



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsovetenskap

# Jämförande studie av nötkreaturs och grisars NK-celler

*Kajsa Wahlberg Jansson*

*Uppsala  
2016*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2016:85*



# Jämförande studie av nötkreaturs och grisars NK-celler

## Comparative study of natural killer cells in cattle and pigs

*Kajsa Wahlberg Jansson*

**Handledare:** *Caroline Fossum och Magnus Åbrink, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi*

**Examinator:** *Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** grund nivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2016

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

**Delnummer i serie:** 2016:85

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** NK-celler, nötkreatur, gris

**Key words:** NK-cells, cattle, pig

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning.....	3
Material och metoder .....	3
Litteraturoversikt.....	3
Presentation av NK-celler .....	3
NK-cellers roll i immunsystemet .....	3
NK-cellers funktion.....	4
NK-celler i nötkreatur .....	6
Genetik .....	6
Uttryck av molekyler.....	6
NK-celler i praktiken.....	7
NK-celler i gris.....	8
Genetik .....	8
Uttryck av molekyler.....	8
NK-celler i praktiken.....	10
Sammanställning av likheter och skillnader.....	10
Diskussion .....	10
Litteraturförteckning .....	12

## **SAMMANFATTNING**

Natural killer cells (NK-celler) är en viktig del i det medfödda immunsystemet. De har förmågan att lysa celler som inte uttrycker tillräckligt många inhiberande molekyler, däribland histokompatibilitetsmolekyler (eng. major histocompatibility complex, MHC) klass I. Detta gäller framför allt tumörceller och virusinfekterade celler. NK-celler spelar dock en väsentlig roll även i andra infektioner då de är potenta cytokinproducenter och kan initiera och styra ett immunsvaret. NK-cellers svar beror på en balans av flertalet aktiverande och inhiberande signaler. Halten NK-celler är högst i unga djur och de är särdeles viktiga i nyfödda som inte hunnit utveckla ett adaptivt immunsvaret. Det har föreslagits att NK-celler också är inblandade i andra fysiologiska processer än immunförsvaret, däribland dräktighet.

Idisslare och enkelmagade djur skiljer sig åt i flera aspekter. Denna litteraturstudie syftar till att granska likheter och skillnader mellan idisslares och enkelmagade djurs NK-celler på biokemisk och funktionell nivå samt undersöka om resultatet har en praktisk relevans. Modelldjuren för de båda grupperna är nötkreatur respektive gris.

Nötkreaturs och grisars NK-celler påminner mycket om varandra till funktion. Hos gris finns indikationer på att NK-celler kan ha en positiv funktion för en normal dräktighet. Hos nötkreatur verkar de däremot ha en negativ inverkan och orsakar abort.

De olika arternas NK-celler skiljer sig något åt vad gäller vilka ytmolekyler som uttrycks. Grisar har en stor andel NK-celler som inte uttrycker ytmolekylen NKp46. NKp46 används vanligen som markör för NK-celler i nötkreatur då den finns uttryckt på de flesta cellerna. En motsvarande markör har ännu inte identifierats i gris. NK-celler är i båda djurslagen en heterogen grupp. I nötkreatur är heterogeniteten i populationen en följd av stor variation i NK-cellsrelaterade gener. I gris är den en följd av naturlig variation av genuttryck mellan olika NK-celler.

Den största skillnaden i praktiken är reaktionen på infektion med mul- och klövsjuka. Denna infektion inducerar en ökad cytolytisk aktivitet hos nötkreaturs NK-celler. Grisars NK-celler hämmas istället av virusinfektionen. Detta tros spela en roll i skillnaden mellan utsöndring av virus vid sjukdom. Grisar är kraftiga utsöndrare av virus vilket nötkreatur inte är. Sjukdomen är dock mycket smittsam även i nötkreatursbesättningar och samma lagstiftning gäller vid utbrott.

## **SUMMARY**

Natural killer (NK) cells are a vital part of the innate immunity. They have the ability to lyse cells which fail to express enough inhibiting molecules such as major histocompatibility complex (MHC) class I. This is the case of many tumour cells and virally infected cells. NK cells also play a significant role in other infections as they are potent producers of cytokines and can initiate and shape an immune response. The action of NK cells is regulated by a combination of activating and inhibiting signals. NK cell frequencies are higher in young animals and are especially important in neonates which still lack adaptive immunity.

Ruminants and monogastric animals differ in many ways. This literature study aims to examine similarities and differences in biochemistry and function of NK cells in ruminants and monogastric animals as well as investigate any practical relevance the outcome may have. Ruminants are in this report represented by cattle and pigs exemplify monogastric animals.

The function of NK cells is very similar in cattle and pigs. It has been suggested that NK cells are involved in other physiological processes than the immune system, for instance gestation. Indications exist that NK cells may play an assisting role in a normal gestation in pigs. In cattle they seem rather to have a negative impact and may cause abortion.

There are differences between the species regarding which molecules that are present on the surface of the NK cells. A large proportion of NK cells in pigs do not express the receptor NKp46 which in cattle is commonly used as a marker for NK cells because it is expressed on most of them. A matching marker in pigs has not yet been found. In both species NK cells make a diverse group. Diversity in cattle is due to a large variation in NK cells related genes. Heterogeneity in pigs is due to a variation in gene expression between NK cells.

The biggest practical difference is the reaction to an infection with foot-and-mouth disease. This infection induces an increase in the cytolytic activity of NK cells in cattle. The same infection rather impairs the NK response in pigs. This it is believed to play a part in the difference in viral shedding between the two species. Pigs are potent shedders while cattle are not. The disease is still highly contagious in cattle and the same regulations apply in an outbreak.

