

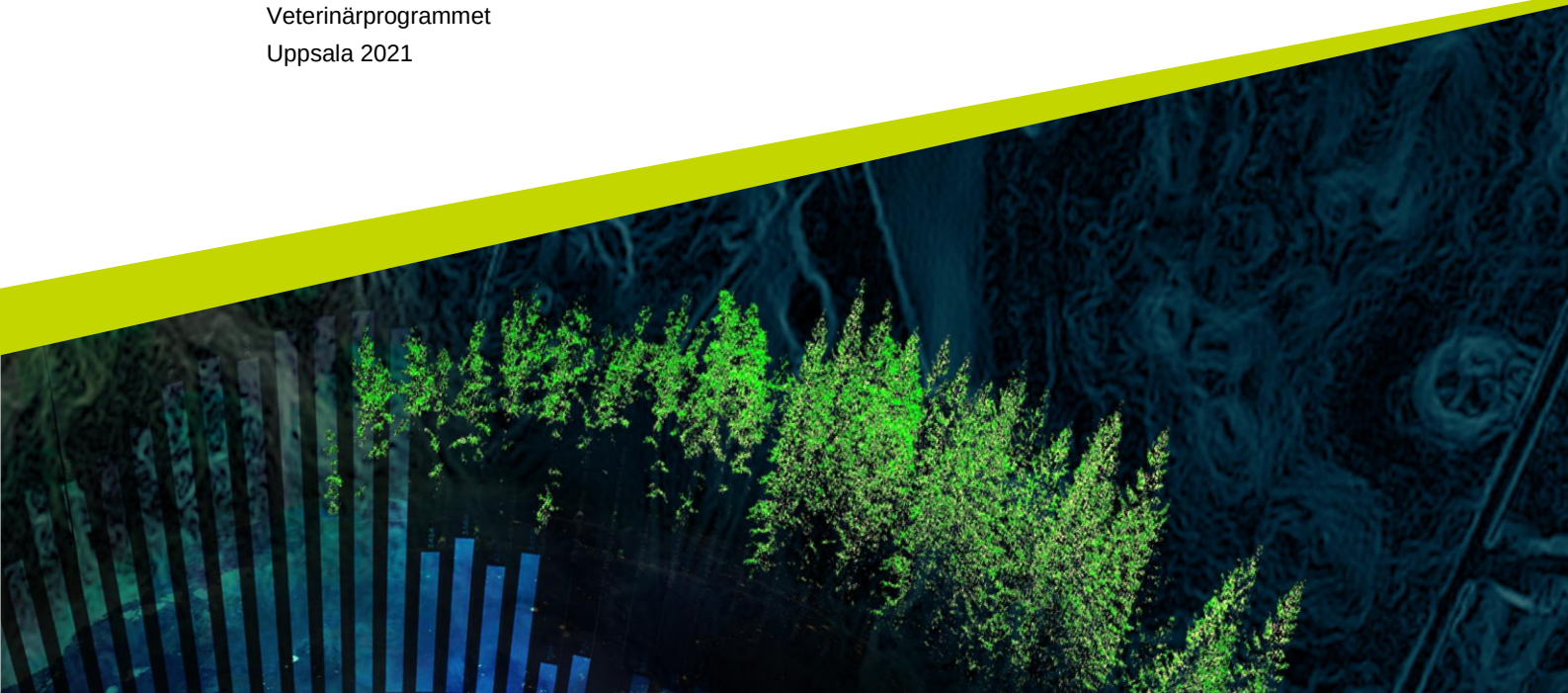


Uttrycksnivåer för interleukin-2 (IL-2)-mRNA och -protein hos Nova Scotia duck tolling retriever

Determination of interleukin-2 (IL-2)-mRNA and -protein expression levels in Nova Scotia duck tolling retriever

Siri Johansson

Examensarbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Institutionen för husdjursgenetik
Veterinärprogrammet
Uppsala 2021



Uttrycksnivåer för interleukin-2 (IL-2)-mRNA och -protein hos Nova Scotia duck tolling retriever

Determination of interleukin-2 (IL-2)-mRNA and -protein expression levels in Nova Scotia duck tolling retriever

Siri Johansson

Handledare: Göran Andersson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjursgenetik
Bitr. handledare: Helene Hamlin, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator: Sara Wernersson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Omfattning: 30 hp
Nivå och fördjupning: Avancerad nivå A2E
Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod: EX0869
Program/utbildning: Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2021

Nyckelord: IMRD, cytokin, immunmedierad reumatisk sjukdom, NSDTR, tollare, tollarsjuka, auto-immunitet, hund, ELISA, RT2-PCR

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjursgenetik

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD) är en autoimmun sjukdom med ökad predisponering hos rasen *Nova Scotia duck tolling retriever*, också känd som tollare. IMRD, som är en del i den så kallade tollarsjukan, karakteriseras främst av smärta och stelhet i leder samt oftast positivt test avseende autoantikroppar (ANA). IMRD är en genetiskt komplex sjukdom, med åtskilliga identifierade riskgener av vilka flertalet är involverade i olika delar av immunsystemet. Beroende på vilken typ av ANA-mönster drabbade hundar uppvisar, kan i tillägg en skillnad i riskgener observeras. Patogenesen bakom IMRD är emellertid inte helt kartlagd.

Målet i studien var att undersöka basuttrycksnivåer för cytokinet interleukin-2 (IL-2), på mRNA-nivå och proteinnivå, hos friska tollare jämfört med friska beaglar. Med avstamp i detta kan IL-2-nivåer i framtiden jämföras mellan friska tollare och tollare insjuknade i IMRD. IL-2 utövar viktiga funktioner för att stimulera immunförsvaret, men också essentiella funktioner för att upprätthålla den immunologiska toleransen. Hos både människor och djur har främst minskade IL-2-nivåer observerats vid flera olika autoimmuna sjukdomar. I studien togs blodprov från friska tollare och beaglar. Studien utfördes genom *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), där 12 tollare och 14 beaglar deltog. Av dessa hundar deltog även 9 tollare och 3 beaglar i *real-time reverse-transcription polymerase chain reaction* (RT²-PCR).

Variationsvidden för koncentrationer IL-2-protein hos tollarna (n=12) uppmättes genom ELISA till 2,5-6,7 ng/l, med en median på 3,3 ng/l. Hos beaglarna (n=11) låg variationsvidden på 2,6-7,9 ng/l, med en median på 5,8 ng/l. En trend observerades där tollarna generellt tycktes ligga lägre än beaglarna i uppmätta IL-2-nivåer. Ingen signifikant skillnad kunde emellertid detekteras mellan de båda raserna. Ett fynd i studien var en signifikant åldersrelaterad minskning av IL-2-nivåer hos äldre individer jämfört med yngre individer inom tollargruppen. Uttrycket av IL-2-mRNA hos tollarna (n=8) bestämdes genom RT²-PCR till ett Δ Ct-spänn mellan 11,1–13,54. Samma spann hos beaglarna (n=3) låg mellan 12,2–13,25. Ingen skillnad i mRNA-uttrycket för IL-2 kunde uppvisas mellan tollarna jämfört med beaglarna. I studien uppvisades emellertid signifikanta skillnader mellan de båda raserna avseende uttrycket av 4 andra gener; CRP, IL-10, IL-1R1 samt TYK2. Ingen korrelation avseende IL-2-mRNA och IL-2-protein kunde detekteras i studien.

Det kan inte uteslutas att tollare generellt uttrycker lägre nivåer IL-2 än andra hundraser, något som i teorin skulle kunna utgöra en initierande faktor för IMRD-utveckling tillsammans med andra riskfaktorer. I framtiden krävs emellertid en större grupp hundar för att kunna säkerställa eventuell signifikans. IL-2 är en komplex cytokin, vilket illustreras av dualiteten avseende dess stimulerande respektive hämmande reglering på immunförsvaret. Om IL-2 visar sig vara involverad i IMRD, kan det därför också spekuleras i huruvida IL-2-nivåer kan ses fluktuera beroende på var i sjukdomsprocessen djuret befinner sig i. Mycket forskning kvarstår emellertid innan slutsatser kan dras kring eventuell koppling mellan IL-2 och IMRD.

Nyckelord: IMRD, cytokin, immunmedierad reumatisk sjukdom, NSDTR, tollare, tollarsjuka, autoimmunitet, hund, ELISA, RT²-PCR

Abstract

Immune-mediated rheumatic disease (IMRD) is an autoimmune disease that shows an increased predisposition in the Nova Scotia duck tolling retriever (NSDTR) breed. In Sweden, IMRD is a part of a disease complex that is often referred to as "toller disease". IMRD is characterized by pain and stiffness in joints, usually with an additional positive test for autoantibodies (ANA). The disease is genetically complex but several genetic risk factors have been identified, most of which are involved in the immune system. Earlier research have found that depending on what type of ANA-patterns the IMRD-positive dogs present, they can be associated with different genetic risk factors. The pathogenesis of IMRD has not been fully characterized.

The aim of this study was to determine basal expression levels of the cytokine interleukin-2 (IL-2), in mRNA and in protein form, in healthy NSDTRs compared to healthy beagles. For future prospects, this study may contribute to assess IL-2 levels in healthy NSDTRs compared to IMRD-positive NSDTRs. IL-2 has been shown to participate in several ways to stimulate the immune system, but IL-2 also performs essential functions in maintaining the immunological tolerance. In both humans and animals, decreased levels of IL-2 has often been associated with several autoimmune diseases. In this study, blood was collected from healthy NSDTRs and beagles. The study was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), where 12 NSDTRs and 14 beagles participated. Out of these dogs 9 NSDTRs and 3 beagles also participated in real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT²-PCR).

The range of IL-2 concentrations in the participating NSDTRs (n=12) was with ELISA measured at 2,5-6,7 ng/l, with a median of 3,3 ng/l. The range of the beagles (n=11) was measured at 2,6-7,9 ng/l, with a median of 5,8 ng/l. An observation was made regarding a possible trend in which the NSDTRs appeared to present lower concentrations than the beagles in measured IL-2 levels. However, no significant difference could be detected between the two groups. One finding in the study was a significant age related decrease of IL-2 protein levels in older individuals compared to younger individuals in the NSDTR group. The expression of IL-2 mRNA in the NSDTRs (n=8) was measured with RT²-PCR at a Δ Ct range of 11,1–13,54. The same range of the beagles was measured at 12,2-13,25. No significant difference in the IL-2 mRNA expression could be detected between NSDTRs and beagles. However, significant differences between the groups were detected regarding 4 other genes; CRP, IL-10, IL1R1 and TYK2. No correlation concerning IL-2 mRNA and IL-2 protein could be distinguished in this study.

The possibility that NSDTRs in general express lower IL-2 levels than other breeds can not be ruled out. This could in theory present an initiating factor in IMRD-development, along with other risk factors. In the future, however, a larger group of dogs is required to be able to ensure any significance. IL-2 is a complex cytokine, which is illustrated by the duality concerning IL-2's stimulating and inhibitory regulation of the immune system. If IL-2 is found to be involved in IMRD, it can therefore also be speculated as to whether IL-2 levels can be seen to fluctuate depending on where in the process of the disease the animal is in. However, a lot of research remains before any conclusions can be made about the association between IMRD and IL-2.

Keywords: IMRD, cytokine, immune-mediated rheumatic disease, NSDTR, toller disease, autoimmunity, dog, ELISA, RT²-PCR

Innehållsförteckning

Förkortningar	9
1. Inledning	11
2. Litteraturöversikt	13
2.1. Hundens immunsystem	13
2.1.1. Det medfödda immunförsvaret	13
2.1.2. Det adaptiva immunförsvaret	14
2.1.3. Autoimmunitet	16
2.1.4. Interleukin-2	19
2.2. Nova scotia duck tolling retriever	22
2.2.1. Förekomst av autoimmuna sjukdomar inom rasen	22
2.2.2. Immunmedierad reumatisk sjukdom hos tollare	23
2.3. Identifierade riskfaktorer associerade med IMRD	25
2.3.1. Risk loci och associerade gener	25
2.3.2. DLA klass II	26
3. Material och metoder	27
3.1. ELISA	27
3.1.1. Preparation	28
3.1.2. Utförande	28
3.2. RNA-preparering	29
3.3. RT ² -PCR	30
3.4. Statistiska metoder	31
4. Resultat	32
4.1. Studiepopulation	32
4.2. ELISA	32
4.3. PCR	36
4.3.1. RNA-kvalitet	36
4.3.2. RT ² -PCR	37
4.4. Korrelation mellan ELISA och RT ² -PCR	40
5. Diskussion	41
5.1. ELISA	41

5.2.	PCR	42
5.3.	Korrelation mellan PCR och ELISA.....	44
5.4.	Confounders	44
5.5.	Möjliga kopplingar mellan IL-2 och IMRD.....	46
5.6.	Förslag på framtida studier	48
Referenser.....		50
Tack		56
Populärvetenskaplig sammanfattning		57

Förkortningar

AICD	Activation-induced cell death
AIRE	Autoimmune regulator
ANA	Autoantikroppar
ANA ^H	Autoantikroppar som uppvisar homogent mönster
ANA ^S	Autoantikroppar som uppvisar kornigt mönster
APC	Antigen-presenterande cell
AP-1	Activator protein 1
ARRE	Antigen receptor response element
CD	Cluster of differentiation
CRAC	Calcium release-activated calcium
CTLA-4	Cytotoxiskt T-lymfocyt-antigen 4
DLA	Dog leukocyte antigen
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
FoxP3	Forkhead box protein P3
GWAS	Genome-wide association study
HLA	Human leukocyte antigen
IFN	Interferon
IIF	Indirekt immunofluorescens
ILF2/ILF3	Interleukin enhancer-binding factor 2/3
IMRD	Immunmedierad reumatisk sjukdom
MHC	Major histocompatibility complex
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
OCT-1	Octamer-binding protein 1
PBMC	Perifera mononukleära leukocyter
RIN	RNA integrity number
RT ² -PCR	Real-time, reverse-transcription polymerase chain reaction
SLE	Systemisk lupus erythematosus
SNP	Single nucleotide polymorphism
SRMA	Steroidresponsiv meningitarterit
TNF	Tumor necrosis factor

1. Inledning

Tollarsjuka är ett samlingsnamn för två immunmedierade sjukdomar; immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD) och steroidresponsiv meningitarterit (SRMA) (Bremer 2018). De båda sjukdomskomplexen har en ökad predisponering hos just tollare, en populär benämning på rasen *Nova Scotia duck tolling retriever*. IMRD är en autoimmun sjukdom som främst kännetecknas av smärta och ökad stelhet i leder, framförallt efter vila (Hansson-Hamlin & Lilliehöök 2009). SRMA är en form av meningit som ofta drabbar yngre individer, med kliniska tecken som feber, nacksmärta, stelhet i nackområdet samt ökad känslighet, så kallad hyperestesi, längs ryggraden (Tipold & Schatzberg 2010). Tidigare ansågs SRMA potentiellt kunna vara en del i sjukdomskomplexet IMRD, men senare forskning har fastställt att det, trots vissa gemensamma genetiska riskfaktorer, rör sig om två olika sjukdomar (Wilbe 2013). År 2002 startades Tollarprojektet av Helene Hamlin (SLU), i samverkan med svenska Tollarklubben. I Tollarprojektet har data samlats in från tollare genom åren för att exempelvis identifiera möjliga genetiska riskfaktorer och biomarkörer för tollare med IMRD och SRMA (Bremer 2018).

I denna studie har arbetet avgränsats till att endast innefatta IMRD. Studien syftar till att bestämma basuttrycksnivåer för interleukin-2 (IL-2) hos friska tollare jämfört med friska beaglar, på proteinnivå och på mRNA-nivå. IL-2 är en cytokin som delvis har funktioner i stimuleringen av immunförsvaret, men också en betydande roll vad gäller att upprätthålla perifer tolerans. Perifer tolerans är en viktig del för att förhindra uppkomsten av autoimmuna sjukdomar (Tizard 2013). Vissa autoimmuna sjukdomar har i studier uppvisat en obalans vad gäller IL-2-nivåer, hos både människor och djur (Suzuki *et al.* 1995; Crispín & Tsokos 2008). Vidare har transkriptionsfaktorerna *interleukin enhancer binding-factor* 2 och 3 (ILF2 och ILF3) hos vissa IMRD-insjuknade hundar rapporterats kunna utgöra autoantigen i sjukdomsförloppet. Dessa transkriptionsfaktorer är nödvändiga för exempelvis uttryck av IL-2 (Bremer 2018). Mot bakgrund av ovanstående rapporter förefaller därför just IL-2 vara motiverat att undersöka närmare vad gäller IMRD.

Intentionen i arbetet är således att förutsättningslöst etablera basnivåerna av IL-2 hos friska tollare och friska beaglar, samt att jämföra dessa grupper med varandra.

Detta kan lägga grunden för framtida forskningsmöjligheter att exempelvis undersöka skillnader i IL-2-uttrycksnivåer hos friska tollare jämfört med tollare som är insjuknade i IMRD. Potentiellt kan därmed en större förståelse för sjukdomsförloppet vid IMRD erhållas, liksom en ny biomarkör om IL-2 visar sig spela en betydande roll.

