UPPSALA
UNIVERSITET

Hur är Th17-celler involverade i patogenesen i multipel skleros?

Sophia Katarina Forsskåhl

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2017
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag
Multipel skleros (MS) är en autoimmun sjukdom som tros vara förmedlad och initierad av T-hjälparceller (Th-celler) från kroppens eget immunförsvar. Likt många andra autoimmuna sjukdomar och allergier blir den allt vanligare i västvärlden, och en god förståelse av sjukdomen ger ökade chanser att hitta botemedel eller vaccin, både mot MS själv men också mot andra sjukdomar som orsakas av ett autoreaktivt immunförsvar. Man har länge kopplat MS till T-hjälparceller som aktiverats mot myelin i det centrala nervsystemet (CNS). När myelin förstörs saktar nervimpulser ner och axonen riskeras att skadas, vilket leder till en rad olika problem beroende på vilka nervceller det är som drabbas. Därför är det av yttersta vikt att förstå hur sådana autoreaktiva T-hjälparceller uppstår och hur de orsakar skada på myelinet. Mycket tyder på att Th-cellerna aktiveras utanför CNS och sedan dras till det med hjälp av en rad proteiner och receptorer som utnyttjar en kemisk gradient för att styra cellerna till deras mål. En rad olika protein är också involverade i Th-cellernas korsning av blod-hjärn-barriären och resultatet från ett antal undersökningar tyder på att cellerna korsar barriären i plexus chorideus. Två typer av Th-celler har visat sig ha stor inverkan på sjukdomsförloppet, Th1-celler och Th17-celler. Innan Th17-celler upptäcktes år 2005 så var man främst inriktad på Th1-celler som den initierande faktorn i MS, men idag är den allmänna uppfattningen att det är Th17-cellerna som oftast aktiverar sjukdomsförloppet. Th17-celler agerar normalt genom att stimulera andra celler runt dem och skapa inflammatoriska responser mot patogener. När de sedan blir autoreaktiva inflammerar de områden av den vita hjärnsubstansen och attraherar andra immunceller till området, och skadar på så sätt hjärnans nervceller. Det huvudsakligen verkande proteinet som Th17 utsöndrar är ”Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor” (GM CSF) som aktiverar granulocyter och makrofager samt rekryterar dem till CNS. Också andra Th17 cytokiner har betydelse för MS sjukdomsförlopp däribland Il-17 som rekryterar neutrofiler till CNS och orsakar inflammation och Il-22 som stimulerar utsöndringen av antimikrobiella protein. Th17-celler har dock inte bara en patogen roll under MS förloppet, utan en speciell subtyp av Th17-celler som kallas T-regulatoriska typ 1(Tr1) -liknande celler bidrar till att inhibera inflammation och minska mängden nya autoreaktiva celler som bildas. Forskning om Th17-celler, deras differentiering, aktivering som autoreaktiva celler, infiltration av CNS och agerande som inflammatoriska celler där, samt deras plasticitet som tillåter ombildande till Tr1-celler har potential att identifiera framtida mål för behandlingar mot MS.

Inledning
År 2008 var 26 738 svenskar diagnostiserade med sjukdomen multipel skleros (MS) (Ahlgren *et al.* 2014). Sedan dess är det troligt att numret har ökat tack vare bättre diagnostisering. Varför specifika individer får sjukdomen medan andra inte gör det, har länge varit oklart men man vet att miljö och gener påverkar sannolikheten att en individ drabbas (Frohman *et al.* 2006, Lassmann 2013). MS är en neurologisk sjukdom som orsakas av skador i det centrala nervsystemet (CNS), oftast i det vita materialet i hjärnan (Frohman *et al.* 2006). Idag har man mer eller mindre accepterat teorin att MS är en autoimmun sjukdom som orsakas av en immunologisk reaktion från kroppens eget immunförsvar (Lassmann 2013). Den beror på att det adaptiva immunförsvaret uppfattar ett autoantigen, ett antigen som finns på kroppens egna celler, som ett hot. I MS sitter autoantigenet på myelinskidorna som omger axonen i den vita hjärnsubstansen i det centrala nervsystemet. Kliniska försök med behandlingar som riktar sig mot just det adaptiva immunförsvaret har visat sig ha effekt, vilket styrker kopplingen mellan MS och immunförsvaret (Rostami & Ciric 2013). Att koppla MS till endast en specifik del av immunförsvaret är dock svårt, men genom försök har man fastställt att det bland annat finns en tydlig koppling mellan MS och T-hjälpar (Th)-celler (Lassmann 2013, Rostami & Ciric

2013). Den autoimmuna reaktionen ledder till att de skyddande myelinskidorna runt nervtrådar skadas och det bildas ärr i vävnaden. Också oligodendrocyterna (de celler som bland annat tillverkar myelinet) attackeras, vilket förvårar läkandet. Samtidigt blir det vita materialet inflammerat vilket gör att de oskyddade axonen kan komma till skada (Frohman *et al.* 2006). De skadade eller förstörda myelinskidorna gör att nervimpulser färdas långsammare genom axonen och gör också axonen mer utsatta för annan skada. På sikt kan detta leda till en rad olika symptom, exempelvis trötthet, stelhet, synbesvär, skakningar, problem med minne och tankeverksamhet, humörsvängningar och förlust av kontroll eller känsel i olika delar av kroppen. Vilka symptom man drabbas av beror på vilka nervceller som tar skada och hur mycket skada de tar (Frohman *et al.* 2006, Lassmann 2013). Sjukdomen uppträder ofta i skov, tidsperioder då man lider av symptomen, med pauser emellan. Inflammationerna kan tidvis lätta och myelinet kan läka innan problemen återkommer. Över längre tid blir det svårare att tydligt avgöra när skoven startar och slutar, och symptomen dyker upp också mellan skoven. En minoritet av drabbade har inte tydliga skov i början utan försämras gradvis med ständigt ökande symptom. Sjukdomsförloppet kan skilja vitt mellan olika patienter (Frohman *et al.* 2006, Lassmann 2013).

Av förståeliga skäl är det svårt att studera sjukdomen direkt i människor på grund av de risker som experiment kan ha. Ett sätt att komma runt den problematiken är att titta på liknande sjukdomar i passande modellorganismer. ”Experimental autoimmune encephalomyelitis”, som förkortas till EAE är ett samlingsnamn för en rad olika autoimmuna sjukdomar i modell vertebrater som används inom forskning för att modulera olika delar av MS sjukdomen (Rangachari & Kuchroo 2013). Forskning med EAE är inte bara användbart för att ge en bättre förståelse för MS, utan är också ett redskap för att forska om immunförsvaret i allmänhet och Th1 (T-hjälpar typ 1)-celler och Th17 (T-hjälpar typ 17)-celler specifikt. Som ett exempel på allmännyttan med EAE forskning gjordes upptäckten av Th17-celler som kommer diskuteras senare genom forskning baserad på EAE. En stor del av forskningen utförs på möss, men även primater och andra däggdjur används (Rangachari & Kuchroo 2013). Det innebär att mycket av terminologin och forskningen baserar sig på specifikt mössens immunsystem. Det mesta jag kommer ta upp här, och en stor del av terminologin baserar sig just på sådan forskning.

I det här arbetet ämnar jag förtydliga Th17-cellers patogena roll inom förloppet av MS. Jag diskuterar kort Th17-cellers vanligaste egenskaper och funktioner. Sedan undersöks i större detalj hur Th17-celler orsakar MS, hur sjukdomen initieras och bibehålls. Kort diskuteras också Th17-cellers möjliga läkande funktioner.

Th17-celler

T-hjälparceller är en typ av T-celler, lymfocyter, som är en del av det adaptiva immunförsvaret. T-hjälparceller utsöndrar kemikalier, cytokiner och andra proteiner som aktiverar olika delar av immunförsvaret (så som B-celler, makrofager, mast celler och ”natural killer ” (NK)-celler m.m.). Th-celler delas in i en rad subtyper, däribland Th1, Th2, Th17 och Treg (T regulatoriska) -celler, på basis av vilka proteiner de utsöndrar. Subtyperna kommer alla från odifferentierade naiva T-hjälparceller och differentierar till en av subtyperna beroende på hurdan kemisk signalering de tar emot från deras omgivning. Ofta utsöndrar Th-celler proteiner som stimulerar differentiering till just denna subtyp i en positiv ”feedback loop” (Nicholson 2016).