## INLEDNING

Att idisslare skiljer sig från enkelmagade djur vad gäller digestion är allmän kunskap men hur djurgrupperna skiljer sig på immunologisk nivå är inte lika välkänt. Denna litteraturstudie går därför ut på att jämföra en liten del av immunsystemet, natural killer (NK-) celler, för att se hur lika djurslagen är. Modelldjur för idisslare är nötkreatur och enkelmagade djur representeras av gris. De frågeställningar som ligger till grund är

- Skiljer sig NK-cellers cellbiologi mellan djurslagen? I så fall hur? Vilka cytokiner verkar?
- Skiljer sig NK-cellers funktion mellan djurslagen? Vilka fysiologiska processer är de inblandade i?
- Har skillnader/likheter någon relevans i praktiken? Ska behandling se olika ut? Ska vaccination och adjuvans vara artspecifika?

Natural killer cells är en mångsidig undergrupp av vita blodkroppar. De identifierades på 1970-talet och klassificerades först som cytolytiska effektorceller som kan döda tumörceller och virusinfekterade celler utan specifik immunisering. Detta ledde till namnet. Därefter har de visats både producera cytokiner (Vivier *et al.*, 2011) och ha en viss minnesfunktion (Roelle *et al.*, 2013). NK-celler har en viktig roll i ett tidigt försvar mot en infektion då de initierar och styr immunsvaret mot ett T<sub>h</sub>1-svar. Detta gäller inte bara virusinfektioner utan även parasit- och bakteriella infektioner (Boysen & Storset, 2009).

## MATERIAL OCH METODER

Denna litteraturstudie är baserad på artiklar som hämtades från databaserna Web of Science samt PubMed. Sökorden som användes var cattle OR bovine OR cow\* OR calf, "NK cell\*" OR killer\* och pig OR swine OR porcine i olika kombinationer. Då en del studier om grisars NK-celler handlar om transplantation till människa och det inte kändes relevant begränsades sökningen efterhand till NOT transplan\* och NOT xenograft\* Relevanta referenser från artiklar har också använts. Efter läsning av artiklars abstracts har irrelevanta artiklar sållats bort.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Presentation av NK-celler

#### *NK-cellers roll i immunsystemet*

Natural killer (NK-) celler har en viktig funktion i det medfödda immunförsvaret, då de har en ospecifik cytotoxisk funktion och producerar flertalet viktiga cytokiner. NK-celler är även delaktiga i att sätta igång och forma det adaptiva immunförsvaret, bland annat genom att interagera med dendritiska celler (DC) och leda dessa till att stimulera till ett T-cellssvar med T<sub>h</sub>1-profil (Boysen & Storset, 2009). Även vissa fysiologiska processer underlättas av NK-celler. De har bland annat föreslagits vara viktiga vid dräktighet där de möjligen remodulerar kärlbädden vid placentation (Tekin & Hansen, 2002; Boysen & Storset, 2009).



NK-celler utgör några procent (upp till runt 10 %) av lymfocyterna i blodet, är generellt fler hos unga individer och avtar med åldern (Boysen & Storset, 2009; Gerner *et al.*, 2009). Den höga nivån av NK-celler i unga individer är betydelsefull då de inte har ett fullt utvecklat immunsystem. Det tar ett tag att bilda ett adaptivt svar så de nyföddas enda försvar är därmed maternellt och medfött. I det medfödda immunförsvaret spelar NK-celler en viktig roll då de kan lysa virusinfekterade celler utan en sensitiseringsfas. Nyföddas NK-celler prolifererar snabbt och nivåerna ökar kraftigt under första levnadsveckorna. De verkar också vara mer cytotoxiska än vuxna individers NK-celler (Elh mouzi-Younes *et al.*, 2009).

NK-celler är främst viktiga vid virusinfektioner och tumörer då de karakteriseras av receptorer som binder in till histokompatibilitetsmolekyler (eng. major histocompatibility complex, MHC) och har en inhiberande effekt på NK-cellen. Uppvisar målcellen inte tillräckligt med MHC-molekyler (vilket är fallet med många virusinfektioner och tumörceller) får NK-cellen inte en tillräckligt stark inhiberande signal och den kommer då döda målcellen (Boysen & Storset, 2009). Även aktiverande receptorer finns uttryckta på NK-celler. De reagerar på molekyler som uttrycks av celler vid stress såsom virusinfektion eller höga temperaturer (Guzman *et al.*, 2010). NK-cellens svar kan därför ses som ett samarbete mellan inhiberande och aktiverande receptorer (Patch *et al.*, 2014). De aktiverande receptorerna kräver ofta en omordning av cytoskelettet. De inhiberande tenderar att hindra detta vilket gör att de generellt är överordnade de aktiverande receptorerna (Boysen & Storset, 2009).