2. Litteraturöversikt

2.1. Hundens immunsystem

Immunsystemet upprätthålls av multipla och komplexa mekanismer, men kan huvudsakligen delas in i två kategorier: det medfödda immunförsvaret; som säkerställer snabbt och initialt skydd, samt det adaptiva immunförsvaret; som medför ett förlängt och specialiserat skydd (Kennedy 2010).

Cellerna inom immunsystemet kan syntetisera och utsöndra hundratals olika cytokiner, det vill säga kortlivade signalsubstanser som kontrollerar immunresponserna, både lokalt i vävnaden eller systemiskt. Cytokinernas biologiska funktioner överlappar varandra och kan påverka flera olika celltyper. Det finns flertal klassificeringar av cytokiner med olika funktioner; såsom interleukiner (IL), interferoner (IFN), *tumor necrosis factor* (TNF) och kemokiner (Tizard 2013).

2.1.1. Det medfödda immunförsvaret

Det medfödda immunförsvaret består av flera olika subsystem, vilka aktiveras snabbt vid olika typer av fara och mikrobiella attacker. Det medfödda immunförsvaret behandlar alla typer av aktiveringar på liknande sätt: genom processer som leder till inflammation med ökat blodflöde, ökad kärlpermeabilitet, attraherande av neutrofiler och makrofager, stimulering till avdödande av eventuella mikroorganismer samt reparering av skadad vävnad (Tizard 2013). Senare studier har påvisat så kallad *trained immunity*, det vill säga en viss minnesfunktion, hos vissa celler inom det medfödda immunförsvaret – vilket möjligen kan skydda mot vissa reinfektioner (Netea *et al.* 2011). Det medfödda immunförsvaret kan ofta effektivt eliminera eventuella angrepp innan det adaptiva försvaret initieras, men kan också interagera med, och assistera, det adaptiva försvaret (Kennedy 2010).

2.1.2. Det adaptiva immunförsvaret

Det adaptiva immunsvaret är ett sofistikerat system som är specialiserat på att försvara kroppen mot invaderande mikroorganismer. Till skillnad från det medfödda försvaret utvecklas här ett mer avancerat minne mot angripare, vilket gör att eventuella återinfektioner kan behandlas mer effektivt. Medan det medfödda försvaret svarar snabbt, kan det ta flera dagar eller veckor för att det adaptiva försvaret ska bli effektivt. För att trigga det adaptiva immunförsvaret måste ett främmande ämne, så kallat antigen, kännas igen. Antigenet härrör ofta från invaderande mikroorganismer, men kan i vissa fall bestå i andra främmande ämnen eller också kroppsegna molekyler (autoantigen) i autoimmuna sammanhang (Tizard 2013).

Major histocompatibility complex

Celler som träffar på antigen i kroppen kan visa upp dessa på sina antigenpresenterande receptorer. De antigenpresenterande receptorererna kodas av gener som är lokaliserade i ett stort genkluster, vilket kallas *major histocompatibility complex* (MHC). De MHC-genererade receptorererna på cellernas yta uttrycks kodominant (både maternella och paternella alleler uttrycks) och uppvisar en hög grad av nedärvd strukturell variation, så kallad genetisk polymorfism (Kennedy 2010; Tizard 2013). Med anledning av denna förekommande variation hos receptorererna anses MHC-klustret vara en nyckelkomponent för olika individers mottaglighet för autoimmuna tillstånd (Tizard 2013).

MHC-receptorererna delas in i två klasser av gener, som kodar för så kallade transplantationsantigener. MHC klass I återfinns på de flesta kärnförande celler i kroppen och presenterar peptider som blivit processade inuti cellen. Hos en normal cell är dessa peptider kroppsegna och ska inte leda till någon immunaktivering. Vid exempelvis en intracellulär infektion eller hos en tumöromvandlad cell kan emellertid MHC klass I istället uppvisa icke-kroppsegna peptider för immunsvaret, vilket då kan eliminera cellen (Kennedy 2010). MHC klass II uttrycks främst av specifika professionella antigenpresenterande celler (APC) – såsom dendritiska celler, makrofager och vissa aktiverade B-lymfocyter. Ifall APC i vävnaden träffar på en extracellulär mikroorganism kan de via endocytos presentera fragment från mikroorganismen på MHC klass II och därigenom aktivera immunförsvaret. I MHC-genklustret finns även en klass III-region, vilken bland annat kodar för olika komplementfaktorer (Tizard 2013).

Hos hund kallas MHC-klustret också för *dog leukocyte antigen* (DLA) medan exempelvis humana MHC-klustret istället benämns som *human leukocyte antigen* (HLA) (Debenham *et al.* 2005). Hos hundar finns en stor variation av DLA-haplotyper och alleler beroende på ras, men inom raserna är tvärtom variationen relativt

liten. Detta kan möjligen förklara rapporter om rasskillnader i hundars immunrespons avseende vissa sjukdomar. Det har även rapporterats om hög grad av homozygoti inom DLA-komplexet. I en studie, där över 80 olika hundraser inkluderats, kunde en homozygoti på 35 % observeras för DLA klass II. Dessa data bekräftar tidigare observationer på en hög inavelsgrad hos många raser, avseende deras DLA-regioner. Raser med bredare populationsbas, såsom schäfer, labrador retriever, border collie och golden retriever, hade i studien dock mer tendens till heterozygoti i DLA-regionen än andra mer ovanliga raser (Kennedy *et al.* 2002). I autoimmuna sammanhang är det framförallt DLA klass II som utgör en viktig genetisk riskfaktor, särskilt hos hundar som är homozygota för riskhaplotyper inom DLA klass II (Wilbe 2013).

Cellmedierad eller antikroppsmedierad respons

Lymfocyter innehar en avgörande roll i det adaptiva immunförsvaret, och delas huvudsakligen in i B- och T-lymfocyter. T-lymfocyter karakteriseras av sina T-cellsreceptorer, och kan vidare delas in i olika funktionella subpopulationer beroende på deras uttryck av ytmarkörer – så kallade *cluster of differentiation* (CD) (Saalmüller 2006; Tizard 2013). Två av dessa subpopulationer är cytotoxiska T-celler (T_C -celler), som uttrycker CD8, och T-hjälparceller (T_H -celler), som uttrycker CD4 (Kennedy 2010). Via antigenpresentation på MHC klass I eller II samt vidare kostimulatoriska signaler kan T-cellsaktivering ske, vilken följs av cytokinsekretioner samt klonal expansion och differentiering. $CD8^+$ T-celler aktiveras av endogena antigen som presenteras på MHC I, varpå de differentieras till T_C -celler som utövar en cytolytisk verkan på de presenterande cellerna. $CD4^+$ T-celler, som aktiverats av exogena antigen som presenterats på MHC II, kan differentiera till T_H1 - eller T_H2 -celler (Saalmüller 2006). T_H1 - och T_H2 -celler spelar en avgörande roll för immunförsvarets två olika riktningar; den cellmedierade responsen respektive den antikroppsmedierade responsen. Cytokinmönstren som utsöndras av de respektive T_H -cellerna styr immunsvaret mot en av dessa riktningar. T_H1 -cellerna stimulerar den cellmedierade responsen, vilken framförallt består av de tidigare nämnda T_C -cellerna, samt neutrofiler, makrofager och naturliga mördarceller (NK-celler). Styrningen mot cellmedierad respons leder till en elimination av celler som härbärgerar intracellulära patogener, till exempel virus (Kennedy 2010).

B-lymfocyterna utsöndrar antikroppar, och är därför centrala i den antikroppsmedierade responsen. B-lymfocyterna känner igen antigenet med sina B-cellsreceptorer, och kan i vissa fall själva aktiveras och börja producera antikroppar. För ett mer effektivt svar krävs emellertid assistans från T_H2 -celler för aktivering och differentiering till antikroppsproducerande plasmaceller eller minnesceller (Saalmüller 2006). Antikroppar, även kallade immunoglobuliner (Ig), kan delas in i fem huvud-

klasstyper; IgM, IgG, IgD, IgA och IgE. Dessa består av en konstant del som medierar effektorfunktioner samt en variabel del, vilken binder till antigenet. Efter antigenaktivering och assistans från T_H2 -celler kan aktiverade B-celler, utöver antikroppsproduktion, även inducera så kallad antikroppsswitch. Antikroppsswitch innebär ett byte av Ig-klass men med kvarstående specificitet för antigenet (Moser & Leo 2010). Beroende på Ig-klass kan antikropparna utföra flertal skyddande mekanismer. Antikroppar kan exempelvis neutralisera antigen genom att blockera dess förmåga att binda till cellulära målstrukturer, men även agglutinera patogener och därmed ”klumpa” ihop dem för att de lättare ska kunna elimineras. IgM som ofta är en initial respons, är särskilt effektiv vad gäller agglutinationsbildning. Antikroppar kan dessutom via bildandet av antigen-antikroppskomplex, ”märka” antigenet, i en process som kallas opsonisering. De bildade komplexen leder då till att fagocyterande celler lättare kan eliminera antigenet. Den antikroppsmedierade responsen utgör ett skydd mot framförallt extracellulära patogener (Kennedy 2010; Moser & Leo 2010).

2.1.3. Autoimmunitet

Central och perifer toleransutveckling

En immunologisk självtolerans innebär att immunförsvaret inte aktiveras av kroppsegna ämnen – autoantigen – utan endast attackerar främmande ämnen (Tizard 2013). Lymfocyter kan känna igen en enorm variation av olika antigen, detta då gensegmenten som kodar för deras receptorer rearrangeras under utvecklingen. Varje lymfocyt har således en unik, slumpmässigt genererad antigenreceptor. Av denna anledning är det essentiellt att lymfocyterna selekteras fram i en noggrann process för att säkerställa tolerans mot den egna kroppen (Kennedy 2010). Detta görs delvis på en central nivå, där autoreaktiva lymfocyter sorteras bort i tymus eller benmärgen hos däggdjur. T-lymfocyter i tymus måste dels kunna känna igen främmande antigen, men får samtidigt inte reagera starkt på kroppsegna antigen (Tizard 2013). Under T-cellsutvecklingen finns bland annat celler i tymus cortex som uppvisar korta peptider på MHC. T-lymfocyter som interagerar med de uttryckta MHC-komplexen stimuleras till tillväxt i en process som kallas positiv selektion. Detta är nödvändigt för att selektera fram T-lymfocyter som också kommer interagera med MHC-komplex när dessa istället uppvisar främmande antigen (Starr *et al.* 2003; Tizard 2013). Negativ selektion är en senare process där autoreaktiva T-lymfocyter elimineras via apoptos. I den negativa selektionsprocessen återfinns celler i tymus medulla som, via exempelvis transkriptionsfaktorn *autoimmune regulator* (AIRE), kan uttrycka kroppsegna proteiner på MHC som i annat fall enbart uttrycks restriktivt i till exempel huden eller levern. T-lymfocyter som reagerar starkt på de uttryckta självproteinerna elimineras klonalt (Tizard 2013).

Avseende B-lymfocyter sker den slumpmässiga genereringen av B-cellreceptorn i två steg, där den första fasen sker i benmärgen och den andra fasen sker i sekundära lymfoida organ. Av denna anledning finns det fler tillfällen för B-lymfocyter att utveckla autoreaktivitet, och mellan 50–75 % av omogna B-lymfocyter anses ha självreaktiva receptorer i tidiga utvecklingsstadier. Därav är det nödvändigt att toleransutvecklingen initieras i tidigt skede. I benmärgen sker en negativ selektion, där omogna B-cellers bindande till autoantigen triggar en eliminering av självreaktiva kloner (Tizard 2013). Toleransen fortsätter sedan via flera andra olika kontrollstationer i B-lymfocyternas utveckling (Goodnow *et al.* 1995), och vidare positiv och negativ selektion av B-lymfocyterna fortsätter i exempelvis germinalcenter i lymfknutor (Tizard 2013).

Självreaktiva B-celler som undkommit selektionsprocessen även i de sekundära lymfoida organen, liksom självreaktiva T-celler som med en låg affinitet bundit till autoantigen i tymus, kan överleva och gå ut i cirkulationen. På en perifer nivå upprätthålls emellertid B- och T-lymfocyternas tolerans genom att mogna lymfocyter som reagerar på autoantigen går in i apoptos, tystas via klonal anergi eller inhiberas av bland annat regulatoriska T-celler (Treg-celler) i vävnaden (Tizard 2013). Klonal T-cellsanergi induceras när T-cellsreceptorn aktiveras trots frånvaro av kostimulatoriska signaler. Vid anergiinduktion aktiveras ett distinkt ”anergiprogram” för genuttryck hos T-cellen, där ett hundratal olika gener setts vara involverade. Proteinerna som kodas från dessa gener ansvarar för att minska T-cellssignalering och inhibera cytokinproduktionen. Kalciumsignalering och aktivering av transkriptionsfaktorer, så kallade *nuclear factor of activated T cells* (NFAT)-faktorer, tros inneha en viktig roll i uttrycket av detta anergiprogram hos T-cellerna (Baine *et al.* 2009). NFAT är en familj av fem olika transkriptionsproteiner som, utöver att delta i anergiinducering, även reglerar aktivering och differentiering av T-celler. NFAT är också involverade i viktiga funktioner hos andra immunceller, samt deltar i åtskilliga embryonala utvecklingsprocesser (Müller & Rao 2010).

Treg-celler är viktiga i sin funktion att upprätthålla den perifera toleransen, men även för att moderera inflammation. Treg-celler uttrycker bland annat inhibitoriska cytokiner (såsom IL-10 och TGF- β) men också transkriptionsfaktorn *forkhead box protein P3* (FoxP3) (Tizard 2013). Uttrycket av FoxP3 regleras bland annat av NFAT. FoxP3 är viktig för utveckling och upprätthållandet av Treg-celler, och kan även tillsammans med NFAT-faktorer reglera uttryck av karakteristiska gener i Treg-celler (Oh-hora & Rao 2009). FoxP3 inducerar transkription av så kallat cytotoxiskt T-lymfocyt-antigen (CTLA-4) (Tizard 2013), en negativ immunregulator vilken bland annat anses uttryckas konstitutivt hos Treg-celler, det vill säga syntetiseras i en konstant mängd oavsett fysiologiskt behov. Uttrycket av CTLA-4 tycks emellertid inte vara beroende av FoxP3 (Walker 2013). Flera studier rapporterar att

CTLA-4 har en fundamental roll för Treg-cellernas funktion inom perifer tolerans (Kolar *et al.* 2009; Schmidt *et al.* 2009). Hos möss har exempelvis spontan utveckling av dödlig autoimmun sjukdom setts vid förlust av CTLA-4 hos Treg-cellerna (Wing *et al.* 2008). Ämnet är emellertid kontroversiellt och omdebatterat, då studier i annan kontext påvisat inhibitoriskt intakt funktion hos Treg-celler trots förlust av CTLA-4 (Walker 2013).

Autoimmuna sjukdomar

En överhängande risk som ofta associeras med adaptiva immunförsvaret är en otillräcklig självtolerans och därtill utveckling av autoimmunitet. Autoimmuna sjukdomar kan vara systemiska eller vävnadsspecifika. Vissa autoimmuna responser härrör emellertid från en normal immunreaktion på ett autoantigen som tidigare varit gömt i celler eller vävnad, men som kanske exponerats vid vävnadsskada. Detta innebär att tolerans aldrig blev inducerad, och inte att toleransen blev bruten. Vissa autoimmuna reaktioner har också rent fysiologiska funktioner, till exempel autoantikroppar som rensar bort åldrande röda blodkroppar – genom att de röda blodkropparna i slutet av sin livslängd genererar en ny epitop som IgG-antikroppar inte känner igen och därmed eliminerar (Tizard 2013).

Autoimmuna sjukdomar orsakas av ett abnormt immunsvaret mot autoantigen, och kan uppstå till följd av en rad olika genetiska faktorer och omgivningsfaktorer. Självreaktiva T-lymfocyter ska normalt sett gå i apoptos via bindning mellan ”dödsreceptorn” CD95 och dess ligand CD95L, i en process som kallas *activation-induced cell death* (AICD). En mutationsdefekt i CD95 eller CD95L kan leda till att självreaktiva T-celler överlever. Inom humana forskningsfältet finns också rapporterat att defekter i transkriptionsgeneratoren AIRE kan leda till autoimmunitet mot flertal olika vävnader (Tizard 2013). MHC, och då särskilt MHC II-gener, är de starkast associerade genetiska faktorerna med ökad risk att utveckla autoimmuna sjukdomar hos både människor och djur (Wilbe 2013; Rosenblum *et al.* 2015). De exakta mekanismerna till hur MHC bidrar till autoimmunitet är inte helt kartlagda. En del i förklaringen tycks vara att sjukdomspredisponerade MHC anses kunna förknippas med skillnader i den repertoar av kroppsegna peptider som presenteras för T-cellerna inom toleransutvecklingen. Möjligen kan också en alltför svag affinitet mellan det kroppsegna antigenet, som presenteras av en risktyp-MHC, och en potentiellt autoreaktiv T-cell, leda till att den negativa selektionen uteblir medan den positiva selektionen av olika anledningar förblir opåverkad (Tsai & Santamaria 2013). Hos hundar har dessutom den selektiva aveln resulterat i en ökning av homozygoti i MHC-regionen, vilket ökar risken att drabbas av flera autoimmuna eller immunmedierade sjukdomar (Wilbe 2013). Vidare kan autoimmuna sjukdomar utvecklas vid vissa typer av infektioner, så kallad infektions-inducerad autoimmunitet (Tizard 2013).

