

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Veronika Bílková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Úloha povrchových molekul NK buněk při rozpoznání nádoru
Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Role of Natural Killer surface molecules in recognition of tumour
Bachelor Thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Bílková**
Osobní číslo: **C17144**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Úloha povrchových molekul NK buněk při rozpoznání nádoru**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

V dostupné odborné literatuře se seznámte s buňkami – přirozenými zabíječi (NK) a jejich úloze v protinádorové obraně organismu a zpracujte rešerši. Zařadte NK buňky do širšího kontextu obranných reakcí imunitního systému proti nádorům.

Popište receptory NK buněk, jejich funkci, strukturu a ligandy. Uveďte metodiky, kterými jsou tyto receptory studovány.

Popište mechanismy odolnosti nádorových buněk vůči cytotoxicitě NK buněk.

Existují dnes možnosti imunoterapií využívající NK buněk a jejich aktivity?

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Seznam doporučené literatury:

Literatura mladší 10 let Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Práci s názvem Úloha povrchových molekul NK buněk při rozpoznání nádoru jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 12.7.2021

Veronika Bílková v. r. 2021

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Mgr. Marcele Slovákové, PhD. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při psaní bakalářské práce a vstřícnost a ochotu v průběhu celého studia.

Taktéž děkuji své rodině za podporu, motivaci a za umožnění studia na Univerzitě Pardubice.

ANOTACE

V bakalářské práci je vypracována literární rešerše zaměřená na buňky přirozených zabíječů (NK), jejich úlohu v imunitním systému a interakci s ostatními částmi imunitního systému. Dále jsou popsány receptory NK a jejich ligandů, způsob, jak jsou receptory studovány a také způsob, jakým nádorové buňky odolávají cytotoxicitě NK buněk. v závěru práce je uvedeno využití NK buněk v imunoterapii.

KLÍČOVÁ SLOVA

NK buňky, rozpoznávání, povrchové molekuly, protinádorová terapie

TITLE

Role of Natural Killer surface molecules in recognition of tumour

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on natural killer (NK) cells, their role in the immune system, and interactions with other parts of the immune system. This is followed by a description of NK receptors and their ligands, methods, how these receptors are studied, and the methods how tumour cells resist cytotoxicity of NK cells. Finally, the use of NK cells in immunotherapy is described.

KEYWORDS

NK cells, detection, surface molecules, antitumor treatment

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	11
SEZNAM TABULEK	12
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	13
ÚVOD	15
1. Úloha NK buněk v imunitním systému	16
1.1. Vývoj NK buněk	16
1.2. Aktivace NK buněk	17
1.3. Mechanismy NK buněk	17
1.4. Interakce NK buněk s ostatními částmi imunitního systému	18
1.4.1. Interakce NK buněk s nespecifickou imunitou	19
1.4.2. Interakce NK buněk s T lymfocyty	20
1.4.3. Interakce NK buněk s B lymfocyty	23
1.5. Ochrana před autoreaktivitou NK buněk	23
1.6. Paměťové NK buňky	24
2. Receptory NK buněk	26
2.1. Receptory stimulační	26
2.1.1. Receptory spojené s molekulami na bázi ITAM	26
2.1.2. Receptor NKG2D (CD 314)	27
2.1.3. Receptory SLAM	27
2.1.4. Ostatní aktivační receptory	27
2.2. Receptory inhibiční	27
2.2.1. Receptory na bázi ITIM	27
2.2.2. Receptory na bázi ITSM	28
2.2.3. Receptory inhibiční C-lektinové	28
2.3. Checkpoint receptory	28
2.4. Chimérické antigenní receptory	29
3. Metody studia receptorů NK buněk	30
3.1. Průtoková cytometrie	30
3.2. Imunomagnetická separace NK buněk	31
3.3. Pokročilé materiály a zařízení pro studium NK buněk	32
3.3.1. Lipidová dvojvrstva se zabudovanými ligandy	33
3.3.2. Ligandy ukotvené na vzoru nanodotů	33
3.3.3. Ligandový mikrovzor	34

3.3.4.	Zařízení pro zachycení a řízení pohybu NK buněk	36
3.3.5.	Nanomateriály interagující s NK buňkami ve 3D prostoru.....	37
3.3.6.	Zařízení pro studii mechanické aktivity NK buněk.....	37
4.	Izolace NK buněk	39
4.1.	Izolace a expanze NK buněk pomocí zařízení CliniMACS.....	39
4.2.	Izolace NK buněk z PBMC.....	40
4.3.	Izolace buněk z pupečnickové krve	41
5.	Odolnost nádorových buněk proti cytotoxicitě NK buněk	43
5.1.	Missing-self rozpoznávání	43
5.2.	Rozpoznávání vyvolané buněčným stresem	43
5.3.	Nádorové antigeny	43
5.3.1.	Specifické nádorové antigeny.....	44
5.3.2.	Antigeny asociované s nádory.....	44
5.4.	Mechanismy nádorové obrany	45
6.	Příklady použití NK buněk v protinádorové imunoterapii	48
6.1.	Adoptivní terapie.....	48
6.2.	Terapie haploidentickou transplantací krvetvorných buněk proti leukémii.....	50
6.3.	Terapie monoklonálními protilátkami inhibujícími checkpoint receptory v NK buňkách.....	52
	ZÁVĚR	54
	POUŽITÁ LITERATURA	55

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1: Stádia Vývoje NK buněk[4]	17
Obr. 2: Interakce nespecifických lymfocytů[11]	19
Obr. 3: Model propojení specifické a nespecifické imunity během místního zánětu závislý na IL-2[11].....	22
Obr. 4: Pokročilé materiály a zařízení pro studium a regulaci NK buněk[32]	32
Obr. 5: Schematický přehled automatizovaného procesu pro separaci a expanzi dárcovských NK buněk pomocí CliniMACS Prodigy[41]	40

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Regulace T lymfocytů NK buňkami[16].....	21
---	----

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADCC – cytotoxická reakce závislá na protilátkách, z angl. antibody dependent cellular cytotoxicity

CAR – chimérický antigenní receptor, z angl. chimeric antigen receptor

CD – diferenční skupina, z angl. cluster of differentiation

CHS – haptinem indukovaná kontaktní hypersenzitivita, z angl. hapten contact hypersensitivity

CLP – běžný lymfoidní progenitor, z angl. common lymphoid progenitor

DC – dendritické buňky, z angl. dendritic cell

GvHD – reakce štěpu proti hostiteli, z angl. Graft versus Host Disease

GvL – štěp proti leukémii, z angl. Graft versus Leukemia

HLA – hlavní lidský antigen

HSCT – haploidická transplantace krvetvorných buněk, z angl. Hematopoietic Stem Cell Transplantation

IFN – interferon

IL – interleukin

ILC – vrozená lymfoidní buňka, z angl. innate lymphoid cells

ITAM – aktivační receptory na tyrosinové bázi, z angl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM – inhibiční receptory na tyrosinové bázi, z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

ITSM – imunoreceptorový switch motif na tyrosinové bázi, z angl. immunoreceptor tyrosine-based switch motif

KAR – stimulační receptory, z angl. killer activation receptors

KIR – inhibiční receptory NK buněk, z angl. killer immunoglobulin-like receptor

LAG – lymfocytový aktivační gen

mAb – monoklonální protilátky z angl. monoclonal antibodies

MDSC – supresorové buňky zbavené myeloidů, z angl. myeloid-derived suppressor cells

MHC gp I – hlavní histokompatibilitní komplex glykoproteinové třídy I, z angl. major histocompatibility complex

MICA/MICB – Sekvence A/B související s polypeptidem MHC třídy I, z angl. MHC class I polypeptide-related sequence A/B

MIP – makrofágový zánětlivý protein, z angl. macrophage inflammatory protein

NCR – přirozené receptory spouštějící cytotoxicitu, z angl. natural cytotoxicity triggering receptors

NK – přirozený zabíječ, z angl. natural killer

NKP – prekurzor NK buněk, z angl. natural killer cell precursor

PBMC – mononukleární buňky periferní krve, z angl. peripheral blood mononuclear cell

PBS – fosfátový pufr, z angl. phosphate-buffered saline

PD – protein plánované buněčné smrti, z angl. programmed cell death

SAP – adaptory pro SLAM receptory, z angl. SLAM-associated proteins

SLAM – signalizační aktivační molekula lymfocytů, z angl. signaling lymphocyte activation molecule

SUMO – malý modifikátor podobný ubikvitinu, z angl. small ubiquitin-like modifier

TCR – T buněčný receptor, z angl. T-cell receptor

TIGIT – T lymfatický Ig a inhibiční imunoreceptor na tyrosinové bázi, z angl. T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

TIM – proteiny transmembránového imunoglobulinu a mucinové domény, z angl. T cell immunoglobulin and mucin-domain containing protein 3

TNF – faktor nádorové nekrózy, z angl. tumor necrosis factor

TRAIL – ligand indukující apoptózu související s faktorem nádorové nekrózy, z angl. TNF related apoptosis-inducing ligand

ÚVOD

Rakovina je jednou z hlavních příčin úmrtí a důležitou překážkou zvyšování průměrné délky života ve všech zemích světa. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2019 je rakovina první nebo druhou hlavní příčinou úmrtí před dosažením věku 70 let ve 112 ze 183 zemí a v dalších 23 zemích je na třetím nebo čtvrtém místě. Za rok 2020 je odhadováno, že přibylo 19,3 milionu nových případů rakoviny a 10 milionů úmrtí způsobených 36 typy rakovin.[1]

Výzkum léčby rakoviny se nyní blíže zaměřuje na využití buněk nespecifické imunity, tj. buněk „přirození zabíječi“ (NK), pro léčbu nádorových onemocnění. Nejčastěji studovaným buněčným typem pro využití v imunoterapii jsou T lymfocyty, které jsou důležitou součástí specifické imunity. Tyto léčebné strategie však mohou způsobit autoreaktivitu (tj. reakce vůči tělu vlastním buňkám) T lymfocytů; mohou vést k autoimunitním onemocněním či zkříženě reagují se zdravými tkáněmi a zabíjejí zdravé buňky. Dalším problémem je neúčinnost vůči solidním nádorům a související možná cytotoxicita T lymfocytů, jako je neurologická toxicita, syndrom uvolňování cytokinů, anafylaxe a reakce štěpu proti hostiteli (GvHD). Léčba pomocí T lymfocytů také čelí problémům způsobených nízkým dělením T lymfocytů, konstantními mutacemi nádoru a častých relapsů nádoru. Mnoho klinických studií bohužel nesplnilo očekávání; u pacientů se značně liší povaha nádoru díky různorodosti spjaté s rakovinným nekontrolovaným množением. Rakovinné buňky taktéž mutují ve snaze vyhnout se léčbě cílené na imunitní systém, což vede k neúspěšnému spuštění léčebného procesu nebo relapsu.[2]

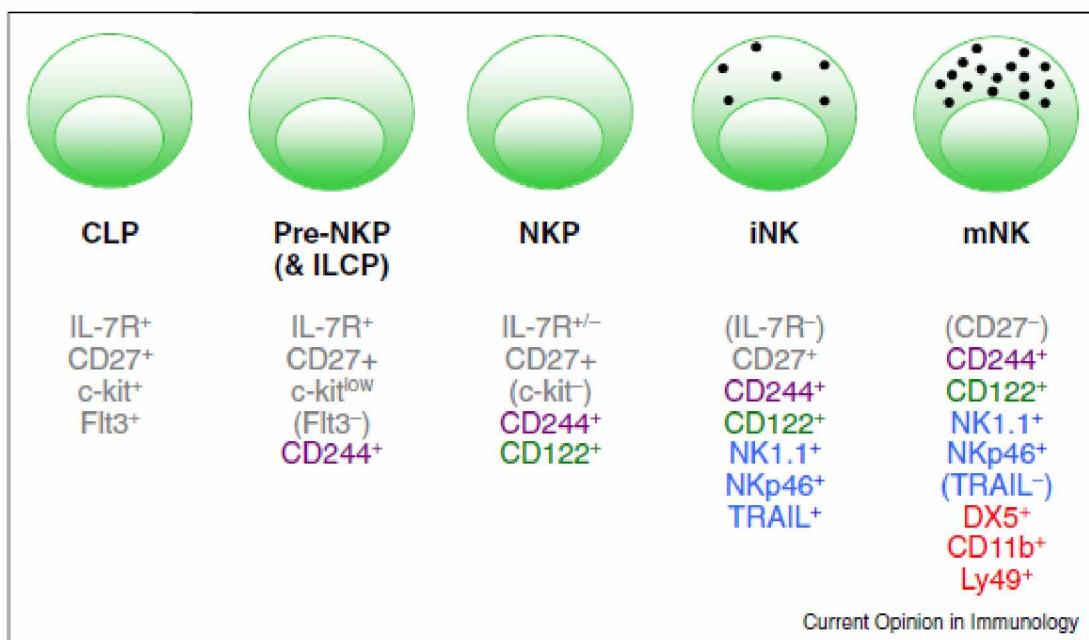
NK buňky jsou součástí imunitního systému schopné ovlivňovat a být ovlivněny mnoha ostatními typy buněk. Na rozdíl od T lymfocytů mají mnoho různorodých receptorů pro interakci s nádorovými i tělu vlastními buňkami. Stejně jako T lymfocyty mají ovšem problém s nízkým množstvím buněk v těle, proto je potřeba různých izolačních a diferenciačních technik pro získání dostatku NK buněk k léčbě pacienta. NK buňky mají určité mechanismy pro rozpoznávání tělu vlastních buněk od buněk tělu cizích, tyto mechanismy ovšem mohou být narušeny nádorovými buňkami. I přesto jsou NK buňky úspěšně využívány k léčbě rakoviny pomocí několika typů imunoterapií.

1. Úloha NK buněk v imunitním systému

NK buňky jsou granulární lymfocyty velkého vzrůstu spadající do nespecifické imunity (ovšem vykazují i některé vlastnosti buněk specifické imunity), které využívají cytotoxicity k zahubení tělu cizích buněk. Jejich prekurzory vznikají v kostní dřeni, po dozrání se buňky přesunují do periferní krve a zastupují přibližně 5–20 % všech lymfocytů. Ve srovnání s cytotoxickými T lymfocyty nemají antigenně specifické receptory (s výjimkou paměťových NK buněk; viz kapitola 1.6) a není zapotřebí předchozí stimulace, proliferace či diferenciaci k jejich působení.[3]

1.1. Vývoj NK buněk

K vývoji NK buněk dochází převážně v kostní dřeni a dělí se do pěti fází (Obr. 1). V první fázi je buňka označována jako běžný lymfoidní progenitor (CLP). Během této fáze CLP obvykle nesou markery, jako je interleukin IL-7R α /CD127, CD117 (diferenciační skupina = CD), antigen kmenových buněk 1, a CD135. Během druhé fáze je buňka označována jako pre-NK prekurzor (pre-NKP). Toto stádium se skládá ze skupiny heterogenních buněk, které zahrnují prekurzory NK a prekurzory vrozených lymfoidních buněk. Během třetí fáze se pre-NKP vyvíjí na NKP a buňky začnou exprimovat komplex IL-15R β / γ , který je důležitý pro dlouhodobý vývoj a přežití NK buněk. Buňky také začnou vyvíjet symbolický NK buněčný marker CD56, který lze dále dělit na dvě podskupiny CD56^{bright} a CD56^{dim}. NK Buňky CD56^{bright}, také známé jako nezralé NK buňky, následně hrají hlavní roli při produkci interferon gama (IFN- γ), který se podílí na imunomodulaci. Na druhé straně CD56^{dim} NK buňky, také známé jako zralé NK buňky, jsou dominantními buňkami v periferní krvi a slezině, a hrají hlavní roli v cytotoxicitě.[4] Alternativně se NK prekurzory s přístupem k sekundární lymfoidní tkáni vyvíjí ve zralé NK buňky. Po jejich vývoji NK buňky cirkulují a jsou široce distribuovány v celém těle.[5]



Obr. 1: Stádia Vývoje NK buněk[4]

1.2. Aktivace NK buněk

Jak se NK buňka zachová při střetu s cizí buňkou závisí na poměru inhibičních a stimulačních signálů. Pokud má buňka na svém povrchu normální množství hlavní histokompatibilní komplex glykoproteinové třídy I (MHC gp I), postrádá-li některý izotyp nebo jsou-li tyto molekuly pozměněny tak, že je inhibiční receptory nerozeznají, převáží stimulační signály a cílová buňka je NK buňkou cytotoxicky zlikvidována. Buňka se může stát citlivou na aktivitu NK buněk i tím, že se na jejím povrchu objeví výrazné množství ligandů aktivačních receptorů, například na stresovaných či virově infikovaných buňkách se projeví sekvence související s polypeptidem MHC gp I (MICA a MICB).[3] Zatímco při autologních transplantacích (tedy takových, kde pacient je dárce vlastních tkání) mají NK buňky jeden či více inhibičních receptorů proti MHC gp I, při alogenních transplantacích (kde tkáň je od zdravého dárce), může nastat situace, že část inhibičních receptorů nerozpozná hlavní lidský antigen (HLA-1) alely alogenních buněk a nedostatek inhibičního signálu může vést k zabití těchto buněk. Tyto NK buňky poté nazýváme aloreaktivní NK buňky.[6]

1.3. Mechanismy NK buněk

Aktivované NK buňky zabíjí nádorové buňky buď přímou nebo nepřímou cestou. Hlavními cytotoxickými nástroji přímé cesty NK buněk jsou, stejně jako u T lymfocytů, cytotoxická granula obsahující granzymy a perforiny (glykoproteiny s cytolytickou aktivitou, které jsou schopné polymerovat a takto pronikají do fosfolipidové

