



## **Ratvísi T-frumna til húðar**

Áhrif D-vítamíns á tjáningu ratvísisameinda á T-frumum

Snæfríður Halldórsdóttir



**Líf- og umhverfisvísindadeild  
Háskóli Íslands  
2011**



**Ratvísi T-frumna til húðar**  
Áhrif D-vítamíns á tjáningu ratvísisameinda á T-frumum

Snæfríður Halldórsdóttir

12 eininga ritgerð sem er hluti af  
*Baccalaureus Scientiarum* gráðu í líffræði

Leiðbeinandi  
Hekla Sigmundsdóttir

Umsjónarkennari  
Guðmundur Hrafn Guðmundsson

Líf- og umhverfisvísindadeild  
Verkfræði- og náttúruvísindasvið  
Háskóli Íslands  
Reykjavík, janúar 2011

Ratvísi T-frumna til húðar  
12 eininga ritgerð sem er hluti af *Baccalaureus Scientiarum* gráðu í líffræði

Höfundarréttur © 2011 Snæfríður Halldórsdóttir  
Öll réttindi áskilin

Líf- og umhverfisvísindadeild  
Verkfræði- og náttúruvísindasvið  
Háskóli Íslands  
Askja, Sturlugata 7  
107 Reykjavík

Sími: 525 4000

Skráningarupplýsingar:  
Snæfríður Halldórsdóttir, 2011, *Ratvísi T-frumna til húðar*, BS ritgerð, Líf- og umhverfisvísindadeild, Háskóli Íslands, 22 bls.

Prentun: Háskólaprent  
Reykjavík, janúar 2011

# Útdráttur

Ratvísi T-frumna til húðar er miðlað af mörgum þáttum. Má þar nefna sameindirnar CLA og CCR4 sem eru tjáðar á T-frumum og stjórna fari þeirra í gegnum æðabekjuna og til húðar. Viðtakinn CCR10 kemur einnig við sögu og gerir T-frumum kleift að ferðast til yfirhúðar. Vítamínið D3 er myndað í yfirhúð. Það er forveri virka efnisins 1,25(OH)<sub>2</sub>D3. Sýnt hefur verið fram á að angafrumur geti myndað 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 út frá D-vítamíni í húð og sýnt T-frumum. Markmið þessa verkefnis var að athuga hvort 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 hvetji tjáningu CCR10 á T-frumum og stuðli þar með að fari þeirra til húðar.

Einkjarna blóðfrumur voru einangraðar úr blóði og ræktaðar í 12 daga með IL-2. Á 6. degi ræktunar var 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 bætt út í helming ræktar. Eftir 12 daga voru framkvæmdar innan- og utanfrumulitanir og sýnin keyrð í frumuflæðisjá.

Marktæk aukning sást á tjáningu CCR10 í frumum ræktuðum með 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 samanborið við viðmiðunarrækt. CCR4<sup>+</sup> T-frumur sýndu mesta tjáningu á CCR10 hjá bæði CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> T-frumum. CCR10 tjáning fór hins vegar ekki saman við tjáningu CLA. Hugsanleg ástæða þessa er sú að T-frumurnar voru ræktaðar í 12 daga eftir ræsingu og tjáning CLA gæti verið lokið. Einnig var litað fyrir CD25, CD127 og α1 en það eru sameindir sem einkenna T-stýrifrumur. Niðurstöður gáfu til kynna að tjáning CCR10 virðist ekki vera tengd T-stýrifrumum. Til að skapa aðstæður sem líkjast þeim sem myndast í bólgu fékk hluti frumuræktarinnar IL-12. Þetta jók CCR10 tjáningu og hæsta tjáning á CCR10 mældist í ræktunum með IL-12 ásamt 1,25(OH)<sub>2</sub>D3.

Vegna óljósra ástæðna fengust ekki marktækar niðurstöður úr innanfrumurækt.

Hér hefur verið sýnt fram á að 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 hvetur tjáningu CCR10 á T-frumum og hvetur þannig far þeirra til yfirhúðar Þær upplýsingar er hægt að nýta við áframhaldandi rannsóknir á ratvísi T-frumna til húðar.

## Abstract

T-cell homing is mediated by many factors including CLA and CCR4 which are both expressed on T-cells. These receptors regulate infiltration of T-cells into the skin. A receptor called CCR10 is also involved and attracts T-cells to the epidermis. D3 vitamin is an active precursor for 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 and is produced in the skin. Dendritic cells are able to produce 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 from D3 and present it to T-cells. The goal of this research was to investigate if 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 stimulates CCR10 expression on T-cells and therefore encourages homing to skin.

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from blood and grown for 12 days with IL-12. On the 6th day, 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 was added to half of the culture. Intra- and extracellular staining were performed after 12 days and samples were processed in a flow cytometer.

Expression of CCR10 significantly increased in  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  cultures compared to controls. CCR10 expression increased most on  $\text{CCR4}^+$  T-cells. This was true for both  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T-cells.  $\text{CLA}^+$  T-cells on the other hand did not show CCR10 expression despite its role in skin-infiltration. A possible reason for that is how long the cells were cultured after activation and CLA expression might be over by the time the cells were stained. CD25, CD127 and  $\alpha 1$  are specific markers for regulatory T-cells and were also studied in relations to CCR10 expression. The results indicated that CCR10 expression is not related to regulatory T-cells. Part of the culture was incubated with IL-12 to mimic inflammatory environment. This increased CCR10 expression and the highest expression was seen on cultures incubated with IL-12 and  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Intracellular staining showed no significant results for unknown reasons.

It has been revealed that  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimulates CCR10 expression on T-cells and thus encourages skin homing. These informations can be exploited for further research in this area.

# Efnisyfirlit

Myndir.....	vi
Töflur.....	vii
Skammstafanir.....	viii
Þakkir.....	ix
<b>1 Inngangur.....</b>	<b>1</b>
1.1 Ónæmiskerfið.....	1
1.2 T-frumur.....	1
1.2.1 Myndun og þroskun T-frumna.....	1
1.2.2 Ræsing T-frumna.....	1
1.3 Ratvísi T-frumna til húðar.....	3
1.3 D-vítamín.....	5
1.4 Markmið rannsóknar.....	5
<b>2 Efni og Aðferðir.....</b>	<b>6</b>
2.1 Einangrun PBMC úr blóði.....	6
2.1.1 Talning.....	7
2.2 Frumurækt.....	7
2.3 Utanfrumulitun.....	9
2.4 Innanfrumulitun.....	10
2.5 Keyrsla sýna í frumuflæðisjá og gagnavinnsla.....	11
<b>3 Niðurstöður.....</b>	<b>12</b>
3.1 Heildartjáning CCR10.....	12
3.2 Tjáning CCR10 á CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-frumum.....	13
3.3 Tjáning CCR10 með IL-12.....	15
3.4 FlowJo myndvinnsla.....	17
<b>4 Umræður og ályktanir.....</b>	<b>18</b>
Heimildir.....	20

# Myndir

Mynd 1. Ræsing T-frumna.....	2
Mynd 2. Ratvísi T-frumna til húðar er háð samspili ýmsra sameinda og boðefna.....	4
Mynd 3. Byggingarformúla 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	5
Mynd 4. Einangrun einkjarna blóðfrumna úr blóði.....	6
Mynd 5. Frumurækt á 6. degi ræktunar.....	8
Mynd 6. Heildartjáning CCR10 á T-frumum ræktaðar með og án 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	12
Mynd 7. Tjáning CCR10 (%) ásamt CD25 <sup>+</sup> /CLA <sup>+</sup> /CCR4 <sup>+</sup> /α1 <sup>+</sup> og CD127 <sup>+</sup> hjá CD4 <sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með og án 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	13
Mynd 8. Tjáning CCR10 (%) ásamt CD25 <sup>+</sup> /CLA <sup>+</sup> /CCR4 <sup>+</sup> /α1 <sup>+</sup> og CD127 <sup>+</sup> á CD8 <sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með og án 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	13
Mynd 9. Tjáning CCR10 á CD25 <sup>-</sup> /CLA <sup>-</sup> /CCR4 <sup>-</sup> /α1 <sup>-</sup> og CD127 <sup>-</sup> á CD4 <sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með og án 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	14
Mynd 10. Tjáning CCR10 á CD25 <sup>-</sup> /CLA <sup>-</sup> /CCR4 <sup>-</sup> /α1 <sup>-</sup> og CD127 <sup>-</sup> á CD8 <sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með og án 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	14
Mynd 11. Tjáning CCR10 ásamt CD25 <sup>+</sup> /CLA <sup>+</sup> /CCR4 <sup>+</sup> /α1 <sup>+</sup> og CD127 <sup>+</sup> á CD4 <sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með IL-12 og með/án 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	15
Mynd 12. Tjáning CCR10 ásamt CD25 <sup>+</sup> /CLA <sup>+</sup> /CCR4 <sup>+</sup> /α1 <sup>+</sup> og CD127 <sup>+</sup> á CD8 <sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með IL-12 og með/án 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	15
Mynd 13. Tjáning CCR10 á CD25 <sup>-</sup> /CLA <sup>-</sup> /CCR4 <sup>-</sup> /α1 <sup>-</sup> og CD127 <sup>-</sup> á CD4 <sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með IL-12 og með/án 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	16
Mynd 14. Tjáning CCR10 á CD25 <sup>-</sup> /CLA <sup>-</sup> /CCR4 <sup>-</sup> /α1 <sup>-</sup> og CD127 <sup>-</sup> á CD8 <sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með IL-12 og með/án 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	16
Mynd 15. CCR10 á móti CCR4 í 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> stofni.....	17
Mynd 16. CLA á móti CCR4 í 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> stofni.....	17



# Töflur

Tafla 1. Samsetning flúormerktra mótefna í FACS- glösum í utanfrumulitun.....9

Tafla 2. Samsetning flúormerktra mótefna í FACS- glösum í innanfrumulitun.....10

# Skammstafanir

CCR	CC chemokine receptor
CTACK	Cutaneous T cell-attracting chemokine
Foxp3	Forkhead box P3
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
LFA-1	Lymphocyte Function-associated antigen-1
MHC	Major Histocompatibility Complex
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffer Saline
TCR	T- Cell Receptor
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-4	Very Late Antigen

# **Þakkir**

Ég vil þakka Heklu Sigmundsdóttur kærlega fyrir frábæra leiðsögn og fyrir að veita mér tækifæri til að kynnast rannsóknarstörfum við fyrsta flokks aðstæður. Ég vil þakka Þórdísi Emmu Stefánsdóttur fyrir alla hjálpina, ráðleggingar og endalausa þolinmæði. Írisi Pétursdóttur fyrir að hreinsa frumur, hjálp og frábæran félagsskap.

