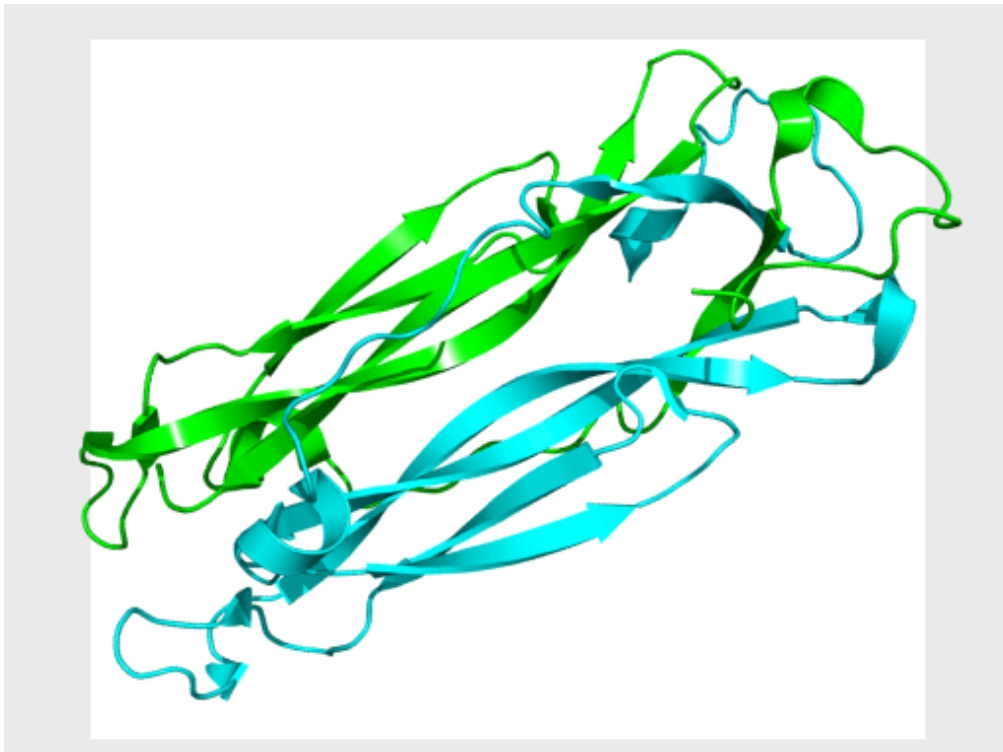


---

# *IL-17A* - En vej til kuren mod kontaktallergi?

---



Projekt Forskerspirer 2023	
Titel	<i>IL-17A</i> - En vej til kuren mod kontaktallergi?
Identifikationskode	MD66
Navn	Mollie Dyrehave
Gymnasium	Roskilde Katedralskole
Fagområde	SUND

## Indholdsfortegnelse

Indledning.....	3
Problemformulering, formål og relevans .....	4
Afgrænsning.....	5
Teori .....	6
Allergi.....	6
Cytokiner .....	7
Metodevalg.....	8
Fremgangsmåde .....	9
Budget estimat .....	11
Tidsramme .....	11
Konklusion og perspektivering .....	12
Kontakt og tak.....	15
Litteraturliste .....	16
Bilag .....	19

*Illustration på forside fra: Interleukin 17A (IL-17A): Description. (s.d.). I: Eos BioAnalytics.*

## Indledning

Alle kender en, der er allergisk over for noget. Jeg er også personligt berørt, da mange i min familie døjer med allergi og sensibilitet, hvorfor jeg gerne vil bidrage til forskningsområdet. Nikkel er den hyppigste årsag til kontaktallergi i hele verden, og findes bl.a. i smykker, pyntegenstande, mønter og værktøj. I Europa har 8-19% af voksne nikkelallergi, og derfor påvirker nikkelallergi dagligt mange mennesker. Nikkelallergi medfører dermatitis, en inflammation i huden, hvor huden hæver, bobler op og bliver rød som resultat af kontakt med metallet. I 1994 indførte EU *Nickel Directive*, som medførte en række love vedrørende grænseværdier for nikkel. Dette har medført et fald i antallet af mennesker med kontaktallergi for nikkel.<sup>1</sup> Dette direktiv er dog kun gældende i EU-landene, og i mange andre lande udsættes arbejdere stadig i stor grad for nikkel. Alligevel findes der i dag ikke et regulært lægemiddel mod kontaktallergi<sup>2,3</sup>, og der er ikke 100% kendskab til mekanismerne i huden, som forårsager inflammationen og symptomerne.<sup>4</sup>

For at etablere en bedre forståelse for disse mekanismer, vil jeg i dette projekt undersøge et af signalstofferne i immunforsvaret. Specifikt vil jeg undersøge signalstoffet *Interleukin-17A* forkortet *IL-17A* sammenhæng med nikkelallergi, og dermed undersøge om *IL-17A* er en af de mekanismer, som forårsager kontaktallergi.

---

<sup>1</sup> Nickel Directive: What is the Nickel Directive?. (s.d.).

<sup>2</sup> I dag er muligheden for behandling kun symptombehandling

<sup>3</sup> Sand, Carsten. (2022, 21. November).

<sup>4</sup> Ahlström, Malin G., Thyssen, Jacob P., Wennervaldt, Michael., Menné, Torkil. & Johansen, Jeanne D.. (2019, 24. Maj).

## Problemformulering, formål og relevans

Et tidligere forsøg lavet af Mraz et al.<sup>5</sup> indikerer at høje niveauer af cytokinet *IL-17A* findes i huden ved kontaktallergi, hvorfor jeg vil undersøge sammenhæng mellem *IL-17A* og kontaktallergi. Et andet forsøg lavet af Todbjerg et al.<sup>6</sup> indikerer desuden at systematisk behandling med *anti-IL-17A*<sup>7</sup> (se bilag 1) medfører en svag reduktion i reaktionen ved nikkelallergi. Derfor er der allerede fastlagt en sammenhæng mellem allergi og *IL-17A*. Dog er denne sammenhæng ikke undersøgt dybere og derfor fokuserer mit projekt på at undersøge hvornår i allergiforløbet, *IL-17A* har indflydelse på den inflammation, der opstår, når allergikere får kontaktallergi forårsaget af nikkel.

Jeg vil arbejde med problemformuleringen:

*Kan man, ved at fjerne cytokinet IL-17A i mus inden sensitization fasen, mindske inflammationen ved kontaktallergi forårsaget af nikkel?*

Viden om sammenhængen mellem *IL-17A*, immunforsvaret og allergiske reaktioner vil kunne bidrage til en basal forståelse af allergi, hvilket i fremtiden vil kunne gavne patienter, der ønsker behandling indenfor immunsygdomme og allergi samt medicinalindustrien.

Sammenhængen mellem *IL-17A* og allergi vil blive undersøgt ved at benytte metoden *fate-reporter* mus, samt en kontaktallergimodel, hvorved jeg lokalt kan fjerne *IL-17A* i musene og herefter udsætte disse mus for nikkel. Herefter vil jeg analysere resultaterne ved at oprense *RNA* og lave en *QPCR* test for at undersøge niveauet af *IL-17A* i musene. Til sidst vil jeg præsentere hypotetisk data, samt fremtidige perspektiver ved projektet.

