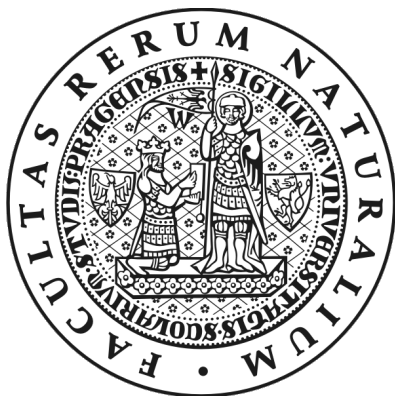


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lucie Hernychová

Receptory NK buněk

Natural killer cell receptors

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Praha, 2012

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za konzultace, trpělivost, vstřícnost a skvělý přístup, a též Mgr. Danieli Rozbeskému za ochotu a cenné rady. Velké díky také patří mé rodině za možnost studovat a za veškerou podporu, kterou jsem od nich vždy měla, a to nejen během psaní této práce. Rovněž děkuji všem svým blízkým, že pro mě byli a jsou oporou.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně na základě konzultací se svým školitelem z uvedené literatury.

V Praze, 10. 5. 2012

.....
Lucie Hernychová

1 ABSTRAKT

NK buňky jsou důležitou součástí vrozeného imunitního systému, mají ovšem mnoho společných vlastností s imunokompetentními buňkami adaptivní imunity a mohou zároveň modulovat jejich činnost. Pomocí širokého spektra receptorů na svém povrchu rozpoznávají „cizí“ molekuly (indukované především virovou nákazou či nádorovou transformací), jejich cílem jsou ale také struktury organismu vlastní, MHC glykoproteiny. Podle jejich množství na povrchu cílových buněk rozlišují, zda jsou tyto buňky infikované či transformované, pak indukují jejich apoptózu, nebo je vůči nim ustavena tolerance. Produkci cytokinů a chemokinů též spouští zánětlivé odpovědi.

Podle funkce lze rozdělit NK receptory do pěti skupin: aktivační, inhibiční, adhezivní, cytokinové a chemokinové. Na základě vazby příslušných ligandů na tyto receptory je buď spuštěna cytotoxická aktivita NK buňky, nebo je naopak inhibována. Funkce NK buněk je do jisté míry ovlivněna i mikroprostředím, ve kterém se právě vyskytují.

Podle struktury se receptory NK buněk dělí na C-lektinové a imunoglobulinové. Do prvně zmíněné skupiny se řadí tři receptorové rodiny: Ly49, NKG2/CD94 a NKR-P1. Jsou to transmembránové proteiny typu II a převážně rozpoznávají MHC glykoproteiny. Mezi imunoglobulinové receptory patří rodiny KIR, LILR a NCR. Jedná se o transmembránové receptory typu I obsahující různý počet imunoglobulinových domén v extracelulární oblasti. KIR a LILR váží MHC glykoproteiny, NCR non-MHC ligandy.

Doposud získaná data naznačují, že NK buňky hrají důležitou roli v reprodukci, kontrole brzkých stádií parazitárních, virových infekcí a rakoviny. Navíc se ukazuje, že jejich modulace může vést k léčbě autoimunitních chorob a zmírnit komplikace po transplantacích kostní dřeně.

Klíčová slova: NK buňka, NK receptor, NK receptorová signalizace, aktivace, inhibice, ligand, MHC glykoproteiny, imunitní odpověď

2 ABSTRACT

NK cells play an important role as a part of the innate immune system, they however share many common features with cells of the adaptive immune system and they can modulate their functions as well. NK cells recognize non-self molecules (induced by viral infection or tumor transformation) through a wide variety of receptors on the cell surface. They also express receptors specific for their own structures, MHC glycoproteins. NK cells distinguish infected or transformed cells according to the quantity of these molecules on the target cell surface. Then NK cells allow apoptotic signals to cause cell death or the tolerance is established. They also promote inflammatory responses by the production of cytokines and chemokines.

NK receptors can be grouped into activating, inhibitory, adhesion, cytokine, and chemokine receptors depending on their function. Based on interactions with appropriate ligands, NK cells exert cytotoxicity or they are inhibited. Moreover, their functions are influenced by the cytokine microenvironment.

