvendig med en mindre mengde enn det som er anbefalt (53).

Antistoffene CD14, CD16, CD88, HLA-DR og CD45 ble fortynnet (Tabell 4) og titrert med følgende mengder: 5 µL, 2,5 µL, 1,0 µL, 0,5 µL og 0,1 µL. Resultat fra flowcytometer ble gatet i FlowJo, og det fokuseres på høy separasjon mellom positiv og negativ populasjon. Figur 11 viser eksempel på gating for CD14, og figur 12 viser resultat fra antistofftitrering for CD14 ved hjelp av diagram.



Figur 11: Resultat av CD14 antistofftitrering: A) Cytogram for titrering av CD14 som er gatet i FlowJo, på y-aksen er cellenes størrelse (FSC-H) og på x-aksen er signalstyrke (PE-A). Cytogrammet viser celler som er gatet negative for CD14 og celler som er gatet positive for CD14. B) Histogram av antistofftitrering for CD14; y-aksen viser antall celler (count) og x-aksen viser signalstyrke for cellene (PE-A). Prøvene 1-5 er tilsatt ulike mengder antistoff; 0,1 µL i 1, 0,5 µL i 2, 1 µL i 3, 2,5 µL i 4 og 5 µL i 5. Populasjonene som en ser til venstre i figuren med høyest antall celler er negative for CD14, mens populasjonene til høyre med lavere antall celler er positive for CD14.



Figur 12: Eksempel på antistofftitrering for CD14. Y-aksen viser signalstyrken for celler som er positive for CD14 og celler som er negative for CD14. På den sekundære y-aksen vises ratio mellom CD14+ og CD14- celler, og på x-aksen vises volum i µL. Prøvenes volum er 0,1, 0,5, 1, 2,5 og 5 µL.

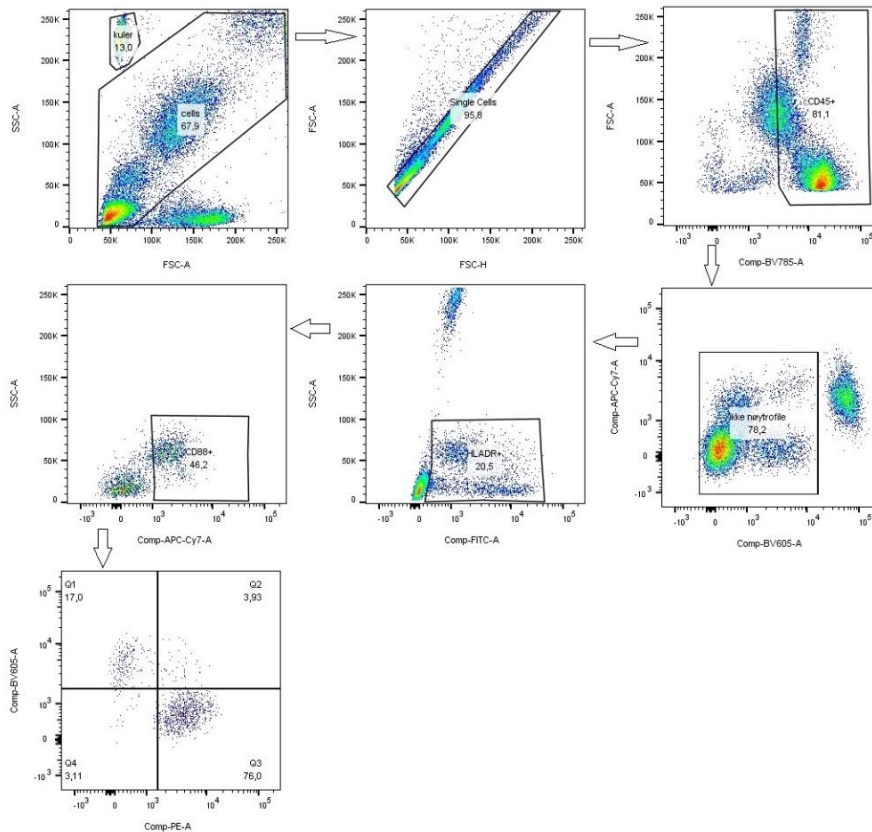
I figur 12 er det høyest ratio ved titrering av 0,1 µL antistoff for CD14. Basert på vurderingen av cytogrammene og ratioen beregnet, ble volum av CD14 bestemt til 0,1 µL. Det ble bestemt en lavere konsentrasjon for alle antistoffene enn det produsenter anbefaler. Volum av de ulike antistoffene som ble bestemt etter antistofftitrering er vist i tabell 6 nedenfor.

Tabell 6: Fortynning og volum av de ulike antistoffene bestemt etter antistofftitrering.

Antistoff	Prefortynning	Volum (µL)	Fortynning i blod (100 µL)
CD14	1:20	2	1:1000
CD16	1:5	5	1:100
CD88	1:20	3	1:666
HLA-DR	1:20	2	1:1000
CD45	1:2	2	1:100

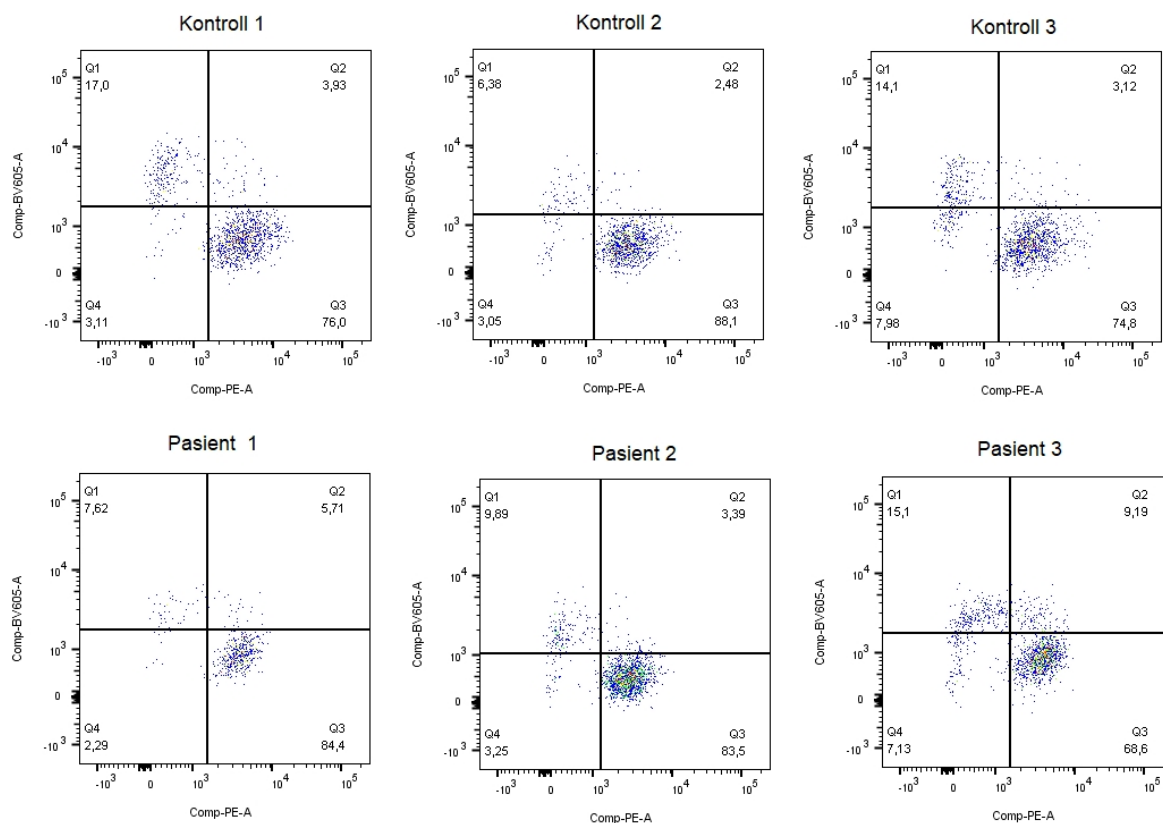
3.1.2 Monocytter hos friske kontroller og pasienter med AAS