Patogenesen och vävnadsskadan vid olika autoimmuna sjukdomar beror på vilken typ av lymfocyt som sjukdomen främst medieras av. Vissa av sjukdomarna domineras av cellmedierat svar med cytolytisk elimination av autoantigenet. Andra sjukdomar domineras av autoantikroppar, vilka medför destruktion av autoantigen alternativt orsakar immunkomplexbildning med inflammation som följd (Tizard 2013).

2.1.4. Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) är en cytokin som produceras av aktiverade T_H1 -celler. IL-2 utövar sin effekt på andra immunceller genom stimulering till cellproliferation, antikropsproduktion, IFN- γ -produktion samt cytotoxicitet, men har även en viktig roll i att främja och stimulera överlevnad hos Treg-celler. Treg-celler har, som tidigare nämnts, en viktig roll i den perifera toleransen (Tizard 2013). IL-2-receptorer kan innehålla tre olika subenheter; IL-2R α , IL-2R β och IL-2R γ . Receptorer som endast består av IL-2R α har en låg affinitet för IL-2, medan receptorer innehållande IL-2R β och IL-2R γ har en intermediär affinitet. Den starkaste affiniteten för IL-2 återfinns hos receptorer innehållande alla tre subenheter. Receptorerna som har intermediär och hög affinitet är de som är funktionella. Treg-celler anses uttrycka IL-2-receptorer med hög affinitet konstitutivt, vilket innebär att Treg-populationen är mycket sensitiv för IL-2 (Spolski *et al.* 2018). Anmärkningsvärt nog är inte subenheterna IL-2R β och IL-2R γ unika för IL-2-receptorn, utan kan också ses i olika konstellationer hos andra receptorer tillhörande den så kallade IL-2-familjen (vilka består av IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 och IL-21). Den intermediära IL-2-receptorn, som består av både IL-2R α och IL-2R β , kan därtill också binda IL-15, och alltså inte enbart IL-2 (Damoiseaux 2020).

Vid transkription av en gen bildas pre-mRNA som genomgår en process där de icke-kodande intronen klipps bort, genom så kallad *splicing*, för att övergå till mognet mRNA. De flesta gener genomgår också *alternativ splicing*, vilket är en noggrann process där både intron, men även bestämda delar av exon eller hela exon, klipps bort – något som ger upphov till alternativa isoformer av proteinet som genen kodar för (Sahoo & Im 2010). IL-2-genen består av 4 exon och 3 mellanliggande intron. Inom humana forskningsfältet har två alternativa *splicing* isoformer av IL-2 presenterats; IL-2 δ 2 and IL-2 δ 3 (Denesyuk *et al.* 1998). Dessa isoformer har avsaknad av exon 2 respektive 3, och har rapporterats utgöra naturliga inhibitorer för IL-2-signalerings. De inhibitoriska effekterna tros utgöras av att isoformerna utövar en kompetitiv, dominant receptorbindning gentemot fullängds-IL-2 (Sahoo & Im 2010). Till undertecknads vetenskap är det ännu okänt huruvida dessa alternativa IL-2-isoformerna förekommer hos hund.

IL-2 och autoimmunitet

De senaste 10 åren har forskning inom humana forskningsfältet lett till nya insikter kring den inhibitoriska rollen som IL-2 utövar på immunförsvaret. Historiskt sett har IL-2 framförallt setts som en viktig cytokin för att stimulera immunförsvaret, men senare studier föreslår istället att cytokinets mer essentiella funktion är i dess involvering i självtoleransen. Många tidigare studier på IL-2 gjordes för att bedöma dess terapeutiska möjligheter att förstärka immunförsvaret (Dooms & Abbas 2010), vilket kliniskt har lett till att exempelvis tumörfiltrerande lymfocyter, som *in vitro* stimulerats med IL-2, kan administreras med god effekt hos humanpatienter drabbade av exempelvis melanom och cancer i njurar (Rosenberg 2014). Många nya studier utforskar nu istället den terapeutiska förmågan hos IL-2 att inhibera immunförsvaret (Dooms & Abbas 2010).

Hos människor finns observerade avvikelser gällande IL-2 hos patienter med systemisk lupus erythematosus (SLE) – en autoimmun sjukdom som finns rapporterad hos både människor och djur, och som på flera sätt påminner om IMRD hos tollare. Typiska symptom vid SLE är exempelvis karakteristiska hudlesioner, polyartrit och hematologiska förändringar (Tizard 2013; Bremer 2018). Hos människor anses ett klassiskt kännetecken hos T-cellerna från SLE-patienter vara att de misslyckas att producera IL-2 vid aktivering (Crispín & Tsokos 2008). Hos möss har dessutom utveckling av dödlig autoimmunitet setts vara förenat med frånvaro av IL-2-signaler (Suzuki *et al.* 1995). Utöver stimuleringen av Treg-celler bidrar även IL-2 till en bibehållen tolerans genom involvering i den tidigare nämnda AICD – en apoptosprocess som eliminerar autoreaktiva T-lymfocyter. Det finns flera rapporter om att T-lymfocyter från möss som saknar IL-2 eller IL-2-receptorer har setts vara resistenta mot AICD *in vitro*. Ämnet är emellertid omdebatterat, och det är inte känt om IL-2 utövar en unik funktion gällande stimulering av AICD eller ifall andra cytokiner kan utöva en liknande effekt (Nelson 2004).

I flera olika djurmodeller har just autoimmuna sjukdomar såsom typ I-diabetes förhindrats vid IL-2-administrering. Detta uppvisas exempelvis i en studie där designade IL-2-varianter, så kallade muteiner, användes för att stimulera expansion av Treg-celler vilket ledde till tillbakagång av pågående diabetes hos icke överviktiga möss (Khoryati *et al.* 2020). En hypotes som framförts är att beroende på ifall IL-2-nivåerna i cirkulationen är höga eller låga sker aktivering av olika IL-2-receptorer. Vid låg tillgänglighet på IL-2 tros IL-2-receptorerna med hög affinitet (exempelvis hos Treg-celler) dominera över celler som uttrycker IL-2-receptorer med intermediär affinitet (exempelvis hos konventionella T-lymfocyter). Vid höga nivåer av IL-2 anses istället receptorer med *både* hög och intermediär affinitet aktiveras. Detta är något som bör beaktas vid eventuell administrering av IL-2; höga doser

tros vara mer effektivt mot malignitet, medan lägre doser IL-2 tros stimulera Treg-celler och möjligen återetablera förlorad tolerans (Damoiseaux 2020).

Sammantaget talar rapporter som dessa för att IL-2 bidrar till upprätthållandet av immunologisk tolerans mot kroppsegna biomolekyler, samt att IL-2 potentiellt kan ha möjlighet att förhindra uppkomst av autoimmuna sjukdomar (Setoguchi *et al.* 2005).

Uttryck av IL-2

Regleringen av IL-2-uttrycket är komplex och involverar en mångfald av olika transkriptionsfaktorer, bland annat den tidigare nämnda NFAT-familjen, samt *activator protein 1* (AP-1), *octamer-binding protein 1* (OCT1), *nuclear factor- κ B* (NF- κ B)-familjen, FoxP3, men även *interleukin enhancer binding-factor 2* och 3 (ILF2 och ILF3) har visats spela in en viktig roll (Zhao *et al.* 2005; Spolski *et al.* 2018).

Medlemmarna inom NFAT-familjen har visat sig kunna binda till flertal nyckelområden på IL-2-promotorn, områden som visat sig vara essentiella för att initiera transkription av IL-2 (Rooney *et al.* 1995). Fosforylerade NFAT-proteiner återfinns i cytoplasman hos vilande T-celler (Hogan *et al.* 2003). Aktivering av NFAT-proteinerna sker via stimulering av receptorer på cellytan, vilka är kopplade till så kallade *calcium-release-activated-calcium* (CRAC)-kanaler. Detta leder till kalciuminträde och vidare kaskadreaktioner, såsom aktivering av calcineurin (Oh-hora & Rao 2009). Calcineurin defosforylerar NFAT-proteinerna i cytoplasman, vilka då translokeras till kärnan och kan aktivera transkription. På detta sätt utgör NFAT en direkt länk mellan kalciumsignalering och genuttrycket för IL-2 (Hogan *et al.* 2003). NFAT har setts bilda komplex tillsammans med AP-1 för att inducera IL-2-uttryck. NFAT kan också bilda komplex med FoxP3 för att istället *inhibera* IL-2-uttrycket (Müller & Rao 2010).

ILF2 och ILF3, vilka också beskrivs som *nuclear factor 45* respektive 90 (NF45 och NF90), är transkriptionsfaktorer som ofta fungerar som ett heterodimer-komplex, och som uttrycks i många vävnader. ILF2- och ILF3-komplexet deltar i en uppsjö av olika cellulära funktioner, vilka inkluderar rollen som potent transkriptionsaktivator för IL-2-promotorn (Zhao *et al.* 2005; Shi *et al.* 2007; Wandrey *et al.* 2015). Området dit ILF2 och ILF3 binder på IL-2-promotorn kallas *antigen receptor response element* (ARRE), och är ett unikt område för IL-2-transkriptionen. Detta då en specifik transkriptionsrepressor, som är bunden till ARRE hos vilande T-celler, konverteras till en potent aktivator för IL-transkriptionen under T-cellsaktivering (Shi *et al.* 2007). ILF3 har också visat sig nödvändigt för att minska degraderingen av IL-2-mRNA, och således hålla IL-2-mRNA-nivåerna stabila. Detta har rapporterats ske posttranskriptionellt, genom att ILF3 vid T-cellsaktivering expor-

teras ut ur cellkärnan och samlas i cytoplasman (Shim *et al.* 2002). I cytoplasman har ILF3 sedan visat sig kunna binda till den 3'-otranslaterade regionen (3'-UTR) på IL-2-mRNA och därmed verka stabiliserande (Kuwano *et al.* 2010).

2.2. Nova scotia duck tolling retriever

2.2.1. Förekomst av autoimmuna sjukdomar inom rasen

Nova scotia duck tolling retriever (tollare) är en apportrande fågelhund som i början av 1800-talet utvecklades på Nova Scotia-halvön i Kanada. Ursprunget är inte helt kartlagt, men rasen tros ha sitt ursprung i den *Nederlandse kooikerhondje*. Andra inkorsade raser som diskuterats är bland annat *Chesapeake Bay retriever*, *newfoundlandshund* och möjligen irländsk röd setter (Wilbe 2013; Svenska Kennelklubben 2020). Först i mitten på 1980-talet kom de första tollarna till Sverige (Svenska Tollarklubben 2020), men trots detta är rasen, jämfört med i andra länder, relativt vanlig i Sverige. Generellt anses det vara en frisk ras (Svenska Kennelklubben 2020), men det finns emellertid en del sjukdomar av autoimmun karaktär inrapporterade. Autoimmuna sjukdomar har rapporterats vara tre gånger vanligare hos tollare jämfört med hos andra raser (Bremer 2018). Jämfört med andra raser ses en ökad incidens av immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD), steroid-responsiv meningit-arterit (SRMA) och hypoadrenokorticism (Addisons sjukdom) (Anfinen *et al.* 2008; Hansson-Hamlin & Lilliehöök 2009; Hughes *et al.* 2010; Bremer *et al.* 2015). Av dessa sjukdomar tycks tollarna i Skandinavien drabbas mer av IMRD och SRMA (vilka ingår i benämningen "tollarsjuka") medan förekomst av Addisons sjukdom oftare ses i tollarpopulationen i USA (Wilbe 2013). Via försäkringsdata har incidensrat för IMRD hos tollare uppskattats till 6,8 fall per 10 000 hundår "at risk" i Sverige, vilket är ca 18 gånger högre än hos andra hundraser. I beräkningarna har dock ej den diagnostiska koden "hälta" tagits med i IMRD-underlaget, på grund av att hälta kan representera flera olika tillstånd. Hälta är emellertid den diagnostiska kod som många tollare med IMRD kan erhålla, och därav kan beräknad incidensrat troligen vara i underkant (Bremer *et al.* 2015).

Vid två tillfällen under början av 1900-talet rapporterades utbrott av valpsjuka (*canine distemper*) i Kanada, vilket drabbade rasen hårt och reducerade tollarpopulationen till endast några få individer. En teori är att dessa få individer som lyckades överleva valpsjukan hade ett högeffektivt immunsvaret, vilket möjligen förts vidare inom rasen via så kallad foundereffekt och kan ha lett till den ökade förekomsten av immunmedierade sjukdomar hos tollare (Hughes *et al.* 2010; Wilbe 2013). Även hos människor finns rapporter där foundereffekter föreslagits vara kopplade till immunmedierade sjukdomar (Wang *et al.* 2004).

Immunmedierade sjukdomar och autoimmunitet kan ibland associeras med vissa typer av cancer, ofta härrörande från lymfoida vävnader (Keller 1992; Tizard 2013). Lymfom har tidigare inte rapporterats förekomma med ökad frekvens hos just tollare (Dobson 2013). En senare rapport indikerar dock en ökad incidens av lymfom hos svenska tollare jämfört med andra hundraser i landet (Bremer *et al.* 2015). Andra studier pekar också på att vissa tumörer kan vara vanligare hos tollare (Grüntzig *et al.* 2016), men vidare forskning, som exempelvis pågår på SLU, krävs för att försöka fastställa möjliga associationer eller samspel mellan tollarsjuka och cancer.

2.2.2. Immunmedierad reumatisk sjukdom hos tollare

Immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD) anses vara en autoimmun sjukdom med en stark predisposition hos tollare (Bremer 2018). Den kliniska bilden har länge varit välkänd bland ortopedier och uppfödare i Sverige, men beskrevs första gången kliniskt hos tollare i en studie från 2009 (Hansson-Hamlin & Lilliehöök 2009).

Vid IMRD innefattar den kliniska bilden smärta från leder samt ökad stelhet i leder, framförallt efter vila. Ofta är flera leder affekterade. I tillägg till detta ses ibland smärta i muskler, feber och hudproblem, men detta är mer ovanligt. I studien från 2009 kunde ingen svullnad över lederna palperas och inte heller kunde avvikelser på de smärtpåverkade lederna detekteras radiologiskt. För de 33 hundar som deltog i studien uppstod kliniska tecken vid en ålder mellan 10 månader-7 år, där medianen var 3 år (Hansson-Hamlin & Lilliehöök 2009).

De flesta hundar med IMRD uppvisar klinisk förbättring vid kortikosteroidbehandling, även efter successiv nedtrappning till en låg dos. För enstaka hundar går sjukdomen på remission och behandlingen kan sättas ut helt (Hansson-Hamlin & Lilliehöök 2009).

Ett antal riskfaktorer för att utveckla sjukdomen finns rapporterade, men patogenesen är inte kartlagd. Möjligen skulle obduktioner av IMRD-drabbade hundar kunna bidra med information, vilket försvåras av att de flesta hundar med IMRD inte blir avlivade på grund av sin sjukdom, och särskilt inte i den akuta fasen (Bremer 2018). Bremer *et al.* (2015) rapporterade att IMRD inom tollarrasen tycks vara mer vanligt hos tikar än hos hanar, och att skillnaden var signifikant. Denna skillnad kunde ej påvisas för IMRD hos andra raser, och har heller ej rapporterats i tidigare studier (Hansson-Hamlin & Lilliehöök 2009). Hos människa drabbas kvinnor oftare än män av autoimmuna sjukdomar, och könsskillnaden är extra påtaglig vid exempelvis SLE (Quintero *et al.* 2012). IMRD beskrivs ofta som SLE-liknande eller SLE-relaterad, då den på flera sätt påminner om just SLE.

Antinukleära antikroppar (ANA)

Vid IMRD, liksom vid SLE, uppträffas exempelvis förekomst av antinukleära antikroppar (ANA) i blodet. ANA är autoantikroppar mot intracellulära kärnantigen, och ANA-positivitet är ett klassiskt kännetecken vid SLE, det vill säga att i princip alla hundar med SLE är ANA-positiva (Bremer 2018). Hos tollare med IMRD ses ANA-positivitet på ca 70 % (Hansson-Hamlin & Lilliehöök 2009), det vill säga att ett negativt ANA-resultat inte utesluter IMRD.