---

<sup>5</sup> Mraz, Veronika., Geisler, Carsten. & Bonefeld, Charlotte Menné. (2020, 9. Maj).

<sup>6</sup> Todbjerg, Tanja., Zachariae, Claus., Krustrup, Dorrit. & Skov, Lone. (2018, 13. December).

<sup>7</sup> Secukinumab

## Afgrænsning

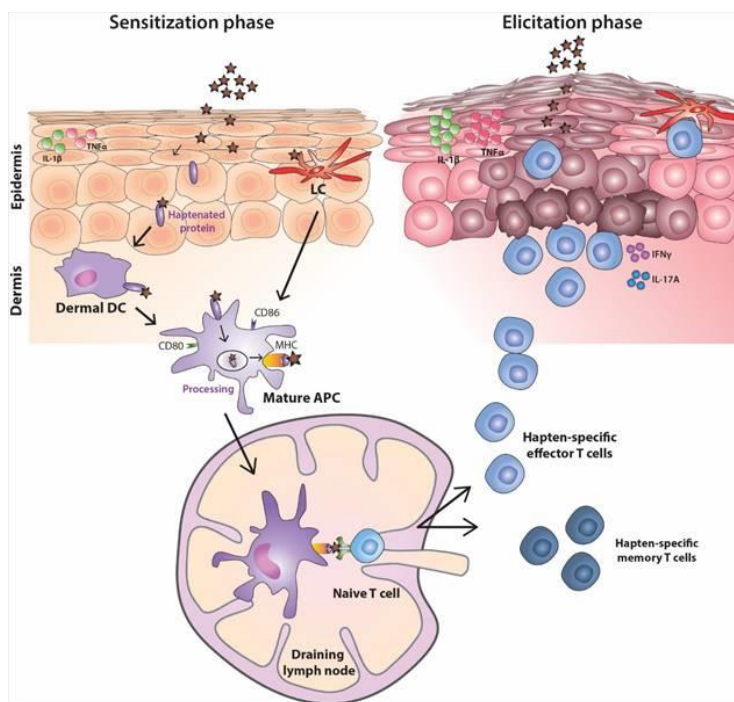
Mit projekt handler om basisforskning, således man kan få mere viden om immunforsvaret i forbindelse med kontaktallergi. Derfor undersøges det ikke hvorvidt *fate-reporter* mus samt kontaktallergimodellen virker, da disse individuelt allerede er testet flere gange i andre forsøg, men blot hvilket resultat, der ville kunne komme ud af undersøgelsen. Mit projekt handler om *IL-17A*, da flere studier peger på at netop *IL-17A* har en forbindelse til allergi. Derfor fokuserer mit studie på at undersøge hvornår i allergiforløbet *IL-17A* har indflydelse på inflammationen. Dette gøres ved at fjerne *IL-17A* før *sensitization* fasen (se teoriafsnit). I mit projekt benytter jeg nikkel som allergen. Dette er valgt ud fra at nikkel i forvejen er grundigt undersøgt, nemt at arbejde med, meget udbredt og derfor relevant. Det er forventet, at andre allergener vil give samme resultat, som nikkel. Jeg undersøger desuden kun allergitype 4 (se teoriafsnit), selvom der findes andre allergityper.

Derudover intenderer jeg ikke at benytte min model til at fremstille medicin mod allergi, selvom dette er en fremtidig mulighed. Endelig omhandler mit projekt hverken de etiske aspekter ved genmodificering af mus, eller økonomiske såvel som juridiske aspekter ved godkendelsen af sådanne forsøg.

# Teori

## Allergi

Allergi er når ens immunforsvar overreagerer på helt almindelige stoffer eller partikler. Allergi er særdeles udbredt i Danmark, da ca. 20-25% af danskerne har det.<sup>8</sup> Der findes forskellige typer allergi, da allergi er opdelt i type I-IV.<sup>9</sup> Kontaktallergi er type IV og denne inflammation i huden opstår kun ved direkte kontakt med allergenet, som eksempelvis når smykker overfører nikkel ioner til huden.<sup>10</sup> Selvom nikkel ikke er farligt for mennesker er det fremmed for kroppen, og derfor nedkæmper immunforsvaret det. Immunforsvaret er opdelt i 2 dele: Det innate og det adaptive immunforsvar. Disse arbejder i de 2 forskellige faser som allergiforløbet for allergi type IV er opdelt i.



Figur 1. Allergiforløbet opdelt i sensitization fasen og elicitation fasen.<sup>11</sup>

Det innate immunforsvar arbejder i *sensitization* fasen, der finder sted første gang man udsættes for et allergen på huden.<sup>12</sup> Se figur 1. I huden aktiveres kroppens innate immunforsvar, som er kroppens medfødte immunforsvar. Her vil eksempelvis hormonet histamin udskilles fra mastcellerne, hvilket skaber hævelse i huden og forårsager udvidelse af blodkarrene, således der dannes en større blodgennemstrømning. Derudover dannes T-celler efter ca. fem dage. T-cellerne tilkalder forskellige celler, som skal uskadeliggøre allergenet ved hjælp af signalstoffer/cytokiner og flere af disse, f.eks. histamin forårsager reaktionen, vi kender som kontaktallergi. Celler kaldet dendritceller tilkaldes også.<sup>13</sup> Disse kan

<sup>8</sup> Küchen, Niels . (2021, 14. December)

<sup>9</sup> Allergireaktioner - hvilke typer findes der?. (s.d.).

<sup>10</sup> Ahlström, Malin G., Thyssen, Jacob P., Wennervaldt, Michael., Menné, Torkil. & Johansen, Jeanne D.. (2019, 24. Maj).

<sup>11</sup> Kongsbak-Wismann, Martin

<sup>12</sup> Ahlström, Malin G., Thyssen, Jacob P., Wennervaldt, Michael., Menné, Torkil. & Johansen, Jeanne D.. (2019, 24. Maj).

<sup>13</sup> Disse kan fagocyttere fremmed materie i kroppen, og dermed er de en af de første celler, som reagerer i det innate immunforsvar.

udsende cytokiner, der fortæller T-cellerne, at de skal blive cytotoksiske, og ved hjælp af antigener og cytokiner kan T-cellerne vide, hvad de skal angribe.<sup>14</sup> Efter *sensitization* fasen forbliver T-cellerne i hudområdet og husker allergenet.<sup>15</sup>

Næste gang hudområdet udsættes for allergenet finder *elicitation* fasen sted. Se figur 1. Det adaptive immunforsvar er den primære faktor i denne fase og består af blandt andet T- og B-celler. T-cellerne aktiverer B-celler og T-celler kan dræbe og huske antigener, fra det fremmede i kroppen, mens B-celler danner og udskiller antistoffer mod det fremmede.<sup>16</sup> Da T-cellerne allerede er i huden ved *elicitation* fasens start, reagerer de langt hurtigere end ved første kontakt, og de mange forskellige celler fra immunforsvaret tilkaldes til området, hvilket ofte vil skabe en voldsommere reaktion, som kommer til udtryk i huden i form af rødme og kløe.<sup>17</sup>

### Cytokiner

Cytokiner, som også kaldes signalstoffer, indgår som en del af immunforsvaret og er små proteiner. Cytokiner udskilles af celler, til kommunikation mellem forskellige celler i immunforsvaret og derfor findes der også mange forskellige cytokiner. Et af disse cytokiner er *IL-17A*, som er vigtig i bekæmpelsen af svampeinfektioner i kroppen, men som også spiller en rolle i inflammationen, der opstår ved allergi type IV. *IL-17A* er et af de signalstoffer, som sættes i gang når T-celler reagerer på et allergen.<sup>18,19</sup> Dermed findes *IL-17A* allerede i hudområdet ved *elicitation* fasens start. Hvad *IL-17A* specifikt gør i immunforsvaret andet end at påvirke området, som er udsat for et allergen, ved man ikke.