Før analysering av kontroll- og pasientprøver, ble det utviklet en gatingstrategi i programmet FlowJo. Gatingstrategi blir benyttet for å identifisere monocytter. FMO for de ulike antistoffene benyttet for å identifisere positiv populasjon. I figur 13 vises gatingstrategi for fullfarget prøve, som til slutt identifiserer de ulike undertypene av monocytter.



Figur 13: Gatingstrategi. Figuren viser gatingstrategi for fullfarget prøve. Gater først celler generelt som en ønsker å se på videre, i tillegg til kuler som er tilsatt. Deretter utføres gating for å fjerne dupletter. Gater videre CD45+ celler, og fjerner de nøytrofile granulocytene ved å gate ikke-nøytrofile celler. Neste trinn er å gate celler som er HLA-DR+, og videre gate CD88+ celler. Til slutt blir CD14+ og CD16+ celler gattet slik at en til slutt har de ulike subtype av monocyttene. Klassiske (Q1), intermediære (Q2) og ikke klassiske monocyttene (Q3).

Gatingstrategi som er vist i figur 13 ble videre anvendt for analyse av kontroll- og pasientprøver. For å bestemme antall av monocyttene i prøvene må gatingstrategien benyttes i programmet FlowJo. Til slutt blir de ulike undertypene av monocyttene identifisert, og antallet av monocyttene kan videre bli beregnet. De ulike undertypene av monocyttene for kontrollprøve 1-3 og pasientprøve 1-3, er vist i figur 14. For fullstendig resultat for kontroll- og pasientprøver, se vedlegg 2.



Figur 14: De ulike monocyttpopulasjonene i et utvalg av kontroll- og pasientprøvene. Cytogram for pasientprøver 1-3, og kontrollprøver 1-3, som viser fordelingen av klassiske (Q1), intermediære-(Q2) og ikke klassiske monocyttene (Q3).

For å lettere kunne se på forskjeller i monocyttpopulasjonene mellom kontroller og pasienter, ble resultatet fra FlowJo overført til Excel. I Excel ble antall monocytt i blod beregnet ved hjelp av kuler og formel 2 (vedlegg 2).

$$\text{Andel monocytt i blod} \left(\frac{\text{celler}}{\mu\text{L}} \right) = \left(\frac{\text{Antall celler}}{\text{Antall kuler}} \right) \times \text{Konsentrasjon av kuler} \left(\frac{\text{kuler}}{\mu\text{L}} \right)$$

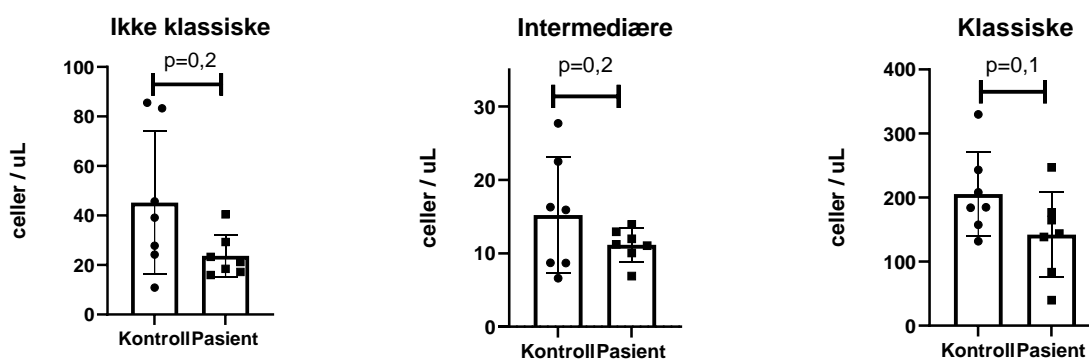
Formel 2: Beregning av antall monocytt (celler/ μL). Deler antall celler på antall kuler og multipliserer med konsentrasjonen av kuler (kuler/ μL) (53).

Antall monocytt beregnet er vist i tabell 7. Resultat vurderes opp mot referanseområdet for monocytt i blod: **0,04-1,30 10^9 celler/L** og intraindividuell biologisk variasjon (in vivo-variasjon hos samme individ (54)) på **21%** (55).

Tabell 7: Antall monocytyter og antall klassiske, intermediære og ikke klassiske monocytyter i fullblod (10^9 celler/L).

Prøver	Monocytyter (10^9 celler/L)	Klassiske (10^9 celler/L)	Intermediære (10^9 celler/L)	Ikke klassiske (10^9 celler/L)
Kontroll 1	0,17	0,13	0,009	0,03
Kontroll 2	0,18	0,16	0,007	0,01
Kontroll 3	0,23	0,21	0,009	0,04
Kontroll 4	0,23	0,19	0,016	0,02
Kontroll 5	0,28	0,18	0,016	0,08
Kontroll 6	0,44	0,33	0,028	0,09
Kontroll 7	0,31	0,24	0,023	0,05
Pasient 1	0,21	0,18	0,012	0,02
Pasient 2	0,29	0,25	0,010	0,03
Pasient 3	0,11	0,08	0,011	0,02
Pasient 4	0,22	0,17	0,014	0,04
Pasient 5	0,05	0,04	0,007	0,02
Pasient 6	0,17	0,14	0,011	0,02
Pasient 7	0,17	0,14	0,013	0,01

For å visualisere dataene ble antall klassiske, intermediære og ikke klassiske monocytyter for kontroll- og pasientprøvene, satt opp i søylediagrammer (Figur 15). Figuren viser også gjennomsnitt av antall klassiske, intermediære og ikke klassiske monocytyter. Det var spredning mellom prøvene for både kontroll- og pasientprøver.



Figur 15: Antall ikke klassiske, intermediære og klassiske monocytyter. Diagrammene viser celler fra kontroll- og pasientprøver. Prikker/firkanter representerer de individuelle prøvene innenfor kontroll- og pasientgruppen.

Variansindikator representerer standardavviket i de ulike gruppene.

Monocytallene for kontroll- og pasientprøver for hver monocyttopulasjon ble satt opp mot hverandre i en to-sidet t-test (Tabell 8).

Setter opp hypotese for T-test. Signifikansnivå (α) = 0,05.