Detektering av ANA görs via indirekt immunfluorescens (IIF), där flera distinkta nukleära mönster delar upp ANA i subgrupper – såsom homogent ANA (ANA^H) och kornigt ANA (ANA^S). Prevalensen av de olika typerna av mönster tycks potentiellt kunna kopplas till specifika autoimmuna sjukdomar. Det finns exempelvis rapporter som tyder på att hundar som lider av diagnosen SLE oftare är ANA^H-positiva, medan hundar med SLE-relaterad sjukdom, såsom IMRD, oftare är ANA^S-positiva (Hansson-Hamlin *et al.* 2006). Både ANA^H- och ANA^S-mönster kan dock observeras hos IMRD-positiva hundar, och har visat sig medföra skillnader inom sjukdomstillståndet beroende på vilket mönster djuret är positivt för. Bland annat finns rapporter om skillnader i genetiska riskfaktorer, förekomst av skilda autoantikroppar samt möjligen en viss skillnad i kliniska symptom vid IMRD, beroende på ifall djuret är ANA^H- eller ANA^S-positiv. Av denna anledning har diskussion förts kring ifall IMRD kan delas upp i två olika sjukdomar. I dagsläget finns emellertid inga tydliga indikationer för en sådan sjukdomsindelning gällande IMRD (Hansson-Hamlin & Lilliehöök 2009; Bremer 2018). Hos människa är subgrupperna av IIF-mönster välutvecklade, och det finns framtagna internationell konsensus på beskrivningar av IIF-mönster såsom flertal nukleära (utöver homogena och korniga) men även cytoplasmiska och mitotiska mönster. Eftersom ANA kan rikta sig mot andra cellulära strukturer utöver cellkärnan finns förslag på att ändra namnet 'antinukleära antikroppar' till 'anticellulära antikroppar' (Damoiseaux *et al.* 2019). Hos hund ses dock sällan andra mönster än kornigt och homogent nukleärt mönster i samband med SLE och IMRD.

Proteinerna ILF2 och ILF3 har rapporterats kunna utgöra autoantigen, och således mål för autoantikropparna, hos specifikt ANA^S-positiva hundar med IMRD. ILF2 och ILF3 är, som tidigare nämnt, transkriptionsfaktorer som uttrycks i många olika vävnader och är nödvändiga för uttryck av exempelvis IL-2. Orsakerna bakom den felaktiga toleransen avseende ILF2 och ILF3 är fortfarande okänt, men dessa fynd kan bana väg för att utveckla nya diagnostiska markörer vid IMRD (Bremer *et al.* 2018).

2.3. Identifierade riskfaktorer associerade med IMRD

Flera genetiska riskfaktorer som förknippas med IMRD hos tollare har identifierats. Det är emellertid inte klarlagt exakt hur riskfaktorerna påverkar utvecklingen av sjukdomsförloppet. IMRD beskrivs som en komplex genetisk sjukdom, vilket innebär att sjukdomen kan uppstå till följd av mutationer i flera gener. Utöver detta finns det troligen epigenetiska och miljörelaterade faktorer som spelar in, liksom andra oidentifierade genetiska riskfaktorer (Bremer 2018).

2.3.1. Risk loci och associerade gener

Mellan olika individer inom en art finns en mängd basparsvariationer i genomet – *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Genom att genotypa vissa utvalda SNPs i en region, vilka också kallas ”tag” SNPs, kan vanliga genetiska variationer mellan individer i utvalda regioner påvisas (Gibbs *et al.* 2003). I genomtäckande associationsstudier, så kallade *genome-wide association studies* (GWAS), kan dessa ”tag” SNPs användas för att påvisa genetiska varianter inom en sjukdom via jämförande av verifierade fall och kontroller (Witte 2010). År 2005 presenterades ett hundsekvenseringsprojekt där ~99 % av hundgenomet kartlades, och där ett stort antal SNPs på hundgenomet identifierades (Lindblad-Toh *et al.* 2005). Detta projekt möjliggjorde att IMRD och SRMA sedermera kunde mappas via GWAS. Vid mappningen påvisades fem riskloci, belägna på kromosomerna 3, 8, 11, 24 och 32, som var associerade med ökad risk att utveckla IMRD. Fynden verifierades via finmappning och regional resequensering. Alla identifierade riskloci för IMRD innehöll gener som visats ha stor betydelse för NFAT-vägen, men även för andra viktiga immunfunktioner (Wilbe *et al.* 2010; Wilbe 2013).

Vid vidare studier av nämnda riskloci har ett flertal gener kunnat associeras med IMRD, vilka också uppvisat förändrade genuttryck. Tre gener (*PTPN3*, *WHAMM*, och *BANK1*) har associerats med både ANA^S- och ANA^H-positiva hundar med IMRD, medan tre ytterligare gener (*WFDC3*, *HOMER2*, and *VRK1*) har associerats med endast ANA^H-positiva hundar med IMRD. Ytterligare en gen (*AP3B2*) har kunnat associeras med både SRMA och IMRD (Wilbe *et al.* 2015). Flera av dessa gener har viktiga roller inom NFAT-vägen och i immunregleringen. *PTPN3*, som visade sig vara nedreglerad hos samtliga ANA-positiva tollare med IMRD, kodar för protein som tros inhibera T-cellsaktivering. Detta genom involvering i T-cellsreceptorn, något som slutligen leder till inhibering av NFAT. *HOMER2* är en gen vars kodande proteiner har rapporterats utöva en negativt reglerande effekt på T-celler, detta genom att kompetitivt binda till NFAT där calcineurin ska binda in. *HOMER2* fungerar även negativt reglerande för IL-2 (Huang *et al.* 2008). *BANK1* uttrycks hos B-celler där de innehar en inhiberande roll. Vissa studier inom humana

forskningsfältet har rapporterat associationer mellan *BANK1* och SLE samt andra autoimmuna sjukdomar (Yang *et al.* 2018).

2.3.2. DLA klass II

Resultatet av en selektiv hundrasavel har lett till en minskad genetisk variation, vilket leder till ökad förekomst av homozygoter. Hundar som är homozygota för riskhaplotyper inom DLA klass II har visat sig ha en ökad risk för att utveckla flera olika autoimmuna eller immunmedierade sjukdomar (Wilbe 2013).

DLA klass II har presenterats som en signifikant genetisk riskfaktor även hos ANA-positiva IMRD-hundar. En kandidatgenstudie påvisade 2009 association mellan DLA klass II-haplotypen DRB1*00601/DQA1*005011/DQB1*02001 och IMRD. IMRD-sjuka ANA^S-positiva hundar med nämnda riskhaplotypen uppvisade en ökad risk att utveckla sjukdom, och risken var särskilt signifikant om hundarna var homozygota för riskhaplotypen (Wilbe *et al.* 2009). Dessa fynd har även rapporterats i senare studier (Wilbe *et al.* 2015). Vidare har det också visats att förekomsten av generell homozygoti i DLA klass II-regionen hos ANA^H-positiva hundar ger en ökad risk att utveckla IMRD (Wilbe *et al.* 2009). Eftersom IMRD är en komplex genetisk sjukdom kan emellertid inte förändringar i enbart DLA klass II användas i diagnostiskt syfte. För framtida diagnostiska ändamål krävs en helhetsbild avseende förändrade gener.

3. Material och metoder

Litteraturdelen i arbetet baseras delvis på litteratur i tidigare vetenskapliga publikationer och avhandlingar inom forskargruppen i Tollarprojektet (Sveriges lantbruksuniversitet, SLU). Därtill har även litteratur erhållits genom sökningar i databaserna Pubmed och Google Scholar samt från viss veterinärmedicinsk facklitteratur.

Etisk prövning godkändes av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (Dnr C15/16). Samtliga djurägare godkände att deras vederbörande djur skulle ingå i studien. Blodprov i serumrör och mRNA-rör (*Tempus™ Blood RNA Tubes*) samlades in från 14 friska beaglar från Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU, Uppsala) och 12 friska privatägda hundar från Uppsalaområdet av rasen *Nova Scotia duck tolling retriever*. Blodproverna togs i slutet vacutainersystem. Efter provtagning skakades mRNA-rören kraftigt under 10-15 sekunder, varpå de placerades i frys med temperatur -20°C. Serumrör centrifugerades direkt efter provtagning (3000 varv/min i 10 min) varpå supernatanten pipetterades av, och förvarades i kryorör i -80°C. Inklusionskriterier för deltagande innefattade att djuret var generellt välmående, ej stod på medicinsk behandling i form av kortikosteroider eller NSAID och ej led av någon form av känd systemisk inflammatorisk sjukdom.

Serum tillkom även från 5 tollarsjuka tollare från den befintliga tollarbanken inom Tollarprojektet. Dessa testkördes i ELISA tillsammans med de provtagna hundarna, ur ett jämförande perspektiv. Tre av beaglarna i studien hade provtagits ännu en gång i ett annat syfte, 12 dagar senare än första provtagningen. Dessa tillkomna prover togs med i ELISA för kort utvärdering avseende dygnsvariationer av IL-2.

3.1. ELISA

För att undersöka IL-2-nivåerna i serum genomfördes ELISA med *RayBio® Canine IL-2 ELISA Kit*. Reagenserna, proverna samt standardproverna preparerades i enlighet med tillverkarens instruktioner, efter att ha blivit rumstempererade. Alla prover och standardprover sattes som duplikat på en mikropatta med 96 brunnar, där varje brunn täckts med antikroppar specifikt för hundens IL-2.

3.1.1. Preparation

20 ml tvättbuffert (Item B) späddes med MilliQ-vatten till en volym på 400 ml. En spädning 1:5 utfördes därefter för respektive medföljande buffert; '*Dilutant D*' (Item K) samt '*Dilutant B*' (Item E), genom att späda 15 ml buffert med 60 ml MilliQ-vatten. Den preparerade '*Dilutant D*' användes sedan för att späda alla respektive serumprover 1:2, genom att tillsätta 150 µl serum och 150 µl buffert i provrör.

För standardpreparering tillsattes 400 µl '*Dilutant D*' samt 1 behållare av medföljande standardproteiner (Item C) i ett provrör, vilket ledde till en koncentration på 100 ng/ml standardlösning. Därefter pipetterades 300 µl '*Dilutant D*' i ytterligare 7 provrör, varpå en seriespädning utfördes. Det sista provröret med '*Dilutant D*' utgjorde nollstandard (0 ng/ml). Spädningsserie utfördes enligt tillverkarens instruktioner (Figur 1).

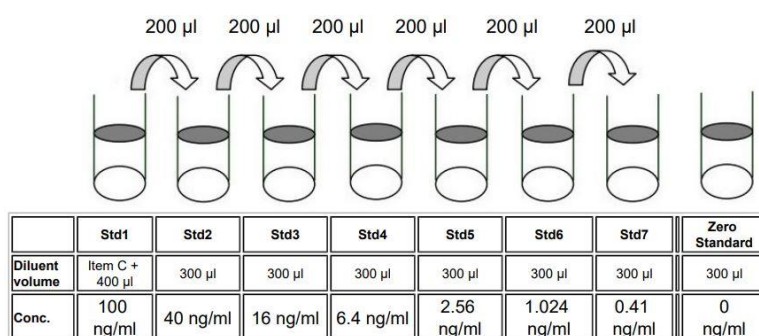


Fig. 1. Spädningsserie för standardprover avseende RayBio® Canine IL-2 ELISA Kit (Raybiotech, 2018)

För att preparera detektionsantikroppar tillsattes 100 µl '*Dilutant B*' vardera till de medföljande två behållarna med antikroppskoncentrat (Item F). Därefter späddes lösningarna 1:80, genom att späda 100 µl antikroppskoncentrat med 7,9 ml '*Dilutant B*'. Preparering av detektionsantikroppar utfördes precis innan lösningarna skulle användas i utförandemomentet.

HRP-Streptavidin (Item G) späddes 1:500 genom att tillsätta 20 µl HRP-Streptavidin i ett provrör med 10 ml '*Dilutant B*'. Denna spädning utfördes precis innan lösningen skulle användas i utförandemomentet.

3.1.2. Utförande

100 µl av respektive prover och standardprover tillsattes som duplikat i varsin brunn, varpå dessa inkuberades i 2,5 h i rumstemperatur. Brunnarna tvättades sedan

med tvättbuffert x 4 i en *Wellwash™ Microplate Washer* (Thermo Scientific™). Därefter tillsattes 100 µl biotinylerad sekundär antikropp till varje brunn, följt av inkubering i 1 h i rumstemperatur. Efter detta tvättades brunnarna precis som tidigare, varpå 100 µl HRP-konjugerat streptavidin pipetterades till vardera brunn, följt av inkubering i 45 min i rumstemperatur. Efter ännu en tvätt av brunnarna, på samma sätt som tidigare, tillsattes en lösning av 100 µl TMB-substrat i vardera brunn följt av inkubering i mörker under 30 min i rumstemperatur. Slutligen tillsattes 50 µl stopp-lösning till varje brunn. Färgutveckling skedde sedan i enlighet med mängden bundet IL-2. Intensiteten på färgen mättes vid 450 nm, och proverna avlästes med en gång med hjälp av en *Multiskan EX* spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific Inc) och mjukvaran *Ascent Software*.

3.2. RNA-preparering

RNA preparerades från perifera mononukleära leukocyter (PBMC) med hjälp av *Tempus™ Spin RNA Isolation Kit*. Isoleringen utfördes genom att deponera respektive prov i varsitt 50 ml provrör, följt av en spädning av varje prov till totalt 12 ml, med hjälp av fosfatbuffrad saltlösning fri från $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (PBS). Provrören försågs med kork och komponenterna blandades med vortexmixer på maximal hastighet i 30 sekunder. Därefter centrifugerades proverna 3000 x g (rcf) i 4°C, under totalt 30 minuter. Supernatanten hölls sedan försiktigt av och insidans väggar torkades försiktigt av med pappersduk. När all vätska var borta adderades 400 µL *RNA Purification Resuspension Solution* till respektive provrör vilka vortexmixades försiktigt. För rening av RNA användes *RNA purification filter* och mikrocentrifug i flera steg, enligt angivelser i tillverkarens instruktioner. Därefter användes nya provrör dit filtren förflyttades. Efter detta adderades 100 µl *Nucleic Acid Purification Elution Solution* till filtret i provröret, följt av inkubering i 2 minuter i 70°C samt centrifugering 16000 x g i 30 sekunder. 100 µl av den uppsamlade RNA-elueringen deponerades sedan tillbaka genom filtret för ytterligare centrifugering 16000 x g. Filtret kasserades varpå ca 90 µl av elutionen tillsattes i ett nytt provrör. Det renade RNA:t förvarades i -20°C.

RNA-kvalitet och -integritet bestämdes via *Agilent Tapestation 4150* med hjälp av *Agilent RNA Screen Tape*. Alla 26 prover analyserades enligt tillverkarens instruktioner. 5 µl av vardera preparerat RNA-prov deponerades i nya rör. Proverna i de nya rören och reagenserna vortexmixades och centrifugerades kort. Därefter tillsattes 5 µl *RNA sample buffert* till samtliga rör i en provrörsremsa, samt 1 µl *RNA Ladder* till anvisad plats för RNA-stege på remsan. 1 µl av vardera RNA-prov tillsattes sedan i varsitt provrör i provrörsremsan, undantaget platsen för RNA-stege. Provrören förseddes med korkar och vortexmixades, med hjälp av en *IKA MS3 vortexer*, i 2000 rpm i 1 minut. Därefter centrifugerades proverna i 1 minut. Proverna

hettades sedan upp till 72°C i 3 minuter varpå de kylades på is i 2 minuter. Slutligen centrifugerades proverna i 1 minut innan de förflyttades till *Agilent Tapestation 4150* och analyserades enligt tillverkarens anvisningar. *RNA integrity number* (RIN) bestämdes för varje enskilt prov.

3.3. RT²-PCR

För att undersöka de uttryckta IL-2-mRNA-nivåerna i serum utfördes en genetisk arrayanalys via RT²-PCR. IL-2 ingick då i en panel av totalt 84 immunologiskt härrörande gener. Totalt möjliggjordes testning av 12 individer, och i PCR-analysen ingick 9 friska tollare och 3 friska beaglar. De aktuella hundarna valdes ut genom indelning i olika köns- och åldersgrupper varpå namn ur varje grupp slumpades fram. Den profil-array som användes var *Dog Innate & Adaptive Immune Responses* (kat.nr 330231 PAFD-052ZA, Qiagen).

En buffert från *RT² First Strand Kit* användes för att eliminera eventuell genomisk DNA-kontamination i de aktuella RNA-proven. 8 µl av vardera RNA-prov (koncentration >56,5 µg/µl, totalmängd 450 µg RNA) blandades med buffert i provrör i enlighet med protokollet till *RT² First Strand Kit*. Blandningen inkuberades sedan i 42°C under 5 minuter och placerades därefter direkt på is. *Reverse transcription mix* beredd sedan, varpå 10 µl av denna tillsattes till varje rör med buffert och blandades försiktigt. Därefter inkuberades blandningen i 42°C under 15 minuter, följt av 95°C under 5 minuter. Sedan tillsattes 91 µl RNase-fritt vatten till varje reaktion, vilket blandades försiktigt. Den färdiga blandningen med cDNA förvarades i -20°C.

RT² SYBR® Green Mastermix blandades tillsammans med cDNA-mixen och RNase-fritt vatten i enlighet med tillverkarens protokoll. 25 µl av PCR-komponenterna pipetterades därefter till varje brunn på vardera medföljande *RT² Profiler PCR Arrays*. PCR-momentet utfördes i *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* för vardera arrayplatta. Inställningar och genomförande av PCR utfördes i enlighet med tillverkarens protokoll. Samtliga PCR-reaktioner utfördes enligt följande: 1 cykel i 10 min med temperatur på 95°C, samt 40 cykler i 15 sekunder med temperatur på 95°C. Slutligen 40 cykler i 1 minut med temperatur på 60°C.