Ég vil einnig þakka Arnóri Gunnarssyni og Rannveigu Jónsdóttur fyrir yfirferðina og stuðninginn.



# 1 Inngangur

## 1.1 Ónæmiskerfið

Ónæmiskerfið kallast sá hluti líkamans er veitir vörn gegn sýklum og viðheldur innra jafnvægi í líkamanum. Það skiptist í ósérhæfðar varnir (e. innate) og sérhæfðar varnir (e. adaptive). Þegar sýkill berst inn í líkamann fara ósérhæfðu varnirnar fyrst af stað. Átfrumur á borð við stórátfrumur og neutrófílar gegna starfsemi kerfisins. Sérhæfðar varnir þróast allan líftíma hvers einstaklings og veitir lífstíðarvörn gegn þeim sýklum sem að ræsa þær. Ef ósérhæfðar varnir geta ekki yfirbugað sýkil er sérhæfða varnarkerfið ræst. Meðal þeirra frumna sem miðla starfsemi sérhæfða varnarkerfisins eru eítílfrumur.

Til eru tveir flokkar af eítílfrumum, það eru B- og T-frumur. Þær veita sértækar varnir gegn sýklum. B-eítílfrumur verða að plasmafrumum við ræsingu og mynda mótefni. T-eítílfrumur sérhæfast við ræsingu í ýmsar gerðir T-verkfrumna (Murphy et al., 2008).

## 1.2 T-frumur

### 1.2.1 Myndun og þroskun T-frumna

T-frumur eru komnar frá blóðmyndandi stofnfrumum (hematopoietic stem cells) í beinmerg en þaðan ferðast þær til hóstarkirtils þar sem þær þroskast (Yang et al., 2010). Við komu í hóstarkirtil eru frumurnar tvíneikvæðar og tjá hvorki sameindirnar CD4 né CD8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Í eítílberki hefst tjáning á CD4 og CD8 og frumurnar eru tvíjákvæðar (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Þegar komið er í eítílmarginn hætta frumurnar tjáningu á annarri hvorri sameindinni, CD4 eða CD8 og verða einjákvæðar. Úr hóstakirtli koma þar af leiðandi óreyndar (e. naïve) einjákvæðar T-frumur. Þær eru annað hvort með yfirborðspróteinið CD4 eða CD8 og kallast þá CD4<sup>+</sup> eða CD8<sup>+</sup> T-frumur.

CD4<sup>+</sup> T-frumur eru einnig kallaðar T-hjálparfrumur. Þær örva aðrar T-frumur og átfrumur og hvetja mótefnamyndun hjá B-frumum.

CD8<sup>+</sup> T-frumur eru einnig nefndar T-drápsfrumur. Þær drepa veirusýktar frumur og krabbameinsfrumur (Murphy et al., 2008).

### 1.2.2 Ræsing T-frumna

Til að ræsa T-frumur þarf mótefnavaki (e. antigen) að vera unnin og sýndur á frumum sem kallast sýnifrumur (e. antigen presenting cells). Þrjár gerðir sýnifrumna þekkjast. Það eru angafrumur, stórátfrumur og óræstar B-frumur. Þessar frumur hafa sameindir á yfirborði sínu sem kallast Major Histocompatibility Complex eða MHC. MHC sameindir binda og sýna T-frumum peptíð ónæmisvaka. Ef að T-frumuviðtakar (e. T-cell receptors) þekkja og bindast MHC sameindinni og peptíðinu sem hún sýnir ræsist T-fruman. Áðurnefndar sameindir CD4 og CD8 eru hjálparviðtakar.

Hjálparviðtakar bindast öðrum hlutum MHC sameindarinnar og lækka ræsibröskuld T-frumna (Murphy et al., 2008). MHC sameindirnar flokkast í tvennt; MHC af flokki I örva T-drápsfrumur en MHC af flokki II örva T-hjálparfrumur (Banchereau og Steinman, 1998). CD4 og CD8 eru þá nefndir hjálparviðtakar þar sem CD4 þekkir MHC II og CD8 þekkir MHC I. Til að ræsast þurfa T-frumur einnig að fá annað merki (merki 2) frá sömu sýnifrumu. Merkið er gefið í gegnum hjálparsameindir á sýnifrumu sem kallast B7 sameindir. Þær eru annað hvort B7.1 (CD80) eða B7.2 (CD86). B7 hjálparsameindir binda viðtakann CD28 á óreyndum (naive) T-frumum og miðla merki 2 (Murphy et al., 2008).

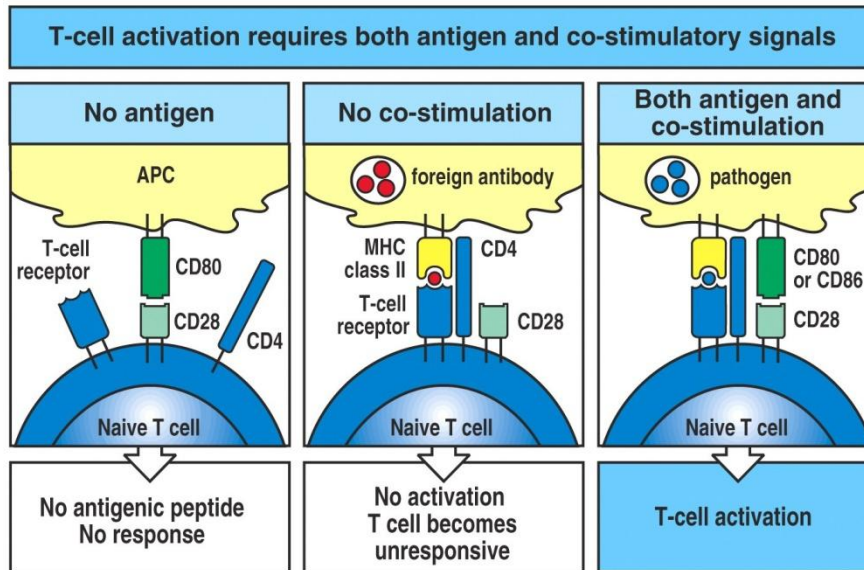


Figure 2-17 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

### Mynd 1. Ræsing T-frumna

(Murphy et al., 2008).

Óreyndar T-frumur eru á sífelldri hringrás úr blóði í eitilvefi þar sem þær skoða mótefnavaka á sýnifrumum. Ef þær komast í tæri við mótefnavaka sem þær þekkja ræsast þær. Við ræingu fer fruman í klónvöxt (e. clonal expansion) þar sem hún fjölgar sér hratt í nokkra daga og sérhæfist. Þá myndast fjöldi T-verkfrumna (e. effector T-cells) sem að eru sérhæfðar gegn mótefnavakanum. Þær ferðast úr eitilvef í blóðrás og á sýktan stað þar sem þær taka þátt í að yfirbuga sýkingu. Við ræingu sérhæfast T-verkfrumur í T-drápsfrumur ( $CD8^+$ ), T-hjálparfrumur ( $CD4^+$ ) eða T-stýrifrumur ( $CD4^+$ ). T-hjálparfrumur skiptast enn frekar í Th1, Th2 og Th17 (Murphy et al., 2008). Th1 frumur ræsa stórátfrumur og framleiða IL-12 sem hvetur Th1 sérhæfingu (Hsieh et al., 1993).

T-stýrifrumur gegna mikilvægu hlutverki við að bæla fjölgun og boðefnaframleiðslu annarra T-verkfrumna. Ýmsir eiginleikar einkenna ræstar T-stýrifrumur. Má þar nefna tjáningu á  $\alpha$ -keðju IL-2 viðtakans, CD25 (IL-2R $\alpha$ ) (Simonetta et al., 2010). IL-2 keyrir T-frumurnar áfram í skiptingu og veldur fjölgun á T-verkfrumum. Hjálparviðtakinn CD28 á T-frumur eykur einnig IL-2 tjáningu (Murphy et al., 2008). Tjáning á CD4 og CD25 hefur löngum verið notuð til að aðgreina T-stýrifrumur frá öðrum T-frumum.

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tjáning er hins vegar ekki sértæk fyrir T-stýrifrumur og er því þörf á að nota aðra þætti til aðgreiningar.

Umritunarþáttur Foxp3 (forkhead box P3) er einnig sértækt tjáður af T-stýrifrumum og stjórnar þroskun og starfsemi þeirra. Foxp3 er mikið tjáður í eitilvef, sérstaklega á CD4<sup>+</sup> T-frumur og er tjáningin næstum ógreinanleg í CD8<sup>+</sup> T-frumum og B-frumum. (Brunkow et al., 2001). Foxp3 virðist einnig vera nauðsynlegur fyrir þroskun CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-stýrifrumna í hóstakirtli (Fontenot et al., 2003; Floess et al., 2007; Khattry et al., 2003) en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-frumur virðast ekki tjá Foxp3. Einnig hefur verið leitt í ljós að Foxp3<sup>-</sup> mýs skortir T-stýrifrumur sem undirstrikar enn frekar mikilvægi þess í þroskun þeirra (Fontenot et al., 2003).

Auk þessara þátta greinir tjáning á CD127 T-stýrifrumur frá öðrum T-frumum. CD127 er  $\alpha$ -keðja IL-7 viðtakans en IL-7 er nauðsynlegt fyrir T-frumur.