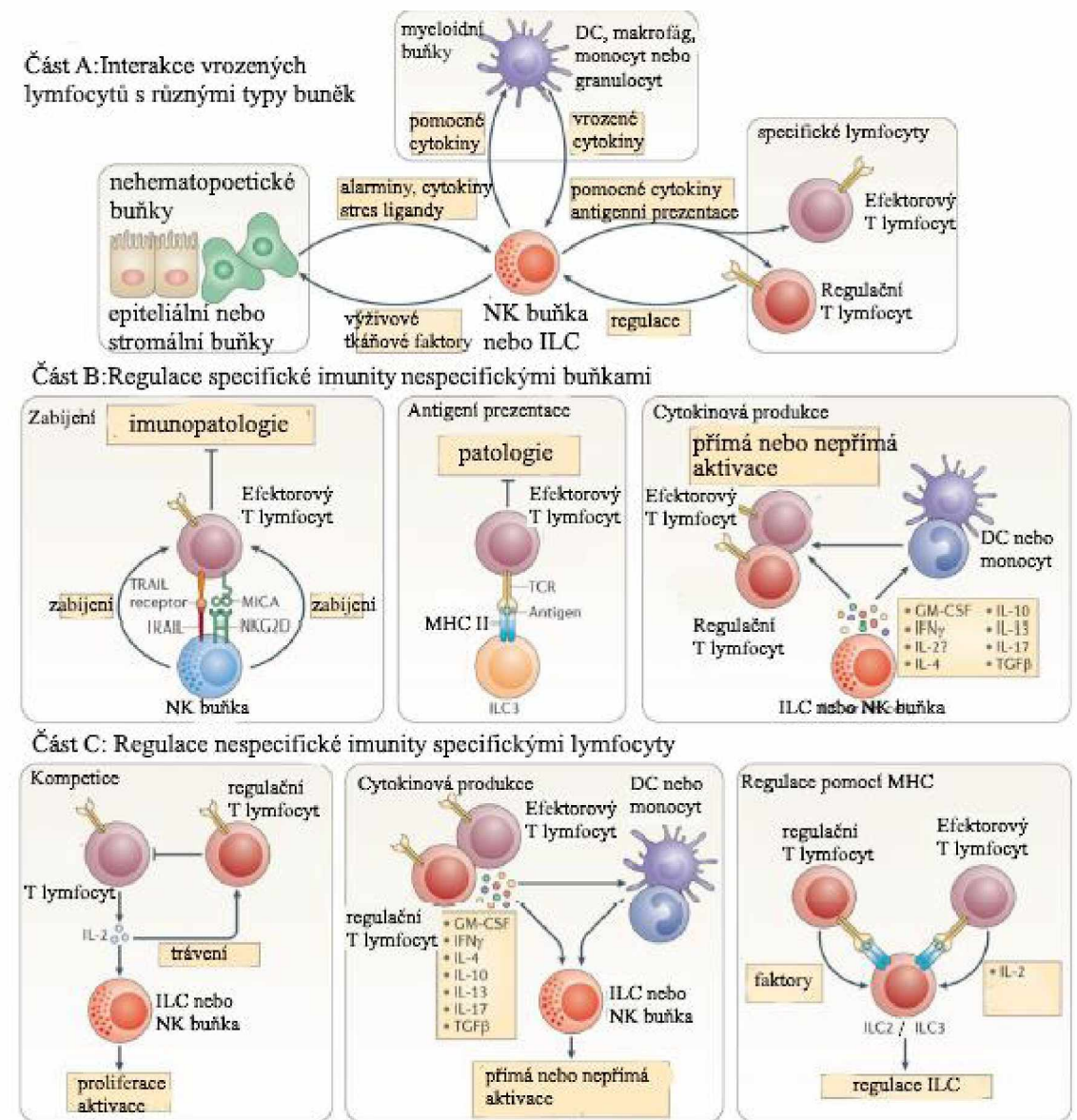
dvojvrstvy).[3] Perforin tedy způsobuje perforaci (protržení) membrány cílové buňky. Granzymy, které jsou typem serinových proteáz, pak vyvolávají apoptózu (kontrolovaná buněčná smrt) závislou nebo nezávislou na kaspáze.[7] buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC) taktéž spadá pod přímou cestu. U lidí je ADCC obvykle zprostředkována pomocí IgG. Fc část a Fab části protilátky se samostatně navážou mezi receptor CD16 na NK buňce a nádorovým antigenem, čímž mezi nimi vytváří most. Po zesílení CD16 může aktivovaná NK buňka zabít nádorovou buňku mechanismem závislým na granulích.[8] Další metoda přímého zabíjení zahrnuje apoptózu závislou na receptoru smrti. Hlavními receptory jsou Fas ligand a ligand indukující apoptózu související s faktorem nádorové nekrózy (TRAIL). Zesíťování Fas vede ke kondenzaci jader, praskání membrány a aktivaci kaspázy. TRAIL na povrchu některých NK buněk může vyvolat spontánní cytotoxicitu proti nádorovým buňkám citlivým na jeho výskyt. Vazba TRAILu na receptory nádorové buňky vede k oligomerizaci receptoru na buněčné membráně a spuštění apoptotického signálu skrze aktivaci kaspáz. Tato cesta však vyžaduje více propojení NK cílových buněk a vykazuje pomalejší kinetiku než cesty zprostředkované granzymy.[3]

Důležitými aktivátory NK buněk jsou interferony α a β produkované různými buňkami po zasažení organismu virovou infekcí. NK buňky fungují prostřednictvím nepřímého modelu jako regulační buňky, které modifikují vrozenou a adaptivní imunitní odpověď, aby nabyly cytotoxické funkce – produkují cytokiny IFN- γ , IL-3, IL-10, faktor nádorové nekrózy α (TNF- α), růstové faktory stimulující granulocytární kolonie i makrofágní kolonie, chemokiny, adenosin a další. Tyto látky mimo jiné ovlivňují diferenciaci efektorových T lymfocytů a přispívají k hematopoéze.[9]

1.4. Interakce NK buněk s ostatními částmi imunitního systému

Sekrece chemokinů NK buňkami je klíčová součást protizánětlivé reakce, kde NK buňky spolupracují s ostatními hematopoetickými buňkami, jako jsou například dendritické buňky (DC). Vzniklé signály napomáhají navést do místa zánětu ostatní imunitní buňky jako jsou monocyty, makrofágy, eozinofily a T lymfocyty. Uvolňování TNF- α z NK buněk podporuje proliferaci B lymfocytů a dělení monocytů a makrofágů. Kromě toho může TNF- α přímo navozovat nekrózu nádorových buněk. NK buňkami řízená cytotoxicita a tvorba cytokinů má dopad na antigeně specifickou odpověď T a B lymfocytů.[10]

Následující schéma (Obr. 2) popisuje možné interakce NK buněk s ostatními částmi imunitního systému.



Obr. 2: Interakce nespecifických lymfocytů[11]

1.4.1. Interakce NK buněk s nespecifickou imunitou

Část A: NK buňky interagují v rámci nespecifické imunity se třemi hlavními typy buněk: nehemopoetickými stromálními a epiteliálními buňkami, myeloidními buňkami (dendritické buňky, makrofágy, monocyty a granulocyty) a dalšími lymfocyty (viz kapitoly 1.4.2. a 1.4.3). Mnoho z těchto interakcí je obousměrných.[11]

DC hrají roli při regulaci dělení a funkci NK buněk vylučováním sekrečních exosomů, IL-12, IFN typu I a trans-prezentací IL-15. IL-15 je primárně vázaný na IL-15R α , který podporuje účinky IL-15. Když jsou komplexy IL-15/IL 15R α na buněčném povrchu, mohou stimulovat buňky prostřednictvím β/γ C receptoru.[12] Makrofágy podpořené imunostimulantem poly I:C (polyinosinová:polycytidylová kyselina) vylučují cytokiny, jako je růstový IL-15 a NK aktivační IL-18.[13] Monocyty jsou taktéž schopny regulovat NK buňky; produkují NK aktivační CD69, stimulační IL-12, růstový IL-15 a inhibiční IL-10 (v případě monocytů infikovaných *Mycobacterium tuberculosis*).[14]

1.4.2. Interakce NK buněk s T lymfocyty

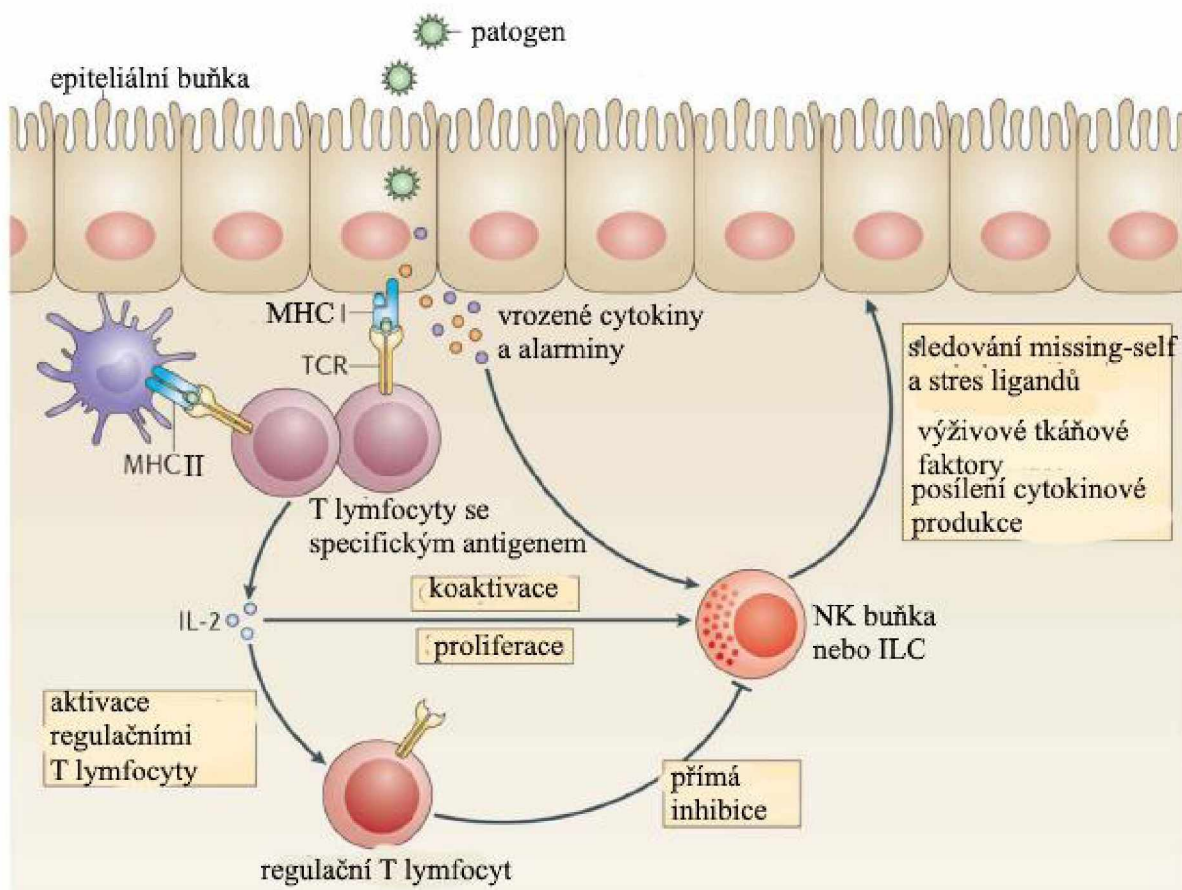
Část B: Vrozené lymfocyty mohou omezit imunopatologickou odpověď antivirových T lymfocytů, a to prostřednictvím usmrcování T buněk buď skrze TRAIL nebo NKG2D. NK buňky izolované od pacientů infikovaných virem chronické hepatitidy B používají povrchovou molekulu TRAIL k usmrcení TRAIL-receptor specifických CD8⁺ T lymfocytů. TRAIL je také exprimován v myších jaterními a slezinnými NK buňkami podobnými vrozeným lymfoidním buňkám (ILC1). Ty se hromadí během chronické infekce viru lymfatické choriomeningitidy, což naznačuje, že tyto NK buňky mají během infekce regulační roli. ILC3 zpracovává antigeny a prezentuje je na molekulách MHC gp II, aby omezila patologickou imunitu T lymfocytů na sliznicích. NK buňky produkují klasické cytokiny pomocných T lymfocytů, které modulují počet a aktivitu myeloidních buněk, včetně neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a DC, ale mohou také působit přímo na T lymfocyty. Místní úprava prostředí cytokinů NK buňkami může proto přímo a/nebo nepřímo přispívat k zahájení a polarizaci adaptivní reakce. Podobně může produkce imunosupresivních cytokinů (např. IL-10 nebo TGF β) NK buňkami přímo a/nebo nepřímo upravovat reakce T buněk.[11] T regulační lymfocyty jsou aktivovány skrze IL-2 (který je důležitý pro přežití a proliferaci NK buněk) a to vede ke sníženému růstu NK buněk. T regulační lymfocyty taktéž přímo inhibují NK buňky a mohou spustit apoptózu NK buněk.[15] Regulační T lymfocyty taktéž potlačují proliferaci a aktivitu NK buněk vylučováním transformujícího růstového faktoru β .

Společná kinetika NK buněk a T lymfocytů dovoluje NK buňkám řídit a upravovat odpověď T lymfocytů skrze cytolytickou aktivitu a sekreci cytokinů, a to jak pozitivně, tak negativně použitím přímých i nepřímých mechanismů.[16] Tyto interakce jsou shrnuty v následující tabulce:

Tabulka 1: Regulace T lymfocytů NK buňkami[16]

Posílení odpovědi T lymfocytů NK buňkami	
Nepřímé mechanismy	Výsledný efekt
Zrání dendritických buněk	IFN- γ produkovaný NK buňkami způsobuje zrání DC, což vede k produkci IL-12. Ten vede k posílení CD4 ⁺ T lymfocytů, které napomáhají nezávislé aktivaci CD8 ⁺ T lymfocytů
Zkřížená prezentace antigenu	NK buňky uvolňují během eliminace cílových buněk antigeny křížené prezentace, čímž aktivují T lymfocyty
Přímé mechanismy	Výsledný efekt
Dělení CD4 ⁺ T lymfocytů	IFN- γ produkovaný NK buňkami podporuje dělení CD4 ⁺ T lymfocytů na buňky T _{H1} a napomáhá jejich polarizaci.
Oslabení odpovědi T lymfocytů NK buňkami	
Nepřímé mechanismy	Výsledný efekt
Oslabení prezentace antigenu	Likvidace CD buněk vede ke snížené aktivaci CD4 ⁺ a CD8 ⁺ T lymfocytů
Snížená stimulační kapacita buněk prezentujících antigen	Snížená odpověď CD4 ⁺ a CD8 ⁺ T lymfocytů proti viru lymfatické choriomeningitidy
Přímé mechanismy	Výsledný efekt
Snížená aktivace CD8 ⁺ T lymfocytů	V myších po cytomegalovirové infekci NK buňky sekretují IL-10, což vede ke snížené odpovědi CD8 ⁺ T lymfocytů a chrání tak před imunopatologií
Eliminace T lymfocytů	NK buňky mohou řídit likvidaci CD4 ⁺ a CD8 ⁺ T lymfocytů

Část C: Mechanismy, kterými T lymfocyty upravují vrozené lymfocyty. T buňky a vrozené lymfocyty mohou soutěžit o společné zdroje, jako jsou růstové faktory a metabolity. Cytokin IL-2 poskytuje jeden příklad toho, jak lze dosáhnout rovnováhy mezi efektorovými T lymfocyty, regulačními T lymfocyty a NK buňkami (Obr. 3). Mediátory místního zánětu aktivují všechny tři typy buněk a navozují vyšší citlivost NK buněk vůči IL-2, například zvýšením CD25. Jakmile se T lymfocyty setkají se svými příbuznými antigeny (toho je docíleno epiteliálními nebo myeloidními buňkami), vylučují IL-2 (a další rozpustné faktory), aktivují NK buňky a snižují jejich aktivační práh. To vede k šíření signálu specifického pro antigen do okolních NK buněk, posílení lokální produkce cytokinů, zvýšení sekrece výživových faktorů pro tkáň a optimalizaci imunitního dozoru pro „missing-self“ NK rozpoznávání (viz kapitola 5.1.) a pro ligandy vyvolané stresem. Regulační T lymfocyty zabráňují nadměrné aktivaci NK buněk soutěží o IL-2. Alternativně může IL-2 aktivovat regulační T lymfocyty, což vede k přímé inhibici NK buněk nebo k synergii s NK buňkami pro udržování funkce tkáně a homeostázy.[11]



Obr. 3: Model propojení specifické a nespecifické imunity během místního zánětu závislý na IL-2[11]

1.4.3. Interakce NK buněk s B lymfocyty

Mezi klíčové schopnosti antivirových protilátek B lymfocytů patří aktivace a proliferace B lymfocytů specifických pro virus, změna třídy izotypů, afinitní zrání imunoglobulinu v germinálních (zárodečných) centrech a terminální diferenciaci plazmatických buněk. NK buňky se podílejí na ovlivňování mnoha těchto událostí v humorální imunitní odpovědi. NK buňky mohou aktivovat B lymfocyty a podporovat produkci imunoglobulinů způsoby, které nezávisí na T lymfocytech, například IFN- γ a TNF. Interakce mezi receptory signálních molekul aktivujících lymfocyty na B lymfocytech a NK buňkách pak poskytují další mechanismus stimulace exprese nezávislý na IFN- γ , a to IgG2a. Aktivace závislá na kontaktu B lymfocytů s NK buňkami také zahrnuje interakce ligandů CD40-CD40.

Na rozdíl od studií naznačujících, že NK buňky zvyšují imunitní odpověď B lymfocytů, řada zpráv podobně popisuje potlačování humorální imunity NK buňkami během virové infekce a očkování. NK buňky jsou schopny zabít B lymfocyty přímo, a to cytotoxicky. NK buňky také rozvracejí imunoglobulinové reakce proti pneumokokovým antigenům a viru Epstein-Barrové, stejně jako syntézu IgE a IgA. NK buňky mohou potlačit množení B lymfocytů a přechod do stavu plazmatických buněk. Paradoxně je i exprese IFN- γ NK buňkami zapojena do inhibice proliferace B buněk. Zjištění přesných důvodů těchto inhibičních funkcí vyžaduje další studie a výzkum.

