



Langlíf mótefnaseytun B frumna og áhrifavaldar hennar

Lærdómur dreginn af sértækum IgA skorti

Rakel Nathalie Kristinsdóttir

Leiðbeinendur: Björn Rúnar Lúðvíksson, Andri Leo Lemarquis og Helga Kristín
Einarsdóttir

Lokaverkefni til B.S. gráðu
Háskóli Íslands
Læknadeild
Heilbrigðisvísindasvið



HÁSKÓLI ÍSLANDS

**Langlíf mótefnaseytun B frumna og áhrifavaldar hennar
Lærdómur dreginn af sértækum IgA skorti**

Rakel Nathalie Kristinsdóttir

Lokaverkefni til B.S. gráðu í Læknisfræði

Leiðbeinendur:

Björn Rúnar Lúðvíksson

Andri Leó Lemarquis

Helga Kristín Einarsdóttir

Læknadeild

Heilbrigðisvísindasvið Háskóla Íslands

Maí 2016

Ritgerð þessi er til B.S. gráðu í læknisfræði og er óheimilt að afrita ritgerðina á nokkurn hátt nema með leyfi réttshafa.

© Rakeł Nathalie Kristinsdóttir, 2016

Reykjavík, Ísland 2016

Efnisyfirlit

Efnisyfirlit	1
Ágrip	3
Þakkir.....	4
Myndaskrá	5
Töfluskrá.....	6
Listi yfir skammstafanir	7
1 Inngangur.....	9
1.1 Yfirlit yfir ónæmiskerfið	9
1.1.1 Ósértæka ónæmiskerfið	9
1.1.2 Sérþæka ónæmiskerfið	9
1.2 B frumur	10
1.2.1 Þroskun B fruma	10
1.2.2 Plasmafrumur	12
1.2.3 Minnisfrumur	12
1.3 Mótefni	12
1.3.1 Bygging og eiginleikar mótefna	13
1.3.2 Mótefnamyndun	13
1.3.3 IgA	14
1.3.3.1 IgA flutningur.....	15
1.3.3.2 IgA í sermi.....	15
1.3.3.3 IgA í slímhúðum og seyttum vökvum.....	16
1.3.4 Sjálfsmótefni	16
1.3.5 Áhrif IL10 á mótefnaframleiðslu.....	16
1.4 Gallar í mótefnasvari	17
1.4.1 IgA skortur	17
1.4.1.1 Greining	17
1.4.1.2 Faraldsfræði.....	17
1.4.1.3 Orsakir og genþættir	17
1.4.1.4 Einkenni	18
1.4.1.5 Tengsl við sjálfsöfnæmissjúkdóma.....	18
1.4.1.6 Meðferð.....	19
2 Markmið.....	20
3 Efni og aðferðir	21
3.1 Leyfi	21

3.2	Pátttakendur	21
3.3	Einangrun einkjarna frumna	21
3.4	Ræktun	21
3.5	ELISA.....	22
3.6	Svipgerðagreining frumna í frumflæðisjá.....	23
3.7	Tölvuvinna og tölfræðileg úrvinnsla.....	24
4	Niðurstöður	25
4.1	Mótefnamagn í floti IgA skorts gjafa m.v. heilbrigða	25
4.2	Fylgni IgA styrks í sermi og floti.....	25
4.3	Einstaklingsbundin framleiðsla	25
4.4	Svipgerð eitifrumna.....	28
4.5	Mismunandi örvanir	29
5	Umræða.....	31
6	Heimildaskrá.....	34
7	Viðauki	38
7.1	Húðunardúi	38
7.2	PBT.....	38
7.3	PBTT.....	38

Ágrip

Langlíf mótefnaseytun B frumna og áhrifavaldar hennar

Lærdómur dreginn af sértækum IgA skorti

Rakel Nathalie Kristinsdóttir¹, Björn Rúnar Lúðvíksson^{1,2}, Andri Leo Lemarquis^{1,2}, Helga Kristín Einarsdóttir².

¹Læknadeild Háskóla Íslands, ² Ónæmisfræðideild Landspítala

Inngangur: Skilningur manna á ferlum sem leiða til mótefnasvars hafa leitt til nýrra meðferðarmöguleika, m.a. í sjálfofnæmi, bólgusjúkdómum, krabbameinum o.fl. Enn eru þó margir þættir óþekktir og mörg skotmörk í ferlinu ónotuð í lækningarlegum tilgangi. Horft hefur verið til þess að nýta sértækan ónæmisskort í mönnum sem náttúrulegt úrfellingar-módel og læra af einkennum og svipgerð þeirra. Sértækur IgA skortur (sIgAD) er algengasti sértæki ónæmisskorturinn í mönnum en hann er skilgreindur sem $IgA \leq 0.07$ g/L með eðlilegt IgG og IgM magn í sermi einstaklings eldri en 4 ára. Talið er að um 1:600 Íslendinga séu með skortinn og hafa þeir auknar líkur á sjálfofnæmissjúkdómum og ofnæmistengdum sjúkdómum og búa því við verri lífsgæði og í sumum tilfellum lífshorfur. Orsakir eru enn ekki fullþekktar en fyrri rannsóknir gefa til kynna færri umskipta B frumur í IgA skorts einstaklingum, en þær frumur seyta IL10 sem er síðan stjórnþáttur í myndun IgA seytandi B frumna. Markmið rannsóknarinnar var að skoða svipgerð B frumna í sIgAD einstaklingum, langlífa mótefnaseytun þeirra í rækt og áhrif örvunar á langlífi B frumana.

Efniviður og aðferðir: Einkjarna frumur voru einangraðar úr 12 IgA skorts gjöfum og fimm heilbrigðum viðmiðum með Ficoll-Hypaque aðferð. Þær voru síðan ræktaðar í hitaskáp í æti (IMDM+10% FCS+pen/strep). Frumur voru óörvaðar eða örvaðar með IL10, í styrkjunum 10 eða 100 ng/mL. Vikulega var floti safnað úr ræktunum. Til að meta mótefnamagn í floti og sermi var ELISA aðferðin notuð. Frumuflæðisjá var notuð til að meta magn og gerðir B frumna í þremur einstaklingum rannsóknarinnar með mismunandi svipgerðir.

Niðurstöður: Niðurstöður benda til einstaklingsbundinnar framleiðslu mótefna í rækt. Magn umskipta B frumna IgA skorts einstaklinga var 1.61% og 0.83% af B frumum samanborið við 6.63% í heilbrigðu viðmiði. Engar IgA plasma-né minnisfrumur sáust hjá IgA skorts gjafa sem myndaði ekki IgA í rækt. Hjá IgA skorts gjafa sem framleiddi IgA í rækt voru IgA plasmafrumur 0.11% af B frumum og IgA minnisfrumur 1.81%. IgA seytun í rækt var til staðar í 25% (3/12) IgA skorts einstaklinga en þó með mismunandi framleiðslumynstri milli og innan einstaklinga hvað varðar styrk og tímalengd seytis. Örvanir með IL10, bæði 10 og 100 ng/mL, höfðu ekki marktæk áhrif á IgA framleiðslu.

Ályktanir: Helstu niðurstöður rannsóknarinnar eru að mótefnaframleiðsla IgA skorts gjafa er breytileg milli einstaklinga, sem er í samræmi við þá staðreynd að IgA skortur er fjölgena sjúkdómur og orsakir hans breytilegar milli einstaklinga. Lægri fjöldi umskipta B fruma í IgA skorts gjöfum er í samræmi við fyrri niðurstöður rannsóknarhópsins. Fyrri birtar rannsóknir sýna aukna mótefnaframleiðslu með IL10 örvun ásamt öðrum frumuboðefnum en niðurstaða þessarar rannsóknar sýnir ekki aukningu þegar einungis er örvað með IL10. Sumir IgA skorts einstaklingar höfðu langlífar IgA plasmafrumur in vitro, þó að IgA mældist ekki í sermi, sem þyrfti að greina betur. Einnig væri áhugavert að skoða frekar frumugerðir IgA skorts einstaklinga, sérstaklega m.t.t. fækkunar umskipta B frumum.

Þakkir

Ég vil þakka Birni Rúnari Lúðvíkssyni, leiðbeinanda mínum, fyrir að gefa mér tækifærið að vinna að þessu verkefni ásamt góðum ráðum og miklum metnaði fyrir því á tímabilinu. Einnig vil ég þakka Andra Leó Lemarquis og Helgu Kristínu Einarsdóttur, meðleiðbeinendum mínum, fyrir ómetanlegan aðstoð hvort sem var við ritgerðarskrif, framkvæmd eða aðra þætti sem tengdust verkefninu. Verkefnið var unnið á Ónæmisfræðideild Landspítalans. Allir starfsmenn á Ónæmisfræðideildarinni fá miklar þakkir fyrir vinsemd og hjálpssemi og þá sérstaklega Fannar Pálsson fyrir hvatningu á erfiðum tímum á rannsóknarstofunni. Verkefnið er styrkt af Rannís, rannsóknarsjóð, og þeim er þakkað þeirra framlag. Sigrúnu Helgu Lund, tölfræðing, þakka ég hjálp við tölfræði úrvinnslu og almennan óbilandi áhuga og hjálpssemi í öllu því sem hún tekur sér fyrir hendur. Að lokum vil ég þakka öllum öðrum sem hjálpuðu mér við gerð þessa verkefnis á einn eða annan hátt.

Myndaskrá

<i>Mynd 1: Mynd úr Wentink MWJ o.fl. 2015. (2)</i>	11
<i>Mynd 2: Skematísk mynd af byggingu mótefnis. Teiknuð mynd byggð á (1)</i>	13
<i>Mynd 3: IgA framleiðsla í flotum IgA skorts einstaklinga m.v. heilbrigða. Marktækur munur reyndist milli hópa</i>	25
<i>Mynd 4: IgA framleiðsla B frumna IgAD einstaklinga í rækt á fyrstu viku. Myndin sýnir þá þrjá einstaklinga sem sýndu framleiðslu ásamt einum sem framleiddi ekki. Hver punktur táknar einn brunn og fyrir hvern einstakling voru 15 brunnar</i>	26
<i>Mynd 5: IgA framleiðsla B frumna í rækt á fjórum mismunandi tímapunktum hjá þeim þremur IgAD einstaklingum sem sýndu framleiðslu ásamt einum sem framleiddi ekki. Hver punktur táknar meðaltal framleiðslu 15 brunna</i>	26
<i>Mynd 6: Nánari skoðun á IgA framleiðslu hjá B frumum í rækt hjá þeim þremur IgAD einstaklingum sem sýndu IgA framleiðslu í rækt. Hver lína sýnir framleiðslu ákveðins brunns á þremur/fjórum tímapunktum</i>	27
<i>Mynd 7: Yfirlitsmynd yfir IgA framleiðslu B frumna í rækt hjá heilbrigðum viðmiðum á mismunandi tímapunktum. Hver lína sýnir framleiðslu ákveðins brunns á fjórum tímapunktum</i>	27
<i>Mynd 8: Myndin sýnir IgG framleiðslu þáttakenda með mismunandi örvunum og á mismunandi tímapunktum. Þ gildi fyrir áhrif örvana má sjá fyrir hvern tímapunkt á viðeigandi mynd</i>	29
<i>Mynd 9: Myndin sýnir IgA framleiðslu þáttakenda með mismunandi örvunum og á mismunandi tímapunktum. Þ gildi fyrir áhrif örvana má sjá fyrir hvern tímapunkt á viðeigandi mynd</i>	30

Töfluskra

<i>Tafla I: Þættir sem einkenna helstu gerðir CD4 T hjálparfruma. Tafla byggð á mynd 1 (13).</i>	10
<i>Tafla II: Tafla úr Jorgensen GH og fl. 2009. (57).</i>	19
<i>Tafla III: Mótefni sem litað var fyrir í frumuflæðisjá.</i>	23
<i>Tafla IV: Ísótýpu viðmið sem litað var fyrir í frumuflæðisjá.</i>	24
<i>Tafla V: Yfirborðssameindir sem voru notaðir til að skilgreina B frumur. Skilgreining fyrir B frumur á við um alla hópa sem skoðaðir voru.</i>	28
<i>Tafla VI: Helstu niðurstöður um svipgerð eitifrumna þriggja einstaklinga rannsóknarinnar. (HC=healthy control, High IgAD= IgAD einstaklingur sem sýndi IgA framleiðslu í rækt, Low IgAD=IgAD einstaklingur sem sýndi ekki IgA framleiðslu í rækt).</i>	28

Listi yfir skammstafanir

ACPA – Anti-citrullinated protein antibody
AID - Activation induced deaminase
APC – Antigen presenting cell
BAFF – B-cell activating factor
BCR – B-cell receptor
BLIMP1 – B-lymphocyte-induced maturation protein 1
BSA – Bovine serum albumin
Btk – Bruton's tyrosine kinase
CCR – CC chemokine receptor
CD – Cluster of differentiation
CD40L – CD40 ligand
CONT - Control
CVID – Common variable immunodeficiency
D hluti – Diversity hluti
DNA – Deoxyribonucleic acid
DON – Donor
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay
FACS – Fluorescence activated cell sorting
FCS – Fetal calf serum
GALT – Gut-associated lymphoid tissue
HRP – Horseradish peroxidase
HSC – Hematopoietic stem cell
IFN - Interferon
Ig – Immunoglobulin
IgAD – IgA deficiency
IL – Interleukin
IMDM – Isocove's modified dulbecco's medium
J hluti – Joining hluti
J keðja- Joining chain
LPS - Lipopolysaccharide
m.a. – meðal annars
m.t.t – með tilliti til
m.v. – miðað við
M frumur – Microfold frumur
MALT – Mucosa-associated lymphoid tissue
MHC – Major histocompatibility complex
NK frumur – Natural killer frumur

o.fl. – og fleiri
OD – Optical density
PAX – Paired box protein
PBS – Phosphate buffered saline
Pen – Penicillin
PFA - Paraformaldehyð
pIgR – Polymeric immunoglobulin receptor
PRR – Pattern recognition receptor
Rpm – Revolutions per minute
SHM – Somatic hypermutation
slgA – Secretory IgA
SLE – Systemic Lupus Erythematosus
Strep - Streptomycin
t.d. – til dæmis
TLR – Toll like receptor
TMB – Tetramethylbenzidine
TCR – T-cell receptor
TGF – Transforming growth factor
V hluti – Variable hluti
þ.e. – það er
þ.e.a.s. – það er að segja
þ.m.t. – þar með talið

1 Inngangur

Í vörnum líkamans gegn sýkingum koma margir þættir saman. Einn hornsteinn sértækra varna líkamans gegn sýkingum er mótefnaframleiðsla. Hún fer fram í B frumum ónæmiskerfisins (3). Ef B frumur eru ekki í réttum tengslum við umhverfi sitt eða þroskast ekki rétt þá raskast mótefnaframleiðsla þeirra. Ein birtingarmynd þess er mótefnaskortur. Mótefnaskortur getur verið sértækur, en þá vantar eina gerð af mótefni þó að heildarmótefnamagn sé í sumum tilfellum eðlilegt. Eitt helsta einkenni mótefnaskorts eru endurteknar og oft alvarlegar sýkingar, aukin hætta á sjálfsöfnæmi og í sumum tilfellum aukin hætta á meinmyndun (4).