---

<sup>14</sup> Allergi – når immunsystemet angriber dig!: Når alle sikkerhedsforanstaltninger brister. (s.d.).

<sup>15</sup> Funch, Anders Boutrup . (2021, 3. November).

<sup>16</sup> Bruun, K., Geertsen, P. B. & Helmig, K. (2011).

<sup>17</sup> Kongsbak-Wismann, Martin

<sup>18</sup> IL-17A Human: Function. (s.d.).

<sup>19</sup> Interleukin 17A (IL-17A): Description. (s.d.).

## Metodevalg

Fremgangsmåden er deduktiv, og kontaktallergimodellen er valgt, da det er denne metode man oftest benytter, når man tester for kontaktallergi. Modellen giver mulighed for at smøre mange forskellige allergener på musenes ører, og man kan benytte forskelligt slags genmanipulerede mus efter eget ønske. Dette giver talrige muligheder for at påvirke mange forskellige variabler i undersøgelser af kontaktallergi.

Modellen med *fate-reporter* mus<sup>20</sup> er valgt af flere grunde. Mus er valgt på baggrund af, at deres immunforsvar ligner menneskers immunforsvar, samt at hele immunforsvaret og ikke en enkelt celle giver det bedste sammenligningsgrundlag med mennesker. Fordelen ved *fate-reporter* mus er, at der i musens genom er indsat genet, der koder for difteria toxin receptoren (DTR) i sammenhæng med det gen, der koder for *IL-17A*. (Se bilag 2). Det vil sige, man har designet *fate-reporter* musene ved at krydse genet for *IL-17A* med genet for DTR<sup>21</sup>. Derfor kan man lave et meget specifikt celledrab af *IL-17A* producerende celler, ved injicering af difteria toxin (DT) på præcis dét tidspunkt, man ønsker.<sup>22</sup> Dette er en fordel, da mit projekt ønsker at fjerne *IL-17A* fra musene lige før forsøget, men ikke i hele musens levetid op til forsøget, som ville være tilfældet med en mus genmanipuleret til ikke at have *IL-17A*. Dette gør de forskellige forsøgsgrupper mere sammenlignelige. Metoden lægger også op til at kunne lave andre fremtidige forsøg, hvor man på andre tidspunkter, i enten *sensitization* fasen eller *elicitation* fasen, laver et knockout af *IL-17A*, og undersøger indvirkningen på allergi ved dette.

En ulempe ved forsøget er, at teorien på området er begrænset, og derfor kan metoden slå fejl, eller der kan opstå uforudsete hændelser, da der kan være andre ukendte faktorer, der spiller ind på *IL-17A*, som jeg ikke har kunnet medregne i forsøgsopsætningen. Dette ville derfor kunne påvirke resultaterne i ukendt retning.

Til at analysere resultaterne måler jeg musenes øretykkelse før, under og efter forsøget, hvilket benyttes til at måle, hvor voldsom en allergisk reaktion musene har. Samtidig viser musenes øretykkelse om manglen på *IL-17A* ved *sensitization* fasen ændrer på inflammationen ved allergi. Jeg vil benytte *quantitative-PCR (QPCR)* til at tjekke om behandlingen med DT har fjernet alt *IL-17A*. Dette er et kontrolforsøg, for at tjekke om DT behandlingen er lykkedes.

---

<sup>20</sup> Fate-reporter mus er mus, som er genmanipuleret til at have en difteria toxin receptor (DTR) på visse celler i kroppen.

<sup>21</sup> Vesely, Maria Carolina Amezcua., Pallis, Paris., Bielecki, Piotr., Esplugues, Enric ., Gagliani, Nicola. & Flavell, Richard A. . (2019, 22. August).

<sup>22</sup> Hvis en celle i musen på et tidspunkt udtrykker eller har udtrykt *IL-17A* i sin levetid vil den også udtrykke DTR. Hvis man i sådan en mus injicerer difteria toxinet, vil toxinet optages i alle cellerne, der udtrykker receptoren og dermed dør alle de celler, der udtrykker *IL-17A*. Det er dermed muligt at slå alle de celler, der er *IL-17A* producerende, ihjel.

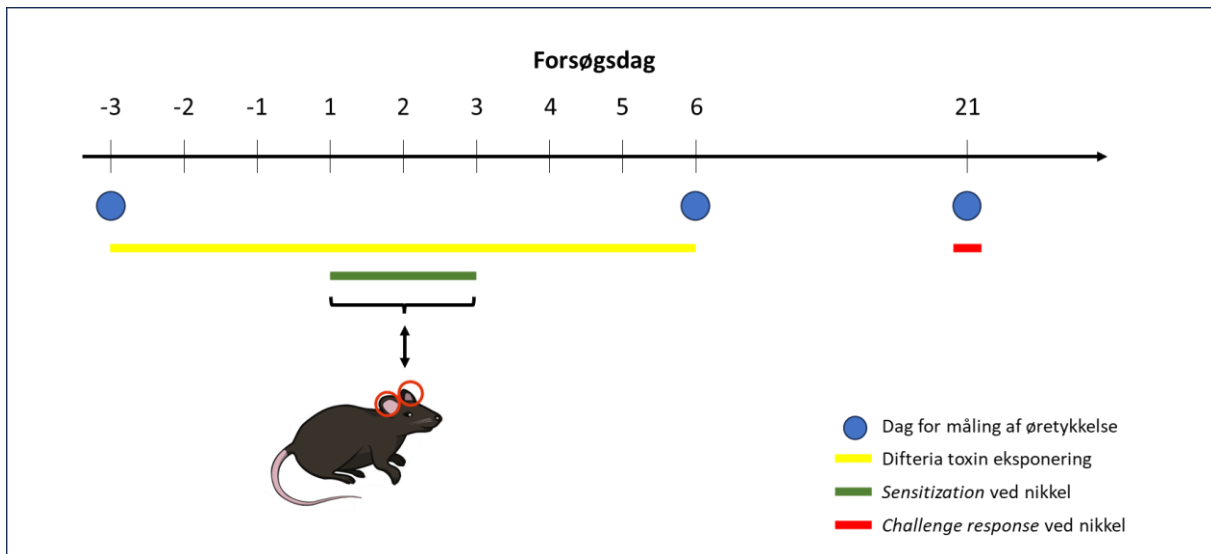


## Fremgangsmåde

Table 1. Oversigt over forløbet for kontakt-allergi forsøg på *IL-17A conditional knockout* mus.

