

Bartosz Grzywacz, M.D.

Streszczenie wykładu

"KOMÓRKI NK (NATURAL KILLERS) – STRAŻNICY ORGANIZMU PRZECIWKO WIRUSOM I NOWOTWOROM".

Komórki NK należą do limfocytów – czyli komórek układu odpornościowego. W gronie limfocytów rozróżniamy limfocyty T, limfocyty B i komórki NK. Limfocyty T i B odpowiedzialne są za specyficzną odpowiedź komórkową, mają one unikalne receptory – tzn. każdy klon ma inne receptory do rozpoznania antygenów. Olbrzymia różnorodność receptorów limfocytów T i B wynika z ich powstawania w wyniku rekombinacji genetycznej, unikalnej dla każdej komórki. Komórki NK nie mają tego rodzaju antygenów powstających w wyniku rekombinacji genetycznej. Pod tym względem komórki NK są bardziej zbliżone do prymitywnej gałęzi układu odpornościowego – granulocytów i monocytów. Do niedawna uważano, że komórki NK nie mają zdolności do pamięci immunologicznej – czyli zjawiska spotęgowanej reakcji na antygeny, które napotkały wcześniej. Ten pogląd został zweryfikowany w ciągu ostatnich 10 lat (Hendricks, Min-Oo et al. 2016). Najpierw odkryto spotęgowaną odpowiedź na pewne antygeny, proste związki chemiczne, u myszy które nie miały limfocytów T czy B i okazało się, że odpowiedzialne są komórki NK (O'Leary, Goodarzi et al. 2006). Nieco później okazało się, że po przejściu pierwotnej infekcji cytomegalowirusem (CMV) zachodzą zmiany w repertuarze ludzkich komórek NK, które przypominają pamięć immunologiczną (Lopez-Verges, Milush et al. 2011). Komórki NK osób, które przeszły infekcje CMV miały większy potencjał cytotoksyczny. Tak więc komórki NK mają zdolność pamięci immunologicznej, która jednak nie jest aż tak spotęgowana jak to ma miejsce w przypadku limfocytów T i B .

Regulacja komorek NK : balans pomiedzy aktywacja a hamowaniem

Receptory Aktywujace

- NCRs: NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, DNAM
- Lektynowe: CD94/NKG2C, NKG2D, CD161
- CD16 (Fc receptor)
- Immunoglobulinowe: KIR
- Co-receptors: CD8, 2B4



Receptory hamujace

- Immunoglobulinowe: (KIR, ILT, LAIR)
- Lektynowe: (CD94/NKG2A)

Jak komórki NK odróżniają przyjaciół od wrogów ?

Działanie układu odpornościowego opiera się na odróżnianiu antygenów obcych od własnych. Obce antygeny wzbudzają produkcję przeciwciał przez limfocyty B i aktywację limfocytów T. Komórki NK działają inaczej – one rozpoznają brak własnych antygenów HLA (Ljunggren and Karre 1990). Wydaje się, że w ten sposób uzupełniają one odpowiedź limfocytów T wobec komórek, które tracą ekspresję antygenów HLA. Okazuje się, że komórki nowotworowe często tracą ekspresję HLA i w ten sposób stają się „niewidoczne” dla limfocytów T (Lopez-Nevot, Esteban et al. 1989). Podobnie infekcje (Lee, Llano et al. 1998) wirusowe, np. CMV obniżają ekspresję HLA w zakażonych komórkach, żeby uniknąć rozpoznania przez limfocyty T (Beersma, Bijlmakers et al. 1993). Wtedy do akcji wkraczają komórki NK, uczulone na brak własnego HLA. Komórki NK mają receptory KIR (*Killer Immunoglobuline – like receptors*) odkryte przez s.p. Alessandro Moretta (Moretta, Vitale et al. 1993). Moretta pierwotnie nazywał je *Killer Inhibitory receptors*, bo ich rola polega na hamowaniu komórek NK, gdy rozpoznają obecność własnego HLA na powierzchni innej komórki. Można to porównać do kontroli policyjnej, gdzie limfocyty T potrafią rozpoznać sfałszowane dokumenty, natomiast komórki NK wkraczają do akcji, gdy podejrzany nie ma żadnych dokumentów.