Nullhypotese (H_0): Det er ingen signifikant forskjell i antall klassiske/intermediære/ikke klassiske monocytyter mellom kontroll- og pasientprøver.

Alternativ hypotese (H_1): Det er en signifikant forskjell i antall klassiske/intermediære/ikke klassiske monocytt mellom kontroll- og pasientprøver.

Etter utført T-test ble p-verdi beregnet til 0,09 for klassiske, 0,21 for intermediære og 0,08 for ikke klassiske monocytt. Beregnet p-verdi for subtypene av monocytt er alle $> 0,05$, og nullhypotesen beholdes. Det er ingen signifikant forskjell i antall klassiske/intermediære/ikke klassiske monocytt og mellom kontroll- og pasientprøver. Alle monocyttpopulasjonene i pasientgruppen viste derimot et lavere gjennomsnitt enn de i kontrollgruppen.

Tabell 8: T-test for klassiske, intermediære og ikke klassiske monocytt. Gjennomsnitt for klassiske, intermediære og ikke klassiske monocytt for kontroll- og pasientprøver. Ble beregnet og brukt til som grunnlag for en to-sidet t-test. P-verdi fra alle t-testene var $> 0,05$, det vil si det ikke var signifikant forskjell mellom antall celler hos kontroll- og pasientprøver.

Monocytt	Gjennomsnitt Kontrollprøver (10^9 celler/L)	Gjennomsnitt Pasientprøver (10^9 celler/L)	T-test (to-sidet)	Signifikant forskjell ($P < 0,05$)
Klassiske	0,2057	0,1421	0,0963	Nei
Intermediære	0,0152	0,0112	0,2146	Nei
Ikke klassiske	0,0452	0,0237	0,0842	Nei

Det har blitt nylig foreslått at CD88 er en viktig monocyttmarkør. I dette prosjektet ble det utført gating både med og uten CD88 (dvs. HLA-DR, CD14 og CD16). Det ble observert at gating med CD88 gir et lavere monocyttall enn ved tradisjonell gating uten CD88. For både tradisjonell gating og gating med CD88, ble det utført en t-test. Begge t-testene viste ingen signifikant forskjell i antall monocytt mellom kontroll- og pasientprøver (vedlegg 2).

3.2 Aktivering av monocytt

3.2.2 Isolering av monocytt og ekstraksjon av RNA

Når pasientprøver ble innhentet, var det ikke nok pasientblod i alle rør til isolering av monocytt. Dermed er ikke alle pasientprøvene fra flowcytometri analysert i denne metoden. I tabell 3 vises kontroll- og pasientprøver benyttet.

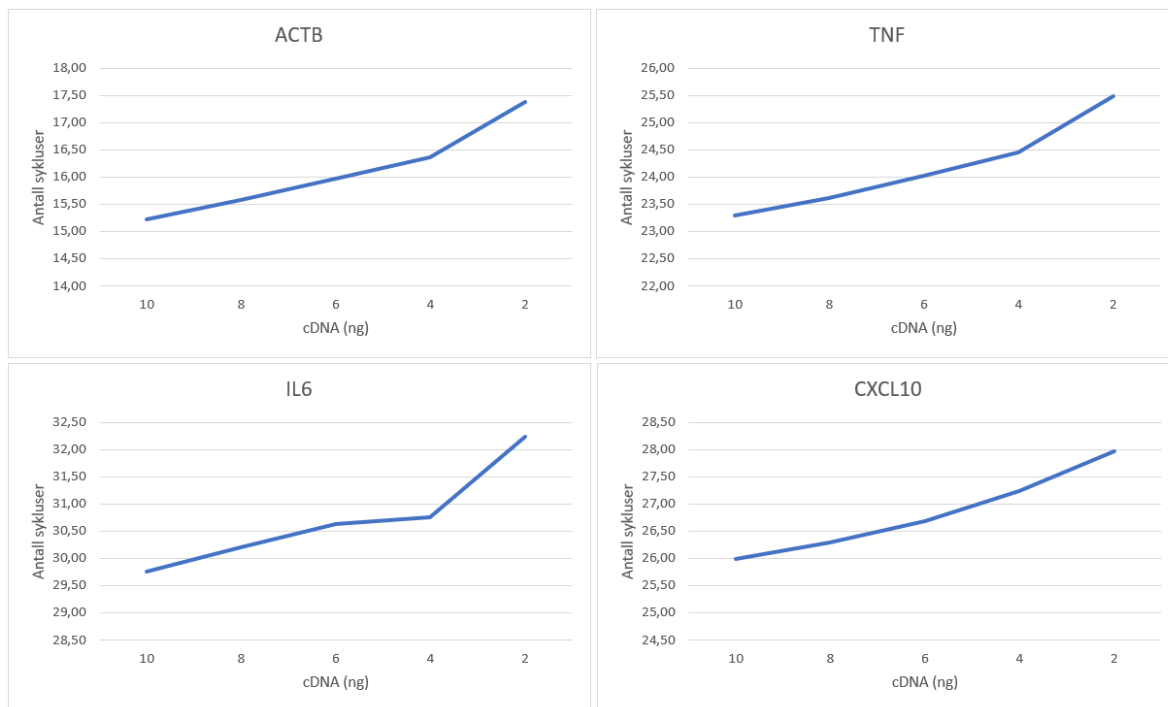
Etter isolering av monocytt ble RNA ekstrahert. Konsentrasjonen av RNA ble målt for å videre beregne mengden av cDNA som skulle benyttes i qPCR (vedlegg 2). Ekstrahert RNA fra LPS stimulert og ustimulert prøve ble målt ved hjelp av NanoDrop 1000 og konsentrasjonen målt er vist i tabell 9.

Tabell 9: Mengde RNA etter ekstrahering. Etter ekstrahering av RNA fra isolerte monocytter ble prøven målt på Nanodrop 1000 Spektrofotometer. RNA målt ble brukt til å beregne mengde cDNA som skulle brukes i qPCR.

Prøver	Ustimulert (ng/μL)	LPS stimulert (ng/μL)
Kontroll 4	29,1	19,0
Kontroll 5	47,2	35,5
Kontroll 6	50,7	36,4
Kontroll 7	23,6	22,5
Pasient 3	5,0	8,1
Pasient 4	12,5	9,7
Pasient 5	21,4	17,6

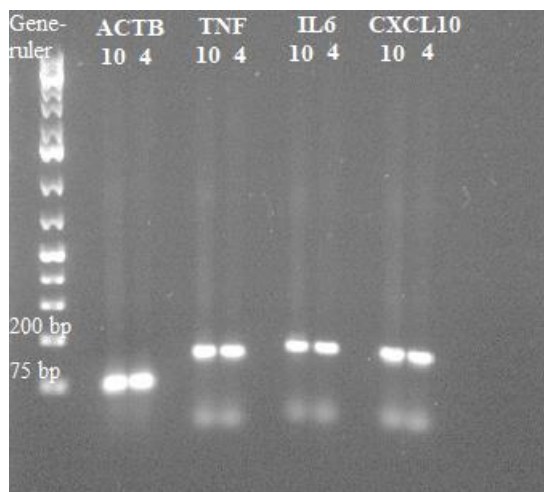
3.2.3 Optimalisering av qPCR

Før endelig analyse på qPCR, må optimal mengde cDNA bestemmes. Det ble testet med cDNA mengdene 2, 4, 6, 8 og 10 ng sammen med hver av de 4 primerene. I brukermanualen til Powertrack SYBR Green Master Mix-kit er det oppgitt at cDNA mengde må være mellom 1-10 ng per reaksjon. Resultat fra qPCR ble hentet og overført fra instrument til Excel. I Excel ble det laget diagrammer (Figur 16) for hver primer. Forholdet mellom antall sykluser og mengde cDNA skal være proporsjonalt. Det er ønsket at prøvene skal ha ≤ 30 sykluser per reaksjon. I figur 16 er mengden cDNA fra 6-10 ng proporsjonalt for alle primerne. Antall sykluser for 2-6 ng er også under eller rundt 30 sykluser. Derfor ble 6 ng cDNA bestemt som optimal mengde for analysering av kontroll- og pasientprøver.