Excelfilen *RT² Profiler PCR Array Data Analysis Spreadsheet 1904*, tillhandahållen och preparerad av Qiagen, laddades ner från företagets hemsida varpå rådatan importerades till dokumentet. Bearbetning av material och vidare analyser utfördes i enlighet med tillverkarens protokoll. För att kompensera icke-biologiska skillnader mellan olika prover behövde en normalisering av datan utföras. Normalisering

av data samt bestämning av genuttrycksratio utfördes i studien genom $\Delta\Delta C_T$ -metoden, där referensgenerna bestod av *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* och *RPLP1*. Kvalitetskontroll erhöles genom utvärdering av kontroller för omvänd transkription, genomiskt DNA samt positiva kontroller.

3.4. Statistiska metoder

Studien omfattar ett mindre antal stickprov vilket försvårar säkerställande av att data är normalfördelade. Hänsyn till detta har tagits vad gäller deskriptiv statistik samt val av statistiska analyser. Data har bearbetats i Excel och analyser utförts via statistiska mjukvaruprogrammet "R" med tillägg av "*R commander*", där statistiska analysen som använts är Mann-Whitneys test. I tillägg till detta har även ett förprogrammerat tvåsidigt T-test, tillhandahållet av Qiagen, använts för att jämföra olika genuttryck i RT²-PCR-analysen. I T-testet användes $2^{-\Delta C_t}$ -värden för varje gen hos tollargruppen jämfört med varje gen hos beaglegruppen.

4. Resultat

4.1. Studiepopulation

Tollargruppen hade ett åldersspann ca 1-12 år, där medianen var 3,5 år. 42 % (5/12) var hanar och 58 % (7/12) tikar. En av tikarna var kastrerad. Beaglegruppen hade ett åldersspann på ca 2-11 år, där medianen var 4 år. 50 % (7/14) var hanar och 50 % (7/14) tikar. Ett visst släktskap fanns mellan flera individer i beaglegruppen. Släktskapet bestod i en triplett helsyskon samt en annan dubblett helsyskon, de sistnämnda även med ett tillhörande halvsyskon. En hund var far åt dubbletten helsyskon samt det tillhörande halvsyskonet.

De 5 tollarsjuka tollarna som, i tillägg till de provtagna hundarna, deltog i ELISA-experimentet hade ett åldersspann på ca 2-11 år där medianen var 7 år. Gruppen bestod av 2 hanar och 3 tikar. 1 av hanarna visade sig vara SRMA-positiv och resterande i gruppen var ANA-positiva tollare med IMRD.

De 9 stycken friska tollare som slumpades fram för RT²-PCR-analys bestod av 4 yngre (0-5 år) och 5 äldre (>5 år) individer, med en könsfördelning på ca 44 % (4/9) hanar och 56 % (5/9) tikar. De 3 beaglarna som slumpades fram var 2, 5 respektive 10 år gamla, och bestod av 2 hanar och 1 tik.

4.2. ELISA

Prover som uppvisade absorbanter högre eller lägre än standardkurvan, kunde inte antas vara linjära och behövde därför uteslutas. Detta innefattade 1 tollare med SRMA från tollarbanken (översteg maxvärde) samt 3 beaglar (där 1 översteg maxvärde och 2 understeg minvärde). Standardkurvas korrelationskoefficient uppmättes till 0,974.

De uppvisade koncentrationsnivåerna av IL-2 hos friska tollare och friska beaglar anges i Tabell 1. Hos beaglegruppen observerades ett extremvärde på 16,5 ng/l (>3

x IQR), vilket också illustreras i Figur 4. Variationsvidden för koncentrationer IL-2 hos friska tollare i denna studie uppmättes till 2,5–6,7 ng/l. Samma siffra hos beaglar uppmättes till 2,6–7,9 ng/l, här fråntaget sitt extremvärde. Median hos tollarna var 3,3 ng/l medan median hos beaglarna låg på 5,8 ng/l, vilket redovisas i Tabell 2. Ingen signifikant skillnad kunde detekteras mellan beaglarna och tollarna vad gäller uppmätta IL-2-värden (Mann-Whitney U=92, n1=11, n2=12, P=0,1164). Fördelning av IL-2-koncentrationer mellan beaglar och tollare illustreras i Figur 2.

Tabell 1. a) Koncentration IL-2 (c) för deltagande friska tollare (n=12) samt variationskoefficient för varje enskilt duplikat (CV). b) Koncentration (c) IL-2 för deltagande friska beaglar (n=14) samt variationskoefficient för varje enskilt duplikat (CV).

1a) Tollare	
c (ng/l)	CV (%)
6,07	1,77
2,49	4,06
3,79	1,75
3,03	1,36
3,36	3,32
6,66	3,3
2,97	1,41
2,88	3,01
3,23	4,8
2,85	1,54
5,5	2,13
5,65	0,81

1b) Beaglar	
c (ng/l)	CV (%)
7,18	1,84
>max	-
3,88	3,34
7,03	1,64
<min	-
7,41	1
2,88	3,01
<min	-
7,89	4,48
3,49	2,05
2,62	10,97
5,8	1,16
2,97	1,41
16,52	0,44

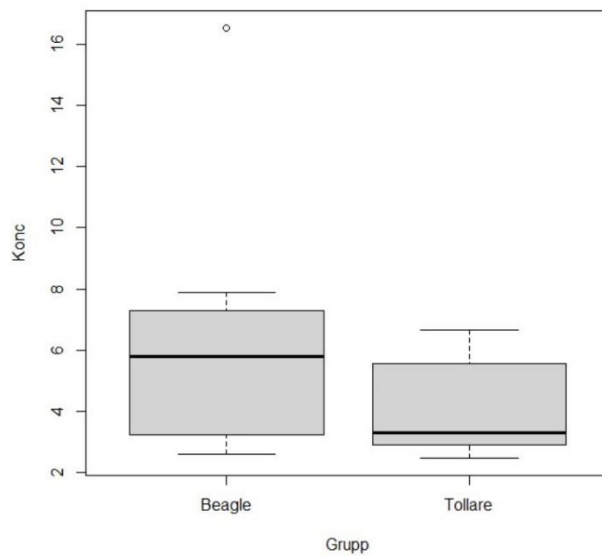


Fig. 2. Boxplot för de uppmätta värdena IL-2 (ng/l) hos friska beaglar (n=11) respektive friska tollare (n=12). De markerade linjerna representerar median för respektive grupp.

Tabell 2. Kvartiler och interkvartilområden för tollare respektive beaglar.

Grupp	Q1 (ng/l)	Median (ng/l)	Q3 (ng/l)	IQR (ng/l)
Tollare	2,9	3,3	5,61	2,71
Beagle	2,97	5,8	7,41	4,44

I denna studie observerades inte heller några signifikanta skillnader i IL-2-nivåer med avseende på kön vare sig hos tollarna enbart (Mann-Whitney U=21, n1=5, n2=7, p-värde 0,6389) eller hos tollare och beaglar sammanslaget (Mann Whitney U=83,5, n1=10, n2=13, p-värde=0,2641). Fördelning av IL-2-koncentrationer baserat på kön illustreras i Figur 3.

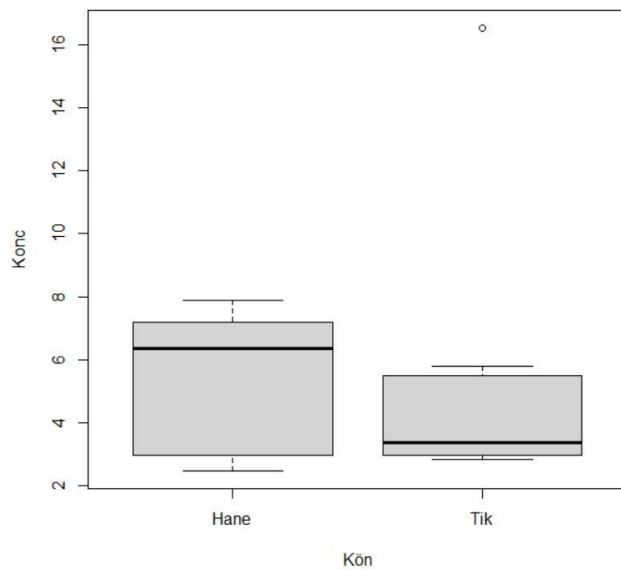


Fig. 3. Boxplot för de uppmätta värdena IL-2 (ng/l) hos hanar ($n=10$) respektive tikar ($n=13$), då både beaglar och tollare inkluderades. De markerade linjerna representerar median för respektive grupp.

Vid en åldersuppdelning av tollarna i kategorierna ”yngre” (0-5 år) och ”äldre” (>5 år) kunde en signifikant skillnad detekteras vad gäller IL-2-nivåer (Mann-Whitney $U=30$, $n_1=7$, $n_2=5$, $p\text{-värde}=0,04798$). Denna skillnad var emellertid inte signifikant vid sammanslagning av både beaglar och tollare (Mann-Whitney $U=93$, $n_1=14$, $n_2=9$, $p\text{-värde}=0,06299$). Fördelning av IL-2-koncentrationer baserat på hundarnas ålder illustreras i Figur 4.

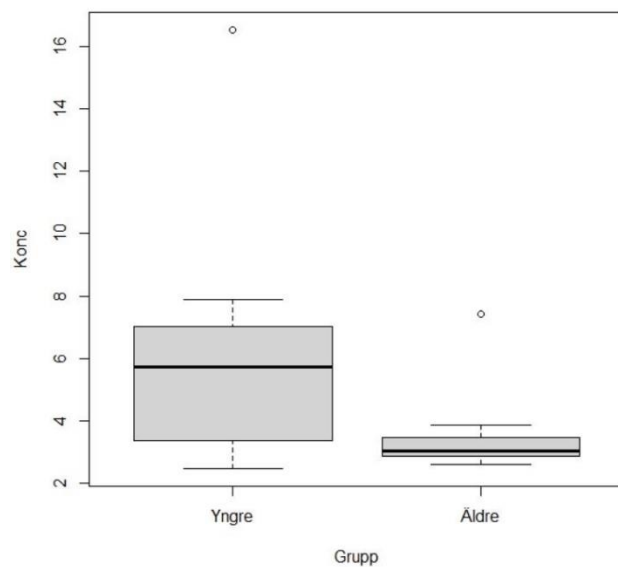


Fig. 4. Boxplot för de uppmätta värdena IL-2 (ng/l) hos yngre individer (0-5 år, $n=14$) respektive äldre individer (>5 år, $n=9$), då både beaglar och tollare inkluderades. De markerade linjerna representerar median för respektive grupp.

Resultatet från de 5 serumproverna från tollarsjuka individer redovisas i Tabell 3. Dessa hundar ingick ej i statistikunderlaget. En IMRD-positiv hund uppvisade ett värde i överkant (14,4 ng/l) jämfört med de andra hundarna. Utöver den tidigare nämnda SRMA-positiva tollaren som överskred maxvärde, kunde ingen uppenbar skillnad detekteras med de resterande 3 IMRD-positiva hundarna, jämfört med de friska tollarna som deltog.

Tabell 3. Koncentration IL-2 (ng/l) för tollarsjuka tollare från tollarbanken, samt variationskoefficient för varje enskilt duplikat (%).

Hund från tollarbank	Koncentration (ng/l)	CV (%)
IMRD	14,36	6,53
IMRD	2,69	6,93
IMRD	4,41	1,94
IMRD	5,02	4,55
SRMA	>max	-

De 3 beaglar som provtogs 12 dagar efter första provtagningen, uppvisade liknande värden mellan de båda dagarna. Mellan de båda dagarna skilde sig koncentrationerna med 0,8 %, 4 % respektive 11 %. Värdena från den andra provtagningen ingick ej statistikunderlaget.

4.3. PCR

4.3.1. RNA-kvalitet

RNA integrity number (RIN) för respektive RNA-prov uppvisade ett spann på 8,6-9,8 med ett medeltal på 9,2 (på en skala 1-10 där >7 är önskvärt). Detta redovisas i Figur 5 och Figur 6. I ett av beagleproverna kunde emellertid ingen förekomst av RNA detekteras (representerar det tomma fältet H2 i Figur 5). Denna individ behövde därmed uteslutas från vidare PCR-analyser.

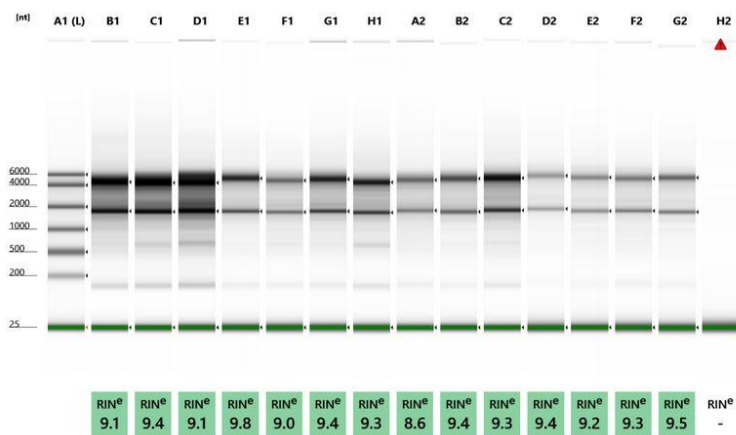


Fig 5. RNA-kvalitet i form av 'RNA integrity number' (RIN) för första omgången i 'Agilent Tape-station 4150'. B1=B, C1=B, D1=B, E1=B, F1=T, G1=T, H1=T, A2=T, B2=B, C2=B, D2=B, E2=B, F2=B, G2=B, H2=B (beagle=B, tollare=T).

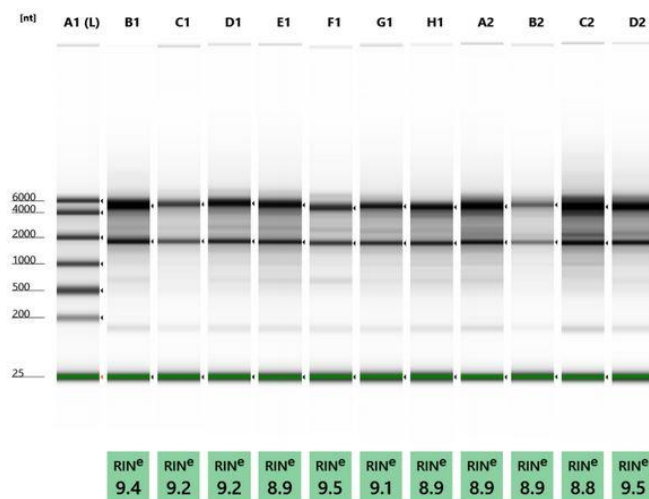


Fig 6. RNA-kvalitet i form av 'RNA integrity number' (RIN) för andra omgången i 'Agilent Tape-station 4150'. B1=B, C1=B, D1=B, E1=T, F1=T, G1=T, H1=T, A2=T, B2=T, C2=T, D2=T (beagle=B, tollare=T).

4.3.2. RT²-PCR

Resultaten från RT²-PCR presenteras här via *cycle threshold* (Ct)-värden, vilket anger hur många PCR-cykler som krävs för att fluorescensen i PCR:en ska överstiga sitt tröskelvärde. Ju lägre Ct-nivåer desto större mängd RNA förekommer i det aktuella provet, detta då Ct-nivåerna är omvänt proportionella till RNA-förekomsten. Normaliserade Ct-värden, så kallade Δ Ct, bidrar till att eliminera icke-

biologiska skillnader mellan proverna genom att relatera Ct till housekeeping-generna, vilket också nämns i metoddelen. De normaliserade Ct-värdena för deltagande hundar i studien redovisas i Tabell 4.

I kvalitetskontrollen för RT²-PCR underkändes ett tollarprov från en ung hane avseende den negativa kontrollen. Detta prov behövde därför uteslutas från vidare analyser. Avseende de positiva kontrollerna på varje platta var Ct-värden mellan 17-21 önskvärt för att med stor tillförlitlighet kunna jämföra de olika plattorna. 3 plattor (1 tollare och 2 beaglar) uppvisade värden strax över 21 (22,13, 21,94 respektive 21,14) på den positiva kontrollen. Dessa individer är märkta med en asterisk i Tabell 4.

Tabell 4. Uttrycket av IL-2-mRNA hos deltagande tollare (n=8) och beaglar (n=3), redovisat via normaliserade cycle threshold (Ct)-värden. *=Hundar vars värden lindrigt översteg den positiva kontrollen.

Ras	ΔCt
Tollare	12,91
Tollare*	13,42
Tollare	12,78
Tollare	12,85
Tollare	13,54
Tollare	13,43
Tollare	11,77
Tollare	11,1
Beagle	12,2
Beagle*	13,14
Beagle*	13,25

Uttrycket av IL-2-mRNA baserat på ΔCt varierade hos tollarna i studien mellan 11,1–13,54, medan variationen hos beaglarna låg mellan 12,2–13,25. Ingen signifikant skillnad kunde ses avseende uttrycksnivåer av IL-2-mRNA mellan tollarna och beaglarna (Mann-Whitney U=12, n1=8, n2=3, p-värde=1). Detta bekräftades också av det förprogrammerade T-testet som nämns i metoddelen.