Th-celler har länge varit kopplade till autoimmuna sjukdomar och specifikt MS (Raphael *et al.* 2015). Först trodde man att subtypen Th1 som allmänt setts kopplats till ökad immunitet mot autoantigener (antigen som kroppens egna celler producerar) kunde vara en av orsakerna till MS (Rostami & Ciric 2013). Men år 2005 identifierade två grupper av forskare, Harrington *et al.* (2005) och Park *et al.* (2005), samtidigt en ny grupp av Th-celler som karaktäriserades av utsöndringen av cytokinet interleukin (Il)-17 som en egen typ av T-hjälparceller. De cellerna fick benämningen Th17-celler. Th17-celler utsöndrar flera proteiner som orsakar inflammation och har specifika egenskaper som gör dem till en trolig kandidat i MS sjukdomsförlopp (Rostami & Ciric 2013). Undersökningar har visat att patienter med MS ofta har högre grader av aktiva Th17-celler i det centrala nervsystemet än friska personer (Kebir *et al.* 2009).

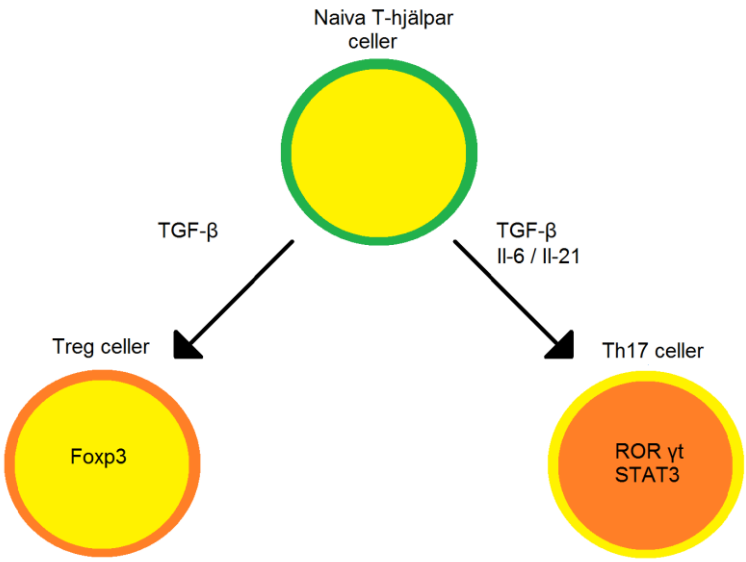
Differentiering

Efter att Th17-celler hade definierats som en egen typ av Th-celler var det av intresse att undersöka hur de differentieras från naiva T-celler. Bettelli *et al.* (2006) visade att naiva Th-celler i en omgivning med ”transforming growth factor - β” (TGF-β) och cytokinet Il-6 differentieras till Th17-celler. Senare visades att i frånvaro av Il-6 kan cytokinet Il-21 i kombination med TGF-β också aktivera samma differentiering (Korn *et al.* 2007, Chen *et al.* 2007, Zhou *et al.* 2008). Il-21 är ett cytokin som Th17-celler själv tillverkar vilket visar på att Th17-celler på så sätt kan stimulera bildningen av flera Th17-celler via positiv feedback (Korn *et al.* 2007). Il-6 å andra sidan tillverkas av andra immunceller och är det cytokin som i huvudsak är ansvarig för att starta differentiering (Yang *et al.* 2007, Zhou *et al.* 2008, Zhou & Littman 2009). Ett annat viktigt protein för Th17-cellerna och deras funktion är Il-23. I möss där Il-23 tillverkningen hade blivit utslagen fanns det mycket färre Th17-celler (McGeachy *et al.* 2009), och andra undersökningar visade att Il-23 stimulerade tillverkning av Il-17, cytokinet som från början har definierat Th17-celler (Rostami & Ciric 2013). Vid tillräcklig närvaro av TGF-β och antingen Il-6 eller Il-21, är det Il-23 som är den begränsande faktorn för Th17-cellers förökning (McGeachy *et al.* 2009). En av Il-6:s funktioner är att uppreglera uttrycket av Il-23 receptorer på cellernas yta (Yang *et al.* 2007) vilket gör cellerna mer känsliga för Il-23.

TGF-β, det protein som inte kan ersättas i differentieringen, aktiverar transkriptionsfaktorn ”factor retinoic acidrelated orphan receptor γt” eller RORγt, en av huvudtranskriptionsfaktorerna för Th17-celler (Zhou *et al.* 2008, Zhou & Littman 2009, Raphael *et al.* 2015). Vid stimulans från TGF-β aktiveras transkriptionsfaktorn som sedan uppreglerar de gener som får cellen att differentiera sig till specifikt Th17-celltypen, däribland de gener som kodar för signatur cytokinet Il-17 (Zhou & Littman 2009, Raphael *et al.* 2015). Men TGF-β kopplar också Th17-celler till en annan typ av T-celler, nämligen Treg-celler (Bettelli *et al.* 2006). Treg-celler undertrycker immunförsvaret och är de celler som inhiberar autoimmuna reaktioner (Raphael *et al.* 2015). De differentieras efter aktivering av transkriptionsfaktorn Foxp3 som uppregleras i närvaron av TGF-β (Bettelli *et al.* 2006). I en miljö med bara TGF-β aktiveras båda transkriptionsfaktorerna, och Foxp3 kan binda till RORγt och inhiberar på så sätt differentieringen till Th17-celler medan bildningen av Treg-celler främjs (Zhou *et al.* 2008). Il-6 är viktigt för att stoppa inhiberingen av RORγt och stimulera bildningen av Th17-celler över Treg-celler. Cytokinet gör detta genom att aktivera en tredje transkriptionsfaktor, STAT3 (Yang *et al.* 2007, Zhou *et al.* 2008). STAT3 binder till Il-17 och RORγt genernas promotorer och stimulerar transkription av dem (Figur 1.) (Yang *et al.* 2007, Zhou *et al.* 2008), och Zhou & Littman (2009) spekulerade att STAT3 också kan ha en direkt effekt på Foxp3:s bindning och inhibering av RORγt. Också Il-23 uppreglerar STAT3 och har en synergisk effekt tillsammans med Il-6, vilket som sagt uppreglerar Il-23

receptorerna på cellerna (Yang *et al.* 2007). Men som redan har nämnt kan cytokinet Il-21 ersätta Il-6, och kan vid dess frånvaro också aktivera STAT3 (Korn *et al.* 2007, Chen *et al.* 2007, Zhou *et al.* 2008).

Th17-celler är dock inte helt plastiska efter differentiering. Gagliani *et al.* (2015) visade att i närvaro av TGF-β kan Th17-celler ombildas till Treg-celler i möss, speciellt under immun respons mot bakterier eller parasiter. Den motsatta reaktionen är också möjlig där Treg-celler ombildas till Th17-celler (Komatsu *et al.* 2013). Th17-celler kan också ombildas till andra subtyper, vilket ofta är en del av just MS sjukdomsförlopp där Th17 ombildas till Th1-liknande celler (Kebir *et al.* 2009, Hirota *et al.* 2011).



Figur 1. I närvaro av TGF-β aktiveras Foxp3 i naiva T-hjälparceller och cellen utvecklas till en T-regulatorisk cell. I närvaro av TGF-β och Il-6 eller Il-21 aktiveras ROR γt och STAT3 och cellen utvecklas till en Th17-cell.

Vad gör Th17-celler?

Il-17

En viktig del av hur Th17-celler definieras är genom vilka proteiner som de tillverkar och utsöndrar (Tabell 1). Som redan nämnts är Th17-celltypen döpt efter Il-17A, dess signatur cytokin som ofta kallas bara Il-17. Tillverkning av Il-17 uppregleras av RORγt som en del av differentieringsprocessen. Det är ett cytokin som agerar inom inflammatoriska responser från immunförsvaret, och stimulerar andra celler genom att binda till receptorer på deras yta. De i sin tur stimulerar bildning av inflammatoriska substanser (till exempel histamin) som sedan utsöndras (van den Berg & McInnes 2013). Il-17 stimulerar också andra celler att bilda och utsöndra ämnen som attraherar fler Th17-celler till det inflammerade området (Onishi & Gaffen 2010). En sista väldigt viktig egenskap som cytokinet har är att stimulera kringliggande celler att tillverka ämnen som attraherar neutrofiler (fagocyter som är del av det ospecifika immunförsvaret) (Onishi & Gaffen 2010, van den Berg & McInnes 2013). Neutrofiler har kort levnadstid i vävnader och finns därför inte i större mängder om de inte attraheras av t.ex. Il-17 till infekterade vävnader (Summers *et al.* 2010, Kolaczkowska & Kubes 2013).