NK buňky mohou také potlačovat kvalitu a velikost odpovědi B lymfocytů nepřímo prostřednictvím účinků na CD4⁺ T lymfocyty. Tato suprese může zahrnovat sekreci cytokinů nebo přímé mechanismy závislé na kontaktu buněk. NK buňky mohou exprimovat TGF β a IL-10, imunosupresivní cytokiny, které ovlivňují humorální imunitu.[17]

1.5. Ochrana před autoreaktivitou NK buněk

Tak jako T a B lymfocyty, NK buňky mohou být autoreaktivní, přestože NK receptorové geny neprochází somatickou obměnou. To nastane, pokud NK buňka postrádá inhibiční receptory vázající se na MHC gp I, nebo pokud jejich aktivační receptory rozpoznávají ligandy tělu vlastní včetně MHC molekul. Tato chyba v identifikaci vzniká, protože řada receptorů, které jednotlivé NK buňky přijímají k expresi během vývoje, jsou do značné míry náhodné a ligandy MHC rozpoznávané těmito receptory jsou zděděny nezávisle na receptorových genech.[10] Aby nedocházelo k autoreaktivitě, existuje vzdělávací systém, pomocí kterého nezralé NK buňky získávají autotoleranci. Buňky

prezentující tyto vzdělávací povrchové molekuly MHC gp I poskytnou NK buňkám zvýšenou efektorovou funkci, ale pouze pro ty NK buňky, které mají silnou inhibiční reakci vůči střetu s tělu vlastní buňkou. Potenciálně autoreaktivní NK buňky, které nemají dostatečné inhibiční schopnosti, po setkání se vzdělávacími buňkami nejsou ničeny, ale nabývají stimulační hyporeaktivity prostřednictvím různých aktivačních receptorů. Během vývoje NK buňky nabývají postupně různorodé inhibiční receptory, dokud se u nezralé NK buňky nevyvine receptor specifický pro MHC gp I. Interakce mezi vzdělávacími buňkami nesoucími tělu vlastní molekuly MHC gp I a NK receptory umožní konečné dozrání NK buněk a ty poté nabydou plných efektorových funkcí. Různorodost inhibičních receptorů mezi NK buňkami odpovídá náhodné expresi receptorů různých NK buněk před získáním receptoru specifického pro tělu vlastní MHC gp I. Fenotypová heterogenita NK buněk je tedy důsledkem probíhajícího procesu zrání.[18]

NK buňky se liší v počtu a afinitě inhibičního receptoru specifického pro tělu vlastní MHC. Funkční odpověď NK buněk na aktivační stimuly úměrně roste s počtem různých inhibičních receptorů pro MHC, které mají NK buňky na svém povrchu. Citlivost zralých NK buněk není pevně dána, ale může se přizpůsobit měnícímu se prostředí *in vivo*. [10] Přenos zralých NK buněk do myši bez MHC ligandů a za nepřítomnosti infekce nebo jiného onemocnění vedl ke snížené reaktivitě NK buněk; setkání s buňkami postrádajícími vlastní MHC, které by NK buňky normálně stimulovaly tedy místo toho vedly k hyporeaktivnímu stavu. Naopak přenos NK buněk z myši s nedostatkem MHC na myši, které již MHC gp I měli, vedlo k následnému zvýšení citlivosti NK buněk s inhibičním receptorem specifickým pro MHC molekuly u nového hostitele. Inhibiční interakce je tedy částečně zodpovědná za posílení odezvy NK buněk.[19][20] Přetrvávající stimulace bez inhibice tedy vede k hyporeaktivitě NK buněk, zatímco přetrvávající stimulace spojená s přiměřenou inhibicí vede ke zvýšené citlivosti NK buněk. U infikovaných zvířat ovšem hyporeaktivní NK buňky přecházejí do vyššího stupně citlivosti. NK buňky postrádající inhibiční receptory specifické pro MHC mají významnější roli než jiné NK buňky v odpovědi na myši cytomegalovirusovou infekci.[21] Za fyziologického stavu tedy NK buňky s inhibičními receptory pro vlastní MHC rychle eliminují buňky s chybějícími MHC gp I, zatímco NK buňky s menším počtem těchto receptorů mohou být mobilizovány zánětlivými signály, které provázejí patogenní infekce.

1.6. Paměťové NK buňky

NK buňky mohou za určitých podmínek získat paměť nebo vlastnosti podobné paměti. První důkaz pro výskyt paměťových NK buněk byl pozorován na modelu haptenem

indukovaná kontaktní hypersenzitivita (CHS) u myši s nedostatkem rekombinačního aktivačního genu 2, které postrádaly T a B lymfocyty, ale měly NK buňky. CHS byla do té doby považována za zprostředkovatelnou pouze $CD4^+$ T buňkami po podání chemického haptenu. CHS reakce zprostředkovaná NK buňkami u myši s deficitem aktivačního genu 2 byla detekována nejméně měsíc po chemické aktivaci a reakce byla specifická pro haptenu. Tyto paměťové NK buňky zůstávaly pouze v játrech, ale nikoli ve slezině, a na jejich buněčném povrchu byly zaznamenány vysoké hladiny CD90 a CD186. U myši, které dostávaly adoptivní přenos jaterních NK buněk z haptenu aktivovaných myši, byla pozorována haptenu-specifická CHS odpověď.[10] V myších játrech také bylo zjištěno, že skupina NK buněk identifikovaných jako $NK1.1^+DX5^-CD49a^+$ má paměťovou odpověď na několik virových antigenů.[22] Během cytomegalovirové infekce u lidí měla skupina NK buněk s vysokou expresí CD94 zvýšenou funkci v reakci na opakovanou virovou infekci.[23] Cytokinové kombinace mohou také vést k tvorbě paměťových NK buněk. NK buňky s pamětí nebo paměťovými vlastnostmi přežívají dlouhou dobu a mají vylepšené funkce proti cílovým buňkám a opakované stimulaci.[24]

2. Receptory NK buněk

Kontrola reaktivity NK buněk je řízena dvěma druhy povrchových receptorů: stimulační a inhibiční.

2.1. Receptory stimulační

Stimulační nebo také aktivační receptory NK buněk (KAR) rozeznávají obecné struktury nejrůznějších typů a jejich signál aktivuje mechanismy jako jsou cytokinová sekrece a přímá buněčná cytotoxicita. Není znám konkrétně specifický druh receptoru, který by spouštěl všechny ostatní – aktivační receptory pracují v synergii, nejsou ovšem rovnoměrně vyvážené v důležitosti. Mezi dominantní stimulační receptory patří jednak ty se signalizačními molekulami obsahující sekvenci aminokyselin, jejichž funkce je závislá na fosforylaci tyrosinu, známé jako aktivační receptory na tyrosinové bázi (ITAM) a jednak receptor NKG2D se signalizačními molekulami DAP10. Do kostimulačních receptorů spadají receptory rodiny signalizačních aktivačních molekul lymfocytů (SLAM) a nezařazené receptory jako jsou CD226, CD2 a NKp80.[12]

2.1.1. Receptory spojené s molekulami na bázi ITAM

Molekuly se sekvencí ITAM přispívají k signalizaci řady aktivačních receptorů na NK buňkách. Řetězce FcR- γ a TCR- ζ tvoří homodimery a heterodimery, a jsou pozorovatelné u CD16. NKp46 a NKp30 mají vazbu s FcR- γ a/nebo TCR- ζ , zatímco NKp44 má vztah se signalizačním adaptérem DAP12. Ten tvoří homodimer.

Transmembránový protein B7-H6 byl identifikován jako ligand pro přirozené receptory spouštějící cytotoxicitu (NCR), obvykle exprimovaný na plazmatické membráně. Váže se na NKp30 a je znakem několika nádorových buněčných linií. NKp30 se zapojuje do aktivace ostatních NK buněk skrze dendritické buňky. Přestože NKp46 má ITAM podjednotky, samostatně není schopen spustit aktivní degranulaci; je zapotřebí synergické kombinace s jedním z receptorů 2B4, CD226, NKG2D nebo CD2. Tato potřeba propojení napomáhá zabránit nekontrolovatelné aktivaci NK buněk. Naproti tomu CD16 tuto synergii nevyžaduje – je schopen vázat se na Fc část protilátek a spouštět ADCC. V tomto případě je specifita určena adaptivními B buňkami produkujícími protilátky, což je možným vysvětlením, proč aktivace NK buněk skrze CD16 nepodléhá požadavku synergie s jinými receptory.[12]

2.1.2. Receptor NKG2D (CD 314)

NKG2D se váže na řadu ligandů, které jsou indukovány na buňkách pod vlivem stresu díky infekci, transformaci nebo poškození DNA. Fosforylovaný DAP10 váže buď podjednotku p85 fosfoinositid 3-kinázy, nebo malý adaptér Grb2 ve spojení s guaninovým výměnným faktorem Vav1. Stimulace NK buněk prostřednictvím NKG2D vede k navázání malého adaptéru CrkL na podjednotku p85 fosfoinositid 3-kinázy. CrkL přispívá k signalizaci NKG2D pro adhezi, polarizaci granulí směrem k cílové buňce a degranulaci.[12]

2.1.3. Receptory SLAM

Imunoglobulinové receptory SLAM rodiny se objevují na hematopoetických buňkách. Ty řídí buňka-buňka interakce skrze homotypické navázání (tj. váží se na sebe v trans konfiguraci) s výjimkou 2B4, který se váže na CD48. NK buňky exprimují všechny členy SLAM rodiny receptorů vyjma vlastního SLAM receptoru (CD150). SLAM receptory jsou spojeny s adaptory pro SLAM receptory (SAP).[25]

2.1.4. Ostatní aktivační receptory

NK buňky mají kromě specifických receptorových skupin také mnoho různorodých receptorů, mezi něž spadá například CD226 a NKp80. CD226 je zásadní při kontrole růstu nádorů, kdy se váže na receptor polioviru CD155 a lektin adhezivní molekuly CD112. NKp80 se váže na aktivačně-indukovaný typ C lektin myeloidních buněk. NKp80 taktéž stimuluje Syk forforylaci a Syk dependentní cytotoxicitu.[12]

2.2. Receptory inhibiční

Inhibiční receptory specifické pro klasické molekuly MHC gp I exprimované lidskými NK buňkami patří do rodiny imunoglobulinových receptorů podobných NK buňkám (KIR). NK buňky mají na svém povrchu i významný počet dalších inhibičních receptorů, které rozpoznávají ligandy jiné než MHC gp I, jako jsou postranní řetězce kyseliny sialové, CD155, kadheriny a Ceacam 1. Tyto receptory zabraňují NK buňkám poškození funkčních tělu vlastních tkání. Inhibiční receptory blokuji funkci NK buněk porušením aktivačních signálů.[26]

2.2.1. Receptory na bázi ITIM

Typické receptory s inhibiční funkcí jsou charakterizovány přítomností inhibičních imunoreceptorů na bázi tyrosinu (ITIM) v cytoplazmatické části receptoru. Komplexy receptorů MHC gp I obsahují dva druhy ITIM, buď v tandemovém uspořádání

s monomerními KIR, nebo jeden ITIM na podjednotku v homodimerních Ly49 receptorech. Zapojení receptoru vede k ITIM fosforylaci kinázami rodiny Src. Fosforylované ITIM přijímají a aktivují tandemové SH2 proteinové fosfatázy SHP1 a SHP2, přičemž SHP1 hraje zásadní roli pro inhibiční funkci.[26]

2.2.2. Receptory na bázi ITSM

Inhibice může nastat i bez souhlasu ITIM, a to skrze přítomnost imunoreceptorových switch motivů na tyrosinové bázi (ITSM). Ačkoli se SLAM receptory běžně řadí do aktivačních receptorů, mohou mít za určitých podmínek inhibiční účinky. U pacientů s X-vázaným lymfoproliferativním onemocněním u NK buněk funguje 2B4 jako inhibiční receptor. Při absenci SAP působí SLAM receptory na SHP1 a SHP2.[25]

2.2.3. Receptory inhibiční C-lektinové

C-lektinové receptory jsou závislé na přítomnosti Ca^{2+} iontů pro jejich aktivaci. Významné receptory u NK buněk spadajících do této kategorie jsou CD94, CD161, CD94, NKR-P1 a další. CD94 receptor rozpoznává převážně neklasické MHC gp I, u člověka tedy molekuly HLA-E.[6]

2.3. Checkpoint receptory

Speciálním druhem receptorů jsou takzvané imunitní kontrolní body neboli checkpoint receptory proteinu plánované buněčné smrti (PD-1), proteiny transmembránového imunoglobulinu a mucinové domény (TIM-3), lymfocytový aktivační gen (LAG-3) a T lymfatický Ig a inhibiční imunoreceptor na tyrosinové bázi (TIGIT). PD-1 je typicky exprimován na efektorových T lymfocytech, B lymfocytech a myeloidních buňkách. PD-1 má dva ligandy, PD-L1 a PD-L2. PD-L1 je exprimován většinou krvetvorných buněk; určitými parenchymálními buňkami, jako jsou vaskulární endoteliální buňky; a různými nádorovými buňkami, jako je melanom, rakovina prsu, ovariální a hematopoetické maligní buňky. PD-L2 je exprimován pouze v makrofázích a DC. PD-1 se silně vyskytuje v podskupině NK buněk v periferní krvi u jedné čtvrtiny dárců, kteří byli pozitivní na lidský cytomegalovirus. NK buňky od nádorových pacientů, včetně těch s Kaposiho sarkomem, mnohočetným myelomem nebo karcinomem vaječníků, vykazují zvýšenou cílenou expresi PD-1.[27] Tyto kontrolní body se v těle významně podílejí na rovnováze mezi aktivací a utlumením imunitního systému, a jsou proto častým cílem nádorových onemocnění, které inhibicí či snížením jejich účinnosti unikají pozornosti imunitního systému.[8]

2.4. Chimérické antigenní receptory

Ve snaze vzdorovat nádorovým buňkám a jejich ochranným mechanismům proti imunitní odpovědi organismu mohou být NK buňky upraveny transdukcí (přenos genetického materiálu) geneticky upravenými virovými vektory tak, aby exprimovaly chimérický antigenní receptor (CAR). Na rozdíl od primárních NK buněk mohou být buňky NK-92 s CAR vyrobeny z již funkčně a molekulárně charakterizovaného jednobuněčného klonu za podmínek vyhovujících správné výrobní praxi. Technologie úpravy genomu CRISPR-Cas9 umožňuje místně specifické navázání CAR, čímž se snižuje riziko jakékoli poruchy v buňkách CAR NK-92. Buňky NK-92 musí být před podání pacientům ozářeny, aby se zabránilo možnému zhoubnému růstu. Přesto však poskytuje opakovaná infuze ozářených buněk CAR NK-92 dobrou účinnost terapie v závislosti na dávce a frekvenci. CAR obsahují signální peptid, jednořetězcový variabilní fragment, pantovou oblast, transmembránovou oblast a intracelulární domény. Složení běžných CAR je následující: panty CD4, CD8 nebo IgG pant; transmembránová doména CD3 ζ , CD4, CD8 nebo CD28; kostimulační doména 4-1BB nebo CD28; a aktivační doména CD3 ζ . Aktuální vývoj buněčných terapií CAR NK v průmyslu zahrnuje následující postupy: GoCAR-NK využívá Rimiducid pro navození aktivace a Rapamycin pro signalizaci apoptózy. NKCAR-iPSC-NK se zaměřuje na antigen FT596, který v kombinaci s Rituximabem (terapeutická monoklonální protilátka CD20). FT596 je nyní testován v rámci I. fáze klinické studie u pacientů s B buněčným lymfomem a chronickou lymfocytární leukémií. Další zkoumanou metodou je využití DR5 TRAIL receptoru s vysoce afinitní variantou TRAIL, což aktivuje signalizaci FADD kaspázy 8 v nádorové buňce a výrazně posiluje účinek apoptózy nádorových buněk. Buňky t-haNK napadají buňky s povrchovými receptory PD-L1 u rakoviny plic. Buňky t-haNK tedy exprimují anti-PD-L1 CAR, vysoce afinitní CD16 a endoplazmatické retikulum zadržené IL 2. T-haNK je nyní v I. fázi klinické studie u pacientů s lokálně pokročilými nebo metastatickými solidními nádory. NKX-101 používá NKG2D-CAR pro rozpoznávání nádorového antigenu. NKX-101: CAR-NK buňky jsou složeny z NKG2D receptorů v extracelulární doméně, CD134/CD3 v kostimulační doméně a na membráně buněk je navázaný IL-15. Receptor NKG2D se váže na osm ligandů NKG2D, které se vyskytují ve zvýšeném množství u řady leukemických a pevných nádorů.[28]

3. Metody studia receptorů NK buněk

Nejčastěji používané metody pro analýzu imunitních buněk jsou založeny na imunochemickém principu antigen-protilátka. Buňka imunitního systému rozpoznává epitopy na povrchovém antigenu buňky cizí a vylučuje protilátky které se na antigeny navážou a spouští tak obrannou reakci organismu.[29]

3.1. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie představuje citlivou kvantitativní techniku snadno použitelnou pro fenotypovou a funkční charakterizaci buněk imunitního systému. Buněčná suspenze se označí pomocí monoklonálních protilátek (mAb) s navázaným fluorochromem. mAb se specificky vážou na povrchové antigeny. V průtokovém cytometru je proud buněk seřazených za sebou ozařován laserovým paprskem. Detektory zaznamenávají 2 optické parametry, to jest odražené světlo (Side scatter; SSc) a rozptyl dostředného úhlu (Forward scatter; FSc) a dále parametry spojené s fluorescencí na různých vlnových délkách.[30] Bylo uměle vytvořeno několik mAb, které se specificky vážou na receptory a další povrchové molekuly. To pak usnadňuje hodnocení reakcí NK buněk a rozlišování jednotlivých podskupin NK buněk. Příkladem je sekreční uvolňování lysozomů, které může být kvantifikováno vyvolanou expresí transmembránových proteinů sekrečních lysozomů. Neaktivované cytotoxické lymfocyty CD63, CD107a, CD107b a CD178 (Fas ligand) leží v sekrečních lysozomech. V NK buňkách od zdravých dárců se CD107a prostorově překrývá s perforinem a vyskytuje se na povrchu NK buněk po lýze citlivých cílových buněk. Porušená indukce povrchové exprese CD107a je spojena s určitými podtypy syndromů zánětlivé imunodeficiency. Po stimulaci citlivými cílovými buňkami NK buňky okamžitě uvolňují cytotoxické proteiny polarizovaným splynutím sekrečních lysozomů s plazmatickou membránou. Sekrece chemokinů a cytokinů je pomalejší proces, vyžaduje transkripci a *de novo* syntézu proteinů a sleduje různé vezikulární dráhy. Ačkoli degranulace NK buněk je předpokladem cytotoxicity NK buněk, hodnocení degranulace nemusí nutně odpovídat množství lýze cílových buněk. Lýza cílové buňky závisí kromě citlivosti cílové buňky na dráhy smrti zprostředkované NK buňkami i na rozsahu degranulace efektorových buněk, obsahu sekrečních lysozomů, strukturách cílových buněk usnadňujících adhezi a polarizované sekreci sekrečních granulí.