1.1 Yfirlit yfir ónæmiskerfið

Mannslíkaminn hefur fjölda varna gegn öllu því áreiti sem hann verður fyrir, bæði utanaðkomandi og vegna samlífis við örverur. Það er hlutverk ónæmiskerfisins að varna eða takmarka skaða af völdum sýkingavalda. Ónæmiskerfið er flókið og gert úr fjölbreyttum þáttum, s.s. frumum, sameindum og fleiru sem vinna saman að því markmiði að verja líkamann (5) Rannsóknir á ónæmiskerfinu í gegnum tíðina hafa skilað miklum árangri í uppgötvunum fyrir klíniska læknisfræði, m.a. sýklalyf, bóluefni, einstofna mótefni o.fl (6).

Ónæmiskerfinu má gróflega skipta í 2 hluta, ósértæka (e. innate immunity) og sértæka (e. adaptive immunity) kerfið. Þessi kerfi eru ólík í eðli sínu en vinna þó náið saman og veita okkur þá vörn sem við þurfum til að lifa af (5).

1.1.1 Ósértæka ónæmiskerfið

Ósértæka ónæmiskerfið myndar fyrstu víglínu gegn sýkingum. Það vinnur hratt en á ósértækan hátt. Það nýtir sér svokallað "munstur greinandi" viðtaka (e. pattern recognition receptors, PRR), sem þekkja mismunandi munstur á sýkingarvaldi (7). Helstu hlutar ósértæka ónæmiskerfisins eru m.a. þekjufrumur, ýmsar frumur sem éta sýkla og örva bólguviðbrögð, komplement kerfið (plasma prótein kerfi í blóði) og NK frumur (verjast vírusum og innanfrumusýklum). Þessu öllu fylgja svo ýmis boðefni sem örva svarið enn meira. Það er ekki fyrir en sýkill eða mótefnavaki nær að fela sig og komast þannig framhjá þessum þáttum sem hann á möguleika á að mynda sýkingu. Þá tekur sértæka kerfið við, og þrátt fyrir styrk og sértækni þess þá þarfnast það örvunar og hjálpar frá ósértæka kerfinu til að fjarlægja sýkil (5, 7).

1.1.2 Sértæka ónæmiskerfið

Sértæka ónæmiskerfið fer í gang þegar sýkill kemst framhjá vörnum ósértæka kerfisins. Einkenni þess eru gífurleg sértækni á mótefnavaka og möguleikinn á að mynda ónæmisfræðilegt minni. Helstu frumur sértæka kerfisins eru T og B frumur. Báðar gerðir myndast út frá forverafrumum í beinmerg (5). B frumur þroskast í beinmergnum, miltanu og eitlum. Þær eru uppspretta mótefnamyndunar sem miðlar vessabundna hluta ónæmiskerfisins (8).

Hinsvegar þroskast T frumur í hóstakirtlinum og eru aðalþáttur í frumubundnu svari sértæka kerfisins (5). T frumur eru í blóði og annarrar gráðu eitilvefjum og virkjun þeirra er háð því að komast í

snertingu við mótefnavaka bundinn í MHC á sýnifrumum (e. antigen presenting cell, APC) (9). En án aðstoðar örvunar verður T fruman óvirk. Aðstoðar örvunin er oft í gegnum CD28 á T frumunni og CD80/CD86 á APC (10).

Sameindir sem einkenna T frumur er T frumu viðtakinn (e. T cell receptor/TCR) ásamt CD3. Aðrar sameindir sem einkenna mismunandi undirhópa T fruma eru t.d. aðstoðarviðtakarnir (e. co-receptor) CD4 og CD8 (11). Þær sem hafa CD8 á yfirborði sínu er frumudrepani (e. cytotoxic). Þær eru vörn gegn veirusýkingum, innanfrumu bakteríum og krabbameinsfrumum. En CD4 T frumur, einnig kallaðar T hjálparfrumur, eru nauðsynlegar til að virkja CD8 T frumur og B frumur. Þær viðhalda svari CD8 frumnanna því án örvunar frá þeim geta CD8 T frumur ekki myndað ónæmisfræðilegt minni gegn mótefnavakanum (12). CD4 T hjálparfrumum má skipta í fleiri undirhópa sem ákvarðast af mismunandi frumuboðefnum (e.cytokine) og umritunarpáttum sem örva myndun þeirra, þær hafa mismunandi hlutverk og frumuboðefni sem þær seyta o.fl (tafla I).

Tafla I: Þættir sem einkenna helstu gerðir CD4 T hjálparfruma. Tafla byggð á mynd 1 (13).

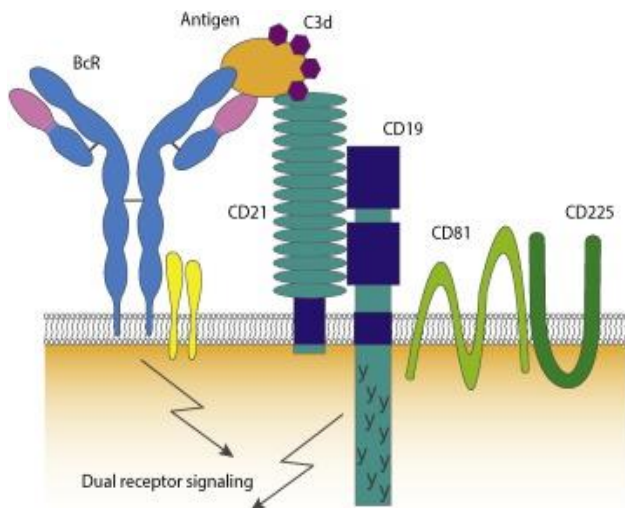
	Boðefni sem sérhæfir	Umritunarpáttur	Boðefni seytt	Hlutverk
Th1	IL12 & IFN γ	T-bet	IFN γ , IL2	Miðla ónæmissvari gegn innanfrumusýklum. Geta valdið sjálfsöfnæmi.
Th2	IL4 & IL2	GATA-3	IL4, IL5, IL13	Verja gegn sníkjudýrum, en valda astma og fleiri ofnæmisviðbrögðum.
Th17	TGF- β (lítið) & IL6	ROR- γ -T	IL17, IL21, IL22	Vinna gegn utanfrumubakteríu- og sveppasýkingum. Geta valdið sjálfsöfnæmi.
Treg	TGF- β (mikið) & IL2	FoxP3	TGF β , IL10, IL35	Viðhalda þoli og jafnvægi innan ónæmiskerfisins. Stjórna ónæmissvari.

1.2 B frumur

B frumur eru önnur gerð eitilfrumna líkamans. Vitneskja um tilveru þeirra varð í kjölfar uppgötvunar á próteinunum sem þær mynda, mótefnum líkamans (14). Þær myndast í beinmerg og fara svo gegnum strangt þroskunarferli þar sem einungis hluti frumnanna lifa af. Þær sem lifa af verða óreyndar B frumur sem taka sér bólfestu í eitilvefjum líkamans. Þar deyja þær nema þær örvist gegnum bindingu mótefnavaka síns við B frumu viðtaka (e. B cell receptor/BCR) á yfirborði sínu og sérhæfast þá í lokastig sín, minnis- eða plasmafrumur (8). Hlutverk plasmafrumna er að mynda hásækni mótefni gegn mótefnavakanum sem virkjaði þær en minnisfrumur viðhalda vörnum ónæmiskerfisins til lengri tíma og gefa hraða endursvörun gegn utanaðkomandi mótefnavaka sem þær hafa komist í tæri við áður (15).

1.2.1 Þroskun B fruma

B frumur myndast út frá blóðmyndandi stofnfrumum (e. hematopoietic stem cells, HSCs). Þær eru staðsettar í beinmerg og eru forverar allra blóðfrumna (16). Þær sérhæfast í ákveðnar áttir með vel stýrðum en þó misvel þekktum ferlum (17). Sterkar vísbendingar eru um að umritunarpátturinn Pax5 leiki stórt hlutverk í þroskun í átt að B frumulínu, með því m.a. að virkja gen sem eru nauðsynleg í B frumu þroskun en bæla gen sem spila lykilhlutverk í þroskun að öðrum frumulínum (14).



Mynd 1: Mynd úr Wentink MWJ o.fl. 2015. (2)

Þennan viðtaka er að hann þarf engan utanfrumubindil, um leið og allir þættir viðtakans safnast saman á frumuyfirborði og krosstengjast fer innanfrumuboðleið hans að virka. Án þessa viðtaka eða ef gallar eru í boðleiðum hans verður skortur á B frumum og/eða mótefnaskortur (e. agammaglobulinemia) (20). Á þessu stigi koma einnig fram aðrar einkennandi B frumu yfirborðssameindir, t.d. CD20 (21), CD10 (22). Eftir að for-B frumu þroska lýkur verður til óproskuð B fruma. Þá hefur léttá keðja BCR náð að endurraða sér og þá fyrst verður fullmótaður BCR af IgM gerð á yfirborði frumunnar. Þá hefst neikvætt val B frumna, þar sem þeim frumum sem þekkja mótefnavaka líkamans er eytt með sjálfstýrðum frumudauða. Án þessa ferlis myndu nýmyndaðar frumur ráðast á sameindir líkamans og valda sjálfsofnæmissjúkdómum. B frumur geta á þessu stigi breytt sértækni viðtakans með svokallaðri viðtaka breytingu (e. receptor editing) (23). Ef B frumur lifa þetta stranga ferli af fara þær úr beinmergnum og til miltans. Þar geta þær enn orðið fyrir neikvæðu vali, ef þær þekkja mótefnavaka líkamans. Á þessu stigi kallast þær umskipta-B frumur (e. transitional B cell). Það sem helst aðgreinir óproskaðar B frumur úr beinmerg og umskipta-B frumur eru viðbót IgD tjáningar við IgM á yfirborði umskipta-B frumna (23). Það sem aðgreinir umskipta-B frumur og þroskaðar B frumur er mikil tjáning yfirborðssameindanna CD10, CD24 og CD38 á þeim fyrrnefndu (24).

Til að verða fullþroskaðar óreyndar B frumur þarf boð að berast gegnum BAFF og viðtaka þess (25). Þessar frumur hringsóla í blóði og eitlum til skiptis. Ef þær hitta mótefnavaka í eitli sem viðtaki þeirra hefur sértækni í hafa þær um tvær leiðir að velja til að virkjast og halda áfram þroskun að lokastigum B frumna. Í þeirri fyrri eykst tjáning CCR7, sem er flakkboða (e. chemokine) viðtaki. Við þetta fara þær að svæði milli kímstöðar (e. follicle) og T frumu svæðis í eitlinum og sýna CD4 T hjálparfrumum mótefnavakabúta í MHC II sameind á yfirborði. Hjálparfruman örvar svo B frumuna svo hún fari að fjölga sér, flokkabreytast (e. class switching) og breyta bindiseti sínu (sjá kafli 1.3.2.). Afkvæmi þessara virkjuðu frumna fara annaðhvort í kímstöðu (e. germinal center) eða framhjá henni og þroskast þaðan í mismunandi áttir (26). Hin leiðin er T frumu óháð og felur í sér að mótefnavakar krosstengja viðtaka á óvirkjuðu B frumunum. Viðtakarnir mynda hópa sem miðla tengslum við Bruton's týrósín kínasa (Btk) sem leiðir til innanfrumuferla sem virkja frumuna og valda fjölgun. En þetta nægir

Þegar stofnfruma hefur skuldbundið sig að verða B fruma gerist þroskunarferlið í nokkrum skrefum. Fyrst myndast svokölluð frum-B fruma (e. pro-B cell). Þær einkennast m.a. af sameindum eins og CD19 (18). CD19 er hluti af B frumu aðstoðarviðtaka, ásamt CD81, CD21 og CD225, sem örva BCR miðluð boð (mynd 1) (2).

Því næst koma til sögunnar for-B frumur (e. pre-B cell). Þær einkennast af for-B frumu viðtaka (e. pre-B cell receptor, pre-BCR) á yfirborði sínu, sem hefur endurraðað þungu keðjunum en staðgöngukeðjur eru í stað léttu keðjanna (18, 19). Það sem er merkilegt við

ekki til að gera B frumu mótefnaseytandi því til þess þarf einnig boð gegnum Toll-líka viðtaka (e. Toll-like receptors) (27).

1.2.2 Plasmafrumur

Plasmafruma er fullsérhæfð B fruma sem er hætt að skipta sér og hefur það hlutverk að mynda og seyta mótefnum (28). Yfirborðssameindir sem einkenna hana eru m.a. CD19⁺, CD38⁺⁺, CD27⁺⁺, CD10⁻ með/án CD138 (29). Aðalstjórnandi í plasmafrumumyndun er talið vera próteinið BLIMP-1. Það er umritunarpáttur sem bæfir umritun ákveðinna gena. Það yfir B frumum í átt að plasmafrumu þroskun og er nauðsynlegt fyrir viðhald plasmafrumu (28). Tvær leiðir er til að mynda plasmafrumur. Önnur gerist utan kímíðju. Þá myndast stuttlífur plasmafrumur sem geta seynt flokkabreyttum lágsækni mótefnum þar sem ekki hefur orðið breyting á bindiseti. Hin leiðin fer gegnum kímíðju og þessar frumur koma fram nokkrum vikum eftir útsetningu fyrir mótefnavaka. Þessar frumur verða langlífur plasmafrumur sem seyta hássækni mótefnum. Þær taka sér bólfestu í beinmergnum og eru ábyrgar fyrir um 80% af mótefnamagni í sermi (30).