Seddiki et al. settu fram og prófuðu tilgátu þess efnis að IL-7 tjáning væri ekki nauðsynleg T-stýrifrumum. Þeir sýndu fram á að Foxp3<sup>+</sup> stofnar í eitlum og blóði væru með lága CD127 tjáningu (Seddiki et al., 2006). Þetta var staðfest af fleiri rannsóknum sem sýndu fram á að T-stýrifrumur einkennast af lágri CD127 tjáningu samanborið við aðrar T-frumur (Cozzo et al., 2003; Liu et al., 2006a). CD127 tjáning virðist einnig vera sértækari á T-stýrifrumum en CD25 (Liu et al., 2006a). Hins vegar virðist tjáning CD127 vera breytileg eftir ræsingu og staðsetningu T-stýrifrumna. Ræsing T-stýrifrumna veldur aukinni tjáningu á CD127 auk þess sem há tjáning er ríkjandi á ræstum T-stýrifrumum í húð en greinist vart í þörmum (Simonetta et al., 2010).

### 1.3 Ratvísi T-frumna til húðar

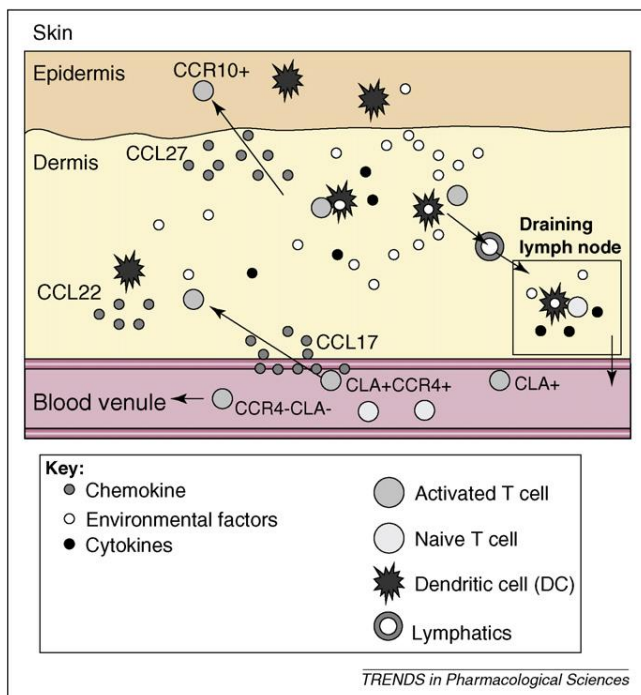
Við ræsingu öðlast T-frumur ýmsa eiginleika sem gerir þeim kleift að ferðast inn í aðra vefi en eitilvefi. Fjölmargir viðtakar og bindlar koma við sögu og valda sértækni fyrir mismunandi vefjum (Mora og von Andrian, 2006). T-frumur hafa tilhneigingu til að ferðast til vefja sem að eru skyldir þeim vefjum sem frumurnar voru ræstar í. Angafrumur sem að ræsast í húð ferðast til nærliggjandi eitla og ræsa T-frumur. Við ræsingu tjá T-frumurnar sameindir og viðtaka sem að gera þeim kleift að ferðast til húðarinnar (Sigmundsdóttir, 2010).

Ysta lag húðarinnar kallast yfirhúð (e. epidermis). Það er myndað af hýrnisfrumum (e. keratinocytes) sem framleiða keratín og verja yfirborð húðarinnar gegn áreiti. Innri hluti húðar er æðaríkt lag sem heitir leðurhúð (e. dermis). Til að komast á sýkingarstað í húð fara eitilfrumur úr blóðrás í leðurhúð og ferðast þaðan til yfirhúðar. Fyrst mynda T-frumur lausa tengingu við æðapekjuna. Þessu er miðlað af CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) á T-frumum sem binst E-selectin á æðapekjunni. Bindingin veldur því að T-frumurnar loða við æðapekjuna og renna eftir henni. Frumur æðapekjunnar mynda flakkboð (e. chemokine) og þær T-frumur sem tjá tilsvareandi viðtaka festast enn frekar við æðapekjuna og breyta um lögum. CCR4 viðtakinn á T-frumum binst flakkboðinu CCL17 (Sigmundsdóttir, 2010). CCR4 tekur ekki aðeins þátt í ferð T-frumna til húðar. CCR4<sup>+</sup> T-frumur finnast einnig í hóstakirtli og lungum og CCR4 tjáning er þar af leiðandi ekki sértæk fyrir T-frumur á leið til húðar (Perros et al., 2009).

Aðrar sameindir koma við sögu og eru ekki sértækar fyrir far T-frumna til húðar. Má þar nefna LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) á T-frumum sem binst ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) og VLA-4 (very late antigen) sem binst VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) á æðapekjunni (mynd 2) (Sigmundsdóttir, 2010).

Þegar komið er í leðurhúð gefa önnur flakkboð frekari upplýsingar um far. Þar á meðal er CCL22 sem er myndaður af mörgum frumugerðum í húðinni og bindur CCR4 (Sigmundsdóttir, 2010). CCL27 (CTACK) er flakkboð sem er tjáð af hyrnisfrumum (keratinocytes) í yfirhúð. Það binst viðtakanum CCR10 á T-frumum og dregur þær úr leðurhúð í yfirhúð (Sigmundsdóttir, 2010; Huang et al., 2008; Homey et al., 2000). CCR10 tekur einnig þátt í færslu T-minnisfrumna úr blóði og til leðurhúðar (dermis), en er ekki nauðsynlegur þar sem CCR4 getur einnig gegnt sama hlutverki (Reiss et al., 2001). Soler et al fundu árið 2003 að 30% CLA<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> Th frumna tjáðu CCR10 Einnig fannst að CCR10 var ekki tjáð á óreyndum Th frumum. CCR4 er tjáð af flestum CLA<sup>+</sup> Th frumum í blóði en CCR10 er tjáð aðeins af litlum hluta frumna (Soler et al., 2003).

Vísbendingar eru um að auk uppruna angafrumnanna séu aðrir þættir nauðsynlegir fyrir tjáningu þessara sameinda á T-frumum. Þar má nefna boðefnið IL-12 sem að eykur tjáningu CLA á T-frumum (Leung et al., 1995). IL-1β og TNF-α hvetja tjáningu CCL27 af hyrnisfrumum og CCR10. Einnig hefur fundist að CCL27 laðar CLA<sup>+</sup> T-minnisfrumur til húðar (Morales et al., 1999).

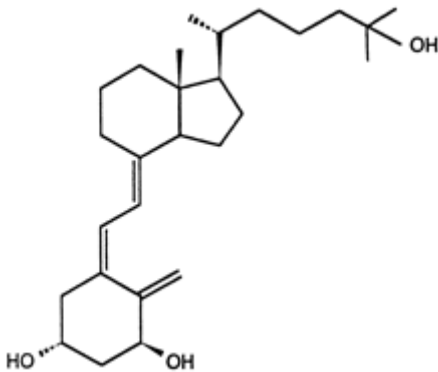


**Mynd 2. Ratvísi T-frumna til húðar er háð samspili ýmsra sameinda og flakkboða (Sigmundsdóttir, 2010)**



## 1.4 D-vítamín

Í sólarljósi (UVB geisla) er vítamínið D<sub>3</sub> myndað í yfirhúð út frá forvera sínum 7-dehydrocholesterol. D<sub>3</sub> er óvirkt en því er umbreytt í 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sem er virkt efni (Prosser og Jones, 2004). Umbreytingarferlið er hvatað af ensímum. Fyrst er vítamínið D<sub>3</sub> flutt úr húð til lifur þar sem CYP27A1 eða CYP2R1 hvata umbreytingu í 25(OH)D<sub>3</sub> og síðan í nýrum þar sem CYP27B1 hvatar umbreytingu í 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Prosser og Jones, 2004). Einnig hefur fundist að hrynisfrumur (Lehmann, 2008), stórátfrumur (Liu et al., 2006b) og angafrumur (Sigmundsdóttir et al., 2007) geti framkallað þessa umbreytingu. Angafrumur tjá CYP27A1 og CYP27B1 og geta því einar og sér umbreytt D<sub>3</sub> vítamíni í virkt form og sýnt T-frumum (Liu et al., 2006b). Þetta þýðir að hægt er að umbreyta D<sub>3</sub> vítamíni í virkt form á sama stað og það var myndað, í húðinni (Sigmundsdóttir og Butcher, 2008). Þar af leiðandi er vert að athuga hvort 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hafi áhrif á tjáningu þeirra sameinda sem að stjórna staðfæringu T-frumna til húðar.



**Mynd 3. Byggingarformúla 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>**

*Mynd aðlöguð úr (Finch et al., 1999).*

## 1.5 Markmið rannsókna

Sýnt hefur verið fram á að angafrumur geti myndað virka efnið 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> út frá D-vítamíni í húð og sýnt T-frumum (Liu et al., 2006b) og að viðtakinn CCR10 finnst á T-frumum og tekur þátt í færslu þeirra til húðar (Sigmundsdóttir, 2010). Þetta gefur tilefni til að athuga hvort 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hvetji tjáningu CCR10 á T-frumum og stuðli þar með að fari þeirra til húðar. Fyrri rannsóknir hafa sýnt fram á að 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> örvi myndun á T stýrifrumum (Gregori et al., 2001). Tilgátan var því sú að CCR10, sem er tjáður vegna áhrifa frá 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, beri einkenni T- stýrifrumna.

## 2 Efni og aðferðir

Tilraun var framkvæmd í fjögur skipti.

### 2.1 Einangrun PBMC úr blóði

Blóðsýni var tekið úr heilbrigðum einstakling. Blóðið var þynnt til helminga með PBS án  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$  (Gibco®). 13 mL Ficoll (histopaque®-1077) var sett í 50 mL glös og 22-25 mL af blóði látið renna varlega ofan á ficoll. Glösin voru sett í skilvindu og spunnið í 30 mínútur við 1100 rpm (mynd 4). Einkjarna frumulag var varlega sogað með einnota pasteur pípettu og sett í 15 mL glös. PBS án  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$  var bætt í glösin þar til þau voru full. Frumur voru spunnar í 10 mínútur við 1100 rpm. Floti var hellt af og botnföllin leyst upp í æti (RPMI 1640 (Sigma®) + 10% FBS). Botnföllin voru varlega losuð með pasteur pípettu og sameinuð í eitt 50 mL glas. Frumur voru spunnar í 10 mínútur við 1100 rpm. Floti var hellt af og frumurnar leystar upp í 5 mL PBS + 10% FBS. 50  $\mu\text{L}$  voru teknir út og taldir (sbr. lýsing á talningu). Frumurnar voru spunnar í 10 mínútur við 1100 rpm. Floti var hellt af og frumur leystar upp í PBS + 10% FBS. Það magn PBS+10% FBS sem leyst var í var ákvarðað eftir talningu og er það magn sem þarf til þess að  $1,0 \times 10^6$  frumur/mL séu í lausninni.