Step	Beskrivelse									
Køb af <i>fate-reporter</i> mus	Fate-reporter mus med genet for <i>IL-17A</i> krydset med genet for DTR bestilles.									
Måling af ører (angivet med blå i figur 2)	Musenes øretykkelse måles, således man kan se, om der er ændring under forsøget.									
DT behandling (angivet med gul i figur 2)	<p>Kontaktallergimodellen anvendes. Musene opdeles i 4 grupper af 4:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- En gruppe, der behandles med DT og nikkel.</li> <li>- En anden gruppe behandles kun med nikkel.</li> <li>- En tredje gruppe behandles med en olivenolie-acetone blanding (Oliv.) og DT.</li> <li>- En fjerde gruppe behandles kun med en olivenolie-acetone blanding.</li> </ul> <table border="1" data-bbox="501 734 1426 884"> <thead> <tr> <th></th> <th>DT</th> <th>Uden DT</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Nikkel påsmøres</td> <td>Nikkel/DT</td> <td>Nikkel</td> </tr> <tr> <td>Olivenerolie-Acetone påsmøres</td> <td>Oliv./DT</td> <td>Oliv.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Herefter behandles 2 af grupperne: Nikkel/DT og Olivenolie-Acetone/DT med DT i 3 dage. Her injiceres musene med DT hver dag.</p>		DT	Uden DT	Nikkel påsmøres	Nikkel/DT	Nikkel	Olivenerolie-Acetone påsmøres	Oliv./DT	Oliv.
	DT	Uden DT								
Nikkel påsmøres	Nikkel/DT	Nikkel								
Olivenerolie-Acetone påsmøres	Oliv./DT	Oliv.								
<i>Sensitization</i> fasen: Nikkel/ Olivenolie-acetone behandling +DT (angivet med grøn i figur 2)	Musene behandles med henholdsvis enten nikkel eller olivenolie-acetone blanding, som smøres på musenes ører hver dag i 3 dage. Olivenolie-acetone blandingen forventes ikke at give immunreaktion. Derudover forsættes påsmøringen med DT i disse 3 dage i de musegrupper, som skal have det.									
Måling af ører (angivet med blå i figur 2)	Man måler musenes øretykkelse.									
DT behandling fortsætter (angivet med gul i figur 2)	Musene behandles forsat med DT i 3 dage efter <i>sensitization</i> fasen, hvor de injiceres med DT hver dag. I alt injiceres DT i 9 dage.									
Ventetid for akut inflammation falder	Man venter 21 dage på at den akutte inflammation falder.									
<i>Challenge response</i> -Nikkel behandling (angivet med rød i figur 2)	Musene får endnu engang påført enten nikkel eller olivenolie-acetone blandingen på ørerne således, at <i>elicitation</i> fasen begynder, og man skaber et <i>challenge response</i> . <sup>23</sup>									
Måling af ører (angivet med blå i figur 2)	Man måler resultatet af forsøget ved at måle øretykkelsen for alle grupper.									
<i>RNA purification TRIzol</i> -Oprensning af RNA	Musene slås nu ihjel, og man skærer deres ører af. Herefter oprenser man <i>RNA</i> fra musenes ører, ved at benytte <i>RNA TRIzol purification</i> , således man får ultrarent <i>RNA</i> . Denne metode beskrives i bilag 3.									
<i>QPCR</i>	Det oprensede <i>RNA</i> benyttes nu til at lave en <i>QPCR</i> . <i>QPCR</i> benyttes til at kopiere DNA, således jeg kan analysere hvorvidt, der er <i>IL-17A</i> i musenes ører. Denne metode beskrives i bilag 4.									
Databehandling	Resultaterne fra analyserne omkring musenes øretykkelse, samt <i>QPCR</i> behandles og fortolkes.									

<sup>23</sup> Et *challenge response* er reaktionen på den eksponering, et immunforsvar har været udsat for.



Figur 2. Forsøgsforløb over kontakt-allergi forsøg på IL-17A conditional knock-out mus. Musene udsættes for DT de første 9 dage af forsøget. På dag 1-3 påføres nikkel på musenes ører, hvilket er sensitization fasen. På dag 21 påføres nikkel igen på musenes ører, hvilket er elicitation fasen, og musenes øretykkelse måles igen.

## Budget estimat

Tabel 2. Liste over udgifter.<sup>24</sup>

Materialer og apparatur	Beløb
<i>Fate-reporter</i> mus	Dækkes af Institutet for <i>Molecular Immunology</i>
Centrifuge	Lånes af Institutet for <i>Molecular Immunology</i>
Difteria toxin (DT)	4.000 kr.
Nikkel	2.000 kr.
Olivenolie-acetone (kontrol)	1.000 kr.
Trizol til oprensning af <i>mRNA</i>	2.500 kr.
BCP til oprensning af <i>mRNA</i>	1.500 kr.
<i>RNA-to-cDNA</i> kit	1.900 kr.
Primere til <i>QPCR</i>	1.800 kr.
<i>QPCR</i> reagenser	3.500 kr.
Laboratorie-remedier (såsom pipettespidser, kanyler etc.)	1.800 kr.
<b>I alt</b>	<b>20.000 kr.</b>

## Tidsramme

Tabel 3. Oversigt over tidshorisonten for kontakt-allergi forsøg på *IL-17A conditional knockout* mus.

Procedure	Forventet tid
DT behandling	3 dage
Nikkel/ Olivenolie-acetone behandling +DT	3 dage
2. DT behandling	3 dage
Ventetid for akut inflammation falder	21 dage
Nikkel behandling - <i>Challenge response</i>	1 dag
Mål øretykkelse	1 dag
Oprens <i>RNA+ QPCR</i>	2 dage
<b>I alt</b>	<b>34 dage</b>