Možné je provést dvouhodinový test, který kvantifikuje degranulaci lidských NK buněk hodnocením povrchové exprese CD107a na mononukleární buňkách periferní krve

(PBMC) a standardních cílových buněčných linií. Tento test se dá použít pro diferenciální diagnostiku defektů buněčné cytotoxicity. Také je možný komplexní šestihodinový test, ve kterém se kromě degranulace lidských NK buněk hodnocená povrchovou expresí CD107a současně zjišťuje i produkce chemokinů a cytokinů, které jsou detekovány intracelulárním barvením makrofágového zánětlivého proteinu 1 β (MIP-1 β), TNF- α a IFN- γ . Indukce produkce MIP-1 β v NK buňkách může být měřena již 30 minut po smíchání cílových buněk, zatímco TNF- α a IFN- γ jsou opožděny. V závislosti na parametrech průtokového cytometru lze další protilátky úspěšně kombinovat, což usnadňuje podrobnější analýzu dalších funkčních parametrů nebo odpovědí ve specifických podskupinách NK buněk.

Nejprve je nutná příprava PBMC. Ty jsou izolovány ze vzorků heparinizované plné krve pomocí centrifugace v hustotním gradientu. Po odstředění se PBMC shromáždí ve zkumavce a přidá se fosfátový pufr se solí (PBS) k promytí. Buňky se znovu odstředí, odstraní se supernatant a buněčná peleta se dvakrát promyje v PBS. Buňky se resuspendují v kultivačním médiu ve vhodné koncentraci, a po izolaci se efektorové buňky kultivují přes noc v inkubátoru. Barvení buněk se liší podle testu. U dvouhodinové verze se využívá fluorochromem konjugované monoklonární protilátky anti-CD3, anti-CD56 a anti-CD107a. U šestihodinového testu navíc přidáváme anti-CD14, anti-CD19, anti-MIP-1 β , anti-TNF- α a anti-IFN- γ mAb. Pro analýzu vícebarevné průtokové cytometrie je nutná kompenzace spektrálního překrytí mezi různými fluorofory. K tomu využíváme kontrolní vzorky. Ty by měly zahrnovat jak jednotlivá barvení všech použitých fluorochromů, tak barvení, kde jsou zahrnuty všechny vyjma jednoho fluorochromu. Intenzita signálu kompenzačních kontrol musí být srovnatelná se signálem obarvených buněk. V ideálním případě kompenzační kontroly obsahují dvě stejné populace obarvených a nebarvených částic. Používáme kompenzační kuličky anti-myší IgG κ . [31]

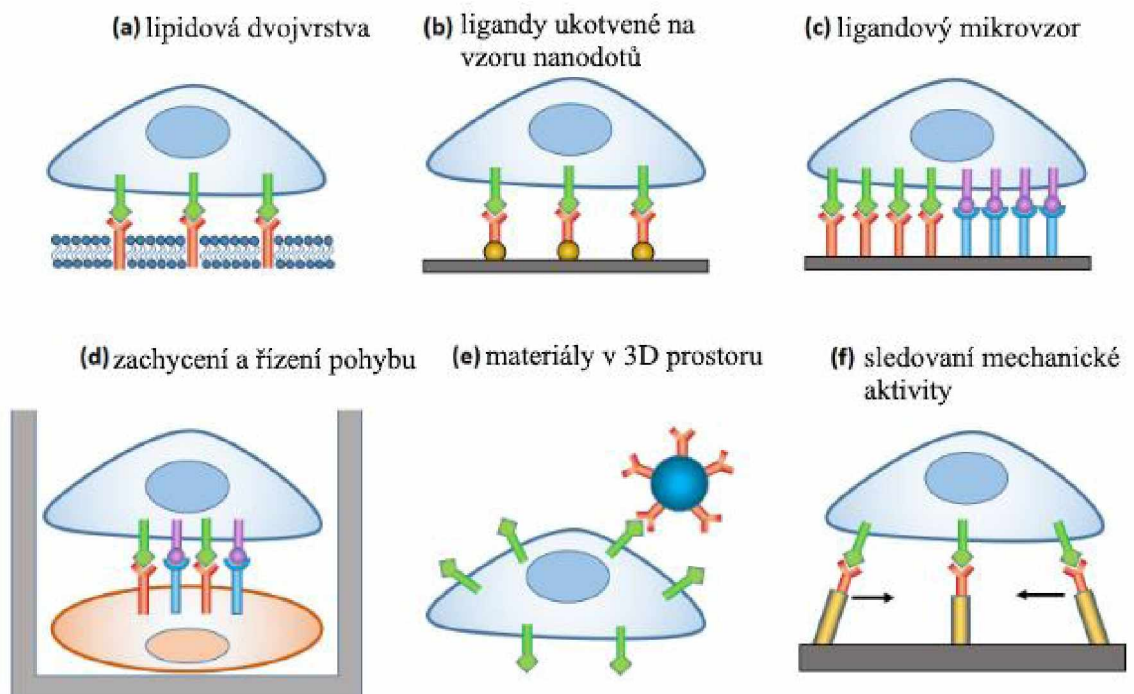
3.2. Imunomagnetická separace NK buněk

Metoda je založena na využití magnetických částic potažených požadovanou protilátkou. Imunomagnetická separace je rozdělena na pozitivní a negativní. Pozitivní selekce se zaměřuje na buňky s konkrétní povrchovou molekulou. Při negativní selekci jsou odstraněny všechny ostatní populace na základě jejich povrchových molekul, a je ponechána neoznačená cílová populace. Po inkubaci buněčné populace a navázání částic jsou buňky umístěny do magnetického pole; buňky s navázanými částicemi jsou zachyceny a ostatní buňky procházejí skrze pole. Pozitivní selekce se zaměřuje na buňky zachycené v magnetickém poli, negativní na prošlé buňky. Negativní selekce je vhodnější z hlediska

získání čisté populace buněk nezměněné navázanými partikulami, vyžaduje ovšem více reagensů. [30]

3.3. Pokročilé materiály a zařízení pro studium NK buněk

V posledních letech se rozvíjí technologie nových materiálů a zařízení určených k regulaci a studiu živých buněk. Tyto materiály a zařízení se liší strukturou, velikostí, chemií a funkcí, ale všechny mají za cíl poskytnout buňkám syntetickou verzi prostředí, které je identické nebo podobné okolí buněk v jejich přirozeném prostředí. V případě NK buněk, které jsou běžně regulované aktivačními, stimulačními a inhibičními signály, lze vytvořit umělé prostředí, které napodobuje povrch buňky prezentující antigen. Protože však každý materiál nebo zařízení obvykle poskytuje pouze jednu konkrétní umělou narážku, zatímco buňky *in vivo* jsou kolektivně regulovány řadou signálů a látek, je často zpochybňována spolehlivost těchto materiálů a zařízení pro reprodukci realistického prostředí buněk. Návrh a sestavení syntetického buněčného mikroprostředí které by bylo komplexní, různorodé a mnohostranné je cílem stávajících a budoucích výzkumů. Obrázek 4 popisuje aktuální technologie používané při studiu NK buněk.[32]



Obr. 4: Pokročilé materiály a zařízení pro studium a regulaci NK buněk[32]

3.3.1. Lipidová dvojvrstva se zabudovanými ligandy

Lipidová dvojvrstva je jedna z nejdůležitějších částí buněk a slouží jako prostředí pro transmembránové molekuly, skrze které buňky interagují s jejich okolím. Upravené lipidové dvojvrstvy se zabudovanými ligandy, které napodobují povrch cílových buněk tak našli široké využití v buněčném výzkumu jako modelové systémy pro buněčná rozhraní, zejména kvůli vysoké mobilitě lipidových molekul ve 2D prostoru, začlenění transmembránových proteinů a také schopnosti prostorově omezit lipidové dvojvrstvy v umělých mikro bariérách.[32]

Lipidové dvojvrstvy se zabudovanými ligandy pro receptory NK buněk NKG2D, CD244 a antigen spojený s funkcí lymfocytů 1 (LFA-1) byly použity k pozorování aktivovaných NK buněk pomocí mikroskopie s úplnou vnitřní reflexní fluorescencí. Tato studie zejména zkoumala roli ICAM-1, ligandu pro LFA-1, při tvorbě organizované imunitní synapse, jakož i regulaci synaptické tvorby pomocí receptorů NKG2D CD244 a LFA-1. V této studii bylo také prokázáno, že upravené lipidové dvojvrstvy věrně reprodukuje biologické procesy, ke kterým dochází na skutečném rozhraní buňka-buňka.[33] Lipidové dvojvrstvy lze také použít ke studiu inhibice NK buněk. Příkladem je studie, která použila lipidové dvojvrstvy s ICAM, ULBP3 (ligand pro NKG2D) a mutantní formu HLA-Cw3, která se specificky váže na KIR2DL2, ke zkoumání role ITIM v inhibičních drahách NK buněk.[34]

3.3.2. Ligandy ukotvené na vzoru nanodotů

Možným přístupem objasnění role shlukování receptorů je fixace ligandů v řízeném uspořádání, a tím vytvoření přísně regulovaných podmínek pro shlukování receptorů. Role uspořádání receptorů v buněčné funkci lze tedy objasnit změnou uspořádání ligandů a sledováním buněčné odpovědi na tyto změny. Uspořádání odlišných ligandů do kontrolovaného fixního vzoru je náročné kvůli jejich malé velikosti, která je obvykle pod 10 nm. Jedním z možných přístupů, jak tohoto docílit je chemicky ukotvit ligandy do pole litograficky vyrobených nanodotů (litografie je technika mikro- a nano- výroby, která umožňuje vytváření přesných a komplikovaných dvojrozměrných nebo trojrozměrných struktur v extrémně malých měřítcích). Nanoimprintová litografie je založena na embosování (proces, při kterém se do materiálu vtiskne reliéf pro dodání třetího rozměru) filmu odolného vůči polymerům pomocí formy s trojrozměrnými reliéfními nanometrickými prvky. Vlastnosti formy, které se obvykle vyrábějí litografií pomocí elektronového paprsku, lze libovolně tvarovat a uspořádat.[32]

Příkladem využití této technologie je použití nanoimprintové litografie k výrobě zařízení, které umožnilo studovat, jak prostorová distribuce aktivujících ligandů reguluje funkci NK buněk. Byl navržen a vyroben čip technologií nanotisku skla sadami pravoúhle uspořádaných >10nm Au/Pd nanodotů, jejichž vzdálenost se pohybovala mezi 50 až 150 nm. Zlaté/palladiové nanodoty byly provázány s ligandy MICA a to nejprve potažením povrchu nanodotů thioly zakončenými kyselinou nitrilotrioctovou, a následnou chelatací kyseliny nitrilotrioctové pomocí niklu a konjugací MICA na vytvořený chelát. Poté byly NK buňky inkubovány na povrchu čipu po dobu 3 hodin a byla změřena průměrná promítaná plocha buněk (dvourozměrné plošné měření trojrozměrného objektu promítnutím jeho tvaru na libovolnou rovinu) na různá pole nanodotů, stejně jako na kontrolní oblasti. Bylo zjištěno, že pole 100 dotů na μm^2 a více stimulovalo šíření buněk. Dále byla studována role distribuce ligandu v imunitní aktivaci NK buněk. Za tímto účelem byly inkubované buňky obarveny fluorescenčně značenou protilátkou s lysozomálně asociovaným membránovým proteinem CD107a, který je běžně používaným markerem pro degranulaci NK buněk. Bylo zjištěno, že zatímco rozdělení dotů poli nemělo vliv na průměrné množství CD107a na buňku, do značné míry regulovalo procento CD107a pozitivních buněk v celkové populaci buněk na poli. Dále bylo pozorováno, že zvýšená populace buněk pozitivních na CD107a vyžadovala stejnou prahovou hodnotu 100 dotů na μm^2 , jako to bylo u buněčného šíření. Tato zjištění jasně dokazují, že prostorová distribuce aktivujících ligandů reguluje šíření a aktivaci NK buněk podobným způsobem.[35]

3.3.3. Ligandový mikrovzor

Nanodotování z předchozí části vyžaduje značnou znalost o sofistikované nanofabrikaci a speciální vybavení. To je biologům obvykle nepřístupné a metoda uvedena v kapitole 3.3.2. tak vyžaduje tak úzkou spolupráci s odborníky na nanofabrikaci. Mnoho studií zaměřených na pochopení role shlukování receptorů ve funkčních buněčných rozhraních, jako je imunitní synapse, navíc nevyžaduje prostorovou kontrolu odlišných ligandů. Ligandové mikrovzory napodobují shlukování ligandů uvnitř membrány cílových buněk. Takové shluky lze vyrobit například mikrokontaktním tiskem, také nazývaný měkká litografie. Mikrokontaktní tisk je založen na mechanickém přenosu molekulárního inkoustu z razítka polydimethylsiloxanu na cílový povrch. I když je mikrokontaktní tisk má však dvě nevýhody jednak každý ligand je na povrchu fyzicky pohlcován v pevné, ale náhodné orientaci a tato orientace nemusí být optimální pro rozpoznání jeho příbuzným receptorem; a jednak je obtížné kontrolovat povrchovou hustotu ligandů vzorovaných mikrokontaktním tiskem. Tyto

nevýhody lze řešit pomocí nepřímého vzorování, ve kterém jsou ligandy selektivně konjugovány s předpřipraveným mikrovzorem s požadovanými chemickými funkcemi. Konjugační chemie tak určuje prostorovou orientaci ligandů a ta je poté všude stejná napříč mikrovzorem, poskytuje ligandům zvýšenou flexibilitou a činí je dostupnějšími pro rozpoznávání receptorů. Hustotu ligandu v mikroprocesoru lze také určit podle hustoty konjugačních funkcí, kterou lze snáze kontrolovat.[32]

Jak mikrokontaktní tisk, tak inkoustový tisk jsou jednoduché a rychlé metody vzorování. Jejich využití je však omezeno na vlastnosti vzorů několika mikronů. Menší vzory mohou být vyrobeny litografií elektronovým paprskem nebo fotolitografií, avšak přeměna litografického vzoru na vzor antigenu vyžaduje místní selektivitu s požadovanými antigeny. To je dále komplikovanější v případě, když má požadovaný vzor napodobovat molekulární rozmanitost imunitní synapse a obsahovat tedy dva nebo více kontrolovatelně seskupené antigeny. Byl tedy navržen vzor, který by tohoto docílil. Vzorek byl složen ze zlatých disků obklopených oxidovaným titanovým filmem vyroben použitím negativní fotolitografie a leptání. Povrch oxidu titaničitého byl upraven pomocí alkylfosfonové kyseliny zakončené biotinem, ke kterému byl připojen neutravidin. Zlaté disky byly také pokryty thiolovou monovrstvou zakončenou kyselinou nitrilotrioctovou, ke které byl poté chelátován nikl. Nakonec byly selektivně připojeny dva různé ligandy – jeden značený biotinem a druhý histidinem. Antigeny použité k prokázání místní selektivity zahrnovaly MICA, monoklonální protilátku pro receptor NKp30, a dva falešné ligandy: myši IgG2a nebo malý modifikátor podobný ubikvitinu (SUMO). Byly připraveny čtyři typy bifunkčních povrchů: MICA na zlatě a myši IgG2a na oxid titaničitý, SUMO na zlatě a anti-NKp30 na oxid titaničitý, MICA na zlatě a anti-NKp30 na oxid titaničitý, a SUMO na zlatě a myši IgG2a na oxidu titaničitém. Místní selektivita byla potvrzena chemickou charakterizací různých oblastí pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie a také použitím fluorescenčně značených protilátek selektivně konjugovaných na vzorované ligandy. Dále byla provedena inkubace NK buněk na bifunkčních mikroprocesorech a ukázalo se, že geometrie a chemické složení těchto mikroprocesorů prostorově reguluje pohyblivost buněk. NK-buňky inkubované na povrchu typu MICA na zlatě a myši IgG2a na oxid titaničitý vykazovaly vyšší afinitu ke zlatým MICA diskům než k pozadí s funkcemi IgG2a. Naopak bylo zjištěno, že NK buňky inkubované na povrchu SUMO na zlatě a anti-NKp30 na oxid titaničitý měly vyšší afinitu k anti-NKp30 pozadí než k SUMO diskům. NK buňky byly úspěšně přichycené k oblastem s aktivačními antigeny. Bylo prokázáno, že bifunkční povrchy mohou prostorově vést imunitní aktivaci NK

buněk, což bylo zjištěno barvením CD107a na povrchu aktivovaných NK buněk s fluorescenční protilátkou. Ukázalo se, že na povrchu pokrytými aktivačními ligandy jich bylo více než 80 % CD107a-pozitivních buněk. Toto číslo kontrastovalo s méně než 40 % buňkami pozitivními na CD107a na povrchu pokrytém falešnými ligandy. Dále bylo zjištěno, že buňky aktivované na površích s falešnými ligandy produkovaly v průměru méně CD107a než buňky aktivované na površích s MICA nebo anti-NKp30. Tyto výsledky ukazují účinnost tohoto přístupu k výrobě a strukturování multifunkčních povrchů, které napodobují molekulární rozmanitost a prostorovou segregaci molekul na imunitní synapse NK buněk. Klíčovou výhodou tohoto přístupu je jednoduchost a modularita, která vychází z kombinace histidinu a biotinu. Oba jsou běžně používané značky a díky rozmanitosti dostupných proteinů a protilátek značených histidinem a biotinem je tato technologie vhodná pro různorodé výzkumy.[36]

3.3.4. Zařízení pro zachycení a řízení pohybu NK buněk

Buňky v kultuře mohou být vysoce heterogenní a je zapotřebí technologie k rozdělování a definování dílčích populací buněk, které reagují odlišně na stejné podněty prostředí. Jednotlivé buňky lze pozorovat optickým mikroskopem s vysokým rozlišením. Mikroskopie jednotlivých buněk je však složitá díky pohyblivosti buněk, protože pohyblivá buňka může snadno zmizet ze zorného pole mikroskopu. To lze vyřešit pomocí mikrozařízení pro fyzické zachycení jednotlivých buněk. Geometrii mikrojamek lze libovolně měnit pro úpravu cytotoxické odpovědi NK buněk.[32]