Il-21, Il-22 och Il-26

Cytokinet Il-21 fungerar som en viktig del av differentiering till Th17-celler och är ett cytokin som cellerna tillverkar själva. Förutom att agera som en faktor i differentiering av Th17-celler från naiva T-celler om Il-6 inte är närvarande (Korn *et al.* 2007), har Il-21 också andra roller i immunförsvaret. Det stimulerar bildningen av bland annat makrofager och NK-celler så väl som utsöndringen av inflammatoriska substanser från mast celler (Korn *et al.* 2009). Th17-celler utsöndrar även cytokinerna Il-22 och Il-26 som också har visat sig delta i differentieringen från naiva T-celler, om än i mindre viktiga roller än Il-21 (Wilson *et al.* 2007). Utöver deras roll i bildningen av Th17-celler har båda två separata roller inom immunförsvaret. Il-22 är speciellt viktig för försvar mot infektioner i slemhinnor. Som

respons mot infektion kan proteinet stimulera tillväxten av epitelvävnad, och bildningen av olika proteiner i epitelvävnad som bidrar till slemhinnans skydd mot patogener (Zheng *et al.* 2007, Valeri & Raffatellu 2016). Il-22 stimulerar också utsöndringen av flera antimikrobiella proteiner, t.ex. protein som gömmer undan nödvändiga metalljoner som patogener kan behöva för att växa (Liang *et al.* 2006, Valeri & Raffatellu 2016). Il-26 hör till samma underfamilj av cytokiner som Il-22 och är också viktigt som en del av immunförsvaret kopplat till kroppens slemhinnor (Stephen-Victor *et al.* 2016). Det har också delvis liknande funktioner; Il-26 stimulerar andra celler till att bilda proteiner som i sin tur rekryterar neutrofiler (Lee & Cua 2015, Stephen-Victor *et al.* 2016). En stor skillnad är dock att Il-26 har direkta antimikrobiella effekter och kan bilda porer i det bakteriella cellmembranet (Lee & Cua 2015).

GM CSF

”Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor” (GM CSF) är ett annat protein som utsöndras av Th17-celler. Det hör till familjen CSF-protein som allmänt deltar i att bibehålla balansen av myeloiska celler (vita blodkroppar) i kroppen, men just GM CSF är mer involverad i inflammatoriska respons mot patogener (Becher *et al.* 2016). Flera olika försök har visat att inhibering av GM CSF i möss inte påverkar balansen av myeloiska celler på samma sätt som de andra medlemmarna i familjen (Granulocyte Colony-Stimulating Factor och Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Vremec *et al.* 1997, McQualter *et al.* 2001, Suzuki *et al.* 2008, Constantinescu *et al.* 2015). Detta tyder på att GM CSF inte har en roll som bibehållare av systemet utan har en funktion inom mer specifika förhållanden. En annan skillnad är att närvaron av GM CSF i det totala systemet är mycket liten jämförd med de andra CSF proteiner (Becher *et al.* 2016). GM CSFs viktigare roll är lokalt där proteinet produceras och verkar som en del av reaktioner mot infektioner. Exakt vilka myeloiska celler som GM CSF interagera med är inte helt säkert och varierar troligtvis mellan olika vävnader där proteinet är verksamt. Troligt är i alla fall att GM CSF aktiverar fagocyterande celler (Bhattacharya *et al.* 2015, Becher *et al.* 2016).

Tabell 1. Översikt över några av de proteiner som utsöndras av Th17 celler samt deras funktion.

Protein	Funktion
Il-17	Stimulerar bildningen av inflammatoriska substanser Attraherar mer Th17-celler till området Attraherar neutrofiler till området
Il-21	Kan aktivera STAT3 i frånvaro av Il-6 Stimulerar bildningen av makrofager Stimulerar bildningen av inflammatoriska substanser
Il-22	Stimulerar bildningen av epitelvävnad Stimulerar bildningen av antimikrobiella protein
Il-26	Attraherar neutrofiler till området Har direkt antimikrobiell effekt
GM CSF	Aktiverar fagocyter Interagera med myeloiska celler som en del av inflammatoriska responser

Th17 i MS

När man först började undersöka Th-cellers roll i MS så fokuserade man framförallt på Th1-subtypen. Resultaten var tvetydiga men det starkaste beviset för Th1-cellers betydande roll var bundet till cytokinet Il-12. Il-12 stimulerar bildningen av Th1-celler och när bildningen av en av de två subenheterna som bygger upp Il-12 stoppades uppstod resistens mot EAE i försöksdjur. Subenheten Il-12p40 är en av två subenheter i Il-12, men test visade att inhibering av den andra subenheten, Il-12p-35, inte gav samma resistans. Det tydde på att Il-12 inte var en avgörande faktor i utvecklingen av EAE eftersom Il-12 inhiberas om någondera av dess två subenheter inhiberas (Rostami & Ciric 2013). Cua *et al.* (2003) visade att det var cytokinet Il-23 istället för Il-12 som var den avgörande faktorn. När bildningen av Il-23 inhiberades utvecklade möss inte EAE. Också när mössen injicerades med autoreaktiva T-hjälparceller som redan var aktiverade mot myelin så gav inhiberingen av Il-23 resistans mot EAE. Il-23 byggs också upp av två slags subenheter, av vilken en är just Il-12p40, vilket förklarar resultaten som tidigare forskare fått. Den andra, Il-23p-19 som är en subenhet i Il-23 men inte i Il-12, gav också resistans mot EAE vilket ytterligare visar på att Il-23, och inte Il-12 är en avgörande faktor i EAE (Cua *et al.* 2003). Som nämnts ovan så kan Il-23 vara en kontrollerande faktor för tillväxt av Th17-celler, vilket tydde på att Th17-celler och inte Th1-celler hade den mer betydande rollen inom MS sjukdomsförlopp. Ett experiment av Cai *et al.* (2017) som undersökte mängden mRNA för olika transkriptionsfaktorer och cytokin i möss som ledd av EAE, konfirmerade ytterligare Th17-cellernas vikt för MS. När EAE förloppet började påverka mössen på alvar så ökade uttrycket av RORγt mRNA i hjärnan och ryggmärgen kraftigt, vilket visar på att mängden Th17-celler ökar.

Vägen in till CNS

Avgörande för om någon av T-hjälparcellerna överhuvudtaget kunde ha en roll i MS patogenes är huruvida cellerna kan ta sig fram till CNS. Det centrala nervsystemet, och mer specifikt hjärnan, är omgiven av blod-hjärn-barriären, endotelceller med täta fogar som omger alla blodkärl i hjärnan. För att alls kunna påverka hjärnan som i MS måste därför Th17-cellerna kunna ta sig fram till och förbi blod-hjärn-barriären.

För att en Th-cell skall vara autoreaktiv måste den först aktiveras med autoantigen som mål. Den allmänna uppfattningen idag är att dessa ofta bildas i det perifera systemet och inte i CNS själv (Korn & Kallies 2017). Berer *et al.* (2011)visade att kommensala bakterier (bakterier som inte skadar deras värd) i mag-och-tarmkanalen kan vara en källa till autoreaktiva Th-celler, och specifikt autoreaktiva celler som reagerar på myelin protein i CNS.

