



Karaktärisering av humana NK-celler med specificitet mot
immunoterapeutiskt (Fas 1) godkända NK-92-celler

Hans Bergman

Matrikelnummer: 40979

E-post: hanbergm@abo.fi

Handledare: Christer Lindqvist, Lektor

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Pro gradu-avhandling 223996.0, 40 sp

Utbildningsprogrammet i Cellbiologi

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

ÅBO AKADEMI – Faculty of Science and Engineering

Abstract

Subject: Cell Biology
Author: Hans Bergman
M.Sc. Thesis titel: Characterizing human NK-cells with specificity against immunotherapeutic (phase 1) approved NK-92 cells
Supervisor: Christer Lindqvist
<p>Abstract: NK cells have a unique capacity to kill mutated or infected cells quickly. These characteristics of the NK cell are greatly used in this M.Sc. thesis when cytotoxicity analyses with varying conditions are performed. The main goal of this thesis was to determine the effects of time and various cytokines on NK effector cells. Therefore, the effects of cytokines on NK cells with various incubation times and different target cells are presented. The target cells in the cytotoxicity analyses were either K562, NK-92 or YT-cells.</p> <p>The incubation of isolated peripheral blood mononuclear cells with various cytokines showed that most of the cytokine treated effector cells showed higher cytotoxicity than the control cells when K562 cells were used as target cells. When NK-92 cells were used as target cells there were significantly less NK activity than in experiments with K562 cells when effector cells were incubated with cytokines. Experiments also managed to determine a timeframe when K562 cells were more prompt for lysis than NK-92 cells. At 24-48 hours of incubation K562 cells showed more lysis compared to NK-92 cells. When comparing at 48-72 hours of incubation the effectors cells showed more NK activity against NK-92 cells than K562 cells. The difference between NK-92 and K562 cell lysis can be an indication that different NK subpopulations are responsible for lysis of K562 and NK-92 cells.</p> <p>To determine if the low NK activity without any preincubation was due to regulatory factors purification of NK cells was done. The purified NK cells used in 0- and 48 hours cytotoxicity analyses also showed a cytotoxic discrepancy between K562 and NK-92 cells. This may indicate that there are some regulatory factors active, or that there are two different subpopulations of NK-cells that are activated at different timeframes.</p>
Keywords: Cytokine treatments, cytotoxicity analyses, K562, NK-92, effector cells
Date: 22.3.2021

ÅBO AKADEMI – Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Abstrakt

Ämne: Cellbiologi
Författare: Hans Bergman
Arbetets titel: Karaktärisering av humana NK-celler med specificitet mot immunoterapeutiskt (fas 1) godkända NK-92-celler
Handledare: Christer Lindqvist
<p>Abstrakt: NK-celler har den unika kapaciteten att döda infekterade eller muterade celler snabbt och effektivt. Dessa egenskaper utnyttjades i denna pro gradu-avhandling då cytotoxicitetsanalyser med varierande cytokiner utfördes. Syftet med avhandlingen var att klargöra effekten av cytokinbehandlingar på effektorceller, och preliminärt kartlägga NK-aktiviteten av PBMC mot NK-92-celler. Utöver det klargjorde resultaten effekten av cytokinbehandlade NK-celler under varierande tidsperioder. Isolerade perifera mononukleära blodceller och renade NK-celler användes huvudsakligen som effektorceller. Som målceller i de utförda cytotoxicitetsanalyserna fungerade K562, NK-92 och YT-celler.</p> <p>Cytokinbehandlingarna visade en effekt då de flesta cytokinbehandlade effektorceller dödade mer effektivt än mediumbehandlade effektorceller då K562 fungerade som målcell. Däremot var effekten av cytokinbehandlingen mindre då NK-92 fungerade som målcell i förhållande till analyser utförda med K562 som målcell. Analyser med cytokinbehandlade PBMC visade intressant data då det förekom stora skillnader i cytotoxiciteten trots samma cytokinbehandling men olika målceller. Skillnaden i cytotoxiciteten mot dessa två målceller gav även en separat tidsram, eftersom K562 lyserades mest när effektorcellerna preinkuberades i 24–48 timmar respektive 48–72 timmar för NK-92. Denna skillnad i NK-aktiviteten av PBMC beroende på målcell kan bero på att det finns flera olika subpopulationer av NK-celler med varierande känslighet beroende på målcell.</p> <p>För att få en inblick i om effektorcellerna är utsatta för någon slags reglering såsom steriska hinder, cell-cell-kontakter eller lösliga faktorer renades NK-celler. Reningen av NK-celler ur isolerade perifera mononukleära blodceller utfördes med hjälp av Dynabeads® och de renade NK-cellerna användes för 0 och 48 timmars analyser.</p>
Nyckelord: Cytokinbehandling, cytotoxicitetanalys, K562, NK-92, effektorcell
Datum: 22.03.2021

Innehållsförteckning

Förkortningar.....	s.1
1. Introduktion.....	s.2
1.1. Ospecifika immunförsvaret.....	s.2
1.2. Specifika immunförsvaret.....	s.3
1.2.1 B-celler.....	s.3
1.2.1.1 Antikroppar.....	s.4
1.2.2 T-celler.....	s.4
1.2.2.1 T-cell receptor och MHC-1 protein komplexet.....	s.5
1.3. NK-celler.....	s.6
1.3.1 NK-cell receptorer.....	s.7
1.4. Målceller.....	s.9
1.4.1 K562-celler.....	s.9
1.4.2 NK-92-celler.....	s.9
1.4.3 YT-celler.....	s.10
1.5 Cytokiner.....	s.10
1.5.1 IL-2.....	s.11
1.5.2 IL-12.....	s.11
1.5.3 IL-15.....	s.12
1.5.4 IL-21.....	s.12
1.5.5 Interferon Gamma.....	s.12
1.5.6 Interleukinreceptorer och dess verkningsmekanismer.....	s.13
1.6 Tidsupplösta immunofluorescenta analyser.....	s.13
1.7 Dynabeads®.....	s.14
1.8 Målsättningar.....	s.15
2. Material och metoder.....	s.16
2.1 Cellkultur.....	s.16

2.1.1 Cytokiner.....	s.16
2.1.2 Cellräkning och tvätt av celler.....	s.16
2.1.3 Datahantering.....	s.16
2.2 Ficoll-Hypaque™ densitetcentrifugering.....	s.17
2.3 Inmärkning av måcellerna med BATDA.....	s.17
2.4 Uppsättningen av cytotoxicitetsanalysen.....	s.18
2.5 Tvätt av Dynabeads och behandling.....	s.19
2.5.1 Isolering av NK-celler.....	s.19
3. Resultat.....	s.19
3.1 PBMC visar NK-aktivitet mot NK-92 och K562 celler.....	s.19
3.2 Inverkan av cytokinbehandling på NK-aktiviteten av PBMC under inkubation.....	s.20
3.2.1 Effekten av IL-2 på NK-aktiviteten av PBMC under inkubation.....	s.20
3.2.2 Effekten av IL-12 på NK-aktiviteten av PBMC under inkubation.....	s.22
3.2.3 Effekten av IL-15 på NK-aktiviteten av PBMC under inkubation.....	s.24
3.2.4 Effekten av IL-21 på NK-aktiviteten av PBMC under inkubation.....	s.26
3.3 NK-aktiviteten av NK-92 klon 1 och klon 2.....	s.28
3.4 Cytotoxiciteten av medium behandlade PBMC mot NK-92 klon 1 och klon 2.....	s.29
3.5 Cytotoxiciteten av renade NK-celler mot NK-92 klon 1 och klon 2.....	s.30
4. Diskussion.....	s.32
5. Eventuella tillkännagivanden.....	s.37
6. Litteraturförteckning.....	s.38

Förkortningar

Histokompatibilitetskomplex (eng. Major histocompatibility complex, MHC)

Perifera mononukleära blodceller (PBMC)

CD (Eng. Cluster of differentiation)

Naturliga mördarceller (NK-celler)

TDA (bis(acetoxymethyl)2,2:6,2-terpyridine-, 6-dicarboxylat, BATDA)

IL-2 (interleukin-2)

IL-12 (interleukin-12)

IFN- γ (interferon-gamma)

IL-21 (interleukin-21)

IL-15 (interleukin-15)

JAK (Janus Kinase)

STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5)

IL-2R (interleukin-2 receptor)

TNF (eng. Tumour-necrosis factor)

TGF- β 1 (eng. Transforming growth factor beta-1)

BATDA (eng. Benzophenonetetracarboxylicdianhydride)

EDTA (eng. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)

T-celle receptor (eng. T-celle receptor, TCR)

Effektor:målcell förhållande (E:M-förhållande)

Immunoglobulin (Ig)

KIR (eng. Killer immunoglobulin-like receptors, KIR)

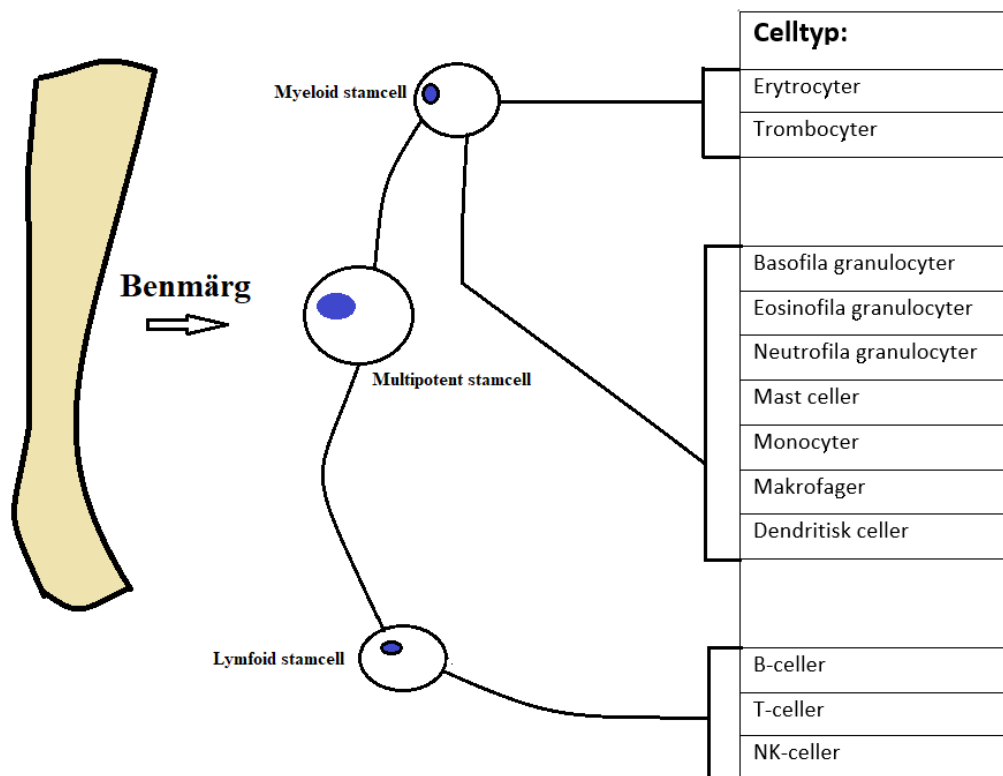
HLA (transplantationsantigen)

1 Introduktion

Människans immunförsvar är uppdelat i två delar, det specifika och ospecifika immunförsvaret (1). Dessa två immunförsvar skiljer sig från varandra med tanke på celltyper, responstid och verkningsmekanism.

1.1 Ospecifika immunförsvaret

Det ospecifika försvaret kallas kroppens första försvar och har en snabb responstid jämfört med det specifika immunförsvaret. Till det ospecifika immunförsvaret hör förutom celler även magsäcken, ögonen, saliv och huden (2). De vita blodkropparna som tillhör det ospecifika immunförsvaret är NK-celler, neutrofila granulocyter, mastceller, makrofager, basofila granulocyter, eosinofila granulocyter och dendritiska celler. Från figur 1 kan det ses att beroende på vilken differentieringsväg cellerna har tagit så tillhör de antingen den myeloida grenen eller den lymfoida grenen.



Figur 1: Cellerna i blodet och deras differentieringsvägar. Beroende på differentieringsvägen hör cellerna antingen till den lymfoida grenen eller den myeloida grenen.

Dendritiska celler (eng. *Dendritic cell*, *antigen-presenting cell*, *APC*) har som uppgift att snappa upp och behandla antigener som sedan introduceras för T-celler (3). Utöver det har dendritiska celler en viktig roll vid stimulering av T- och B-celler.

Neutrofila granulocyter är en variant av fagocyter som cirkulerar i blodet i stora koncentrationer. Vid inflammation söker neutrofilerna sig till det inflammerade området med hjälp av olika ytproteiner såsom integriner och selektiner (4). Neutrofiler är den första vågen av celler som når inflammationsområdet och därmed en av de första celltyperna som aktiveras vid inflammation.

Basofila granulocyter mognar i ryggmärgen och cirkulerar i det vaskulära nätverket där de har en kort livstid på några dagar (5). Basofilernas huvudsakliga uppgift är producera cytokiner såsom IL-4 och IL-13 som har en väsentlig roll vid inflammationer.

Eosinofila granulocyter är granulocyter som befinner sig bland annat i mag- och tarmkanalen, och verksamma främst i samband med parasitinfektioner (6). Eosinofila granulocyter producerar inte interleukiner som mastceller och basofila granulocyter utan producerar istället eosinofila katjonproteiner och eosinofila peroxidaser som har pro-inflammatoriska effekter (5).

Mastceller är en celltyp som hör till den myeloida grenen och har en viktig roll vid allergiska reaktioner och andra inflammatoriska processer (7). Dessa celler befinner mest i saliv och huden och därmed är de en stor del av kroppens första försvar. Mastceller differentieras i sitt verkningsområde som är till exempel de perifera vävnaderna såsom blodkärl (7).

1.2 Specifika immunförsvaret

Tack vare det specifika immunförsvaret har människokroppen möjlighet att effektivt döda patogener som tidigare invaderat kroppen (1). Celler som tillhör det specifika immunförsvaret är T- och B-celler. Det specifika immunförsvaret används då kroppens ospecifika immunförsvar inte har kapacitet att döda den invaderande patogenen i tid.

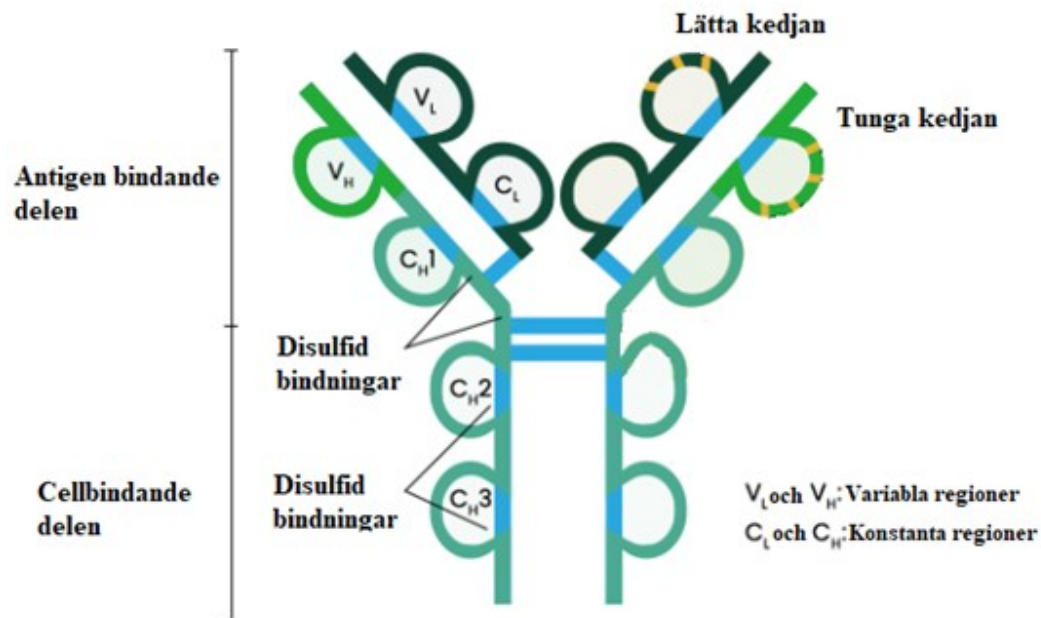
1.2.1 B-celler

B-celler binder till patogener med hjälp av antikroppar som leder till att B-celler genomgår celledelning, varefter produktionen av de specifika antikropparna påbörjas. Antikropparna rör sig sedan runt i kroppen med hjälp av bland annat blodomloppet.