### **NK-cellers funktion**

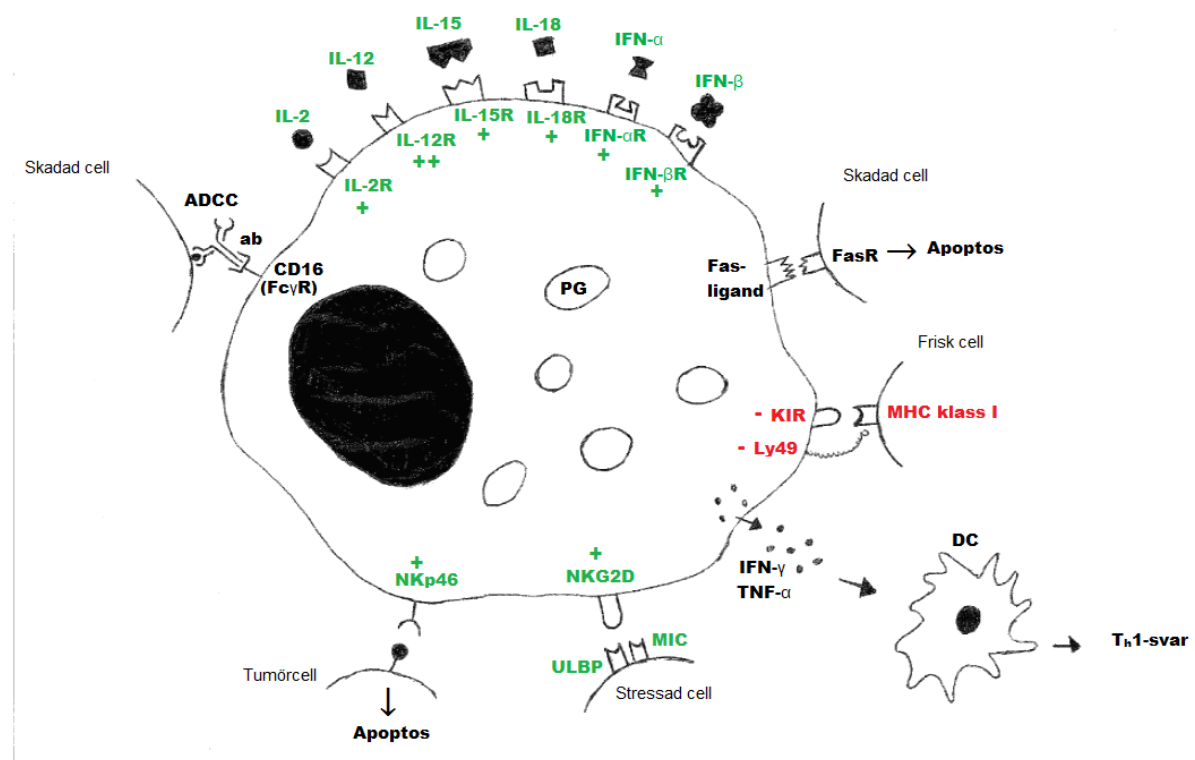
NK-celler kan avdöda målceller på två sätt. Ett sätt är att vid avsaknad av inhiberande molekyler bilda en immunologisk synaps med sitt offer och släppa ut förtillverkade lysosomer med bl.a. granzym och perforin (Denyer *et al.*, 2006; Patch *et al.*, 2014). Perforin är ett protein som bildar porer i målceller vilket leder till ökad membranpermeabilitet och slutligen död (Denyer *et al.*, 2006). Det andra sättet är via fas-ligand-receptorinteraktion vilket ger en apoptosignal till cellen (Screpanti *et al.*, 2005). De kan också binda antikroppar med sin Fc $\gamma$ -receptor CD16 och utföra antikroppsberoende cellmedierad cytotox (ADCC) (Boysen & Storset, 2009). Flertalet cytokiner stimulerar NK-cellers cytotoxicitet däribland interleukinerna (IL-) 2, 12, 15, 18 (Vivier *et al.*, 2011) och de antivirala interferonerna (IFN-)  $\alpha$  och  $\beta$  (Biron *et al.*, 1999).

Cytokinproduktionen sker främst efter stimulering av IL-12 som utsöndras av DC och makrofager efter kontakt med patogener. Även IL-2 och 18 verkar stimulerande på cytokinproduktion och utsöndring (Boysen & Storset, 2009). IL-18 har dock ensam en liten eller ingen stimulerande effekt på NK-celler att producera cytokiner men verkar synergistiskt med IL-12. Det beror troligen på att IL-18 har en uppreglerande effekt på IL-12-receptorn (Domeika *et al.*, 2002). De cytokiner som bildas är framför allt IFN- $\gamma$  och tumörnekrosfaktor (TNF-)  $\alpha$  (Mair *et al.*, 2013; Patch *et al.*, 2014). IFN- $\gamma$  hjälper till att forma T-cellssvaret. Även antiinflammatoriska IL-10, tillväxtfaktorer och kemokiner som IL-8 kan produceras av NK-celler (Vivier *et al.*, 2011). Figur 1 sammanfattar flera viktiga ytmolekyler och deras verkan på

NK-celler.

Även om NK-celler kategoriseras i det medfödda immunförsvaret verkar de ha en egenskap som normalt återfinns hos det adaptiva systemet, nämligen minnesfunktion. Försök har visat att stimulering av NK-celler ger ett bättre skydd vid senare exponering än vad naiva individer har. Minnescellerna verkar uttrycka vissa cellreceptorer som vanliga NK-celler inte gör och de finns kvar i kroppen upp till några månader efter tillfrisknande (Roelle *et al.*, 2013).

Då NK-celler är anpassade till att angripa celler som inte är kroppsegna kan de utgöra ett hot mot embryo och placenta vid dräktighet. NK-aktivitet i dräktiga livmodrar har visats (Tekin & Hansen, 2002). Infektioner med abortorsakande patogener som *Neospora caninum* kan också leda till infiltration av NK-celler i placenta som kan ha en roll i  $T_H1$ -svaret som leder till abort (Boysen & Storset, 2009). Att konceptus inte alltid lyseras kan bero på ökad resistens hos trofoblasterna att motstå angrepp men också att molekyler som hämmar NK-aktivitet utsöndras (Segerson & Beetham, 2000; Tekin & Hansen, 2002).



Figur 1. Sammanställning av ytmolekyler på NK-cellen samt dess funktion.