NK receptors can be also divided into C-type lectin and immunoglobulin superfamilies according to the structure. Ly49, NKG2/CD94 and NKR-P1 are receptor families that belong to the C-type lectin glycoproteins. These molecules have a type II transmembrane protein orientation and they recognize MHC glycoproteins. The latter group includes KIR, LILR and NCR receptors, type I transmembrane proteins with various number of immunoglobulin domains in the extracellular region. KIR and LILR bind MHC glycoproteins, NCR non-MHC ligands.

The data obtained so far support a role for NK cells in reproduction, in the early control of parasitic and viral infections and cancer. It also appears that NK cell modulation can lead to the treatment of the autoimmune diseases, NK cells could also mitigate complications after the bone marrow transplantations.

Key words: NK cell, NK receptor, NK receptor signalling, activation, inhibition, ligand, MHC glycoproteins, immune response

OBSAH

1	Abstrakt	3
2	Abstract.....	4
3	Seznam zkratk	6
4	Úvod	8
5	Základní charakteristika NK buněk.....	10
5.1	Objev NK buněk a jejich souvislost s adaptivní imunitou.....	10
5.1.1	NK buňky, T a B lymfocyty.....	11
5.2	Anatomická lokalizace a typy NK buněk.....	13
5.3	Funkce NK buněk	15
6	Receptory NK buněk	17
6.1	Receptory podle jejich funkce	18
6.1.1	Adhezivní, chemokinové a cytokinové receptory	18
6.1.2	Inhibiční receptory.....	18
6.1.3	Aktivační receptory.....	20
6.2	NK buněčná signalizace	21
6.3	Receptory podle jejich struktury.....	23
6.3.1	C-lektinové receptory.....	23
6.3.2	Imunoglobulinové receptory	27
7	Využití NK buněk pro imunoterapie	32
8	Závěr.....	34
9	Použitá literatura	36

3 SEZNAM ZKRATEK

ADCC	antibody-dependent cell cytotoxicity, cytotoxická reakce závislá na protilátkách
AML	acute myeloid leukemia, akutní myeloidní leukémie
CCL-3	CC (C-C motif) chemokine ligand-3, chemokin
CD	cluster of differentiation, označení pro povrchové molekuly buněk
Clec2	C-type lectin domain family 2, ligandy receptorů z rodiny NKR-P1
Clr	C-lectin related, molekuly příbuzné lektinům C-typu
DAP10/12	DNAX-activating protein of 10 kDa, adaptorové proteiny
DC	dendritic cell, dendritická buňka
DNAM-1	DNAX accessory molecule-1, adhezivní molekula z imunoglobulinové rodiny
EAT-2	Ewing's sarcoma-activated transcript-2, adaptorový protein pro ITSM
ERT	EAT-2-related transducer, adaptorový protein pro ITSM
Fc	fragment crystallizable, část molekuly protilátky
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor, faktor stimulující kolonie
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor, faktor stimulující kolonie
GVHD	graft-versus-host disease, reakce štěpu proti hostiteli
GVL	graft-versus-leukemia, reakce štěpu proti leukémii
Grb2	growth factor receptor-bound 2, adaptorový protein
H-2	histocompatibility antigen-2, myší ligand pro receptory z rodiny Ly49
H-60	histocompatibility antigen-60, ligand pro myší NKG2D
HIV	human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti
HLA	human leukocyte antigen, lidské MHC glykoproteiny
iDC	immature dendritic cell, nezralá dendritická buňka
IFN- γ	interferon gamma
IL	interleukin
ILT2	human Ig-like transcript 2, receptor LILRB1
iNKT	invariant natural killer T cell, invariantní NKT buňka
ITAM	immunoreceptor tyrosin-based activation motif, aktivační motiv receptorů imunitního systému založený na tyrosinu
ITIM	immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif, inhibiční motiv receptorů imunitního systému založený na tyrosinu
ITSM	immunoreceptor tyrosin-based switch motif, "přepínatelný" motiv receptorů imunitního systému založený na tyrosinu
Jak3	Janus kinase 3, kináza zahrnutá v signalizačních drahách aktivačních NK receptorů
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptor, imunoglobulinové receptory