Då B-cellerna binder till rätt antigen kan de medverka med aktiveringen av det specifika immunförsvaret (1, 2).

1.2.1.1 Antikroppar

Antikropp kallas även immunglobulin (*Ig*) vars bastruktur består av två tunga och två lätta proteinkedjor (8). De tunga och lätta proteinkedjorna kan indelas i regioner, en variabel region och en konstant region. De variabla regionerna är delarna som binder antigener och de konstanta regionerna binder till proteiner på immunförsvarets celler. De konstanta regionerna bestämmer till vilken av de fem grupperna IgG, IgE, IgA, IgM och IgD antikroppen tillhör. Dessa olika grupper av Ig hittas i olika ställen i kroppen där de har unika biologiska funktioner.



Figur 2: Basstrukturen av en antikropp. Blåfärgade delarna är disulfid bindingarna, V_L och V_H är de variabla regionerna, C_L och C_H är de konstanta regionerna. Modifierad från (9).

1.2.2 T-celler

T-celler härstammar från benmärgen, varefter de migrerar till brässen där de differentieras. T-celler kategoriseras i olika grupper beroende på funktionen av ytmarkörerna som förekommer på cellytan (10, 1). De viktigaste subclasserna av T-celler är cytotoxiska T-celler, T-hjälpar celler samt regulatoriska T-celler.

Hjälpar-T-celler är en del av det specifika immunförsvaret, vars uppgift är att aktivera immunförsvarets celler (11). Genom att utsöndra cytokiner kan hjälpar-T-celler uppnå

en önskad effekt på både närvarande och avlägsna celler. Hjälpar-T-celler kan aktiveras med hjälp av antigenpresenterande celler (*eng. antigenpresenting cells, APC*), som sker i två faser. I den första fasen binder hjälpar-T-cellens TCR (*T-cellreceptor, TCR*) till antigenpresenterande cellens antigenbundna MHC-komplex (*eng. Major histocompatibility complex, MHC*). I den andra fasen binder den sekundärstimulatoriska-receptoren CD28 till den antigenpresenterande cellens ligand B7, vilket leder till aktivering av hjälpar-T-celler.

Cytotoxiska T-celler hör till de celler i det specifika immunförsvaret som dödar muterade- eller infekterade celler (2). Cytotoxiska T-celler har specifika T-cellreceptorer som binder till specifika antigener. När T-cellreceptorer binder till den rätta antigenen aktiveras cellen, vilket ofta leder till inducering av apoptos i målcellen. För att cytotoxiska T-celler inte ska döda kroppsegen vävnad så krävs det två skilda signaler för att inducera apoptos.

Den regulatoriska T-cellens huvudsakliga roll är att reglera det specifika immunförsvaret så att ingen självskada sker (12, 13). Regulatoriska T-celler använder för det mesta cytokiner för att inducera en nedreglerande respons i effektor-T-celler (13). De kan även signalera med hjälp av cell-cell-kontakter via cytokinen TGF- β 1 (*eng. Transforming growth factor beta-1, TGF- β 1*). TGF- β 1 är inte en löslig cytokin utan är fastankrad i cellmembranet, TGF- β 1 liganden binder till TGF- β 1 receptorn och inducerar immunsuppression (14). Det finns två grupper av regulatoriska T-celler de nativa och de adaptiva (12). Nativa regulatoriska T-cellerna ansvarar för att inga autoimmuna angrepp sker i kroppen genom nedreglering av aktiva immunceller i normala tillstånd. De adaptiva regulatoriska T-cellerna bildas då immunförsvaret stöter på infekterade- eller muterade celler. Cancerceller kan signalera för differentiation av regulatoriska T-celler som leder till en nedsänkt immunrespons mot cancercellerna.

1.2.2.1 T-cell receptor och MHC-1 proteinkomplexet

T-cellens motsvarighet till B-cellens antikropp är T-cellreceptor (13, 15). TCR består av två monomerer, α och β . TCR är den receptor som ansvarar för att känna igen antigener som har bundit till MHC-komplexet på cellytan av den infekterade cellen (16). Dessa monomerer har olika genvariationer som leder till en stor variation av T-cellreceptorer. Både α och β har en extracellulär och intracellulär del, där den

extracellulära delen utgör den variabla regionen och intracellulära den konstanta regionen (15). Konstanta regionen står för signaltransduktionen in i cellen. Den variabla delen av TCR är den delen som binder till peptidfragmenten som är bundna till MHC-1. Denna region är den som ger TCR variation och möjligheten att känna igen olika peptidfragment bundna till MHC-1, som är ett proteinkomplex som uttrycker fragment av peptider som producerats intracellulärt, så kallade kroppsegna peptider (17). En annan benämning för MHC-1 proteinkomplexet i människan är transplantationsantigen eller HLA.

Ifall cellen är utsatt för någon mutation eller infektion kommer det med stor sannolikhet att bindas icke kroppsegna peptidfragment till MHC-1. Ifall dessa peptidfragment är kroppsegna så fungerar MHC-1 som en inhibitor. Om peptidfragmenten som uttrycks av MHC-1 inte är kroppsegna så fungerar MHC-1 som en aktivator. Ifall MHC-1 uttrycks lite eller inte alls på grund av cancer eller virusinfektioner blir cellerna en måltavla för NK-celler.

1.3 NK-celler

I Ivan Roitts laboratorie upptäcktes år 1973 celler med en cytotoxisk aktivitet som var varken T- eller B-celler (18). I Sverige år 1975 upptäckte Rolf Keissling lymfocyter som inte krävde en antikropp eller tidigare stimulering för att döda cancerceller, dessa celler fick namnet naturliga mördarceller. Samma år upptäckte Ronald Herberman att det fanns en subpopulation av celler som visade cytotoxisk aktivitet redan efter fyra timmar, dessa fick namnet NK-celler (19). NK-celler även kallade naturliga mördarceller hör till det ospecifika immunförsvaret. Naturliga mördarceller härstammar från hematopoetiska stamceller och differentieras i både benmärgen och i lymfkärlen. Detta menar att NK-celler har sitt ursprung ur den lymfoida grenen, till den lymfoida grenen hör B-, T- och NK-celler (20, 21). Av PBMC i blodet är 5–15 % NK-celler (22). NK-celler har en viktig funktion i människans vardag eftersom de kan eliminera vissa virusinfekterade- och cancerceller.

NK-celler har en förmåga att döda genom att utsöndra cytotoxiska ämnen, detta sker utan en fördröjningsfas (23). De verksamma ämnen som utsöndras är perforin och granzyme B. Perforin är ett protein som har förmågan att bilda tunnlar i membran vilket leder till att molekyler kan ta sig igenom cellmembranet in i cellen (24). Tack vare perforins förmåga att ändra membranstrukturen på målcellen kan granzyme B ta

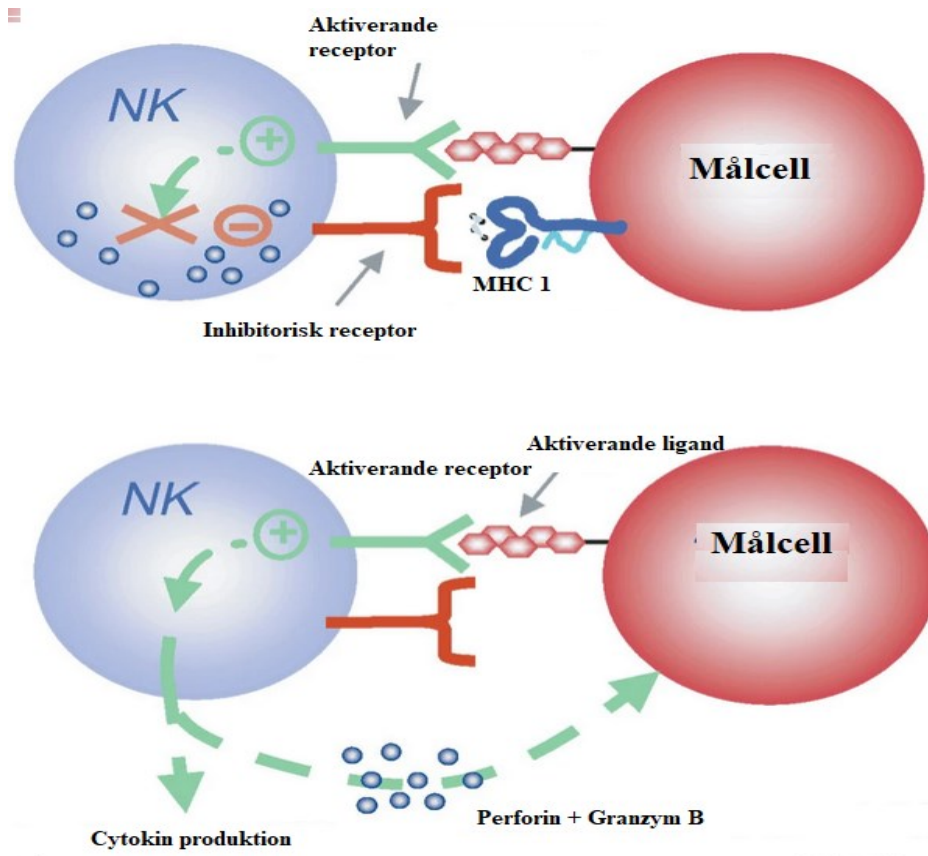
sig in i cellen och initiera apoptos (25). Granzyme B är en protease som klyver kaspas 8, 10, 3 och 7 som initierar apoptos inifrån målcellen. Detta sker via olika signaleringskaskader såsom utsöndring av cytokrom C från mitokondriet (25).

NK-celler har en synergi med celler från det specifika immunförsvaret tack vare att dessa celler utsöndrar cytokiner som aktiverar NK-celler. Speciellt dendritiska celler som utsöndrar IL-15 och makrofager som står för utsöndringen av IL-12 och IL-18 är viktiga för aktivering av NK-celler (26). Förutom att NK-celler kan utan fördröjning döda virusinfekterade- och cancerceller, spelar NK-celler även en roll i att nedreglera celler från det specifika immunförsvaret genom utsöndring av cytokiner.

1.3.1 NK-cell receptorer

NK-cellen har olika receptorer på cellmembranet som har både aktiverande och nedreglerande effekter på NK-aktivitet. Tabell 1 representerar aktiverande receptorer, inhiberande receptorer och cytokinreceptorer som är närvarande på ytan av en NK-cell (26). Ytmarkörer som identifierar NK-prekursorer är $CD34^+$, $CD3^-$, $CD4^-$ och $CD8^-$ där positiva märket indikerar närvaro av ytmarkören och negativa tecknet frånvaron (23).

De vanligaste aktiverande och inhiberande receptorerna som uttrycks på NK-cellernas cellmembran är KIR (*eng. Killer immunoglobulin-like receptors, KIR*) (27). Tack vare dessa receptors stora diversitet kan NK-cellerna känna igen flera olika allotyper av HLA. Dessa receptorer är heterodimerer som har en extracellulär del som binder till liganden, och en intracellulär del som för signalen in i cellen. Inhiberande KIR binder till olika varianter av HLA-A, HLA-B och HLA-C (*transplantationsantigen*) som uttrycks på kroppsegna friska celler. En del cancer- och virusinfekterade celler uttrycker oftast inget eller väldigt lite av transplantationsantigener, detta leder till att ingen aktivering av inhiberande KIR sker. Figur 3 demonstrerar hur cytotoxiciteten av NK-cellen är beroende av vilka molekyler som uttrycks (28).



Figur 3: Cytotoxiciteten av NK-celler är beroende av vilka molekyler som uttrycks mellan NK- och målcell. Modifierad från (28).

Aktiverande KIR binder till andra typer av HLA såsom HLA-C2 och HLA-A3/A1 (29). Ifall den aktiverande signaleringen är starkare än den inhiberande signaleringen aktiveras NK-cellen (27). En av de viktigaste cytokinreceptorerna som uttrycks på NK-cellen är cytokinreceptorer där den så kallade "common-gamma chain" ingår (30).

Tabell 1: Tabell på aktiverande-, inhibitoriska- samt cytokinreceptorer som finns på NK-celler. Redigerad från (26, 31).

Aktiverande receptorer	Inhibitoriska receptorer	Cytokinreceptorer
NKp46, NKp3, NKp44	LAIR-1	IL-1R
CD16/CD94/CD84	CEACAM-1	IL-2R
hNKp30/44/80	TIGIT	IL-12R
mNKR-P1C	KLRG-1	IL-15R
2B4	mNKR-P1B/mNKR-P1D	IL-18R
Ly9	M Inh.Ly49	IL-21R

M Act.Ly49	CD94/NKG2A	IFNAR
hKIR-S	hKIR-L	
NTBA	hLILRB1	
CRACC		
TRAIL		

Som tabell 1 visar finns det mer NK-cell aktiverande receptorer än inhibitoriska receptorer. När NK-celler kommer i kontakt med andra celler så är NK-cellernas huvudsakliga uppgift att känna igen MHC-1 ytproteinet.

1.4 Målceller

1.4.1 K562-celler

K562 är NK-känsliga målceller som är isolerade från en 53 år gammal kvinna med kronisk myelogen leukemi år 1975 av Lozzio's forskningsgrupp i Philadelphia (32). K562-celler har nedreglerade gener som spelar en kritisk roll i celladherens (33). K562-celler har en ovanligt kort kromosom 22, som kallas Philadelphia kromosom (*eng. Philadelphia chromosome*). Den korta kromosomen leder till att genetiskt material från kromosom 9 och kromosom 22 sammanslås och fusionsgenen BCR-ABL1 uppstår (34). BCR-ABL1 är ett tyrosinkinas-komplex som är konstant aktivt och därmed nedregulerar gener som har en effekt på celladherens (33). BCR-ABL1 fusionsgenen fungerar även som en ytmarkör så att man kan identifiera celler med en Philadelphia kromosom. K562-cellinjen uttrycker bara små mängder MHC-1 och används därför som målcell för olika NK-cellinjer (35).

1.4.2 NK-92-celler

År 1992 lyckades Hans Klingemann i Vancouver Canada isolera NK-celler från periferala blod leukocyter som härstammade från en patient med granulär lymfoma (36). Dessa isolerade NK-celler fick namnet NK-92-celler. NK-92-celler bevarar cytotoxiciteten då de inkuberas i medium som innehåller fetalkalvserum och IL-2. Cellinjen NK-92 används mycket inom forskning och kan frysas ner utan att dess cytotoxicitet påverkas (37, 36). Olika NK-cellinjer har isolerats från patienter med NK-cell lymfom men ingen av dessa NK-cellinjer har visat lika hög cytotoxicitet mot

tumörceller som NK-92 (36). NK-92-celler är av speciellt intresse då de kan modifieras med hjälp av en CAR (*eng. Chimeric Antigen Receptor, CAR*) vars uppgift är att öka specificiteten av NK-cellen.

1.4.3 YT-celler

YT är en cellinje som isolerades från en 15 årig pojke med akut lymfoblastisk lymfom år 1985 i Japan av Yodoi's forskningsgrupp (38). Denna cellinje är tetraploid och har flera ytreceptorer som är liknande som NK-cellernas ytreceptorer såsom HNK-1 Ag (38). I en studie av (39) framkom det att YT-celler har en cytotoxisk effekt mot myelomceller med ytmarkören CD86 då YT-celler inkuberas med cytokinen IL-2. Eftersom cytotoxiciteten har sedan tidigare etablerats kunde cellerna användas som både mål- och effektorceller i denna pro gradu-avhandling. Tabell 2 visar de olika målcellernas ytmarkörer.