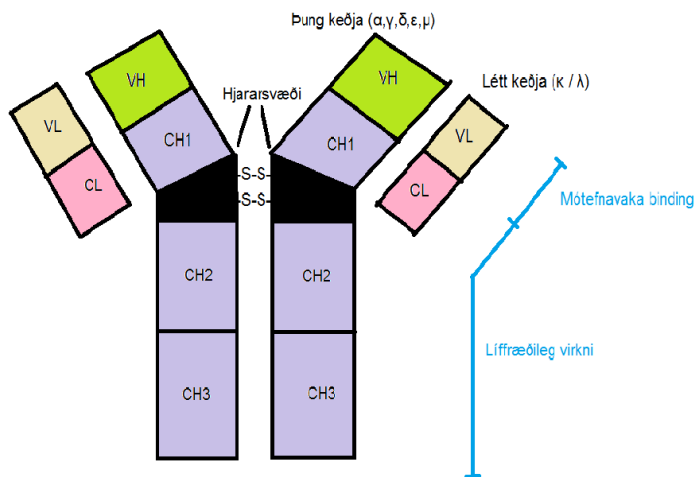
1.2.3 Minnisfrumur

Minnisfrumur eru skilgreindar sem CD19⁺, CD10⁻, CD27⁺, CD38⁻ B frumur (29). Þær seyta ekki mótefnum fyrr en þær eru endurúttættar fyrir mótefnavakanum sem þær eru sértækar fyrir. Við útsetningu sérhæfast þær snögglega yfir í mótefnaseytandi plasmafrumur. Samanborið við fyrsta ónæmissvarið gerist þetta hraðar, í meira magni og mótefnin eru strax flokkabreytt og með háa sækni (31). Þættir sem ráða því hvort B fruma þroskast í minnisfrumu eða plasmafrumu eru ekki fullþekktir en rannsóknir virðast benda helst til boðleiða gegnum CD40 og hjálpar frá T hjálparfrumum í kímstöðvum (32, 33).

1.3 Mótefni

Mótefni eru verndandi prótein mynduð af B frumum. Þau eru prótein í líkamanum sem eru framleidd í hvað mestu magni. Þau mynda um 20% af allri próteinþyngd í plasma (34). Þau bindast mótefnavaka sem er sambærilegur mótefnavakanum sem kveikti á ónæmissvarinu (3) og hafa áhrif á hann með mismunandi leiðum. Þar má m.a. nefna hlutleysing (e. neutralization). Þá húða mótefnin sýkilinn eða eitufni hans og hindra að hann geti sinnt hluverki sínu, þ.e.a.s. þau hlutleysa hann. Einnig á sér stað sýning (e. opsonization). Í sýningu húða mótefnin sýkil og gera hann þar með sýnilegri fyrir átfrumum sem eyða honum. Mótefni sem eru bundin mótefnavaka geta einnig virkjað komplement kerfið og hindrað viðloðun mótefnavaka við slímhúðir (5). Mótefni eru af fimm gerðum, IgM, IgD, IgG, IgA og IgE. Þessar gerðir hafa mismunandi áhrif og hlutverki að gegna í vörnum líkamans (3).

1.3.1 Bygging og eiginleikar mótefna



Mynd 2: Skematísk mynd af byggingu mótefnis. Teiknuð mynd byggð á (1)

og gerð mótefnis ákveður virkni þess. Svokallað hjararsvæði (e. hinge region) tengir þessi svæði mótefnisins. Sveigjanleiki þess leyfir hreyfingar armanna tveggja óháð hvor öðrum. Einnig er smá hreyfanleiki milli fasta- og breytisvæðisins. Þetta gerir mótefnum kleift að bindast sameindum með mismunandi fjarlægðum á milli sín. Mótefni samanstanda af fjórum fjölpeptíð keðjum, tveimur þungum (e. heavy chain) og tveimur léttum (e. light chain). Dísúlfíðtengi tengja keðjurnar saman. Hver keðja hefur breytisvæðið á amínóenda úr u.þ.b. 110 amínósýrum en fasta svæðið er staðsett á karboxýl endanum. Breytisvæði þungu og léttu keðjanna koma saman og mynda breytisvæði mótefnisins, eitt á hvorum armi Y-sins. Léttu keðjurnar geta verið af tveimur gerðum, κ eða λ , en þungu af fimm gerðum (μ , δ , γ , α , ϵ) (mynd 2) (1).

1.3.2 Mótefnamyndun

Mótefnavaka viðtakar (e. antigen receptors) á eililfrumum eru leið ónæmiskerfisins til að þekkja mótefnavaka í umhverfinu. Á T frumum eru það T-frumu viðtakar en á B frumum eru það mótefni. Einungis verður rætt um myndun þess síðarnefnda en myndun T frumu viðtaka er sambærileg. B frumur hafa mjög skilvirkt kerfi til að mynda mótefni með fjölbreytt bindiset sem eru þó kóðuð í litlum hluta genamengisins (35).

Fyrst er það mótefnavakaóháð þroskun B frumu viðtakans sem gerist í beinmerg. Breytisvæði mótefna eru kóðuð í hlutum í genamenginu (V, D, og J hlutar) og tilviljanakennd endröðun þeirra getur myndað meira en $5 \cdot 10^{13}$ mismunandi gerðir breytisvæða, þ.e. mótefni sem þekkja meira en $5 \cdot 10^{13}$ gerðir af mótefnavökum. Skrefin eru í grófum dráttum eftirfarandi:

1. Fyrst er þungu keðjunni endurraðað. D genið er endurraðað við J genið. Þetta kallast D-J endurröðun. Því næst er V geni skeytt við nýmyndaða DJ genið. Þetta kallast V-DJ endurröðun (8).
2. Ef endurröðun þungu keðju tekst, birtist pre-BCR á yfirborð frumunnar, sem samanstendur af nýmyndaðri þungri keðju og staðgöngu léttri keðju (e. surrogate light chain) (36).

3. Nú fær B fruman, sem er orðin að for-B frumu, leyfi til að endurraða léttu keðjunni. Ferlið er sambærilegt við endurröðun þungu keðjunnar nema einungis ein endurröðun á sér stað, milli V og J gens (8).

4. Ef allt tekst vel til er fullmyndaður BCR af IgM gerð settur á yfirborð óþroskuðu B frumunnar (36).

Næstu skref mótefnamyndunar felast í því að B frumur sem bindast sjálfsmótefnavaka í beinmerg of sterkt fara í sjálfstýrðan frumudauða en sumar fara í gegnum viðtaka breytingu. Það gefur þeim nýja sértæki og möguleikann á að lifa af og fara úr beinmergnum (36, 37). Sama ferli getur líka átt sér stað í umskipta-B frumum sem gefur möguleikann á að eyða frumum sem þekkja sjálfsmótefnavaka utan beinmergs (23).

Nú tekur við sá hluti myndunarinnar sem er mótefnavakaháður og gerist í þroskaðri óreyndri B frumu (38). Sómatísk ofurstökkbreyting (e. somatic hypermutation/SHM) er ferli sem veldur punktstökkbreytingum í bindiseti mótefnis eftir kynni við mótefnavaka. Ef breytingin veldur hærri sækni mótefnis í mótefnavaka er sú fruma valin til að skipta sér og þroskast enn frekar. Annað ferli er flokkabreyting. Þá gerst endurröðun á geni fyrir fasta svæði mótefnis sem veldur því að mótefnið hefur enn sömu bindigetun en er af annarri gerð (39). Það eru fimm gerðir mótefna, IgM, IgD, IgG, IgA og IgE. Mismunandi gerðir mótefna hafa mismunandi hlutverki að gegna og miðla því gegnum bindingu fasta svæðis mótefnisins við viðtaka á frumum sem á að hafa áhrif á eða með því að virkja aðra þætti ónæmiskerfisins eins og t.d. komplement kerfisins (40). Bæði SHM og flokkabreyting stjórnast af ensíminu activation induced deaminase (AID). Þetta ensím er cýtósín deaminasi sem breytir basanum cýtósín í úracíl. Þessi breyting er ekki leyfileg í DNA og því hefst DNA-viðgerð í B-frumunni, sem leiðir annaðhvort til punktstökkbreytinga í bindisetinu eða á fasta svæði viðtakans. Mikilvægt er þó að stjórna AID vel til að koma í veg fyrir krabbameinsmyndandi stökkbreytingar (39). SHM og flokkabreyting gerast almennt í kímniðju eitla, sem eru sérstök svæði innan eitla sem sjá um B frumu fjölgun. Þar binst B fruma mótefnavaka sínum ásamt því að CD40 á B frumu binst CD40L á CD4 T hjálparfrumu. Þetta er þó ekki algilt því mikilvægi flokkabreytingu utan kímniðju og án boða frá CD4 T hjálparfrumunni er mikilvæg í meltingarvegi í flokkabreytingu yfir í IgA (41).

Fyrstu mótefni sem B fruma býr til eru fest í frumuhimnuna og virka þá sem viðtakar fyrir mótefnavaka. En B frumur geta einnig seytt mótefnum. Ef mótefnavaki binst frumubundnu viðtökunum fer af stað innanfrumuferli gegnum þá og B frumurnar sérhæfast í mótefnaseytandi plasmafrumur eða minnisfrumur, með eða án hjálpar CD4 T fruma. Munurinn á seyttu og frumubunda forminu liggur í karboxýl enda mótefnisins þar sem seyttu formið hefur vatnssækið peptíð á endanum en frumubundna hefur vatnsfælið. Peptíðin eru tjáð og þýdd úr sama geni en er splæst á mismunandi hátt (42).

1.3.3 IgA

IgA er það mótefni sem er framleitt í hvað mestu magni í líkamanum. Það má helst finna í slímhúðum en þó einnig í blóði (43). Helsta hlutverk þess eru vörn, þolmyndun og ónæmi slímhúða. Einnig viðheldur það jafnvægi (e. homeostasis) milli líkama og örveruflórunnar (44). Helstu áhrifavaldar á flokkabreytingu yfir í IgA eru CD40L á CD4 T hjálparfrumum, TGFβ1, IL6, IL10, retínóik sýra o.fl (41).

IgA hefur tvo undirflokk, IgA1 og IgA2, sem eru tjáðir af mismunandi genum á litning 14 (45). Það eru nokkrir hlutir sem aðgreina þessa undirflokk. M.a. er dreifing innan líkamans mismunandi. IgA í blóði er oftast af IgA1 gerð en í slímhúðum og seyttum vökvum er IgA2 meira áberandi (46). Annar munur á IgA undirflokkunum er að IgA1 er með lengra hjararsvæði. Talið er að þetta hafi þróast til að auka bindistyrk milli mótefnis með tveimur tengingum við mótefnavaka (47). Lengra hjararsvæði veldur því þó að líklegra er að próteasar baktería brjóti það niður. Það er því kostur að IgA2 sé frekar í slímhúðum því gefur meiri vörn gegn bakteríum í meltingar- og öndunarvegi (45). Annar kostur sem IgA2 hefur framyfir IgA1 er að þau virðast hafa betri Fc- α -miðlaða, mannósa háða kekkjunar eiginleika gegn garna örverum og virkni gegn lípópólýsakkariðum (e. lipopolysaccharides/LPS), sem er lykilþáttur í uppbyggingu frumuveggs Gram neikvæðra baktería í görninni (41).

IgA hefur einnig mismunandi byggingarform, það er bæði til sem einliða og fjölliða, en oftast þó tvíliða. Dreifing þessara byggingaforma er mismunandi. Í blóði er það langoftast sem einliða. Í slímhúðum myndast það staðbundið og er oftast sem tvíliða, tengt með J keðju og kallast seytunar-IgA (sIgA) (48).

sIgA virkni getur hlutleyst sýkla og eitur þeirra án þess að valda bólgu því það getur ekki virkjað komplement kerfið. Vaxandi vísbendingar eru um að IgA hafi mismunandi sækni í örverur eftir því hvaðan þær eru. Ef þær eru skaðlegar hefur IgA háa sækni í þær en ef þetta eru örverur þarmaflórunnar að ráðast gegnum þekjulagið þá hefur IgA lága sækni í þær. Þetta seinna skref kallast ónæmis útilokun (e. immune exclusion) og er sérstaklega mikilvægt í meltingarkerfinu þar sem örveruflóra er í nánnum samskiptum við líkamsstarfsemina. Örveruflóran er nauðsynleg til lífsafkomu og því er mikilvægt að ónæmiskerfið veiti henni líka vörn til að samlífi þar á milli geti átt sér stað (41).

1.3.3.1 IgA flutningur

En hvernig kemst IgA inn í holrými öndunar- og meltingarveggar úr blóði til að sinna sínu hlutverki þar, þ.e. að verja slímhúðir? IgA seytandi plasmafrumur í eiginþynnu (e. lamina propria) slímhúðar mynda og seyta tvíliðu IgA tengda með J keðju. Flutningur þess gegnum seytandi þekjufrumur er af sérstakri gerð og undir góðri stjórn. Á grunnhimnuhlíð (e. basolateral) þessara frumna er sérstakur viðtaki sem er einungis þar, svokallaður fjölliðu-Ig viðtaka (e. polymeric immunoglobulin receptor/pIgR). Hann hefur mikla sækni í J keðju sem tengir saman fjölliðu mótefni og flytjur það mótefni úr millifrumuvökvanum yfir í seytunarvökvann. Hann getur því einnig bundist og flutt IgM, því það myndar fjölliðu, en gerir það þó ekki eins skilvirkt. Þegar komið er á yfirborð þekjufrumunnar holmegin losnar IgA frá utanfrumuhluta pIgR með próteólítísku rofi á utanfrumuhluta pIgR. Hluti viðtakans er enn fastur á mótefninu og kallast seytunar hluti. Þetta mótefni sem hefur ferðast yfir þekjufrumuna kallast nú seytt-IgA (sIgA) og binst mótefnavökum í holrúmum og hlutleysir þau og sér til þess að þeim sé hent út (34, 49).

1.3.3.2 IgA í sermi

IgA í sermi er helst á einliðu formi og af IgA1 gerð (43). Þrátt fyrir miklar rannsóknir er hlutverk þess í sermi enn frekar óljóst. Fasta svæði IgA í sermi binst mismunandi viðtökum á mismunandi frumum ónæmiskerfisins (41). Má þar m.a. nefna Fc- α -RI (CD89), en þegar hann binst IgA sem húðar sýkil

kallar það á öflug viðbrögð ónæmiskerfisins, svo sem át og losun frumuboðefna til að eyða sýklinum (47).