Figur 16: Bestemmelse av cDNA mengde til qPCR. Det ble analysert ulike mengder cDNA etter protokollen til Powertrack SYBR Green Master Mix-Kit. X-aksen er mengde cDNA (ng) og y-aksen er antall sykluser. Forholdet mellom antall sykluser og mengde cDNA skal være lineært.. Antall sykluser skal være ≤ 30 .

qPCR-produktene fra reaksjonene med 4 og 10 ng ble undersøkt ved gelelektroforese, for å se om primerene er spesifikke for genene. De sterke båndene som kom fram i gel (Figur 17), ble sammenlignet med produktlengdene primerene skal lage i følge primer-BLAST (Tabell 5). Båndplassering og produktlengde stemte. Hos TNF, IL6 og CXCL10 ble det observert et ekstra sett med svake bånd nederst i gelen, dette viser at ikke alt av primere ble brukt opp under qPCR. ACTB prøvene brukte opp alt av primere.



Figur 17: Gelelektroforese av utvalgte qPCR-produkt. qPCR-produktene fra prøvene med 4 og 10 ng cDNA for hver primer ble kjørt på gel. Dette ble gjort for å se på spesifisiteten til primerene. Tabell 5 viser produktlengden (bp) som en skal få med de ulike primerene. Visuelt ser en at alle primerene har laget korrekt sekvens, men TNF, IL6 og CXCL10 har i tillegg ett ekstra sett med svake bånd nederst i gelen. Dette indikerer at ikke alt av primere har blitt brukt opp under qPCR.

3.2.4 Resultat fra qPCR

For å vurdere om monocyttene blir mer eller mindre aktivert hos pasienter med AAS sammenlignet med friske kontroller, ble monocyttene stimulert med LPS. Monocyttene er sensitive til LPS, og vil ved stimulering bli aktivert og produsere inflammatoriske cytokiner. Cytokiner som blir produsert er blant annet TNF, IL6 og CXCL10. Ved aktivering vil dermed monocyttene øke genuttrykket av TNF, IL6 og CXCL10, og dette er derfor de genene som brukes som mål på aktivering i denne metoden.

For å se om det er en oppregulering av genene, ble resultat fra qPCR overført til Excel og FC ble beregnet (Formel 1). FC for TNF, IL6 og CXCL10 ble beregnet (vedlegg 2) og satt inn i søylediagrammer (Figur 18). Genene ble satt opp mot ACTB også kalt housekeeping-genet *ACTIN* i beregning av FC. Se 1.5 Real time qPCR.

FC-verdiene for oppregulering av genene hos kontroll- og pasientprøvene ble satt opp i en to-sidet t-test (Tabell 10 og Tabell 11). Det ble sammenlignet genuttrykk i ustimulert kontrollprøver og LPS stimulert kontroller, for å se om det er en signifikant aktivering av monocyttene. Videre ble det samme gjort for pasienter.

Setter opp hypotese for T-test. Signifikansnivå (α) = 0,05.

Nullhypotese (H_0): Det er ingen signifikant forskjell i aktivering av monocyttene etter LPS stimulering

Alternativ hypotese (H_1): Det er en signifikant forskjell i aktivering av monocytter etter LPS stimulering

Etter utført T-test ble p-verdi 0,032 for TNF, 0,039 for IL6, og 0,022 for CXCL10 for kontrollprøver (Tabell 10). p-verdi for genene er alle $< 0,05$, og nullhypotesen forkastes.

Benytter alternativ hypotese. Det er en signifikant forskjell i aktivering av monocytter etter LPS stimulering.

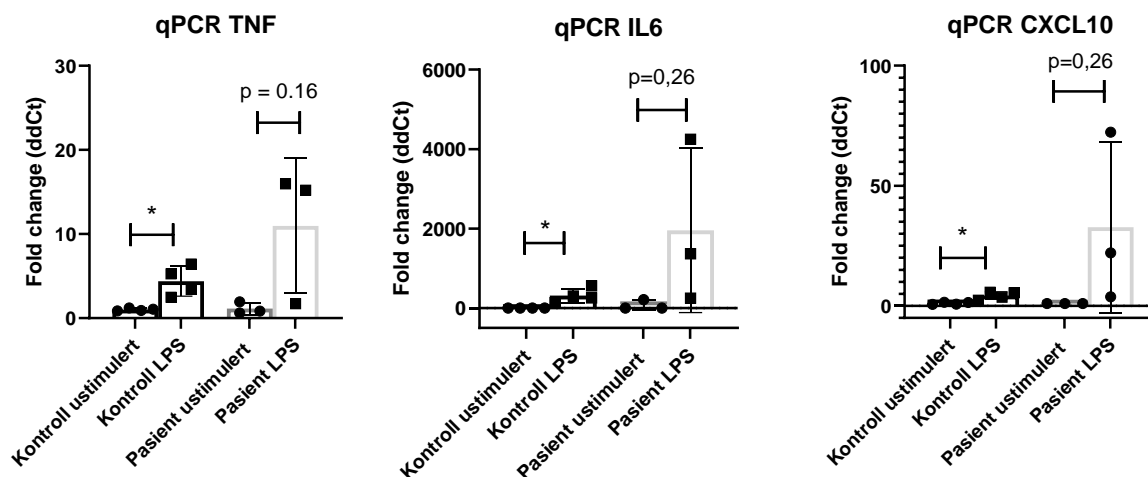
For pasientprøver ble p-verdi 0,167 for TNF, 0,254 for IL6 og 0,261 for CXCL10. P-verdi for genene er alle $> 0,05$ (Tabell 11). Nullhypotesen beholdes, og det er ingen signifikant forskjell i aktivering av monocytter etter LPS stimulering.

Tabell 10: T-test for FC av TNF, IL6 og CXCL10 i kontrollprøver. Gjennomsnitt av ustimulert kontroll- og LPS stimulert kontroll for genene er satt opp mot hverandre i en to-sidet t-test. P-verdiene fra t-testene var alle $< 0,05$, som betyr at det er signifikant forskjell mellom LPS stimulert og ustimulert kontrollprøver.