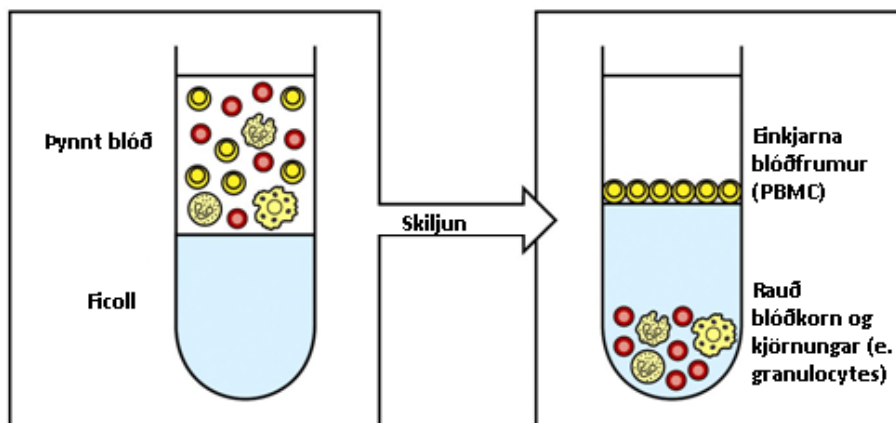


Figure A-24 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

#### Mynd 4. Einangrun einkjarna blóðfrumna úr blóði

Mynd aðlögðuð úr (Murphy et al., 2008).

### 2.1.1 Talning

50  $\mu\text{L}$  sýni var blandað til helminga við Trypan blue lit (0,4% w/v, Stemcell technologies inc.) til talningar. Einkjarna frumur voru taldar á Neubauer gleri í smásjá. 16 reitir á tveimur hornum glersins voru notaðir til talningar. Fjöldi frumna var fenginn með eftirfarandi jöfnu:

$$\text{Frumufjöldi} = 10^4 \times \bar{x} \text{ taldra frumna} \times \text{þynning í lit} \times \text{mL af frumum}$$

Dæmi:

$$\text{Frumufjöldi} = 10^4 \times 685 \text{ frumur} \times 2 \times 5 \text{ mL} = 6850 \times 10^4 = 68,5 \times 10^6 \text{ frumur}$$

Þar sem 685 frumur voru taldar, þynnt er til helminga og sýni var tekið til talningar úr 5 mL af frumulausn.

$68,5 \times 10^6$  frumur voru leystar upp í 6,85 mL af RPMI 1640 + 10% FBS æti og botnfalli blandað með pasteur pípettu og voru þá  $10 \times 10^6$  frumur/mL. 100  $\mu\text{L}$  af frumurækt var síðan sett í brunn ásamt 900  $\mu\text{L}$  af RPMI 1640 + 10% FBS æti til að fá  $1,0 \times 10^6$  frumur/mL í hverja holu.

## 2.2 Frumurækt

Frumur voru ræktaðar í 24 holu bakka. Bakkar voru geymdir í myrkvuðum hitaskáp við  $37^\circ\text{C}$  og aðeins teknir út þegar unnið var með frumuræktina í eftirfarandi tilfellum;

*Dagur 0: Holur húðaðar og frumurækt sett af stað.*

Holur voru húðaðar með 1,5  $\mu\text{L}$  af anti-human CD3 (UCHT1) og anti-human CD28 (CD28.2) blandað í 1,5 mL PBS. 300  $\mu\text{L}$  af blöndunni voru sett í hverja holu. Bakkinn var látinn standa í  $37^\circ\text{C}$  í 2 klst áður en húðun var fjarlægð. Húðun var fjarlægð með pípettu og 1 mL af  $1,0 \times 10^6$  frumur/mL blandað í æti (RPMI 1640 + 10% FBS) látin í hverja holu. Þetta var gert við 8 holur á bakkanum

*Dagur 2: Frumurækt færð niður um holu og nýju æti ásamt IL-2 bætt í.*

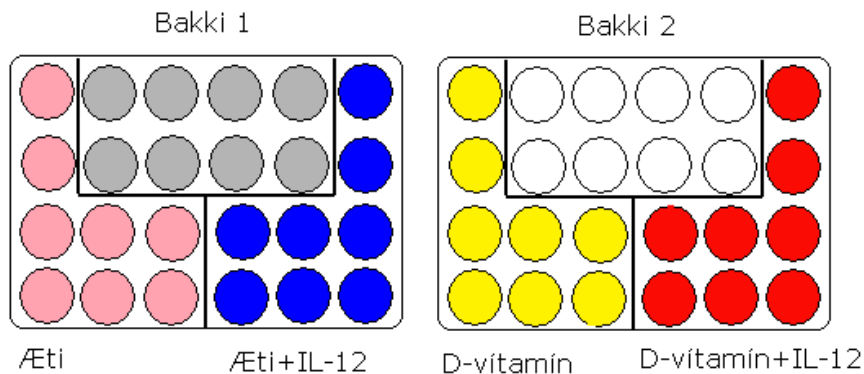
Æti og IL-2 var blandað í 15 mL glas. Lokastyrkur fyrir IL-2 var 4  $\mu\text{g}$  per hvern mL af æti. Frumurækt var blandað vel með pípettu og síðan færð öll niður um eina holu á bakkanum. Þetta var gert fyrir allar holurnar. 1 mL af IL-2 og ætisblöndunni var bætt í hverja holu og blandað með pípettu.

*Dagur 4: Frumurækt færð niður um holu, nýju æti ásamt IL-2 og IL-12 bætt í.*

Æti og IL-2 var blandað í tvö 15 mL glös. Lokastyrkur fyrir IL-2 var 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  af æti. Í annað 15 mL glasið var bætt við IL-12 með lokastyrk 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Frumurækt var blandað vel með pípettu og síðan 950  $\mu\text{L}$  færðir niður um eina holu á bakkanum. Þetta var gert fyrir allar holurnar. IL-2 blandað í æti var sett í helming holna, 1 mL í hverja holu. 1 mL af IL-2, IL-12 og æti var settur í hinn helming holanna.

*Dagur 6: Helmingur frumuræktar færður á nýjan bakka ,nýju æti ásamt IL-2 og IL-12 bætt í bakka 1. IL-2, IL-12 og D-vítamíni bætt í bakka 2.*

IL-2 (4 µg/mL) og æti var blandað í tvö 15 mL glös. IL-2 (4 µg/mL), IL-12 (5 µg/mL) ásamt æti var einnig blandað í tvö 15 mL glös. Frumurækt var blönduð með pípettu og 950 µL úr hverri holu færðir á nýjan 24 holu bakka (bakki 2). 1 mL af IL-2 í æti var blandað í tilsvarendi holur á bakka 1. Sama var gert með blöndu IL-2, IL-12 og æti. D-vítamíni (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) var blandað í hin tvö 15 mL glösin í lokastyrknum 10 nM. 1 mL af æti, IL-2 og D-vítamíni var blandað í tilsvarendi holur (án IL-12) í bakka 2. 1 mL af æti, IL-2, IL-12 og D-vítamíni var einnig blandað í tilsvarendi holur (með IL-12) í bakka 2.



#### **Mynd 5. Frumurækt á 6. degi ræktunar.**

*Á degi 0 er frumurækt komið fyrir í gráum holum á bakka 1. Þær eru síðan færðar niður í holurnar fyrir neðan (degi 2) og helmingur hvernar holu er síðan færður til hliðar (degi 4). Á degi 6 er helmingur frumuræktar færður á bakka 2 og D-vítamíni bætt í.*

*Dagur 8: Helmingur frumuræktar fjarlægður, nýju æti ásamt IL-2 bætt í.*

Frumur voru blandaðar vel og 950 µL úr hverri holu (á bakka 1 og 2) fjarlægðir og hent. IL-2 er blandað í æti með lokastyrk 4 µg/mL. 1 mL af blöndunni var bætt í hverja holu á báðum bökkum og blandað vel með pípettu.

*Dagur 10: Helmingur frumuræktar fjarlægður, nýju æti ásamt IL-2 bætt í*

Frumur voru blandaðar vel og 900 µL úr hverri holu (á bakka 1 og 2) fjarlægðir og hent. IL-2 var blandað í æti með lokastyrk 4 µg/mL. 1 mL af blöndunni var bætt í hverja holu á báðum bökkum og blandað vel með pípettu.

*Dagur 12: Utan- og innanfrumulitun framkvæmd*  
Sjá bls. 9-10.

Frávik.

Tilraunin var framkvæmd í fjögur skipti. Fyrsta framkvæmd fór fram á fyrirgreindan hátt að fráskildri meðferð frumna með IL-12.

## 2.3 Utanfrumulitun

Utanfrumulitun var framkvæmd á 12.-14. degi ræktunar.

Allar holur í hverri rækt (æti+IL-2, D-vítamín+IL-2, æti+IL-2+IL-12 og D-vítamín+IL-2+IL-12) voru sameinaðar í fjögur 50 mL glös. Glösin voru spunnin í 10 mínútur við 1300 rpm. Botnföllin voru leyst upp í 1 mL PBS fyrir utan æti sem var leyst upp í 1,5 mL PBS. Blandað vel með pípettu.

100 µL af hverri rækt var sett í tilsvareandi FACS glös. Ætisláusn var notuð í stillingarglös. Litað var með 1 µL af mótefnum samkvæmt töflu 1. 2 µL voru notaðir fyrir PerCP/Cy5.5:CCR4.