Det fanns inte heller några signifikanta skillnader i Ct-nivåer baserat på kön inom enbart tollargruppen (Mann-Whitney U=11, n1=3, n2=5, p-värde=0,3929) alternativt hos tollare och beaglar sammanslaget (Mann-Whitney U=17, n1=5, n2=6, p-värde=0,7929). Vid en åldersuppdelning av hundarna i kategorierna ”yngre” (0-5 år) och ”äldre” (>5 år) kunde inte heller någon signifikant skillnad ses mellan grupperna vare sig inom tollargruppen (Mann-Whitney U=4, n1=3, n2=5, p-värde

=0,3929) eller hos tollare och beaglar sammanslaget (Mann-Whitney U=7, n1=5, n2=6, p-värde=0,1775). Fördelning av IL-2-koncentrationer baserat på ålder illustreras i Figur 7.

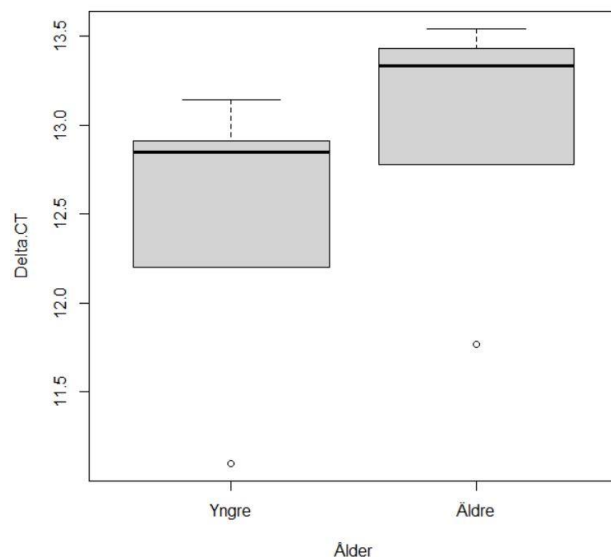


Fig 7. Boxplot på uttrycksnivåerna (ΔCt) av IL-2-mRNA hos yngre individer (0-5 år, n=5) respektive äldre individer (>5 år, n=6), då både beaglar och tollare inkluderades. De markerade linjerna representerar median för respektive grupp. Ct-nivåerna är omvänt proportionella till RNA-förekomsten.

Av de 83 andra generna som analyserades samtidigt som IL-2, kunde en signifikant skillnad ses i uttrycket hos 4 olika gener mellan tollare och beaglar, baserat på det förprogrammerade T-testet som nämns under metoddelen. De 4 gener vars uttryck uppvisade signifikant skillnad mellan de båda hundgrupperna var generna för C-reaktivt protein (CRP), IL-10, IL-1-receptor 1 (IL-1R1) samt tyrosinkinas 2 (TYK2). Uttrycket för de nämnda generna redovisas i tabell 5, och presenteras genom så kallad *fold change*. *Fold change* är en ratio mellan relativt genuttryck, i detta fallet mellan tollare och beaglar, där värden >1 indikerar en uppreglering av genuttryck, medan värden mellan 0-1 indikerar en nedreglering av genuttryck.

Tabell 5. Gener vars uttryck av mRNA skiljer sig signifikant åt mellan deltagande tollare (n=8) och beaglar (n=3).

Genuttryck	P-värde (T-test)	Fold change	Fold regulation
CRP	0,004615	0,4	-2,49
IL-10	0,033970	0,65	-1,54
IL-1R1	0,017609	0,7	-1,42
TYK2	0,043651	1,29	1,29

Det fanns även flertal gener vars p-värde låg nära konfidensintervallet 0,05. De gener som hade ett p-värde på $<0,15$ och kan benämnas som *borderline* är följande: *IFNB1*, *IRAK1*, *ITGAM*, *JAK2*, *MYD88*, *SLC11A1*, *STAT6*, *TBX21*, *TICAM1*, *TLR5* samt *TLR6*.

4.4. Korrelation mellan ELISA och RT²-PCR

Alla 11 hundar som deltog i momentet med RT²-PCR hade också adekvata ELISA-värden. I samma ögonblicksbild kunde således både uttrycket av IL-2-mRNA samt IL-2-proteinet utvärderas hos dessa individer. Med avseende på IL-2 kunde ingen signifikant korrelation i denna studie uppvisas mellan uttrycket av mRNA och uttrycket av protein, vare sig hos tollare enbart (Spearman $S=104$, p-värde 0,5821, $\rho=(-0,2380952)$) eller hos tollare och beaglar sammanslaget (Spearman $S=280$, p-värde=0,4182, $\rho=(-0,2727273)$). I Figur 8 presenteras en scatterplot där ΔC_t -värden har plottats mot ELISA-koncentrationerna inom tollargruppen.

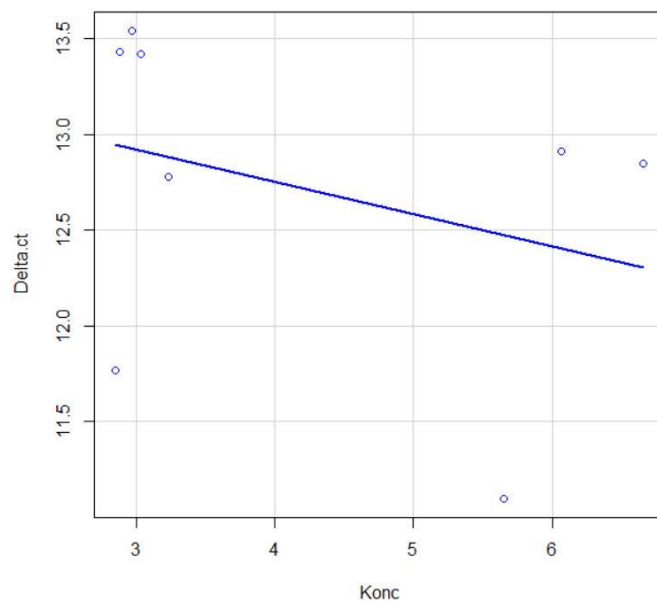


Fig 8. Scatterplot på uttrycksnivåer av IL-2, där RT²-PCR-värden (delta Ct) är plottade mot ELISA-värden (konc (ng/l)).

5. Diskussion

I denna studie kunde proteinnivåerna av IL-2 hos samtliga tollare, med hjälp av ELISA, uppvisas till ett spann mellan 2,5–6,7 ng/l, med en median på 3,3 ng/l. Hos 8 av dessa tollare kunde uttrycksnivåerna för IL-2-mRNA, via RT²-PCR, bestämmas till ett Δ Ct-spann mellan 11,1–13,54. IL-2-nivåer hos friska tollare har inte tidigare undersökts på motsvarande sätt.

5.1. ELISA

Det är utmanande att etablera gränsvärden på cytokinnivåer via enbart ELISA, då resultaten kan skilja sig åt mellan olika testomgångar. Detta gör det svårt att jämföra absoluta värden från olika studier – särskilt ifall olika kit har använts (Leng *et al.* 2008). En demonstration på problematiken kan illustreras av att sera från de fem tollarsjuka individerna i studien, som inhämtades från tollarbanken, tidigare genomgått en opublicerad ELISA med ett likadant IL-2-kit som användes i denna studie. Ett av proven uppvisade relativt likvärdig IL-2-koncentration mellan de båda omgångarna, men de fyra andra proverna skilde sig med flera enheter. Anledning till detta kan exempelvis vara upprepade frystining eller att olika personer deltagit i utförandet mellan omgångarna, och därmed risk för skillnader i pipettering. Vidare innehöll det nämnda ELISA-kitet omfattande förberedelser med många spädningar, något som ger utrymme för felsteg och därför är en generell möjlig felkälla i arbetet. För att fungera som en kontrollgrupp hade de tollarsjuka individerna behövt kvantifieras med ytterligare en metod, förslagsvis immunohistokemi.

Samtliga duplikat för varje enskilt prov uppvisade enhetliga resultat, det vill säga *intra-assay*-variationskoefficienten (*intra-assay* CV) var generellt god (<15 %). Triplikat hade emellertid varit att föredra för en ännu säkrare mätning. Inom beaglegruppen fanns ett avvikande extremvärde, samt tre individer vars värden låg utanför standardkurvan (en över maxvärde och två under minvärde). Detta skulle kunna förklaras av tidigare nämnda felkällor under processen, alternativt vara orsakat av möjliga påverkande faktorer, så kallade *confounders*, listade nedan

Medianerna för IL-2-nivåerna hos tollare jämfört med beaglar skiljde sig i denna studie åt med 2,5 ng/l, och en trend observerades där beaglarna i stickprovet tycktes ligga något högre än tollarna. Spridningen inom grupperna skilde sig också åt, vilket illustrerades av IQR som hos tollarna var 2,71 ng/l och hos beaglarna 4,44 ng/l. Fördelningarna av koncentrationerna mellan grupperna skiljde sig emellertid inte signifikant åt, även om p-värdet inte låg långt ifrån konfidensintervallet (0,1164). Baserat på ELISA-resultatet kunde således inga säkra slutsatser dras avseende skillnader i IL-2-nivåer mellan de båda grupperna. Ett intressant fynd var den signifikanta åldersrelaterade minskningen av IL-2-nivåer hos äldre tollare jämfört med yngre tollare. Skillnaden var inte signifikant vid sammanslagning av tollargruppen och beaglegruppen, men ett observandum var att p-värdet vid sammanslagningen låg mycket nära konfidensintervallet (0,06299). Dessa data styrks av tidigare studier som redovisat åldersrelaterade minskningar av IL-2-nivåer, vilket presenteras under avsnittet om *confounders* nedan.

En IMRD-positiv individ från tollarbanken hade högre IL-2-värden än de friska tollarna. Inga uppenbara skillnader kunde detekteras mellan de tre övriga IMRD-positiva tollarna jämfört med de friska tollarna. Det var inte klarlagt huruvida dessa individer stod under behandling vid provtagningstillfället. För att statistiskt kunna undersöka eventuella skillnader i framtiden kommer större stickprov krävas. Ett större stickprov hade också varit önskvärt generellt i denna studie, avseende friska tollare och beaglar, för att mer säkert kunnat ha utvärderat eventuell statistisk signifikans i koncentrationsskillnader mellan grupperna.

5.2. PCR

I denna studie valdes metoden RT²-PCR för att undersöka uttrycksnivåer av mRNA, då detta är en välbeprövad och robust metod som möjliggör en bredare genetisk arrayanalys. En genetisk arrayanalys är mer effektivt än att endast undersöka IL-2, då det i princip tar lika lång tid i anspråk, men dessutom leder till en ögonblicksbild på många andra relevanta immunologiska gener. Detta kan bidra med värdefull information till framtida studier inom ämnet. En negativ aspekt är att metoden är mer kostsam än att endast undersöka IL-2, vilket medförde att endast 12 individer kunde utvärderas. Då fokus i arbetet var rasen tollare ingick en majoritet på totalt 9 friska tollare (där 8 hade adekvata resultat) i den slutliga PCR-analysen, medan 3 friska beaglar fungerade som en slags kontrollgrupp.

Ingen signifikant skillnad i mRNA-uttrycket för IL-2 kunde uppvisas mellan tollarna jämfört med beaglarna. Det kan således inte dras några slutsatser avseende skillnader i uttrycket av IL-2-mRNA mellan raserna. Uttrycket av IL-2-mRNA ba-

serat på ΔCt varierade hos tollarna i studien mellan 11,1–13,54. Hos beaglarna varierade ΔCt istället mellan 12,2–13,25. En potentiell trend kunde detekteras att yngre individer möjligen uppvisade en högre förekomst av IL-2-mRNA jämfört med äldre individer, när både tollare och beaglar var sammanslagna. Detta var emellertid inte statistiskt signifikant. Som tidigare nämnt representerar ett lägre Ct-värde en högre förekomst av RNA, detta då Ct-nivåerna är omvänt proportionella mot RNA-förekomsten.

I RNA-prepareringen, som föregick RT²-PCR-analysen, uppvisade ett RNA-prov från en beagle avsevärt mindre blod jämfört med de andra proverna, vilket innebar att provet fick spädas i större mängd vid prepareringen. Detta visade sig också i RIN-resultaten, då analysen i just detta prov inte kunde detektera RNA. Felkällan här berodde därmed mest troligen på för lite mängd blod i RNA-provröret.

De flesta deltagande individer uppvisade generellt god kvalitet på proverna sett till de inkluderade kontrollerna på varje arrayplatta. En ung tollarhane föll bort i kvalitetskontrollen avseende den negativa kontrollen, och kunde därför inte ingå i vidare analyser. Den negativa kontrollen bestod av så kallad *genomisk DNA-kontroll* (GDC), vilket påvisar eventuell kontaminering av genomiskt DNA under RT²-PCR-analysen. Provet som föll bort uppvisade ett GDC-värde som, enligt Qiagens instruktioner, mest troligt överensstämde med genomisk DNA-kontaminering. De positiva kontrollerna i en RT²-PCR-analys innehåller en mindre mängd DNA med en specifik sekvens, samt primers som ska amplifiera denna specifika sekvens. Värdena för de positiva kontrollerna bör vara konsekventa mellan de olika plattorna och inte avvika från en bestämd *range*. Avseende de positiva kontrollerna i denna studie var Ct-värden mellan 17-21 önskvärt för att med stor tillförlitlighet kunna jämföra de olika plattorna. De 3 plattor som lindrigt översteg 21 kontrollerades genom att de uppmätta ΔCt -nivåerna för IL-2 hos de 3 individerna, plottades mot övriga individers ΔCt -nivåer. Det fanns inga tecken på avvikande värden avseende IL-2 på dessa 3 plattor. Även om den lindriga diskrepansen avseende de positiva kontrollerna är ett observandum, bedömdes det ha en låg inverkan vid jämförande av IL-2-uttryck i denna studie. Möjliga felkällor kan vara exempelvis pipetteringsfel eller tillverkarfel i de affekterade arrayplattorna.

En grundligare undersökning av de andra 83 generna som utgjorde en del av RT²-PCR-analysen ingick ej inom ramarna för detta arbete. Även om uttrycket för IL-2 ej skilde sig signifikant mellan beaglar och tollare fanns intressant nog 4 andra gener som gjorde just detta. Därtill tillkom även ett antal *borderline*-gener, vilka låg i närheten av konfidensintervallet och som i framtida studier också är intressanta att undersöka vidare. Det är även relevant att undersöka huruvida IL-2 ses korrelera med någon av de andra generna i undersökningen.

5.3. Korrelation mellan PCR och ELISA

Ingen korrelation mellan uttrycket av IL-2-mRNA och IL-2-protein kunde detekteras i denna studie. Detta resultat är emellertid inte helt oväntat med tanke på det mindre stickprovet i arbetet, men även på grund av att nivåerna är dynamiska och de biologiska processerna som inverkar på nivåerna är komplexa. Tidigare studier har uppvisat en viss korrelation mellan undersökta protein och deras korresponderande mRNA, men korrelationen har inte varit speciellt stark (Vogel & Marcotte 2012). Höga proteinnivåer kan exempelvis bero på stabilt mRNA med en frekvent transkription, alternativt genom frekvent translation och stabil proteinnivå (Abreu *et al.* 2009). Det är således inte alltid fallet att höga proteinnivåer motsvaras av höga mRNA-nivåer. Hos däggdjur produceras mRNA i en lägre hastighet jämfört med protein, och i tillägg till detta är mRNA mindre stabilt än protein (Vogel & Marcotte 2012). Något som teoretiskt också skulle kunna leda till en diskrepans mellan mRNA och protein är förekomst av alternativa splice-varianter av mRNA, som tidigare diskuterats. För mer tillförlitlighet avseende korrelationen sett till IL-2-mRNA och IL-2-protein hos hund krävs en studie i större skala.

5.4. Confounders

Möjliga confounders som i studien kan inverka på uttryck och produktion av IL-2, och därmed leda till feltolkning av resultat, är bland annat pågående inflammation, ålder, kön, miljö, släktskap mellan individer och förvaring av serum.

IL-2-nivåer ökar bland annat vid inflammation, och även om inga tecken fanns på systemisk inflammation hos deltagande djur i studien går det inte helt att utesluta pågående subklinisk inflammation som orsak till högre värden hos vissa individer.

Hos både råttor och människor har en högre ålder förknippats med minskade IL-2-uttrycksnivåer och IL-2-produktion, vilket bedöms orsakas av ett med åldern försämrat immunförsvar (Davila & Kelley 1988; Pahlavani & Richardson 1996). Detta är något som också observerats hos hundar. En studie på schäfer rapporterade exempelvis en signifikant åldersrelaterad minskning av serumnivåerna IL-2 vid jämförande av unga djur och äldre djur (Strasser *et al.* 2000). Även i denna studie uppvisades en signifikant skillnad av IL-2-proteinnivåer inom tollargruppen, där äldre tollare generellt hade lägre IL-2-nivåer än yngre tollare. En trend gällande lägre IL-2-nivåer hos äldre hundar syntes också vid sammanslagning av tollargruppen och beaglegruppen, även om skillnaden inte var signifikant. Även avseende IL-2-mRNA kunde en potentiell trend detekteras att yngre individer möjligen uppvisade en högre förekomst av mRNA, då tollar- och beaglegrupperna var sammanslagna. Detta var emellertid inte statistiskt signifikant. Sammantaget tycks ålder vara en

möjlig confounder i studien vad gäller IL-2-nivåer. Tollarnas och beaglarnas åldersmedian låg emellertid relativt likvärdigt. Ålder borde därför inte utgöra någon betydande confounder för IL-2-nivåerna mellan de båda grupperna i detta arbete.