1.3.3.3 IgA í slímhúðum og seyttum vökvum

IgA er það mótefni sem er helst tengt ónæmiskerfi slímhúða. Í slímhúðum og seyttum vökvum þaðan er slgA langoftast sem tvíliða en hlutfall undirflokkana IgA1 og IgA2 er mismunandi eftir því hvaða slímhúð mótefnið þekur (48). Mótefnavaki þarf að vera fluttur úr holrými meltingavegarins og inn í eitilvefinn MALT til að valda mótefnasvari. Þetta gerist með M frumum, sérstökum þekjufrumum sem einungis má finna í þekjulagi yfir MALT. Þær hafa þætti sem leyfir þeim að flytja mótefnavaka hratt og örugglega yfir þekjulagið. Einnig hafa þær viðtaka á holhlið (e. apical) sinni sem flytja sértækt slgA og komplexa af mótefninu bundið við mótefnavaka. Þetta ferli örvar og viðheldur slímhúðarónæmi (50). Hlutverk slgA í slímhúðum er margþætt. slgA vinnur bug á sýklum án þess að valda bólguviðbragði, vegna vanhæfni við að virkja komplement kerfið. Einnig veldur það viðloðun örveruflóru við slímhúð í þörmum en hindra ferð þeirra í undirliggjandi þekjufrumum. Það minnkar einnig tjáningu bólguörvandi mótefnavaka frá þarmaflóru. Ásamt þessu hlutleysir það ýmsar sameindir frá örverum sem valda bólguviðbrögðum, svo sem LPS, og myndar þekju yfir þekjufrumulaginu sem örvar vöxt þarmaflóru en hindrar sýkla (41).

1.3.4 Sjálfsmótefni

Eitt mikilvægasta ferlið sem eitilfrumur fara í gegnum í þroskun er neikvætt val, þar sem frumum sem bregðast við sjálfinu er eytt. Ef ekki tekst að mynda þol gegn sjálfinu myndast frumur sem þekkja sjálfíð og mynda mótefni gegn því sem kallast sjálfsmótefni. Ferlið sem frumur nota til að komast framhjá neikvæða valinu er enn óþekktur. Þessi mótefni beinast að mismunandi þáttum sjálfsins, m.a. erfðaefni, próteinum í kjarna, hvatberapróteinum, sameindum á frumuhimnu o.fl. Sjálfsmótefni má finna í sermi sjálfsöfnæmissjúklinga en þó einnig í öðrum sjúkdómum og jafnvel heilbrigðum einstaklingum (51). Nota má sjálfsmótefni til greiningar sjúkdóma og sem merki um framrás og virkni þeirra. Í ákveðnum líffæra sérhæfðum sjálfsöfnæmissjúkdómum má greina sjálfsmótefni í blóði nokkrum árum áður en klínísk einkenni koma fram (52).

Nýverið hefur verið þróað módel fyrir sjálfsprottna (e. spontant) mótefnaframleiðslu út frá sjálfsmótefnaframleiðslu. Hún byggist á uppgötvun framleiðslu sjálfsmótefnisins ACPA (e. anticitrullinated protein antibodies) í floti frá ræktuðum einangruðum einkjarna frumum gigtsjúklinga. Sjálfsprottin framleiðsla felur í sér að hún gerist án örvunar utan líkama. Einnig mældist mótefnaframleiðsla í floti á örvuðum einangruðum B frumum gigtsjúklinga (53).

1.3.5 Áhrif IL10 á mótefnaframleiðslu

Frumuboðefni (e. cytokine) eru lítil prótein sem hafa sértæk áhrif á samskipti og tengsl frumna. Dæmi um frumuboðefni eru interferón, interleukin o.fl (54). IL10 er frumuboðefni með mjög fjölbreytta virkni. Það er myndað af einkyrningum (e. monocyte) og gleypifrumum (e. macrophage), angafrumum, B frumum og ýmsum undirgerðum T frumna (55). Það hamlar bólgusvörun, m.a. með því að bæla virkni T frumna, einkyrninga og gleypifrumna. En einnig eykur það lifun og fjölgun B frumna í mönnum sem hafa verið virkjaðar m.a. með CD40 krosstengingu. Þessi áhrif aukast með samvirkni frá IL2 og IL4.

Örvun með IL10 og öðrum boðefnum örvar einnig sérhæfingu B frumna. Þessar uppgötvanir eru spennandi í klínískum tilgangi a.m.k. að tvennu leyti. Í fyrsta lagi gæti IL10 á lyfjaformi örvað mótefnamyndun og flokkabreytingu í sjúklingum sem þjást af mótefnaskorti. Í öðru lagi gætu hindrar (e. antagonists) þess verið hjálplegir í meðferð gegn sjálfsöfnæmissjúkdómum sem eru miðlað af mótefnum, s.s. SLE (56).

1.4 Gallar í mótefnasvari

Í ferlinu sem leiðir til mótefnasvars er margt sem getur farið úrskeiðis, eins og búast má við út frá flóknu ferli sem liggur þar að baki. Algengasta birtingarmynd sértæks ónæmisskorts (e. primary immunodeficiency) er einmitt mótefnaskortur. Rannsóknir síðustu ára á sértækum ónæmisskort og undirflokkum hans hefur gefið betri innsýn í þroskunar- og sérhæfingarferli B frumna og því sem getur farið úrskeiðis þar (4).

1.4.1 IgA skortur

IgA skortur (e. IgA deficiency, IgAD) er algengasti mótefnaskortur líkamans. Sértækur IgA skortur (e. selective IgA deficiency) er skilgreindur sem IgA magn í sermi undir 0.07 g/L með eðlilegt magn IgG og IgM í sermi í sjúklingi eldri en 4 ára, þar sem aðrar ástæður mótefnaskorts hafa verið útilokaðar. IgA skortur getur einnig verið að hluta (e. partial IgA deficiency) en þá er IgA magn hærra en 0.07 g/L en 2 staðalfrávikum undir eðlilegu gildi m.v. aldur. Þessir einstaklingar greinast oft fyrir tilviljun og eru án einkenna. En skortinum fylgja þó auknar líkur á endurteknum sýkingum, ofnæmisviðbrögðum og sjálfsöfnæmissjúkdómum og það undirstrikar klínískt mikilvægi þess að skilja betur orsakir sjúkdómsins og þessa alvarlegu fylgikvilla hans (45).

1.4.1.1 Greining

Greining á IgAD er einungis gerð með mælingum á IgA magni í sermi. IgA magn í seyttum vökvum er ekki notað (45).

1.4.1.2 Faraldsfræði

Algengi á heimsvísu er mjög misjafnt eftir kynþætti og þjóðarbroti, hæst algengi í hvítu fólki en lægst í fólki af asískum uppruna. Þennan mun má að einhverju leyti útskýra með mismunandi skilgreiningum á IgAD en þó útilokar það ekki muninn sem sést milli þjóðarbrota. Einnig gæti algengið í raun verið hærra en tölur benda til því algengi er metið út frá blóðsýnum og margir IgAD sjúklingar eru einkennalausir og engin regluleg skimun er í boði (45). Algengi í íslenskum blóðgjöfum er talið vera um 1:600 (57).

1.4.1.3 Orsakir og genþættir

Þrátt fyrir miklar rannsóknir er orsök sjúkdómsins enn ekki fulljós. Rannsóknir hafa þó sýnt að einhver tengsl eru við beinmerg þar sem beinmergsgjöf úr IgAD einstakling veldur IgAD í þega. Oftast finnast tengsl við galla í B frumu þroskun, sem veldur skertri IgA myndun. Tengsl við innanfrumu B frumu galla, T hjálparfrumu vanvirkni, bælingu á T frumum eða skortur á ýmsum frumuboðefnum hafa einnig verið skilgreind (45).

Genapátturinn á bakvið IgAD er enn illa skilgreindur. Oft sjást stök tilfelli en einnig fjölskyldutengsl án mendelísk mynsturs. Magn tilfella í fjölskyldum, mismunandi algengi milli þjóðarbrotá og erfðamynstur benda þó sterklega til tilhneigingu á að fá IgAD út af genapætti (58). Sýnt hefur verið fram á stökkbreytingar í himnubundnum virkjurum, kalsíum-miðlurum og ýmsum bindlum bæði í tengslum við IgA skort og CVID (e. common variable immune deficiency). Óljóst er um orsakapátt þessara stökkbreytinga en þessar vísbendingar, ásamt því að IgA skortur getur í sumum tilfellum þróast yfir í CVID, styður þá kenningu að IgA skortur og CVID hafi sameiginlegan orsakavald. Þessi breytileiki í erfðamynstri IgA skorts og breytileiki milli einstakra tilfella gefur til kynna að genaorsök IgA skorts er líklega sundurleitur hópur genaafbrigðileika og betri skilningur á myndun og virkni IgA er nauðsynleg til að fullútskýra sjúkdóminn (45).

1.4.1.4 Einkenni

IgAD einstaklingar eru oft án einkenna. Þetta hefur valdið miklum vangaveltum um mikilvægi IgA í vörnum líkamans. Þetta má þó útskýra með öðrum varnarkerfum ónæmiskerfisins. T.d. hefur seytt IgM svipaða eiginleika, útlit og virkni og IgA. Þau hafa jafnan fjölda svæða á fasta hluta þungu keðju, hafa bæði J keðju og mynda fjölliður og það sem meira er að þau bindast bæði pIGR á neðra borði þekjufruma slímhúðar. Þannig getur IgM bætt upp fyrir IgA skortinn að einhverju leyti (45).

Þrátt fyrir þetta er IgAD ekki eitthvað sem á að taka sem léttvægum hlut því fylgikvillar hans hafa alvarlegar klínískar afleiðingar og valda því að þessir sjúklingar lifa við verri lífsgæði og verri lífslíkur í þeim tilfellum þar sem langvinnir sjúkdómar fylgja skortinum. Helsta einkenni IgAD eru endurteknar sýkingar. Oftast bakteríusýkingar tengdar öndunarvegum en einnig í meltingarveginum, þ.e. á þeim stöðum þar sem slímhúð er ríkjandi (45). Þar sem IgM er í meira magni í meltingarvegi getur það bætt upp fyrir IgA skortinn þar og því eru sýkingar þar ekki eins algengar og í öndunarvegi (59).

Sterk tengsl eru milli IgA skorts og ofnæmistengdra sjúkdóma. Rannsóknir ber þó ekki saman um algengi þess, m.a. vegna mismunandi skilgreininga á skortinum og ofnæmi (45).

1.4.1.5 Tengsl við sjálfsöfnæmissjúkdóma

Aukið algengi sjálfsöfnæmissjúkdóma hefur verið tengt við IgAD, allt frá 7-36% í sjúklingum með einkenni. Tengslin eru sérstaklega sterk við kerfisbundna sjálfsöfnæmissjúkdóma, t.d. gigt og rauða úlfa. Líffæra sértækir sjálfsöfnæmissjúkdómar, t.d. sykursýki I, sóri (e. psoriasis) o.fl. hafa þó einnig verið tengdir við IgAD. Rannsóknir benda einnig til aukins algengis sjálfsmótefna í IgAD einstaklingum, hvort sem þeir eru greindir með sjálfsöfnæmissjúkdóm eða ekki. Í flestum tilfellum eru þetta sjálfsmótefni tengd kerfisbundnum sjúkdómum. Einnig má snúa dæminu við, þ.e. IgAD er einnig algengari í fólki með sjálfsmótefni í blóði (57). Vert er að nefna að IgAD sjúklingar geta þróað með sér and-IgA sjálfsmótefni sem þarf að hafa í huga við blóðgjöf. Ef þessir einstaklingar fá blóð sem inniheldur IgA geta komið fram týpu I bráðaofnæmisviðbrögð. Það væri því mikilvægt að skima fyrir IgE mótefnum gegn IgA ef gefa þarf IgAD sjúkling blóð en það er þó ekki gert. Í staðinn má mæla IgG and-IgA mótefni (45).

Einnig eru martækt aukin áhætta á sjálfsöfnæmissjúkdómum hjá 1^oættinga IgAD einstaklinga m.v. almennt þýði. Rannsóknir hafa sýnt fram á allt að 62.5% algengi sjálfsöfnæmissjúkdóma hjá

1°ættingum IgAD einstaklings ef hann er einnig með sjálfsöfnæmissjúkdóm (57). Helstu sjálfsöfnæmissjúkdómar sem greindust hjá hópi IgAD einstaklinga og ættingjum þeirra samkvæmt rannsókn frá 2009 má sjá í töflu II.

Tafla II: Tafla úr Jorgensen GH og fl. 2009. (57).

Autoimmunity	IgAD (no.)	1° relatives (no.)
Organ specific	6	14
Primary hypothyroidism	1	8
Hyperthyroidism (Graves)		2
DM type 1		2
MS		2
ITP	1	
Pernicious anemia	1	
Pemphigus	1	
Steven Johnson syndrome (multiple and of unknown cause)	1	
Interstitial cystitis	1	
Systemic	6	17
RA	2	5
Psoriasis	2	4
SLE		4
Polymyalgia rheumatica	1	1
Sarcoidosis	1	
Reiter's syndrome		1
Sjögren's syndrome		1
Ankylosing spondyloarthritis		1
In total	X = 8^a	X = 27^b

1.4.1.6 Meðferð

Ef einstaklingur upplifir engin einkenni felst meðferðin helst í fræðslu og að vera meðvitaður um ástand sitt. Þá sérstaklega þegar kemur að blóðgjöf, að skima sérstaklega fyrir and-IgA mótefnum ef blóðþegi er með IgA skort, til að koma í veg fyrir möguleg bráðaöfnæmisviðbrögð. Annars snýst meðferð um að meðhöndla einkenni, t.d. fyrirbyggjandi sýklalyf gegn endurteknum sýkingum. Ef skortingum fylgja öfnæmi eða sjálfsöfnæmissjúkdómar, þá er það meðhöndlað sérstaklega (45).

..

2 Markmið

Á undanförunum árum hafa verið gerðar ítarlegar rannsóknir á ferlum sem leiða til mótefnasvars. Í þessari rannsókn, sem er hluti af stærri rannsókn sem fjallar um IgA skort á Íslandi, verður leitast við að skilja betur ferli sem leiðir til langlífrar mótefnaseytunar B frumna með IgA skorts einstaklinga í huga sem náttúrulegt úrfellingarmódel. Markmið rannsóknar sem hér um ræðir eru þrjúþætt:

1. Að skoða mótefnaseytun B frumna í rækt með einangruðum einkjarna frumum. Athugað verður hvort B frumur skorts einstaklinga geti hafið sjálfsprottna IgA framleiðslu og hvernig sú framleiðsla þróast með tíma.
2. Athuga svipgerð frumna IgA skorts gjafa, hvort hún sé frábrugðin svipgerð frumna heilbrigðra einstaklinga.
3. Áhrif IL10 örvunar á langlífi B frumna og mótefnaseytun þeirra.