När Th-celler har aktiverats med autoantigen som mål måste de ännu ta sig fram till och in i CNS för att EAE eller MS skall uppstå. Flera olika experiment har visat att olika faktorer är nödvändiga för det här steget och för att EAE alls skall uppstå då möss med inhiberad tillverkning eller aktivitet av dessa protein är EAE resistenta. År 2000 visade Fife *et al.* (2000) att CCR2, receptorer för kemokiner, var nödvändig för att EAE skall uppstå. Kemokiner är små cytokiner som rekryterar lymfocyter till infekterade vävnader genom att skapa en kemisk gradient som receptorer på lymfocyterna kan känna av. På så sätt kan lymfocyter riktas mot specifika platser i kroppen (Fife *et al.* 2000). Gris *et al.* (2010)visade att inflammasomet NLRP3 spelade en viktig roll för utvecklingen av EAE då NLRP3 negativa möss (möss med där NLRP3 inhiberats) hade mindre allvarliga fall av EAE än vildtyp möss. Inflammasom är komplex av flera proteiner som bland annat initierar celldöd och inducera inflammation i vävnader som en del av inflammatoriska responser på infektion (Schroder &

Tschopp 2010). Men en av orsakerna att inhiberingen av NLRP3 hade effekt på EAE var att när inflammasomen inhiberats fann man mycket mindre autoreaktiva Th-celler i CNS (Gris *et al.* 2010). År 2012 visade Inoue *et al.* (2012) att en av NLRP3s funktioner var i skapande av en kemisk gradient som rekryterar Th-celler till CNS. I samma artikel redogjorde gruppen också för teorin att migrationen av Th17-celler från resten av kroppen till CNS var en nödvändig del av skeendet som gjorde EAE allvarligare då möss som fått autoreaktiva Th-celler injicerade direkt till CNS visade på mindre grava fall av EAE. Receptorn EBI2 har nyligen också visats ha en betydande roll i migration från det perifera systemet till CNS (Wanke *et al.* 2017). Möss som injicerades med EBI2 negativa Th17-celler utvecklade EAE långsammare än möss injicerade med vildtyp Th17-celler. Wanke *et al.* (2017) visade också att enzymer som producerar EBI2:s huvudsakliga ligand är uppreglerade under EAE.

För att faktiskt infiltrera CNS använder Th-celler sig av transmembranproteiner som kallas integriner. Redan innan Th17-celler upptäcktes identifierades en integrin som minskade effekten av EAE när den inhiberades, α4β1 (eller VLA-4) (Yednock *et al.* 1992). Men inhibering av VLA-4 ger inte total resistans mot EAE och Rothhammer *et al.* (2011) identifierade en annan integrin, αLβ2 (eller LFA-1), som när den inhiberas samtidigt som VLA-4 ger total resistens till EAE i möss. Deras experiment visade att Th1-celler som också spelar en roll i EAE behöver VLA-4 för att kunna infiltrerar CNS och Th17-celler behöver LFA-1. Att blockera VLA-4 ger därmed en reducerad version av sjukdomen då Th1-celler inte bidrar till patogenes. Ett annat viktigt protein som Th17-celler uttrycker är kemokin receptorn CCR6. Reboldi *et al.* (2009) visade att CCR6 negativa möss i hög grad är resistenta mot EAE. CCR6 påverkar inte Th17-cellernas differentieringen men har en stark påverkan på hur mycket autoreaktiva Th17 celler som infiltrerade CNS. De upptäckte vidare att om CCR6 negativa mössen tillförs Th17-celler som har CCR6 receptorer så försvinner resistensen och EAE utvecklades. CCR6 receptorer reagerar med liganden CCL20 som uttrycks starkt i epitelvävnaden i plexus choroideus men inte i parenkym vävnaden i hjärnan. Plexus choroideus är den vävnaden som ger upphov till cerebrospinalvätska, och skyddas också av täta fogar precis som blod-hjärn-barriären. Upptäckten som Reboldi *et al.* (2009)gjorde tyder på att just plexus choroidues kan vara en plats där Th17-celler infiltrerar CNS. Reboldi *et al.* (2009)gjorde en noggrannare undersökning av Th17-cellerna och andra immun relaterade celler i CNS i möss. De visade att när sjukdomen fortskred fanns det också en stor mängd CCR6 negativa celler i CNS. Detta tydde på att CCR6 receptorerna är nödvändiga hos Th17-cellerna för att initiera sjukdomen men inte för dess fortskridande.

Il-17, en av de karaktäristiska cytokinerna utsöndrade av Th17-celler kan skada blod-hjärn-barriären med hjälp av reaktiva syreföreningar (ROS från ”reactive oxygen species”) (Huppert *et al.* 2010). Det här gör det lättare för andra celler från immunförsvaret att ta sig in i CNS och vidare bidra till sjukdomsförloppet. Kebir *et al.* (2007) visade också att Il-17 samt Il-22 utrycker protein som inhiberar bildandet av protein involverade i tillverkningen av täta fogar mellan epitelceller. Celler i blod-hjärn-barriären uttrycker också receptorer för Il-17 och Il-22 nära inflammerade områden i hjärnan, vilket kan underlätta migration av flera Th17-celler till CNS. Il-17 har också en roll i att aktivera och rekrytera neutrofiler till inflammerade områden i kroppen. Neutrofiler i tur utsöndrar också ett antal proteiner och molekyler, däribland ROS, men också matris metalloproteaserna MMP2 och MMP9 som skadar det basala membranet mellan epitelvävnaden och parenkym vävnaden i hjärnan (Agrawal *et al.* 2006). Allt detta bidrar till att skada blod-hjärn-barriären och underlättar vidare rekrytering av Th.celler och av andra celler involverade i EAE och MS patogenes.

Th17-cellers effekt i CNS

När man väl klargjort att Th17-celler kan infiltrerar CNS så blir frågan vad de gör när de väl är där. Th17-celler som reagerar på autoantigen känner igen myelin och reagerar då mot dessa som om de är en infekterande cell och utsöndrar sedan proteiner och cytokiner som orsakar inflammation (Rostami & Ciric 2013). Men vilka av cytokinerna som utsöndras av Th17-celler som är viktiga för sjukdomsförloppet var länge oklart. När Th17-celler först identifierats så var det naturligt att titta på deras signatur cytokin Il-17A som den mest troliga nyckelfaktorn i patogenes. Som redan har diskuterats så har Il-17 en roll både genom att skada blod-hjärn-barriären (Kebir *et al.* 2007, Huppert *et al.* 2010) och att rekrytera och aktivera makrofager och andra skadliga celler mot de celler som antigenen sitter på (Onishi & Gaffen 2010, van den Berg & McInnes 2013). Men försök visade över tid att även om inhibering av Il-17 påverkade EAE sjukdomsförloppet (Komiyama *et al.* 2006) så var proteinet inte nödvändigt för att sjukdomen skulle uppstå (Haak *et al.* 2009). Andra cytokiner från Th17-celler (Il-21, Il-22 och Il-26) undersöktes också och man fann att även om de hade en roll inom MS patogenes och bidrog till mer allvarliga fall av sjukdomen så var de inte en nyckelfaktor (Rostami & Ciric 2013).

Patogena Th17-celler

GM CSF

Man vände sig till ett annat cytokin, GM CSF, som Th17-cellerna producerar. GM CSF produceras inte bara av Th17-celler utan också av Th1-celler och av flera andra celler involverade i immunförsvaret och utanför immunförsvaret. Bland annat så inducerar cytokinet Il-17 utsöndringen av GM CSF från andra immunceller (Bhattacharya *et al.* 2015, Becher *et al.* 2016, Valeri & Raffatellu 2016). Som redan nämnt så har GM CSF en roll främst inom inflammatoriska responser där den aktiverar olika myeloiska celler, närmare bestämt granulocyter och makrofager (Bhattacharya *et al.* 2015). GM CSF stärker också dessa målcellers överlevnad och förökning (Bhattacharya *et al.* 2015). Guthridge *et al.* (2006) visade ett samband mellan GM CSF koncentration och dess funktion där en lägre koncentration stimulerar cell överlevnad medan en högre koncentration leder till både längre överlevnad och förökning. Med ett sådant samband mellan koncentration och effekt är det lätt att se det möjliga sambandet mellan en ökande GM CSF koncentration och den patogena effekten från celler som utsöndrar cytokinet. Utöver att stimulera fagocytiska celler som direkt kan skada myelin och oligodendrocyter kan GM CSF också förstärka responsen från det adaptiva immunförsvaret. Försök där möss injicerades med GM CSF visade att cytokinet ökade mängden dendritiska celler som genom att presentera antigen på sina membran som de plockat upp från sin omgivning kunde aktivera fler Th-celler i hjärnan (Mausberg *et al.* 2009).