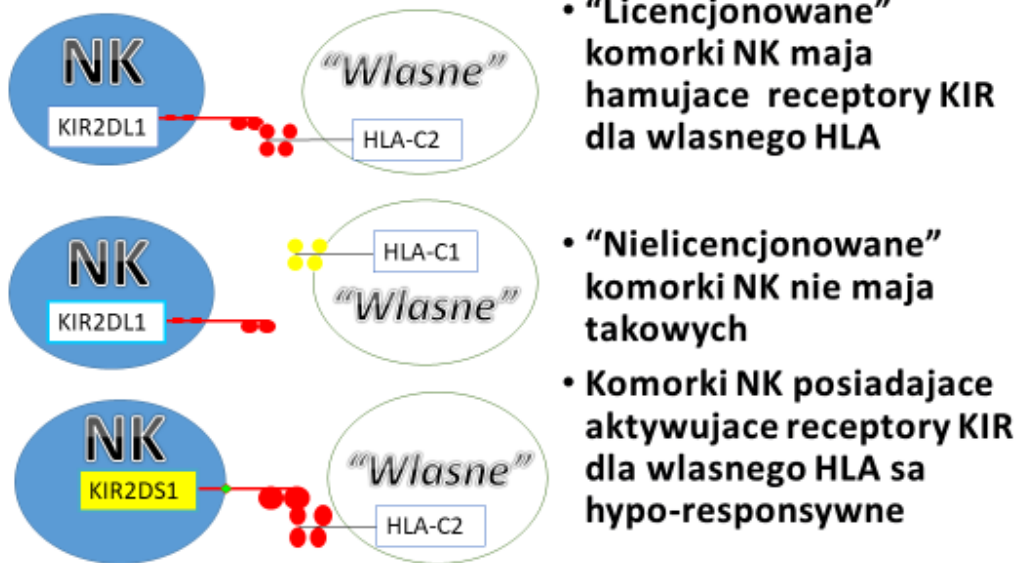
Lektynowe receptory hamujące komórki NK

Oprócz receptorów KIR jest jeszcze jeden rodzaj receptorów hamujących komórki NK – CD94/NKG2A. Ten receptor ma strukturę lektynową, nie immunoglobulino-podobną. CD94/NKG2A rozpoznaje antygen nieklasyczny HLA-E (Lee, Llano et al. 1998). HLA-E jest nietypowym antygenem HLA. Klasyczne antygeny HLA – A, B, C, DR, DQ są bardzo polimorficzne, tzn. różni ludzie mają bardzo różne antygeny HLA. Prawdopodobieństwo, że dwie niespokrewnione osoby mają takie same antygeny klasyczne HLA jest prawie zerowe, dlatego tak trudno jest czasami znaleźć zgodnego w HLA dawcę szpiku i potrzebne są międzynarodowe rejestry w liczbie milionów ludzi by to prawdopodobieństwo zwiększyć. HLA-E natomiast jest takie samo u wszystkich. Przez długi czas nie było wiadomo dlaczego tak jest, aż odkryliśmy, że HLA-E jest rozpoznawane przez CD94/NKG2A. Wydaje się, że HLA-E zostało „zakonserwowane” w toku ewolucji żeby się nie zmieniać. Ekspresja HLA-E zależy od dostępności fragmentów liderowych z klasycznych antygenów HLA (Lee, Goodlett et al. 1998), tak więc jeżeli komórka zakażona wirusem lub pod wpływem transformacji nowotworowej utraci ekspresję HLA klasy I, może też utracić ekspresję HLA-E i stanie się podatna na atak komórek NK. Oczywiście, wirusy szukają innych sposobów na oszukanie układu odpornościowego i mają w swoich genach receptory podobne do HLA-E, są to swoiste „podróbki” HLA-E zdolne do symulowania tego receptora i hamowania komórek NK. CD94 /NKG2A jest receptorem hamującym, złożonym z dwóch podjednostek – CD94 i NKG2A. Ale CD94 może także tworzyć kompleks z innym partnerem - NKG2C, który jest aktywujący a nie hamujący. Jak się okazuje, komórki NK u osób, które przeszły infekcję CMV mają wysoką ekspresję NKG2C, tak więc pamięć komórek NK związana jest z przejściem z hamującego kompleksu CD94/NKG2A do aktywującego CD94/NKG2C.