	Gjennomsnitt av ustimulert kontrollprøver FC	Gjennomsnitt av LPS stimulert kontrollprøver FC	T-test (to-sidet)	Signifikant forskjell ($P < 0,05$)
TNF	1,01	4,40	0,032	Ja
IL6	1,10	312,8	0,039	Ja
CXCL10	1,07	4,31	0,022	Ja

Tabell 11: T-test for FC av TNF, IL6 og CXCL10 i pasientprøver. Gjennomsnitt av LPS stimulert og ustimulert pasientprøver for genene er satt opp mot hverandre i en to-sidet t-test. P-verdiene fra t-testene var alle $> 0,05$, som betyr at det ikke er signifikant forskjell mellom LPS stimulert og ustimulert pasientprøver.

	Gjennomsnitt av ustimulert pasientprøver FC	Gjennomsnitt av LPS stimulert pasientprøver FC	T-test (to-sidet)	Signifikant forskjell ($P < 0,05$)
TNF	1,13	10,96	0,167	Nei
IL6	1955	70,98	0,254	Nei
CXCL10	1,00	32,75	0,261	Nei



Figur 18: Beregnet FC for ustimulerte og LPS stimulerte kontroll- og pasientprøver. Diagrammene er FC beregnet ut ifra Cq-verdier hentet ut fra instrumentet QuantStudio™ 5. y-aksen er FC (ddCt), x-akse er prøvegruppe. For hvert gen (TNF, IL6 og CXCL10) er FC beregnet for kontroll/pasient Non-stimulert og LPS stimulert. Prikker/firkanter representerer de individuelle FC-verdiene. Videre representerer variansindikator standardavviket for prøvene innen samme gruppe.

FC-verdiene for oppregulering av genene hos kontroll- og pasientprøvene ble satt opp i en to-sidet t-test (Tabell 12). Beregnet FC-verdi for LPS stimulert kontroll- og pasientprøver er også vist i figur 19.

Det ble sammenlignet oppregulering i LPS stimulert kontrollprøver med LPS stimulert pasientprøver, for å se om der er en signifikant forskjell i aktivering av monocytter mellom kontroll- og pasientprøver.

Setter opp hypotese for T-test. Signifikansnivå (α) = 0,05.

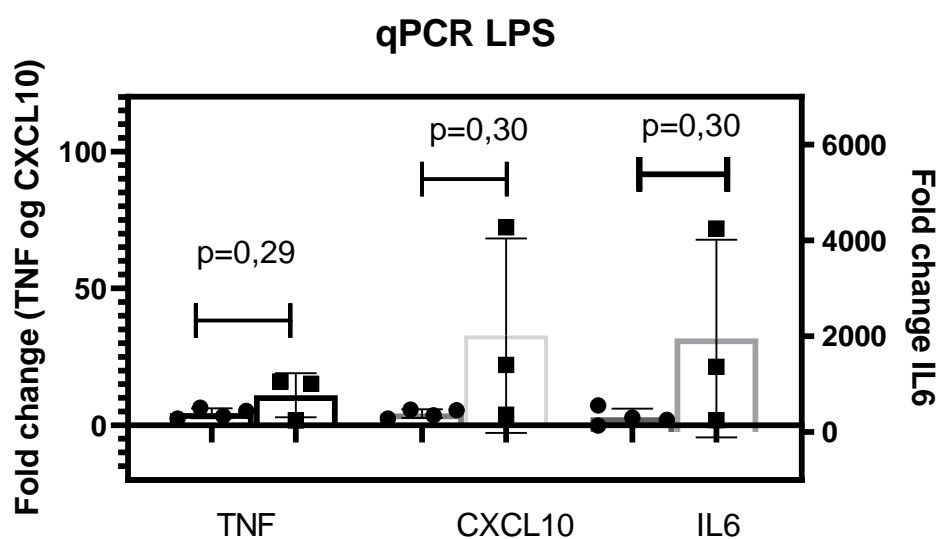
Nullhypotese (H_0): Det er ingen signifikant forskjell i aktivering av monocytter mellom LPS stimulert kontroll- og pasientprøver.

Alternativ hypotese (H_1): Det er en signifikant forskjell i aktivering av monocytter mellom LPS stimulert kontroll- og pasientprøver.

Etter utført T-test ble p-verdi beregnet til 0,19 for TNF, 0,32 for IL6 og 0,33 for CXCL10 (Tabell 12). Beregnet p-verdi for genene er alle $> 0,05$, og nullhypotesen beholdes. Det er ingen signifikant forskjell i aktivering av monocytter mellom kontroll- og pasientprøver.

Tabell 12: T-test for FC av TNF, IL6 og CXCL10. Gjennomsnitt av LPS stimulert kontroll- og pasientprøver for genene er satt opp mot hverandre i en to-sidet t-test. P-verdiene fra t-testene var alle >0,05, som betyr at det ikke er signifikant forskjell mellom kontroll- og pasientprøvene.

	Gjennomsnitt LPS stimulert Kontrollprøver FC	Gjennomsnitt LPS stimulert Pasientprøver FC	T-test (to-sidet)	Signifikant forskjell (P<0,05)
TNF	4,4	10,96	0,291	Nei
IL6	312,8	1955	0,3021	Nei
CXCL10	4,313	32,75	0,2995	Nei



Figur 19: Beregnet FC for LPS stimulert kontroll- og pasientprøver. Diagrammene er FC beregnet ut ifra Cq-verdier hentet ut fra instrumentet QuantStudio™ 5. Primær y-aksen er FC (ddCt) for TNF og CXCL10, sekundær y-aksen er FC for IL6 og x-aksen er LPS stimulert kontroll- og pasientprøver for hvert gen (TNF, IL6 og CXCL10). Prikker representerer FC-verdiene til kontrollers mens firkanter representerer FC-verdiene til pasientene. Videre representerer variansindikator standardavviket for prøvene innen samme gruppe.

4.0 Diskusjon

I dette prosjektet ble monocyttene identifisert ved å benytte antistoff-merking og flowcytometri. Prøver fra friske blodgivere og prøver fra pasienter med AAS ble analysert på instrumentet, og antall av monocyttene ble beregnet ved hjelp av kuler tilsatt til prøvene. Kontroll og pasientprøver ble sammenlignet, for å undersøke om AAS pasienter har mer eller mindre monocyttene i blod i forhold til friske kontrollere.

For å undersøke om monocyttene i AAS pasienter har større potensiale til å bli aktiverte sammenlignet med friske kontrollere, ble det utført monocyttisolering, LPS stimulering,

RNA-ekstrahering, cDNA-syntese og qPCR analyse. FC ble beregnet og sammenlignet mellom kontroller og pasientprøver.

4.1 Etablering av monocyttnpanel

Som nevnt i 3.1.1 Titrering av antistoff, kan produsenten oppgi en høyere mengde antistoff enn det som er nødvendig å bruke. Det er viktig å titrere antistoff ettersom en lav konsentrasjon av antistoff vil føre til ufullstendig merking av de positive cellene. Dette ble observert ved en forskyvning av populasjonen til venstre i cytogrammet. Motsatt, vil for mye antistoff føre til uspesifikk binding av celler, som vil føre til en forskyvning av den negative populasjonen til høyre i cytogrammet. Dette vil føre til en lav separasjon og en unøyaktig gating, som vil gi et monocyttnantall som ikke er reelt.