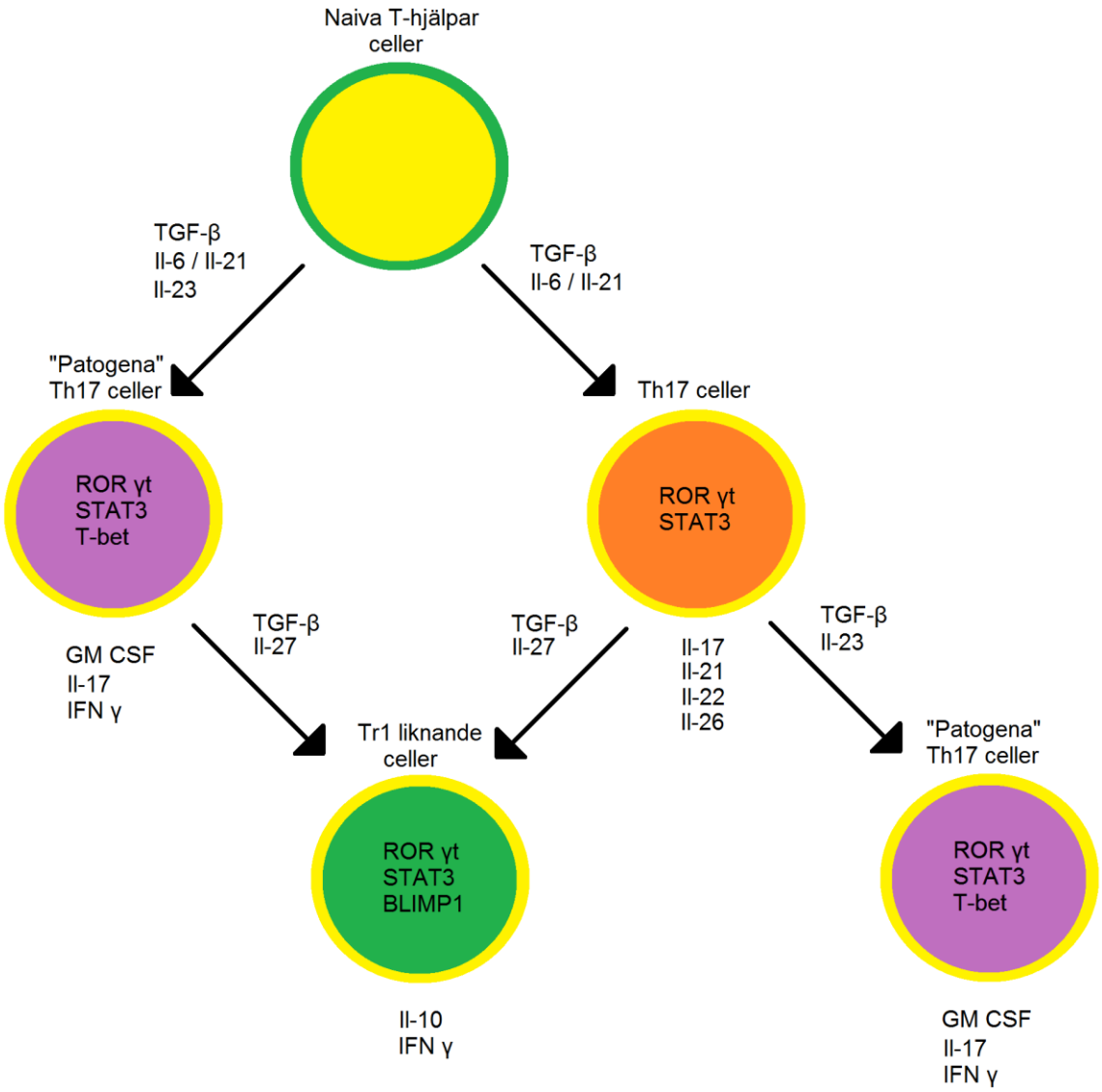
Il-23 och differentieringen till patogena Th17 subtyper

Ett experiment av El-Behi *et al.* (2011) visade att inhibition av GM CSF i Th17-celler som implanterades i möss minskade sjukdomens styrka kraftigt jämfört med celler som fortfarande utsöndrade GM CSF. Detsamma gällde även Th1-celler som också utsöndrar GM CSF och som man fortfarande tror spelar en viktig roll inom utvecklingen och fortskridningen av MS. Ett intressant samband som El-Behi *et al.* (2011) också fann var att GM CSF inducerad utsöndring av Il-23 från andra celler i Th17-cellens omgivning, vilket bidrar till större ökning av Th17-celler. Vidare visade gruppen att Il-23 var viktigt för att Th17-cellerna skulle uttrycka högre nivåer av GM CSF. Detta visar på en positiv feedback loop mellan de två cytokinerna GM CSF och Il-23.

Under differentiering kan alltså Th17-celler utvecklas till mer eller mindre patogena celler beroende på deras kemiska omgivning. Som redan nämnts är Il-23 celler avgörande för utveckling av EAE, men det är inte ett nödvändigt cytokin för utvecklingen av Il-17 positiva celler. Snarare verkar det som om Il-23 som uttrycks speciellt i inflammerad vävnad (Veldhoen *et al.* 2006) är avgörande för Th17-cellers utveckling till patogena celler (Hirota *et al.* 2011). Il-23 aktiverade Th17-celler uttrycker också mera EBI2 receptorer, vilket främjar migration till CNS (Wanke *et al.* 2017). Medan TGF-β och Il-6 aktiverar transkriptionsfaktorn RORγt som i sin tur aktiverar uttryck av Il-17 har det visat sig att Il-23 aktiverar transkriptionsfaktorn T-bet (Figur 2) (Kebir *et al.* 2009, Hirota *et al.* 2011, Wang *et al.* 2014, Krausgruber *et al.* 2016). T-bet är den huvudsakliga transkriptionsfaktorn i differentieringen från naiva - celler till Th1-celler, och aktiverar produktion av Th1-cellers signatur cytokin IFN γ (Raphael *et al.* 2015). Th17-celler i närvaro av Il-23 genomgår en förändring där de via T-bet och en annan transkriptionsfaktor, ”Runt Related Transcription Factor 1” eller ”Runt Related Transcription Factor 1” (RUNX1 eller RUNX3), också börjar tillverka IFNγ och därmed kan sägas ha differentierats till en Th1-liknande form av Th17-celler (Wang *et al.* 2014). Mängden T-bet mRNA ökar också kraftigt i hjärna och ryggmärg när EAE utvecklas i möss (Cai *et al.* 2017). Detta kan delvis bero på Th1-celler, men de Th1-liknande Th17-cellerna kan vara en annan källa till denna ökning. Medan man ännu trodde att Th1-celler var den huvudsakliga T-cellstypen verksam inom MS så ansågs IFNγ som ett viktigt protein genom vilket Th1-cellerna påverkade sjukdomsförloppet (Rostami & Ciric 2013). En undersökning av Panitch *et al.* (1987) visade att en ökning av IFNγ mängden i patienter med MS försvårar sjukdomsförloppet genom att ytterligare aktivera immunförsvaret. Kebir *et al.* (2009) visade att i människor är just denna typ av Th17-celler vanligare i personer som lider av MS och att i möss så är det en större andel Th1-liknande Th17-celler som infiltrerar CNS vid EAE. Bettelli *et al.* (2004) visade också att inhibering av T-bet bildning gav resistens mot EAE i möss. Med detta i tanke har man identifierat den Il-23 påverkade Th17-cellstypen som den mer patogena typen vad gäller EAE och MS. De uttrycker huvudsakligen Il-17, GM CSF och IFNγ, cytokiner som har visat sig bidra till MS patogenes. En viss paradox uppträder i och med att man också har visat att inhibering av just IFNγ faktiskt förvärrat MS förloppet i möss (Duong *et al.* 1994) och proteinet har visat sig ha en regulatorisk roll under sjukdomsförloppet (Willenborg *et al.* 1999) trots att tillverkningen av proteinet aktiveras av transkriptionsfaktorn T-bet som är nödvändig för sjukdomen (Bettelli *et al.* 2004, Raphael *et al.* 2015).

Icke patogena Th17-celler

Som redan nämnts så är Th17-celler i sig inte patogena. Om de aktiveras med autoantigen som mål, samt utvecklas i specifika miljöer där Il-23 aktiverar bildning av GM CSF och IFNγ i större utsträckning, kan de agera som patogena celler i CNS. Men också efter att Th17-celler har infiltrerat CNS kan de differentieras till icke-patogena celler. Heinemann *et al.* (2014) fann att i frånvaro av Il-23 så utvecklades Th17-celler till IFNγ och Il-10 uttryckande celler, som då utan GM CSF inte var lika patogena som Il-23 utsatta celler. T-celler som uttrycker mycket Il-10 (men inte Il-4 och bara lite Il-2) kallas samlat för ”T regulatory type 1”-celler, eller Tr1-celler (Battaglia *et al.* 2006). Tr1-celler motarbetar autoimmunitet och inhiberar immunresponser och inflammation, framförallt genom utsöndring av det anti-inflammatoriska cytokinet IL-10 (Battaglia *et al.* 2006). Il-10 inhiberar både presentation av antigen på specifika antigen presenterande celler och produktion av IFNγ (Malefyt *et al.* 1991). IFNγ som redan har nämnst kan agera både inflamatoriskt och regulatoriskt inom sjukdosmförloppet av EAE och MS (Panitch *et al.* 1987, Willenborg *et al.* 1999). För att Tr1-celler skall utvecklas behövs en miljö med cytokinet Il-27 (Figur 2) som produceras av dendritiska celler (Awasthi *et al.* 2007).