KLRb	killer cell lectin-like receptor subfamily b, receptory NKR-P1
LCR	leukocyte receptor complex, receptorový komplex leukocytů
LFA1	leukocyte function-associated antigen 1, leukocytární integrin
LILR	leukocyte immunoglobulin-like receptor, imunoglobulinové receptory
LIR-1	leukocyte inhibitory receptor 1, receptory LILR
LLT1	lectin-like transcript 1, ligand lidského NKR-P1, ortolog myších Clr
LTi	lymphoid tissue inducer, buňky podobné pomocným T lymfocytům
Ly49	lymphocyte antigen 49, receptorová rodina C-lektinového typu
MCMV	mouse cytomegalovirus, myší cytomegalovirus
mDC	mature dendritic cell, zralá dendritická buňka
MHC gp	major histocompatibility complex, MHC glykoprotein
MICA	MHC class I-chain-related protein A, proteiny podobné MHC glykoproteinům
Mult1	mouse ULBP-like transcript 1, ligand myšího NKG2D
NCR	natural cytotoxicity receptor, rodina receptorů imunoglobulinového typu
NH	natural helper, buňky podobné pomocným T lymfocytům
NK	natural killer, přirozený zabíječ
NKC	NK-gene complex, NK genový komplex
NKG2	NK group 2, rodina receptorů C-lektinového typu
NKp	natural killer protein, skupina NK receptorů z rodiny NCR
NKR-P1	NK-cell receptor protein 1, receptory C-lektinového typu
Ocil	osteoclast inhibitory lectin, protein Clrb
PAMP	pathogen-associated molecular pattern, molekulární vzor asociovaný s patogeny
Rae1	retinoic acid early transcript 1, ligandy pro myší NKG2D
SAP	SLAM associated protein, adaptorové proteiny pro molekuly s ITSM
SH2	Src homology 2, adaptorová doména signálních proteinů vážící sekvence obsahující fosforylovaný tyrosin
SHIP	SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, inositolová fosfatáza
SHP-1/2	SH2 domain-containing protein tyrosin phosphatase-1, protein tyrosin fosfatázy
Src	sarcoma, rodina kináz
Syk	Spleen Y (tyrosin) kinase, rodina kináz
TCR	T cell receptor, specifický receptor T lymfocytů
TNF- α	tumor necrosis factor alpha, faktor způsobující nekrózu tumorů
ULBP	UL-16 binding protein, protein vážící UL16
vNKT	variant natural killer T cell, variantní NKT buňky
ZAP-70	zeta-chain-associated protein kinase-70, kináza

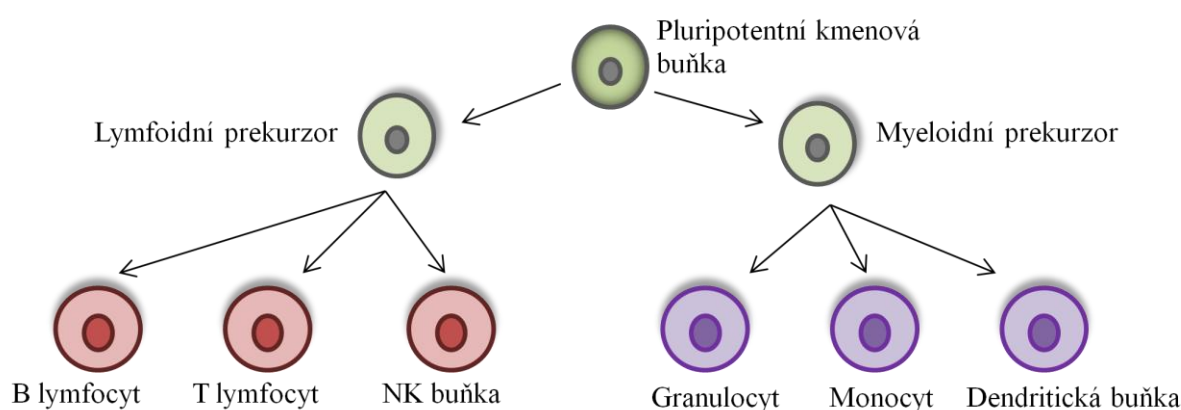
4 ÚVOD

Imunitní systém představuje velmi důležitý mechanismus udržující v organismech homeostázu. Mezi jeho funkce patří obranyschopnost, tedy ochrana těla před potenciálně nebezpečnými strukturami pocházejícími z vnějšího prostředí, jako jsou mikroorganismy a jejich produkty. Dále průběžně organismus zbavuje odumřelých, starých či nějak pozměněných buněk – vykonává imunitní dohled, a také udržuje toleranci vůči vlastním tkáním.