Tolerancja komórek NK wobec własnych komórek

opiera się na ekspresji hamujących receptorów KIR, które po rozpoznaniu własnego HLA zapobiega niszczeniu własnych komórek. Jednak HLA jest bardzo polimorficzne, bardzo zróżnicowane. Receptory KIR też są polimorficzne, a dziedziczone są niezależnie od HLA, bo są one kodowane przez geny na innym chromosomie (HLA jest na chromosomie 6-tym a KIRy na 19-tym). Jak to się dzieje, że komórki NK uczą się własnego HLA ?

Jak Receptory KIR i HLA regulują aktywność komórek NK

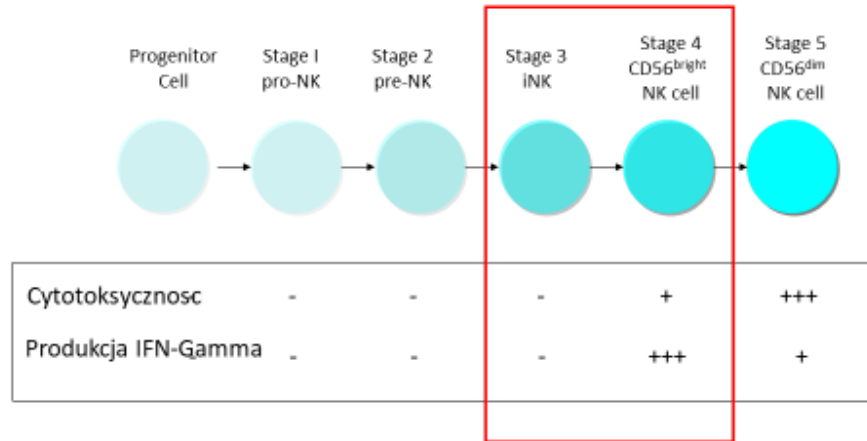


- **“Licencjonowane”** komórki NK mają hamujące receptory KIR dla własnego HLA
- **“Nielicencjonowane”** komórki NK nie mają takich
- **Komórki NK posiadające aktywujące receptory KIR dla własnego HLA są hypo-respansywne**

Dojrzewanie komórek NK z ich prekursorów

Dojrzewanie komórek NK może być badane w hodowli. My badaliśmy różnicowanie komórek NK z komórek macierzystych w hodowli *in vitro* i opisaliśmy po raz pierwszy etapy dojrzewania komórek NK (Grzywacz, Kataria et al. 2006). Te same stopnie dojrzewania zostały opisane przez A. Freud (Freud, Yokohama et al. 2006) na bazie studiów komórek obecnych w węzłach chłonnych i migdałach gardłowych. Obydwa modele wskazują na to, że nabycie zdolności cytotoksycznych jest związane czasowo z nabyciem receptorów hamujących CD94/NKG2A. Jak wspomniałem wcześniej, HLA-E jest obecne u każdego i ma taką samą budowę, zapewniając „bezpieczeństwo” komórek NK i zabezpieczając przed ich auto-reaktywnością.

Roznicowanie komórek NK



Freud, JEM, 2006
Grzywacz, Blood, 2006

Naturalne komórki limfoidalne (*Innate Lymphoid Cells*)

Naturalne komórki limfoidalne – czyli nowa populacja komórek opisana w ostatnich latach. W naszych eksperymentach z dojrzewaniem komórek NK w hodowli z komórek macierzystych opisaliśmy etap pośredni tuż przed uzyskaniem zdolności cytotoksycznych (CD117 bright CD94(-)). We wszystkich eksperymentach ta populacja komórek zachowywała się z jednej strony jak niedojrzały etap pośredni, ale z drugiej strony część z nich nigdy nie dojrzewała do kompletnych komórek NK a nawet obserwowaliśmy odrobinę zmiany w kierunku przeciwnym. Jak się okazało później, w populacji tej znajdują się naturalne komórki limfoidalne (*Innate Lymphoid Cells*). Komórki te zostały w pewnym sensie odkryte na przestrzeni ostatnich 10 lat (Vivier, Artis et al. 2018). Jak do tego doszło? Otóż polega to na tym, że komórki tego typu znajdują się przede wszystkim w tkankach organizmu. Większość badań opierała się na komórkach obecnych we krwi, a tych komórek tam nie znajdziemy.