Figur 2. Th17-celler som bildas i närvaro av Il-23 uttrycker också transkriptionsfaktorn T-bet och utsöndrar framförallt GM CSF, Il-17 och IFNγ, och är extra patogena. Både patogena Th17-celler och ”standard” Th17-celler kan i en miljö med Il-23 bibehålla eller utveckla en patogena natur. Både två typerna kan i en miljö utan Il-23 men med TGF-β och Il-27 transdifferentieras till Tr1-liknande celler som uttrycker Il-10 och IFN γ.

De celler som Heinemann *et al.* (2014) fann passade definitionen av Tr1-celler; de producerade Il-10 men var inte kontrollerade av regulatoriska T-cellers huvudsakliga transkriptionsfaktor Foxp3. För att vidare undersöka sambandet mellan Il-23 och den nya celltypen, testade de att inhibera Il-23 samtidigt som de inhiberade uttrycket av Il-10 och IFNγ. Resultatet blev möss utan någon resistens mot EAE vilket Il-23 vanligtvis ger. Detta tyder på att Il-23 inhiberar utvecklingen till Il-10 och IFNγ positiva celler, och att den rollen är väldigt viktig för dess betydelse för utvecklingen av EAE. För att ta reda på hur Il-23 inhiberar utvecklingen av de Tr1-lika cellerna tittade Heinemann *et al.*(2014) på vilka transkriptionsfaktorer som var aktiva i Tr1- och Th17-celler (Figur 2.). De fann att transkriptionsfaktorn ”B lymphocyte induced maturation protein-1” (BLIMP1) var en avgörande faktor för utvecklingen av Tr1-celler, men bara i frånvaron av TGF-β och närvaron av Il-27. Om det i omgivningen finns TGFβ samt Il-27 men inte Il-23 utvecklas alltså Th17-celler till immunrespons inhiberande Tr1-celler. Heinemann *et al.* (2014) visade också att

med hjälp av BLIMP1 kan Th17-celler ombildas till Tr1-celler också i en inflammerande miljö, vilket innebär att även om Il-23 påverkade celler har en av de viktigaste rollerna som patogener i MS så har andra Th17-celler en inhiberande roll gentemot sjukdomen.

I en nyare undersökning visade Gagliani *et al.* (2015) att omvandlingen från Th17-celler till Tr1-celler är ett naturligt skift som ofta sker efter en infektion av bakterier eller maskar i möss. De fastställde att TGF-β bidrog till att bibehålla Th17 plasticitet och till att ändra Th17-celler till Tr1-celler under inflammatoriska förhållanden. De lyckades också fastslå transkriptionsfaktorn ”Aryl Hydrocarbon Receptor ”(AHR) som en viktig faktor i TGF-β driven omvandling av Th17-celler.

Diskussion

Th17-celler är en T-hjälparcell typ som är mycket aktiv inom inflammatoriska responser. Cellerna uppkommer när naiva Th-celler differentieras i en miljö med TGF-β och Il-6 eller Il-21. Vid rätt mängder aktiverar de transkriptionsfaktorerna RORγt och STAT3 som är avgörande för Th17 differentieringen (Yang *et al.* 2007, Korn *et al.* 2007, Chen *et al.* 2007, Zhou & Littman 2009). Th17-cellernas signatur cytokin är Il-17, som stimulerar kringliggande celler att bilda inflammatoriska substanser och attraherar neutrofiler och mer Th17-celler till inflammerade områden (Onishi & Gaffen 2010). Th17-celler uttrycker också Il-21 som sedan bidrar till bildningen av flera Th17-celler i en positiv ”feedback loop”. Il-21 stimulerar också bildningen av inflammatoriska substanser och aktiveringen av makrofager (Korn *et al.* 2009, Gharibi *et al.* 2016). Cytokinerna Il-22 och Il-26 agerar båda anti mikrobiellt, Il-22 via andra celler och Il-26 direkt. Il-22 stimulerar också bildningen av epitelvävnad och Il-26 kan attrahera neutrofiler (Liang *et al.* 2006, Zheng *et al.* 2007, Lee & Cua 2015, Stephen-Victor *et al.* 2016, Valeri & Raffatellu 2016). Det protein som utsöndras av Th17-celler som man idag tror är viktigast för MS är GM CSF. Proteinet är involverat framförallt i inflammatoriska responser där de interagerar med olika myeloiska celler. Man vet idag inte exakt vilka myeloiska celler de är frågan om eller hur dessa interaktioner påverkar omgivningen men en sak som man har fastställt är att GM CSF aktiverar fagocyter (McQualter *et al.* 2001, El-Behi *et al.* 2011, Bhattacharya *et al.* 2015, Becher *et al.* 2016).

Th17-celler kan ha ett antal olika fenotyper beroende på omgivningen de differentierades i och ibland kan de också transdifferentiera i efterhand. Il-23 som i allmänhet bidrar till att öka storleken på Th17-cellpopulationen (McGeachy *et al.* 2009) aktiverar också transkriptionsfaktorn T-bet som normalt är den avgörande faktorn i Th1-cellers differentiering. Det gör att Th17-cellerna utvecklar ett antal Th1-liknande egenskaper, framförallt utsöndringen av det inflammatoriska cytokinet IFNγ (Wang *et al.* 2014, Raphael *et al.* 2015, Krausgruber *et al.* 2016). Il-23 stimulerar också en högre nivå av GM CSF utsöndring och GM CSF stimulerar andra immunceller att tillverka Il-23, vilket skapar en positiv ”feedback loop” mellan de två cytokinerna (El-Behi *et al.* 2011). En annan viktigt egenskap Il-23 har är att den inhiberar utvecklingen till Il-10 uttryckande Tr1-liknande celler. I en miljö utan Il-23 men med TGF-β och cytokinet Il-27 kan Th17-celler utveckla en anti-inflammatorisk fenotyp också efter att de differentierats från naiva Th-celler Transkriptionsfaktorn BLIMP1 kan aktivera bildningen av Il-10 till och med i inflammatoriska miljöer, och utan närvaron av TGF-β (Heinemann *et al.* 2014, Gagliani *et al.* 2015).

Sedan upptäckten av Th17-celler år 2005 har vikten av deras roll inom utvecklingen och sjukdomsförloppet av MS klargjorts all mer. Genom de många experiment som har beskrivits

har flera proteiner som interagerar och stimulerar bildningen av Th17-visat sig vara nödvändiga för att EAE skall uppstå. Interleukin-23 kan man säga att var den första av dessa där inhibering av cytokinet gav upphov till total resistans (Cua *et al.* 2003). Mycket har ändrats sedan dess. Heinemann *et al.* (2014) visade att det inte var proteinet i sig utan dess inhibering av uttrycket av Il-10 och IFNγ som var avgörande då det stoppade Th17-celler att utvecklas till de anti-inflammatoriska Tr1 cellerna. Detta visade bara ytterligare på Th17 cellernas vikt inom MS.

Th1 och Th17 är båda viktiga för utvecklingen av MS
Ett viktigt steg var att identifiera GM CSF som det protein som var avgörande för utvecklingen av MS. Det öppnar för en bättre förståelse för MS och för möjligheten till behandlingar som siktar på att inhibera GM CSF:s roll som sjukdomsframkallare. Ett intressant faktum är att både Th17-celler och Th1-celler tillverkar och utsöndrar GM CSF, och att båda fortfarande har en roll i MS. Att bara fokusera på Th17-celler skulle vara fel då det finns bevis på en Th1 driven version av sjukdomen. Rothhammer *et al.* (2011) visade att när infiltration av Th17-celler till CNS inhiberades men inte infiltration av Th1-celler uppstod EAE fortfarande.