Jedna studie prokázala, že NK buňky uzavřené v jamkách 50 μm eliminovaly buňky rakoviny prsu efektivněji a rychleji než NK buňky uzavřené v jamkách 150 μm . Dále byly vyrobeny mikrojamky spojené mikrokanály, které umožňují migraci NK buněk mezi jamkami, a ukázalo se, že míra úmrtí cílových buněk v těchto mikrojamkách je vyšší než v izolovaných mikrojamkách.[37] Tvar mikro jamek lze také upravit pro dosažení požadovaného zachycování NK buněk. Další studie vytvořila mikrofluidní pole mikrojamek, která zachycují páry NK buněk a cílové buňky ve svislé orientaci. Taková orientace usnadnila studium imunitní synapse vytvořené ve vodorovné rovině mezi dvěma buňkami ve vysokém rozlišení. Pro efektivní uzavření buněk byly do jamek přidány mikrozachytávací funkce, což vedlo k současnému zachycení 3000 párů buněk s účinností plnění 70 %, což bylo dvakrát vyšší než u jednoduchého pole mikrojamek.[38]

3.3.5. Nanomateriály interagující s NK buňkami ve 3D prostoru

Pro řízení stimulačních funkcí NK buněk ve 3D, například prostřednictvím kontroly jejich shlukování, mohou být využity nanometrické struktury. Tyto struktury mohou být chemicky syntetizovány se specifickou velikostí, tvarem a chemickým složením řízeným na atomové úrovni a mohou být chemicky upraveny, např. stimulačními ligandy pro specifické interakce s buňkami. Kromě cíleného molekulárního dodávání se pro zlepšené zobrazování používají některé nanostruktury, například kvantové body, které mají silnou fluorescenční emisi.[32]

Slibnou aplikací nanomateriálů konjugovaných na NK buňky je cílené dodání těchto buněk do nádorové tkáně pro imunoterapeutické účely. Obecně nádorové tkáně vytvářejí prostředí, které stěžuje NK buňkám se k nádoru snadno dostat, a tím oslabuje jejich imunologickou účinnost. K překonání této překážky a umožnění účinného nábory NK buněk do místa nádoru můžeme NK buňky označit nanočásticemi oxidu železa potažené dopaminem. Magnetická povaha těchto nanočástic umožňuje jejich vedení směrem k místu nádoru vnějším magnetickým polem, které lze aplikovat pomocí invazivního magnetického zařízení. Konkrétně značené NK buňky poháněné magnetickým polem vykazovaly zvýšenou infiltraci do nádorové tkáně.[39]

3.3.6. Zařízení pro studii mechanické aktivity NK buněk

Buňky snímají fyzikální vlastnosti prostředí působením mechanických sil na prostředí a převáděním mechanických podnětů do biochemických signálů. Tyto podněty určují základní buněčné funkce, jako je adheze, pohyblivost, proliferace, diferenciaci a smrt. Kromě toho lymfocyty používají mechanické síly k rozlišení mezi zdravými a infikovanými nebo nádorovými buňkami. Imunoreceptory rozpoznávají antigeny pod mechanickým zatížením, aby od sebe rozlišily vysoce afinitními a nízko afinitními antigeny.[32]

Pro studium NK buněk byla vyvinuta možnost zkoumání mechanické aktivity buněk založena na nanodrátech. Byla vyrobena hustá pole vertikálních nanodrátů o průměru 50 nm a délce 20 μm pomocí chemické depozice v páře a pak byly nasazeny NK buňky. NK buňkám byly poskytnuty biochemické podněty obalením nanodrátů MICA ligandy. Ke studiu účinku mechanických a biochemických stimulů samostatně nebo v kombinaci byly NK buňky naneseny jak na nanodáty, tak na kontrolní ploché povrchy pokryté nanočásticemi zlata (holé povrchy, MICA a falešné ligandy). Bylo zjištěno, že NK buňky aplikují dostředivé síly na nanodráty. Navíc bylo objasněno, jak přítomnost nanovláken, MICA ligandů a jejich

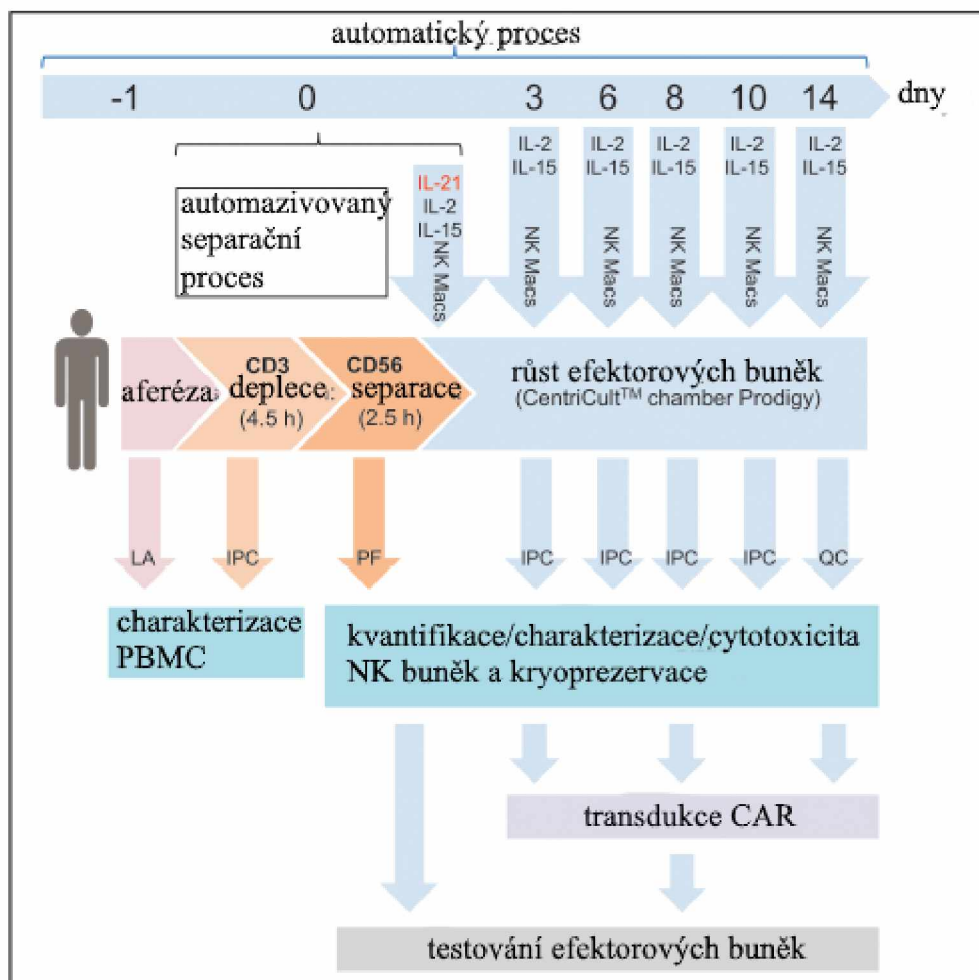
kombinace určuje imunitní funkci NK buněk. Pomocí fluorescenčně označených CD107a na povrchu aktivovaných buněk bylo zjištěno, že NK buňky mechanicky zkoumají své prostředí a vysoká mechanická shoda nanodrátů vytváří fyzický stimul, který v kombinaci s chemickým stimulem poskytovaným MICA spouští zvýšenou imunitní aktivaci NK buněk.[40]

4. Izolace NK buněk

NK buňky lze získat z několika různých zdrojů, včetně periferní krve, pupečnickové krve, embryonálních kmenových buněk a indukovaných pluripotentních kmenových buněk.[28]

4.1. Izolace a expanze NK buněk pomocí zařízení CliniMACS

Léčba akutní leukémie využívá efektu štěp vs. leukémie (GvL), do níž se zapojují NK buňky pro zesílení tohoto účinku (viz. Kapitola 5.2). Pro tyto infuze je zapotřebí, aby množství NK buněk dosahovalo alespoň 1.10^7 buněk/kg. To vedlo k vývoji aferézní technologie a zařízení CliniMACS[®]. V minulosti byl úspěšně vyvinut postup založený na správné výrobní praxi pro dvoustupňové procesy, a to kombinací imunomagnetického odstranění T lymfocytů $CD 3^+$ a separaci NK buněk $CD56^+$ pomocí zařízení CliniMACS Plus[®]. V současnosti se pracuje na vývinu vícekrokového výrobního procesu pomocí přístroje CliniMACS Prodigy[®], kde jsou získány NK buňky klinického stupně čistoty. Tento proces je proveden pomocí automatizovaného vyčerpání T lymfocytů skrze receptor α/β -CD19 a obohacení směsi pomocí NK $CD56^+$, po kterém následuje období expanze na základě automatického podavače krmných buněk, které vede k průměrné 850násobné expanzi NK buněk po dvou týdnech. NK buňky jsou dále geneticky upraveny pomocí virových vektorů tak, aby měli na svém povrchu chimérické antigenní receptory. Ty napomáhají NK buňce proti mechanismům nádorů imunitního úniku, a také ke zvýšení specifického cílení na rezistentní /maskující se rakovinné buňky. Schéma tohoto procesu je zobrazeno na Obrázku 5. Pro depleci buněk $CD3^+$ byly použity produkty nestimulované leukaferézy (LA) s následným imunomagnetickým obohacením buňkami $CD 56^+$. Poté byla provedena expanze izolovaných buněk $CD56^+ /CD3$, které tvořily pozitivní frakci (PF) v růstovém médiu NKMACS. Médium bylo nejprve doplněno interleukiny IL-21, IL-2 a IL-15 ve dni zahájení. Doplnění média následovalo ve dnech 3, 6, 8 a 10 s NKMACS médiem obohaceným o interleukiny IL-2 a IL-15. Vzorky byly odebírány každé 2–3 dny, a to jednak mezioperační kontrolní vzorky (IPC) a také kontrolní vzorky (QC). Byly provedeny testy pro kvantifikaci NK buněk, analýza funkčních efektorových buněk, hladiny exprese povrchových molekul, růstové parametry (glukóza, pH) a otestována vhodnost zamrazení. Aby se určilo vhodné časové období pro transdukcii, byly odebrány vzorky expandovaných NK buněk během fáze růstu ve dnech 2, 8 a 14. Taktéž byly odebrány buněčné vzorky pro analýzu bazální cytotoxicity NK buněk, degranulaci/sekreci cytokinů a detekci chimérického antigenního receptoru.[41]



Obr. 5: Schematický přehled automatizovaného procesu pro separaci a expanzi dárcovských NK buněk pomocí CliniMACS Prodigy[41]

4.2. Izolace NK buněk z PBMC

Protože NK buňky představují pouze přibližně 10 % PBMC, musí být většina přečištěných NK buněk namnožena *ex vivo*, aby se dosáhlo požadavků na klinické použití. Expanze a aktivace NK buněk vyžadují signály od jiných imunitních buněk, například monocytů. Nonseparační strategie obvykle využívá cytokiny, podpůrné buňky nebo jejich kombinaci, aby současně vyvolala expanzi a aktivaci NK buněk.[8] Podpůrné buňky jsou také účinné pro podporu produkce *ex vivo* NK buněk. PBMC kultivované s ozářenými autologně stimulovanými T lymfocyty kombinovanými s IL-2 a Picibanilem vedou k zisku NK buněk s přibližně 90 % čistotou za 20 dní.[42]

4.3. Izolace buněk z pupečnickové krve

Pupečnicková krev je důležitým buněčným zdrojem alogenních NK buněk a může být zachována po mnoho let technikou kryoprezervace. Pupečnicková krev jakožto zdroj má důležité výhody, jako je vhodnost pro alogenní použití a snadné získání. NK buňky izolované z pupečnickové krve vykazují stejnou kvalitu jako NK buňky derivované z periferní krve co se týče množství produkce INF- γ a TNF- α , jakož i expresi cytotoxických receptorů. Kromě toho mohou být NK buňky pupečnickové krve a NK buňky z periferní krve stimulovány stejnými IL-2, IL-7, IL-15, IL-18 a IL-21 pro expanzi *in vitro*.

Příkladem je studie založená na izolaci NK buněk z pupečnickové krve a měření jejich cytotoxických účinků na buňky rakoviny prsu. Pupečnicková krev (50 ml/jednotka) se navrství na separační médium gradientu hustoty Ficoll-Histopaque a odstředí se. Mononukleární buňky se odeberou na rozhraní a promyjí v PBS. Mononukleární buňky pupečnickové krve se poté kultivují v růstovém médiu RPMI-1640 doplněném o 500 IU/ml IL-2 po dobu 1 týdne. Následně se CD56⁺ NK buňky z mononukleární pupečnickové krve izolují pomocí imunomagnetické separace buněk. Buňky CD56⁺ CB-NK jsou opět kultivovány v růstovém médiu RPMI-1640, tentokrát doplněném o 500 IU/ml IL-2, 50 ng/ml faktoru kmenových buněk, 50 ng/ml CD135-3 a 40 ng/ml IL-15 cytokiny po dobu 1 týdne. NK buňky jsou po kultivaci promyty PBS a inkubovány směsí fykoerythrin (fotosyntetický pigment) konjugovanou anti-CD56 (ředění 1:10), fykoerythrin konjugovanou anti-CD314 (1:10) a izotypovou kontrolní protilátkou fykoerythrin konjugovanou IgG1 (1:10) po dobu 20 minut při 4 °C. Poté jsou buňky promyty PBS a exprese povrchových markerů je analyzována průtokovou cytometrií.

Cytotoxicita je analyzována inkubací s NK buněk s nádorovými buňkami v poměru 1:2 za přídavku reagentie pro proliferaci buněk (ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl) po dobu 30 minut při 37 °C a 5 % CO₂ a potom měřena spektrofotometricky při 450nm. Apoptóza je stanovena inkubací NK buněk s nádorovými buňkami v poměru 1:2 po dobu 4 hodin při 37 °C ve vlhké atmosféře v CO₂ inkubátoru. Stanovení profilu apoptózy je dosaženo pomocí kitu Muse® annexin V a mrtvých buněk, kvantitativní analýza apoptotických a nekrotických buněk je hodnocena pomocí analyzátoru Muse® Cell Analyzer založeném na fluorescenční analýze. Pro změření cytokinové produkce jsou NK buňky inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C ve vlhké atmosféře v CO₂ inkubátoru. Supernatanty jsou odebrány z NK buněk po inkubaci a hladiny Granzymu B a perforinu jsou měřeny pomocí komerčních souprav ELISA a následným změřením absorbance při 450 nm na čtečce mikrodestiček.

Po imunomagnetické separaci bylo naměřeno 99,59 % CD56⁺ v populaci NK buněk a exprese povrchových molekul CD314⁺ byla 99,48 %. Cytotoxicita NK buněk byla prokázána lýzou 57–60 % nádorových buněk v závislosti na druhu buňky. Apoptóza nádorových buněk se pohybovala mezi 35–50 % v závislosti na druhu buňky. NK buňky vyprodukovaly 50 ng/ml granzymu B and 80 ng/ml perforinu.[43]

5. Odolnost nádorových buněk proti cytotoxicitě NK buněk

NK buňky rozpoznávají nádorové buňky prostřednictvím dvou modelů. V prvním modelu ztráta molekul MHC gp I na nádorových buňkách vede ke ztrátě KIR a CD94 inhibičních signálů, což způsobuje aktivaci NK buněk. Tento model se nazývá „missing-self rozpoznávání“. V druhém případě se silně stimulované receptory vznikající poškozením buněk mohou navázat na aktivujícími receptory NK buněk a tím spustit jejich cytotoxicitu v modelu známém jako „rozpoznávání vyvolané stresem“.[8]

5.1. Missing-self rozpoznávání

Missing-self rozpoznávání je schopnost NK buněk napadat buňky, které nemají dostatečné množství hladiny molekul MHC gp I. na svém povrchu. Molekuly MHC jsou rozpoznávány inhibičními receptory přítomnými na NK buňkách a zapojení těchto receptorů zablokuje aktivaci cytotoxicity u NK buněk. Lidské NK buňky mají dva hlavní druhy MHC specifických receptorů, KIR a CD94. Inhibice není samospustitelná, je zapotřebí určitého množství stimulace aktivačními signály, než je inhibiční signál převáží a zastaví aktivaci NK buňky. NK buňky mají různé kombinace 3–5 inhibičních receptorů, a reagují na určité signály s různou intenzitou.[44]

5.2. Rozpoznávání vyvolané buněčným stresem

Buněčný stres vede k různorodým efektům na poškozené buňce, od snahy opravy až po apoptózu. V souvislosti s NK buňkami poškozené buňky exprimují ligandy pro receptor NKG2D, jehož signály převáží inhibiční MHC gp I signál a navozují aktivaci NK buněk. NKG2D receptor se také snadno váže na proteiny příbuzné MHC gp I, jako jsou MICA/MICB a ULBP. Tyto proteiny se na běžných buňkách nevyskytují, ale objevují se u nádorových a virově infikovaných buněk a jejich množství se zvyšuje u buněčného stresu. Dalším spouštěčem NK buněk je změna peptidu na MHC gp I vlivem proteinu teplotního šoku při infekci nebo zánětu, díky němuž NK buňky nerozpoznají poškozenou buňku jako tělu vlastní a napadnou ji.[45]

5.3. Nádorové antigeny

Nádorové buňky vznikají poruchou regulace dělení vyvolané mutacemi v onkogenech. Onkogeny běžně kódují signalizační proteiny, transkripční faktory a proteiny regulující buněčnou adhezivitu a apoptózu. To vede k nekontrolovanému dělení, kde rakovinné buňky poté opouštějí původní tkáň, přesunou se do jiných tkání a tam agresivně rostou a dělí se.