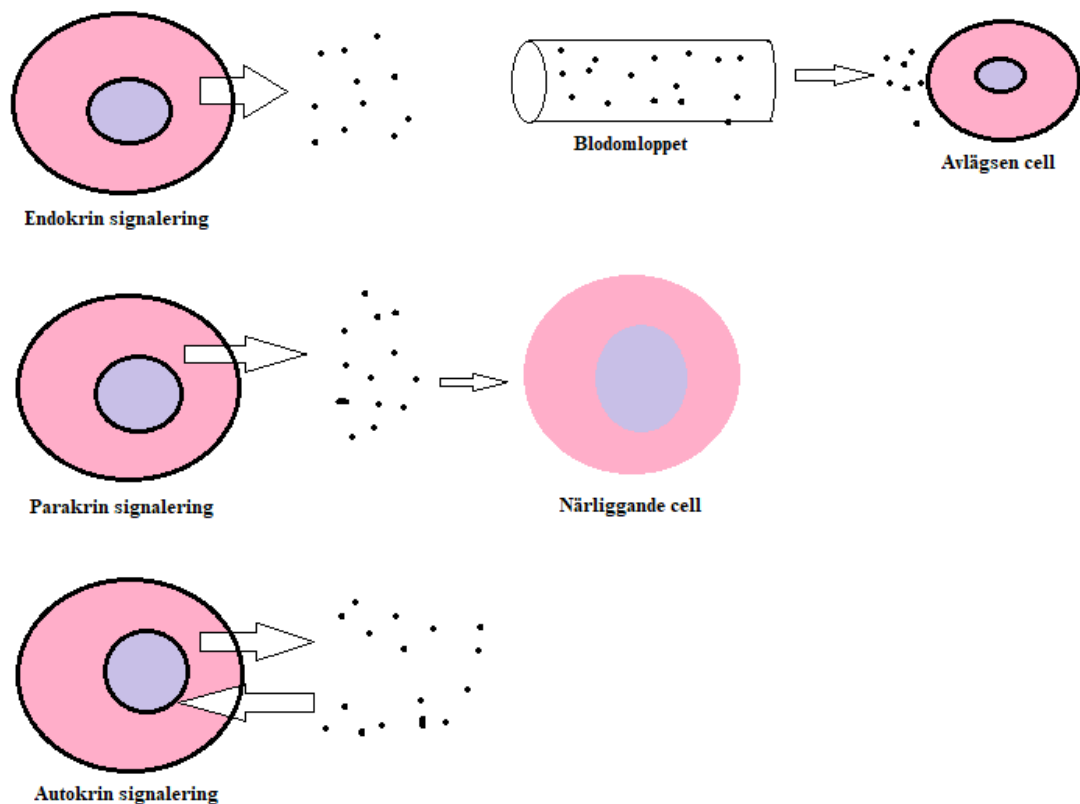
Tabell 2: Ytmarkörer som uttrycks av målcellerna (40, 41, 42,).

K562-celler	NK-92-celler	YT-celler
CD45, CD13, CD34, CD71, CD61	CD10, CD2, CD7, CD11a, CD28, CD45, CD54, CD56, CD4, CD3, CD1, CD5, CD8, CD10, CD16, CD14, CD19, CD20, CD23, CD34, HLA-DR	CD7, CD28, CD30, CD45R0, TLI SA, S6F1, CD25, CD56, HLA-DR

1.5 Cytokiner

Cytokiner är proteiner som utsöndras av olika celler och leder till olika reaktioner beroende på cytokinen (40). Cytokinerna kan ha en pro-inflammatorisk effekt eller en anti-inflammatorisk effekt. Cytokinerna har tre olika signaleringsmöjligheter: autokrin, parakrin eller endokrin signalering. När cellen producerar och stimulerar sig själv med cytokiner kallas det autokrin signalering. Parakrin signalering är när cytokinerna har en effekt på närliggande celler och endokrin signalering är när de påverkar celler längre ifrån. Figur 4 visar de olika signaleringsmöjligheterna.

Cytokiner har olika namn beroende på celltypen som producerat dem. De cytokiner som användes i denna avhandling var interleukiner som är producerade av leukocyter.



Figur 4: De olika signaleringsmöjligheter cellerna använder sig av. Svarta prickarna är signaleringsmolekylerna.

1.5.1 IL-2

IL-2 är ett 15,5 kDa stor cytokin med fyra α -helixar (41). IL-2 binder receptorn IL-2R och har olika egenskaper i kroppens immunförsvar. Till dessa egenskaper hör stimuleringen av regulatoriska T-celler och ökningen av kroppens immunresponser mot cancerceller. Utöver detta har IL-2 även en viktig roll i differentieringen av naiva T-celler (42). IL-2 kan stimulera NK-cellernas cytotoxicitet, öka produktionen av cytokiner i NK-celler samt öka NK-cellernas motilitet (41). IL-2 produceras i stort sett av CD4⁺ T-celler och CD8⁺ T-celler (43).

1.5.2 IL-12

IL-12 är en 70 kDa stor cytokin som produceras huvudsakligen av aktiverade B-celler, makrofager och dendritiska celler (44). IL-12 har en heterodimerisk struktur med fyra α -helixar. IL-12 skiljer sig från de andra interleukinerna då den kodas av två olika

gener. IL-12 familjens heterodimeriska struktur möjliggör interaktioner som inte kan utföras av andra cytokiner (44). Till IL-12 familjen tillhör IL-23, IL-12, IL-27 och IL-35. IL-12 och IL-23 har en aktiverande effekt medan IL-27 och IL-35 har en nedreglerande effekt på immunresponsen. IL-12 har en proinflammatorisk effekt då den stimulerar T- och NK-celler att producera IFN- γ (*interferon-gamma*) (45). När IFN- γ produceras av T- och NK-celler sker det en aktivering i antigenpresenterande celler (APC). Denna aktivering leder till att APC producerar mer IFN- γ vilket leder till en positiv feedbackloop.

1.5.3 IL-15

IL-15 är en 14–15 kDa stor cytokin som binder till IL-15 R α receptorn som finns på ytan av makrofager, monocyter, NK-celler, B-celler, T-celler och dendritiska celler (46). IL-15 produceras huvudsakligen av fibroblaster, makrofager, monocyter och dendritiska celler. Produktionen av IL-15 i de olika cellerna är väldigt noggrant reglerad då IL-15 har en stor pro-inflammatorisk effekt på dess målceller (47). I NK-, B- och T-celler inducerar IL-15 cellproliferation och celldifferentiation samt ökar IL-15 cytotoxiciteten av dessa celler. I makrofager ökar IL-15 fagocytosaktiviteten medan i dendritiska celler har IL-15 en effekt på cellproliferation (46).

1.5.4 IL-21

IL-21 är en 14 kDa stor cytokin som har en bred målgrupp av celler och produceras huvudsakligen av T- och NK-celler (48). IL-21 har en effekt på dendritiska celler, T-celler, NK-celler, makrofager och B-celler. I B-celler reglerar IL-21 cellproliferation och differentiering av B-celler till minnes B-celler. IL-21 framkallar differentieringen från M1 makrofager till M2 makrofager. I NK-celler har IL-21 effekt på cellproliferation och NK-cellernas cytotoxicitet då patogener är närvarande. I CD4+ och CD8+ T-celler ökar cellproliferation samt cytotoxiciteten. Om IL-21 eller dess receptor IL-21R muteras i celler minskas effekten av organismens immunrespons (49).

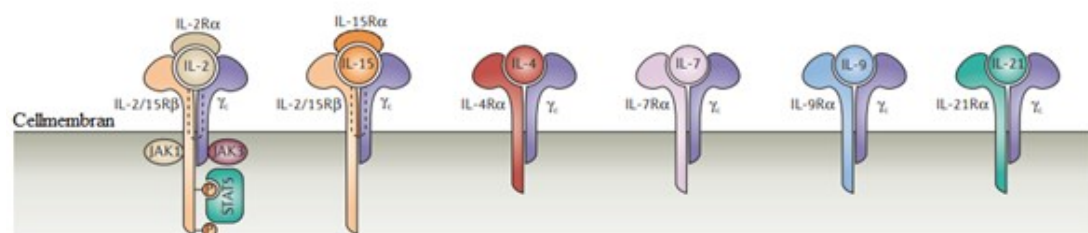
1.5.5 Interferon Gamma

Interferon- γ är en 25 kDa stor cytokin som spelar en stor roll i kroppens kamp mot cancer (50). Onormalt förhöjd produktion av interferon- γ leder till autoimmuna sjukdomar. Interferon- γ aktiverar expressionen av MHC-2 proteinkomplexet på cellmembranet och aktiverar makrofager för fagocytos. Dessa cytokiner produceras

mest av NK-, CD8⁺ och CD4⁺ T-celler. Interferon- γ binder till IFNGR1 (*interferongamma receptor-1*) som är en typ 2 interleukinreceptor (51).

1.5.6 Interleukinreceptorer och dess verkningsmekanismer

Interleukinreceptorer delas upp i två klasser: klass 1 och klass 2, och de vanligaste interleukinreceptorerna är dimerer (52). klass 1 interleukinreceptorer binder för det mesta bara interleukiner, och har identiska signaltransducerande subenheter. Däremot binder klass 2 receptorer bara några få interleukiner och istället binder de interferoner såsom IFN- γ . Cytokinerna IL-2 och IL-15 har en gemensam subenhet som har namnet IL-2/15R β . Det som möjliggör att cellen kan skilja ifrån IL-2 eller IL-15 är interleukinernas α -kedja (53). Denna kedja har en viss affinitet till receptorsubenheter beroende på cytokinen, som leder till olika signaleringsskaskader då IL-2 eller IL-15 binder till receptorn. Det finns tre olika interleukin-2 receptorkedjor γ c (CD132), β (CD122) och α (CD25). Dessa proteinkedjor bildar komplex som har en inverkan med vilken affinitet IL-2 binder (41). Figur 5 visar hur interleukinreceptorerna har en identisk subenhet i detta fall gamma-kedjan.

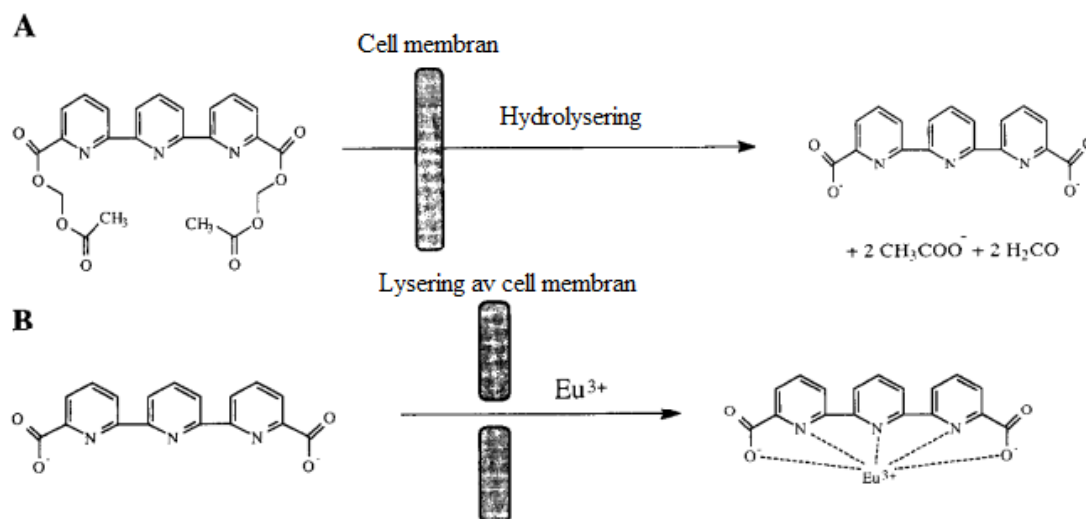


Figur 5: Strukturer av ofta förekommande interleukinreceptorer med gamma-kedja. Redigerad från (54)

1.6 Tidsupplösta immunofluorescenta analyser

Tidsupplösta immunofluorescenta analyser är fördelaktiga då radioaktiva ämnen inte behöver användas som fluorescenta sonder (55). En mycket använd tidsupplöst fluorescens baserad metod är den som används för att mäta cellers cytotoxiska förmåga (56). I den metoden inmärks måcellerna med BATDA (*eng. Benzophenonetetracarboxylic dianhydride*) som efter upptagning omvandlas till TDA med hjälp av intracellulära esteraser. Denna omvandling framgår i figur 6. Ovannämnda egenskaper utnyttjas då effektorcellerna dödar måcellerna och cellmembranet lyseras vilket leder till att TDA läcker ur cellen och kan därmed mätas. Europium tillsätts för att bilda ett kelat med TDA som läckt ur de lyserade cellerna.

Kelatet fungerar som den långlivade fluorescenssonden och möjliggör mätning av mängden lyserade celler. De långlivade fluorescenssonder möjliggör mätning av emissionsignalen i ett betydligt senare skede än icke tidsbaserade analyser. Denna egenskap ger låga bakgrundstörningar.

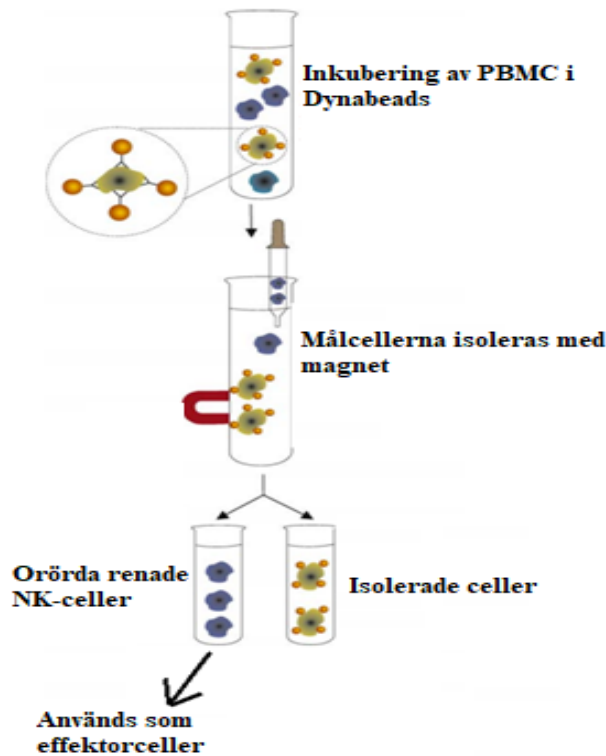


Figur 6: En schematisk illustration hur BATDA hydrolyseras då ämnet tar sig in i cellen, och hur europium bildar ett kelat med TDA redigerad från: (56).

1.7 Dynabeads®

Dynabeads® är kulor som används för att isolera och separera specifika celler med hjälp av magneter (57). Dessa kulor är gjorda av polystyren som är ett aromatiskt kolväte. Kulorna har en sfärisk form och ytan är överdragen med streptavidin för att kunna binda biotinylerade antikroppar. Dessa polymerer är superparamagnetiserade vilket innebär att de är bara magnetiska ifall de utsätts för ett magnetiskt fält. Denna paramagnetiska egenskap möjliggör åter suspension av dessa kulor när magnetiska fältet upphör.

Till dessa kulor kan man tillsätta specifika antikroppar som till exempel binder till membranbundna differentieringsantigener som finns på cellerna av. Vid isolering med hjälp av dynabeads är det ofta bra att de celler som är av intresse förblir orörda då de inte bundit till magnetkulorna. Figur 7 hänvisar de olika stegen hur en isolering av NK-celler sker ur helblod.



Figur 7: Rening av NK-celler med hjälp av Dynabeads™. Modifierad från (57).