Hos råttor finns indikationer på att kön kan vara en faktor som påverkar IL-2-nivåerna. Vid undersökning av lektin-inducerad IL-2-syntes hos råttor har äldre råttor rapporterats uppvisa högre IL-2-nivåer om de är av honkön jämfört med ifall de är av hankön. Inga skillnader har emellertid kunnat detekteras av IL-2-koncentrationen mellan könen hos unga råttindivider (Davila & Kelley 1988). Hos människor anses kvinnor generellt ha lägre nivåer IL-2 jämfört med män, och en föreslagen anledning är att östrogen verkar inhiberande på uttryck av IL-2 (McMurray *et al.* 2001). Till undertecknads kännedom finns för närvarande inga studier avseende hund och könsskillnader i IL-2-nivåer. I denna studie kunde ingen signifikant skillnad detekteras vad gäller nivåer av IL-2-protein eller IL-2-mRNA mellan könen, vare sig inom tollargruppen eller vid sammanslagning av de båda grupperna. Det observerades emellertid en trend att tikar tenderade att ligga lite lägre i IL-2-proteinnivåer än hanhundar. Med bakgrund av att det fanns procentuellt fler tikar i tollargruppen jämfört med beaglegruppen (58 % tikar och 42 % hanar i tollargruppen, medan beaglegruppen hade en fördelning på 50/50), är det inte uteslutet att detta möjligen kan ha påverkat slutresultatet.

Vidare lever beaglegruppen i en mer likartad miljö i universitetslokaler med hundrastgård, medan tollarna är privatägda och därför blir en mer brokig grupp rent miljömässigt. Detta skulle också kunna bidra till skillnader i IL-2-nivåer. En gemensam miljöförändring hos beaglarna skulle hypotetiskt kunna leda till någon form av immunologisk reaktion som kan förklara trenden med ökade IL-2-nivåer i beaglegruppen. Utöver miljöaspekten är beaglegruppen också mer genetiskt homogen, då flera individer i gruppen är nära släkt. En ökad likhet sett till uttrycket av IL-2 hos dessa individer sågs emellertid inte i ELISA-resultatet.

Vad gäller dygnsvariationer av IL-2 har humanforskningen rapporterat en viss cyklisk aktivitet, med högre utsöndring på natten (Lissoni *et al.* 1998). Till författarens vetskap är detta emellertid inget som har bekräftats hos hund. En publikation inom humana forskningsfältet har kartlagt variationerna av ett större antal cytokiner hos friska individer över tid, ett område som tidigare inte studerats speciellt ingående. Vissa cytokiner uppvisade signifikanta skillnader sett till ett tidsspänn på 7 dagar. Dessvärre kunde IL-2-nivåer inte detekteras alls i studien, och därav är det i nuläget fortsatt okänt i vilken omfattning IL-2-nivåerna fluktuerar över tid hos friska människor (Biancotto *et al.* 2013). Som tidigare nämnts, togs i detta arbete upprepade prover på 3 beagleindivider. Bägge provtagningar skedde under efter-

middagstid, och den andra provtagningen utfördes 12 dagar efter den första provtagningen. Mellan de båda provtagningarna skilde sig resultaten med 0,8 %, 3 % samt 11 %. Mängden IL-2 höll sig därmed relativt stabil mellan de båda provtagningstillfällena hos dessa individer.

Proverna från de tollarsjuka hundarna, som adderades till ELISA-analysen, hade lagrats i tollarbanken i några år. Det finns indikationer på att degradering av lagrat IL-2 i serum sker efter ca 3 år (de Jager *et al.* 2009), vilket innebär att det inte är otänkbart att viss degradering skett och att dessa värden tidigare legat något högre.

5.5. Möjliga kopplingar mellan IL-2 och IMRD

Att en *minskning* av IL-2, den cytokin som är central för T-cellsaktivering, skulle kunna orsaka utveckling av autoimmuna sjukdomar kan anses motsägelsefullt. Detta förklaras dock, som tidigare nämnts, av det faktum att frånvaro av IL-2 också leder till frånvaro av Treg-celler, vilka är essentiella för den perifera toleransutvecklingen. Eftersom IL-2-funktionen i immunsystemet är komplex är det tänkbart att initialt låga nivåer av IL-2, tillsammans med andra riskfaktorer, skulle kunna bidra till uppkomst av IMRD. Senare skeden i den kliniska sjukdomsutvecklingen, med tillhörande inflammation, skulle möjligen istället kunna uppvisa höga nivåer av IL-2. En liknande teori redogörs i en studie på möss av Knoechel *et al.* (2005), där autoimmunitet i form av *graft-vs-host*-sjukdom inducerades. Författarna visade att frånvaro av IL-2 hos vissa möss ledde till att den akuta fasen uppvisade ett mildare förlopp, eftersom effektor-T-cellerna därmed var reducerade. Frånvaron av IL-2 ledde emellertid också till en reduktion av Treg-celler, vilket resulterade i en progressiv sjukdomsutveckling och slutligen kronisk sjukdom. I studien föreslogs att sjukdomsförloppet genomleddes i olika faser, där effektor-T-cellerna orsakade den kliniska patologin medan Treg-cellerna krävdes för att återhämta sig från sjukdomen. IL-2 tycktes således vara avgörande för att orsaka en kraftigare akut fas, men också för att tillfriskna från den inducerade autoimmuniteten.

Något som ytterligare talar för involvering av IL-2 vid utveckling av IMRD är förekomsten av autoantikroppar mot IL-2-transkriptionsfaktorerna ILF2 och ILF3 hos ANA^S-positiva hundar med IMRD. Eftersom ILF2 och ILF3 är transkriptionsfaktorer lokaliserade intracellulärt är det emellertid inte klarlagt hur extracellulära autoantikroppar mot dessa skulle kunna påverka IL-2-produktionen, eller ifall det alls finns någon klinisk relevans. Det finns ett antal rapporter om autoantikroppar som penetrerar intracellulärt, såsom hos SLE-patienter där exempelvis Golan *et al.* (1993) påvisat IgG kapabla att penetrera en epitelial cellinje. Autoantikroppar kan, utöver att penetrera själva cellmembranet, också translokeras till cellkärnan och affektera DNA-reparering samt utöva direkt skada på DNA (Noble *et al.* 2016). Det

är emellertid inte kartlagt ifall detta är en utbredd förekommande företeelse. Några slutsatser kring eventuell påverkan på IL-2 till följd av autoantikroppar mot ILF2 och ILF3 kan därför inte dras. Utöver en potentiell påverkan på IL-2-transkribering, är det inte uteslutet att autoantikroppar specifikt riktade mot ILF3 också skulle kunna leda till att IL-2-mRNA blir mer instabilt och degraderas snabbare. Detta då just ILF3, som tidigare nämnt, också visat sig nödvändigt för att minska degradering av IL-2-mRNA. Oavsett klinisk relevans kan potentiellt både ILF2 och ILF3 användas som nya diagnostiska markörer, sett till dess starka förekomst hos just ANA^S-positiva hundar med IMRD.

En annan aspekt avseende IL-2 är möjlig förekomst av alternativa splicevarianter av IL-2-mRNA hos tollare. Alternativa splicevarianter skulle potentiellt kunna ha en inhiberande effekt på fullängds-IL-2 på receptornivå. Ifall exempelvis presumptiva splicevarianter binder dominant till Treg-receptorn skulle detta kunna leda till minskad Treg-överlevnad, och därtill en sämre perifer tolerans. Även om alternativa splicevarianter avseende IL-2 finns beskrivna hos människor, vilket tidigare nämnts, har de emellertid ännu inte beskrivits hos hund (inkluderat tollare).

Som tidigare påtalades i litteraturstudien finns tecken på att IMRD inom tollarrasen är vanligare hos tikar jämfört med hanar. Hos människor är en intressant aspekt att kvinnor oftare än män drabbas av autoimmuna sjukdomar, och att könsskillnaden är extra påtaglig vid exempelvis SLE (Tedeschi *et al.* 2013), en sjukdom som på flera sätt påminner om IMRD. Som tidigare nämnts anses bristande produktion av IL-2 hos T-cellerna vara ett klassiskt kännetecken hos människor drabbade av SLE. Huruvida den ökande prevalensen av autoimmuna sjukdomar hos kvinnor på något sätt korrelerar med kvinnors lägre nivåer av IL-2 är, till undertecknads vetskap, emellertid inte kartlagt. Generellt anses könshormonerna spela en avgörande roll vid utveckling av SLE. Exempelvis har testosteron setts ha en skyddande effekt hos männen, möjligen genom en negativ reglering av cytokinet BAFF, en essentiell faktor för B-celler (Wilhelmson *et al.* 2018). Framtida forskning krävs för att utreda huruvida IL-2 är involverad i eventuella könsskillnader gällande IMRD-uppkomst hos tollarna.

Avvikande reglering av transkriptionsfaktorsfamiljen NFAT och dess regleringsvägar kan ha en teoretiskt möjlig del i sjukdomsutvecklingen av IMRD, sett till dess roll i IL-2-balansen, anergiinduktionen eller aktivering av T-celler. Tidigare beskrivna riskloci för IMRD innehåller flera gener som anses vara involverade vid reglering av NFAT. De associerade sjukdomsgenerna *PTPN3* och *HOMER2* är två viktiga exempel. Båda dessa gener utövar inhibitoriska funktioner på T-cellsaktivering genom att på olika sätt modulera NFAT-kaskaden. Intressant är att *HOMER2* utöver detta också visats inneha en inhiberande roll på IL-2. *PTPN3* visade sig vara

signifikant nedreglerad hos samtliga ANA-positiva hundar med IMRD i studien av Wilbe *et al.* (2015), medan en trend kunde anas gällande nedreglering av *HOMER2* hos hundar med riskhaplotyp. Det är inte kartlagt vilken eller vilka medlemmar i NFAT-familjen som hos hund skulle kunna affekteras av en nedreglering av de nämnda generna, och inte heller i vilken omfattning det skulle ske. Det är därför osäkert hur nedreglering potentiellt skulle kunna påverka slutprodukten IL-2. I tillägg till detta tycks NFAT dessutom utöva både positiv och negativ reglering av IL-2-transkription, beroende på ifall NFAT bildar komplex med transkriptionsfaktorerna AP-1 eller FoxP3. Detta försvårar tolkningen ytterligare. Avvikande NFAT-vägar skulle potentiellt också kunna påverka FoxP3-uttrycket samt uttrycket av den negativa immunregulatorn CTLA-4, vilka båda på olika sätt anses vara involverade i upprätthållandet av Treg-cellerna, och därmed också perifer tolerans. Uttrycken av FoxP3 och CTLA-4 hos friska tollare jämfört med IMRD-positiva tollare skulle således också vara värdefulla att undersöka närmare.

Det är viktigt att ha i åtanke att denna studie endast uppvisar en ögonblicksbild i IL-2-nivåerna, och att dessa nivåer kan vara dynamiska. Ifall att tollarpopulationen generellt skulle visa sig förknippas med signifikant lägre nivåer av IL-2 jämfört med andra hundraser uppstår vidare frågor – såsom dess kliniska relevans i IMRD-sammanhanget och varför vissa individer insjuknar och andra inte. IMRD är en genetiskt komplex sjukdom som tycks har många samverkande faktorer i patogenesen, men en initialt lägre nivå av IL-2 och därtill minskad perifer tolerans skulle kunna vara en viktig aspekt som gör just tollare särskilt utsatta för att utveckla IMRD. Mycket forskning kvarstår dock innan eventuella slutsatser kan dras kring koppling mellan IL-2 och IMRD.

5.6. Förslag på framtida studier

För att kunna detektera signifikanta skillnader i IL-2-nivåer krävs utökat material där fler friska individer är inkluderade, både tollare och andra hundraser. En större studie möjliggör också att detektera eventuella könsskillnader i IL-2-nivåer, vilket krävs för att vidare undersöka ifall exempelvis lägre IL-2-uttryck är något som bidrar till att tikar oftare än hanhundar drabbas av IMRD.

Denna studie utfördes delvis för att agera underlag till fortsatta studier som kan undersöka IL-2-skillnader mellan friska tollare och tollare med IMRD. Hypotesen att låga IL-2-nivåer potentiellt skulle kunna bidra till patogenesen vid IMRD kan emellertid vara svår att påvisa i en sådan studie. Detta då det är möjligt att förloppet är indelat i olika faser, där tidiga skeden av sjukdomen uppvisar låga IL-2-nivåer medan aktiva, kliniska skeden av sjukdomen uppvisar höga IL-2-nivåer. För att klarlägga detta behöver prover tagna från tidiga till sena faser av sjukdomsförloppet

analyseras hos ett tillräckligt stort antal hundar. Utöver IL-2 kan det även vara relevant att, mellan friska och IMRD-sjuka tollare, undersöka uttryck av andra cytokiner inom IL-2-familjen, men även exempelvis uttryck av FoxP3 och CTLA-4. Det är också högst intressant att titta vidare på de 4 gener vars uttryck skilde sig signifikant mellan tollare och beaglar på RT²-PCR-analysen, och i tillägg till detta även de nämnda *borderline*-generna.

Uttryck av splicevarianter av IL-2 hos tollare och andra hundraser kan kartläggas genom en kombination av RNA-sekvensering för detektion av olika splicevarianter, med uppföljande kvantitativ validering genom att till exempel designa primers mellan exon 1-2, 2-3 samt 3-4 på IL-2-genen. Detta kan tydliggöra eventuell alternativ splicing genom att undersöka ifall uttrycket skiljer sig åt mellan de olika primerdesignerna. Vidare bör frågetecken kring autoantikroppar mot ILF2 och ILF3 undersökas närmare, såsom dess kliniska relevans i IMRD-uppkomsten samt varför just ANA^S-positiva hundar uppvisar förekomst av dessa autoantikroppar.

Referenser

- Abreu, R. de S. *et al.* (2009) 'Global signatures of protein and mRNA expression levels', *Molecular bioSystems*, 5(12), pp. 1512–1526. doi: 10.1039/b908315d.
- Anfinsen, K. P. *et al.* (2008) 'A retrospective epidemiological study of clinical signs and familial predisposition associated with aseptic meningitis in the Norwegian population of Nova Scotia duck tolling retrievers born 1994–2003', *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72(4), pp. 350–355.
- Baine, I., Abe, B. T. and Macian, F. (2009) 'Regulation of T-cell tolerance by calcium/NFAT signaling', *Immunological Reviews*, 231(1), pp. 225–240. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00817.x>.
- Biancotto, A. *et al.* (2013) 'Baseline levels and temporal stability of 27 multiplexed serum cytokine concentrations in healthy subjects', *PloS One*, 8, p. e76091. doi: 10.1371/journal.pone.0076091.
- Bremer, H. (2018) *Canine immune-mediated disease*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet. https://pub.epsilon.slu.se/15432/7/bremer_h_180419.pdf.
- Bremer, H. D. *et al.* (2015) 'Disease patterns and incidence of immune-mediated disease in insured Swedish Nova Scotia Duck Tolling Retrievers', *Veterinary Record*, 177(3), pp. 74–74. doi: 10.1136/vr.102960.
- Bremer, H. D. *et al.* (2018) 'ILF2 and ILF3 are autoantigens in canine systemic autoimmune disease', *Scientific Reports*, 8(1), p. 4852. doi: 10.1038/s41598-018-23034-w.
- Crispín, J. and Tsokos, G. C. (2008) 'Novel molecular targets in the treatment of systemic lupus erythematosus', *Autoimmunity Reviews*, 7(3), pp. 256–261. doi: 10.1016/j.autrev.2007.11.020.
- Damoiseaux, J. *et al.* (2019) 'Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78(7), pp. 879–889. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214436.
- Damoiseaux, J. (2020) 'The IL-2 – IL-2 receptor pathway in health and disease: The role of the soluble IL-2 receptor', *Clinical Immunology*, 218, p. 108515. doi: 10.1016/j.clim.2020.108515.
- Davila, D. R. and Kelley, K. W. (1988) 'Sex differences in lectin-induced interleukin-2 synthesis in aging rats', *Mechanisms of Ageing and Development*, 44(3), pp. 231–240. doi: 10.1016/0047-6374(88)90024-3.
- Debenham, S. L. *et al.* (2005) 'Genomic sequence of the class II region of the canine MHC: comparison with the MHC of other mammalian species', *Genomics*, 85(1), pp. 48–59. doi: 10.1016/j.ygeno.2004.09.009.