Fjögur tilraunaglös voru undirbúin fyrir hverja rækt og lituð með eftirfarandi mótefnum;

- Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 anti-human CD49a ( $\alpha$ 1), TS2/7, BioLegend
- Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Mouse anti-human CD127, HIL-7R-M21, BD Biosciences
- Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Mouse IgG1,  $\kappa$  Isotype Ctrl (FC), MOPC-21, BioLegend
- APC/Cy7 anti-human CD8a, RPA-T8, BioLegend
- FITC anti-human CD25, BC96, BioLegend
- FITC Rat anti-human Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA), Rat IgM,  $\kappa$ , BD Biosciences
- Pacific Blue<sup>™</sup> anti-human CD4, RPA-T4, BioLegend
- PerCP/Cy5.5 anti-human CD194 (CCR4), TG6/CCR4, BioLegend
- PerCP/Cy5.5 Mouse IgG2b,  $\kappa$  Isotype Ctrl, MPC-11, BioLegend
- Phycoerythrin (PE) anti-human CCR4, 205410, R&D systems
- Phycoerythrin (PE) anti-human CCR10, 314305, R&D systems
- Phycoerythrin (PE) Rat IgG2a  $\kappa$  Isotype Control, R35-95, BD Biosciences

**Tafla 1: Samsetning flúormerktra mótefna í FACS- glösum í utanfrumulitun.**

Litir	Glas 1	Glas 2	Glas 3	Glas 4	Stillingarglös
<b>FITC</b>	CLA	CLA	CD25	CD25	CLA
<b>PE</b>	CCR10	rIgG2a	CCR10	CCR10	CCR4
<b>APC/AF647</b>	$\alpha$ 1	mIgG1	CD127	mIgG1	$\alpha$ 1
<b>PerCP/Cy5.5</b>	CCR4	CCR4	CCR4	mIgG2b	CCR4
<b>Pacific Blue</b>	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4
<b>APC/Cy7</b>	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8

Sýni voru geymd í ísskáp í 30 mínútur. 1 mL af PBS var bætt í hvert glas. Spunnið var í 6 mínútur við 1300 rpm og botnfalli hellt af. 0,5 mL af þynntri Fix lausn (1/10 fixation buffer, Biolegend, á móti PBS) var bætt úti tilraunaglösin fyrir utanfrumulitun og stillingarglös. Þau voru síðan keyrð í frumflæðisjá.

## 2.4 Innanfrumulitun

Sýni fyrir innanfrumulitun voru undirbúin á sama hátt og gert var í utanfrumulitun. Þrjú tilraunaglös voru undirbúin fyrir hverja rækt og lituð með eftirfarandi mótefnum;

- Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Mouse anti-human CD127, HIL-7R-M21, BD Biosciences
- Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Mouse anti-human FOXP3, 259D/C7, BD Biosciences
- Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Mouse IgG1,  $\kappa$  Isotype Ctrl (FC), MOPC-21, BioLegend
- APC/Cy7 anti-human CD8a, RPA-T8, BioLegend
- FITC anti-human CD25, BC96, BioLegend
- Pacific Blue<sup>™</sup> anti-human CD4, RPA-T4, BioLegend
- Pacific Blue<sup>™</sup> anti-human FOXP3, 206D, BioLegend
- PE/Cy7 anti-human CD4, RPA-T4, BioLegend
- Phycoerythrin (PE) anti-human CCR10, 314305, R&D systems

**Tafla 2. Samsetning flúormerktra mótefna í FACS- glösum í innanfrumulitun.**

Litir	Glas 1	Glas 2	Glas 3
FITC	CD25	CD25	CD25
PE	CCR10	CCR10	CCR10
APC/AF647	CD127	mIgG1	Foxp3
Pacific Blue	Foxp3	Foxp3	CD4
PE/Cy7	CD4	CD4	
APC/Cy7	CD8	CD8	

Í stað þess að leysa sýnin upp í 0,5 mL af Fix lausn í lokin, var 0,5 mL af Cytifix/cytoperm (fixation and permeabilization solution, BD Biosciences) bætt út í og sýnin geymd í 20 mínútur í myrkvi. Sýnin voru þar næst spunnin í 6 mínútur við 1300 rpm og flot tekið með pípettu. 1 mL af þynntum Perm buffer (Permeabilization wash buffer, BioLegend), 1/10 á móti dH<sub>2</sub>O, var bætt í hvert mæliglas og spunnið sem fyrr. Botnfall var síðan leyst upp í 100  $\mu$ L af sama Perm buffer. 5  $\mu$ L af FoxP3 og mIgG1 var bætt í viðeigandi glös. Mæliglösín voru síðan öll geymd í myrkri í 30 mínútur. 1 mL af Perm buffernum var síðan bætt í, spunnið sem fyrr og hellt af. Botnfallið var leyst upp í 300  $\mu$ L af Perm buffer og keyrð í frumuflæðisjá.

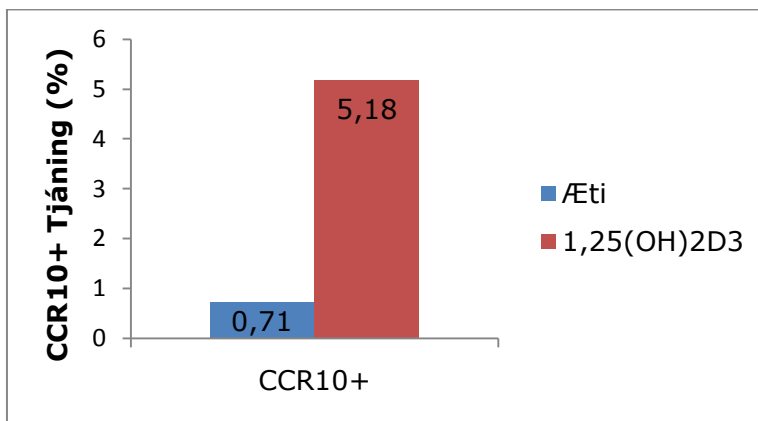
## **2.5 Keyrsla sýna í frumuflæðisjá og gagnavinnsla**

Sýni undirbúin með innan- eða utanfrumulitun voru keyrð í gegnum MACS Quant flæðifrumusjá (Miltenyi Biotec). Tækið telur og flokkar frumur eftir mismunandi eiginleikum. Í þessari rannsókn voru frumur flokkaðar eftir tjáningu innanfrumu- og yfirborðssameinda. Með aðferðum lýst í kafla 2.3, utanfrumulitun, og 2.4., innanfrumulitun, voru ákveðnar sameindir T-frumna merktar með flúormerktum mótefnum. Sýnin voru keyrð í gegnum MACS Quant tæki þar sem leysigeyslum er beint að frumunum og endurkast flúorljómunar greind. Þetta gefur upplýsingar um hvaða frumur tjá merktu viðtaka. Eftir keyrslu sýna í gegnum MACS Quant voru gögnin færð yfir á tölvutækt form og tjáning sameinda greind með hjálp gagnaforrítsins FlowJo.

### 3 Niðurstöður

#### 3.1 Heildartjáning CCR10

Heildartjáning á viðtakanum CCR10 var reiknuð í prósentum fyrir T-frumur ræktaðar með og án 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (mynd 6). Samanburðurinn sýnir marktæka aukningu á CCR10 tjáningu hjá þeim T-frumum sem fengu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> á sjötta degi ræktunar. Að meðaltali sýndu 5,18% T-frumna, ræktaðar með 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, tjáningu á CCR10 viðtakanum. Aftur á móti sýndu að meðaltali 0,17% T-frumna úr viðmiðunarrækt tjáningu á CCR10.

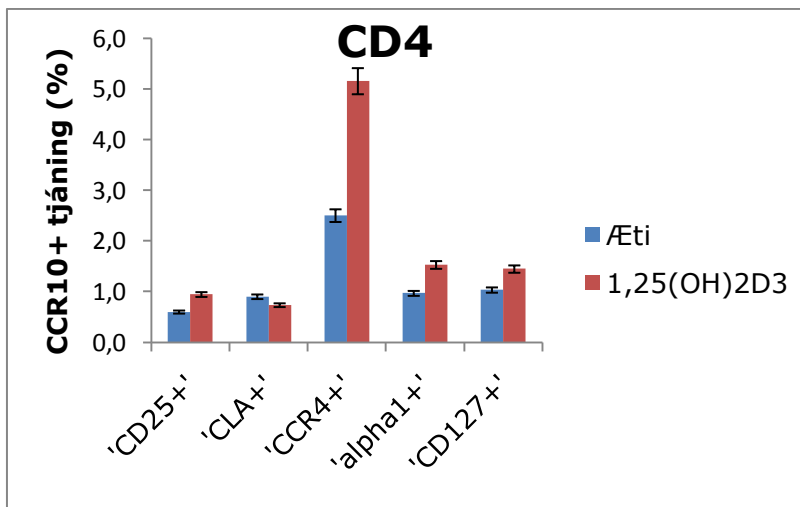


Mynd 6. Heildartjáning CCR10 á T-frumum ræktaðar með og án 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