1.8 Målsättningar

Målsättningar som ställts för detta projekt:

- Påvisa att det är NK-celler som dödar NK-92-celler.
- Undersöka hur dessa NK-cellers (med specificitet för NK-92-celler) cytotoxiska förmåga påverkas genom inkubering i vanligt odlingsmedium under 0–72 timmar.
- Undersöka hur dessa NK-cellers cytotoxiska förmåga påverkas genom inkubering av i närvaro av IL-2, IL-12p70, IL-15, IL-12 eller IFN-gamma under 0–72 timmar.
- Preliminära undersökningar huruvida dessa NK-cellers aktivitet är relaterad till NK-92-cellens egen cytotoxiska aktivitet mot K562-celler.
- Initiala undersökningar huruvida NK-celler med specificitet för NK-92-celler regleras av CD4⁺ celler.

2. Material och metoder

2.1 Cellkultur

Cellinjerna NK-92, PBMC, K562 samt YT odlades i RPMI 1640 i närvaro av 5 % fetalkalvserum (*GIBCO™, Invitrogen Corp., Paisley, UK.*), 2 mM L-glutamin, 10 U/ml penicillin G natriumsulfat och streptomycin sulfat (*GIBCO™*). Utöver det tillsattes det i NK-92-cellernas medium 20 U/ml IL-2 (*Peptotech lot: 0116226*). Förhållanden i inkubatorn var 37 °C och 5 % koldioxidhalt. Då effektorcellerna cytokinbehandlades späddes cellerna ut till koncentrationen 1×10^6 /ml och cytokiner tillsattes i preinkubationsmediet. Preinkubationerna av effektorcellerna gjordes på Nunclon™ surface (*Thermo Scientific™*) petriskålar.

2.1.1 Cytokiner

Samtliga cytokiner löstes upp i MQ-vatten till en koncentration av 10 µg/ml (*Peptotech IL-21: lot 0116226, IL-15 lot 0804CY12C155, IL-12: lot 0715611 och IL-2: lot 080CY12 C155*).

2.1.2 Cellräkning och tvätt av celler

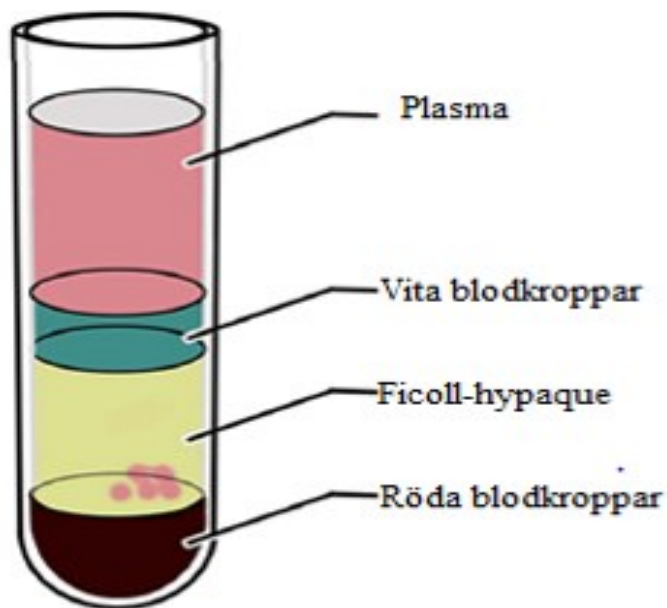
Rätt koncentrationen av celler som användes till inmärknigen med BATDA eller som effektorceller uppnåddes med hjälp av cellräkning. Detta gjordes efter att cellerna hade tvättats tre gånger i RPMI 1640 + 5 % fetalt kalvserum och centrifugerats (583 g, 5min, 20°C). Cellerna späddes ut tiofaldigt i trypanblå färg som möjliggör räkningen av döda celler. 10 µl cellsuspension togs och blandades med 90 µl trypanblå lösning varefter 10 µl trypanblå+cellsuspension lösning tillsattes i en Burker kammare och räknades med hjälp av ett mikroskop.

2.1.3 Datahantering

Resultaten är analyserade med hjälp av statistikprogrammet GraphPad Prism 9 version 4.00 (*San Diego, California USA*). GraphPad Prism användes för att räkna medeltal, standardavvikelse och för att utföra oberoende t-test mellan cytokinbehandlade K562- och NK-92-celler. Alla p-värden under 0,05 betraktades som signifikanta och markerades med *.

2.2 Ficoll-Hypaque™ densitetcentrifugering

Det färska blodet tappades ur blodpåsen i ett 50 ml falconrör (*Thermo Fisher Scientific*) varefter blodet centrifugerades (583 g, 5 min, 20°C). 20 ml av plasmat som lagt sig högst upp i röret avlägsnades med en pasteurpipett, varefter 20 ml 1640-RPMI medium tillsattes och cellsuspensionen omskakades. 6 ml av cellsuspensionen tillsattes i ett rör med Ficoll-Hypaque lösning, och detta gjordes 6 gånger varefter rören centrifugerades (583 g, 25 min, 20°C). Figur 8 illustrerar hur ett provrör såg ut efter centrifugeringen. Röda blodkropparna trycks ner i rörbotten och Ficoll-hypaque lagret bildas ovanpå, vilket separerar röda och vita blodkroppar. Cellerna av intresse är de vita blodkropparna som befinner sig mellan Ficoll-Hypaque lagret och blodplasmat. Dessa vita blodkroppar togs med en pasteurpipett och överfördes till ett skilt rör varefter PBMC är klara för användning.



Figur 8: Illustration av ett provrör efter en lyckad densitetcentrifugering, cellerna av intresse är de vita blodkropparna som har isolerats från röda blodkroppar med hjälp av Ficoll-Hypaque lösning. Modifierad från (58).

2.3 Inmärkning av måcellerna med BATDA

Måcellerna späddes till koncentration 1×10^6 /ml och preinkuberades i ett vattenbad i $\sim 37^\circ\text{C}$ i 15 minuter, varefter 1–1,5 μl BATDA tillsattes i cellsuspensionen. Måcellerna lades sedan i ett vattenbad i $\sim 37^\circ\text{C}$ i 25 minuter. Cellerna tvättades sedan tre gånger i medium (RPMI 1640+FCS 5 %) med centrifugering (583 g, 2 min, 20°C).

Efter tvätten justerades måcellernas koncentration till 5000 celler/100 µl, varefter de blandades med effektorceller i en 96-hålsplatta (*Sarstedt Inc, Nümbrecht, Tyskland*) och inkuberades i 2 timmar (37°C, 5 % koldioxidhalt).

2.4 Uppsättningen av cytotoxicitetsanalysen

Cytotoxicitetsanalysen utfördes i en 96-håls platta med V-botten köpt från Sarstedt Inc. Effektorcellerna tvättades med hjälp av centrifugering i medium (RPMI 1640+5 % FCS) varefter de räknades och justerades till koncentration 5×10^6 celler/ml. Efter tvätten tillsattes 100 µl (5×10^6 celler/ml) av effektorceller i triplikat och en seriespädning gjordes för att uppnå 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1, 6,25:1 och 3,125:1 effektor/måcell-förhållanden. Varefter 100 µl (5×10^3 celler/µl) av BATDA inmärkta celler kunde tillsättas i brunnarna vilket ledde till en slutvolym av 200 µl per brunn. procent lys räknades för varje enskilda experiment med hjälp av ett maximalt och spontant värde. Dessa värden kunde fås med hjälp av att blanda 100 µl (5000 celler/100 µl) måceller med antingen 0,05 % Triton X-100 som uppgav maximal fluorescence eller 100 µl medium (1640 RPMI+ 5 % FCS) som uppgav spontan fluorescence. Då plattan var färdig för inkubering gjordes en kort centrifugering (162 g, 1min, 20°C) varefter plattan inkuberades i 2 timmar i 37 °C, 5 % koldioxidhalt och 95 % luftfuktighet.

Efter inkuberingen centrifugerades 96-hålsplattan (583 g, 5min, 20°C) så att en cellpellet av de kvarvarande levande cellerna skulle bildas. Brunnarna i en Costar RIA/EIA 96-hålsplatta (Corning Inc., Corning, NY, USA) som korrelerade med plattan som cytotoxicitetsanalysen skedde i tillsattes 100 µl europiumlösning (PerkinElmer, Inc.). 20 µl av effektor/måcell-lösning togs och tillsattes i plattan med europiumlösning och plattan skakades i 15 minuter varefter fluorescensen mättes med 1420 Victor multi-label counter (PerkinElmer Inc.) Procentvärden av fluorescensen som utgavs räknades med hjälp av följande formel:

$$\text{Specifik fluorescens (lysprocent)} = \frac{\text{Experimentell fluorescens} - \text{spontan fluorescens}}{\text{Maximal fluorescens} - \text{spontan fluorescens}} \times 100\%.$$

2.5 Tvätt av dynabeads® och behandling

PBMC tvättades i sterilt isoleringsbuffert som bestod av Ca^{2+} och Mg^{2+} fri (GIBCO) PBS* + 2 % FCS och 2mM EDTA (eng. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA). PBMC späddes ut med medium till $100 \times 10^6/\text{ml}$ och användes i reningen med Dynabeads (Dynabeads Untouched™ Human NK Cells [cat no 11349D/Invitrogen]. Reningskulorna vortexades varefter de 750 μl Dynabead lösning som innehöll antikropparna tillsattes. de antikroppar som användes var IgG antikroppar för CD3, CD14, CD36, CDw123, HLA klass 2 och CD235a. 1 ml av isoleringsbuffert blandades med pärlorna varefter de placerades i en magnetställning (Dyna MPC-1) i 1 minut i en horisontal position varefter bara supernatanten hälldes ut. 750 μl isoleringsbuffert tillsattes i röret med pärlorna och fick stå i kylskåp tills användning.

2.5.1 Isolering av NK-celler

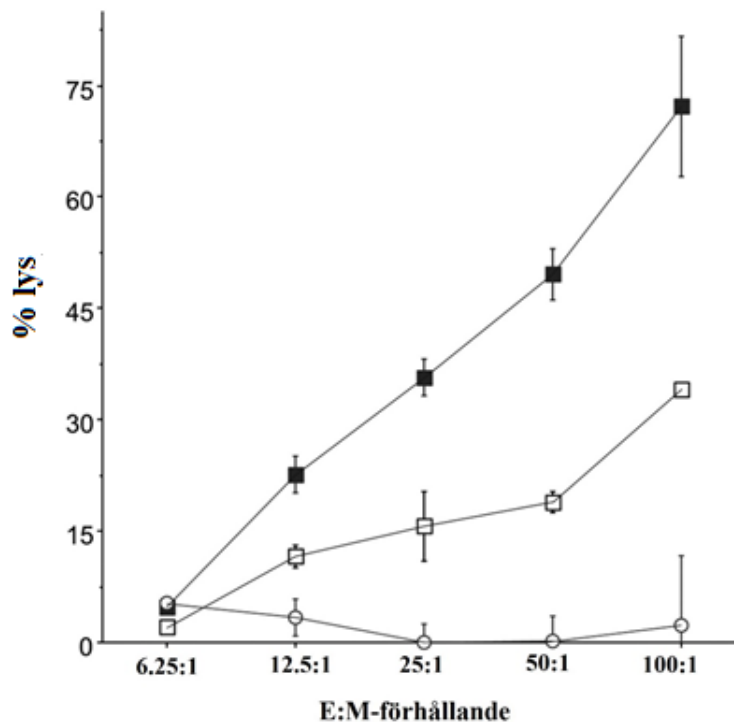
600 μl av $100 \times 10^6/\text{ml}$ PBMC lösning togs och fördes över till ett skilt rör, detta gjordes i två separata rör. 200 μl av värmeinaktiverat FCS och antikroppsmix lades till i båda rören. Dessa rör lades på gungning i 20 minuter i 4°C . Varefter 5 ml PBS* lades i varsitt rör och centrifugerades i (420 g, 8min, 8°C). Supernatanten hälldes ut från båda rören varefter lösningen som innehöll reningspärlorna (Dynabeads™) från kylskåpet lades till rören och inkuberades i 15 minuter under mjuk blandning. Sedan lades 5 ml isoleringsbuffert till båda rören och blandades om cirka 10 gånger per rör. Efter blandning lades rören i en magnetställning (Dyna MPC-1) i 2 minuter och supernatanten togs tillvara och centrifugerades (583 g, 5 min, 20°C). Båda cellsuspensionerna löstes upp i RPMI-1640 + 5 % FCS medium och räknades varefter cellkoncentrationen justerades till $5 \times 10^6/\text{ml}$ som användes i analysen. Resten av $5 \times 10^6/\text{ml}$ cellsuspensionerna justerades till $1 \times 10^6/\text{ml}$ och inkuberades enligt den indikerade tiden i 37°C , 5 % CO_2 .

3. Resultat

3.1 PBMC visar NK-aktivitet mot NK-92 och K562-celler

Figur 9 är sammanställd från experiment med PBMC som effektorcell och YT, NK-92, och K562 som målceller. PBMC visade cytotoxisk aktivitet mot både K562- och YT-celler vid 6,25:1 E:M-förhållande med 5 % lyserade målceller vid båda fallen. När E:M-förhållandet steg gick NK-aktiviteten mot YT-celler neråt och hölls vid ~ 2

%. Däremot med K562 som målceller kunde en cytotoxicitet på 72,2 % uppnås vid 100:1 E:M-förhållande. Vid samma E:M-förhållande visade PBMC en cytotoxisk aktivitet på 34,1 % mot NK-92-celler.



Figur 9: Data ur cytotoxicitetsanalyser med PBMC som effektorcell och YT (O), NK-92 (□) och K562 (■) som målceller. Resultaten är redovisade som medelvärde \pm standardavvikelse och är baserade på 3 oberoende experiment.