Tilgangurinn er að skilja betur langlífa mótefnaseytun B fruma og í framhaldinu gera sér grein fyrir sérhæfðari skotmörkum í klínískum tilgangi gegn göllum í ferlinu sem leiðir til mótefnasvars.

3 Efni og aðferðir

3.1 Leyfi

Öll tilskilin leyfi lágu fyrir áður en rannsóknin hófst. Þau fengust frá Vísindasiðanefnd og Persónunefnd. Verkefnið eru hluti af rannsókn sem fjallar um IgA skort á Íslandi (e. Cohort of Icelandic IgAD individuals). Það verkefni er styrkt af Rannís.

3.2 Þátttakendur

Þátttakendur rannsóknarinnar eru einstaklingar sem eru í rannsókninni um IgA skort á Íslandi. Hingað til hafa 86 einstaklingar verið teknir inn í þá rannsókn með staðfesta IgA skorts greiningu og 138 heilbrigð viðmið. Einstaklingar komu inn í rannsóknina með þremur mismunandi leiðum. Sumir voru greindir í fyrri rannsókn Guðmundar Jörgensen á sértækum IgA skorti. Söfnun þeirra fór fram gegnum gagnagrunna Landspítala og Blóðbankans. Í öðru lagi voru þátttakendur fengnir í gegnum gagnagrunn deCode genetics. Að lokum voru einstaklingar greindir með því að skima 1^ográðu ættingja einstaklinga með IgAD. Í þessari rannsókn gafst tími til að gera ELISA mælingu á flotum úr ræktum 12 IgAD gjafa og fimm heilbrigðra viðmiða.

3.3 Einangrun einkjarna frumna

Til að skoða mótefnaframleiðslu B frumnanna án áhrifa annarra efna í sermi voru einkjarna frumur (e. peripheral blood mononuclear cell) einangraðar með Ficoll-Hypaque aðferðinni. Samhliða einangrun einkjarna frumna var sermi einangrað til að eiga fyrir frekari tilraunir seinna meir.

Unnið var í sterílu umhverfi í frumufælði húddi (e.laminar flow hood). Fyrst var sermi einangrað. Blóðsýnið var spunnið niður við 2500 rpm (e.revolutions per minute) í 10 mínútur. Sermi var síðan tekið með sterilli pípettu og sett í fyrirfram merkt frystiglös og sett í -80°C eins fljótt og hægt var. Það blóð sem eftir var var þynnt 1:2 með PBS (15 mL blóð á móti 15 mL PBS). Þessari þynningu var síðan hellt ofurhægt á 15 mL af Histopaque lausn (Sigma, 1077). Því næst var spunnið við 1600 rpm í 30 mínútur án bremsu. Lagi með einkjarna frumum var safnað með einnota pípettu. Þær voru síðan þvegnar í 30 mL PBS í 10 mínútur við 1400 rpm. Að því loknu var floti hellt af. 10 µL af frumum voru teknir og blandað við 10 µL af Trypan blue solution, 0.4% (Sigma, T8154). 10 µL af þessari blöndu voru sett á gler (Countess, Cell counting chamber slides, Invitrogen) og í frumutalningartæki (Countess, automated cell counter, Invitrogen). Rest af frumunum voru þvegin aftur, í þetta sinn í 20 mL af PBS í 5 mínútur við 1300 rpm. Að því loknu var floti hellt af og frumurnar síðan leystar upp í því magni af æti (IMDM (+L-Glutamine,+25mM HEPES, Gibco, 21980-032) með 10% FCS (Gibco-Invitrogen, 10270-106) +pen/strep (Gibco-Invitrogen, 15140-122)) sem gerði frumufjölda að 15 milljón/mL (reiknað út frá útkomu úr frumutalningu).

3.4 Ræktun

3 milljónir frumna, af ofangreindum frumum, voru þá settar í nýtt glas og spunnar niður fyrir rækt. Floti hellt af og frumur leystar upp í því magni af æti (IMDM með 10% FCS +pen/strep) sem gerði magn þeirra að 1 milljón/mL. Þessar frumur voru svo settar í rækt, 200 µL settir í um 15 brunna á 96 brunna

plötu með ívölum botni, og geymt í hitaskáp. Fimm brunnar af þeim voru örvaðir með 10 ng/mL (RND systems, 217-IL-005) og aðrir fimm með 100 ng/mL af IL10 (RND systems, 217-IL-005). Í sumum tilfellum var ekki örvað með IL10 og þá innihéldu allir 15 brunnarnir óörvaðar frumur.

Vikulega var floti safnað af frumunum til að fá flot með mótefnum í sem seinna yrði gerð ELISA á. Plötur voru spunnar niður í um 10 mínútur. Flotinu var safnað af frumunum við sterílt umhverfi og sett í nýja bakka og í frysti við -20°C. Að lokum var 200 µL af nýju æti sett á frumurnar aftur og plötunni komið fyrir inn í hitaskáp.

3.5 ELISA

Gerð var ELISA til að meta mótefnamagn í flotum 12 IgAD einstaklinga og fimm heilbrigðra (N=17). Hún var framkvæmd blindandi, þ.e. rannsakandi vissi ekki hvort um væri að ræða heilbrigða eða IgAD einstakling. Þetta var gert á fjóra mismunandi tímamörum, eftir eina, tvær, þrjár og fimm vikur í rækt. Fyrir tvo IgAD einstaklinga og eitt heilbrigt viðmið voru ekki til flot frá fimmtu viku. Einnig voru skoðuð áhrif mismunandi örvana með IL10. Það vantaði þó mælingar fyrir mismunandi örvanir fyrir fjóra IgAD einstaklinga og fyrir eitt heilbrigt viðmið. Til viðmiðunar var einnig gerð ELISA á sermi nokkurra einstaklinga.

Framkvæmd var stöðluð samloku ELISA eftir leiðbeiningum frá Bethyl laboratories. 96 brunna plata (Nunc maxisorp plates, Denmark) var húðuð með húðunardúa (e. coating buffer) sem innihélt viðeigandi and-manna mótefni í styrknum 10 µg/mL (sjá viðauka fyrir innihald). Fyrir IgA ELISA var α-h IgA Fc (Bethyl Laboratories reagentia, A80-102), IgG var α-h IgG Fc (Bethyl Laboratories reagentia, A80-104) og fyrir IgM var α-h IgM Fc (Bethyl Laboratories reagentia, A80-100). 50 µL af húðunardúa með mótefni sett í hvern brunn plötunnar og láti standa í 1 klst við herbergishita. Að því loknu var 100 µL af PBT (sjá viðauka fyrir innihald) sett í hvern brunn og látið standa í 30 mínútur til að metta yfirborð brunnanna. Því næst var staðalsermi sett í tvo brunna, og raðþynnt 1:2 11 sinnum í PBTT (sjá viðauka fyrir innihald) frá upphafsstyrk sem var 1:15000 fyrir IgA, 1:5000 fyrir IgG og 1:2000 fyrir IgM. Lokarúmmál sýna var 50 µL. Alltaf voru brunnar til staðar sem innihéldu einungis PBTT, svokallaðir blankar, til að mæla bakgrunn. Flot í IgA ELISA voru óþynnt en fyrir IgG og IgM voru þynnt 1:2 í PBTT. Þynningar sermis voru í samræmi við þynningar staðalsermis. Hvert sermi var sett í tvö brunna og í tveimur þynningum, og þar með samtals var hvert sermi í fjórum brunna. Þynning IgA í sermi var 1:40000 og 1:160000, IgG var 1:500000 og 1:2500000 og IgM var 1:20000 og 1:40000. Sýni stóðu síðan í klukkustund við herbergishita áður en annarrar gráðu mótefni voru sett á. Þau voru and-manna mótefni með áföstu ensíminu HRP (horseradish peroxidase) (Bethyl Laboratories reagentia, A80-100P). Þynningar voru í samræmi við leiðbeiningar frá framleiðanda (α-IgA 1:50000 en α-IgG og α-IgM 1:20000). 50 µL af þessari blöndu sett í alla brunna og látið standa í klukkustund. Að því loknu var bindingin gerð sýnileg með 50 µL TMB (frá Thermo scientific), sem er hvarfefni ensímsins og veldur litabreytingu yfir í bláan lit. Til að stöðva hvarfið var 50 µL af 0.18 M H₂SO₄ bætt í alla brunna og þá verður litabreyting yfir í gulan lit. Ljósþéttni (e. optical density, OD) var mæld við 450 nm með ljósgleypnimæli (Thermo Electron Corporation. Original multitasken EX). Mótefnastyrkur í flotum/sermi sjúklinga var reiknaður út frá staðalkúrvu sem var gerð í Microsoft Excel út frá meðaltali af styrkjum

staðalsermanna. Þessi staðalkúrvu var sá ferill sem lýsti best breytingum á mótefnastyrk eftir ljóspéttni.

3.6 Svipgerðagreining frumna í frumflæðisjá

Frumur í blóði þriggja einstaklinga voru greindar út frá yfirborðssameindum í frumflæðisjá. Þessir þrjú einstaklingar höfðu allir mismunandi svipgerðir. Einn var heilbrigt viðmið, annar var IgAD gjafi þar sem einkjarna frumurnar byrjuðu að mynda IgA í rækt og sá síðasti var IgAD gjafi þar sem engin IgA framleiðsla var í rækt.

Frumur voru afþýddar í hitabaði. Þær voru síðan leystar varlega upp í æti (IMDM með 50% FCS + pen/strep) og spunnið niður í 10 mínútur á 1200 rpm. Þá var floti hellt af og frumurnar leystar upp í PBA (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA) að 30 M/mL. Frumur voru litaðar með mótefnablöndu (tafla III), ísótýpublöndu (tafla IV) eða hafðar ólitaðar og að því loknu stóðu þær í myrkri við 4°C í 20-30 mínútur. Því næst var 100 µL af PBA bætt í alla brunna og spunnið niður við 1200 rpm í 5-10 mínútur. Flotinu var þá hellt kröftulega af og þetta þvottaskref endurtekið nema nú með 200 µL PBA. Síðan voru frumur leystar upp í 200 µL af PBA og komið fyrir í litlum FACS glösum. Frumur voru geymdar yfir nótt í 0.5% PFA við myrkur og safnað daginn eftir. Söfnun fór fram í frumflæðisjá (Beckmar & Coulter Navios) sem var látin skoða 300.000 atburði. Gögnin voru svo greind í Kaluza analysis 1.3.

Tafla III: Mótefni sem litað var fyrir í frumflæðisjá.

Mótefni	Litur	Framleiðandi	Vörulistanr.	Styrkur (mg/mL)	µL per 100 µL
CD38	Pe efluor 610	ebio	61-0389-42	0.025	1
CD19	Percp cy5.5	ebio	45-0199-71	0.00625	2
CD24	Anti-Human CD24 PE-Cyanine7	ebio	25-0247-42	0.1	2
IgD	Alexa fluor 700	Ebio	348230	0.4	1
CD27	efluor 450	ebio	48-0279-42	0.025	1
CD3/CD14	Brilliant Violet 510	Biolegend	317332/ 301842	0.03/0.12	0.1/0.2
IgM	Anti-Human IgM FITC	Ebio	11-9998-42	0.025	2
IgG	Mouse Anti-Human IgG Fc-PE	southern biotech	9040-09	0.1	2
IgA	APC	milteny	130-093-113	NA	2

Tafla IV: Ísótýpu viðmið sem litað var fyrir í frumflæðisjá.

Ísótýpa	Litur	Framleiðandi	Vörulistanr.	Styrkur (mg/mL)	µL per 100 µL
Músa IgG1 k	Pe efluor 610	ebio	61-4714-80	0.2	0.125
Músa IgG1 k	Percp cy5.5	ebio	45-4714-82	0.2	0.0625
Músa IgG1	Anti-Human CD24 PE-Cyanine7	ebio	737662	NA	2
Músa IgG2b k	Alexa fluor 700	ebio	56-4732-80	0.2	2
Músa IgG1 k	efluor 450	ebio	48-4714-82	0.2	0.125
Músa IgG2a k	Brilliant Violet 510	Biolegend	400267	0.1	0.27
Músa IgG1k	Anti-Human IgM FITC	Ebio	53-4714-42	0.2	0.25
Músa IgG1	Mouse Anti-Human IgG Fc-PE	southern biotech	IC002P	NA	2
Músa IgG1	APC	Miltenyi	17-4714-73	NA	2

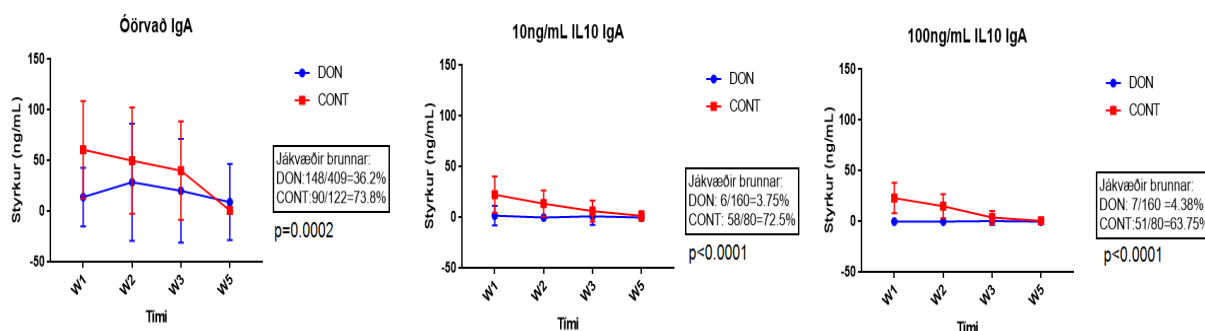
3.7 Tölvuvinna og tölfræðileg úrvinnsla.

Öll frumúrvinnsla gagna fór fram í Microsoft Office Excel. Myndagerð og tölfræðileg úrvinnsla fór fram í GraphPad Prism 7.00. Marktæknimörk á tölfræðiprófunum voru $p=0.05$.