Th17-celler som reglerande faktorer
En viktig utveckling de senaste åren är den större förståelsen för Th17-cellernas plasticitet och vad de innebär för sjukdomsförloppet. Gagliani *et al.* (2015) skrev att det var TGF-β som gav Th17-cellerna deras plasticitet vilket senare tillät patogena Il-17 positiva celler att om differentiera till Il-10 positiva Tr1-celler. Det här sammanhanget är definitivt ett som kunde utnyttjas för framtida behandlingar fokuserade på att artificiellt ändra patogena celler till regulatoriska celler. Det är också ett viktigt steg framåt i vår förståelse av Th17-celler och T-celler i allmänhet och deras funktion inom immunförsvaret som tyder på ett mycket mer flexibelt system som är kapabelt till att anpassa sig till nya situationer och är ett bra exempel på kroppens egna försvar mot autoimmuna sjukdomar.

Fortsatt utveckling
En viktig frågeställning som inte tagits upp här är osäkerheten med de definierade kategorierna av Th-celler. Det finns flera orsaker att ifrågasätta de typer som Th-celler idag delas in i. T.ex. har det föreslagits att dela in GM CSF uttryckande celler i en egen kategori eller att Th17-cellerna som kan utvecklas på så olika sätt egentligen inte bör delas in i samma kategori överhuvudtaget. Bättre tekniker, så som RNA-sekvensering, som tillåter en närmare granskning av genuttrycket i celler ger nya möjligheter att definiera celltyper. De kategorier som finns idag är definierade enligt vår nuvarande förståelse av immunförsvaret, något som utvecklas hela tiden. Därför kan ett arbete som detta som riktat in sig på en specifik Th-celltyp och försökt ge en översiktlig bild av denna lätt ge en felaktig uppfattning om hur det verkligen förhåller sig. Th-celltyperna definieras enligt vilka protein de utsöndrar, deras transmembranprotein och hur de differentieras, men som har framgått av det här arbetet så är dessa definierande karaktärsdrag inte nödvändigtvis unika. Th17-celler uttrycker i vissa fall både t-bet och IFNγ, två av de definierande faktorerna för Th1-celler. Tr1-celler å andra sidan uppstår inte bara från Th17-celler utan kan också uppstå på andra vägar.

Med detta i beaktande är det ändå väl värt att titta närmare på en specifik typ för det i sig gör det möjligt att ifrågasätta de gränser som dragits mellan celltyperna. Om Th17-celler alltid kommer definieras som de görs idag, (vilket redan nu inte är en helt tydlig kategori) så är det ändå en intressant och mycket viktig grupp av T-hjälparceller, där en förståelse för dem ökar vår förmåga att hantera sjukdomar så väl som öppnar nya avenyer för forskning.

Tack

Till min handledare Lage Cerenius för goda råd både innan och under skrivprocessen och för återkoppling och hjälp med arbetet, till min seminariegrupp, Carolina Viman och Stefan Bublich, för konstruktiv och hjälpsam kritik och till min familj för att de stod ut med mitt stönande och suckande klockan två på natten innan inlämningarna; tack.

Referenser

Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM. 2006. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. The Journal of Experimental Medicine **203**: 1007–1019.

Ahlgren C, Odén A, Lycke J. 2014. High Nationwide Incidence of Multiple Sclerosis in Sweden. PLOS ONE **9**: e108599.

Awasthi A, Carrier Y, Peron JPS, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL. 2007. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10–producing anti-inflammatory T cells. Nature Immunology **8**: 1380–1389.

Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R, Roncarolo M-G. 2006. Tr1 cells: From discovery to their clinical application. Seminars in Immunology **18**: 120–127.

Becher B, Tugues S, Greter M. 2016. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. Immunity **45**: 963–973.

Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G. 2011. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. Nature **479**: 538–541.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature **441**: 235–238.

Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK. 2004. Loss of T-bet, But Not STAT1, Prevents the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. The Journal of Experimental Medicine **200**: 79–87.

Bhattacharya P, Budnick I, Singh M, Thiruppathi M, Alharshawi K, Elshabrawy H, Holterman MJ, Prabhakar BS. 2015. Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy. Journal of Interferon & Cytokine Research **35**: 585–599.

Cai Y, Shen H, Qin C, Zhou J, Lai W, Pan J, Du C. 2017. The Spatio-Temporal Expression Profiles of CD4 + T Cell Differentiation and Function-Related Genes During EAE Pathogenesis. Inflammation **40**: 195–204.

Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. 2007. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. Seminars in Immunology **19**: 400–408.

Constantinescu CS, Asher A, Fryze W, Kozubski W, Wagner F, Aram J, Tanasescu R, Korolkiewicz RP, Dirnberger-Hertweck M, Steidl S, Libretto SE, Sprenger T, Radue EW.

2015. Randomized phase 1b trial of MOR103, a human antibody to GM-CSF, in multiple sclerosis. Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation **2**: e117.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature **421**: 744–748.

Duong TT, Finkelman FD, Singh B, Strejan GH. 1994. Effect of anti-interferon-γ monoclonal antibody treatment on the development of experimental allergic encephalomyelitis in resistant mouse strains. Journal of Neuroimmunology **53**: 101–107.

El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang G-X, Dittel BN, Rostami A. 2011. The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. Nature Immunology **12**: 568–575.

Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ. 2000. Cc Chemokine Receptor 2 Is Critical for Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Journal of Experimental Medicine **192**: 899–906.

Frohman EM, Racke MK, Raine CS. 2006. Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. New England Journal of Medicine **354**: 942–955.

Gagliani N, Vesely MCA, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, de Zoete MR, Licona-Limón P, Paiva RS, Ching T, Weaver C, Zi X, Pan X, Fan R, Garmire LX, Cotton MJ, Drier Y, Bernstein B, Geginat J, Stockinger B, Esplugues E, Huber S, Flavell RA. 2015. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. Nature **523**: 221–225.

Gharibi T, Majidi J, Kazemi T, Dehghanzadeh R, Motallebnezhad M, Babaloo Z. 2016. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. Immunobiology **221**: 357–367.

Gris D, Ye Z, Iocca HA, Wen H, Craven RR, Gris P, Huang M, Schneider M, Miller SD, Ting JP-Y. 2010. NLRP3 Plays a Critical Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Mediating Th1 and Th17 Responses. The Journal of Immunology **185**: 974–981.

Guthridge MA, Powell JA, Barry EF, Stomski FC, McClure BJ, Ramshaw H, Felquer FA, Dottore M, Thomas DT, To B, Begley CG, Lopez AF. 2006. Growth factor pleiotropy is controlled by a receptor Tyr/Ser motif that acts as a binary switch. The EMBO Journal **25**: 479–485.

Haak S, Croxford AL, Kreymborg K, Heppner FL, Pouly S, Becher B, Waisman A. 2009. IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. The Journal of Clinical Investigation **119**: 61–69.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nature Immunology **6**: 1123–1132.

Heinemann C, Heink S, Petermann F, Vasanthakumar A, Rothhammer V, Doorduijn E, Mitsdoerffer M, Sie C, Costa OP da, Buch T, Hemmer B, Oukka M, Kallies A, Korn T. 2014. IL-27 and IL-12 oppose pro-inflammatory IL-23 in CD4+ T cells by inducing Blimp1. Nature Communications **5**: 3770.

Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, Ahlfors H, Wilhelm C, Tolaini M, Menzel U, Garefalaki A, Potocnik AJ, Stockinger B. 2011. Fate mapping of interleukin 17-producing T cells in inflammatory responses. Nature immunology **12**: 255.

Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann CRW. 2010. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **24**: 1023–1034.

Inoue M, Williams KL, Gunn MD, Shinohara ML. 2012. NLRP3 inflammasome induces chemotactic immune cell migration to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis. Proceedings of the National Academy of Sciences **109**: 10480–10485.

Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, Duquette P, Prat A. 2009. Preferential recruitment of interferon-γ–expressing TH17 cells in multiple sclerosis. Annals of Neurology **66**: 390–402.

Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. Nature Medicine **13**: 1173–1175.

Kolaczkowska E, Kubes P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nature Reviews Immunology **13**: 159–175.

Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. 2006. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. The Journal of Immunology **177**: 566–573.

Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. Nature **448**: 484–487.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. IL-17 and Th17 Cells. Annual Review of Immunology **27**: 485–517.

Korn T, Kallies A. 2017. T cell responses in the central nervous system. Nature Reviews Immunology **17**: 179–194.

Krausgruber T, Schiering C, Adelmann K, Harrison OJ, Chomka A, Pearson C, Ahern PP, Shale M, Oukka M, Powrie F. 2016. T-bet is a key modulator of IL-23-driven pathogenic CD4+ T cell responses in the intestine. Nature Communications **7**:11627.