3.2 Inverkan av cytokinbehandling på NK-aktiviteten av PBMC under inkubation

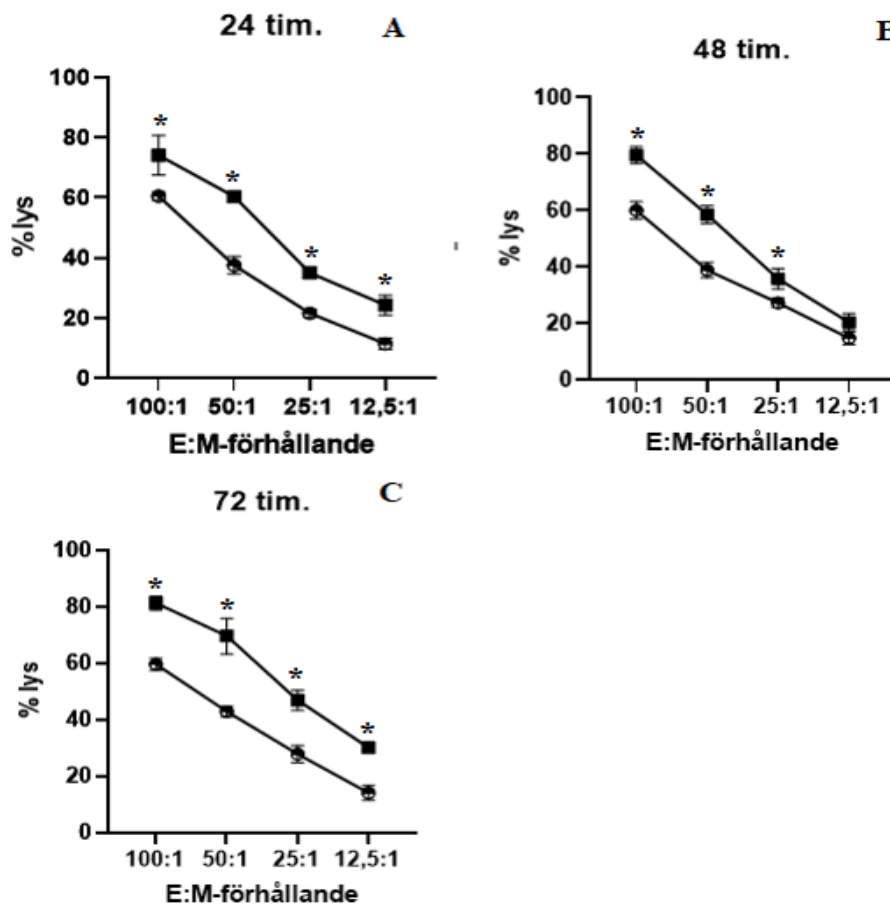
3.2.1 Effekten av IL-2 på NK-aktiviteten av PBMC under inkubation

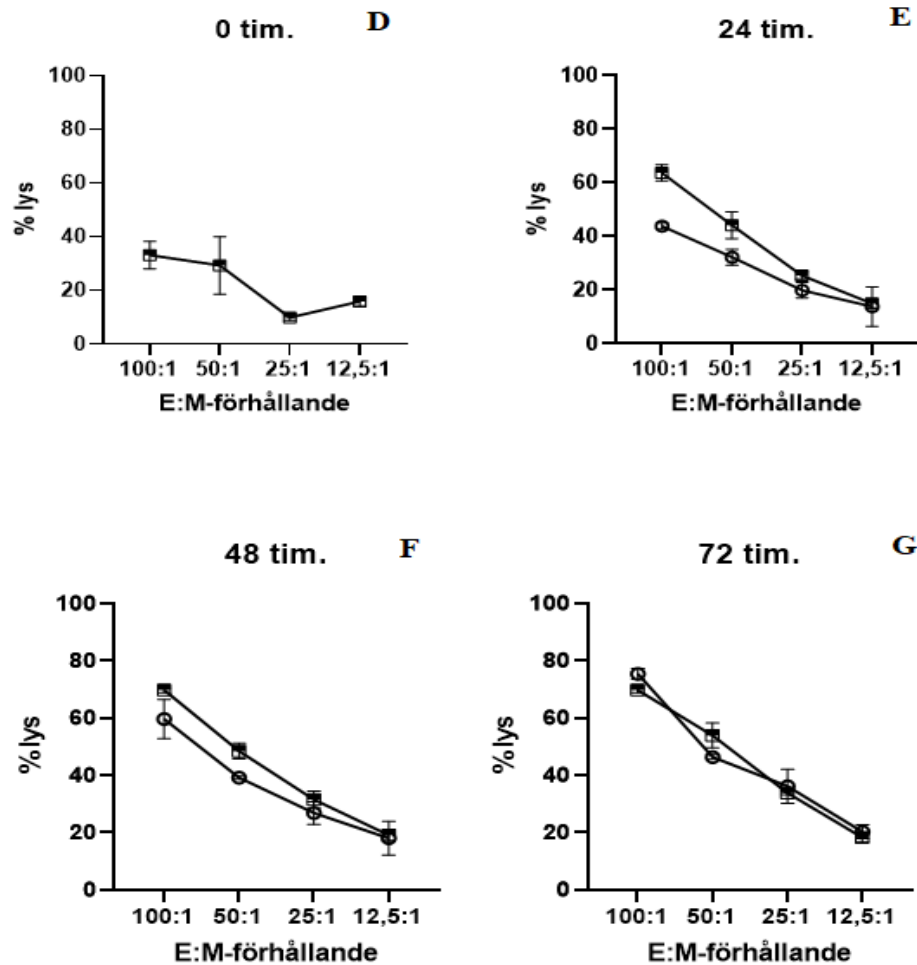
Figur 10 visar cytotoxiciteten av PBMC vid preinkubering i 0–72 timmar. Figur 10 representerar då PBMC var preinkuberade i 50ng/ml IL-2 samt när de var preinkuberade i medium.

Vid 72 timmars preinkubering i IL-2 och E:M-förhållandet 100:1 var cytotoxiciteten av PBMC mot NK-92-celler 59,7 % respektive 75,4 % för medium behandlade PBMC. När effektorcellerna var preinkuberade i 48 timmar visade IL-2 behandlade PBMC en cytotoxisk aktivitet på 60 % respektive 59,7 % för medium behandlade PBMC. 24 timmars preinkubation i IL-2 visade PBMC en cytotoxisk aktivitet på 60,6

% mot NK-92-celler, då preinkubation i medium uppgav en lysis procent på 43,8 %. Även vid låga E:M-förhållanden kan en cytotoxisk aktivitet mot NK-92-celler ses i både medium och IL-2 behandlade PBMC. Vid 24 timmars inkubation och 12,5:1 E:M-förhållanden visar IL-2 preinkuberade PBMC en cytotoxicitet på 11,6 % mot NK-92-celler och 13,8 % då PBMC var preinkuberade i medium. När effektorcellerna preinkuberades i 72 timmar i IL-2 uppnåddes en cytotoxisk aktivitet på 14,1 % när E:M-förhållandet var 12,5:1. Preinkubation i medium under samma tid och förhållanden gav PBMC 20,1 % lyserade målceller med NK-92 som målcell.

Med K562 som målceller gav det en cytotoxisk aktivitet på 74,1 % vid 24 timmar, 80 % vid 48 timmar och 81,2 % då PBMC var preinkuberade i 72 timmar i IL-2. Medium behandlade PBMC visade en NK-aktivitet på 33,0 % vid ingen preinkubation, 63,8 % vid 24 timmar, 69,8 % vid 48 timmar preinkubation och 70,0 % vid 72 timmar preinkubation.



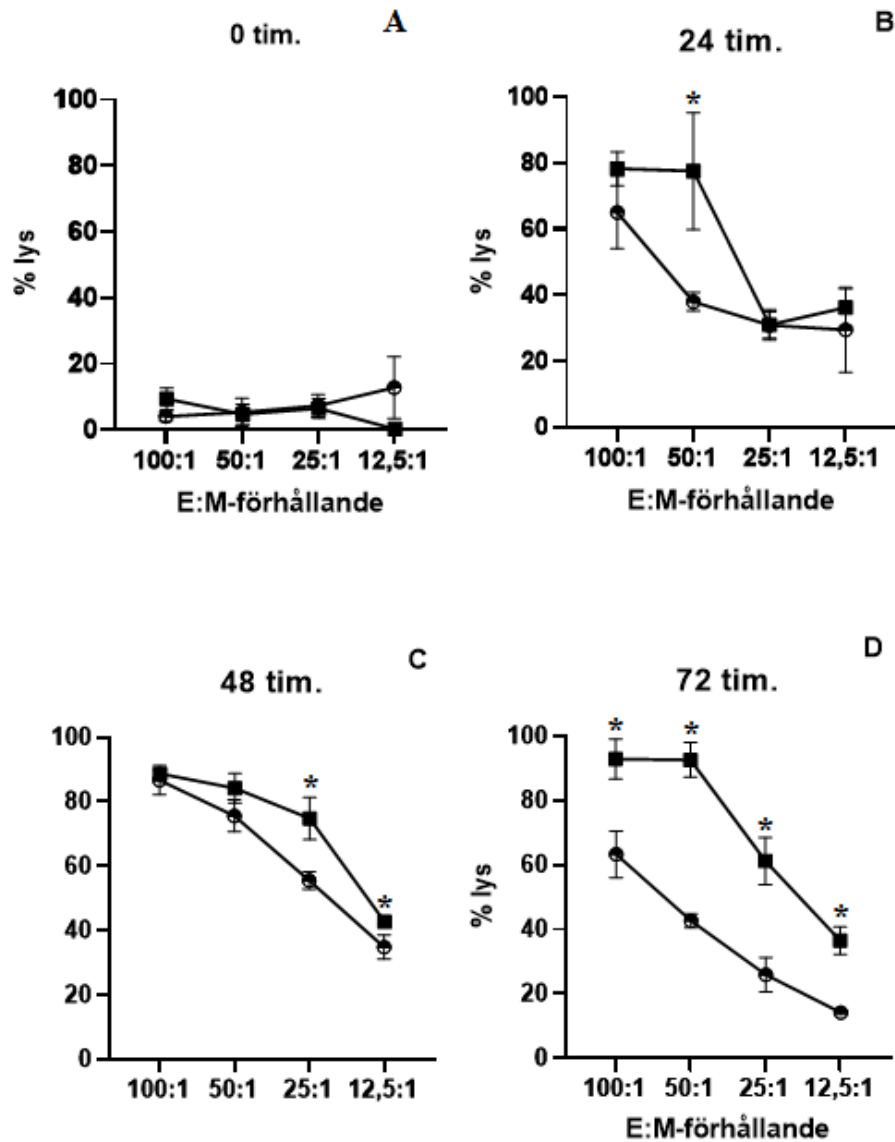


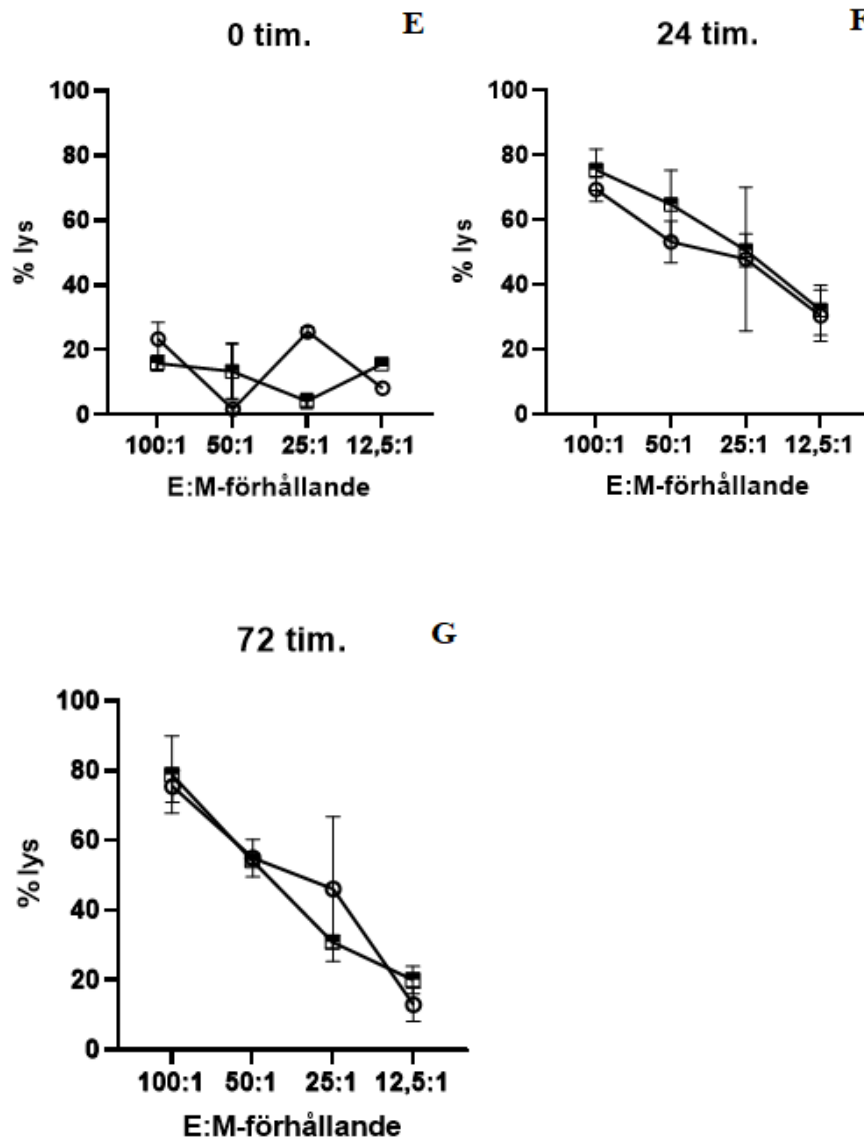
Figur 10: Cytotoxiciteten av IL-2 (A, B, C) och medium (D, E, F, G) behandlade PBMC mot K562- och NK-92-celler vid 0 tim, 24 tim, 48 tim och 72 timmar preinkubation. Representerar ■ medium behandlade PBMC:K562, ○ medium behandlade PBMC:NK-92, ■ representerar IL-12 PBMC:K562 och ● IL-12 PBMC:NK-92. Resultaten är redovisade som medelvärde \pm standardavvikelse. * $p < 0,05$ när K562 jämfördes med NK-92, $n=3$.

3.2.2 Effekten av IL-12 på NK-aktiviteten av PBMC under inkubation

Figur 11 är sammaställd ur experiment när NK-92- och K562-celler fungerade som målceller för IL-12 (50 ng/ml) preinkuberade PBMC. En cytotoxisk aktivitet på 4,00 % vid ingen preinkubation respektive 65,0 % vid 24 timmar och 86,6 % vid 48 timmar vid 100:1 E:M-förhållande. Då effektorcellerna preinkuberades i IL-12 i 72 timmar resulterade det i en procent lys på 63,4 % med NK-92 som målcell. I medium behandlade PBMC var den cytotoxiska aktiviteten mot NK-92-celler 23,3 % då ingen preinkubation skedde, 69,5 % med 24 timmars preinkubation och 75,6 % med 72 timmars preinkubation.

Med K562 som målceller gav det en cytotoxisk aktivitet på 9,40 % vid ingen preinkubation, 78,4 % vid 24 timmar, 88,8 % vid 48 timmar och 92,8 % då PBMC var preinkuberade i 72 timmar i IL-12. Medium behandlade PBMC visade en NK-aktivitet på 16,0 % vid ingen preinkubation, 75,4 % vid 24 timmar och 78,7 % vid 72 timmar preinkubation.





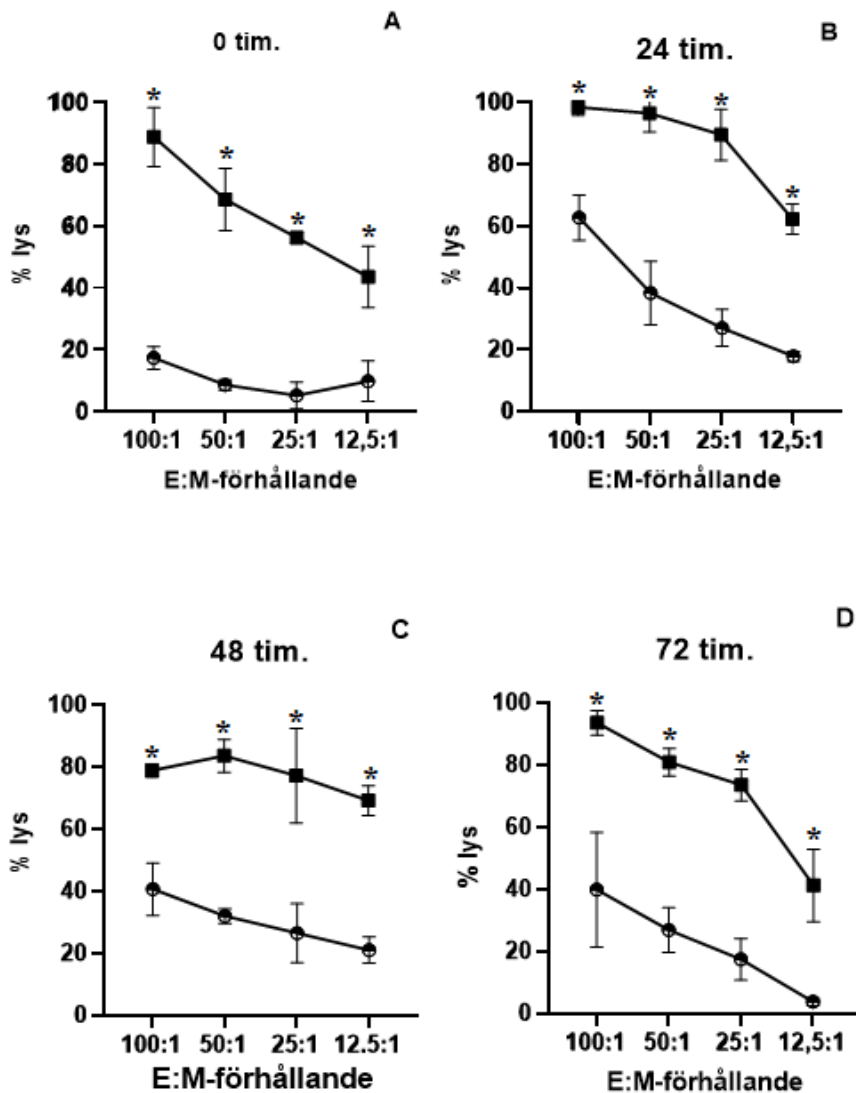
Figur 11: Cytotoxiciteten av IL-12- (A, B, C, D) och medium- (E, F, G) behandlade PBMC mot K562- och NK-92-celler vid 0 tim, 24 tim, 48 tim och 72 timmar preinkubation. Representerar ■ medium behandlade PBMC:K562, ○ medium behandlade PBMC:NK-92, ■ visar IL-12 PBMC:K562 och ● IL-12 PBMC:NK-92. Resultaten är redovisade som medelvärde \pm standardavvikelse. * $p < 0,05$ när K562 jämfördes med NK-92, resultaten är baserade på 3 oberoende experiment.