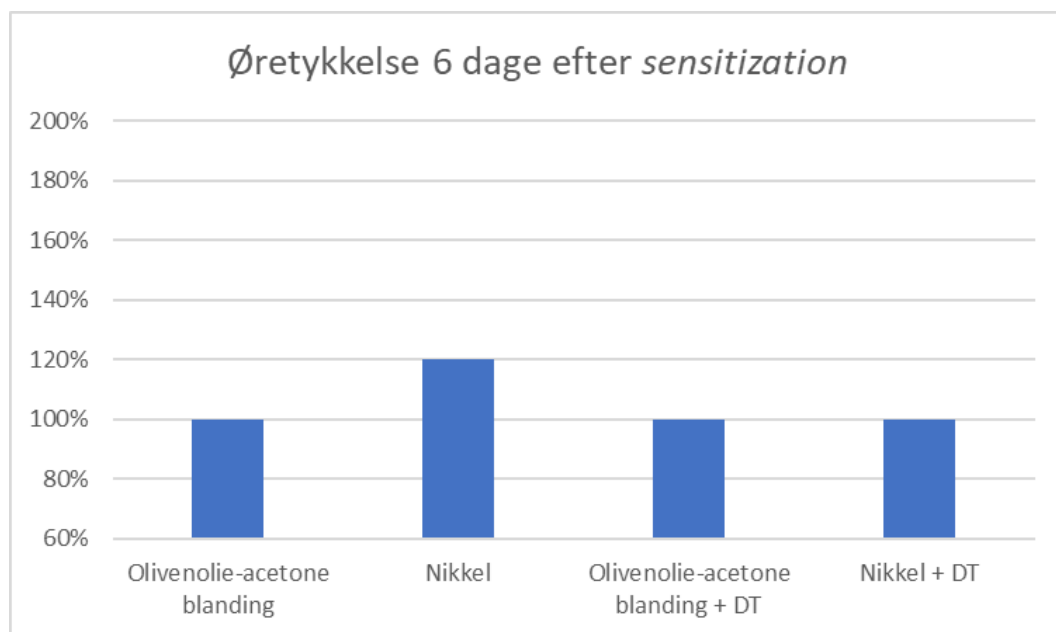
<sup>24</sup> Kongsbak-Wismann, Martin

## Konklusion og perspektivering

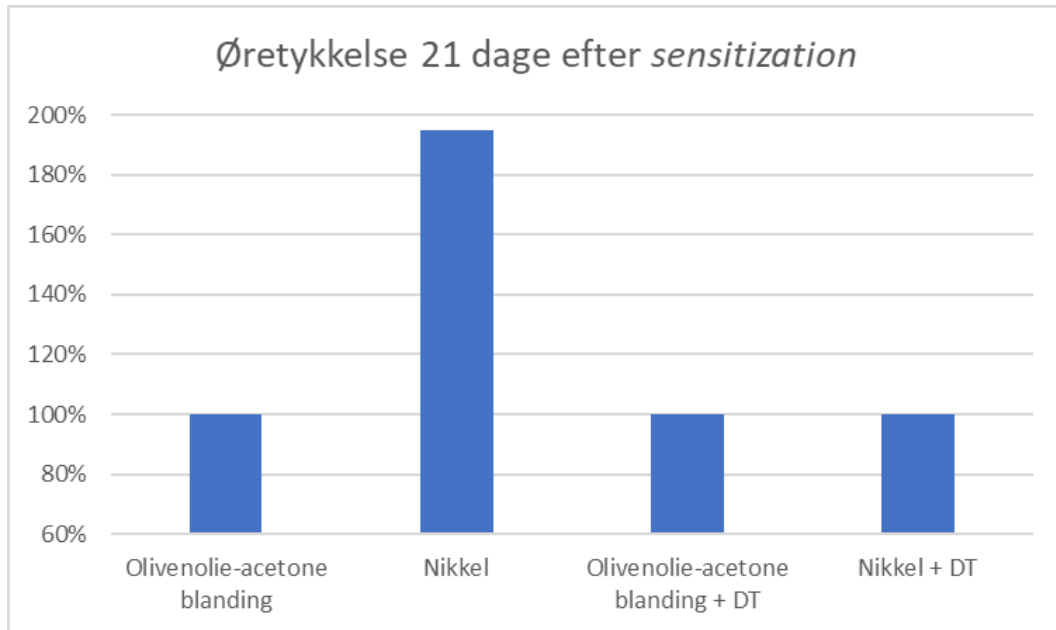
Efter forsøget forventer jeg, at det ved ovenstående metode, er muligt at mindske inflammationen i huden ved kontaktallergi forårsaget af nikkel, ved at udrydde de celler, der er eller har været *IL-17A* producerende.

Jeg forventer et af disse to scenarier: Hvis musene, som er behandlet med DT samt udsat for nikkel har ører, som er tykkere end kontrolgruppens ører/lige tykke som kontrolgruppens ører indikerer dette, at der ikke er en sammenhæng mellem kontaktallergi inflammation i huden og *IL-17A* i *sensitization* fasen. Derimod hvis musene, som er behandlet med DT samt nikkel har ører, som er tyndere end kontrolgruppens ører indikerer dette, at der er en sammenhæng mellem kontaktallergi og *IL-17A* i *sensitization* fasen. Uanset resultatet vil det lægge op til yderligere forsøg og forskning inden for området.

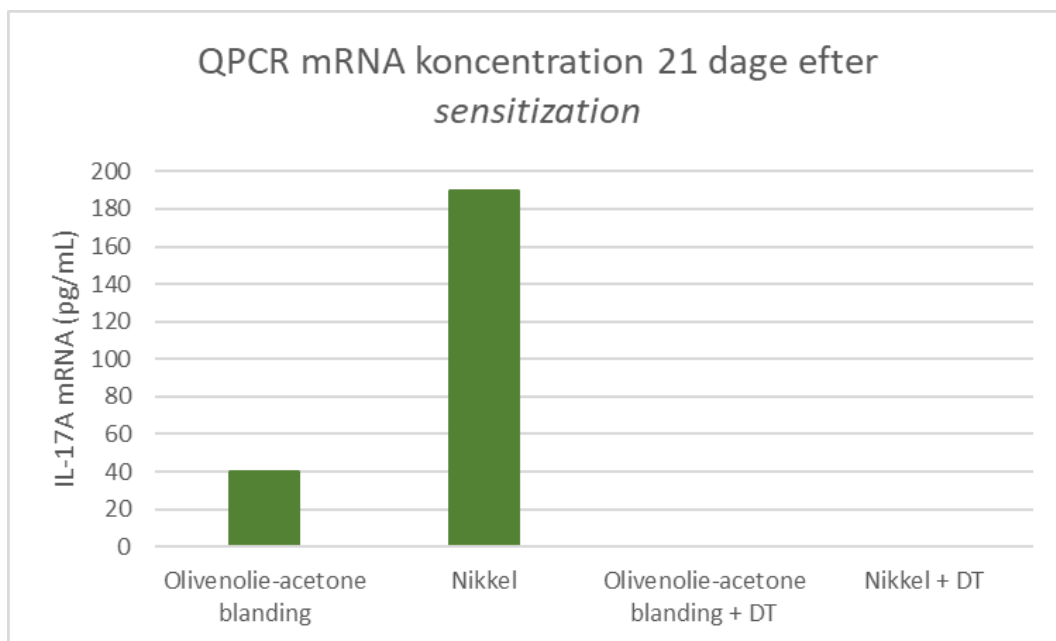
Ud fra min diskussion om mit hypotetiske data (se bilag 15) er min hypotese, at *IL-17A* kan fjernes ved DT behandling, og at dette vil mindske inflammationen og dermed øretykkelsen hos musene. Derfor har jeg lavet noget hypotetisk data over hvilke resultater, jeg forventer. (Se figur 3, figur 4 og figur 5). På disse kan man se, hvordan jeg forventer en stor inflammation hos gruppen af mus uden DT og med nikkel, samt ingen inflammation hos grupperne, der bliver behandlet med DT. Derudover har jeg også lavet en graf over en hypotetisk måling af mængden af *IL-17A* i musene, hvor jeg forventer et normalt niveau af *IL-17A* i gruppen uden DT eller nikkel, samt ingen *IL-17A* i grupperne med DT. (Se bilag 5).



Figur 3. Hypotetisk data: Graf over den forventede øretykkelse for hver musegruppe 6 dage efter sensitization.



Figur 4. Hypotetisk data: Graf over den forventede øretrykkelse for hver musegruppe 21 dage efter sensitization.



Figur 5. Hypotetisk data: Den forventede mængde af IL-17A mRNA for hver musegruppe 21 dage efter sensitization undersøgt ved QPCR.

Hvis denne hypotese bekræftes lægger dette op til mere forskning inde for IL-17A's funktion<sup>25</sup>. Man kan undersøge andre faser med samme metode og *knockoute IL-17A* på andre tidspunkter end i *sensitization* fasen. Desuden kan man undersøge andre cytokiner eller andre dele af immunforsvaret ved kontaktallergi. I alle tilfælde kan forsøg efterprøves ved andre allergener end nikkel.