Proliferace buněk vede ke spuštění nádorové suprese imunitními buňkami s receptorem NKGD2. Replikační stres (způsobený zastavením replikačních vidlic) a DNA dvouřetězcové zlomy aktivují odpověď na poškození DNA v nádorových buňkách a prekancerózních lézích. Tato odpověď zvyšuje citlivost NKGD2 a CD226 ligandů. NK buňky jsou stimulovány proteinem p53, který urychluje procesy stárnutí a apoptózu v nádorových buňkách. Nádorové antigeny dělíme do dvou tříd: antigeny specifické pro nádory a antigeny asociované s nádory.[46]

5.3.1. Specifické nádorové antigeny

Antigeny specifické pro nádory (taktéž neoantigeny) se na jiných buňkách nevyskytují. Tyto unikátní antigeny jsou výsledkem náhodných somatických mutací vyvolaných fyzikálními nebo chemickými karcinogeny, a proto jsou neoantigeny jedinečné pro jednotlivé nádory. Nestabilita genomu rakoviny a následný selektivní tlak vedou k nahromadění mutací, což může vést k nesynonymním mutacím jako je záměna aminokyselin nebo vznik stopkodonu.[47]

S rozvojem technologií hlubokého sekvenování (proces, při němž se určuje primární struktura biopolymerů) je možné identifikovat mutace přítomné v proteinové části genomu (exomu) jednotlivých nádorů a tím předvídat potenciální neoantigeny. Technologie použité k identifikaci neoantigenů se ovšem podstatně liší v různých studiích a bude potřeba další optimalizace. Genetická analýza samotného nádoru, přijmeme-li omezení vyplývající ze zkoumání mutačního profilu nádoru v jedné biopsii, je poměrně robustní proces. Míra falešně negativních nálezů rakoviny analýzou neoantigenů pomocí sekvenování exomu je v porovnání s dřívějšími metodami identifikace nízká. Zároveň bylo však zjištěno pomocí objektivních screeningů, ve kterých byla celá kolekce identifikovaných mutací v nádoru předložena imunitním buňkám a bylo studováno, které mutace spustily aktivaci imunitního systému, že většina mutací v exprimovaných genech nevede k tvorbě neoantigenů, které jsou rozpoznávány imunitními buňkami. Z tohoto důvodu je nezbytný vývin technologie, kterou lze použít k filtrování dat exomu rakoviny, zejména u nádorů s vysokým počtem mutací.[48]

5.3.2. Antigeny asociované s nádory

Antigeny asociované s nádory se nacházejí jak u nádorových, tak klasických buněk, ale liší se v množství, času či místě exprese a využívají se jako pomocné diagnostické markery. Dělíme je se na sdílené a unikátní.

Sdílené antigeny lze rozdělit do 3 hlavních skupin: rakovina varlat, diferenciace tkání a široce se vyskytující nadměrně exprimované antigeny. Antigeny rakoviny varlat vychází z reaktivace genů, které jsou normálně neaktivní v dospělých tkáních, ale transkripčně se aktivují v různých nádorových histotypech. Řadíme mezi ně například MAGE-A1, NY-ESO-1 a SSX-2. Antigeny diferenciace tkání jsou taktéž jak v nádorech, tak i ve zdravých tkáních; vyskytují se většinou v melanomech a normálních melanocytech (Gp100, Melan-A/Mart-1, tyrosináza), stejně jako v epiteliálních tkáních a nádorech, jako je prostata (PSA) a karcinomy prsu (Mammaglobin-A). Nadměrně exprimované antigeny se hojně vyskytují na nádorových buňkách ve srovnání s normálními tkáněmi a dosahují prahové hodnoty pro rozpoznávání imunitními buňkami, což vede k porušení imunologické tolerance a spuštění protinádorové odpovědi. Do této skupiny patří například hTERT a tumor supresorové proteiny (např. p53). Karbohydrátové antigeny spojené s nádorem představují další třídu sdílených nádorových antigenů; jsou to glykany nadměrně exprimované nádory, které souvisí s různými fázemi vývoje rakoviny.[49]

5.4. Mechanismy nádorové obrany

Nádorové buňky mají řadu mechanismů, které využívají pro vyhýbání se či oslabení imunitní odpovědi. Nádory u pacientů jsou schopny přetrvávat v těle pacienta až několik let bez toho, aniž by byly zpozorovány imunitním systémem předtím, než se znovu projeví, a nádory mohou růst navzdory tomu, že hostitel má plně funkční imunitní systém. Jedním z těchto mechanismů je takzvaná imunoeditace, to jest vztah mezi nádorovými buňkami a buňkami imunitního systému. Během fáze eliminace je imunitní systém schopen rozpoznat a zničit nejvíce imunologicky zranitelné rakovinné buňky, protože obsahují nádorové antigeny. Kvůli genetické nestabilitě nádorů však konstantní dělení nádorových buněk dojde u některých buněk ke snížené imunogenicitě (schopnost buněk vyvolat imunitní odpověď). Tento stav produkce nových odolných variant nádorových buněk vyvážený imunitní eliminací starých nádorových buněk se nazývá „ekvilibrium“ (rovnovážný stav), během kterého se rakovinné buňky nadále dělí a hromadí mutační změny náhodně nebo v reakci na imunitní zánět. Tudíž je udržována rovnováha mezi imunitní kontrolou a růstem nádoru. Nakonec rakovinné buňky však převládnu nad imunitním systémem, a to skrze potlačení imunity nebo ztrátou cílového antigenu, kterým imunitní systém nádor rozpoznával. Tím imunoeditace přechází do fáze úniku nádoru, což vede ke zjevnému projevu klinické rakoviny. Existují však situace, za kterých jsou nádorové buňky v nečinnosti, například

během senescence (biologické stárnutí, kde dlouhodobé dělení vede k postupnému zhoršení funkce buněk). V tomto případě buňky zůstávají trvale neaktivní, protože replikační stárnutí je obecně nevratný proces.[50]

Nádorové buňky tedy podstupují rakovinou imunoeditaci, kdy buňky mutují specificky proti imunitnímu systému. Konkrétním příkladem je eliminace určitých epitopů, které buňky imunitního systému používají k rozpoznání nádoru. Mnoho nádorových buněčných linií uvolňuje rozpustné ligandy NKG2D prostřednictvím různých mechanismů, včetně alternativního sestřihu, štěpením zprostředkované fosfolipázou C, proteolytickým vylučováním či exosomální sekrecí. Uvolňování ligandů NKG2D z nádorových buněk vede k dramaticky nižším hladinám na buněčném povrchu, což snižuje jejich náchylnost k cytolyze a snižuje aktivitu NK buněk. Nádory exprimující aktivující ligandy, jako jsou ligandy NKG2D, mohou vyvolat zastavení nebo hyporesponzivitu NK buněk způsobenou chronickým zapojením aktivačních receptorů a tím jejich postupné oslabení, včetně ovlivnění reakcí zprostředkovaných jinými receptory než NKG2D. To nádorům umožní vyhnout se imunitnímu dohledu.[46]

Nádorové buňky exprimují některé proteiny, které naváží na inhibiční receptory NK buněk tak, aby přenášely inhibiční signály a vyhnuly se imunitnímu dohledu NK buněk. Inhibiční receptory PD-1 a TIM-3 v NK buňkách se mohou vázat na PD-1 ligand a Galektin-9 na nádorových buňkách.[8]

Existují podmínky, za kterých se NK buňky přítomné v buňkách lymfomu s deficitem MHC gp I dostanou do anergního stavu vůči nádorovým buňkám (tj. nejsou schopny reagovat na antigen, vůči kterému mají specifické receptory) i přesto, že NK buňky jsou běžně aktivovány u buněk s nedostatkem MHC gp I molekul na jejich povrchu. Následující studie použila buněčnou linii RMA, která je rezistentní vůči NK buňkám, a její příbuznou buněčnou linii RMA-S s deficitem povrchových molekul MHC gp I, kterou NK buňky běžně účinně zabíjejí. Nízké nebo střední dávky nádorových buněk RMA-S byly úspěšně zlikvidovány NK buňkami u syngenních myšiček (syngenní modely jsou transplantační modely získané injekcí příjemce specifického genetického pozadí buněčnými liniemi dříve vytvořenými izolací nádorových buněk od myši stejného genetického pozadí). Když však byly implantovány vysoké dávky RMA-S, u značné části myšiček byly posléze nalezeny solidní nádory. NK buňky v těsné blízkosti nádorů s deficitem MHC gp I měli poškozenou schopnost degranulovat nebo produkovat zánětlivé cytokiny po stimulaci *ex vivo* (tedy funkčně anergický stav). Anergie NK buněk byla také spojena se špatnou fosforylací intracelulárních kináz. Anergie NK buněk

byla zaznamenána jak v nádorovém lůžku, tak v nádorových lymfatických uzlinách, zatímco v distálních lymfatických uzlinách nebo ve slezině si NK buňky zachovaly svou funkčnost. Když byla obnovena exprese MHC I na buňkách RMA-S, nedocházelo k anergii NK buněk infiltrujících nádor. Z výsledků vyplývá, že NK buňky se stávají anergickými díky trvalé stimulaci poskytované buňkami s deficitem MHC gp I v nádorovém lůžku.

Využití prozánětlivých cytokinů k podpoře imunitního systému proti nádorovým buňkám bylo jedním z prvních příkladů rakovinné imunoterapie. Tento typ léčby je však účinný pouze u malé části pacientů a čelí problému, že cytokiny mohou být značně toxické účinky. Na základě zjištěných výsledků jsou nádory s deficitem MHC gp I lákavým cílem imunoterapie založené na cytokinech. Byl jistý předpoklad, že směs protizánětlivých cytokinů by mohla být schopna anergické NK buňky znovu uvést do funkčního stavu. Proto byla myším se solidními nádory podána buď směs IL-12 s IL-18, nebo mutovaná forma IL-2 (takzvaný „superkin“ H9), který je schopný fungovat nezávisle na α řetězci IL-2 receptoru. Obě léčby vedly ke značně vyššímu počtu myší, které přežily napadení nádory s deficitem MHC gp I a účinky této léčby byly zprostředkovány výhradně NK buňkami. To poukazuje na novou možnost použití prozánětlivých cytokinů v kontextu nádorové imunoterapie (viz kapitola 6.1). Toxicitu cytokinové terapie lze do určité míry zmírnit použitím upravených cytokinů, které vykazují nižší cytotoxicitu. Kombinace cytokinů s ostatními terapiemi, jako je inhibice checkpoint receptorů nebo KIR s NK buňkami jsou předmětem studií.[51]

6. Příklady použití NK buněk v protinádorové imunoterapii

Léčba nádorů zahrnuje chirurgické odstranění, chemoterapie nebo radioterapie. Imunoterapie je léčebný postup založený na indukci protinádorové imunity nebo na využití imunitních mechanismů k cílenému směřování léčiv do místa nádoru.[3]

V současné době rozeznáváme tři skupiny protinádorových imunoterapií využívajících NK buňky: adoptivní NK buněčná terapie, užití NK buněk v terapii haploidentické transplantace krvetvorných buněk (haplo-HSCT) proti leukémii a monoklonální protilátky inhibující checkpoint receptory v NK buňkách.

6.1. Adoptivní terapie

Adoptivní terapie je založená na izolaci vlastních oslabených imunitních buněk pacienta, které jsou následně aktivovány, rozmnoženy a pak navraceny do těla pacienta. U pacientů s rakovinou vykazují NK buňky poškozenou aktivitu. Proto je posílení přirozené protinádorové aktivity NK buněk v organismu primárním zaměřením imunoterapií.[6] Jeden ze způsobů, jak tohoto docílit, je založen na *in vivo* správě cytokinů zodpovědné za aktivaci, dělení a šíření NK buněk, jako jsou například IL-2 a IL-15.[52] Dva problémy asociované s IL-2 terapií jsou dávková cytotoxicita (způsobující Vascular Leak Syndrome) a aktivace T regulačních lymfocytů, které inaktivují funkce NK buněk.[6] Proto byly vyvinuty varianty IL-2 s nižší afinitou k podjednotce IL-2R α (které jsou silně exprimovány T regulačními lymfocyty).[53] Polyethylenglykolenový IL-2 (nazývaný také NKTR 214), který je přítomen u obou T lymfocytů a NK buněk posiluje jejich protinádorovou odpověď a tato terapeutická léčba je nyní předmětem klinických zkoušek u osob se solidními nádory.[54]

IL-15 je speciální cytokin gama řetězce převážně dendritických buněk, který je exprimován buď na stejné buňce (cis-prezentace) nebo jiné buňce (trans-prezentace). V reakci na lipopolysacharidy nebo gram-negativní bakterie je cis-prezentace nezbytná pro aktivaci NK buněk.[55] IL-15 hraje důležitou roli ve vývoji, homeostáze a cytotoxicitě NK buněk. V *in vivo* podmínkách může být IL-15 trans-prezentován NK buňkám prostřednictvím několika typů buněk, včetně monocytů, makrofágů a DC.[56] IL-15 je tedy vhodnější možnost než IL-2 díky selektivitě na NK buňky bez aktivace T regulačních lymfocytů, má ovšem omezené

klinické využití díky krátkému poločasu života v organismu.[57] První klinická studie zkoumající lidský jednořetězcový rekombinantní IL-15 odhalila, že bolusová intravenózní infuze (menší množství tekutiny je podané injekční stříkačkou) vyvolala redistribuci a rozmnožení cirkulujících NK buněk a T lymfocytů efektorové paměti CD8 a vedla ke čtyřnásobnému až osminásobnému zvýšení počtu buněk; byla však také detekována intenzivní sekrece cytokinů. Hlavní příčinou tohoto vedlejšího účinku byly IL-2 a IL-15, které ve svých receptorech sdílejí společné β a γ řetězce.[8][58] Proto bylo vyvinuto několik fúzních proteinů pro zlepšení účinnosti a prodloužení poločasu IL-15. Fúzní protein dsNKG2D IL-15 má zvýšenou schopnost cílit na NK buňky a vykazuje posílenou schopnost potlačovat růst nádoru rakoviny lidského žaludku.[59] Spojení chimérického proteinu IL-15 s IL-15R α , také nazývaná heterodimerní IL 15, vykazuje zlepšenou schopnost podporovat NK buňky a potlačovat nádory.[60] Substituce asparaginu kyselinou asparagovou v aminokyselině 72 může v IL-15 významně prodloužit poločas rozpadu heterodimerního superagonisty (účinek posilující) ALT 803 o téměř 25 hodin. *In vivo* ALT-803 vykazuje téměř 25násobné zvýšení biologické aktivity ve srovnání s aktivitou IL-15. ALT-803 také vykazuje zvýšenou schopnost podporovat cytotoxicitu NK buněk a zlepšit potlačování nádorů u rakoviny vaječníků a myeloidní leukémie.[61] ALT-803 je studován jak samostatně[62], tak v kombinaci s checkpoint inhibitory.[63]

Výzkum se také zabývá bi- a tri- specifickými protilátkami vytvořené rekombinací (BiKE/TriKE), které zlepšují cílení a cytotoxicitu NK buněk. Tato technologie se spoléhá na specifické nádorové antigeny a specifické markery efektorové buňky. Protilátkou je inovativní imunoglobulin s upravenou Fab nebo Fc částí. V těchto protilátkách jsou kombinovány dva nebo tři fragmenty Fab proti receptorům antigenu nebo efektorových buněk spojených s nádorem. Tyto protilátky slouží jako specifické zesílení mezi nádorovou a efektorovou buňkou, což vede k lepšímu propojení. CD16 receptory na NK buňkách pak mají obzvlášť silný potenciál na zprostředkování tohoto zesílení, díky nimž se zvyšuje interakce mezi NK buňkou a nádorovou buňkou. TriKE v sobě obsahují modifikovaný IL-15 spojník na lepší proliferaci NK buněk.[64] Aktivované NK buňky se CD16 zbavují pomocí metaloproteázy zvané ADAM17. Následná kombinace BiKE s inhibítorem ADAM17 zlepšuje terapeutickou účinnost. Léčba NK buňkami u pacientů s myelodysplastickými syndromy může z neschopnost a výrazně zvýšit degranulaci a produkci cytokinů IFN- γ a TNF- α . [65]

V rané fázi adoptivního výzkumu buněčného přenosu byly cytokiny, jako například IL-2 a IL-15, aplikovány na NK buňky před přenosem. Tato metoda má však dva problémy: zaprvé, IL-2 nebo IL-15 může indukovat apoptózu NK buněk při kontaktu s citlivou cílovou buňkou nebo vaskulárním endotelem. Za druhé, metody používající jediný cytokin vedly pouze k 10–20násobné expanzi NK buněk, což je nedostačující. Začalo se tedy využívat podpůrných buněk k posílení NK buněk. Jako podpůrných buněk se používá mnoho typů původních nebo geneticky modifikovaných buněk, jako jsou PBMC, lymfoblastoidní buněčné linie transformované virem Epstein-Barrové a geneticky modifikovaný K562-exprimující membránově vázaný IL-15 nebo 41BB ligand. Použití podpůrných buněk výrazně zvyšuje účinnost expanze NK buněk. Kombinace podpůrných buněk a cytokinů může účinněji spustit množení a aktivaci NK buněk, pohybující se v rozmezí od 100 do 40 000krát ve 2–3 týdnech. Ošetřené NK buňky však mohou být postupem času vyčerpány, což ukazuje na urychleném stárnutí expandovaných NK buněk. To může být odvráceno nadměrnou expresí genu telomerázy reverzní transkriptázy.[8] Použití podpůrných buněk k výrobě NK buněk mohou mít potenciální rizika infúze, jelikož jsou před použitím letálně ozářeny. Proto byla stanovena řada detekčních opatření tomuto problému zabránit, včetně sledování rychlosti růstu podpůrných buněk a detekce přítomnosti životaschopných podpůrných buněk.[66] Dalším zdrojem NK buněk je i plurální tekutina primárních nebo metastázických tumorů obsahujících velké množství funkčních NK buněk[67], které nabydou silné cytotoxicity po kultivaci s IL-15 či IL-2 *in vitro*. Protože se pravidelně zbavujeme velkého množství těchto tekutin, NK buňky by mohly být extrahovány a znovu použity systémově či v pohrudnicové dutině v kultuře s IL-15.[52]

6.2. Terapie haploidentickou transplantací krvetvorných buněk proti leukémii

NK a další buňky vrozené imunity hrají významnou roli v léčbě vysoce agresivních leukémií. Haploidentické krvetvorné buňky různých zdrojů zvyšují vznik ILC, převážně ILC3. ILC3 přispívají k opravě a regeneraci lymfoidních tkání a hrají významnou roli v integritě těchto tkání, které jsou vážně ohroženy chemo či radio terapií u pacientů před HSCT.[68]

Infúze silných efektorových buněk s protinádorovou aktivitou je důležitým postupem při nádorové imunoterapii, protože výrazně zesilují účinek endogenních buněk. T lymfocyty nesoucí řetězce α/β receptoru TCR jsou podmnožinou lymfocytů odpovědnou za výskyt

GvHD a proto jejich eliminace umožňuje předcházet vzniku této život ohrožující komplikace. Selektivní fyzické odstranění $\alpha\beta^+$ T lymfocytů umožňuje poskytnout funkční $\gamma\delta$ T buňky a aloreaktivní NK buňky, které mohou brzy po transplantaci vyvinout svoji antileukemickou aktivitu, čímž se snižuje riziko rychlých relapsů leukémie v případech částečných odpovědí na režim léčby a/nebo v rychle se množících leukémiích.[69] HSCT je léčba vhodná u pacientů špatně reagujících na chemoterapii, relapsující pacienty či u pacientů s nepříznivými cytogenetickými charakteristikami. Šance k úspěšnému nalezení dárce, který je HLA kompatibilní s pacientem je ovšem relativně nízká.