(Biron *et al.*, 1999; Screpanti *et al.*, 2005; Vivier *et al.*, 2011; Roelle *et al.*, 2013)

NK-celler är än så länge inte väl beskrivna hos våra husdjur då det varit svårt att hitta en specifik markör för dem. Många NK-cellsreceptorer finns på andra celltyper också. Identifiering av cellerna utgår ofta från NK-cellsfunktion och NK-liknande celler har hittats i bl.a. hund, katt, häst, gris, kyckling, får och nötkreatur (Boysen & Storset, 2009).

## **NK-celler i nötkreatur**

Nötkreaturens NK-celler verkar vara en heterogen grupp av stora, granulära lymfocyter. De återfinns, förutom i blodet, i mjälte, lunga, lever, benmärg och lymfknutors paracortex och medulla. NK-cellerna utgör 2-10 % av lymfocyterna i en frisk individ (Boysen & Storset, 2009; Maslanka, 2014). Halten NK-celler är högst i kalvar (Graham *et al.*, 2009) men kan påverkas av medicinering. Icke-steroida antiinflammatoriska läkemedel (eng. non steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) kan öka antalet NK-celler efter en tids behandling medan glukokortikoider kan minska antalet (Maslanka, 2014). Huruvida NK-celler hjälper eller stjälper vid idisslares dräktighet är omdiskuterat. I djurslag med en invasiv placentation, som människa och mus, kan de vara viktiga för att bryta ned moderns vävnad vid bildande av placenta. Detta verkar inte vara fallet för nötkreatur som inte har en lika invasiv placentation (Oliveira *et al.*, 2013).

### **Genetik**

Nötkreatur har en ovanligt stor uppsättning och variation av gener som kodar för receptorer som känner igen MHC klass I, varav de flesta är inhiberande (Dobromylskyj & Ellis, 2007). Dessa gener är duplicerade, dvs finns i flera upplagor, och tillhör två genfamiljer. Den ena familjen är killer cell lectin-like receptor (KLR) (Allan *et al.*, 2015) varav nöt har en, *Ly49*, som är polymorf. Alla varianter tros ha en inhiberande roll på NK-cellen (Dobromylskyj *et al.*, 2009). Den andra är killer immunoglobulin-like receptor (*KIR*) (Dobromylskyj & Ellis, 2007). De flesta icke-primater har få eller inga *KIR*-gener. Nöt är ett undantag och uttrycker minst åtta sådana (sju är inhiberande och en är aktiverande) (Sanderson *et al.*, 2014). Det kan höra ihop med den variation som finns av alleler av MHC klass I. Det finns totalt sex olika MHC klass I-gener och varje individ har mellan en och tre stycken. Vissa MHC-haplotyper förekommer oftare i populationen men om detta är orsakat av en evolutionär fördel eller skett slumpmässigt i en intensiv avel är svårt att säga (Allan *et al.*, 2015). Den stora mångfalden av *KIR*-gener tros däremot vara orsakad av naturlig selektion snarare än avelsarbete då uppsättningen av dessa gener i dagens nötkreatur är mycket lika uroxens (Sanderson *et al.*, 2014).

### **Uttryck av molekyler**

Uttryck av markörer på NK-celler varierar mellan aktiveringsstatus, funktion, ålder och organ men en del av receptorprofilen som sammanknyts med nötkreaturs NK-celler är NKp46<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup>. NKp46 är en starkt aktiverande receptor som tillhör familjen natural cytotoxicity receptors vars ligander ofta återfinns på tumörceller och xenogena celler eller har viralt ursprung (Boysen & Storset, 2009). NKp46 är exklusiv för NK-celler och kan därför ses som en bra markör för dessa (Boysen & Storset, 2009; Graham *et al.*, 2009). Det finns dock en liten andel NK-celler som inte uttrycker NKp46 (Patch *et al.*, 2014). CD2 är ett exempel på en ytstruktur som varierar. De CD2<sup>-</sup> NK-cellerna finns mest i lymfknutor (Boysen & Storset, 2009) och svarar starkare på IL-2 genom att producera mer IFN- $\gamma$ . Den lägre cytokinproducerande

aktiviteten hos CD2<sup>+</sup> är korrelerat med ett ökat uttryck av inhibitoriska receptorer. Däremot är de båda typerna lika cytotoxiska. (Allan *et al.*, 2015) Uttrycket av perforin varierar med åldern. De flesta NK-celler hos nyfödda kalvar är perforin<sup>-</sup> men andelen perforin<sup>+</sup> ökar efter hand (Graham *et al.*, 2009; Talker *et al.*, 2013).

NKG2D-ligander är en grupp molekyler som strukturellt liknar MHC klass I och som presenteras på ytan av celler vid stress såsom värme, infektion, DNA-skada, vävnadsskada eller tumöromvandling. De binder in till receptorn NKG2D på NK-celler och stimulerar till lys av den skadade cellen. De flesta NKG2D har flera möjliga ligander. NKG2D-ligander delas in i två grupper: MHC class I related chains (MIC) och UL16 binding proteins (ULBP). Nötkreatur som population har totalt fyra möjliga MIC-gener. En av dessa gener är gemensam för de flesta individer. Utöver den har de vanligen två av de andra tre. Vilka de två är varierar beroende på MHC-haplotyp (Kasahara & Yoshida, 2012). Nötkreaturs MIC uttrycks enbart i epitel- och endotelceller. Inbindande av MIC till NK-celler leder också till utsöndrande av IFN- $\gamma$  (Guzman *et al.*, 2010). Nöt har flera ULBP-gener, över tio stycken. Det finns stora skillnader mellan raser i hur många gener och i vilken uppsättning de förekommer (Kasahara & Yoshida, 2012).