<sup>25</sup> Her er det en fordel, at jeg har benyttet *fate*-reporter mus

Jeg mener, at denne forskning er yderst relevant, da det vil være en fordel i fremtiden at kunne behandle kontaktallergi direkte i stedet for blot at behandle symptomerne. Derudover giver mit forsøg også mulighed for at undersøge hvornår i allergiforløbet *IL-17A* evt. er vigtigt, hvilket kan være afgørende viden for hvornår en evt. medicin/behandling skal gives til patienten i et allergiforløb. Eksempelvis med *anti-IL-17A*.

## Kontakt og tak

Jeg vil gerne sige en stor tak til min forskerkontakt Martin Kongsbak-Wismann, som har hjulpet mig igennem hele mit projekt. Han har givet inspiration, stor støtte og vejledning fra projektets tilblivelse til færdiggørelse. Derudover vil jeg takke min bioteknologilærer Karina Haupt, som har hjulpet mig med korrektur, samt faglige bidrag og sparring.

Tak til KU, AU og koordinatore fra Projekt Forskerspirer for professionel undervisning og vejledning igennem forløbet.

### Min Forskerkontakt:

Lektor Martin Kongsbak-Wismann.

PhD in Molecular Immunology.

Skin Immunology Research Center, Københavns Universitet.

### Min underviser i bioteknologi:

Karina Haupt

Cand. Scient. Biokemi og Molekylær Biologi.

Gymnasielærer Roskilde Katedralskole.

## Litteraturliste

Allergi – når immunsystemet angriber dig!: Når alle sikkerhedsforanstaltninger brister. (s.d.).

Biotech Academy. Lokaliseret den 26. Oktober 2023 på

<https://www.biotechacademy.dk/undervisning/grundskole/derfor-faar-du-allergi/allergi-naar-immunsystemet-angriber-dig/>

Se bilag 6

Ahlström, Malin G., Thyssen, Jacob P., Wennervaldt, Michael., Menné, Torkil. & Johansen, Jeanne D.. (2019, 24. Maj). Nickel allergy and allergic contact dermatitis: A clinical review of immunology, epidemiology, and treatment. *Contact Dermatitis Wiley*.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cod.13327>

*Allergireaktioner - hvilke typer findes der?*. (s.d.). Apoteket-Online.dk. Lokaliseret den 22. 9 2023

på <https://apoteket-online.dk/artikler/allergireaktioner#>

Se bilag 7

Bruun, K., Geertsen, P. B. & Helmig, K. (2011). *Grundbog i bioteknologi. Bind 2* (Bd. 2).

Gyldendal.

Funch, Anders Boutrup . (2021, 3. November). Kontaktallergi er mere komplekst end hidtil

troet: Cellerne husker. I: *Astma-Allergi Danmark*. Lokaliseret den 20. August 2023 på

<https://www.astma-allergi.dk/nyheder/kontaktallergi-er-mere-komplekst-end-hidtil-troet/>

Bilag 8

*IL17A Human: Function*. (s.d.). UniProt. Lokaliseret den 20. August 2023 på

<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q16552/entry>

Se bilag 9

Interleukin 17A (IL-17A): Description. (s.d.). I: *Eos BioAnalytics*. Lokaliseret den 24. Oktober 2023

på <https://bioanalytics.tcu.edu/product/interleukin-17a-il-17a/>

Bilag 10



Küchen, Niels . (2021, 14. December). Allergi, hvad er det?: Allergi som folkesygdom. Sundhed.dk. Lokaliseret den 27. Oktober 2023 på <https://www.sundhed.dk/borger/patienthaandbogen/allergi/om-allergi/allergi-hvad-er-det/>  
Bilag 11

Mraz, Veronika., Geisler, Carsten. & Bonfeld, Charlotte Menné. (2020, 9. Maj). Dendritic Epidermal T In Allergic Contact Dermatitis. *Frontiers in Immunology*, 2020(874). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7248261/>

*Nickel Directive: What is the Nickel Directive?*. (s.d.). Eurofins. Lokaliseret den 9. Juni 2023 på <https://blcchemicaltesting.com/test-by-legislation/nickel-directive/>  
Bilag 12

Sand, Carsten. (2022, 21. November). *Kontakt-eksem: Hvad er Kontakt-eksem?*. Medicin.dk. Lokaliseret den 2. April 2023 på <https://min.medicin.dk/sygdomme/sygdom/78>  
Bilag 13

*Secukinumab (Cosentyx) (Led- og Bindevævssygdomme)*. (s.d.). Aarhus Universitetshospital. Lokaliseret den 30. August 2023 på <https://www.auh.dk/patientvejledninger/led-og-bindevavssygdomme/medicin/secukinumab/>  
Bilag 14

Termo Fisher Scientific. (2016, 12. Januar). *How to isolate RNA from tissue or cells* [Youtube video]. Youtube.com. <https://www.youtube.com/watch?v=L5XIB8KkKt4>

Todbjerg, Tanja., Zachariae, Claus., Krusturp, Dorrit. & Skov, Lone. (2018, 13. December). The effect of anti-IL-17 treatment on the reaction to a nickel patch test in patients with allergic contact dermatitis. *Wiley*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ijd.14347>

UH Hilo DKICP. (2019, 28. Marts). *4 How to use PCR and qPCR* [Youtube video]. Youtube.com. [https://www.youtube.com/watch?v=0d\\_vBQp3NV0](https://www.youtube.com/watch?v=0d_vBQp3NV0)

Vesely, Maria Carolina Amezcua., Pallis, Paris., Bielecki, Piotr., Esplugues, Enric ., Gagliani, Nicola. & Flavell, Richard A. . (2019, 22. August). Effector TH17 Cells Give Rise to Long-Lived TRM Cells that Are Essential for an Immediate Response against Bacterial Infection. *Cell*, 178, 1176-1188.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7057720/>

# Bilag

## **Bilagsoversigt**

Bilag 1: Secukinumab.

Bilag 2: Gensekvenser i *fate-reporter* mus.

Bilag 3: Steps for *RNA* purifikation *trizol*.

Bilag 4: *QPCR*-metode.

Bilag 5: Hypotetisk data- rådata.

Bilag 6: Allergi – når immunsystemet angriber dig!: Når alle sikkerhedsforanstaltninger brister. (s.d.).

Bilag 7: Allergireaktioner - hvilke typer findes der?. (s.d.).

Bilag 8: Funch, Anders Boutrup . (2021, 3. November).

Bilag 9: Il17A Human: Function. (s.d.).

Bilag 10: Interleukin 17A (IL-17A): Description. (s.d.).

Bilag 11: Küchen, Niels . (2021, 14. December).

Bilag 12: Nickel Directive: What is the Nickel Directive? (s.d.).

Bilag 13: Sand, Carsten. (2022, 21. November).