Lassmann H. 2013. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. Journal of the Neurological Sciences **333**: 1–4.

Lee JS, Cua DJ. 2015. IL-26 AMPs up the TH17 arsenal. Nature Immunology **16**: 897–898.

Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. Journal of Experimental Medicine **203**: 2271–2279.

Malefyt R de W, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, Velde A te, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, Vries JE de. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. Journal of Experimental Medicine **174**: 915–924.

Mausberg AK, Jander S, Reichmann G. 2009. Intracerebral granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces functionally competent dendritic cells in the mouse brain. Glia **57**: 1341–1350.

McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein W, McClanahan T, O'Shea JJ, Cua DJ. 2009. Interleukin 23 receptor is essential for terminal differentiation of effector T helper type 17 cells in vivo. Nature Immunology **10**: 314.

McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CCA. 2001. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. Journal of Experimental Medicine **194**: 873–882.

Nicholson LB. 2016. The immune system. Essays In Biochemistry **60**: 275–301.

Onishi RM, Gaffen SL. 2010. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. Immunology **129**: 311–321.

Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP. 1987. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. Neurology **37**: 1097–1102.

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nature Immunology **6**: 1133–1141.

Rangachari M, Kuchroo VK. 2013. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. Journal of Autoimmunity **45**: 31–39.

Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. 2015. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. Cytokine **74**: 5–17.

Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F. 2009. C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. Nature Immunology **10**: 514–523.

Rostami A, Ciric B. 2013. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. Journal of the Neurological Sciences **333**: 76–87.

Rothhammer V, Heink S, Petermann F, Srivastava R, Claussen MC, Hemmer B, Korn T. 2011. Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of α4 integrin expression during EAE. The Journal of Experimental Medicine **208**: 2465.

Schroder K, Tschopp J. 2010. The Inflammasomes. Cell **140**: 821–832.

Stephen-Victor E, Fickenscher H, Bayry J. 2016. IL-26: An Emerging Proinflammatory Member of the IL-10 Cytokine Family with Multifaceted Actions in Antiviral, Antimicrobial, and Autoimmune Responses. PLOS Pathogens **12**: e1005624.

Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. Trends in Immunology **31**: 318.

Suzuki T, Sakagami T, Rubin BK, Nogee LM, Wood RE, Zimmerman SL, Smolarek T, Dishop MK, Wert SE, Whitsett JA, Grabowski G, Carey BC, Stevens C, Loo JCM van der, Trapnell BC. 2008. Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. Journal of Experimental Medicine **205**: 2703–2710.

Valeri M, Raffatellu M. 2016. Cytokines IL-17 and IL-22 in the host response to infection. Pathogens and Disease **74**: ftw111.

van den Berg WB, McInnes IB. 2013. Th17 cells and IL-17 A—Focus on immunopathogenesis and immunotherapeutics. Seminars in Arthritis and Rheumatism **43**: 158–170.

Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. 2006. Signals mediated by transforming growth factor-β initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. Nature Immunology **7**: 1151–1156.

Vremec D, Lieschke GJ, Dunn AR, Robb L, Metcalf D, Shortman K. 1997. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. European Journal of Immunology **27**: 40–44.

Wang Y, Godec J, Ben-Aissa K, Cui K, Zhao K, Pucsek AB, Lee YK, Weaver CT, Yagi R, Lazarevic V. 2014. The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon-γ-producing T helper 17 cells. Immunity **40**: 355.

Wanke F, Moos S, Croxford AL, Heinen AP, Gräf S, Kalt B, Tischner D, Zhang J, Christen I, Bruttger J, Yogev N, Tang Y, Zayoud M, Israel N, Karram K, Reißig S, Lacher SM, Reichhold C, Mufazalov IA, Ben-Nun A, Kuhlmann T, Wettschureck N, Sailer AW, Rajewsky K, Casola S, Waisman A, Kurschus FC. 2017. EBI2 Is Highly Expressed in Multiple Sclerosis Lesions and Promotes Early CNS Migration of Encephalitogenic CD4 T Cells. Cell Reports **18**: 1270–1284.

Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. 1999. IFN-γ Is Critical to the Control of Murine Autoimmune Encephalomyelitis and Regulates Both in the Periphery and in the Target Tissue: A Possible Role for Nitric Oxide. The Journal of Immunology **163**: 5278–5286.

Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, **Mattson** JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron J-C, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK,

Bowman EP, de Waal Malefyt R. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17–producing helper T cells. Nature Immunology **8**: 950–957.

Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. 2007. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. Journal of Biological Chemistry **282**: 9358–9363.

Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against α4βl integrin. Nature **356**: 63–66.

Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. 2007. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. Nature **445**: 648–651.

Zhou L, Littman DR. 2009. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. Current opinion in immunology **21**: 146–152.

Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. 2008. TGF-β-induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing RORγt function. Nature **453**: 236–240.

Hur är Th17-celler involverade i patogenesen i Multipel Skleros?: etisk bilaga

Sophia Katarina Forsskåhl

Självständigt arbete i biologi 2017

Problematiken

Bör behandlingar mot MS testas på patienter trots att man inte kan vara säker på att behandlingen inte har allvarliga bieffekter?

I forskning kring MS, liksom med all forskning rörande sjukdom, så kommer det en tid då möjliga behandlingar utvecklas och når ett stadium där man snart måste börja testa dem på människor. Det svåra med fråga är att det finns flera olika faktorer som påverkar när och om en behandling skall tillåtas gå till en sådan fas. När det gäller MS kan det finna extra svårigheter. Eftersom sjukdomen förmedlas via det egna immunförsvaret kommer potentiella behandlingar att påverka immunförsvaret. Behandlingar kan därför ha flera sidoeffekter som är svåra att förutsäga i människor innan behandlingarna testats. De kan potentiellt försvaga immunförsvaret, eller leda till att ny autoimmuna sjukdomar uppstår. En rubbad balans av T-hjälparceller kan också öka risken för cancer eller allergier. Vidare är MS en sjukdom som påverkar folk väldigt olika vilket ytterligare försvårar situationen. Bieffekter kan vara personliga, och dessutom svåra att upptäcka i djurmodeller som inte alltid har ett likadant immunförsvar.

Att en potentiell MS behandling kan ha så många bieffekter, många av dem oförutsägbara, gör att det finns ett etiskt dilemma också med friska volontärer. Men när det gäller MS försvåras situationen ytterligare. Sjukdomen kan leda till nedsatt tankeförmåga, vilket gör det svårt att få tillstånd eller veta om personen ens är kapabel att ge tillstånd till behandlingen. Och i gränsfall kan det vara svårt att avgöra om man är kapabel att fatta informerade beslut. Men MS är en svår sjukdom med inget hittills känt botemedel. Antalet människor som lider av den ökar varje år, speciellt i västvärlden. Det finns visserligen godkända behandlingar som kan lindra symptomen eller sakta ner förloppet, men inget som stoppar det helt. Många av dessa behandlingar har också bieffekter, och allmänt sett så ökar antalet och styrkan hos bieffekterna samtidigt som behandlingarnas effektivitet minskar. Det är inte omöjligt att leva ett långt liv trots att man lider av MS, men livskvalitén sjunker och sjukdomen kan vara livsberövande i de senare stadierna. En behandling skulle göra livet lättare och bättre för väldigt många människor, däribland de personer som testar behandlingen.

Då man på förhand inte vet vilka bieffekter som kan uppkomma innebär det också att en behandling aldrig kan godkännas utan test på människor. Så de är en nödvändig del av processen som prövar och godkänner behandlingar. Om för många hinder läggs i vägen för att börja testa behandlingen på människor, skulle ett potentiellt botemedel aldrig realiseras på grund av svårigheterna med att få ut det på marknaden. Största möjliga arbete bör förstås läggas i att minska risker och att se till att volontärer är informerade och kapabla att ge sitt samtycker till testerna. Innan test med MS patienter utförs bör djurtest och test i labb i artificiella miljöer utnyttjas så långt som möjligt. Test med friska individer när det är möjligt är också ett sätt att minska riskerna för MS patienterna. Att börja tester på unga patienter och på relativt nydiagnostiserade patienter minskar risken för att samtycke ges från personer som inte är kapabla att göra informerade beslut. Sammanfattningsvis är test med MS patienser ett måste för att ett botemedel en dag skall hittas. Så mycket som möjligt bör göras för att minska riskerna för patienterna och för att se till att informerat samtycke kan och har getts.