4 Niðurstöður

4.1 Mótefnamagn í floti IgA skorts gjafa m.v. heilbrigða

Þegar borin er saman mótefnaframleiðsla úr flotum heilbrigðra viðmiða við IgAD einstaklinga var búist við meiri IgA framleiðslu hjá heilbrigðu viðmiðunum. Það reyndist vera raunin, og marktækt meiri IgA framleiðsla reyndist vera í flotum heilbrigðra heldur en frá IgAD gjöfum (mynd 3). Þetta átti bæði við við óörvað ástand og örvað.



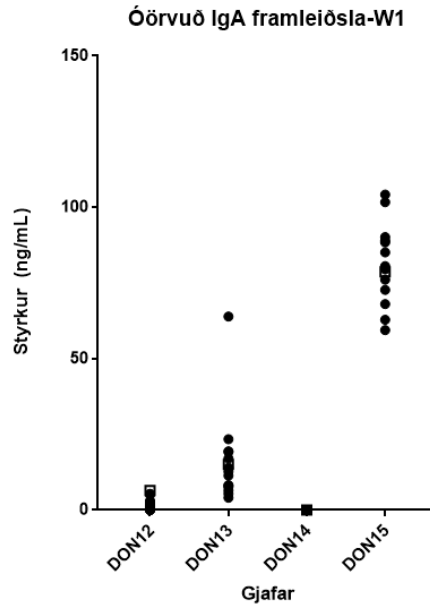
Mynd 3: IgA framleiðsla í flotum IgA skorts einstaklinga m.v. heilbrigða. Marktækur munur reyndist milli hópa.

4.2 Fylgni IgA styrks í sermi og floti

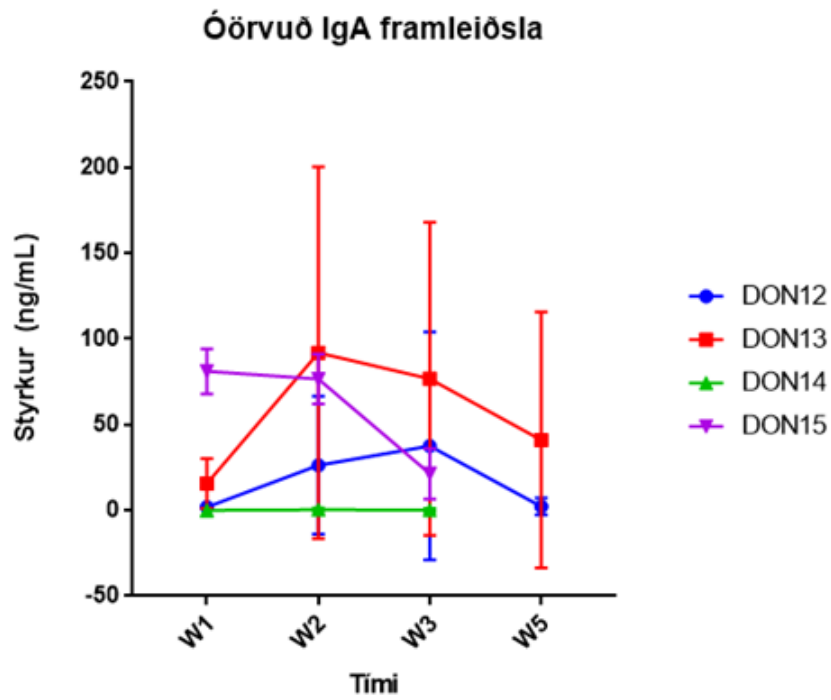
Fylgni milli IgA styrks í sermi og floti var skoðuð. Einungis voru til mælingar í sermi fyrir fimm einstaklinga þar sem ELISA var einnig gerð á flotum einangraðra einkjarna fruma. Það var ekki marktæk fylgni milli styrks í blóði og í flotum á neinum tímamarki. Þó var P-gildið <math><0.1</math> á viku eitt sem gæti gefið vísbendingar um ákveðið mynstur, þ.e. því hærri IgA styrkur í sermi því meiri IgA framleiðsla í rækt. Þetta átti ekki við um hina tímamarkana (viku tvö og þrjú). Fyrir viku 5 voru einungis til mótefnamælingar úr flotum fyrir tvo einstaklinga og því ekki hægt að gera tölfræðipróf á því.

4.3 Einstaklingsbundin framleiðsla

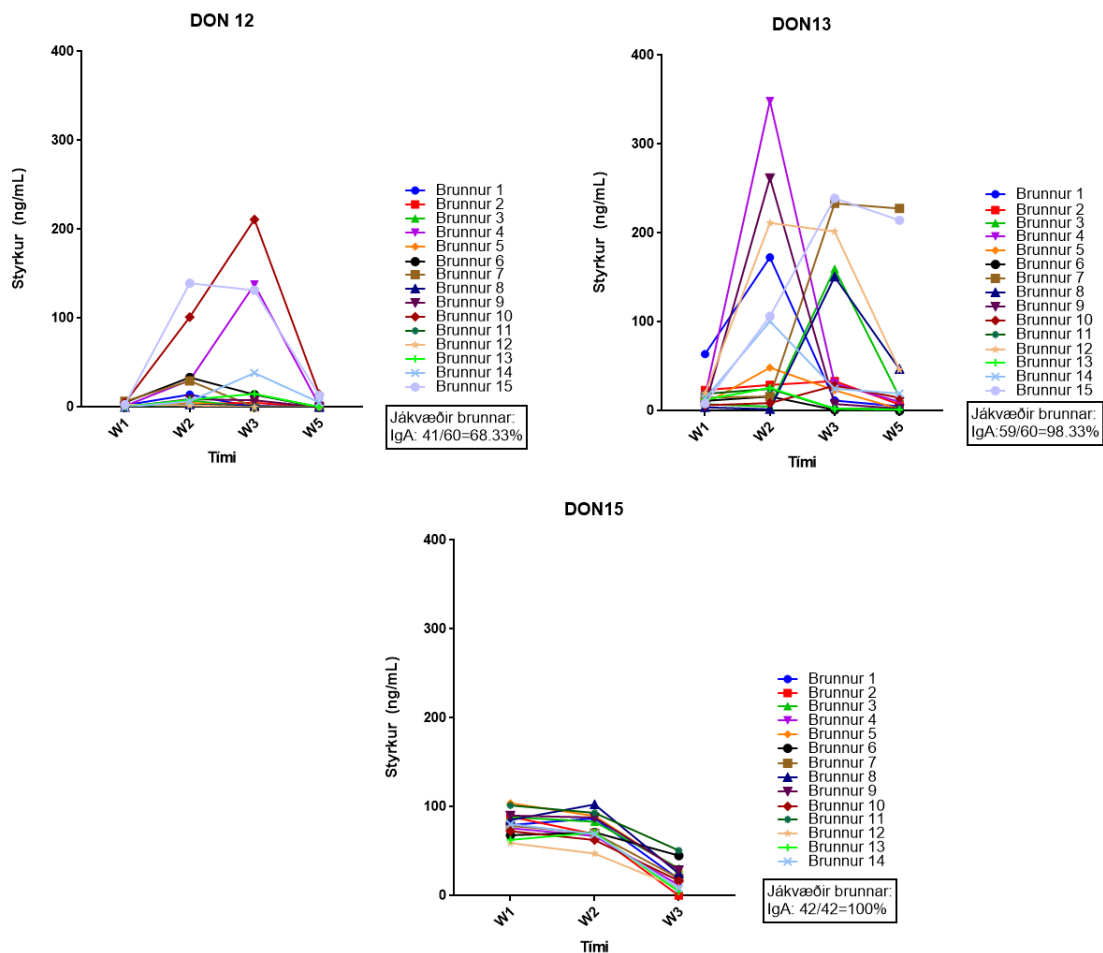
Helstu niðurstöður rannsóknarinnar benda þó til að mótefnaframleiðsla í rækt sé einstaklingsbundin. Þrír af 12 IgAD einstaklingum sýndu sjálfsprottna IgA framleiðslu í óörvaðri rækt (framleiðsla í ≥ 5 brunnum). Hjá þessum þremur einstaklingum var hlutfall jákvæðra brunna 88% (142 jákvæðir brunnar af samtals 162 brunnum). Framleiðslan var mjög mismunandi milli einstaklinga, eins og myndirnar hér að neðan (myndir 4,5,6) sýna. Þar sést betur framleiðslumynstur IgAD einstaklinganna sem framleiddu IgA í rækt.



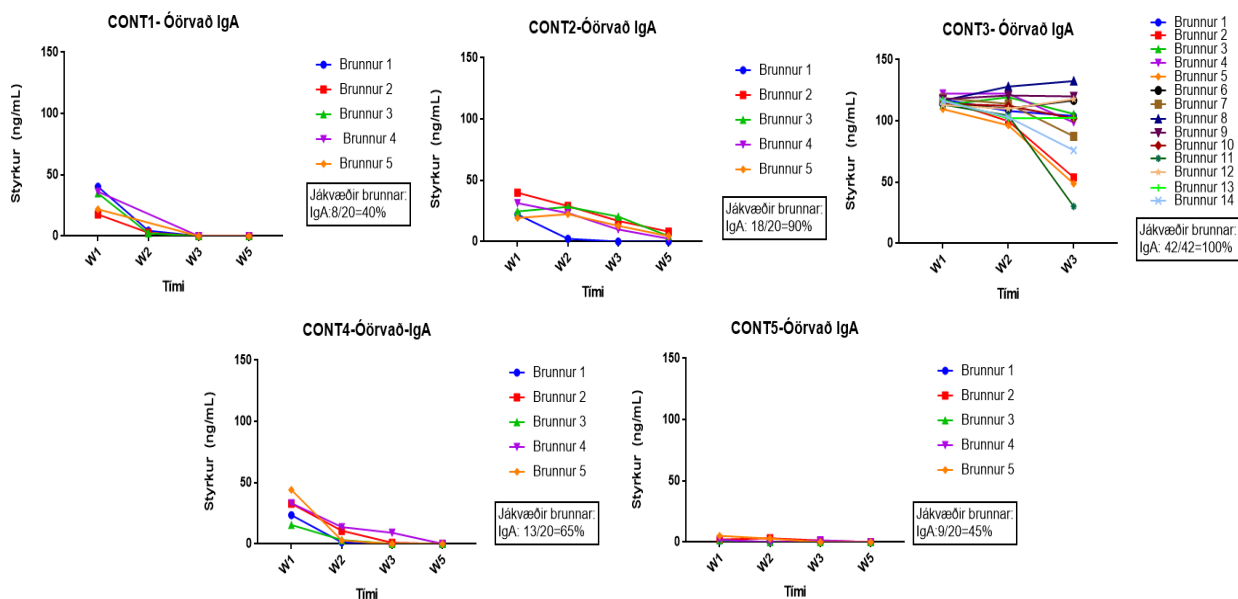
Mynd 4: IgA framleiðsla B frumna IgAD einstaklinga í rækt á fyrstu viku. Myndin sýnir þá þrjá einstaklinga sem sýndu framleiðslu ásamt einum sem framleiddi ekki. Hver punktur tákna einn brunn og fyrir hvern einstakling voru 15 brunnar.



Mynd 5: IgA framleiðsla B frumna í rækt á fjórum mismunandi tímamögnum hjá þeim þremur IgAD einstaklingum sem sýndu framleiðslu ásamt einum sem framleiddi ekki. Hver punktur tákna meðaltal framleiðslu 15 brunna.



Mynd 6: Nánari skoðun á IgA framleiðslu hjá *B* frumum í rækt hjá þeim þremur IgAD einstaklingum sem sýndu IgA framleiðslu í rækt. Hver lína sýnir framleiðslu ákveðins brunnar á þremur/fjórum tímapiptum.



Mynd 7: Yfirlitsmynd yfir IgA framleiðslu *B* frumna í rækt hjá heilbrigðum viðmiðum á mismunandi tímapiptum. Hver lína sýnir framleiðslu ákveðins brunnar á fjórum tímapiptum.

4.4 Svipgerð eítílfrumna

Frumuflæðisjain var látin skoða 300.000 atburði í sýnaglasinu og þar af reyndust vera 30-90.000 eítílfrumur (skilgreindar á fram- og hliðardreifingu (e. forward- and side scatter)). Skilgreiningar á einkennandi yfirborðssameindum fyrir mismunandi hópa eítílfruma má sjá á töflu V.

Tafla V: Yfirborðssameindir sem voru notaðir til að skilgreina B frumur. Skilgreining fyrir B frumur á við um alla hópa sem skoðaðir voru.

Frumur	Yfirborðssameindir
B frumur	CD19 ⁺ CD3 ⁻ CD14 ⁻
Óproskaðar B frumur	CD27 ⁺ IgD ⁺
Umskipta B frumur	CD24 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺
Óflokkabreyttar minnisfrumur	CD27 ⁺ IgD ⁺
Flokkabreyttar minnisfrumur	CD27 ⁺ IgD ⁻
IgG minnisfrumur	CD27 ⁺ IgG ⁺
IgA minnisfrumur	CD27 ⁺ IgA ⁺
IgG plasmafrumur	CD38 ⁺ IgG ⁺
IgA plasmafrumur	CD38 ⁺ IgA ⁺

Helstu niðurstöður svipgerðagreiningu eítílfrumna má sjá í töflu VI hér að neðan.

Tafla VI: Helstu niðurstöður um svipgerð eítílfrumna þriggja einstaklinga rannsóknarinnar. (HC=healthy control, High IgAD=IgAD einstaklingur sem sýndi IgA framleiðslu í rækt, Low IgAD=IgAD einstaklingur sem sýndi ekki IgA framleiðslu í rækt).