Videre antydte noen prøver en dårligere separasjon med CD88 enn forventet. Det ble ikke observert at den suboptimale fargingen med CD88 hadde noe betydning for resultat i dette prosjektet. Det ble utført en gating med CD88 og en tradisjonell gating uten CD88, sistnevnte gav lignende resultater med ingen signifikant forskjell og samme trender. Under tillagingen av monocyttnpanelet, ble titreringen utført på kun en prøve. Ut ifra erfaring gjennom prosjektet er det blitt observert at mengden antistoff benyttet var litt lavt og dette er ulempen med å lage et monocyttnpanel basert på kun en prøve. CD88 fluorokromet som ble benyttet var APC-fireTM, og ifølge «Brightness index» til BioLegend er APC-fireTM ikke et av fluorokromene som gir sterkest signal (56). Siden det har vist seg at CD88 ikke er så sterkt uttrykt blant cellene, anbefales det å gå for et fluorokrom med høyere styrke, som PE, i framtidige studier.

4.2 Antall monocytter i blod

Det er observert en spredning i antall monocytter blant både kontroll- og pasientprøver (Tabell 7 og Figur 15). Ettersom den intraindividuelle biologiske variasjonen er på 21 %, vil det være stor variasjon i antall monocytter i ett individ. I fremtidige studier kan det dermed være interessant å se på samme kontroll- og pasientprøver over lengre tid, samt benytte en større gruppe.

Det ble utført en t-test for å vurdere om det er en signifikant forskjell i monocyttnpopulasjonene mellom pasient og kontrollgruppen. Det er ingen signifikant forskjell i antall monocytter mellom kontroll- og pasientgruppe (Tabell 8). Som nevnt er det et lavt antall kontroll- og pasientprøver som er blitt analysert i prosjektet, og det observeres et lavere

antall monocytytter blant pasientgruppen sammenlignet med kontrollgruppen (Figur 15). Til tross for utført T-test, kan det dermed fortsatt være en forskjell i antall monocytytter hos pasienter med AAS sammenlignet med friske kontroller. Det er et stort antall av makrofager i binyrebarken og det kan dermed ikke utelukkes at de har en rolle i sykdommen (26). I tillegg er det flere risikogener som er knyttet til APS-2, som spiller en rolle i regulering av monocytytter og makrofager, slik som PTPN22 og BACH2 (19, 21, 26). Det er et stort antall av makrofager i binyrebarken og det kan dermed ikke utelukkes at de har en rolle i sykdommen (26).

Ut ifra figur 9 observeres det liten forskjell i alder mellom kontroll- og pasientgruppe. Det ble utført en T-test, og det var ingen signifikant forskjell i alder mellom kontroll- og pasientgruppen. Dette kan tyde på at alder ikke har en innvirkning i nedgangen av antall monocytytter som er observert.

I studien Wolff et al. blir det blant annet sett på monocytytter i APS-1 (50). Selv om APS-1 er et annet syndrom enn APS-2, er de fortsatt nært beslektet og en del av autoimmune polyendokrine syndromer (APS). I studien blir det observert et redusert antall intermediære monocytytter ($CD14^+CD16^+$) hos pasienter med APS-1. Resultatet i studien blir oppgitt med relativ kvantitering (prosent $CD16^+$ celler av $CD14^+$ celler). I dette prosjektet har det derimot blitt brukt absolutt kvantitering av monocytytter. Fordelen med absolutt kvantitering er at det benyttes kuler til å beregne den absolutte mengden av monocytytter i blod *in vivo*. Dette er en mer nøyaktig metode.

Dermed er det en del forskjeller i metoden benyttet av Wolff et al., sammenlignet med metoden benyttet i dette prosjektet. Det er ikke blitt benyttet kuler og det er heller ikke blitt sett på absolutt antall monocytytter i fullblod. Dette ble tatt med i betraktning ved sammenligning av resultat. Som nevnt i Wolff et al. er det et redusert antall intermediære monocytytter i APS-1. Selv om det ikke kan sammenlignes fullstendig, vil det gi en indikasjon på hva som kan forventes ved APS-2. I prosjektet ble det observert et lavere antall av alle typer monocytytter hos pasienter med APS-2, men dette var ikke signifikant.

Det er viktig å merke seg at pasienter med AAS får substitusjonsbehandling med glukokortikoider (GCS) på grunn av mangel på hormonet kortisol, som nevnt i teori. Kortisol er et antiinflammatorisk molekyl. Mer spesifikt vil behandling med GCS føre til inhibering av aktiverte immunceller, slik som T-celler eller monocytytter/makrofager (16). Den utvalgte

pasientgruppen i prosjektet, står mest sannsynlig på slik substitusjonsbehandling, og har trolig blitt behandlet i flere år. Det kan da være et spørsmål om antall år med behandling, kan ha en betydning for antall monocytter i blod. For å studere om det er en signifikant forskjell i antall monocytter uten påvirkning av glukokortikoider, kan en mulig løsning være å se på nye diagnostiserte pasienter, som enda ikke har fått substitusjonsbehandling.

4.3 Monocyttilisering

Monocytter fra blod ble isolert og stimulert med LPS, for å se på reaktivitet av monocytter i kontroll- og pasientprøver. Monocytter som ble isolert fra blod ble talt i mikroskop, for å sikre at antall celler var $\geq 200\ 000$ - $300\ 000$. Det er kun monocyttene som benyttes i metoden, og disse utgjør en liten bestanddel i blod. Det er dermed viktig å forsikre seg at en har nok celler for å få ekstrahert nok RNA til qPCR. Monocyttantallet fra pasientene varierte mellom $200\ 000$ - $800\ 000$ monocytter, og det var nok celler til ekstrahering av RNA.

Videre ble det ekstrahert små mengder RNA som ble målt på instrumentet Nanodrop 1000. På grunn av den lave mengden RNA, er det vanskelig å stole på kvalitetsmålene på instrumentet. Ratio for absorbansen ved 260 nm og 280 nm blir brukt for å observere renheten på prøvene. Dersom denne absorbansen er lavere enn 2,0 kan det indikere tilstedeværelse av protein og fenoler. Flertallet av prøvene har en verdi som er lavere enn 2,0 ved 260/280 ratio (vedlegg 2). Det ble ikke observert noe utslag på qPCR, med tanke på Cq verdien til *ACTIN*, som holdt seg stabil ved stimulering. Eventuelle urenheter hadde dermed ikke noe betydning for qPCR produktene.

Det ble også observert andre typer celler enn monocytter i kontrollprøvene. Disse cellene ble ikke identifisert, og kan være en mulig feilkilde. Men de har ikke vist å gi noe utslag på cDNA eller qPCR resultat.

4.4 Endring i genuttrykk

I henhold til problemstilling 2, ble FC først beregnet for pasient og kontrollprøver. For å se på grad av aktivering etter LPS stimulering, ble ustimulerte prøver sammenlignet med LPS stimulerede prøver. Dette ble gjort innad i pasient og kontrollgruppen (Figur 18). Som forventet ble det observert en oppregulering i genene hos både kontroll- og pasientprøver etter stimulering med LPS, sammenlignet med ustimulerte prøver. Videre ble det utført T-test som viste at det var en signifikant forskjell i aktivering av monocytter etter LPS stimulering av

kontrollprøver (Tabell 10). Men det var ingen signifikant forskjell i aktivering av monocytter etter LPS stimulering av pasientprøver (Tabell 11). Til tross for t-test, er det likevel observert en høyere aktivering av noen av pasientprøvene etter LPS stimulering.