Pro pacienty bez jiné možnosti léčby tedy byla vytvořena haploidentická HSCT zbavena T lymfocytů. Haplo-HSCT je založena na infúzi vysokého množství $CD34^+$ buněk očištěných od T lymfocytů za účelem vyhnutí se nebezpečné až smrtelné GvHD reakci. V transplantačním prostředí mohou NK buňky aloreaktivních dárců obsahovat KIR, které nerozpoznávají žádné z MHC gp I alel pacienta a ničí zbytkové leukemické buňky.[70] NK buňky jsou prvními detekovatelnými lymfoidními buňkami v periferní krvi po transplantaci. V krvi pediatrických pacientů se poté dají zaregistrovat zhruba za dva týdny. Tyto NK buňky jsou však převážně zastoupeny relativně nezralými $CD56^{\text{bright}}$ buňkami, exprimujícími NKG2A receptory ale ne KIR (exprese KIR je vyžadována pro aloreaktivitu NK buňky). Měřitelné množství dospělých KIR^+ NK buněk vyžaduje dalších 4 až 6 týdnů. V tomto uspořádání HSCT zbaveném T lymfocytů mají NK buňky hlavní roli v reakci GvL.[71]

Ve snaze překlenout mezeru mezi transplantací a tvorbou dospělých KIR^+ aloreaktivních NK buněk byla vytvořena štěpová manipulace. Tato manipulace se štěpem se provádí za účelem definování a optimalizace objemu a buněčného složení zdrojů kmenových buněk, jako jsou produkty aferézy, kostní dřeně a pupečnickové krve. Deplece $CD3^+$ T lymfocytů poskytuje téměř nedotčené štěpy s antileukemickými efekty (tj. NK buňkami), což umožňuje rychlé štěpení a spolehlivou prevenci GvHD. Nízké hodnoty tkáňových paměťových T lymfocytů po haplo-HSCT v kombinaci s toxicitou a intenzitou redukuje kondičionální režimy pacientů (léčby používané k přípravě pacienta na transplantaci kmenových buněk). Musí být zajištěno, aby během inkubačního procesu všechny buňky přišly do styku s činidlem CD3, aby se zabránilo neznačeným T lymfocytům, které mohou výrazně narušit výsledek deplece.[72] Dále se využívá selektivní deplece T buněčných receptorů (TCR), $\alpha\beta$ T lymfocytů (způsobující GvHD) a B lymfocytů (zabraňuje B lymfocytům v tvorbě maligních nádorů u pacientů s oslabenou imunitou). Tato štěpová manipulace obsahuje mononukleární buňky, a to jak haploidentické krvetvorné buňky

(zahrnující CD34⁺ a CD34⁻ prekurzory), tak i efektorové buňky jako jsou dospělé CD56^{DIM} NK buňky a TCR $\gamma\delta$ T lymfocyty, obě s účinky proti leukémii.[69][73][74] Nepředpokládaným zjištěním bylo, že aloreaktivita NK buněk zdánlivě nehraje v této léčbě příliš velkou roli.[75] Zatímco je možné, že aloreaktivita NK buněk byla utlumena GvL efektem $\gamma\delta$ T buněk, které byly posíleny *in vivo* díky využití kyseliny zoledronové.[76], není možné vyloučit ani ostatní mechanismy, které mohli narušit NK aloreaktivitu. Supresorové buňky zbavené myeloidních prekurzorů (MDSC), hojně se vyskytující ve štěpu, vykazují potentní inhibiční účinek vůči NK buňkám.[78] Zavedení dalších kroků u manipulace štěpu k očištění od MDSC vede k ochraně NK buněk a tím ke zlepšení klinických výsledků, zvláště proti leukemickému relapsu zodpovědné za 25% úmrtí pacientů.

6.3. Terapie monoklonálními protilátkami inhibujícími checkpoint receptory v NK buňkách

Zatímco KIR a CD94 se ustáleně exprimují na povrchu zralých NK buněk, exprese ostatních inhibičních checkpointů podílejících se na homeostázi imunitních odpovědí (PD-1, TIGIT, TIM-3, CD96) může být navozena.[6] Tyto *de novo* exprimované checkpoint regulátory inhibují funkci NK buněk po interakci jejich ligandů na nádorových buňkách.[67][77] PD-1 je hlavním checkpoint receptorem podílejícím se na kontrole imunitní odpovědi a představuje průlom v léčbě agresivních nádorů při terapeutickém využití blokujících protilátek narušujících strukturu PD-1/PD-L1. Zatímco PD-1 exprese byla poprvé zaznamenána v T lymfocytech, později byly nalezeny i v NK buňkách u pacientů s patologickými kondicemi, například v cytomegalovirových infekcích a nádorech. Exprese PD-1 NK buňkami je nerovnoměrná; NK buňky periferní krve získané jak od zdravých donorů, tak od pacientů s rakovinnými buňkami, měli velmi nízké až žádné množství PD-1. Na druhou stranu nezralé PD-1 NK buňky byly hojně nalezeny v ascitické tekutině (tekutina hromadící se v břiše) pacientů s nádorem vaječnicků[77] i v pleurálních (prostor pohrudnice) výpotcích pacientů s primárními a metastatickými nádory[67] a v Hodgkinově lymfomě. PD-1 mRNA (messenger ribonukleová kyselina) i PD-1 protein se nachází v cytoplazmě NK buněk izolovaných od zdravých dárců[79], ovšem jejich molekulární mechanismy vedoucí k povrchové expresi nejsou v tuto chvíli známy a vyžadují budoucí výzkum.

Za fyziologických podmínek se PD-1 chová jako brzda v regulaci imunitní odpovědi a má významnou roli v uvedení do chodu a údržbě T lymfocytové tolerance. V případě pacientů s rakovinou ovšem může oslabit T lymfocytární a NK buněčnou reakci proti

rakovinným buňkám. V těchto případech vysokou efektivnost vykazuje imunoterapie využívající mAb narušující PD-1/PD-L1 interakci, zvláště pak u pacientů s melanomem a plicními nádory, kde na léčbu pozitivně reagovalo 20-40 % pacientů v závislosti na jednotlivých klinických testech. Terapeutická blokáda checkpoint receptorů inhibujících NK buňky by taktéž mohla být účinná proti MHC gp I^{neg} tumoru, což je stav, který často nastává u metastatických karcinomů (jakožto výsledek úniku nádoru kontrole řízené T lymfocyty).[80][81] Pro převážnou většinu pacientů však není anti-PD-1/PD-L1 léčba vhodná. Vysoká cena léčby a vedlejší účinky ztěžují odhad klinické odpovědi pacienta na PD-1/PD-L1 blokády. Je tedy důležité ohodnotit PD-L1 expresi na nádorových buňkách. Tyto odhady jsou však nedostačující z důvodů technických limitací, jako je použití jiných druhů mAb, odlišných diagnostik (biopsie vs. chirurgický vzorek, cytologie) a různých pracovníků.[82][83][84] Z těchto důvodů jsou v nynější době výzkumy zaměřeny na identifikaci a cílení dalších checkpointů jak samostatně, tak v kombinaci. V tomto kontextu je předmětem výzkumu potenciál blokování TIGIT, TIM-3, CD96 a LAG-3. Jedním z těchto studií je využití anti-CD94 blokujících mAb v nádorové terapii.[85] Přes 50 % NK buněk periferní krve má CD94 receptory s buď CD56^{bright} nebo CD56^{dim} fenotypem. Zatímco buňky s CD56^{bright} jsou primárními cytokinovými producenty, CD56^{dim} buňky taktéž vykazují potentní cytolytickou aktivitu a úpravu dendritických buněk.[6] Blokování CD94 uvolní nejen NK buňky, ale taktéž tumor infiltrující T lymfocyty s možnou protinádorovou aktivitou. CD94 ligand HLA-E se vyskytuje v mnoha agresivních nádorech (plicní, hlavový a krční, tlustého střeva, slinivky břišní a jater). Převážné množství buněk těchto nádorů jsou HLA E⁺, a proto by blokáda CD94 mohla vyústit v potentní protinádorový účinek v různých typech rakoviny. U nádorů exprimujících jak HLA E tak PD L1 může kombinovaná inhibice CD94 a PD-1/PD-L1 struktur zesílit cytotoxicitu NK buněk a ochránit funkci T lymfocytů. V kombinované léčbě taktéž došlo k zvýšené proliferaci a indukci paměťových T lymfocytů. U HLA-E nádorů s antigeny spojenými s tumory může vést blokáda CD94 ke zvýšené terapeutické účinnosti ostatních mAb (například anti-receptor epidermálního růstového faktoru mAb), které upřednostňují aktivaci NK buněk přes ADCC zprostředkovanou CD16.[85][86]

ZÁVĚR

NK buňky jsou nepostradatelné v moderní léčbě nádorů. Jejich schopnost rychle reagovat na nádorové buňky bez předchozí stimulace, proliferace či diferenciaci. To z nich dělá primární kandidáty pro výzkum a postupné zařazení do protinádorových terapií. NK buňky jsou schopny interakce s ostatními součástmi imunitního systému, kde mohou regulovat T a B lymfocyty a taktéž interagují s buňkami jako jsou monocyty, dendritické buňky a makrofágy. NK buňky mají širokou škálu aktivačních a inhibičních receptorů pro rozpoznání zhoubných buněk od buněk těla vlastních, jakož i speciální checkpoint receptory. Taktéž je možné genetickým inženýrstvím vytvořit účinné chimérické antigenní receptory pro dosažení vylepšených protinádorových schopností. Tyto receptory jsou stále aktivně studovány různými technikami, od průtokové cytometrie po specifické pokročilé materiály a zařízení, jako je lipidová dvojvrstva se zabudovanými ligandy, nanodoty, ligandový mikrovzor, fyzické zadržování NK buněk, 3D nanomateriály či zařízení pro studii mechanické aktivity. NK buňky je možné izolovat z různých buněčných zdrojů včetně dostupné periferní krve a pupečnickové krve, či embryonálních kmenových buněk a pluripotentních kmenových buněk pomocí několika technik, jako je zařízení CliniMACS[®] či imunomagnetickou separací a následně fluorescenčně analyzovány. Nádorové buňky se brání NK buněčnému rozpoznání (kde NK buňky využívají „missing-self“ rozpoznávání nebo rozpoznávání buněčným stresem pro rozpoznání specifických nádorových antigenů nebo antigenů asociovaných s nádory) různými mechanismy, jako je imunoeditace, ztráta povrchových molekul nebo oslabení až kompletní utlumení aktivovaných NK buněk. I přesto jsou NK buňky úspěšně využívány v nádorových terapiích, jako je adoptivní terapie pomocí upravených cytokinů a BiKE/TriKE protilátek, terapie haploidentickou transplantací krvetvorných buněk pro léčbu některých druhů leukémie (kde jsou NK buňky uplatňovány díky jejich schopnosti nevyvolávat život nebezpečnou GvHD reakci), či terapie pomocí monoklonálních protilátek inhibujících checkpoint receptory NK buněk jako je PD-1/PD-L1. NK buňky a jejich mechanismy i přesto nejsou stále dokonale prozkoumány a jejich využití v léčbě rakovinných nádorů bude s největší pravděpodobností stoupat i do budoucnosti.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] SUNG, Hyuna, Jacques FERLAY, Rebecca L. SIEGEL, Mathieu LAVERSANNE, Isabelle SOERJOMATARAM, Ahmedin JEMAL a Freddie BRAY, 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. **71**(3), 209-249 [cit. 2021-6-22]. ISSN 0007-9235.
- [2] ROSENBERG, Jillian a Jun HUANG, 2018. CD8 T cells and NK cells: parallel and complementary soldiers of immunotherapy. *Current Opinion in Chemical Engineering* [online]. **19**, 9-20 [cit. 2021-6-22]. ISSN 22113398.
- [3] HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ, 2009. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9.
- [4] GEIGER, Theresa L a Joseph C SUN, 2016. Development and maturation of natural killer cells. *Current Opinion in Immunology*. **39**, 82-89. DOI: 10.1016/j.coi.2016.01.007. ISSN 09527915.
- [5] FREUD, Aharon G., Jianhua YU a Michael A. CALIGIURI, 2014. Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Seminars in Immunology*. **26**(2), 132-137. DOI: 10.1016/j.smim.2014.02.008. ISSN 10445323.
- [6] VACCA, Paola, Gabriella PIETRA, Nicola TUMINO, Enrico MUNARI, Maria Cristina MINGARI a Lorenzo MORETTA, 2020. Exploiting Human NK Cells in Tumor Therapy. *Frontiers in Immunology*. **10**(3013), 1-8 [cit. 2020-02-29]. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03013. ISSN 1664-3224.
- [7] CAROTTA, Sebastian, 2016. Targeting NK Cells for Anticancer Immunotherapy: Clinical and Preclinical Approaches. *Frontiers in Immunology*. **7**, 1-10. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00152. ISSN 1664-3224.
- [8] FANG, Fang, Weihua XIAO a Zhigang TIAN, 2017. NK cell-based immunotherapy for cancer. *Seminars in Immunology*. **31**, 37-54. DOI: 10.1016/j.smim.2017.07.009. ISSN 10445323.
- [9] CHESTER, Cariad, Katherine FRITSCH a Holbrook E. KOHRT, 2015. Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. **6**, 1-9. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00601. ISSN 1664-3224.
- [10] VIVIER, E., D. H. RAULET, A. MORETTA, M. A. CALIGIURI, L. ZITVOGEL, L. L. LANIER, W. M. YOKOYAMA a S. UGOLINI, 2011. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*. **331**(6013), 44-49. DOI: 10.1126/science.1198687. ISSN 0036-8075.
- [11] GASTEIGER, Georg a Alexander Y. RUDENSKY, 2014. Interactions between innate and adaptive lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* [online]. **14**(9), 631-639 [cit. 2021-6-22]. ISSN 1474-1733.

- [12] LONG, Eric O., Hun SIK KIM, Dongfang LIU, Mary E. PETERSON a Sumati RAJAGOPALAN, 2013. Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annual Review of Immunology*. **31**(1), 227-258. ISSN 0732-0582.
- [13] ZHOU, Zhixia, Cai ZHANG, Jian ZHANG, Zhigang TIAN a Jacques ZIMMER, 2012. Macrophages Help NK Cells to Attack Tumor Cells by Stimulatory NKG2D Ligand but Protect Themselves from NK Killing by Inhibitory Ligand Qa-1. *PLoS ONE* [online]. **7**(5), 1-12 [cit. 2021-6-21]. ISSN 1932-6203.
- [14] MICHEL, Tatiana, François HENTGES a Jacques ZIMMER, 2013. Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Frontiers in Immunology* [online]. **3**, 1-6 [cit. 2021-6-21]. ISSN 1664-3224.
- [15] DAVIS, Zachary B., Martin FELICES, Michael R. VERNERIS a Jeffrey S. MILLER, 2015. Natural Killer Cell Adoptive Transfer Therapy. *The Cancer Journal*. **21**(6), 486-491. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000156. ISSN 1528-9117.
- [16] CROUSE, Josh, Haifeng C. XU, Philipp A. LANG a Annette OXENIUS, 2015. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends in Immunology* [online]. **36**(1), 49-58 [cit. 2021-6-1]. ISSN 14714906.
- [17] GYUROVA, Ivayla E., Ayad ALI a Stephen N. WAGGONER, 2020. Natural Killer Cell Regulation of B Cell Responses in the Context of Viral Infection. *Viral Immunology* [online]. **33**(4), 334-341 [cit. 2021-6-22]. ISSN 0882-8245.
- [18] JAEGER, B. N. a E. VIVIER, 2012. Natural Killer Cell Tolerance: Control by Self or Self-Control? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **4**(3), 1-12 [cit. 2021-5-17]. ISSN 1943-0264.
- [19] JONCKER, Nathalie T., Nataliya SHIFRIN, Frédéric DELEBECQUE a David H. RAULET, 2010. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *The Journal of Experimental Medicine*. **207**(10), 2065-2072. DOI: 10.1084/jem.20100570. ISSN 1540-9538.
- [20] ELLIOTT, Julie M., Joseph A. WAHLE a Wayne M. YOKOYAMA, 2010. MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *The Journal of Experimental Medicine*. **207**(10), 2073-2079. DOI: 10.1084/jem.20100986. ISSN 1540-9538.
- [21] ORR, Mark T, William J MURPHY a Lewis L LANIER, 2010. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nature Immunology*. **11**(4), 321-327. DOI: 10.1038/ni.1849. ISSN 1529-2908.
- [22] PENG, Hui, Xiaojun JIANG, Yonglin CHEN, et al., 2013. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. **123**(4), 1444-1456. DOI: 10.1172/JCI66381. ISSN 0021-9738.

- [23] FEHNIGER, Todd A. a Megan A. COOPER, 2016. Harnessing NK Cell Memory for Cancer Immunotherapy. *Trends in Immunology*. **37**(12), 877-888. DOI: 10.1016/j.it.2016.09.005. ISSN 14714906.
- [24] ROMEE, Rizwan, Maximillian ROSARIO, Melissa M. BERRIEN-ELLIOTT, et al., 2016. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Science Translational Medicine*. **8**(357), 1-13. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf2341. ISSN 1946-6234.
- [25] WU, Ning a André VEILLETTE, 2016. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Current Opinion in Immunology* [online]. **38**, 45-51 [cit. 2021-03-13]. ISSN 09527915.
- [26] ALARI-PAHISSA, Elisenda, Camille GRANDCLEMENT, Beena JEEVAN-RAJ a Werner HELD, 2014. Inhibitory Receptor-Mediated Regulation of Natural Killer Cells. *Critical Reviews in Immunology* [online]. **34**(6), 455-465 [cit. 2021-03-13]. ISSN 1040-8401.
- [27] ZITVOGEL, Laurence a Guido KROEMER, 2014. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *OncoImmunology*. **1**(8), 1223-1225. DOI: 10.4161/onci.21335. ISSN 2162-402X.
- [28] KIM, Nayoung, Dong-Hee LEE, Woo Seon CHOI, Eunbi YI, HyoJeong KIM, Jung Min KIM, Hyung-Seung JIN a Hun Sik KIM, 2021. Harnessing NK cells for cancer immunotherapy: immune checkpoint receptors and chimeric antigen receptors. *BMB Reports* [online]. **54**(1), 44-58 [cit. 2021-03-15]. ISSN 1976-670X.
- [29] QIU, Tianyi, Han XIAO, Qingchen ZHANG, et al., 2015. Proteochemometric Modeling of the Antigen-Antibody Interaction: New Fingerprints for Antigen, Antibody and Epitope-Paratope Interaction. *PLOS ONE* [online]. **10**(4), 1-15 [cit. 2021-03-24]. ISSN 1932-6203.
- [30] BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK, 2005. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 1. Praha: Grada. ISBN 80-247-0691-1.
- [31] BRYCESON, Yenan T., Cyril FAURIAT, João M. NUNES, Stephanie M. WOOD, Niklas K. BJÖRKSTRÖM, Eric O. LONG a Hans-Gustaf LJUNGGREN, 2010. Functional Analysis of Human NK Cells by Flow Cytometry. *Natural Killer Cell Protocols*. 2010-11-9, **612**, 335-352. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-60761-362-6_23. ISBN 978-1-60761-361-9.
- [32] LE SAUX, Guillaume a Mark SCHVARTZMAN, 2019. Advanced Materials and Devices for the Regulation and Study of NK Cells. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(3), 1-22 [cit. 2021-6-25]. ISSN 1422-0067.
- [33] LIU, Dongfang, Yenan T. BRYCESON, Tobias MECKEL, Gaia VASILIVER-SHAMIS, Michael L. DUSTIN a Eric O. LONG, 2009. Integrin-Dependent Organization and Bidirectional Vesicular Traffic at Cytotoxic Immune Synapses. *Immunity* [online]. **31**(1), 99-109 [cit. 2021-6-25]. ISSN 10747613.