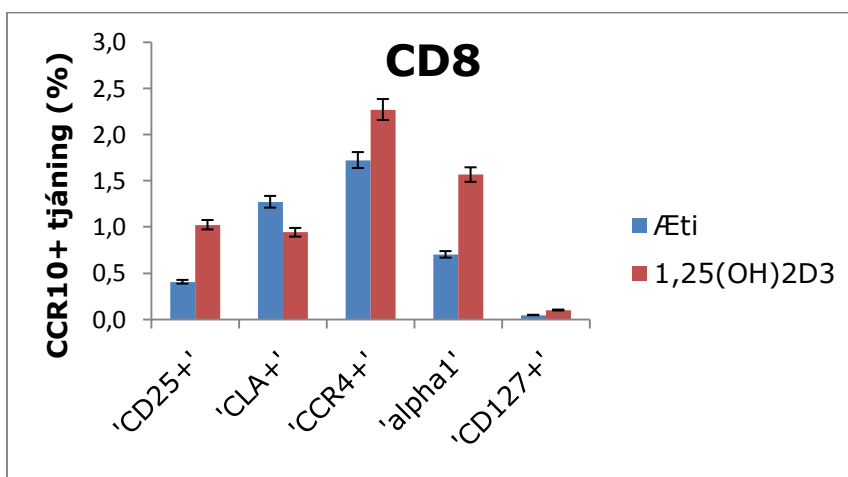


### 3.2 Tjáning CCR10 á CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-frumum

Myndir 7 og 8 sýna CCR10 tjáningu hjá CD4<sup>+</sup> eða CD8<sup>+</sup> T-frumum sem ræktaðar voru með og án 1,25(OH)<sub>2</sub>D3. CCR10 tjáning er gefin sem prósentu af T-frumum sem sýndu tjáningu á CCR10 ásamt CD25/CLA/CCR4/α1 eða CD127. Marktækur munur sést á tjáningu CCR10 í nærveru 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 hjá öllum flokkum nema CLA<sup>+</sup> T-frumum þar sem tjáning CCR10 er meiri hjá viðmiðunarrækt. Mesta tjáning á CCR10 sást hjá CCR4<sup>+</sup> T-frumum. 5,16% CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-frumna tjáðu CCR10 (mynd 7) og 2,27% CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-frumna (mynd 8). Um 1% CD25<sup>+</sup> frumna tjáðu einnig CCR10 hjá CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> T-frumum. Tjáning CCR10 hjá α1<sup>+</sup> T-frumum var líka svipuð fyrir CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> hópanna, eða um 1,5%. Tjáning CCR10 hjá CD127<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-frumum er lítil eða 0,1% samanborið við 1,5% hjá CD127<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>.

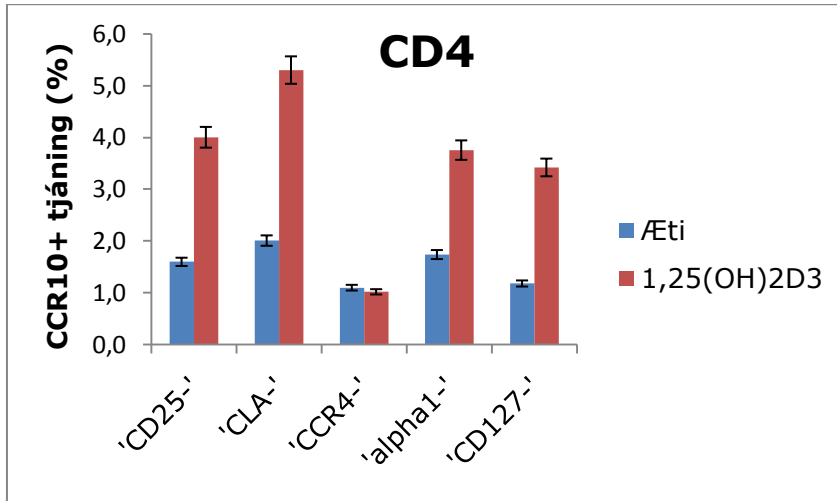


Mynd 7. Tjáning CCR10 (%) ásamt CD25<sup>+</sup>/CLA<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup>/α1<sup>+</sup> og CD127<sup>+</sup> hjá CD4<sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með og án 1,25(OH)<sub>2</sub>D3.

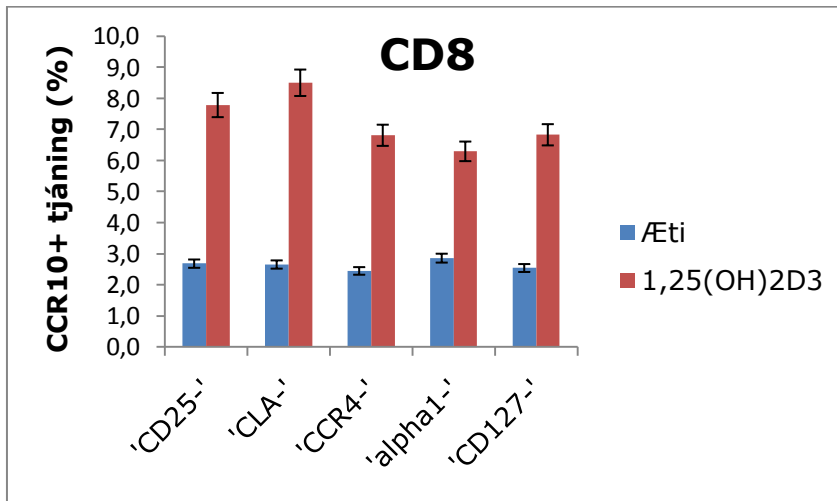


Mynd 8. Tjáning CCR10 (%) ásamt CD25<sup>+</sup>/CLA<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup>/α1<sup>+</sup> og CD127<sup>+</sup> á CD8<sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með og án 1,25(OH)<sub>2</sub>D3.

Myndir 9 og 10 sýna hve mörg prósent T-frumna sýndu CCR10 tjáningu án þess að tjá CD25/CLA/CCR4/ $\alpha$ 1 eða CD127. Marktækur munur sést á tjáningu CCR10 hjá 1,25(OH)<sub>2</sub>D3 rækt og viðmiðunarhóp hjá öllum hópum nema CCR4<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-frumum. Hins vegar sýndu CCR4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-frumur aukna tjáningu á CCR10 með 1,25(OH)<sub>2</sub>D3, eða 6,81%. CCR10 tjáning var meiri hjá öllum flokkum fyrir CD8<sup>+</sup> T-frumur. Þar fór CCR10 tjáning aldrei yfir 3% hjá viðmiðunarhópum en var á bilinu 6,3% ( $\alpha$ 1<sup>-</sup>) og upp í 8,5% (CLA<sup>-</sup>). Tjáning á CCR10 var einnig hæst fyrir CLA<sup>-</sup> af CD4<sup>+</sup> T-frumum eða 5,3%.



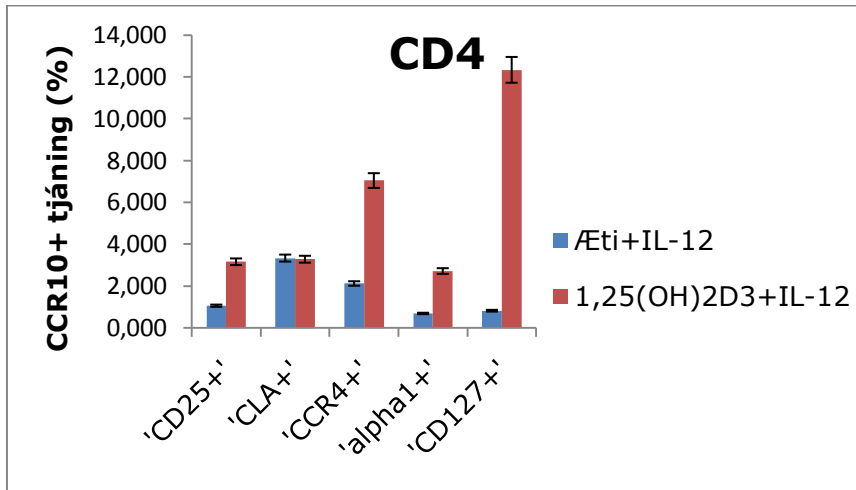
Mynd 9. Tjáning CCR10 á CD25<sup>-</sup>/CLA<sup>-</sup>/CCR4<sup>-</sup>/ $\alpha$ 1<sup>-</sup> og CD127<sup>-</sup> á CD4<sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með og án 1,25(OH)<sub>2</sub>D3.



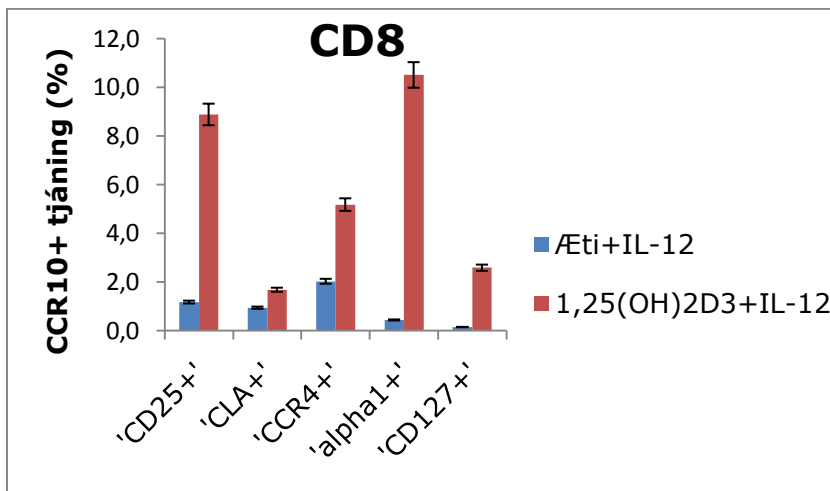
Mynd 10. Tjáning CCR10 á CD25<sup>-</sup>/CLA<sup>-</sup>/CCR4<sup>-</sup>/ $\alpha$ 1<sup>-</sup> og CD127<sup>-</sup> á CD8<sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með og án 1,25(OH)<sub>2</sub>D3.

### 3.3 Tjáning CCR10 með IL-12

Myndir 11-14 sýna CCR10 tjáningu hjá T-frumum ræktaðar með IL-12. Tjáning CCR10 er há hjá CD127<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-frumum, 12,3% (mynd 11) en aðeins 2,6% hjá CD127<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-frumum (mynd 12). Tjáning CCR10 hjá CCR4<sup>+</sup> T-frumum er 7% hjá CD4<sup>+</sup> og 5,2% hjá CD8<sup>+</sup> T-frumum. Enginn munur sést á CCR10 tjáningu milli viðmiðunarstofns og 1,25(OH)2D3 hjá CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-frumum en marktækur munur sést á CD8<sup>+</sup> T-frumum. CD8<sup>+</sup> T-frumur eru með hæstu CCR10 tjáningu á α1<sup>+</sup> (10,5%) og CD25<sup>+</sup> T-frumum (8,9%).