NK cell licensing – czyli licencja na „zabijanie”

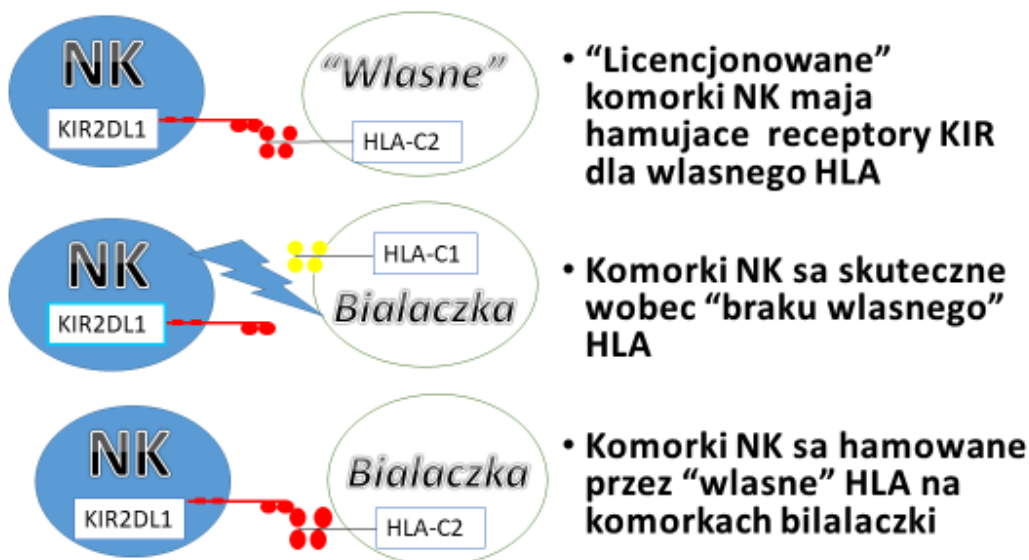
NK cell licensing – czyli licencja na „zabijanie” innych komórek jest zależna od ekspresji receptorów hamujących (Kim, Poursine-Laurent et al. 2005). Komórki NK, które mają receptory hamujące, dla których są obecne ligandy HLA posiadają zdolność do zabijania komórek, które nie mają tego właśnie „własnego” HLA. W myśl tej reguły komórki NK, które nie mają receptorów hamujących dla własnego HLA nie posiadają „licencji na zabijanie” i w eksperymentach nie są zdolne do zabijania innych komórek.

Komórki NK po przeszczepieniu szpiku kostnego – czyli jak brak własnego HLA na komórkach białaczki pomaga w efekcie leczniczym.

W przeszczepach komórek macierzystych szpiku w celu leczenia białaczki wykorzystuje się różnego rodzaju dawców. Specjaliści z ośrodka w Perugia (Włochy) specjalizowali się

w przeszczepach od dawców tylko w połowie zgodnych w HLA (haploidentycznych). To może być matka lub ojciec, czasem rodzeństwo chorego. W leczeniu białaczki limfoblastycznej największym zagrożeniem jest wznowa białaczki. Okazało się, że pacjenci którzy mieli „brak własnego HLA” z perspektywy komórek NK dawcy mieli mniejsze ryzyko wznowy białaczki (Ruggeri, Capanni et al. 2002). Był to bardzo przekonujący dowód na to, że komórki NK są w stanie efektywnie zapobiec wznowie agresywnych nowotworów hematologicznych, jakimi są białaczki.

Jak komórki NK pomagają po haploidentycznym przeszczepie szpiku



- **“Licencjonowane” komórki NK mają hamujące receptory KIR dla własnego HLA**
- **Komórki NK są skuteczne wobec “braku własnego” HLA**
- **Komórki NK są hamowane przez “własne” HLA na komórkach białaczki**

Komórki NK mają zdolność do ADCC – w tym przypadku działają jakby „na polecenie” specyficznego układu odpornościowego. Jeżeli limfocyty B wytworzą przeciwciała, które wiążą się z komórką docelową, komórki NK mają receptor CD16 I poprzez to przeciwciało będą aktywowane do ataku na oznaczoną przeciwciałem komórkę. Czy komórki NK odgrywają rolę w efekcie leczenia przeciwciałami takimi jak rituximab (przeciwciało przeciw CD20), które stanowi podstawę w leczeniu chłoniaków? Wyniki naszych badań wskazują, że może tak być.