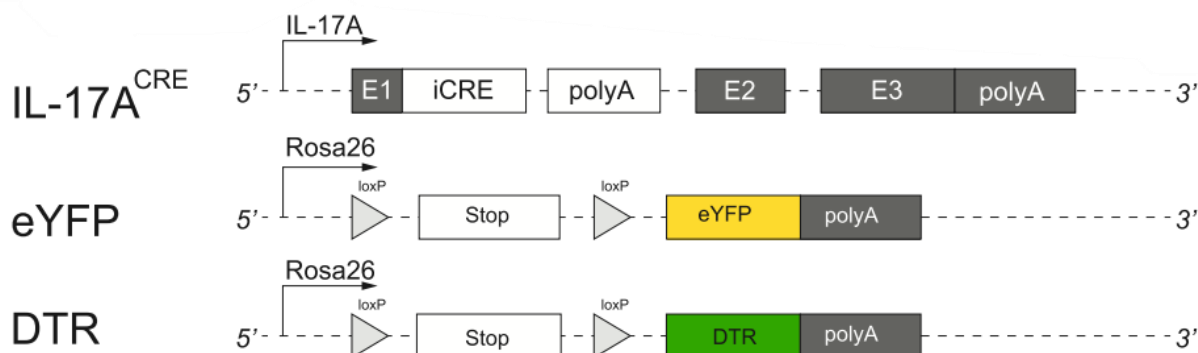
Bilag 14: Secukinumab (Cosentyx) (Led- og Bindevævssygdomme). (s.d.).

Bilag 15: Overvejelser og diskussion ved hypotetisk data.

## Bilag 1: Secukinumab

Secukinumab er medicin, som benyttes til behandling af leddegigt, psoriasisgigt og rygsøjlegigt. Medicinen er et biologisk lægemiddel, som hæmmer *IL-17A*. Led- og bindevævssygdomme opstår når kroppens immunforsvar er overaktivt, ved således at hæmme dele af immunforsvaret, stoppes gigtten.<sup>26</sup>

## Bilag 2: Gensekvenser i fate-reporter mus



Figur 6. Constructs of Fate-DTR mice.<sup>27</sup>

## Bilag 3: Steps for RNA purification trizol.

1. Der tages 50-100 mg frisk eller frossent materie man vil isolere RNA fra
2. Tilføj 1 ml TRIzol reaktant
3. Homogeniser prøven med en homogenisator
4. 0,2 ml Chloroform tilføjes og massen blandes
5. Centrifuger massen i 15 min ved 4 °C ved 12.000 g
6. Der dannes 3 lag i væsken hvor det øverste indeholder RNA.
7. RNA fjernes med pipette og der tilføjes 70% ethanol og blandes.
8. 700 µl af væsken puttes i en purelink silicone membrane column.
9. Centrifuger massen ved 12.000 g i 15 sek og flyt column fra collectiontube
10. Tilføj wash buffer 1
11. Gentag step 9
12. Tilføj wash buffer 2
13. Gentag step 9
14. Flyt column og tilføj elution buffer
15. Lad væsken inkubere 1 min
16. Centrifuger væsken i 2 min ved 12.000 g
17. Fjern column og nederst i recovery tube findes det ultrarene RNA<sup>28</sup>

<sup>26</sup> Secukinumab (Cosentyx) (Led- og Bindevævssygdomme). (s.d.).

<sup>27</sup> Vesely, Maria Carolina Amezcua., Pallis, Paris., Bielecki, Piotr., Esplugues, Enric ., Gagliani, Nicola. & Flavell, Richard A. (2019, 22. August).

<sup>28</sup> Thermo Fisher Scientific. (2016, 12. Januar)

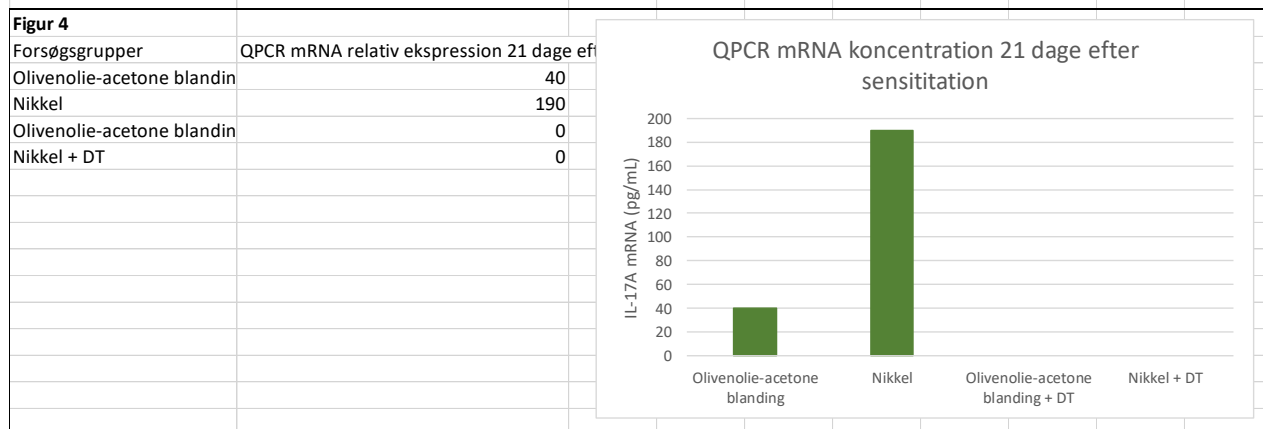
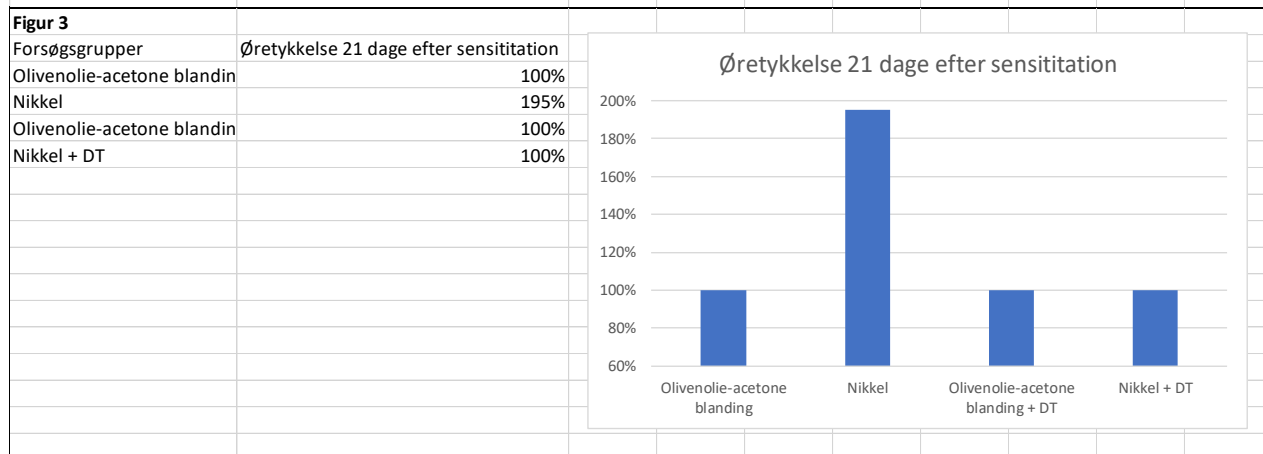
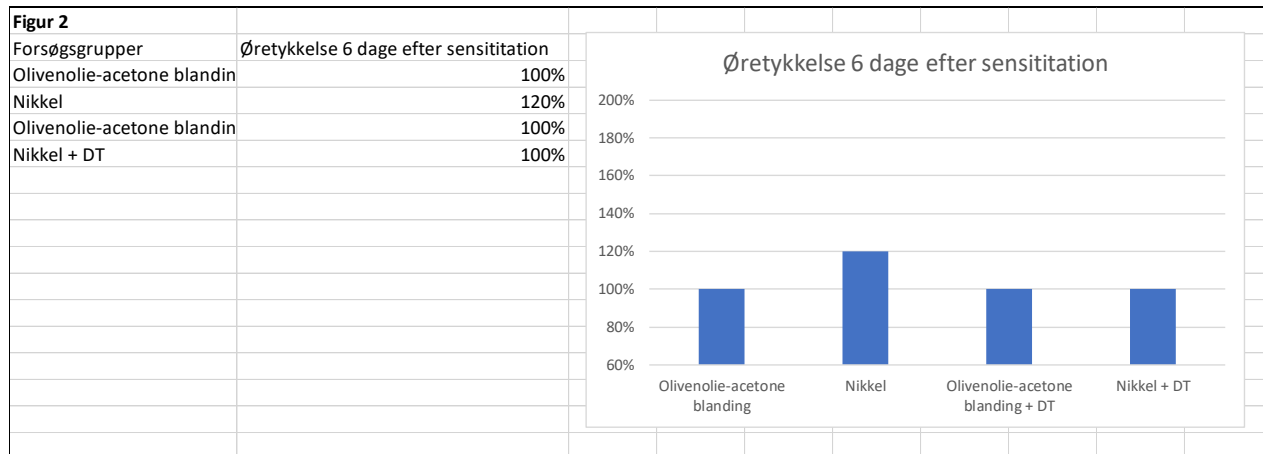
#### Bilag 4: QPCR-metode