Aktiverade NK-celler uttrycker i högre grad CD69 vilken saknas på vilande lymfocyter. Nötkreatur har en större mängd aktiverade (definierade som CD69<sup>+</sup>) NK-celler än bl.a människa, möjligen på grund av att de generellt lever i en mindre steril miljö och dessutom har en stor mängd normalflora (Boysen & Storset, 2009). Minnesliknande NK-celler kan uppvisa CD69 efter tillfrisknande (Boysen & Storset, 2009; Lund *et al.*, 2012).

### **NK-celler i praktiken**

NK-cellers förmåga att stimulera både ett tidigt och ett adaptivt immunsvaret är intressant vid vaccinnutveckling. Ett adjuvans som kan stimulera NK-celler skulle på grund av denna förmåga kunna förbättra och ge ett tidigare skydd efter vaccination. NK-celler verkar ha en betydande roll vid reaktionen mot infektion med Bacille Calmette-Guerin, en försvagad *Mycobacterium bovis* som används som vaccin mot tuberkulos. Troligen är detta orsaken till att vaccinet har bättre effekt på unga djur (som har fler NK-celler) än äldre individer (Boysen & Storset, 2009). Det är dock inte alltid utvecklingen av vaccin lyckas lika bra. Ett standardvaccin mot mul- och klövsjuka har visats inte ge en ökad cytolytisk effekt hos NK-cellerna medan en genuin infektion har den effekten. Dvs det avdödade viruset i kombination med aluminiumhydroxid och saponin har inte förmågan att stimulera NK-celler till cytolys som det levande viruset har. Det säger dock inget om NK-cellernas förmåga att forma immunsvaret med cytokinproduktion. Det nuvarande vaccinet ger måttligt skydd efter fyra dagar och fullgott skydd efter sju dagar. Möjligen kunde skyddet gå snabbare om också NK-celler stimulerades och detta bör utredas (Patch *et al.*, 2014).

## NK-celler i gris

Grisar har en låg nivå klassiska cytotoxiska T-celler men desto fler ospecifika cytotoxiska celler, däribland NK-celler (Pintaric *et al.*, 2008). NK-celler i gris är små, täta lymfocyter till skillnad från andra djurslags som är stora och granulära (Yang *et al.*, 1987; Denyer *et al.*, 2006). De utgör 2-10 % av lymfocyterna i en individ och är en mycket heterogen celltyp avseende marköruttryck (Gerner *et al.*, 2009). En förhöjd NK-aktivitet har setts i porcina dräktiga livmödrar jämfört med icke-dräktiga. Grisar har inte en invasiv placentation men en teori om att NK-celler påverkar vaskulariseringen har framförts. Det är dock inte helt utrett (Engelhardt *et al.*, 2002).

## Genetik

Grisen har en *KIR*-gen (Sambrook *et al.*, 2006) och en *Ly49*-gen (Gagnier *et al.*, 2003). Den förra är mycket lik en av nötkreaturens *KIR*-gener (Dobromylskyj & Ellis, 2007). Den senare är fylogenetiskt nära släkt med nörens *Ly49*-gen. Både *KIR* och *Ly49* binder in till MHC klass I men *KIR* binder in till den övre delen av MHC klass I-molekylen och *Ly49* binder in till sidan på molekylen (Dobromylskyj *et al.*, 2009). Grisens har två MIC-gener, varav den ena är en pseudogen, och vad som kunnat visas enbart en ULBP-gen (Kasahara & Yoshida, 2012).

## Uttryck av molekyler

Grisars NK-celler kan definieras som perforin<sup>+</sup>/CD2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD5<sup>-</sup>/CD6<sup>-</sup>/CD8α<sup>+</sup>/CD8β<sup>-</sup>/CD11β<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> (Denyer *et al.*, 2006). En enda selektiv markör finns ej för porcina NK-celler utan det är denna kombination som gäller för identifiering. De kan uttrycka MHC klass II men det finns också NK-celler som inte gör det. Här finns en stor individvariation (Gerner *et al.*, 2009). Vissa cytokiner, t.ex. IFN-α, kan öka uttrycket av MHC klass II vilken vanligen är låg i inaktiva celler (Franzoni *et al.*, 2014). NKp46 som i andra arter är en bra markör för NK-celler fungerar inte på gris. Det finns en stor grupp celler som uttrycker alla de andra karaktäristika för NK-celler men som är NKp46<sup>-</sup>. Förhållandet i blodet verkar vara 50:50 vad gäller NKp46<sup>-</sup>:NKp46<sup>+</sup>-celler (Mair *et al.*, 2012). Det finns dock en markant individuell skillnad. Inget samband mellan ålder och uttryck av NKp46 har kunnat ses (Talker *et al.*, 2013). Populationerna har jämförbar förmåga att lysa exogena celler. Den egenskapen verkar således inte vara beroende av NKp46 i gris. NKp46<sup>+</sup> celler har däremot visats betydligt effektivare på att producera IFN-γ. Tidigare negativa cellpopulationer kan stimuleras till uttryck av NKp46 med IL-2, 12 och 18 (Mair *et al.*, 2012). Det finns försök som utgått från CD16 som en markör för porcina NK-celler (Engelhardt *et al.*, 2002).

Nyfödda grisar verkar ha perforin<sup>+</sup> NK-celler från dag ett vilket tyder på ett cytolytiskt skydd från början. Antalet NK-celler är högst vid vecka 5-7 och avtar sedan (Talker *et al.*, 2013). Då grisars placenta inte tillåter överföring av antikroppar eller immunceller är råmjölken mycket viktig för de nyföddas immunsvar. Den innehåller en del NK-celler precis efter födseln men

halterna sjunker inom några timmar. NK-cellerna i råmjölken visar vissa tecken på att vara aktiverade och kan snabbt skapa ett försvar i kultingen (Hlavova *et al.*, 2014).