Zastosowanie komórek NK w leczeniu białaczek.

Komórki NK są skuteczne w zabijaniu komórek białaczkowych, dlaczego by nie zastosować ich w leczeniu? Specjaliści z Uniwersytetu stanu Minnesota zaczęli podawać komórki NK pacjentom z białaczkami (Miller, Soignier et al. 2005). Cała procedura jest skomplikowana organizacyjnie – dobór dawcy (najczęściej haploidentyczny członek rodziny), pobranie komórek NK, oczyszczenie ich spośród innych komórek, aktywacja przed podaniem - to etapy tej procedury w dużym skrócie. W ostatecznym wyniku leczniczym ważne jest, czy komórki NK przetrwają w organizmie biorcy, czy dotrą do szpiku i czy będą się rozmnażać w miejscu gdzie przebywają komórki białaczki. My ostatnio przeanalizowaliśmy zagadnienie, czy przetoczone komórki NK można wykryć w biopsji szpiku pacjentów pobranej w 2 tygodnie po ich przetoczeniu. Zbadaliśmy, jaki to ma związek z efektem leczniczym, czyli z remisją lub

wznową białaczki (Grzywacz, w druku). Z drugiej strony, na przestrzeni lat protokół leczniczy był modyfikowany poprzez zmiany, takie jak: podawanie interleukiny 2 lub interleukiny 15 po transfuzji komórek NK, uprzednie napromieniowanie szpiku, podanie leku żeby wyeliminować limfocyty T regulatorowe dawcy i inne zmienne. Okazało się, że liczba komórek NK w szpiku była skorelowana z korzystnym wynikiem leczenia białaczki. Co więcej, stwierdziliśmy, że napromieniowanie niszy szpikowej przed ich podaniem (*Total Body Irradiation*) jak również eliminacja limfocytów T regulatorowych przy pomocy przeciwciała/toksyny przeciwko CD25 sprzyja przetrwaniu komórek NK w szpiku biorcy.

Przyszłe kierunki immunoterapii przy użyciu komórek NK.

Różnicowanie komórek NK z komórek macierzystych jest możliwe w hodowli laboratoryjnej. Komórki NK, które są w ten sposób „fabrykowane” z embrionalnych komórek macierzystych mają dobre zdolności cytotoksyczne wobec białaczek i innych nowotworów (Woll, Grzywacz et al. 2009). Co więcej, laureat Nagrody Nobla S. Yamanaka pokazał jak przy pomocy 4 czynników można przeobrazić komórkę ciała taką jak np. fibroblast pobrany z tkanki podskórnej w komórkę IPS (*Induced Pluripotent Stem cell*) – indukowaną komórkę podobną do embrionalnych (Takahashi, Tanabe et al. 2007). W chwili obecnej z takich wyindukowanych komórek macierzystych produkuje się komórki NK (Saetersmoen, Hammer et al. 2018). Tak uzyskane komórki NK dostępne są w o wiele większej liczbie niż konwencjonalne komórki NK. Co więcej, można je łatwo modyfikować poprzez dodawanie lub odejmowanie receptorów i innych czynników wpływających na aktywność. Umożliwi to produkcję komórek NK w dużej ilości, a jak wykazały nasze badania jest to jeden z kluczy do sukcesu terapeutycznego.

Podsumowanie

Przedstawię podstawowe zasady działania komórek NK i etapy ich dojrzewania. Omówione będą przykłady zastosowania komórek NK w leczeniu chorób nowotworowych i jak zrozumienie zasad ich działania pomaga w skutecznym zastosowaniu w terapii. Ponadto przedstawię nowe kierunki, w których wykorzystujemy znajomość zjawiska pamięci immunologicznej komórek NK i inżynierii ich dojrzewania z komórek macierzystych do produkcji nowej generacji komórek NK z zamiarem ich wykorzystania w leczeniu nowotworów.