- [34] ABEYWEERA, Thushara P., Ernesto MERINO a Morgan HUSE, 2011. Inhibitory signaling blocks activating receptor clustering and induces cytoskeletal retraction in natural killer cells. *Journal of Cell Biology* [online]. **192**(4), 675-690 [cit. 2021-6-25]. ISSN 1540-8140.
- [35] KEYDAR, Yossi, Guillaume LE SAUX, Ashish PANDEY, et al., 2018. Natural killer cells' immune response requires a minimal nanoscale distribution of activating antigens. *Nanoscale* [online]. **10**(30), 14651-14659 [cit. 2021-6-26]. ISSN 2040-3364.
- [36] LE SAUX, Guillaume, Avishay EDRI, Yossi KEYDAR, Uzi HADAD, Angel PORGADOR a Mark SCHVARTZMAN, 2018. Spatial and Chemical Surface Guidance of NK Cell Cytotoxic Activity. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. **10**(14), 11486-11494 [cit. 2021-6-26]. ISSN 1944-8244.
- [37] XU, Yuanhao, Shufan ZHOU, Yun Wah LAM a Stella W. PANG. Dynamics of Natural Killer Cells Cytotoxicity in Microwell Arrays with Connecting Channels. *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, **8**, 1-9 [cit. 2021-6-27]. ISSN 1664-3224.
- [38] JANG, Joon Hee, Yu HUANG, Peilin ZHENG, Myeong Chan JO, Grant BERTOLET, Michael Xi ZHU, Lidong QIN a Dongfang LIU. Imaging of Cell-Cell Communication in a Vertical Orientation Reveals High-Resolution Structure of Immunological Synapse and Novel PD-1 Dynamics. *The Journal of Immunology* [online]. 2015, **195**(3), 1320-1330 [cit. 2021-6-27]. ISSN 0022-1767.
- [39] WU, Liya, Fuqiang ZHANG, Zhenhong WEI, et al. Magnetic delivery of Fe₃O₄@polydopamine nanoparticle-loaded natural killer cells suggest a promising anticancer treatment. *Biomaterials Science* [online]. 2018, **6**(10), 2714-2725 [cit. 2021-6-27]. ISSN 2047-4830.
- [40] LE SAUX, Guillaume, Netanel BAR-HANIN, Avishay EDRI, Uzi HADAD, Angel PORGADOR a Mark SCHVARTZMAN. Nanoscale Mechanosensing of Natural Killer Cells is Revealed by Antigen-Functionalized Nanowires. *Advanced Materials* [online]. 2019, **31**(4), 1-10 [cit. 2021-6-28]. ISSN 09359648.
- [41] OBERSCHMIDT, Olaf, Michael MORGAN, Volker HUPPERT, et al., 2019. Development of Automated Separation, Expansion, and Quality Control Protocols for Clinical-Scale Manufacturing of Primary Human NK Cells and Alpharetroviral Chimeric Antigen Receptor Engineering. *Human Gene Therapy Methods* [online]. **30**(3), 102-120 [cit. 2021-6-20]. ISSN 1946-6536.
- [42] SAKAMOTO, Naoyuki, Takeshi ISHIKAWA, Satoshi KOKURA, et al., 2015. Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *Journal of Translational Medicine*. **13**(1), 1-13. DOI: 10.1186/s12967-015-0632-8. ISSN 1479-5876.

- [43] KARLITEPE, ayfer, 2021. Cytotoxic Effect of Cord Blood Derived Natural Killer Cells on Breast Cancer Cells. *Turkish Journal of Oncology* [online]. **36**(2), 146-153 [cit. 2021-6-22]. ISSN 13007467.
- [44] RAULET, David H., 2006. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Seminars in Immunology* [online]. **1**(18), 145-150 [cit. 2021-03-25].
- [45] LONG, Eric O. a Sumati RAJAGOPALAN, 2002. Stress Signals Activate Natural Killer Cells. *Journal of Experimental Medicine* [online]. **196**(11), 1399-1402 [cit. 2021-03-30]. ISSN 1540-9538.
- [46] MARCUS, Assaf, Benjamin G. GOWEN, Thornton W. THOMPSON, et al., 2014. Recognition of Tumors by the Innate Immune System and Natural Killer Cells. *Advances in Immunology* [online]. Elsevier, 2014, 91-128 [cit. 2021-03-16]. Advances in Immunology. ISBN 9780128002674.
- [47] RUS BAKARURRAINI, Nurul Ainaa Adilah, Nurul Syakima AB MUTALIB, Rahman JAMAL a Nadiyah ABU, 2020. The Landscape of Tumor-Specific Antigens in Colorectal Cancer. *Vaccines* [online]. **8**(3), 1-17 [cit. 2021-03-23]. ISSN 2076-393X.
- [48] SCHUMACHER, Ton N. a Robert D. SCHREIBER, 2015. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* [online]. **348**(6230), 69-74 [cit. 2021-6-23]. ISSN 0036-8075.
- [49] TAGLIAMONTE, Maria, Annacarmen PETRIZZO, Maria Lina TORNESELLO, Franco M BUONAGURO a Luigi BUONAGURO, 2014. Antigen-specific vaccines for cancer treatment. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. **10**(11), 3332-3346 [cit. 2021-03-16]. ISSN 2164-5515.
- [50] VINAY, Dass S., Elizabeth P. RYAN, Graham PAWELEC, et al., 2015. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology* [online]. **35**, 185-198 [cit. 2021-6-23]. ISSN 1044579X.
- [51] ARDOLINO, Michele, Camillia S. AZIMI, Alexandre IANNELLO, et al., 2014. Cytokine therapy reverses NK cell anergy in MHC-deficient tumors. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **124**(11), 4781-4794 [cit. 2021-6-24]. ISSN 0021-9738.
- [52] CROXATTO, D., S. MARTINI, L. CHIOSSONE, F. SCORDAMAGLIA, C. F. SIMONASSI, L. MORETTA, M. C. MINGARI a P. VACCA, 2017. IL15 induces a potent antitumor activity in NK cells isolated from malignant pleural effusions and overcomes the inhibitory effect of pleural fluid. *OncoImmunology* [online]. **6**(4) [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1293210. ISSN 2162-402X.
- [53] SIM, G. C., C. LIU, E. WANG, et al, 2016. IL2 Variant Circumvents ICOS Regulatory T-cell Expansion and Promotes NK Cell Activation. *Cancer Immunology Research*. **4**(11), 983-994. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0195. ISSN 2326-6066.
- [54] BENTEBIBEL, Salah-Eddine, Michael E. HURWITZ, Chantale BERNATCHEZ, et al, 2019. A First-in-Human Study and Biomarker Analysis of NKTR-214, a Novel

IL2R $\beta\gamma$ -Biased Cytokine, in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Cancer Discovery*. **9**(6), 711-721. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1495. ISSN 2159-8274.

- [55] ZANONI, Ivan, Roberto SPREAFICO, Caterina BODIO, et al., 2013. IL-15 cis Presentation Is Required for Optimal NK Cell Activation in Lipopolysaccharide-Mediated Inflammatory Conditions. *Cell Reports*. **4**(6), 1235-1249. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.021. ISSN 22111247.
- [56] FLOROS, Theofanis a Ahmad A. TARHINI, 2015. Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- α 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Seminars in Oncology*. **42**(4), 539-548. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.015. ISSN 00937754.
- [57] COOLEY, Sarah, Fiona HE, Veronika BACHANOVA, et al, 2019. First-in-human trial of rhIL-15 and haploidentical natural killer cell therapy for advanced acute myeloid leukemia. *Blood Advances*. **3**(13), 1970-1980. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018028332. ISSN 2473-9529.
- [58] CONLON, Kevin C., Enrico LUGLI, Hugh C. WELLES, et al., 2015. Redistribution, Hyperproliferation, Activation of Natural Killer Cells and CD8 T Cells, and Cytokine Production During First-in-Human Clinical Trial of Recombinant Human Interleukin-15 in Patients With Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. **33**(1), 74-82. DOI: 10.1200/JCO.2014.57.3329. ISSN 0732-183X.
- [59] CHEN, Yan, Bei CHEN, Ti YANG, et al., 2017. Human fused NKG2D–IL-15 protein controls xenografted human gastric cancer through the recruitment and activation of NK cells. *Cellular & Molecular Immunology*. **14**(3), 293-307. DOI: 10.1038/cmi.2015.81. ISSN 1672-7681.
- [60] THAYSEN-ANDERSEN, M., E. CHERTOVA, C. BERGAMASCHI, et al., 2016. Recombinant human heterodimeric IL-15 complex displays extensive and reproducible N- and O-linked glycosylation. *Glycoconjugate Journal*. **33**(3), 417-433. DOI: 10.1007/s10719-015-9627-1. ISSN 0282-0080.
- [61] ROSARIO, M., B. LIU, L. KONG, et al., 2016. The IL-15-Based ALT-803 Complex Enhances Fc RIIIa-Triggered NK Cell Responses and In Vivo Clearance of B Cell Lymphomas. *Clinical Cancer Research*. **22**(3), 596-608. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1419. ISSN 1078-0432.
- [62] ROMEE, Rizwan, Sarah COOLEY, Melissa M. BERRIEN-ELLIOTT, et al, 2018. First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood*. **131**(23), 2515-2527. DOI: 10.1182/blood-2017-12-823757. ISSN 0006-4971.
- [63] WRANGLE, John M, Vamsidhar VELCHETI, Manish R PATEL, et al, 2018. ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic

- non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial. *The Lancet Oncology*. 19(5), 694-704. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30148-7. ISSN 14702045.
- [64] DAVIS, Zachary B., Daniel A. VALLERA, Jeffrey S. MILLER a Martin FELICES, 2017. Natural killer cells unleashed: Checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy. *Seminars in Immunology* [online]. 31, 64-75 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1016/j.smim.2017.07.011. ISSN 10445323.
- [65] WIERNIK, A., B. FOLEY, B. ZHANG, et al., 2013. Targeting Natural Killer Cells to Acute Myeloid Leukemia In Vitro with a CD16 x 33 Bispecific Killer Cell Engager and ADAM17 Inhibition. *Clinical Cancer Research*. 19(14), 3844-3855. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0505. ISSN 1078-0432.
- [66] DENG, Xuewen, Hiroshi TERUNUMA, Mie NIEDA, Weihua XIAO a Andrew NICOL, 2012. Synergistic cytotoxicity of ex vivo expanded natural killer cells in combination with monoclonal antibody drugs against cancer cells. *International Immunopharmacology*. 14(4), 593-605. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.09.014. ISSN 15675769.
- [67] TUMINO, Nicola, Stefania MARTINI, Enrico MUNARI, et al, 2019. Presence of innate lymphoid cells in pleural effusions of primary and metastatic tumors: Functional analysis and expression of PD-1 receptor. *International Journal of Cancer*. 145(6), 1660-1668. DOI: 10.1002/ijc.32262. ISSN 0020-7136.
- [68] MORETTA, Francesca, Francesca PETRONELLI, Barbarella LUCARELLI, et al., 2016. The generation of human innate lymphoid cells is influenced by the source of hematopoietic stem cells and by the use of G-CSF. *European Journal of Immunology*. 46(5), 1271-1278. DOI: 10.1002/eji.201546079. ISSN 00142980.
- [69] LOCATELLI, Franco, Aurelie BAUQUET, Giuseppe PALUMBO, Francesca MORETTA a Alice BERTAINA, 2013. Negative depletion of α/β T cells and of CD19 B lymphocytes: A novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Immunology Letters*. 155(1-2), 21-23. DOI: 10.1016/j.imlet.2013.09.027. ISSN 01652478.
- [70] AVERSA, Franco, Antonio PIERINI, Loredana RUGGERI, Massimo Fabrizio MARTELLI a Andrea VELARDI, 2019. The Evolution of T Cell Depleted Haploidentical Transplantation. *Frontiers in Immunology*. 10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02769. ISSN 1664-3224.
- [71] FALCO, Michela, Daniela PENDE, Enrico MUNARI, Paola VACCA, Maria C. MINGARI a Lorenzo MORETTA, 2019. Natural killer cells: From surface receptors to the cure of high-risk leukemia (Ceppellini Lecture). *HLA*. 93(4), 185-194. DOI: 10.1111/tan.13509. ISSN 2059-2302.
- [72] SCHUMM, Michael, Peter LANG a Rupert HANDGRETINGER, 2019. Graft Manipulation. CARRERAS, Enric, Carlo DUFOUR, Mohamad MOHTY a Nicolaus

KRÖGER, ed. *The EBMT Handbook*. 7. Cham: Springer International Publishing, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-02278-5_19. ISBN 978-3-030-02277-8.

- [73] LI PIRA, Giuseppina, David MALASPINA, Elia GIROLAMI, et al, 2016. Selective Depletion of $\alpha\beta$ T Cells and B Cells for Human Leukocyte Antigen–Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. A Three-Year Follow-Up of Procedure Efficiency. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. **22**(11), 2056-2064. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.08.006. ISSN 10838791.
- [74] PISTOIA, Vito, Nicola TUMINO, Paola VACCA, Irene VENEZIANI, Alessandro MORETTA, Franco LOCATELLI a Lorenzo MORETTA, 2018. Human $\gamma\delta$ T-Cells: From Surface Receptors to the Therapy of High-Risk Leukemias. *Frontiers in Immunology*. **9**. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00984. ISSN 1664-3224.
- [75] LOCATELLI, Franco, Pietro MERLI, Daria PAGLIARA, et al., 2017. Outcome of children with acute leukemia given HLA-haploidentical HSCT after $\alpha\beta$ T-cell and B-cell depletion. *Blood*. **130**(5), 677-685. DOI: 10.1182/blood-2017-04-779769. ISSN 0006-4971.
- [76] AIROLDI, Irma, Alice BERTAINA, Ignazia PRIGIONE, et al., 2015. $\Gamma\delta$ T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR- $\alpha\beta$ /CD19 lymphocytes. *Blood*. **125**(15), 2349-2358. DOI: 10.1182/blood-2014-09-599423. ISSN 0006-4971.
- [77] PESCE, Silvia, Marco GREPPI, Giovanna TABELLINI, et al., 2017. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **139**(1), 335-346.e3. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.04.025. ISSN 00916749.
- [78] TUMINO, Nicola, Francesca BESI, Anna Laura DI PACE, et al., 2020. PMN-MDSC are a new target to rescue graft-versus-leukemia activity of NK cells in haplo-HSC transplantation. *Leukemia*. **34**(3), 932-937. DOI: 10.1038/s41375-019-0585-7. ISSN 0887-6924.
- [79] MARIOTTI, Francesca R., Stefania PETRINI, Tiziano INGEGNERE, et al., 2018. PD-1 in human NK cells: evidence of cytoplasmic mRNA and protein expression. *OncImmunity*. **8**(3), 1-11. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1557030. ISSN 2162-402X.
- [80] GARRIDO, Federico, Natalia APTSIAURI, Elien M DOORDUIJN, Angel M GARCIA LORA a Thorbald VAN HALL, 2016. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*. **39**, 44-51. DOI: 10.1016/j.coi.2015.12.007. ISSN 09527915.
- [81] SABBATINO, F., V. VILLANI, J. H. YEARLEY, et al., 2016. PD-L1 and HLA Class I Antigen Expression and Clinical Course of the Disease in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. **22**(2), 470-478. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0715. ISSN 1078-0432.

- [82] MUNARI, Enrico, Giulio ROSSI, Giuseppe ZAMBONI, et al., 2018. PD-L1 Assays 22C3 and SP263 are Not Interchangeable in Non–Small Cell Lung Cancer When Considering Clinically Relevant Cutoffs. *The American Journal of Surgical Pathology*. **42**(10), 1384-1389. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001105. ISSN 0147-5185.
- [83] MUNARI, Enrico, Giuseppe ZAMBONI, Gianluigi LUNARDI, et al., 2018. PD-L1 Expression Heterogeneity in Non–Small Cell Lung Cancer: Defining Criteria for Harmonization between Biopsy Specimens and Whole Sections. *Journal of Thoracic Oncology*. **13**(8), 1113-1120. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.04.017. ISSN 15560864.
- [84] MUNARI, Enrico, Giuseppe ZAMBONI, Gianluigi LUNARDI, et al., 2019. PD-L1 expression in non–small cell lung cancer: evaluation of the diagnostic accuracy of a laboratory-developed test using clone E1L3N in comparison with 22C3 and SP263 assays. *Human Pathology*. **90**, 54-59. DOI: 10.1016/j.humpath.2019.05.003. ISSN 00468177.
- [85] ANDRÉ, Pascale, Caroline DENIS, Caroline SOULAS, et al., 2018. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell*. **175**(7), 1731-1743. DOI: 10.1016/j.cell.2018.10.014. ISSN 00928674.
- [86] MINGARI, Maria Cristina, Gabriella PIETRA a Lorenzo MORETTA, 2019. Immune Checkpoint Inhibitors: Anti-NKG2A Antibodies on Board. *Trends in Immunology*. **40**(2), 83-85. DOI: 10.1016/j.it.2018.12.009. ISSN 14714906