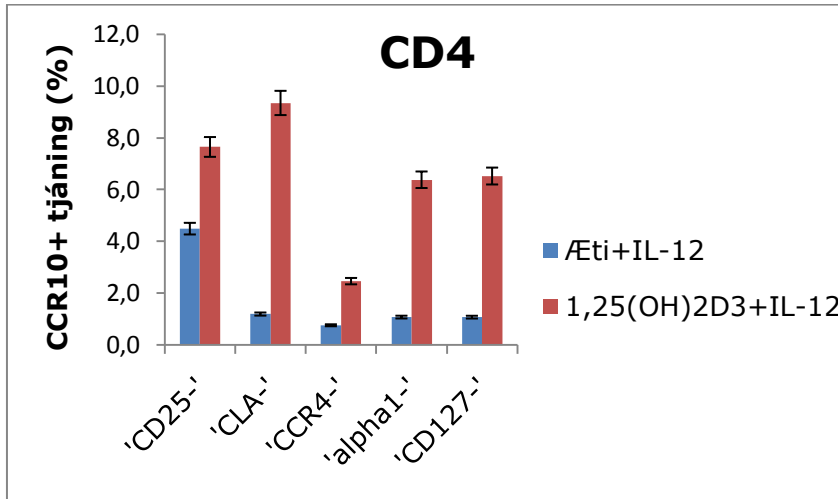


Mynd 11. Tjáning CCR10 ásamt CD25<sup>+</sup>/CLA<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup>/α1<sup>+</sup> og CD127<sup>+</sup> á CD4<sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með IL-12 og með/án 1,25(OH)<sub>2</sub>D3.

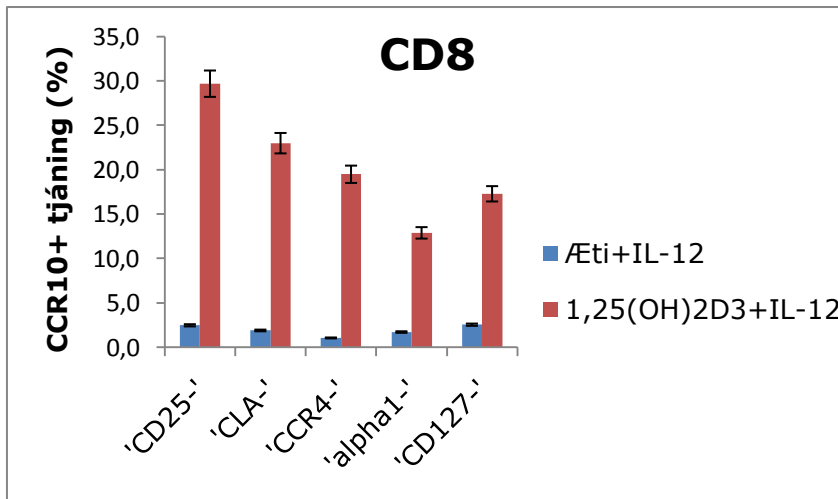


Mynd 12. Tjáning CCR10 ásamt CD25<sup>+</sup>/CLA<sup>+</sup>/CCR4<sup>+</sup>/α1<sup>+</sup> og CD127<sup>+</sup> á CD8<sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með IL-12 og með/án 1,25(OH)<sub>2</sub>D3.

Myndir 13 og 14 sýna hve mörg prósent T-frumna sýndu CCR10 tjáningu án þess að tjá CD25/CLA/CCR4/ $\alpha$ 1 eða CD127. Marktæk aukning á CCR10 tjáningu sást hjá öllum 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hópum. CD4<sup>+</sup> T-frumur sýndu hæstu CCR10 tjáningu (9,3%) á CLA<sup>-</sup> T-frumum. CD4<sup>+</sup> T-frumur sýndu einnig háa CCR10 tjáningu á CD25<sup>-</sup>/ $\alpha$ 1<sup>-</sup> og CD127<sup>-</sup> (6,4-7,6%) en 2,5% CCR4<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-frumna tjáðu CCR10 (mynd 13). CD8<sup>+</sup> T-frumur sýndu háa tjáningu á CCR10 hjá öllum hópum, 12,9% á  $\alpha$ 1<sup>-</sup> uppí 29,7% á CD25<sup>-</sup>.



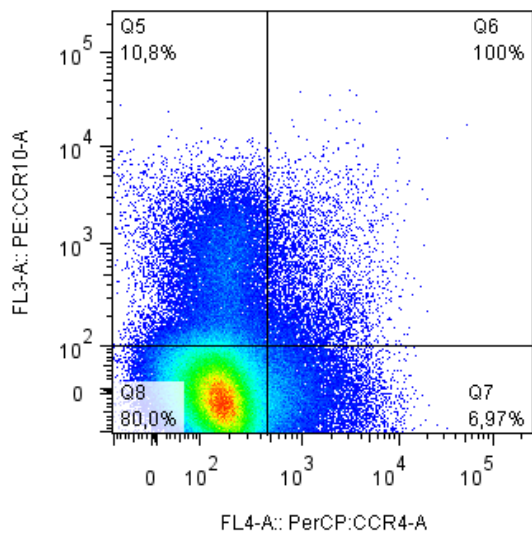
Mynd 13. Tjáning CCR10 á CD25<sup>-</sup>/CLA<sup>-</sup>/CCR4<sup>-</sup>/ $\alpha$ 1<sup>-</sup> og CD127<sup>-</sup> á CD4<sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með IL-12 og með/án 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.



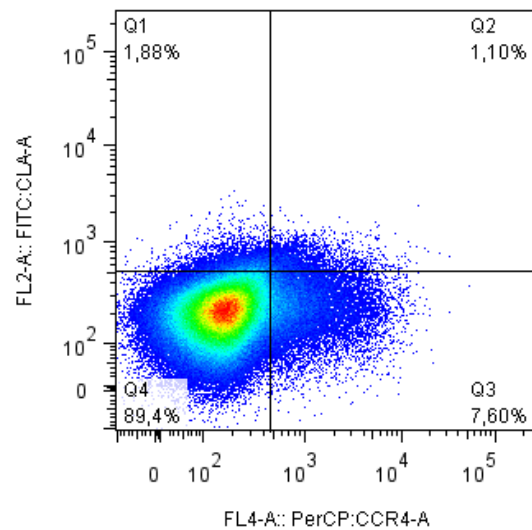
Mynd 14. Tjáning CCR10 á CD25<sup>-</sup>/CLA<sup>-</sup>/CCR4<sup>-</sup>/ $\alpha$ 1<sup>-</sup> og CD127<sup>-</sup> á CD8<sup>+</sup> T-frumum ræktaðar með IL-12 og með/án 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

### 3.4 FlowJo myndvinnsla

Gagnaforritið FlowJo var notað við úrvinnslu gagna og til að reikna niðurstöður. Myndir 15 og 16 eru dæmi um hvernig þetta var gert. Mynd 15 sýnir tjáningu CCR10 á móti CCR4 í stofni sem fékk 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. X-ás sýnir CCR4 tjáningu á frumum og y-ás sýnir CCR10 tjáningu. Krossinn er dreginn út frá viðmiðunarsýni þar sem engin binding ætti að eiga sér stað. Eftir því sem punktarnir dragast lengra eftir x-ásnum, þeim mun sterkari tjáning er á CCR4. Það sama gildir fyrir CCR10. Punktarnir sem falla hægra megin að ofan flokkast sem tvíjákvæðir og tjá þá bæði CCR10 og CCR4. 10,8% frumna voru CCR4<sup>-</sup>CCR10<sup>+</sup> og 2,23% frumna voru CCR4<sup>+</sup>CCR10<sup>+</sup>. Mynd 16 er sambærileg en sýnir CLA tjáningu á móti CCR4 í 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> rækt. 1,88% frumna voru CCR4<sup>-</sup>CLA<sup>+</sup> og 1,10% voru CCR4<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>.



**Mynd 15. CCR10 á móti CCR4 í 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stofni.**



**Mynd 16. CLA á móti CCR4 í 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stofni.**

## 4 Umræður og ályktanir

T-frumur eru á sífelldri hringrás, í gegnum blóðrás og vessakerfið, og nauðsynlegt er að skilja hvaða þættir stjórna ratvísi þeirra. Þessi rannsókn var gerð með því markmiði að skoða nokkra þætti sem að hafa áhrif á ratvísi T-frumna til húðar eftir ræsingu. Sýnt var fram á að 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hvetur tjáningu viðtakans CCR10 á yfirborði T-frumna (mynd 6). Fyrri rannsóknir hafa sýnt fram á að 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> örvi myndun á T-stýrifrumum (Gregori et al., 2001). Tilgátan var því sú að CCR10, sem er tjáður vegna áhrifa frá 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, beri einkenni T- stýrifrumna.

Tjáning CCR10 var skoðuð út af fyrir sig hjá CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> T-frumum og í sambandi við aðra þætti sem vitað er að hafi áhrif á íferð T-frumna til húðar. CCR4<sup>+</sup> T-frumur sýndu mesta tjáningu á CCR10 hjá bæði CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> T-frumum (myndir 7 og 8). CD8<sup>+</sup> T-frumur í viðmiðunarrækt sýndu einnig mikla CCR10 tjáningu en marktækur munur var þó frá 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> rækt. Tjáning CCR10 virðist vera í samræmi við tjáningu CCR4 á CD4<sup>+</sup> T-frumum þar sem engin tjáning sást á CCR4<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-frumum samanborið við viðmiðunarhóp. Þessar niðurstöður eru í samræmi við þekkt hlutverk CCR4 viðtakans við færslu T-frumna til húðar. Það á ekki við um CD8<sup>+</sup> T-frumur þar sem tjáning var meiri á CCR4<sup>-</sup> T-frumum. Ekki er fullvíst af hverju CCR4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T-frumur sýna jafn mikla CCR10 tjáningu og raun ber vitni. Hugsanlegt er að CCR4 tjáningin hafi dottið niður eftir allan þann tíma sem að ræktin tók. CCR4 er þar af leiðandi meira tjáð af CD4<sup>+</sup> T-frumum og mögulegt er að CD8<sup>+</sup> T-frumum hafi annan óþekktan húðsértækan viðtaka.