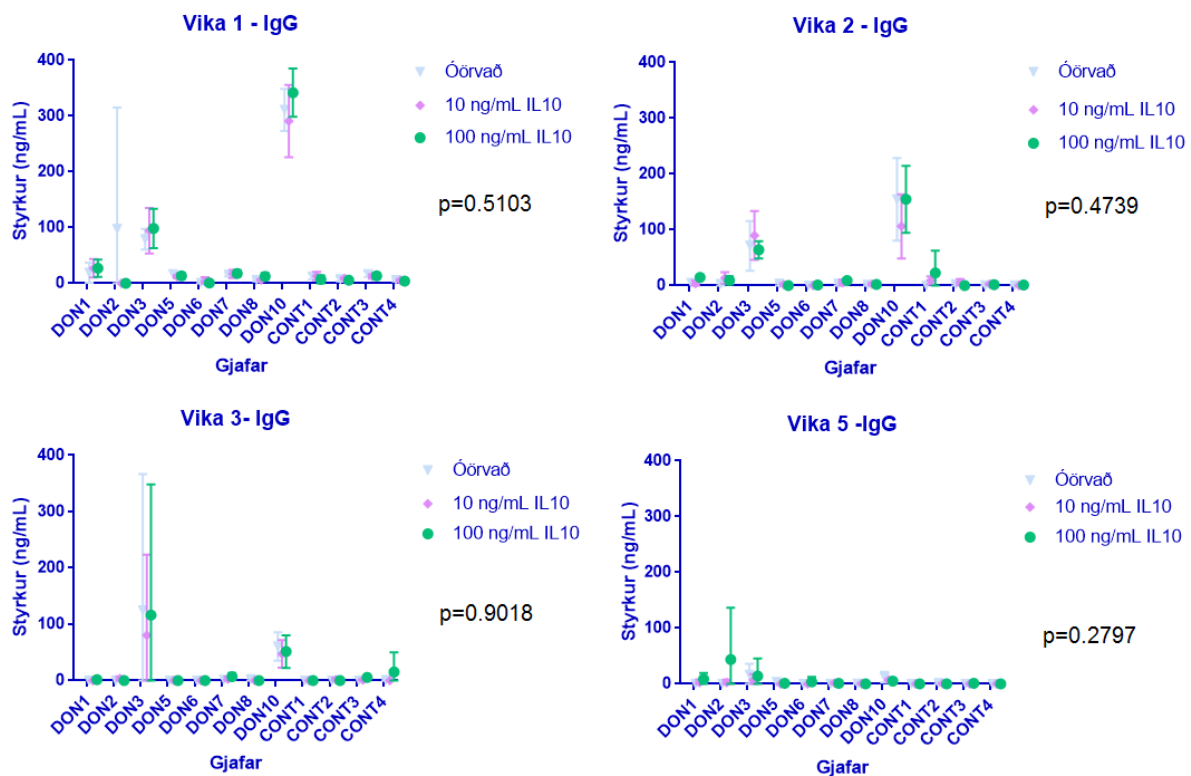
Einstaklingur	HC	High IgAD	Low IgAD
B frumur (% af eítílfrumum)	7,17	3,15	7,6
Óproskaðar B frumur (% af B frumum)	78,95	61,02	79,34
Umskipta B frumur (% af B frumum)	6,63	0,83	1,61
Óflokkabreyttar minnisfrumur (% af B frumum)	8,91	6,35	5,78
Flokkabreyttar minnisfrumur (% af B frumum)	6,16	9,46	9,14
IgG minnisfrumur (% af B frumum)	5,18	8,3	9,6
IgA minnisfrumur (% af B frumum)	4,29	1,81	0
IgG plasmafrumur (% af B frumum)	0,23	0,11	0,24
IgA plasmafrumur (% af B frumum)	0,65	0,11	0

Helstu þættir sem er vert að skoða í töflu VI er lækkað magn umskipta B frumna í IgAD einstaklingum m.v. heilbrigt viðmið (0.83% og 1.61% á móti 6.63%). Einnig að IgAD einstaklingur sem ekki sýndi IgA framleiðslu í rækt hann hefur hvorki IgA plasma- né minnisfrumur. Af B frumum IgAD einstaklingur

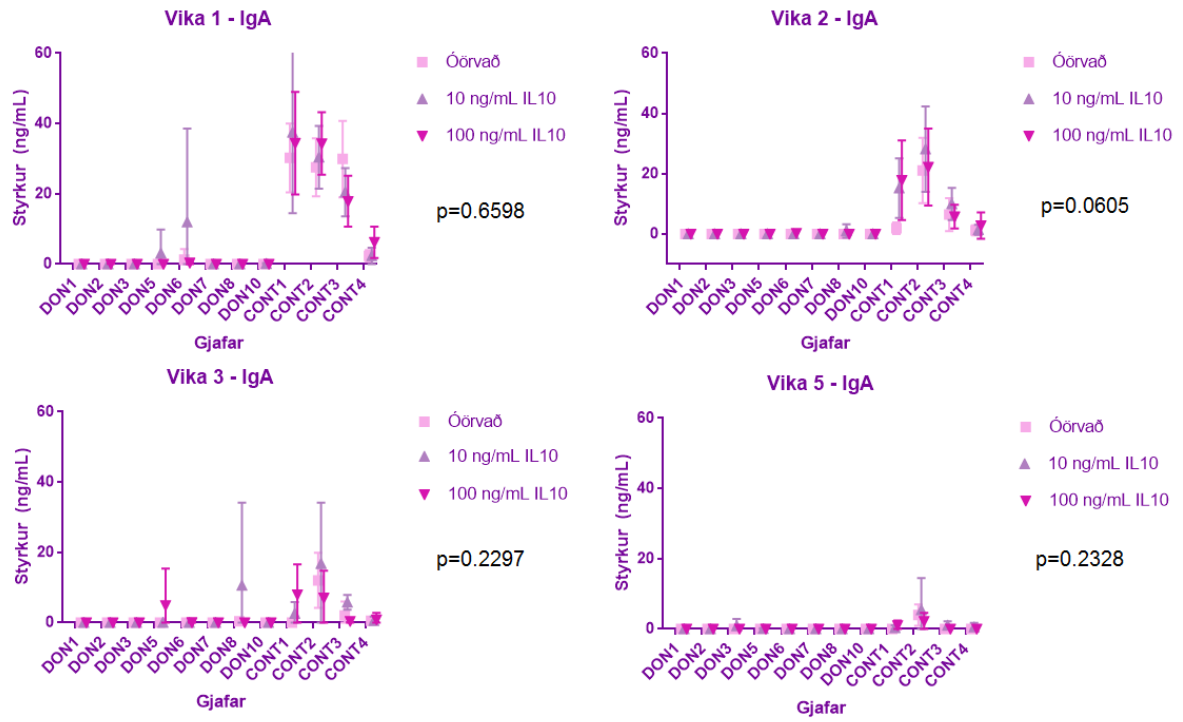
sem fór að mynda IgA í rækt, en hafði ekkert IgA í sermi, eru 1.81 % IgA minnisfrumur og 0.11% IgA plasmafrumur. Samanborið við heilbrigt viðmið þar sem af B frumum eru 4.29% IgA minnisfrumur og 0.65% IgA plasmafrumur. Þessari niðurstöður hafa ekki nægan fjölda á bakvið sig til að vera tölfærðilega marktækar en eru gefa þó ákveðnar vísbendingar, t.d. fækkun umskipta-B frumna sem mögulegur þáttur í orsök IgAD.

4.5 Mismunandi örvanir

Athugað var hvort IgA framleiðsla myndi aukast með örvun með frumuboðefninu IL10. Niðurstöður rannsóknarinnar voru að örvanir með IL10 hafði ekki marktæk áhrif á mótefnaframleiðslu B frumna, hvort sem var í styrknum 10 ng/mL eða 100 ng/mL. Þessar niðurstöður eiga bæði við IgG og IgA og á öllum tímupunktum sem skoðaðir voru. Ef engin framleiðsla var við óörvað ástand þá náði IL10 örvun ekki að hefja framleiðslu og ef mótefnaframleiðsla var til staðar við óörvað ástand þá jók IL10 örvunin hana ekki (myndir 8 og 9).



Mynd 8: Myndin sýnir IgG framleiðslu þáttakenda með mismunandi örvunum og á mismunandi tímupunktum. P gildi fyrir áhrif örvana má sjá fyrir hvern tímupunkt á viðeigandi mynd.



Mynd 9: Myndin sýnir IgA framleiðslu þáttakenda með mismunandi örvinum og á mismunandi tímarpunktum. P gildi fyrir áhrif örvana má sjá fyrir hvern tímarpunkt á viðeigandi mynd.

5 Umræða

Helstu niðurstöður benda til einstaklingsbundinnar mótefnaframleiðslu IgAD gjafa sem er í samræmi við þá staðreynd að IgAD er fjölgena sjúkdómur og orsakir hans breytilegar milli einstaklinga (45).

Munur á IgA framleiðslu hjá IgAD gjöfum og heilbrigðum sýndi marktækan mun eins og búist var við. Þó minnkaði munurinn með tíma, en það má rekja til að mótefnaframleiðsla í flotum virtist almennt fara minnkandi með tíma og þá nálgast framleiðsla heilbrigðra alltaf meir og meir skorts einstaklinga.

Fylgni milli styrks IgA í sermi og meðaltal framleiðslu þess í rækt var skoðuð. Birt rannsókn þar sem skoðað var fylgni ACPA mótefna í sermi gigtsjúklinga og framleiðslu plasmafrumna í rækt sýndi marktæka fylgni, þ.e. því hærrí styrkur í sermi sjúklinga því meiri framleiðsla í flotum af ræktum einangraðra B fruma (53). Niðurstaða þessarar rannsóknar sýndu ekki marktæka fylgni milli mótefnastyrks í sermi og floti en þó hefði verið áhugavert að vera með fleiri mælingar til að skoða það nánar.

IgA framleiðsla í floti einangraðra einkjarna frumna var breytileg milli og innan einstaklinga. 25% IgAD einstaklinga sýndu óörvaða IgA framleiðslu í flotum af ræktuðum einangruðum einkjarna frumum (framleiðsla í ≥ 5 brunnum). Rannsóknir á sértækum ónæmisskortum hafa kennt okkur margt því líta má á einstaklinga sem þjást af þessum sjúkdómum sem einhverskonar náttúrulegt úrfellingar módel (60). IgAD gjafar sem módel fyrir langlífa mótefnaseytun var markmið rannsóknarinnar og má segja í ákveðnum brunnum hafi IgA framleiðslan verið gott módel fyrir langlífa mótefnaseytun. Brunnar milli og innan einstaklinga sýndu þó mjög mismunandi framleiðslumynstur (mynd 6). Breytileg framleiðsla milli brunna staðfestir að mismunandi frumur eru í hverju brunni sem hegða sér því mismunandi. Ef skoðað er t.d. gjafa 13 sést í sumum brunnum mest framleiðsla á viku tvö sem fellur strax niður á þriðju viku. Þar eru stuttlífir IgA seytandi plasmafrumur. Í brunnum þar sem IgA framleiðsla hélst jöfn út fimmtu viku eru til staðar langlífir IgA seytandi plasmafrumur, t.d. brunnur 15 hjá gjafa 13. Það er mögulegt að einhver hömlun sé til staðar í líkamanum sem er að valda því að þessar frumur geta ekki myndað IgA þar. Aðrir möguleikar væru að í þessum brunni er einmitt rétt umhverfi fyrir þær til að byrja að seyta IgA, þ.e. hinar einkjarna frumurnar eru að gefa B frumunum rétta örvun, eða jafnvel að í brunnum sé til staðar óþekktur mótefnavaki t.d. í ætinu, í plastinu á bakkanum, í serminu, sjálfsmótefnavakari frá öðrum frumum, sem veldur mótefnaframleiðslunni. Allt eru þetta hugleiðingar sem velta má fyrir sér en mikilvægt væri að skoða betur þær frumur sem seyta IgA í rækt m.t.t. erfðamengis þeirra og umhverfisins í brunnum sem gæti verið að valda þessari IgA seytun. Ef skoðað var flot heilbrigðu viðmiðanna mátti sjá IgA framleiðslu í öllum tilfellum en þó mismikla. Í öllum tilfellum sást mynstur þar sem IgA framleiðsla minnkaði eftir viku eitt en þó voru nokkrir brunnar hjá CONT3 sem sýndu jafna framleiðslu allt fram að viku þrjú (ekki voru til mælingar fyrir viku fimm hjá þeim einstakling) (mynd 7).

Spennandi niðurstöður fengust þegar svipgerðir frumna IgAD gjafa voru skoðaðar. Þó ber að taka fram að þær voru einungis gerðar á þremur einstaklingum og því ekki hægt að draga neinar tölfærðilegar marktækar niðurstöður. Heilbrigða viðmiðunarsýnið var með sambærilegt hlutfall B frumu hópa og aðrar rannsóknir benda til, fyrir utan að B frumu hlutfall og minnisfrumuhlutfall var í lægri

kantinum. IgAD gjafi sem ekki sýndi neina IgA framleiðslu, hvorki í sermi né flotum, hafði engar IgA myndandi frumur (hvorki plasma- né minnisfrumur) ásamt því að minnkað hlutfall var af nær öllum undirflokkum B frumna fyrir utan óþroskaðar B frumur m.v. aðrar rannsóknir (61). Svipgerð eitilfrumna IgAD gjafa sem hafði einkjarna frumur sem mynduðu IgA í langtíma rækt en ekki í sermi var svipuð hinum IgAD gjafanum nema að því leyti að hann hafði örlítið magn IgA minnis- og plasmafrumna. Þetta er vísbending um að þessi einstaklingur hafi frumur sem eru hæfar að mynda IgA en það sé eitthvað í umhverfi þeirra í líkamanum sem stoppar framleiðsluna. Það sem IgAD einstaklingarnir eiga sameiginlegt og samræmist við fyrri, óbirtar niðurstöður rannsóknarhópsins er fækkun umskipta-B frumna. Umskipta-B frumur seyta IL10 (62) sem er eitt af mörgum frumuboðefnum sem stjórna flokkabreytingu mótefna í átt að IgA (41). Það gefur því auga leið að fækkun frumna sem seytir IL10 ætti að hafa áhrif á myndun IgA seytandi B frumna. Áhugavert væri að rannsaka þetta enn betur og með það í huga að finna mögulegar orsakir IgAD og hugsanlega framtíðar skotmark í lækningarlegum tilgangi.