For å undersøke om det er en forskjell i aktivering av monocytter mellom LPS stimulert kontroll- og pasientprøver, ble det utført en ny T-test (Tabell 12), som viste ingen signifikant forskjell. I tabell 12 og figur 19 observeres det et generelt høyere gjennomsnitt av FC for stimulerede LPS pasientprøver sammenlignet med stimulerede LPS kontrollprøver. Videre har det blitt observert stor variasjon i LPS stimulerede prøver til pasientgruppen i forhold til kontrollgruppen.

I tillegg er det interessant at det er observert en høyere aktivering av monocytter blant noen av pasientene sammenlignet med kontrollgruppen, til tross for at det ble observert et lavere antall monocytter blant noen av pasientene (Tabell 7). For i studien Kraus et al., ble monocytter fra AAS pasienter isolert og stimulert med IL-1. Etter stimulering var det ingen signifikant forskjell i aktivering mellom kontroll- og pasientprøver, og en kan ikke se den samme trenden som ved stimulering med LPS. Dette kan mulig være på grunn av at IL-1 har en annen signaleringsvei, og det kan være en forskjell i dose og inkuberingstid (57).

Det ble observert at pasient 5, født i 1950, hadde en lavere oppregulering i genene i forhold til de andre pasientene. Mest sannsynlig er det denne pasientprøven som gjør at det ikke blir en signifikant forskjell i begge t-testene. Den lave oppreguleringen i genene kan samsvare med at eldre menneske ofte har et mer svekket immunforsvar (58). I studien Pence og Yarbrow, ble det observert en redusert IL6 respons ved LPS-stimulering (over 2 timer) av klassiske monocytter blant eldre (60-80 år) (59). Dermed kan det hende at en økt alder gir en redusert aktivering av immunceller, slik som monocyttene. Pasient 5, har mest sannsynlig også gått på kortisolbehandling i flere år, som også kan påvirke aktivering av monocyttene.

Som nevnt fører kortisolbehandling til nedsatt immunforsvar. Det er flere studier som har vist at GCS hemmer CD14/TLR mediert aktivering av monocytter (60). CD14 er en viktig PRR, som gjenkjenner LPS og fører til aktivering av cellene. Det er dermed interessant at det er observert en høy LPS-respons blant flere pasientprøver i prosjektet (Figur 18), til tross for tidligere studier som viser til en redusert LPS-respons i monocytter ved behandling med GCS (60). Det kan derfor tenkes at AAS pasienter representerer en spesiell pasientgruppe. Ofte blir sykdommen oppdaget nokså sent, slik at produksjonen av kortisol opphører helt. Det kan

dermed bli foreslått at monocyttene blir mindre inhibert av kortisol, og kan videre bli mer aktiverte ved infeksjoner og føre til trent immunitet. Benmargen kan da bli påvirket til å produsere flere immunceller og HSC kan få en epigenetisk omprogrammering. Denne omprogrammeringen kan føre til mer aktive monocytter, som har evne til å aktivere flere autoreaktive T-celler. Men i prosjektet er det svært begrenset i antall pasienter inkludert, derfor må dette undersøkes i et større pasientmateriale. I fremtidige større studier kan en også benytte aktiveringsassayet som er blitt utviklet i dette prosjektet til å se nærmere på nydiagnostiserte pasienter sammenlignet med pasienter som har stått på behandling i flere år. Basert på observasjoner her kan det også være interessant å avgrense studiet ved å kun se på pasienter opptil 60 år, som et inklusjonskriterie.

Ved LPS stimulering blir monocytter og makrofager aktiverte, og vil få en oppregulering av HLA. Monocytter benytter HLA-DR for antigen presentasjon til T-celler og på denne måten er monocytter med på å aktivere det adaptive immunforsvaret (61). Det kan dermed være interessant å se nærmere på rollen til HLA-DR molekylet etter LPS stimulering hos AAS pasienter sammenlignet med friske kontroller.

5.0 Konklusjon

I prosjektet er det blitt utviklet analysemetoder for å bestemme monocyttantall i blod og LPS respons. Selv om t-test viste at det ikke var noen signifikant forskjell i både antall og aktivering av monocytter, observeres det likevel en lavere antall monocytter og en større aktivering hos pasienter. Det kan dermed være interessant å se om trenden med høyere oppregulering i pasientprøver fortsetter. Dette åpner for flere spørsmål i forhold til behandlingen av AAS pasienter, og om målrettet behandling mot monocytter kan være et alternativ. Større studier er nødvendig for å undersøke dette.

6.0 Referanser

1. Sand O, Sjaastad V Ø, Haug E, Bjålie G J, Toverud C K. Menneskekroppen. 3 ed: Gyldendal akademisk; 2018.
2. Keohane EM. Rodak's hematology : clinical principles and applications. 5th. ed. St. Louis: Saunders; 2016.
3. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3666375/>.
4. Evensen S. Hematopoiese 2019. Available from: <https://sml.snl.no/hematopoiese>.
5. Simonsen T, Aarbakke J, Lysaa R. Illustrert farmakologi. 3 ed: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS; 2012. 153-6. 87-88. 290-300 p.
6. Aristizábal B, González A. Innate immune system 2013 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459455/>.
7. Lea T. Immunologi og immunologiske teknikker. 3. utg. ed. Bergen: Fagbokforl.; 2006.
8. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology 2018. Available from: <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13223-018-0278-1>.
9. Bogen B. Immunologi. 2. utg. Oslo: Universitetsforl.; 2007.
10. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. PLoS One [Internet]. 2017 PMC5406034]; 12(4):[e0176460 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406034/>.

11. Kondělková K, Vokurková D, Krejsek J, Borská L, Fiala Z, Ctírad A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)* [Internet]. 2010; 53(2):[73-7 pp.].
12. Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest.* 2015;125(6):2228-33.
13. Hellesen A, Bratland E, Husebye ØS. Autoimmune Addison's disease - An update on pathogenesis. 2018 [cited 30.01.2021]; 79(3):[157-63 pp.]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/galanga/hvl.no/science/article/pii/S0003426618300489>.
14. Board PATE. Figure, Anatomy of the adrenal gland: National Cancer Institute (US); 2007 [cited 10.02.2021]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65782/figure/CDR0000269044_204/.
15. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, et al. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline 2016 [cited 01.02.2021]; 101(2):[364-89 pp.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4880116/>.
16. Varga G, Ehrchen J, Brockhausen A, Weinlage T, Nippe N, Belz M, et al. Immune Suppression via Glucocorticoid-Stimulated Monocytes: A Novel Mechanism To Cope with Inflammation 2014; 193(3):[1090-9 pp.]. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1300891>.
17. Løvås K, Erichsen Møter M, Husebye ES, Fougner KJ, Mella B, Svartberg J, et al. Primær binyrebarksvikt - årsaker, diagnostikk og behandling. Oversiktsartikkel - Medisin og Vitenskap [Internet]. 2005 [cited 01.02.2021]; 125(2):[155-8 pp.]. Available from: <https://tidsskriftet.no/sites/default/files/pdf2005--155-8.pdf>.
18. Munir S, Quintanilla Rodriguez BS, Waseem M. Addison Disease. 2020 [cited 02.02.]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, [cited 02.02.2021]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441994/>.