Det finns också en tredje distinkt population NK-celler i gris med avseende på NKp46-uttryck. Denna grupp celler uttrycker mycket höga nivåer NKp46. NKp46<sup>hög</sup> återfinns framför allt i mjälten. Även uttrycket av en specifik kemokinreceptor var högt i dessa celler vilket kan tyda på att de är viktiga vid rekrytering av NK-celler till mjälten. Denna grupp verkar extra effektiv på att producera cytokiner som IFN- $\gamma$  samt visar tecken på att vara aktiverade för att utföra cytotox (Mair *et al.*, 2013).

Tabell 1. Likheter och skillnader mellan NK-celler i nötkreatur och gris

	Nöt	Gris
Huvudsaklig funktion i immunsystem	Ospecifik cytotox och cytokinproduktion	Ospecifik cytotox och cytokinproduktion
Andel av lymfocyterna	2-10 % <sup>[1]</sup>	2-10 % <sup>[2]</sup>
Utseende på cellerna	Stora, granulära <sup>[1]</sup>	Små, täta <sup>[3]</sup>
Verksamma cytokiner	IL-2, 12, 15, 18. IFN- $\alpha$ , $\beta$ . <sup>[1]</sup>	IL-2, 12, 18. IFN- $\alpha$ <sup>[4]</sup> <sup>[5]</sup>
Antal <i>KIR</i> -gener (st)	8 <sup>[6]</sup>	1 (lik en av nötkreaturens) <sup>[7]</sup>
Antal <i>KLR</i> -gener (st)	1 <sup>[8]</sup>	1 (fylogenetiskt nära släkt) <sup>[8]</sup>
Anta <i>MIC</i> -gener (st)	4 <sup>[9]</sup>	1 + 1 pseudogen <sup>[9]</sup>
Antal <i>ULBP</i> -gener (st)	>10 <sup>[9]</sup>	1 <sup>[9]</sup>
Uttryck av NKp46	Mycket liten andel NKp46 <sup>-[10]</sup>	Ca 50 % NKp46 <sup>-[5]</sup>
Specifik markör	Ja, NKp46 <sup>[1]</sup>	Nej <sup>[2]</sup>
Främsta producenten av cytokiner	CD2 <sup>-[11]</sup>	NKp46 <sup>+ [5]</sup>
Variation med åldern	Fler NK-celler som ung Nyföddas NK-celler är perforin <sup>-</sup> , ändras med ålder <sup>[12]</sup>	Fler NK-celler som ung Nyföddas är perforin <sup>+</sup> , ändras ej med åldern <sup>[13]</sup>
Respons på mul- och klövsjuka och virusutsöndring	Starkt stimulerade NK-celler Liten utsöndring av virus <sup>[10]</sup>	Hämmar NK-celler <sup>[4]</sup> Kraftig utsöndring av virus <sup>[10]</sup>
Roll i dräktighet	Troligen negativ <sup>[14]</sup>	Kanske positiv, kanske negativ <sup>[15]</sup>

<sup>[1]</sup>(Boysen & Storset, 2009), <sup>[2]</sup>(Gerner *et al.*, 2009), <sup>[3]</sup>(Denyer *et al.*, 2006), <sup>[4]</sup>(Franzoni *et al.*, 2014), <sup>[5]</sup>(Mair *et al.*, 2012), <sup>[6]</sup>(Sanderson *et al.*, 2014), <sup>[7]</sup>(Sambrook *et al.*, 2006), <sup>[8]</sup>(Dobromylskyj & Ellis, 2007), <sup>[9]</sup>(Kasahara & Yoshida, 2012), <sup>[10]</sup>(Patch *et al.*, 2014), <sup>[11]</sup>(Allan *et al.*, 2015), <sup>[12]</sup>(Graham *et al.*, 2009), <sup>[13]</sup>(Talker *et al.*, 2013), <sup>[14]</sup>(Oliveira *et al.*, 2013), <sup>[15]</sup>(Engelhardt *et al.*, 2002)

## **NK-celler i praktiken**

Vissa patogener kan direkt aktivera NK-celler men de flesta verkar göra det via antigenpresenterande celler. Exempelvis infektion med klassisk svinpest aktiverar NK-celler via DC med IFN- $\alpha$ . Även om NK-celler är aktiverade i infektion av klassisk svinpest verkar de inte spela någon direkt roll i det snabba skyddet som fås vid vaccination mot klassisk svinpest. Andra infektioner kan dock hämma NK-celler, bland annat infektion med mul-och klövsjuka (Franzoni *et al.*, 2014). Detta tros ha en del i den höga utsöndring av virus som grisar har vid denna sjukdom (Patch *et al.*, 2014).

## **Sammanställning av likheter och skillnader**

För tydlighetens skull presenteras intressanta likheter och skillnader i tabellform i Tabell 1.

## **DISKUSSION**

Mycket av det som är gemensamt för nötkreaturs och grisars natural killer (NK-) celler verkar också vara gemensamt med andra arter. De har i stort sett samma funktion i immunsystemet, de utgör ungefär lika stor andel av lymfocyterna i djuret och det är liknande cytokiner som verkar. NK-cellerna är i båda djurslagen en mycket heterogen grupp celler (Boysen & Storset, 2009; Gerner *et al.*, 2009). Heterogeniteten orsakas dock av olika saker. Hos nöt är den stora variationen mellan individers aktuella gener som ger en heterogenitet på populationsnivå. Hos gris är det istället variationen i uttrycket av markörer som ger en heterogenitet på cellpopulationsnivå.