Imunitní mechanismy lze rozdělit do dvou základních skupin, vrozené a antigenně specifické (adaptivní). Prvně jmenované jsou evolučně starší a v organismu připravené již předem. Fungují na základě rozpoznávání obecných strukturních či funkčních motivů, které jsou společné mnohým patogenům (tzv. PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*). Adaptivní imunitní mechanismus začíná reagovat až po styku s antigenem, a to tvorbou vysoce specifických molekul reagujících s tímto jedním antigenem.

Každý z mechanismů má dvě složky, humorální a buněčnou. Komplementový systém, interferony, lektiny a další sérové proteiny tvoří humorální část neadaptivního a protilátky adaptivního imunitního mechanismu. Fagocyty a NK buňky (přirození zabíječi) jsou součástí buněčné vrozené, T a B lymfocyty buněčné adaptivní imunity. Souhrnně jsou tyto buňky označovány jako imunokompetentní. Diferencují se z pluripotentních kmenových buněk v kostní dřeni. V závislosti na působících faktorech nejprve vzniká buď lymfoidní, nebo myeloidní prekurzor.

Z myeloidní linie se tvoří granulocyty (neutrofil, eozinofil, bazofil), dendritické buňky a monocyty, jejichž tkáňovou formou jsou makrofágy. Patří sem také erythrocyty a trombocyty, jejich hlavní funkce však nejsou imunitní. NK buňky, T a B lymfocyty pocházejí z linie lymfoidní (viz. Obr. 1).



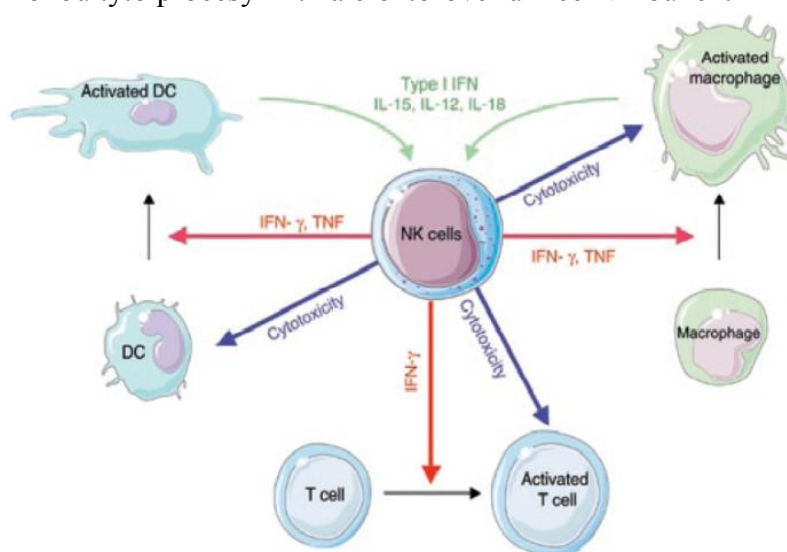
Obr. 1: Diferenciace imunokompetentních buněk

Přestože se NK buňky řadí do přirozené části imunity (rozeznávají evolučně konzervované struktury sdílené mnoha cílovými organismy), některé vlastnosti sdílí s buňkami využívajícími antigenně specifické imunitní mechanismy. Například podobně jako T a B lymfocyty jsou vybaveny receptory specifickými pro cílovou buňku. Navíc některé receptory původně objevené na NK buňkách byly později nalezeny i na jiných buněčných typech, především na T lymfocytech. Další podobností je, že NK buňky vytvářejí stejně jako T či B lymfocyty „klony“ v závislosti na tom, jaké konkrétní receptory exprimují, nebo že také podléhají během svého vývoje selekci, která slouží jako prevence vzniku autoimunity (Raulet, 2004). Takových vlastností mají NK buňky více a budou zmíněny níže.