19. Eriksson D, Røyrvik EC, Aranda-Gulli  n M, Berger AH, Landegren N, Husebye E, et al. GWAS for autoimmune Addison’s disease identifies multiple risk loci and highlights AIRE in disease susceptibility. *Nature Communications* [Internet]. 2021; 12:[959 p.]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21015-8>.
20. Visnu V G, Manuel O B. Polyglandular Autoimmune Syndrome Type I 2021. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537211/>.
21. Husebye ES, Anderson MS, K  mpe O. Autoimmune Polyendocrine Syndromes 2018 [cited 25.01.2021]; 378:[1132-41 pp.]. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1713301>.
22. Oftedal BE, Hellesen A, Erichsen MM, Bratland E, Vardi A, Perheentupa J, et al. Dominant Mutations in the Autoimmune Regulator AIRE Are Associated with Common Organ-Specific Autoimmune Diseases 2015; 42(6). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761315002101>.
23. Armitage LH, Wallet MA, Mathews CE. Influence of PTPN22 Allotypes on Innate and Adaptive Immune Function in Health and Disease 2021; 12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.636618/full>.
24. Ebina S, Risa, Watanabe-Matsui M, Matsumoto M, Itoh-Nakadai A, Funayama R, Nakayama K, et al. The double knockout of Bach1 and Bach2 in mice reveals shared compensatory mechanisms in regulating alveolar macrophage function and lung surfactant homeostasis 2016; 160. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27387751/>.
25. UniProt. Proteinknowledgebase UniProt.org [Available from: <https://www.uniprot.org/>].
26. Almeida H, Ferreira J, Neves D. Macrophages of the adrenal cortex: a morphological study of the effects of aging and dexamethasone administration 2004; 1019:[135-40 pp.]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15247006/>.
27. Williams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* [Internet]. 2018 Oct 16; 49(4):[595-613 pp.]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30332628/>.

28. Espinoza V, Emmady P. Histology, Monocytes 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557618/?report=classic>.
29. Mirjam K, Broos CE. Chapter 3 - Immunological Manifestations in Sarcoidosis 2019. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323544290000033>.
30. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2019;37:439-56.
31. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7186935/>.
32. Christ A, Günther P, Lauterbach MAR, Duewell P, Biswas D, Pelka K, et al. Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell.* 2018;172(1-2):162-75.e14.
33. Fenstad MH, Rø AD. Flowcytometri i klinisk praksis. *Bioingeniøren*; 2012. p. 14-9.
34. Rahman M. Introduction to Flow Cytometry 2006.
35. Biosciences B. BD LSRFortessa Cell Analyzer User's Guide. BD Biosciences; 2010.
36. Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods.* 2000;243(1):77-97.
37. Thommesen L, Berg K. En kort innføring i immunologi. *Bioingeniøren.* 2019(9):16-9.
38. Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunol Lett.* 2018;196:22-32.
39. Ortolani C. Flow Cytometry of Hematological Malignancies. Hoboken: Wiley; 2011.

40. Dutertre C-A, Becht E, Irac SE, Kahlilnezhad A, Narang V, Kahlilnezhad S, et al. Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity*. 2019;51(3):573-89.e8.
41. Zaroni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:32-.
42. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(3):584-92.
43. Lie KA. DNA-analyser i diagnostisk patologi. *Tidsskrift for Den norske legeforening*. 2000;120:589-94.
44. Kalland K-H, Myrmel H, Nordbø SA. Nukleinsyrediagnostikk i medisinsk mikrobiologi. *Tidsskrift for den norske legeforening*. 2005;125(22):3110-4.
45. TaqMan vs. SYBR Chemistry for Real-Time PCR u.å [cited 07.03.2021]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html>.
46. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005;39(1):75-85.
47. Goni R, Garcia P, Foissac S. The qPCR data statistical analysis. *Integromics White Paper*. 2009;1:1-9.
48. Pfaffl MW. Livestock Transcriptomics: Quantitative mRNA Analytics in Molecular Endocrinology and Physiology 2003 Available from: <https://www.gene-quantification.de/habilitation.html>.
49. Ma W-T, Gao F, Gu K, Chen D-K. The Role of Monocytes and Macrophages in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.

50. Wolff ASB, Oftedal BV, Kisand K, E. E, Lima K, Husebye ES. Flow cytometry study of blood cell subtypes reflects autoimmune and inflammatory processes in autoimmune polyendocrine syndrome type I 2010; 71:[459-67 pp.]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20500699/>.
51. Netea MG, Joosten LAB, van der Meer JWM. Hypothesis: stimulation of trained immunity as adjunctive immunotherapy in cancer. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017;102(6):1323-32.
52. Human Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) (Picture): HumanCells Bio; Available from: <https://humancellsbio.com/products/human-normal-pmbc>.
53. BioLegend | Your Partner for Antibodies, Proteins, Kits, Proteogenomics, Custom Services, and Reagents in Life Science u.å Available from: <https://www.biolegend.com/>.
54. Talking av laboratorieanalyser: Helse Bergen; 2016 [updated 31.08.17; cited 18.03.2021]. Available from: <https://helse-bergen.no/avdelinger/laboratorieklinikken/medisinsk-biokjemi-og-farmakologi/talking-av-laboratorieanalyser>.
55. Analyseoversikten. Differensialtelling av Leukocytter - Analyseoversikten: Helse Bergen. Haukeland Universitetssykehus; u.å Available from: <https://analyseoversikten.no/analyse/221>.
56. Fluorophore Brightness Index: u.å BioLegend; [cited 21.03 2021]. Available from: <https://www.biolegend.com/en-us/brightness-index>.
57. Kraus AU, Penna-Martinez M, Meyer G, Badenhoop K. Vitamin D effects on monocytes' CCL-2, IL6 and CD14 transcription in Addison's disease and HLA susceptibility. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;177:53-8.
58. Montecino-Rodriguez E, Berent-Maoz B, Dorshkind K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(3):958-65.
59. Brandt PD, Yarbro JR. Classical monocytes maintain ex vivo glycolytic metabolism and early but not later inflammatory responses in older adults 2019; 16. Available from: <https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12979-019-0143-1>.

60. Sümegi A, Antal-Szalmás P, Aleksza M, Kovács I, Sipka S, Zeher M, et al. Glucocorticosteroid therapy decreases CD14-expression and CD14-mediated LPS-binding and activation of monocytes in patients suffering from systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*. 2005;117(3):271-9.
61. Jørgensen PF, Wang JE, Almløf M, Thiemermann C, Foster SJ, Solberg R, et al. Peptidoglycan and Lipoteichoic Acid Modify Monocyte Phenotype in Human Whole Blood. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2001;8(3):515-21.

7.0 Vedlegg

Vedlegg 1 - ROAS samtykkeskjema

Vedlegg 2 - Resultat