Skillnaden är stor mellan grisar och nötkreaturs NK-celler på gennivå. Nötkreatur har en stor variation mellan sina många aktuella gener medan grisar har få än så länge identifierade varianter. Här sällar sig grisarna till de flesta andra arter medan nötkreaturen är avvikande tillsammans med primater som också visats ha en stor uppsättning och variation i NK-gener. En bakomliggande faktor till detta som de flesta undersökta studier diskuterat är den stora variationen i MHC klass I hos nötkreatur men vad denna variation är orsakad av avhandlas ej. (Dobromylskyj & Ellis, 2007; Dobromylskyj *et al.*, 2009; Kasahara & Yoshida, 2012; Sanderson *et al.*, 2014) Inte heller att grisars NK-celler är små och täta (Denyer *et al.*, 2006) jämfört med många andra djurslags stora och granulära och eventuell orsak eller konsekvens av det har diskuterats i den studerade litteraturen.

Uttrycket av perforin skiljer mellan arterna. Grisar uttrycker perforin redan vid födseln (Talker *et al.*, 2013) medan andelen perforin<sup>+</sup> NK-celler är lägre i kalvar yngre än 6 veckor än vuxna nötkreatur (Graham *et al.*, 2009). Perforinuttryck indikerar aktiv cytotoxisk funktion (Denyer *et al.*, 2006). Skillnaden kan då tolkas som att grisars NK-celler är aktiverade redan tidigt i livet men kalvars däremot inte är lika effektiva. I Graham *et als* (2009) studie som konstaterade att en stor andel NK-celler hos mycket unga djur är perforin<sup>-</sup> visades också att dessa uttryckte högre nivåer av NKp46 än vuxnas perforin<sup>+</sup> NK-celler. NKp46 är även den en markör för cytotoxisk aktivitet så möjligen kan NKp46<sup>+</sup> celler i unga djur kompensera för bristen på perforin<sup>+</sup> celler. Detta överensstämmer med en studie gjord av Elhmouzi-Younes *et al.* (2009) som konstaterade att NKp46-medierad cytotoxisk aktivitet var högre i nyfödda kalvars NK-celler än i äldres (4-10 månader gamla).

En parallell som kan dras är mellan nötkreaturs CD2<sup>-</sup> NK-celler som är den främsta IFN- $\gamma$ -producenten och NKp46<sup>+</sup> som har samma position i gris (Mair *et al.*, 2012). Utöver detta skiljer sig inte funktionen mellan djurslagen markant. Eventuellt är NK-celler viktiga i dräktighet på gris (Engelhardt *et al.*, 2002) men inte på nöt. Utebliven hämning av NK-celler verkar snarare kunna orsaka spontan abort på nötkreatur (Oliveira *et al.*, 2013). Om en liknande funktion finns i gris skulle detta eventuellt kunna vara en orsak till minskade griskullar. Frågan är då om det är aktuellt med en NK-hämmande terapi för att öka storleken på kullarna.

Skillnaden i reaktion på mul- och klövsjuka gör troligen att grisar är värre smittspridare än nöt (Patch *et al.*, 2014) men eftersom den ändå är mycket smittsam på nöt och den lyder under epizootilagen på båda djurslagen (SJVFS 2006:10, SFS 1999:657) ger det inte någon praktisk skillnad i Sverige. Möjligen att man ska vara något hårdare med hygienreglerna på en grsigård. Vacciner vars effekt delvis vilar på NK-cellsaktivering bör ges till unga djur eftersom de är mer mottagliga med sina höga halter NK-celler (Boysen & Storset, 2009). Sammanfattningsvis kan sägas att även om det finns artskillnader är de inte väldigt avgörande i praktiken.



## LITTERATURFÖRTECKNING

- Allan, A. J., Sanderson, N. D., Gubbins, S., Ellis, S. A. & Hammond, J. A. (2015) Cattle NK Cell Heterogeneity and the Influence of MHC Class I. *Journal of Immunology*, 195: 2199-2206.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. (1999) Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*, 17: 189-220.
- Boysen, P. & Storset, A. K. (2009) Bovine natural killer cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 130: 163-177.
- Denyer, M. S., Wileman, T. E., Stirling, C. M. A., Zuber, B. & Takamatsu, H. H. (2006) Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of Natural Killer, Cytotoxic T, Natural Killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110: 279-292.
- Dobromylskyj, M. & Ellis, S. (2007) Complexity in cattle *KIR* genes: transcription and genome analysis. *Immunogenetics*, 59: 463-72.
- Dobromylskyj, M. J., Connelley, T., Hammond, J. A. & Ellis, S. A. (2009) Cattle *Ly49* is polymorphic. *Immunogenetics*, 61: 789-95.
- Domeika, K., Berg, M., Eloranta, M. L. & Alm, G. V. (2002) Porcine interleukin-12 fusion protein and interleukin-18 in combination induce interferon-gamma production in porcine natural killer and T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 86: 11-21.
- Elhmozi-Younes, J., Storset, A. K., Boysen, P., Laurent, F. & Drouet, F. (2009) Bovine neonate natural killer cells are fully functional and highly responsive to interleukin-15 and to NKp46 receptor stimulation. *Veterinary Research*, 40:54
- Engelhardt, H., Croy, B. A. & King, G. J. (2002) Evaluation of natural killer cell recruitment to embryonic attachment sites during early porcine pregnancy. *Biology of Reproduction*, 66: 1185-1192.
- Franzoni, G., Edwards, J. C., Kurkure, N. V., Edgar, D. S., Sanchez-Cordon, P. J., Haines, F. J., Salguero, F. J., Everett, H. E., Bodman-Smith, K. B., Crooke, H. R. & Graham, S. P. (2014) Partial Activation of Natural Killer and gamma delta T Cells by Classical Swine Fever Viruses Is Associated with Type I Interferon Elicited from Plasmacytoid Dendritic Cells. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21: 1410-1420.
- Gagnier, L., Wilhelm, B. T. & Mager, D. L. (2003) *Ly49* genes in non-rodent mammals. *Immunogenetics*, 55: 109-115.
- Gerner, W., Kaeser, T. & Saalmueller, A. (2009) Porcine T lymphocytes and NK cells - An update. *Developmental and Comparative Immunology*, 33: 310-320.
- Graham, E. M., Thom, M. L., Howard, C. J., Boysen, P., Storset, A. K., Sopp, P. & Hope, J. C. (2009) Natural killer cell number and phenotype in bovine peripheral blood is influenced by age. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132: 101-108.
- Guzman, E., Birch, J. R. & Ellis, S. A. (2010) Cattle MIC is a ligand for the activating NK cell receptor NKG2D. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 136: 227-234.
- Hlavova, K., Stepanova, H. & Faldyna, M. (2014) The phenotype and activation status of T and NK cells in porcine colostrum suggest these are central/effector memory cells. *Veterinary Journal*, 202: 477-482.
- Kasahara, M. & Yoshida, S. (2012) Immunogenetics of the NKG2D ligand gene family. *Immunogenetics*, 64: 855-67.