- Denesyuk, A. I. *et al.* (1998) 'Molecular models of two competitive inhibitors, IL-282 and IL-283, generated by alternative splicing of human interleukin-2', *Immunology Letters*, 60(2), pp. 61–66. doi: 10.1016/S0165-2478(97)00144-2.
- Dobson, J. M. (2013) 'Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs', *ISRN Veterinary Science*, 2013. doi: 10.1155/2013/941275.
- Dooms, H. and Abbas, A. K. (2010) 'Revisiting the role of IL-2 in autoimmunity', *European Journal of Immunology*, 40(6), pp. 1538–1540. doi: 10.1002/eji.201040617.
- Gibbs, R. A. *et al.* (2003) 'The International HapMap Project', *Nature*, 426(6968), pp. 789–796. doi: 10.1038/nature02168.
- Golan, T. D., Gharavi, A. E. and Elkon, K. B. (1993) 'Penetration of autoantibodies into living epithelial cells', *Journal of Investigative Dermatology*, 100(3), pp. 316–322. doi: 10.1111/1523-1747.ep12469994.
- Goodnow, C. C. *et al.* (1995) 'Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development', in Dixon, F. J. (ed.) *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 279–368. doi: 10.1016/S0065-2776(08)60633-1.
- Grüntzig, K. *et al.* (2016) 'Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the most common tumour diagnoses and influence of age, breed, body size, sex and neutering status on tumour development', *Journal of Comparative Pathology*, 155(2–3), pp. 156–170. doi: 10.1016/j.jcpa.2016.05.011.
- Hansson-Hamlin, H. and Lilliehöök, I. (2009) 'A possible systemic rheumatic disorder in the Nova Scotia duck tolling retriever', *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51, p. 16. doi: 10.1186/1751-0147-51-16.
- Hansson-Hamlin, H., Lilliehöök, I. and Trowald-Wigh, G. (2006) 'Subgroups of canine antinuclear antibodies in relation to laboratory and clinical findings in immune-mediated disease', *Veterinary Clinical Pathology*, 35(4), pp. 397–404. doi: 10.1111/j.1939-165X.2006.tb00155.x.
- Hogan, P. G. *et al.* (2003) 'Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT', *Genes & Development*, 17(18), pp. 2205–2232. doi: 10.1101/gad.1102703.
- Huang, G. N. *et al.* (2008) 'NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins', *Science (New York, N.Y.)*, 319(5862), pp. 476–481. doi: 10.1126/science.1151227.
- Hughes, A. M. *et al.* (2010) 'Association of a dog leukocyte antigen class II haplotype with hypoadrenocorticism in Nova Scotia Duck Tolling Retrievers', *Tissue Antigens*, 75(6), pp. 684–690. doi: 10.1111/j.1399-0039.2010.01440.x.
- de Jager, W. *et al.* (2009) 'Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays', *BMC Immunology*, 10(1), p. 52. doi: 10.1186/1471-2172-10-52.
- Keller, E. (1992) 'Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma', *Cancer*. doi: 10.1002/1097-0142(19921101)70:9<2334::AID-CNCR2820700920>3.0.CO;2-7.
- Kennedy, L. J. *et al.* (2002) 'Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs', *Tissue Antigens*, 59(3), pp. 194–204. doi: 10.1034/j.1399-0039.2002.590303.x.

- Kennedy, M. A. (2010) 'A brief review of the basics of immunology: the innate and adaptive response', *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(3), pp. 369–379. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.01.003.
- Khoryati, L. *et al.* (2020) 'An IL-2 mutein engineered to promote expansion of regulatory T cells arrests ongoing autoimmunity in mice', *Science Immunology*, 5(50). doi: 10.1126/sciimmunol.aba5264.
- Knoechel, B. *et al.* (2005) 'Sequential development of interleukin 2–dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen', *The Journal of Experimental Medicine*, 202(10), pp. 1375–1386. doi: 10.1084/jem.20050855.
- Kolar, P. *et al.* (2009) 'CTLA-4 (CD152) controls homeostasis and suppressive capacity of regulatory T cells in mice', *Arthritis and Rheumatism*, 60(1), pp. 123–132. doi: 10.1002/art.24181.
- Kuwano, Y. *et al.* (2010) 'NF90 selectively represses the translation of target mRNAs bearing an AU-rich signature motif', *Nucleic Acids Research*, 38(1), pp. 225–238. doi: 10.1093/nar/gkp861.
- Leng, S. X. *et al.* (2008) 'ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research', *The Journals of Gerontology: Series A*, 63(8), pp. 879–884. doi: 10.1093/gerona/63.8.879.
- Lindblad-Toh, K. *et al.* (2005) 'Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog', *Nature*, 438(7069), pp. 803–819. doi: 10.1038/nature04338.
- Lissoni, P. *et al.* (1998) 'Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans', *Natural Immunity*, 16(1), pp. 1–5. doi: 10.1159/000069464.
- McMurray, R. W. *et al.* (2001) '17- β -estradiol suppresses IL-2 and IL-2 receptor', *Cytokine*, 14(6), pp. 324–333. doi: 10.1006/cyto.2001.0900.
- Moser, M. and Leo, O. (2010) 'Key concepts in immunology', *Vaccine*, 28, pp. C2–C13. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.07.022.
- Müller, M. R. and Rao, A. (2010) 'NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age', *Nature Reviews Immunology*, 10(9), pp. 645–656. doi: 10.1038/nri2818.
- Nelson, B. H. (2004) 'IL-2, regulatory T cells, and tolerance', *The Journal of Immunology*, 172(7), pp. 3983–3988. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.3983.
- Netea, M. G., Quintin, J. and van der Meer, J. W. M. (2011) 'Trained immunity: a memory for innate host defense', *Cell Host & Microbe*, 9(5), pp. 355–361. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.006.
- Noble, P. *et al.* (2016) 'DNA-damaging autoantibodies and cancer: the lupus butterfly theory', *Nature Reviews Rheumatology*, 12. doi: 10.1038/nrrheum.2016.23.
- Oh-hora, M. and Rao, A. (2009) 'The calcium/NFAT pathway: role in development and function of regulatory T cells', *Microbes and Infection*, 11(5), pp. 612–619. doi: 10.1016/j.micinf.2009.04.008.
- Pahlavani, M. A. and Richardson, A. (1996) 'The effect of age on the expression of interleukin-2', *Mechanisms of Ageing and Development*, 89(3), pp. 125–154. doi: 10.1016/0047-6374(96)01725-3.

- Quintero, O. L. *et al.* (2012) 'Autoimmune disease and gender: Plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity', *Journal of Autoimmunity*, 38(2), pp. J109–J119. doi: 10.1016/j.jaut.2011.10.003.
- Rooney, J. W. *et al.* (1995) 'Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation', *Molecular and Cellular Biology*, 15(11), pp. 6299–6310. doi: 10.1128/mcb.15.11.6299.
- Rosenberg, S. A. (2014) 'IL-2: The first effective immunotherapy for human cancer', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(12), pp. 5451–5458. doi: 10.4049/jimmunol.1490019.
- Rosenblum, M. D., Remedios, K. A. and Abbas, A. K. (2015) 'Mechanisms of human autoimmunity', *The Journal of Clinical Investigation*, 125(6), pp. 2228–2233. doi: 10.1172/JCI78088.
- Saalmüller, A. (2006) 'New understanding of immunological mechanisms', *Veterinary Microbiology*, 117(1), pp. 32–38. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.007.
- Sahoo, A. and Im, S.-H. (2010) 'Interleukin and interleukin receptor diversity: role of alternative splicing', *International Reviews of Immunology*, 29(1), pp. 77–109. doi: 10.3109/08830180903349651.
- Schmidt, E. M. *et al.* (2009) 'Ctla-4 controls regulatory T cell peripheral homeostasis and is required for suppression of pancreatic islet autoimmunity', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(1), pp. 274–282. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.274.
- Setoguchi, R. *et al.* (2005) 'Homeostatic maintenance of natural Foxp3 + CD25+ CD4+ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization', *The Journal of Experimental Medicine*, 201(5), pp. 723–735. doi: 10.1084/jem.20041982.
- Shi, L. *et al.* (2007) 'NF90 regulates inducible IL-2 gene expression in T cells', *The Journal of Experimental Medicine*, 204(5), pp. 971–977. doi: 10.1084/jem.20052078.
- Shim, J. *et al.* (2002) 'Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization', *Molecular Cell*, 10(6), pp. 1331–1344. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00730-X.
- Spolski, R., Li, P. and Leonard, W. J. (2018) 'Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy', *Nature Reviews Immunology*, 18(10), pp. 648–659. doi: 10.1038/s41577-018-0046-y.
- Starr, T. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A. (2003) 'Positive and negative selection of T cells', *Annual Review of Immunology*, 21(1), pp. 139–176. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141107.
- Strasser, A. *et al.* (2000) 'Age-associated changes in the immune system of German shepherd dogs', *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 47(3), pp. 181–192. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2000.00278.x>.
- Suzuki, H. *et al.* (1995) 'Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor β ', *Science*, 268(5216), pp. 1472–1476.
- Svenska Kennelklubben (2020) *Nova scotia duck tolling retriever*. Available at: <https://www.skk.se/sv/hundraser/nova-scotia-duck-tolling-retriever/> (Accessed: 11 September 2020).

- Svenska Tollarklubben (2020) *Nova scotia duck tolling retriever*. Available at: <http://tollarklubben.se/rasen/artikel/> (Accessed: 14 September 2020).
- Tedeschi, S. K., Bermas, B. and Costenbader, K. H. (2013) 'Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA', *Clinical Immunology*, 149(2), pp. 211–218. doi: 10.1016/j.clim.2013.03.003.
- Tipold, A. and Schatzberg, S. J. (2010) 'An update on steroid responsive meningitis-arthritis', *Journal of Small Animal Practice*, 51(3), pp. 150–154. doi: 10.1111/j.1748-5827.2009.00848.x.
- Tizard, I. R. (2013) *Veterinary Immunology*. 9th edn. Missouri: Elsevier.
- Tsai, S. and Santamaria, P. (2013) 'MHC Class II polymorphisms, autoreactive T-Cells, and autoimmunity', *Frontiers in Immunology*, 4. doi: 10.3389/fimmu.2013.00321.
- Vogel, C. and Marcotte, E. M. (2012) 'Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses', *Nature reviews. Genetics*, 13(4), pp. 227–232. doi: 10.1038/nrg3185.
- Walker, L. S. K. (2013) 'Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance', *Journal of Autoimmunity*, 45, pp. 49–57. doi: 10.1016/j.jaut.2013.06.006.
- Wandrey, F. *et al.* (2015) 'The NF45/NF90 heterodimer contributes to the biogenesis of 60S ribosomal subunits and influences nucleolar morphology', *Molecular and Cellular Biology*, 35(20), pp. 3491–3503. doi: 10.1128/MCB.00306-15.
- Wang, N. *et al.* (2004) 'Genetic signatures of pre-expansion bottleneck in the Choctaw population of Oklahoma', *American Journal of Physical Anthropology*, 124(4), pp. 373–379. doi: 10.1002/ajpa.10363.
- Wilbe, M. *et al.* (2009) 'MHC class II polymorphism is associated with a canine SLE-related disease complex', *Immunogenetics*, 61(8), pp. 557–564. doi: 10.1007/s00251-009-0387-6.
- Wilbe, M. *et al.* (2010) 'Genome-wide association mapping identifies multiple loci for a canine SLE-related disease complex', *Nature Genetics*, 42(3), pp. 250–254. doi: 10.1038/ng.525.
- Wilbe, M. (2013) *Discovery of a Novel Pathway for an SLE-related Disease Complex in the Canine Breed Nova Scotia Duck Tolling Retriever*. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet. https://pub.epsilon.slu.se/10229/1/wilbe_m_130415.pdf.
- Wilbe, M. *et al.* (2015) 'Multiple changes of gene expression and function reveal genomic and phenotypic complexity in SLE-like disease', *PLOS Genetics*, 11(6), p. e1005248. doi: 10.1371/journal.pgen.1005248.
- Wilhelmson, A. S. *et al.* (2018) 'Testosterone is an endogenous regulator of BAFF and splenic B cell number', *Nature Communications*, 9(1), p. 2067. doi: 10.1038/s41467-018-04408-0.
- Wing, K. *et al.* (2008) 'CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T Cell function', *Science*, 322(5899), pp. 271–275. doi: 10.1126/science.1160062.
- Witte, J. S. (2010) 'Genome-wide association studies and beyond', *Annual Review of Public Health*, 31, pp. 9–20. doi: 10.1146/annurev.publhealth.012809.103723.
- Yang, J. *et al.* (2018) 'BANK1 alters B cell responses and influences the interactions between B cells and induced T regulatory cells in mice with collagen-induced arthritis', *Arthritis Research & Therapy*, 20. doi: 10.1186/s13075-017-1503-x.

Zhao, G. *et al.* (2005) 'NF45/ILF2 tissue expression, promoter analysis, and interleukin-2 transactivating function', *Experimental Cell Research*, 305(2), pp. 312–323. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.12.030.

Tack

Tack till handledare Göran Andersson för din aldrig sinande entusiasm samt vägledning. Tack till biträdande handledare Helene Hamlin för feedback och råd samt Malin Nilsson för värdefulla inputs och assistans med det praktiska. Hjärtligt tack även till alla tollarägare med tollare som ställt upp för provtagning – utan er skulle det inte blivit någon studie.

Tack även till er som kommit med råd och guidning, och på olika sätt hjälpt till att föra arbetet framåt; Tytti Vanhala, Haleh Yazdan Panah, Anna Darlene Van Der Heiden, Patrice Humblot samt Erling Strandberg.

Tack även till katten Todd som peppat i skrivandet!

Populärvetenskaplig sammanfattning

Immunmedierad reumatisk sjukdom (IMRD) är en autoimmun sjukdom som har en ökad benägenhet att drabba hundar inom hundrasen *Nova Scotia duck tolling retriever*, vilken också populärt kallas tollare. IMRD är en del av den så kallade tollarsjukan, och vanliga symptom vid IMRD är exempelvis smärta och stelhet i lederna. Ofta kan symptomen lindras med hjälp av kortisonbehandling. Autoimmuna sjukdomar uppstår när immunförsvaret felaktigt angriper den egna vävnaden, och kan leda till att det exempelvis bildas antikroppar mot olika organ eller strukturer i kroppen. Dessa antikroppar kallas autoantikroppar, och kan ofta påvisas genom blodprov. Vid IMRD uppvisar de flesta drabbade hundar ett positivt autoantikroppssvar. Orsaken till att IMRD uppstår är inte helt kartlagd, men flera genetiska riskfaktorer finns beskrivna. IMRD kan beskrivas som en genetiskt komplex sjukdom, då det finns flera olika gener som är involverade.

Målet i denna studie var att undersöka nivåerna av cytokinet IL-2 hos friska tollare jämfört med friska beaglar. Cytokiner är kortlivade protein som utsöndras av olika celler och sköter signalering samt responser inom immunförsvaret. Anledningen till att just IL-2 är intressant att undersöka närmare är på grund av att IL-2 utövar viktiga funktioner för att stimulera immunförsvaret, men också viktiga funktioner för att förhindra att kroppen utvecklar autoimmunitet. Hos både människor och djur har främst minskade nivåer av IL-2 setts vid olika typer av autoimmuna sjukdomar. Genom att jämföra IL-2-nivåerna mellan friska tollare och friska beaglar, kan en ”basnivå” av IL-2 etableras. Därefter kan framtida studier vidare undersöka hur skillnaderna ser ut gällande IL-2-nivåer hos friska tollare jämfört med tollare som är insjuknade i IMRD. Sammantaget kan detta ge oss värdefull information om sjukdomsutvecklingen vid IMRD.

Totalt analyserades blodprover från 12 friska tollare och 14 friska beaglar i studien. Av dessa hundar undersöktes också 9 tollare och 3 beaglar avseende hur stor mängd av IL-2-mRNA som uppvisades, det vill säga den första ”mallen” för IL-2 som skapas från IL-2-genen. I studien bestämdes basvärden av IL-2 och IL-2-mRNA hos både tollare och beaglar, varpå dessa grupper jämfördes. En viss trend kunde observeras där tollarnas koncentrationer av de faktiska IL-2-nivåerna i blodet generellt tycktes ligga lite lägre än beaglarnas. Detta kunde dock inte bekräftas via

statistiska analyser, och trenden var därmed inte statistiskt signifikant. Det fanns inte heller några statistiskt signifikanta skillnader av mRNA-nivåerna för IL-2 mellan de båda grupperna. Ett intressant fynd i studien var en signifikant åldersrelaterad minskning av IL-2-nivåer hos äldre tollare jämfört med yngre tollare.

Det kan inte uteslutas att flera tollare generellt uttrycker lägre nivåer IL-2 än andra hundraser. Detta skulle, tillsammans med andra riskfaktorer, i teorin kunna utgöra en initierande faktor för utveckling av IMRD hos tollare. I framtiden krävs emellertid en större grupp hundar för att statistiskt kunna säkerställa eventuella skillnader i IL-2-nivåer. IL-2 är en komplex cytokin, eftersom den är viktig både för att stimulera immunförsvaret men också för att hämma immunförsvaret i samband med skyddet mot autoimmunitet. Om IL-2 visar sig vara involverad i IMRD, kan det därför också spekuleras i huruvida IL-2-nivåer kan ses fluktuera beroende på var i sjukdomsprocessen djuret befinner sig. En teori är att lägre nivåer av IL-2 möjligen kan ses i tidigt skede, medan senare stadier av sjukdomen, med tillhörande inflammation, istället uppvisar högre nivåer av IL-2. Mycket forskning kvarstår emellertid innan slutsatser kan dras kring eventuell koppling mellan IL-2 och IMRD.