CCR10 tjáning fór ekki saman með tjáningu CLA eins og búast mætti við þar sem CLA er nauðynlegt fyrir viðloðun T-frumna við æðaveggi sem leiðir til færslu þeirra inn í húð. Hugsanleg ástæða þessa er sú að T-frumurnar voru ræktaðar í 12 daga eftir ræsingu og tjáning CLA gæti verið lokið. Þetta er í samræmi við röð atburða þar sem CLA gegnir hlutverki snemma eftir ræsingu T-frumna en hefur lokið hlutverk sínu þegar T-fruman er komin inn í leðurhúð. Þá tekur við staðfæring frumnanna til yfirhúðar sem CCR10 miðlar ásamt fleiri þáttum.

Sameindirnar CD25<sup>há</sup> og CD127<sup>lág</sup> eru þekktar fyrir að einkenna CD4<sup>+</sup> T-stýrifrumur. α1 sameindin er hins vegar ekki tjáð á T-stýrifrumum. Því kemur á óvart að tjáning CCR10 á CD25<sup>+</sup> og α1<sup>+</sup> frumum var svipuð fyrir bæði CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> (myndir 7 og 8). Hins vegar var meiri CCR10 tjáning á CD127<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> sem er ekki í samræmi við það að lág CD127 tjáning sé einkennandi fyrir CD4<sup>+</sup> T-stýrifrumur. Tjáning CCR10 var þó hærri á CD25<sup>-</sup> og CD127<sup>-</sup> hjá bæði CD4<sup>+</sup> og CD8<sup>+</sup> hópum. Tjáningin reyndist vera helmingi hærri hjá CD8<sup>+</sup> T-frumum fyrir bæði CD25<sup>-</sup> og CD127<sup>-</sup>. Þetta gefur til kynna að tjáning CCR10 virðist ekki vera tengd T-stýrifrumum með CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lág</sup> svipgerð.

Til samanburðar voru T-frumur einnig ræktaðar í nærveru IL-12. Þetta var gert til að skapa aðstæður sem líkjast bólgum í líkamsvefjum. Ýmsar breytingar sást á tjáningu CCR10. Tjáning á CD127<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-frumum fór uppí 12,3% samanborið við 1,5% í ræktun án IL-12. Þetta styður þá tilgátu að CCR10 tjáning sé ekki tengd T-stýrifrumum þar sem þær einkennast af lágri tjáningu á CD127. Tjáning jókst líka á CD8<sup>+</sup> T-frumum. Þá sérstaklega hjá  $\alpha 1^+$  (10,5%) og CD25<sup>+</sup> (8,9%) T-frumum. Þetta ýtir undir þá tilgátu að tjáning CCR10 sé ekki tengd CD4<sup>+</sup> T-stýrifrumum. Hærri tjáning á CCR10 sást hjá öllum frumuhópum sem fengu meðferð með IL-12. Aukningin var meiri fyrir CD8<sup>+</sup> T-frumur en CD4<sup>+</sup>. Við keyrslu sýna í frumflæðisjá sást mikill munur á frumfjölda milli sýna ræktuðum með og án IL-12. Frumuræktir með IL-12 voru með talsvert færri frumur og því ríkir meiri óvissa um þær niðurstöður og erfiðara að draga ályktanir út frá þeim.

Innanfrumulitun var einnig framkvæmd á 12. degi ræktunar og sýnin keyrð í gegnum flæðifrumusjá. Ekki fengust marktækar niðurstöður. Ástæða þess er óljós en má rekja til ófullkominnar aðferðarfræði. Vert er því að benda á að ef tilraunin verður endurtekin þyrfti að betrumbæta þá aðferð sem notuð var við innanfrumulitun.

Næsta skref í rannsóknarferlinu væri að finna út af hverju innanfrumulitun tókst ekki og endurtaka hana með breyttri aðferðarfræði. Þær niðurstöður gætu varpað frekari ljósi á það hvort CCR10 tjáning sé tengd T-stýrifrumum þar sem litað var fyrir umritunarþættinum Foxp3 sem er sértækt tjáður af T-stýrifrumum. Síðan mætti einangra CCR10<sup>+</sup> T-frumur, rækta þær með öðrum frumum og athuga hvort þær hafi einhver áhrif á fjölgun þeirra. Á þennan hátt væri hægt að staðfesta hvort þær séu T-stýrifrumur.

Nauðsynlegt er að skilja til fulls færslu T-frumna til húðar og þá þætti sem að stjórna því. Til þess þarf að rannsaka þær sameindir sem koma við sögu og hlutverk þeirra í ferlinu. Þessa þekkingu er hægt að nýta á margvíslegan hátt. Sem dæmi má nefna þróun betri meðferða gegn húðsjúkdómum á borð við psoriasis sem er bólgusjúkdómur og einkennist af íferð T-frumna til húðar. Þau lyf sem notuð eru í dag eru ónæmisbælandi en í stað þess að verka aðeins á ákveðinn hluta líkamans, í þessu tilviki húðina, bæla þau ónæmiskerfið á stærra svæði og eru því slæm til langtímanotkunar. Því er mikilvægt að hægt sé að þróa ónæmisbælandi lyf sem að verka aðeins í húðinni en bæla ekki þá nauðsynlegu starfsemi sem ónæmiskerfið gegnir annars staðar í líkamanum. Verið er að rannsaka margs konar leiðir til að ná þessu fram. Einn möguleiki er að hindra far T-frumna inní yfirhúðina. Þessu er hægt að ná fram með því að bæla tjáningu CCR10 á T-frumum eða með því að bæla myndun eða seytun CCL27 af hyrnisfrumum (Sigmundsdóttir, 2010). Hér hefur verið sýnt fram á að 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hvetur tjáningu CCR10 á T-frumum og hvetur þannig far þeirra til yfirhúðar. Þær upplýsingar er hægt að nýta við áframhaldandi rannsóknir á ratvísi T-frumna til húðar.

# Heimildir

- Banchereau, J. og Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F. og Ramsdell, F. (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* **27**, 68-73.
- Cozzo, C., Larkin III., J. og Caton, A.J. (2003) Cutting Edge: Self-Peptides Drive the Peripheral Expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* **171**, 5678-5682.
- Finch, J.L., Brown, A.J. og Slatopolsky, E. (1999) Differential Effects of 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 and 19-Nor-1,25-Dihydroxy-Vitamin D2 on Calcium and Phosphorus Resorption in Bone. *Journal of the American Society of Nephrology* **10**, 980-985.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt og E., et al. (2007) Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biology* **5** (2), e38.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A. og Rudensky, A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunology* **4** (4), 330-336.
- Gregori, S., Casorati, M., Amuchastegui, S., Smiroldo, S., Damalli, A.M. og Adorini, L. (2001) Regulatory T cells induced by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *Journal of Immunology* **167**, 1945-1953.
- Homey, B. et al. (2000). Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *The Journal of Immunology* **164**, 3465-3470.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S. Wolf, S.F., O'Garra, A. og Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T-cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260** (5107), 547-549.
- Huang, V., Lonsdorf, A.S., Fang, L., Kakinuma, T., Lee, V.C., Cha, E., Zhang, H., Nagao, K., Zaleska, M., Olszewski, W.L. og Hwang, S.T. (2008). Cutting edge: rapid accumulation og epidermal CCL27 in skin-draining lymph nodes following topical application of a contact sensitizer recruits CCR10-expressing T cells. *Journal of Immunology* **180**, 6462-6466.



- Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A. og Ramsdell, F. (2003) An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nature Immunology* **4** (4), 337-342.
- Lehmann, B. (2008). Role of the vitamin D<sub>3</sub> pathway in healthy and diseased skin – facts, contradictions and hypotheses. *Experimental Dermatology* **18**, 97-108.
- Leung, D.Y.M, Gately, M., Trumble, A., Ferguson-Darnell, B., Schlievert, P.M. og Picker, L.J. (1995). Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *The Journal of Experimental Medicine* **181** (2), 747-753.
- Liu et al. (2006a) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> Treg cells. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 1701–1711.
- Liu et al. (2006b). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **311** (5768), 1770-1773
- Mora, J.M. og von Andrian, U.H. (2006). T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends in Immunology* **27** (5), 235-243.
- Morales, J. et al. (1999). CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96** (25), 14470-14475.
- Murphy, K., Travers, P. og Walport, M. (2008). *Janeway's immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York USA, London UK.
- Perros, F., Hoogsteden, H.C., Coyle, A.J., Lambrecht, B.N. og Hammad, H. (2009) Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. *Allergy* **64**, 995-1002.
- Prosser, D.E. og Jones, G. (2004). Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends in Biochemical Sciences* **29** (12), 664-673.
- Reiss, Y., Proudfoot A.E., Power, C.A., Campbell, J.J. og Butcher, E.C. (2001) CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *The Journal of Experimental Medicine* **194** (10), 1541-1547.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., Kelleher, A. og Fazekas de St. Groth, B. (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *Journal of Experimental Medicine*, **203** (7), 1693-1700.

- Sigmundsdóttir, H. (2010). Improving tropical treatments for skin diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* **31** (6), 239-45.
- Sigmundsdóttir, H. og Butcher, E.C. (2008). Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nature Immunology* **9** (9), 981-987.
- Sigmundsdóttir, H., Pan, J., Debes, G.F., Alt, C., Habtezion, A., Soler, D. og Butcher, E.C. (2007). DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nature Immunology* **8** (3), 285-293.
- Simonetta, F., Chiali, A., Cordier, C., Urrutia, A., Girault, I., Bloquet, S., Tanchot, C. og Bourgeois C. (2010) Increased CD127 expression on activated Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *European Journal of Immunology* **40** (9), 2528-2538.
- Soler, D., Humphreys, T.L., Spinola, S.M. og Campbell, J.J. (2003) CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *The American Society of Hematology* **101** (5), 1677-1683.
- Yang, Q., Bell, J. J. og Bhandoola, A. (2010). T-cell lineage determination. *Immunological Reviews* **238**, 12-22.