1. Beersma, M. F., M. J. Bijlmakers and H. L. Ploegh (1993). "Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains." *J Immunol* **151**(9): 4455-4464.
2. Freud, A. G., A. Yokohama, B. Becknell, M. T. Lee, H. C. Mao, A. K. Ferketich and M. A. Caligiuri (2006). "Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo." *J Exp Med* **203**(4): 1033-1043.
3. Grzywacz, B., N. Kataria, M. Sikora, R. A. Oostendorp, E. A. Dzierzak, B. R. Blazar, J. S. Miller and M. R. Verneris (2006). "Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells." *Blood* **108**(12): 3824-3833.
4. Hendricks, D. W., G. Min-Oo and L. L. Lanier (2016). "Sweet Is the Memory of Past Troubles: NK Cells Remember." *Curr Top Microbiol Immunol* **395**: 147-171.
5. Kim, S., J. Poursine-Laurent, S. M. Truscott, L. Lybarger, Y. J. Song, L. Yang, A. R. French, J. B. Sunwoo, S. Lemieux, T. H. Hansen and W. M. Yokoyama (2005). "Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules." *Nature* **436**(7051): 709-713.

6. Lee, N., D. R. Goodlett, A. Ishitani, H. Marquardt and D. E. Geraghty (1998). "HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences." J Immunol **160**(10): 4951-4960.
7. Lee, N., M. Llano, M. Carretero, A. Ishitani, F. Navarro, M. Lopez-Botet and D. E. Geraghty (1998). "HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5199-5204.
8. Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-244.
9. Lopez-Navot, M. A., F. Esteban, A. Ferron, J. Gutierrez, M. R. Oliva, C. Romero, C. Huelin, F. Ruiz-Cabello and F. Garrido (1989). "HLA class I gene expression on human primary tumours and autologous metastases: demonstration of selective losses of HLA antigens on colorectal, gastric and laryngeal carcinomas." Br J Cancer **59**(2): 221-226.
10. Lopez-Verges, S., J. M. Milush, B. S. Schwartz, M. J. Pando, J. Jarjoura, V. A. York, J. P. Houchins, S. Miller, S. M. Kang, P. J. Norris, D. F. Nixon and L. L. Lanier (2011). "Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(36): 14725-14732.
11. Miller, J. S., Y. Soignier, A. Panoskaltsis-Mortari, S. A. McNearney, G. H. Yun, S. K. Fautsch, D. McKenna, C. Le, T. E. Defor, L. J. Burns, P. J. Orchard, B. R. Blazar, J. E. Wagner, A. Slungaard, D. J. Weisdorf, I. J. Okazaki and P. B. McGlave (2005). "Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer." Blood **105**(8): 3051-3057.
12. Moretta, A., M. Vitale, C. Bottino, A. M. Orengo, L. Morelli, R. Augugliaro, M. Barbaresi, E. Ciccone and L. Moretta (1993). "P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities." J Exp Med **178**(2): 597-604.
13. O'Leary, J. G., M. Goodarzi, D. L. Drayton and U. H. von Andrian (2006). "T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells." Nat Immunol **7**(5): 507-516.
14. Ruggeri, L., M. Capanni, E. Urbani, K. Perruccio, W. D. Shlomchik, A. Tosti, S. Posati, D. Rogaia, F. Frassoni, F. Aversa, M. F. Martelli and A. Velardi (2002). "Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants." Science **295**(5562): 2097-2100.
15. Saetersmoen, M. L., Q. Hammer, B. Valamehr, D. S. Kaufman and K. J. Malmberg (2018). "Off-the-shelf cell therapy with induced pluripotent stem cell-derived natural killer cells." Semin Immunopathol.
16. Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.
17. Vivier, E., D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J. P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R. M. Locksley, A. N. J. McKenzie, R. E. Mebius, F. Powrie and H. Spits (2018). "Innate Lymphoid Cells: 10 Years On." Cell **174**(5): 1054-1066.
18. Woll, P. S., B. Grzywacz, X. Tian, R. K. Marcus, D. A. Knorr, M. R. Verneris and D. S. Kaufman (2009). "Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent in vivo antitumor activity." Blood **113**(24): 6094-6101.