1. Først benyttes reverstranskriptase til at lave RNA om til DNA
2. En blanding laves af DNA prøven, *IL-17A*-specifikke primere, nukleotider, Taq- DNA polymerase, fluorescerende stof og buffer.
3. Blandingen indsættes i QPCR maskine, som har til formål at replikere DNA.
4. Denaturering: Blandingen varmes op således hydrogen bindinger går fra hinanden, og man får 2 Single-stranded DNA strenge.
5. Annealing: Temperaturen sænkes således primere binder sig til deres komplementære strenge og omgrænser interesse området. (en forward og en backward primer).
6. Extension: Hæver temperatur igen således taq polymerase kan syntetisere ud fra primere og lave double stranded DNA
7. QPCR maskinen kan nu måle hvor meget af det fluorescerende stof der er, alt efter hvor meget DNA der er
8. Herefter køre cyklus igen og igen: Step 1-7 gentages
9. På et tidspunkt er der enten lavet nok DNA til at man kommer over CT-værdien og man kan måle DNAet, hvis det er der. Hvis det ikke er der, vil det aldrig komme over CT-værdien. En lav CT-værdi betyder at der er en høj DNA konc. En høj CT-værdi betyder at prøven indeholder en lav DNA konc. 30 cyklusser giver ca.  $10^9$  kopier.<sup>29</sup>

---

<sup>29</sup> UH Hilo DKICP. (2019, 28. Marts).

**Bilag 5: Hypotetisk data- rådata**



**Bilag 6: Allergi – når immunsystemet angriber dig!: Når alle sikkerhedsforanstaltninger brister. (s.d.).**



Allergi - når immunsystemet angriber dig - Biotech Academy.pdf

**Bilag 7: Allergireaktioner - hvilke typer findes der?. (s.d.).**



Allergireaktioner - hvilke typer findes der\_.pdf

**Bilag 8: Funch, Anders Boutrup . (2021, 3. November).**



Kontaktallergi er mere komplekst end hidtil troet - Astma-Allergi Danmark.pdf

**Bilag 9: IL17A Human: Function. (s.d.).**



IL17A - Interleukin-17A - Homo sapiens (Human) \_ UniProtKB \_ UniProt.pdf

**Bilag 10: Interleukin 17A (IL-17A): Description. (s.d.).**



Interleukin 17A (IL-17A) \_ TCU Eos BioAnalytics.pdf

**Bilag 11: Küchen, Niels . (2021, 14. December)**



Allergi, hvad er det\_ - Patienthåndbogen på sundhed.dk.pdf

**Bilag 12: Nickel Directive: What is the Nickel Directive?. (s.d.).**



Nickel Directive \_ BLC Chemical Testing.pdf

**Bilag 13: Sand, Carsten. (2022, 21. November).**



Kontakt-eksem - Find information på Medicin.dk.pdf

**Bilag 14: Secukinumab (Cosentyx) (Led- og Bindevævssygdomme). (s.d.)**



Secukinumab (Cosentyx) (Led- og Bindevævssygdomme) - Aarhus Universitetshospital.pdf

## Bilag 15: Overvejelser og diskussion ved hypotetisk data

Grafen med hypotetisk data for hvor tyk øretykkelsen vil være efter 6 dage er lavet ud fra, at jeg kun forventer en lille hævelse i gruppen, der får påført nikkel. Denne gruppe vil hæve lidt, da huden på musenes ører vil blive irriteret af nikkel ionerne, men ikke har mødt nikkel før, og dermed ikke kommer med en stor reaktion, som der eller burde komme i *elicitation* fasen, jf. teori afsnittet. Hos de andre forsøgsgrupper, forventer jeg ikke en ændring i øretykkelsen, da grupperne eksponeret med olivenolie-acetone blandingen ikke bør påvirke huden på musenes ører. Desuden bør gruppen, som har fået nikkel, men også DT behandling op til og under nikkeleksponering ikke reagerer, da min hypotese er, at IL-17A er vigtigt i *sensitization* fasen, og da jeg har fjernet dette inden sensitisationsfasen, burde der ikke opstå hævelse.

Grafen for hypotetisk data over musenes øretykkelse 21 dage efter sensitisationsfasen er lavet ud fra, at hypotesen, om at IL-17A er vigtigt i *sensitization* fasen,, holder. Derfor forventer jeg, at gruppen, som både har fået nikkel og DT behandling ikke hæver op, da jeg forventer, der ikke kommer nogen allergisk reaktion som følge af fraværet af IL-17A. Derfor bør den gruppe have samme øretykkelse som før eksperimentet, ligesom grupperne med olivenolie-acetone blanding heller ikke bør hæve, da dette ikke bør aktivere musenes immunforsvar. Modsat forventer jeg, at hævelsen i musene, som kun har fået nikkel er stor, da disse mus har været igennem et normalt allergiforløb, hvormed musenes anden eksponering af nikkel bør medfører en meget voldsom immunrespons.

Grafen med hypotetisk data over koncentrationen af IL-17A mRNA i de forskellige forsøgsgrupper 21 dage efter *sensitization* er lavet ud fra en formodning om, at grupperne, som har været behandlet med DT ikke har noget IL-17A tilbage i kroppen, hvormed det ikke er muligt at detektere noget mRNA fra IL-17A i musene. Derudover er det forventet, at gruppen der kun er blevet eksponeret for nikkel har en meget høj koncentration af mRNA fra IL-17A, som følge af en meget voldsom immunrespons. Der bør i gruppen, som kun er blevet behandlet med olivenolie-acetone blandingen være et normalt niveau af mRNA fra IL-17A. Da denne gruppe ikke er blevet behandlet med DT, bør der derfor stadig være noget IL-17A, men da denne gruppe ikke har haft nogen immunrespons, bør niveauerne af mRNA fra IL-17A være langt lavere end gruppen med nikkel, som har haft en immunrespons.