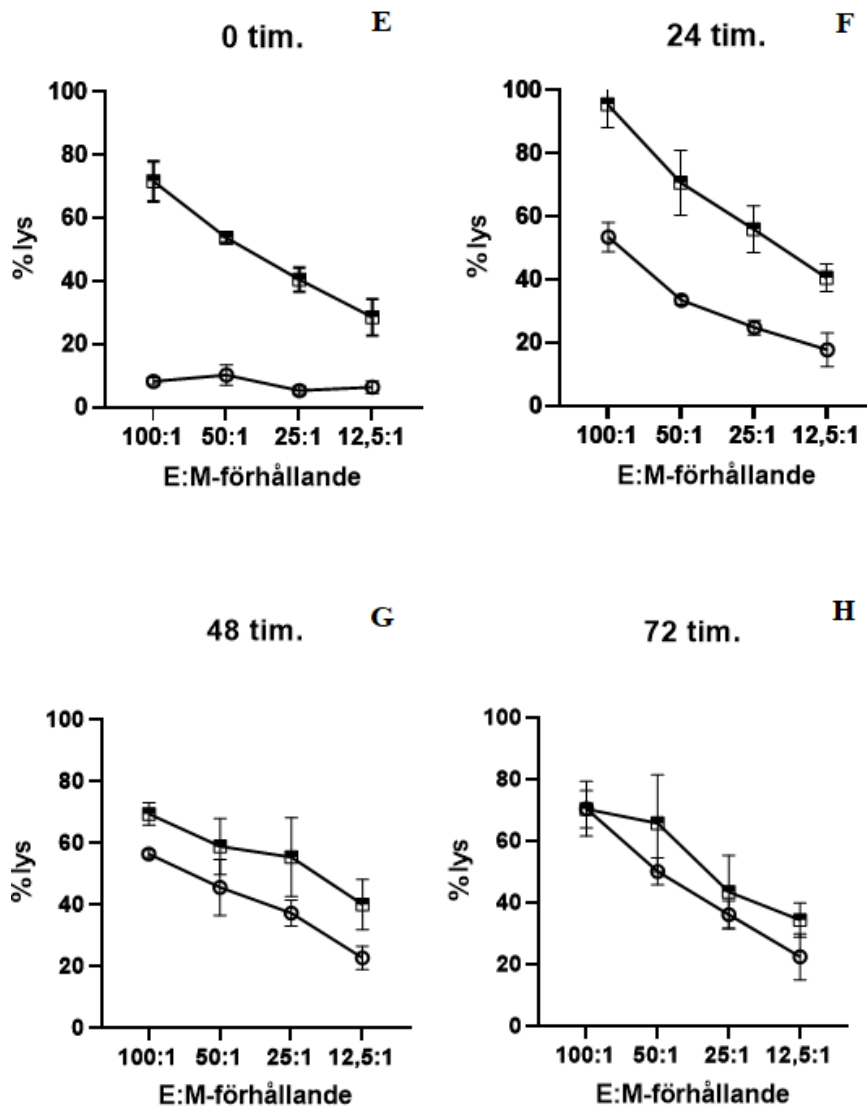
3.2.3 Effekten av IL-15 på NK-aktiviteten av PBMC under inkubation

Figur 12 visar effekten av 50 ng/ml IL-15 på NK-aktiviteten av PBMC. Då NK-92-celler fungerade som målceller visade IL-15 preinkuberade PBMC en cytotoxisk aktivitet på 14,0 % då E:M-förhållandet var 100:1 vid ingen preinkubation respektive 65,0 % vid 24 timmar, 86,6 % vid 48 timmar och 40,0 % vid 72 timmar preinkubation. Samtidigt i medium behandlade PBMC var den cytotoxiska aktiviteten mot NK-92-

celler 8,20 % då ingen preinkubation skedde, 53,5 % med 24 timmars preinkubation, 56,6 % med 48 timmar preinkubation och 70,4 % vid 72 timmar preinkubation.

Då K562 fungerade som målceller uppnåddes en procent lys på 88,8 % vid ingen preinkubation, 98,5 % vid 24 timmar, 78,8 % vid 48 timmar och 93,6% då PBMC var preinkuberade i 72 timmar i IL-15. Medium behandlade PBMC visade en NK-aktivitet på 71,6 % vid ingen preinkubation, 95,5 % vid 24 timmar, 69,2 % vid 48 timmar och 70,3 % vid 72 timmar preinkubation.





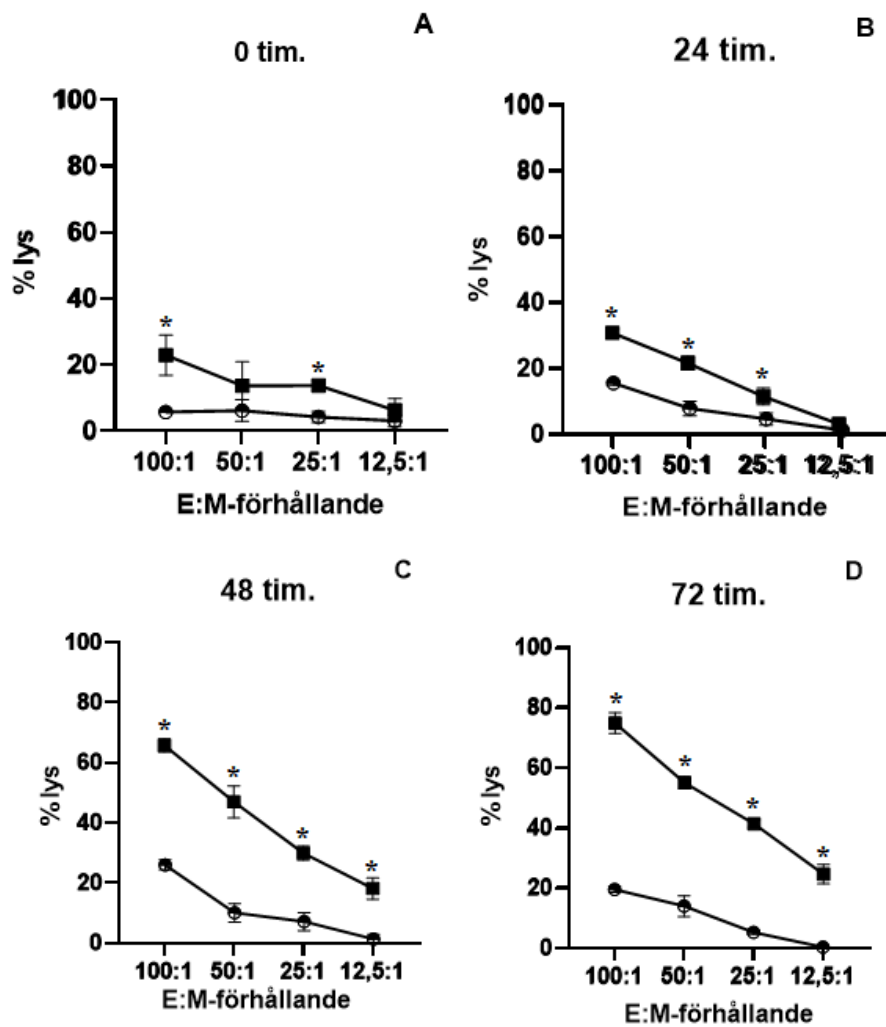
Figur 12: Cytotoxiciteten av 50 ng/ml IL-15- (A, B, C, D) och medium- (E, F, G, H) behandlade PBMC mot K562- och NK-92-celler vid 0 tim, 24 tim, 48 tim och 72 timmar preinkubation. Representerar ■ medium behandlade PBMC:K562, ○ medium behandlade PBMC:NK-92, ■ visar IL-12 PBMC:K562 och ● IL-12 PBMC:NK-92. Resultaten är redovisade som medelvärde \pm standardavvikelse. * $p < 0,05$ då K562 jämfördes med NK-92, resultaten är baserade på 3 oberoende experiment.

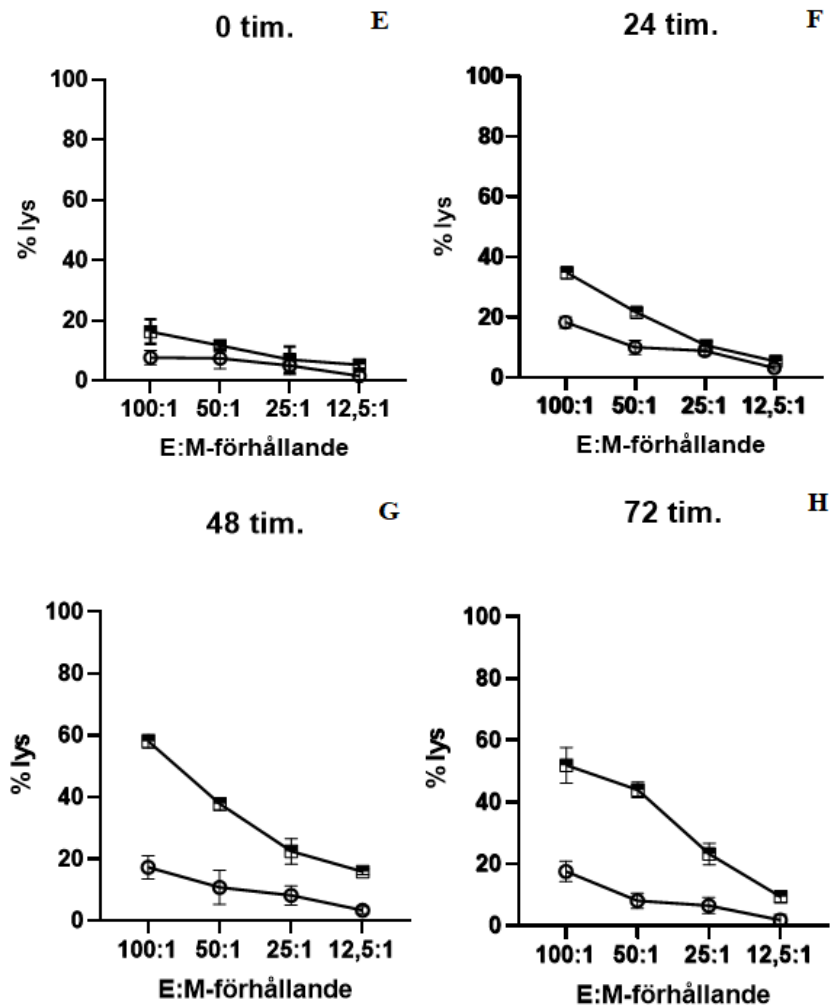
3.2.4 Effekten av IL-21 på NK-aktiviteten av PBMC under inkubation

Figur 13 är sammanställd ur data från experiment med PBMC preinkuberade i 50 ng/ml IL-21 i 0–72 timmar. Den högsta cytotoxiska aktiviteten av mediumbehandlade PBMC som effektorcell och K562 som målcell kunde observeras när effektorcellerna hade preinkuberats i 48 timmar. Cytotoxiska aktiviteten för medium behandlade PBMC mot K562-celler vid E:M-förhållandet 100:1 och 48 timmar preinkubation var 58,2 % respektive 65,8 % när IL-21 behandlade PBMC fungerade som effektorceller.

Medan vid 72 timmar preinkubation i IL-21 visade PBMC en NK-aktivitet på 74,7 % mot K562-celler respektive 52,1 % då PBMC preinkuberades i medium.

Däremot med NK-92 som målceller och 100:1 E:M-förhållande kunde högsta NK-aktiviteten av cytokinbehandlade PBMC ses vid 48 timmar preinkubation med 26,1 % lyserade målceller. Vid samma tid och förhållanden gav mediumbehandlade PBMC 17,2 % lyserade NK-92-celler.



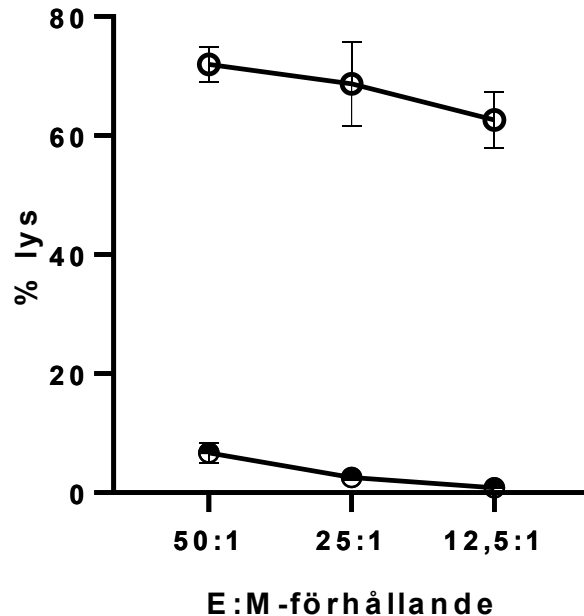


Figur 13: Cytotoxiciteten av IL-21- (A, B, C, D) och medium- (E, F, G, H) behandlade PBMC mot K562- och NK-92-celler vid 0 tim, 24 tim, 48 tim och 72 timmar preinkubation. Representerar ■ medium behandlade PBMC:K562, ○ medium behandlade PBMC:NK-92, ■ visar IL-12 PBMC:K562 och ● IL-12 PBMC:NK-92. Resultaten är redovisade som medelvärde \pm standardavvikelse. * $p < 0,05$ då K562 jämfördes med NK-92, $n = 3$.