- Lund, H., Boysen, P., Dean, G. A., Davis, W. C., Park, K. T. & Storset, A. K. (2012) Interleukin-15 activated bovine natural killer cells express CD69 and produce interferon-gamma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 150: 79-89.
- Mair, K. H., Essler, S. E., Patzl, M., Storset, A. K., Saalmueller, A. & Gerner, W. (2012) NKp46 expression discriminates porcine NK cells with different functional properties. *European Journal of Immunology*, 42: 1261-1271.
- Mair, K. H., Muellebner, A., Essler, S. E., Duvigneau, J. C., Storset, A. K., Saalmueller, A. & Gerner, W. (2013) Porcine CD8 alpha(dim<sup>-</sup>) NKp46(high) NK cells are in a highly activated state. *Veterinary Research*, 44:13
- Maslanka, T. (2014) Effect of dexamethasone and meloxicam on counts of selected T lymphocyte subpopulations and NK cells in cattle -In vivo investigations. *Research in Veterinary Science*, 96: 338-346.
- Oliveira, L. J., Mansourri-Attia, N., Fahey, A. G., Browne, J., Forde, N., Roche, J. F., Lonergan, P. & Fair, T. (2013) Characterization of the Th Profile of the Bovine Endometrium during the Oestrous Cycle and Early Pregnancy. *PLoS ONE* 8:e75571. doi:10.1371/journal.pone.0075571
- Patch, J. R., Dar, P. A., Waters, R., Toka, F. N., Barrera, J., Schutta, C., Kondabattula, G. & Golde, W. T. (2014) Infection with foot-and-mouth disease virus (FMDV) induces a natural killer (NK) cell response in cattle that is lacking following vaccination. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 37: 249-257.
- Pintaric, M., Gerner, W. & Saalmueller, A. (2008) Synergistic effects of IL-2, IL-12 and IL-18 on cytolytic activity, perforin expression and IFN-gamma production of porcine natural killer cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121: 68-82.
- Roelle, A., Pollmann, J. & Cerwenka, A. (2013) Memory of Infections: An Emerging Role for Natural Killer Cells. *Plos Pathogens*, 9:e1003548. doi:10.1371/journal.ppat.1003548
- Sambrook, J. G., Sehra, H., Coggill, P., Humphray, S., Palmer, S., Sims, S., Takamatsu, H.-H., Wileman, T., Archibald, A. L. & Beck, S. (2006) Identification of a single killer immunoglobulin-like receptor (*KIR*) gene in the porcine leukocyte receptor complex on chromosome 6q. *Immunogenetics*, 58: 481-486.
- Sanderson, N. D., Norman, P. J., Guethlein, L. A., Ellis, S. A., Williams, C., Breen, M., Park, S. D. E., Magee, D. A., Babrzadeh, F., Warry, A., Watson, M., Bradley, D. G., MacHugh, D. E., Parham, P. & Hammond, J. A. (2014) Definition of the Cattle Killer Cell Ig-like Receptor Gene Family: Comparison with Aurochs and Human Counterparts. *Journal of Immunology*, 193: 6016-6030.
- Screpanti, V., Wallin, R. P. A., Grandien, A. & Ljunggren, H. G. (2005) Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Molecular Immunology*, 42: 495-499.
- Segerson, E. C. & Beetham, P. K. (2000) A porcine intrauterine 4-MDa component with transforming growth factor-beta activity suppresses natural killer cell responses. *Journal of Animal Science*, 78: 1900-1906.
- Talker, S. C., Kaeser, T., Reutner, K., Sedlak, C., Mair, K. H., Koinig, H., Graage, R., Viehmann, M., Klingler, E., Ladinig, A., Ritzmann, M., Saalmueller, A. & Gerner, W. (2013) Phenotypic maturation of porcine NK- and T-cell subsets. *Developmental and Comparative Immunology*, 40: 51-68.
- Tekin, S. & Hansen, P. J. (2002) Natural killer-like cells in the sheep: Functional characterization and regulation by pregnancy-associated proteins. *Experimental Biology and Medicine*, 227: 803-811.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M. & Ugolini, S. (2011) Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*, 331: 44-49.
- Yang, W. C., Schultz, R. D. & Spano, J. S. (1987) ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PORCINE NATURAL-KILLER (NK) CELLS. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 14:

345-356.