Örvun með frumuboðefninu IL10 hafði ekki marktæk áhrif á mótefnaframleiðsu. Það er þekkt að IL10 ásamt öðrum frumuboðefnum stjórni m.a. IgA seytun (41). Birtar rannsóknir staðfesta að örvun með IL10 ásamt t.d. IL21, CD40L, örvi IgA seytun á einangruðum B frumum í rækt hjá IgAD einstaklingum (63, 64). Í þessari rannsókn var einungis örvað með IL10 í mismunandi styrkjum og það virðist vera að það eitt og sér hafi ekki örvandi áhrif á mótefnaframleiðslu. Þó má velta fyrir sér ýmsum ástæðum þess að örvunin hafi ekki haft tilætluð áhrif. Það gæti m.a. útskýrst af því að frumuboðefnið hafi komið frá öðrum framleiðanda en í fyrri rannsóknum. Það er alltaf einhver breytileiki milli framleiðanda á hversu „hreint“ efni er. Með hreinleika er átt við að aðrir þættir gætu hafa mengað frumuboðefnið og valdið mótefnaframleiðslunni, t.d. ýmsar bakteríuafurðir sem geta virkjað ónæmissvar gegnum TLR o.fl (65). Því „öhreinna“ sem efni er því meiri líkur eru á að aðrir þættir í því gæti örvað framleiðsluna sem horft er til. Annað sem vert er að hafa í huga er að hér var IL10 bætt í brunna sem innihélt einkjarna frumur, ekki einungis einangraðar B frumur, eins og í fyrri birtum rannsóknum. Að brunnaþeir innhéldu einkjarna frumur var m.a. grunnurinn fyrir því að einungis var örvað með IL10 en ekki öðrum frumuboðefnum því aðrar frumur í brunnum geta haft áhrif á mótefnamyndun B frumna, t.d. CD40L á T frumum (66). Velta má því fyrir sér hvort hinar frumurnar í brunnum hafi verið að nýta sér IL10 sem leiddi til þess að of lítið magn hafi verið eftir af því til að hafa áhrif á B frumurnar. Annar möguleiki væri að hinar frumurnar í brunnum væru að hafa hindrandi áhrif á mótefnaframleiðslu B frumnanna. Þetta eru einungis vangaveltur og þar sem staðfest er að IL10 ásamt öðrum frumuboðefnum örvar mótefnaseytun einangraðra B frumna væri spennandi að halda áfram með örvanir í mismunandi styrkjum og með öðrum frumuboðefnum, með það í huga að finna bestu mögulegu útkomuna sem mögulegt klínískt lyfjaskotmark til að örva IgA seytun hjá IgAD einstaklingum í framtíðinni. Það má þó nefna að af þeim 12 IgAD gjöfum sem voru í rannsókninni þá var einungis örvað hjá átta af þeim. Þessir átta einstaklingar sýndu enga IgA framleiðslu við óörvað ástand. IgG framleiðsla var þó til staðar hjá flestum þessum einstaklingum sem staðfestir að það voru lífvænlegar mótefnaseytandi frumur til staðar í brunnum. Það sem staðfestir einnig að IL10 virtist ekki hafa áhrif er að það hafði ekki áhrif á IgA framleiðslu heilbrigðu viðmiðanna. Spennandi hefði þó verið að sjá áhrif örvana á IgA framleiðslu hjá skorts einstaklingum sem mynduðu IgA í rækt við

óörvað ástand og verður það líklega næsta skref hjá rannsóknarhópnum í framhaldi þessarar rannsóknar.

Rannsóknin var framsýn og helstu styrkleikar hennar voru m.a. að þátttakendur rannsóknarinnar eru sjúklingahópur með nokkuð hátt algengi og er vel skilgreindur hér á landi og góð aðstaða og tækni er til að rannsaka hann betur. Aðalframkvæmd hennar, ELISA, var framkvæmd blindandi. Til að hafa yfirsýn yfir áreiðanleika ELISA mælinganna var alltaf mælt mótefnastyrkur í sermi sömu tveggja einstaklinga í öllum ELISA mælingunum. Styrkirir voru síðan bornir saman milli mælinga, hvort þeir væru sambærilegir. Að auki voru bæði sermissýnin gerð tveimur mismunandi þynningum. Fleiri styrkleikar voru til staðar en þó voru einnig hlutir sem betur hefði mátt fara. Vankantar voru m.a. lágur fjöldi þátttakenda í þessum hluta rannsóknarinnar og vöntun á ýmsum mælingum, t.d. floti á viku fimm hjá ákveðnum gjöfum og vöntun á örvunum hjá öðrum. Við framkvæmd svipgerðagreiningu eitilfrumnanna hefði verið gott að gefa frumflæðisjánni lengri tíma til söfnunar svo fleiri eitilfrumur hefðu safnast. Þetta eru þó hlutir sem má bæta úr í framtíðinni. Þó svo að ELISA sé ein mest notaða vísindaaðferð nútímans og að alltaf hafi verið mælt sermissstyrk með flotunum til viðmiðunar þá er margt sem getur haft áhrif á mótefnastyrk í brunnunum. Það sést t.d. best á því að ef beðið væri nógu lengi eftir að annarrar gráðu mótefnið er komið í brunnana þá yrði litabreyting í öllum brunnunum á endanum, jafnvæl þó einungis hafi verið sett PBTT í þá.

Eins og áður hefur verið nefnt þá var þessi rannsókn hluti af stærri rannsókn sem fjallar um IgA skort á Ísland, sem hefur það markmið að skilja betur tengslin milli IgAD og sjálfsofnæmissjúkdóma. Með því er leitast eftir að meta betur áhættu IgAD einstaklinga og ættingja þeirra á að greinast með sjálfsofnæmissjúkdóma ásamt því að bæta meðferðarmöguleika og reyna að koma í veg fyrir þróun sjálfsofnæmissjúkdómanna. Næstu skref út frá þessari rannsókn sem hér var gerð yrði að klára að gera ELISA á flotum allra IgAD einstaklinga (N=86) sem eru í rannsókninni og heilbrigðu viðmiðanna (N=138). Samanburður á mótefnaframleiðslu í flotum IgAD einstaklinga og heilbrigðra væri áhugavert að skoða betur. Einnig að skoða betur áhrif örvana, bæði IL10 með/án annarra frumuboðefna. Einkennandi fækkun umskipta B frumna er einnig uppgötvun sem vekur upp margar spurningar og er líklega sá þáttur sem væri hvað áhugaverðast að skoða í sambandi við orsakir IgA skorts. Að lokum væri áhugavert að raðgreina erfðamengi og skoða innanfrumuboðferla B frumna IgAD einstaklinga sem mynduðu IgA í rækt og reyna að dýpka skilning okkar á því hvaða ferli fara af stað í þessum frumum og eru frábrugðin frumum í brunnnum þar sem engin IgA framleiðsla átti sér stað.

6 Heimildaskrá

1. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York: Garland Science; 2001. Sótt af: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/>.
2. Wentink MWJ, Lambeck AJA, van Zelm MC, Simons E, van Dongen JJM, Ijspeert H o.fl. CD21 and CD19 deficiency: Two defects in the same complex leading to different disease modalities. *Clinical Immunology*. 2015;161(2):120-7.
3. antibody. Britannica. 2016. Sótt af : <http://www.britannica.com/science/antibody>
4. Ballou M. Primary immunodeficiency disorders: Antibody deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002;109(4):581-91.
5. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet*. 2001;357(9270):1777-89.
6. Saylor C, Dadachova E, Casadevall A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. *Vaccine*. 2009;27(Suppl 6):G38-G46.
7. Hoffmann J, Akira S. Innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2013;25(1):1-3.
8. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013;131(4):959-71.
9. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL o.fl. IN VIVO ACTIVATION OF ANTIGEN-SPECIFIC CD4 T CELLS. *Annual Review of Immunology*. 2001;19(1):23-45.
10. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunological Reviews*. 2009;229(1):5-11.
11. van der Merwe PA, Dushek O. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(1):47-55.
12. Zhang S, Zhang H, Zhao J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;384(4):405-8.
13. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.
14. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570-80.
15. Gatto D, Brink R. The germinal center reaction. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;126(5):898-907; quiz 8-9.
16. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
17. Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCaffrey L, Hamilton M, Lyons K o.fl. Long-Term Propagation of Distinct Hematopoietic Differentiation Programs In Vivo. *Cell Stem Cell*. 2007;1(2):218-29.
18. Nuñez C, Nishimoto N, Gartland GL, Billips LG, Burrows PD, Kubagawa H o.fl. B cells are generated throughout life in humans. *The Journal of Immunology*. 1996;156(2):866-72.
19. Nishimoto N, Kubagawa H, Ohno T, Gartland GL, Stankovic AK, Cooper MD. Normal pre-B cells express a receptor complex of mu heavy chains and surrogate light-chain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(14):6284-8.

20. Conley ME. Genes required for B cell development. *The Journal of Clinical Investigation*.112(11):1636-8.
21. Boross P, Leusen JHW. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *American Journal of Cancer Research*. 2012;2(6):676-90.
22. Cook JR, Craig FE, Swerdlow SH. Benign CD10-Positive T Cells in Reactive Lymphoid Proliferations and B-Cell Lymphomas. *Mod Pathol*. 0000;16(9):879-85.
23. Sandel PC, Monroe JG. Negative Selection of Immature B Cells by Receptor Editing or Deletion Is Determined by Site of Antigen Encounter. *Immunity*. 1999;10(3):289-99.
24. Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C o.fl. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(10):5982-93.
25. Tussiwand R, Bosco N, Ceredig R, Rolink AG. Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. *European Journal of Immunology*. 2009;39(9):2317-24.
26. Pape KA, Catron DM, Itano AA, Jenkins MK. The Humoral Immune Response Is Initiated in Lymph Nodes by B Cells that Acquire Soluble Antigen Directly in the Follicles. *Immunity*. 2007;26(4):491-502.
27. Vos Q, Lees A, Zheng-Qi W, Snapper CM, Mond JJ. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews*. 2000;176(1):154.
28. Shaffer AL, Lin K-I, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A o.fl. Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program. *Immunity*. 2002;17(1):51-62.
29. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM o.fl. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138(-) and CD138(+) plasma cells. *Haematologica*. 2010;95(6):1016-20.
30. O'Connor BP, Cascalho M, Noelle RJ. Short-lived and Long-lived Bone Marrow Plasma Cells Are Derived from a Novel Precursor Population. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;195(6):737-45.
31. Nutt SL, Fairfax KA, Kallies A. BLIMP1 guides the fate of effector B and T cells. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):923-7.
32. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):149-59.
33. Lane P. Development of B-cell memory and effector function. *Current Opinion in Immunology*. 1996;8(3):331-5.
34. Alberts B JA, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York. 2002. Sótt af: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26884/>.
35. Alberts B JA, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York. 2002. Sótt af: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26860/>.
36. Melchers F. Checkpoints that control B cell development. *The Journal of Clinical Investigation*.125(6):2203-10.
37. Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1217:96-121.

38. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE. Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annual Review of Immunology*. 2008;26(1):261-92.
39. Maul RW, Gearhart PJ. AID AND SOMATIC HYPERMUTATION. *Advances in immunology*. 2010;105:159-91.
40. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 0 2):S41-S52.
41. Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):421-34.
42. Cushley W, Coupar BEH, Mickelson CA, Williamson AR. A common mechanism for the synthesis of membrane and secreted immunoglobulin [alpha], [gamma] and [mu] chains. *Nature*. 1982;298(5869):77-9.
43. Kerr MA. The structure and function of human IgA. *Biochemical Journal*. 1990;271(2):285-96.
44. Singh K, Chang C, Gershwin ME. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2014;13(2):163-77.
45. Yel L. Selective IgA Deficiency. *Journal of clinical immunology*. 2010;30(1):10-6.
46. Simell B, Kilpi T, Käyhty H. Subclass distribution of natural salivary IgA antibodies against pneumococcal capsular polysaccharide of type 14 and pneumococcal surface adhesin A (PsaA) in children. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006;143(3):543-9.
47. Woof JM, Kerr MA. IgA function – variations on a theme. *Immunology*. 2004;113(2):175-7.
48. Woof JM, Russell MW. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol*. 2011;4(6):590-7.
49. Brandtzaeg P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2009;70(6):505-15.
50. Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacheruvu KR, Rey J, Corthésy B, Neutra MR. Selective Adherence of IgA to Murine Peyer's Patch M Cells: Evidence for a Novel IgA Receptor. *The Journal of Immunology*. 2002;169(4):1844-51.
51. Lleo A, Invernizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME. Definition of human autoimmunity — autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(5):A259-A66.
52. Leslie D, Lipsky P, Notkins AL. Autoantibodies as predictors of disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(10):1417-22.
53. Kerkman PF, Rombouts Y, van der Voort EIH, Trouw LA, Huizinga TWJ, Toes RE o.fl. Circulating plasmablasts/plasmacells as a source of anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013;72(7):1259-63.
54. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *International anesthesiology clinics*. 2007;45(2):27-37.
55. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*. 2008;180(9):5771-7.
56. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. INTERLEUKIN-10 AND THE INTERLEUKIN-10 RECEPTOR. *Annual Review of Immunology*. 2001;19(1):683-765.
57. Jorgensen GH, Thorsteinsdottir I, Gudmundsson S, Hammarstrom L, Ludviksson BR. Familial aggregation of IgAD and autoimmunity. *Clinical Immunology*. 2009;131(2):233-9.

58. Vorechovsky I, Webster AD, Plebani A, Hammarstrom L. Genetic linkage of IgA deficiency to the major histocompatibility complex: evidence for allele segregation distortion, parent-of-origin penetrance differences, and the role of anti-IgA antibodies in disease predisposition. *American journal of human genetics*. 1999;64(4):1096-109.
59. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*. 0000;1(1):11-22.
60. Marodi L, Casanova J-L. Can primary immunodeficiencies help to provide insights into infectious risks of therapeutic antibodies? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(5):299-300.
61. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical & Experimental Immunology*. 2010;162(2):271-9.
62. Nova-Lamperti E, Fanelli G, Becker PD, Chana P, Elgueta R, Dodd PC o.fl. IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+T-cell responses. *Scientific Reports*. 2016;6:20044.
63. Briere F, Bridon JM, Chevet D, Souillet G, Bienvenu F, Guret C o.fl. Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *The Journal of Clinical Investigation*.94(1):97-104.
64. Borte S, Pan-Hammarström Q, Liu C, Sack U, Borte M, Wagner U o.fl. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood*. 2009;114(19):4089-98.
65. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 2005;17(1):1-14.
66. Wykes M. Why do B cells produce CD40 ligand? *Immunol Cell Biol*. 2003;81(4):328-31.

7 Viðauki

7.1 Húðunardúi

0.1 M Na₂CO₃

0.1 M NaHCO₃

pH=9,6

7.2 PBT

500 mL PBS (phosphate buffered)

5 gr 1% BSA

3.025 gr af 50 mM TRIS.

pH=8,0

7.3 PBTT

500 mL PBS (phosphate buffered)

5 gr 1% BSA

3.025 gr af 50 mM TRIS.

250 µL af Tween-20

pH=8,0