3.3 NK-aktiviteten av NK-92 klon 1 och klon 2

Figur 14 presenterar resultat ur experiment med två olika NK-92 kloner som effektorceller och K562 som målcell. En NK-aktivitet på 71,8 % uppnåddes då NK-92 klon 1 användes som effektorcell medan bara en cytotoxisk aktivitet på 5,50 % uppgavs då NK-92 klon 2 fungerade som effektorcell vid 50:1 E:M-förhållanden. Då NK-92 klon 1 användes som effektorcell och K562 som målcell kunde klar cytotoxisk aktivitet ses även vid väldigt låga effektor:målcell-förhållanden. Vid 12,5:1 E:M-förhållande är NK-aktiviteten av klon 2 0,40 % respektive 62,6 % med klon 1 som effektorcell. Då cytotoxiciteten är fastställd kan dessa kloner användas för att fastställa

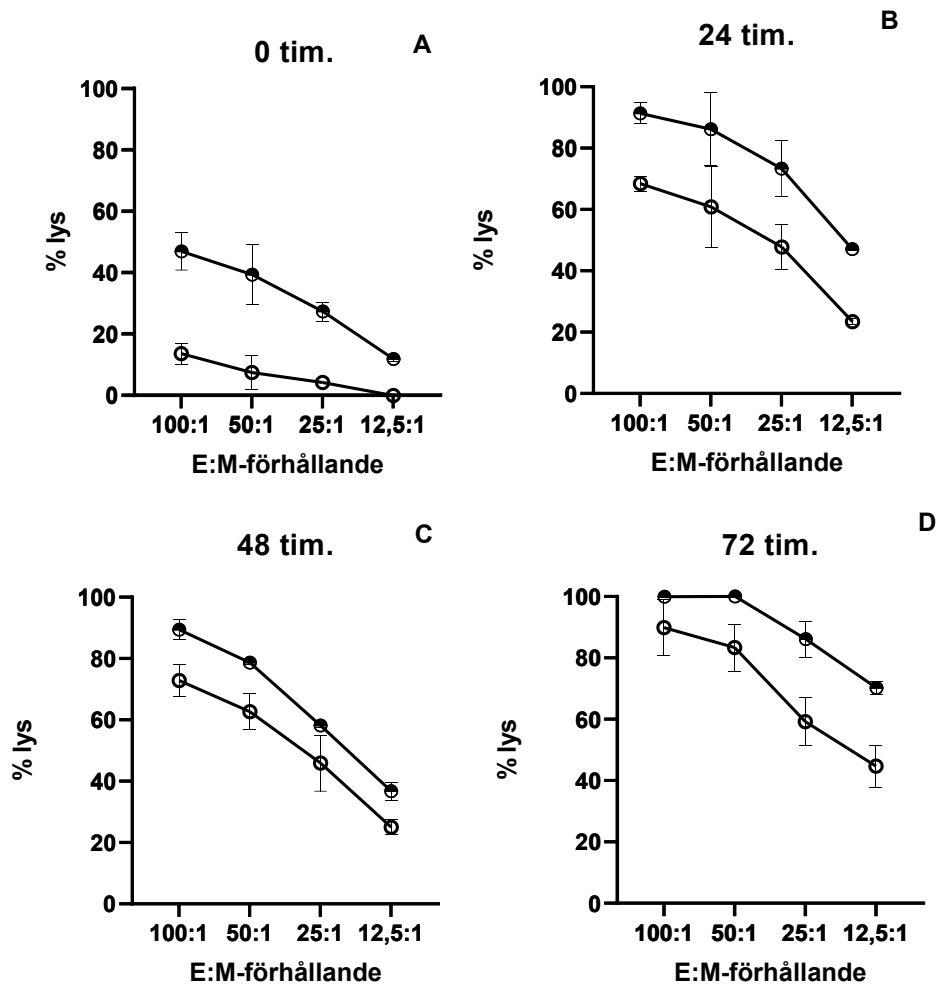
ifall cytotoxiciteten av måcellerna har en effekt på hur mycket de lyseras av effektorceller.



Figur 14: Cytotoxicitetsanalys med NK-92 klon 1 och klon 2 som effektorceller och K562 som måcell. ○ visar NK-92 klon 1:K562 och ● NK-92 klon 2:K562. Resultaten är redovisade som medelvärde ± standardavvikelse och är baserade på 3 oberoende experiment.

3.4 Cytotoxiciteten av medium behandlade PBMC mot NK-92 klon 1 och klon 2

Figur 15 presenterar resultat från experiment med PBMC som effektorceller under varierande preinkuberingstider (0–72 timmar) med de två olika klonerna av NK-92 som måceller. Största skillnaden i NK-aktiviteten av PBMC kan ses då ingen preinkubation skedde och uppgav en cytotoxisk aktivitet på 43,3 % med klon 2 som måcell respektive 13,6 % med NK-92 klon 1 som måcell med E:M-förhållande 100:1. NK-aktiviteten av PBMC mot klon 1 och klon 2 ökar med preinkubation, vid 24 timmar preinkubation och 100:1 E:M förhållande visade PBMC en cytotoxisk aktivitet på 68,3 % mot klon 1 och 91,4 % mot klon 2. När medium behandlade PBMC hade preinkuberats i 72 timmar gav det 89,9 % lys av klon 1 celler respektive 100 % lys av klon 2 celler.



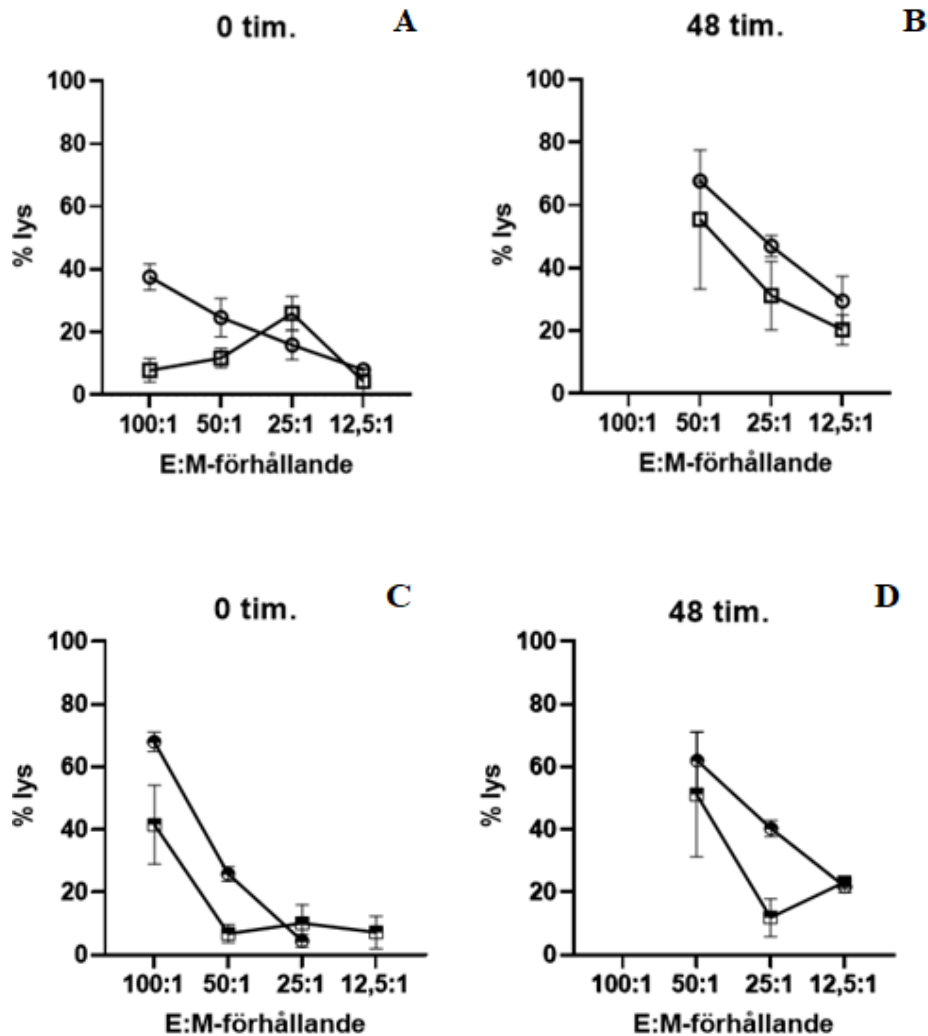
Figur 15: Medium behandlade PBMC förmåga att lysa NK-92 klon 1 (○) och NK-92 klon 2 (●) celler under 0 tim. (A), 24 tim. (B), 48 tim. (C) och 72 timmar (D) preinkubation. Resultaten är redovisade som medelvärde \pm standardavvikelse och är baserade på 3 oberoende experiment.

3.5 Cytotoxiciteten av rena NK-celler mot NK-92 klon 1 och klon 2

Figur 16 är sammaställd ur data från experiment med rena NK-celler mot två NK-92 kloner. När medium behandlade PBMC användes i cytotoxicitetsanalyser direkt efter de var isolerade gav de en cytotoxicitet på 7,90 % mot klon 1 och 37,6 % mot klon 2 med 100:1 E:M-förhållande. Vid 100:1 E:M-förhållande och ingen preinkubation visade de rena NK-cellerna en cytotoxisk aktivitet på 68,1 % mot klon 2 respektive 41,4 % med klon 1 som målcell.

Vid 48 timmars preinkubation uppnådde de rena NK-cellernas en cytotoxicitet på 62,1 % mot klon 2 och 51,1 % mot klon 1. Vid E:M-förhållandet 12,5:1 var lysis procenten av rena NK-celler 21,9 % mot klon 2 respektive 29,6 % med medium

behandlade PBMC. Medan under samma förhållanden med klon 1 som målcell kunde en cytotoxisk aktivitet på 21,9 % ses med renade NK-celler respektive 29,6 % då medium behandlade PBMC fungerade som effektorceller.



Figur 16: Cytotoxicitetsanalyser med medium behandlade PBMC (A, B) och renade NK-celler (C, D) som effektorceller under 0 tim. och 48 timmar. □ visar medium behandlade PBMC: NK-92 klon 1 ○ medium behandlade PBMC: NK-92 klon 2, ■ representerar renade NK-celler: NK-92 klon 1 och ● renade NK-celler: NK-92 klon 2. Resultaten är redovisade som medelvärde \pm standardavvikelse, $n=3$.

4. Diskussion

Från figur 9 kan det ses hur PBMC uppvisar en märkbar NK-aktivitet mot K562- och NK-92-celler, mot YT-celler visar PBMC väldigt låga nivåer av NK-aktivitet. En NK-aktivitet kunde observeras redan vid så låga E:M-förhållanden som 6,25:1. När effektor:målcell-förhållandet ökades så kunde en märkbar ökning i procent lyserade målceller observeras i både NK-92- och K562-analyserna. En lysis procent på 72,2 % då K562 var målceller respektive 34,1 % när NK-92 var målcell uppnåddes vid 100:1 E:M-förhållanden (*fig. 9*). Fastän mängden lyserade K562-celler var nästan tvåfaldig jämfört med NK-92 så är det en hög NK-aktivitet av PBMC som kan observeras mot NK-92-celler.

Cytokinexperimenten (*fig. 10–13*) påvisar data hur medium behandlade PBMC kan lysa både K562- och NK-92-celler under varierande preinkubationstider. PBMC cytotoxiska aktivitet ökar under preinkubation med högsta effekten vid 24–48 timmar för K562-celler och 48–72 timmar för NK-92-celler. Förhöjningen av cytotoxiciteten kan bero på cellulära responser som orsakas då den yttre miljön förändras. I en studie utförd i Christer Lindqvist laboratorie påvisades det att NK-aktiviteten av PBMC ökar mot NK-92-celler efter en tidsperiod mellan 24–48 timmar utan cytokiner, då cytotoxiciteten av PBMC mot K562-celler var hög från början (60). Den fördröjda immunresponserna kan även bero på olika regulatoriska faktorer som är med i den isolerade cellkulturen av vita blodkroppar. Dessa regulatoriska faktorer kan beskrivas som lösliga faktorer, diverse regulatoriska celler, steriska hinder och cell-cell-kontakter.

NK-92-celler anses vara en bra cellinje för CAR-terapi tack vare dess NK-aktivitet och lägre underhållningskostnader än CAR T-celler (61). En studie av (61) påvisade att terapi med CAR NK-92-celler visade varierande resultat då CAR NK-92-celler användes mot patienter med myeloid leukemi. Dessa fas 1 kliniska studier påvisade att när NK-92-celler förekom en längre tid i blodet så minskades koncentrationen CAR NK-92-celler från $7,4 \times 10^3/\text{ml}$ dag ett till $2,9 \times 10^3/\text{ml}$ vid dag fyra. Data ur figur 10 kan förklara varför CAR NK-92-cellernas koncentration sjunker efter administration. Då medium behandlade PBMC visade 43,8 % lyserade NK-92-celler redan vid 24 timmar preinkubation (*fig. 10E*) varefter NK-aktiviteten av PBMC ökade (*fig. 10F, G*). Detta kan vara en orsak varför resultaten av immunoterapier med NK-92-celler som

effektorceller inte varit så imponerande. Det är möjligt att använda CAR YT-celler istället för CAR NK-92-celler när PBMC uppvisar inte lika stor cytotoxisk aktivitet mot YT-celler som NK-92-celler (*fig. 9*).

Då PBMC är preinkuberade i cytokiner såsom IL-15, IL-2, IL-21 och IL-12p70 uppvisar de en förhöjd potential av att lysera K562- och delvis NK-92-celler. I de utförda experimenten kan det observeras att K562-celler lyserades mer effektivt än NK-92-celler oavsett vilken cytokinbehandling effektorcellerna var utsatta för. Behandlingen av isolerade PBMC med cytokiner visar att maximala effekten av cytokinerna uppnås vid 48–72 timmars preinkubation då medium behandlade PBMC visade minst cytotoxicitet. Med hjälp av de ovannämnda cytokinerna kan det vara möjligt att skapa en jämn aktivering av effektorceller under en tidsperiod på 0–72 timmar vilket kan utnyttjas i immunoterapier. Dock uppvisade cytokinbehandlade effektorceller högsta cytotoxiciteten vid 24–48 timmar då NK-92-celler var målceller varefter effekten avtar (*fig. 11B, C*).

Cytokinbehandlingarna gav varierande effekter beroende på vilken cellinje fungerade som målcell. IL-2 behandlade PBMC visade mer cytotoxicitet än medium behandlade mot K562-celler vid alla olika preinkubationstider (*fig. 10*). Medan med NK-92 som målceller visade IL-2 behandlade PBMC lägre cytotoxicitet än medium behandlade vid 72 timmar preinkubation (*fig. 10*). Största skillnaden i lyserade målceller mellan dessa två målceller kunde ses då PBMC var preinkuberad i IL-15 i 72 timmar (*fig. 12D*). Vid E:M-förhållande 100:1 och K562 som målceller uppfattades en cytotoxicitet på 93,6 % medan med NK-92 som målceller vid samma förhållande gav 40 % lyserade NK-92-celler (*fig. 12D*). Att cytokinbehandlingarna har olika effekt beroende på målcellen kan ha sin grund i att det finns olika NK-subpopulationer i PBMC som reagerar olika på cytokinbehandlingarna. Detta fenomen kan även betyda att med hjälp av cytokiner kan kroppsegna NK-cellernas cytotoxicitet styras mot eller bort från antingen K562- eller NK-92 celler vilket skulle kunna utnyttjas i immunoterapier.

NK-92 klonerna gav en unik chans att undersöka huruvida målcellernas cytotoxicitet har en effekt på hur mycket klonerna lyseras av PBMC. Enligt figur 14 framstår det att en klar skillnad mellan cytotoxiciteten av NK-92 klon 2 och klon 1 mot K562-celler uppstod. Denna skillnad kan bero på att NK-92 klon 2 har eller saknar yttre strukturer som är med och reglerar NK-känsligheten mot K562-celler. Den låga cytotoxiciteten

i NK-92 klon 2 kan även bero på att ifall utsöndringen av perforin och granzym B är felaktig kan klon 2 inte utföra sina cytotoxiska egenskaper. Fler undersökningar med NK-92 klon 2 bör utföras för att fastställa orsaken till låg cytotoxicitet mot K562-celler.

Resultaten ur figur 15 visade att PBMC kunde mer effektivt döda NK-92 klon 2 än NK-92 klon 1. Data ur figur 15 kan tyda på att lyseringen av NK-celler genomgår någon slags ytterlig reglering såsom cell-cell-kontakter eller lösliga faktorer för att upprätthålla en balans av cytotoxisk aktiva NK-celler i blodomloppet.

Det är även intressant att största skillnaden i cytotoxiciteten kunde ses när ingen preinkubation av medium behandlade PBMC skedde, 43,3 % lyserade NK-92 klon 2 celler respektive 13,6 % lyserade NK-92 klon 1 (*fig. 15A*). Denna respons av NK-cellerna i PBMC kunde indikera att det är några yttre strukturer som är muterade i NK-92 klon 2 såsom NK-cell aktiverande- eller inhiberande ligander, vilket leder till ökad NK-aktivitet av PBMC. Det är även möjligt att utöver yttre strukturer har NK-92 klon 2 mutationer i intracellulära komponenter. Dessa komponenter kan vara transkriptionsfaktorer som är inhiberade eller överaktiverade. Detta kan leda till förhöjd produktion av antingen inhiberande- eller aktiverande cytokiner som sedan släpps ut från cellen till omgivningen

För att minska på regulatoriska signaler renades NK-celler från isolerade PBMC. När de renade NK-cellerna användes som effektorceller mot de två NK-92 klonerna så dödades klon 2 mer än klon 1 (*fig. 16*). Figur 16 klargör att det är en stor skillnad mellan cytotoxiciteten av renade NK-celler och medium behandlade PBMC mot både klon 2 och klon 1 vid ingen preinkubation (*fig. 16A, C*). Trots det visar det sig att effekten av renade NK-celler avtar vid 48 timmars stadie var medium behandlade PBMC effekt ökar jämfört med ingen preinkubation (*fig 16B, D*). De renade och medium behandlade NK-cellerna uppvisade en signifikant cytotoxiciteten mot klon 2 även vid 12,5 E:M-förhållanden, då en väldigt låg cytotoxicitet observerades mot klon 1.

Renade NK-cellernas cytotoxicitet i förhållande med medium behandlade vid 48 timmars preinkubation ger intressant data. Med hjälp av data ur figur 16 kan det fastslås att medium behandlade PBMC cytotoxicitet förhöjs mer vid inkubation än de renade NK-cellernas. Troligaste orsaken varför renade NK-cellers cytotoxicitet ökar

försumbart under preinkubation jämfört med medium behandlade PBMC är att renade NK-celler behöver de andra regulatoriska cellerna för att bevara sina cytotoxiska egenskaper. Däremot de regulatoriska system som är närvarande i medium behandlade PBMC sänker NK-aktiviteten när ingen preinkubation har skett. Varefter de utsöndrar proinflammatoriska cytokiner/signaler som aktiverar NK-cellerna vid längre preinkubation. Utöver detta kan det konstateras att vid längre preinkubationer ses en förhöjd cytotoxicitet av både renade NK-celler och medium behandlade PBMC mot klon 1 (*fig. 16*).

Preinkubationstider på 0, 24, 48 och 72 timmar ger preliminära data på hur PBMC cytotoxicitet förhåller sig då de är preinkuberade. Utöver det kan ovannämnda experiment ge en inblick huruvida överaktivering av PBMC med cytokiner har en tidsram då cellerna återställer sig, och är kapabla att uttrycka cytotoxiska egenskaper igen. Flera experiment med alla cytokiner som använts i denna avhandling bör utföras då vissa förhållanden saknade data. Detta var på grund av brist på antingen effektor- eller målceller som ledde till att cellerna inte räckte till att utföra analyser med 100:1 E:M-förhållande.

För T-celler är det möjligt att känna igen när de övergår till utmattningsskedet med hjälp av specifika ytmarkörer (62). Med hjälp av att identifiera ytmarkörerna som uttrycks på NK-celler när cellernas cytotoxicitet är nedsänkt kan möjliggöra blockering av dessa receptorer för att uppnå en högre NK-aktivitet. Denna typ av aktivering utnyttjas redan med T-celler då inhibitoriska receptorer såsom PD-1 och CTLA-4 inhiberas och ingen inhibering av T-celler sker. I en studie av (63) föreslås det olika receptorer som möjligtvis aktiveras då NK-cellen är i utmattningsfasen. Att kunna upprätthålla NK-aktiviteten i en längre tid är en viktig hörnsten för att uppnå maximal potential av NK-celler när de används i immunoterapier.

För vidare forskning föreslår jag ytterligare experiment med renade NK-celler för att erhålla mer data under en bredare tidsram än 0 och 48 timmar. Orsaken till att experimenten med renade NK-celler utfördes enbart vid 0 och 48 timmars stadiet var avkastningen renade NK-celler. Avkastningen var låg jämfört med koncentrationen NK-celler som fordrades för cytotoxicitetsanalyser med 100:1 E:M-förhållandet.

Det är även av intresse att forska mer i orsaken för låg cytotoxicitet när ingen preinkubation sker då medium behandlade PBMC fungerar som effektorceller. För att

få en inblick vilka celltyper det är som reglerar medium behandlade PBMC cytotoxicitet borde CD⁴⁺-celler renas. Med dessa experiment kontrolleras det om CD⁴⁺-celler är cellerna som reglerar NK-aktiviteten när PBMC inte har preinkuberats. Förutsatt att CD⁴⁺-celler är de största reglerande faktorerna för NK-aktiviteten kan regulatoriska T-celler isoleras för att vidare karaktärisera orsaken till låg cytotoxicitet av medium behandlade PBMC då ingen preinkubation har skett.

Immunoterapier är ytterst invecklade terapiformer då varje individ har ett unikt immunförsvar som blivit stimulerat på ett visst sätt. Detta leder till att en stor varians i effekten av terapin fås. Ifall bättre förståelse om både aktiverande- och inhiberande faktorer i immunförsvaret erhålls kan detta utnyttjas för att uppnå en önskad respons av immunoterapin i varje individ. Denna typ av manipulering av den enskilda patientens immunförsvar skulle vara en stark grund för nya och ennu bättre cancerterapiformer, som utan tvekan är välkomna.

Användningen av NK-92- och CAR NK-92-celler som effektorceller i immunoterapier bör kanske analyseras noggrannare med tanke på det data som presenterats i denna pro gradu-avhandling.

5. Eventuella tillkännagivanden

Jag vill tacka Christer Lindqvist för möjligheten att få jobba med det jag varit intresserad i flera år. Responsen, handledningen och stödet jag fått i detta projekt har varit ytterst bra. Jag anser att jag har ur detta projekt erhållit ovärderliga kunskaper jag kommer att ha nytta av i framtiden. Utöver det vill jag tacka Christer för förtroende som jag fått under detta projekt. Jag vill även rikta ett stort tack för det stöd jag erhållit av min flickvän Emma, min familj och mina studiekompisar jag har haft chansen att träffa under min studietid.

6. Litteraturförteckning

1. Hansson, G K, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation research*. 2002, Vol. 91, 4.
2. Janeway, C A, et al. *Immunobiology, 5th edition*. New York: Garland Science, 2001.
3. Banchereau J, Steinman R M. *Dendritic cells and the control of immunity* 6673, s.l.: Nature, Nature, 1998, Vol. 392, pp. 245-252.
4. Witko-Sarsat V, Rieu P, et al *Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects*, Nature, 2000, Vol. 80, pp. 617-653.
5. Stone K D, Prussin C, et al *IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils.*, Journal of allergy and Clinical Immunology, 2010, Vol. 125, pp. 73-80.
6. Huang Lu, Appleton J A, *Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes*.10: Trends in parasitology, 2016, Vol. 32.
7. Marcelino D S, Elaine Z, et al *Mast Cell Function.*, Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2014, Vol. 10, pp. 698-738.
8. Woof M J, Burton D R. *Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures*. Nature reviews immunology. 4, 2004, Vol. 2, 89-99.
9. Sinobiological. *Sinobiological*. [Online] [Citat: den 23.2.2021.] <https://www.sinobiological.com/resource/antibody-technical/antibody-structure-function>.
10. Ariotti S, Haanen J B, et al. *Behavior and Function of Tissue-Resident Memory T cells.*: Advances in Immunology, 2012, Vol. 114, pp. 203-216.
11. Mallewaey T, Fontaine J et al *Invariant and Noninvariant Natural Killer T cells exert opposite regulatory functions on the immune response during Murine Schistosomiasis.*.75, Infection and Immunity, 2007, Vol. 5, pp. 2171-2180.
12. Curiel, T J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *The Journal of Clinical Investigation*. 117, 2007, Vol. 5, 1167-1174, pp. 1167-1174.
13. Corthay, A *How do Regulatory T cells Work*. Scandinavian Journal of Immunology, 2009, Vol. 70, pp. 326-336.
14. Nakamura K, Kitani A, et al *Cell Contact-Dependent Immunosuppression by CD4+ cd25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor Beta*. Journal of experimental medicine, 2001, Vol. 194, pp. 629-644.
15. Kieke M C, Shusta EV, et al. *Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 11, 1999, Vol. 96, 5651-5656.
16. Sewell A K. *Why must T cells be cross-reactive*, Nature Reviews Immunology, 2012, Vol. 12, pp. 669-677.

17. Hewitt E W. *The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion*. Immunology. 2003, Vol. 2, pp. 163-169.
18. Greenberg A H. *The origins of the NK cell, or a canadian in King Ivan's court*⁶, Clinical and Investigative Medicine, 1994, Vol. 17, pp. 626-631.
19. Herberman R B, Nunn N E, et al. *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumours*. International Journal of Cancer. 16, 1975, Vol. 2.
20. Abel A M, Chao Y, et al. *Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization*. Frontiers in Immunology. 2018, Vol. 9.
21. Scoville S D, Freud A G, et al. *Modeling human natural killer cell development in the era of innate lymphoid cells*, 2017, Frontiers in Immunology, Vol. 8.
22. Sovren P, Girdhari, L, et al. *The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy*. *Frontiers in Immunology*. 2017, Vol. 8.
23. Pfefferle A, Benedikt J, et al. *Deciphering Natural Killer Cells Homeostasis*, Frontiers in Immunology, 2020, Vol. 11.
24. Osinska I, Popko K, et al. *Perforin: an important player in immune response*, Central European Journal of Immunology, 2014 Vol. 39, pp. 109-115.
25. Afonina I S, Cullen S P, et al. *Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease Granzyme B*: Immunological Reviews, 2010, Vol. 235.
26. Vivier E, Raulet D H, et al. *Innate or adaptive immunity? The example of Natural killer cells*, Science, 2011 Vol. 331, pp. 44-49.
27. Foley B, Felices M, et al. *The biology of NK cells and their receptors affects clinical outcomes after hematopoietic cell transplantation*. Immunology reviews. 2014, Vol. 1, 45-63.
28. French A R, Yokoyama W M, et al. *Natural Killer Cells and Autoimmunity*. Arthritis Research & Therapy, 2003, Vol. 6.
29. Rajalingam, R. *The impact of HLA Class I-specific killer cell immunoglobulin-like receptors on antibody-dependent natural killer cell-mediated cytotoxicity and organ allograft rejection*. Frontiers in Immunology, 2016, Vol. 2.
30. Meazza R, Azzarone B et al. *Role of Common-Gamma Chain Cytokines in NK cell development and function: Perspectives for Immunotherapy*. Journal of Biomedical Biotechnology. 2011.
31. Chester C, Fritsch K et al. *Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy*, Frontiers in Immunology, 2015, Vol. 6.
32. Lozzio C. *Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line with positive Philadelphia Chromosome*. 1975, Blood, Vol. 45, pp. 321-34.

33. Jongen-Lavrencic M, Salesse C, et al. *BCR/ABL-mediated downregulation of genes implicated in cell adhesion and motility leads to impaired migration toward CCR7 ligands CCL19 and CCL21 in primary BCR/ABL-positive cells.* 2005, Nature, Vol. 19, pp. 373-380.
34. Weinberg RA. *The Philadelphia chromosome: A genetic mystery, a lethal cancer, and the improbable invention of a lifesaving treatment.* The Experiment; Reprint Edition, 2014.
35. Martin B K, Chin K, et al. *Induction of MHC class 1 expression by the MHC class 2 transactivator CIITA.* 5, Immunity, 1997, Vol. 6, pp. 591-600.
36. Klingemann H, Boissel L et al. *Natural Killer Cells for Immunotherapy - Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells,* 2016, Frontiers in immunology, Vol. 14.
37. Tonn T, Becker S, et al. *Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell linked NK-92,* Journal of hematotherapy & stem cell research, 2001, Vol. 10, pp. 535-544.
38. Yodoi J, Teshigawara K, et al. *TCGF (IL-2)-receptor inducing factors. Regulation of IL-2 receptor on a natural killer-like cell line (YT cells),* The Journal of Immunology, 1985, Vol. 3, pp. 1623-1630.
39. Harnack U, Johnen H, et al. *Natural Killer Cell Line YT exerts Cytotoxicity Against CD86+ Myeloma cells,* International Journal of Cancer Research and Treatment, 2011 Vol. 31, pp. 475-479.
40. Ming J, An J. *Cytokines, Inflammation and Pain,* International Anesthesiology Clinics, 2009, Vol. 2, pp. 27-37.
41. Liao W, Lin J X, et al. *IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation,* Current Opinion In Immunology, 2011 Vol. 23, pp. 598-604.
42. Ramirez A W, J, et al. *Interleukin-2: Biology, Design and Application,* Trends in Immunology, 2015 Vol. 12, pp. 763-777.
43. Malek T R, Castro I. *Interleukin-2 Receptor Signaling: At the interface between tolerance and immunity.* Immunity, 2010 Vol. 33, pp. 153-165.
44. Vignali D A, Kuchroo V K. *IL-12 family cytokines: immunological playmakers.* Nature Immunology, 2012 Vol. 13, pp. 722-728.
45. Car B.D, Eng VM, et al. *Role of interferon-gamma in interleukin 12-induced pathology in mice,* The American Journal of Pathology, 1995 Vol. 6, pp. 1693-1707.
46. Steel J C, Waldmann T A, et al. *Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer,* Trends in pharmacological science, 2012, Vol. 1, pp. 35-41.
47. Patidar M, Yadav N, et al. *Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy,* Elsevier, 2016, Vol. 31, pp. 49-59.
48. Warren J. L, Wan, C K. *IL-21 Signaling in Immunity,* F1000 Research, 2016 Vol. 5.

49. Kotlarz D, Natalia Z, et al. *Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome*, Journal of Experimental Medicine, 2013, Vol. 210, pp. 433-443.
50. Schoenborn J R, Wilson C B. *Regulation of Interferon- γ during innate and adaptive immune responses*, Advances in Immunology, 2007, Vol. 96, pp. 41-101.
- 51.. Noviek D. *Inferferon- γ receptor*, The Human, 1986, pp. 8483-8487.
52. Subramaniam S, Stansberg C, et al. *The interleukin 1 receptor family*, Developmental and comparative immunology, 2004, Vol. 25, pp. 415-428.
53. Vamosi G, Bodnar A, et al. *IL-2 and IL-15 receptor alpha subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T-cells*, Immunology, 2004 Vol. 101, pp. 11082-11087.
54. Waldmann T A. *The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design*. Nature Reviews Immunology, 2006 Vol. 6, pp. 595-601.
55. Gaillard O, Kapel N, et al. *Time-resolved fluorometry: principles and applications in clinical biology*, Annales de biologie clinique, 1993 Vol. 11, pp. 751-755.
56. Blomberg K, Hautala R, et al. *Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a flourescence enchancing ligand*. Journal of Immunological methods, 1996, Vol. 21, pp. 199-206.
57. Neurauter A A, Bonyhadi M, et al *Cell Isolation and Expansion Using Dynabeads*, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2007, Vol. 106, pp. 41-73.
58. Rodriguez-Gonzalez FG, Mustafa D A M, et al. *The challenge of gene expression profiling in heterogeneous clinical samples*, Methods, 2021, Vol. 1.
59. Pross H F, Maroun, J, A. *The standardization of NK cell assays for use in studies of biological response modifiers*. Journal of Immunological Methods, 1984 Vols. 1-2, pp. 235-249.
60. Bergman H, Sissala N, et al. *Human NK-92 cells function as target cells for human NK cells- Implications for CAR NK-92 therapies*, Anticancer Research, 2020, Vol. 40.
61. Tang X, Yang L, et al. *First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia*, American Journal of Cancer Research, 2018, Vol. 8, pp. 1083-1089.
62. Wei S C, Duffy C R, et al. *Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy*, Cancer discovery, 2018, Vol. 8, pp. 1069-1086.
63. Judge S J, Murphy W J, et al. *Characterizing the dysfunctional NK cell: Assessing the clinical relevance of exhaustion, Anergy, and senescence*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, Vol. 10.