NK buňky jsou nepostradatelnou součástí imunitního systému, neboť nejenže produkcí cytokinů a chemokinů spouští zánětlivé odpovědi, ale také dokáží ovlivňovat i imunitní odpovědi adaptivního typu, a tvoří tak spojnici mezi oběma imunitními mechanismy (Vivier et al., 2008; viz. Obr. 2). Dále jejich receptory fungující na unikátním principu jim umožňují rozpoznávat nádorové buňky či buňky napadené viry, a proto mohou být NK buňky využity k různým imunoterapiím. Jejich dalším uplatněním by také mohlo být řešení problémů po transplantacích kostní dřeně (Vivier et al., 2011).

Jelikož mnohé ligandy dosud nejsou známy, je potřeba pokračovat ve studiích, jež by pomohly osvětlit interakce těchto molekul s receptory NK buněk (krystalografická struktura těchto receptorů, afinita k jejich ligandům, molekuly účastníci se přenosu signálu a další).

Cílem této práce je zpracovat dostupné informace týkající se receptorů NK buněk, signalizačních drah aktivovaných interakcí těchto receptorů s jejich specifickými ligandy, a dopadů, které mohou tyto procesy mít na efektorové funkce NK buněk.



Obr. 2: Regulace imunitních odpovědí NK buňkami (převzato z Vivier et al., 2008)

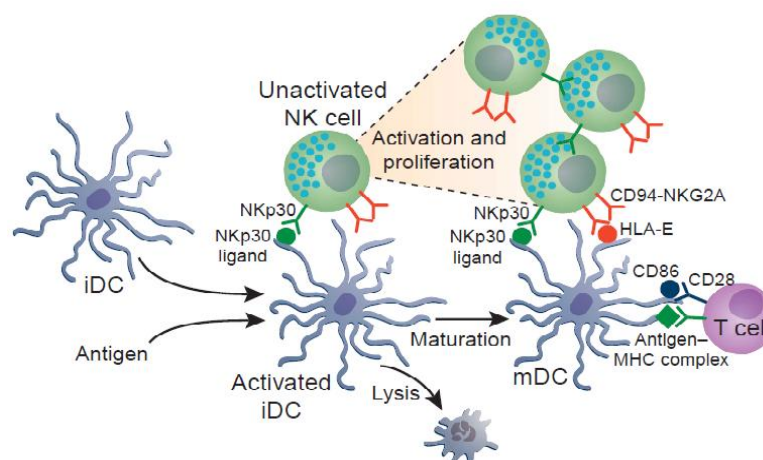
5 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA NK BUNĚK

5.1 Objev NK buněk a jejich souvislost s adaptivní imunitou

NK (*natural killer*) buňky byly objeveny na počátku 70. let 20. století na základě jejich funkce - schopnosti lyzovat některé druhy nádorů bez předchozí stimulace (*Herberman et al., 1975; cit. dle Raulet et al., 2001; Moretta et al., 2002). Byly identifikovány jako granulární lymfocyty (Lanier et al., 1986), postupně však bylo zjišťováno, že jsou specifické pro mnohé nádorové, virem infikované či alogenní buňky, a přitom jim chybí antigen-specifické receptory. Teprve objev mechanismů, které NK buňky používají pro rozpoznávání cílových struktur, pomohl objasnit jejich zařazení v rámci imunitního systému (Vivier, 2006).

NK buňky pochází z lymfoidní vývojové linie stejně jako T a B lymfocyty, jsou však součástí vrozené imunity. Mohou ovlivňovat odpovědi adaptivní imunity, a to prostřednictvím interakcí s jinými buňkami imunitního systému, jako jsou T lymfocyty, makrofágy a především pak dendritické buňky (*dendritic cells*, DC). Kromě toho jejich imunitní odpověď závisí i na cytokinovém mikroprostředí (Vivier, 2008).

NK buňky jsou aktivovány interakcí s DC, a opačně NK buňky stimulují DC k maturaci. Takto vzniklé zralé DC (*mature dendritic cells*, mDC) působí na T lymfocyty (jedná se o CD8⁺ T lymfocyty), které spustí Th1 imunitní odpověď. Ovšem někdy je touto interakcí způsobena lyze nezralých DC (*immature dendritic cells*, iDC), čímž je aktivita T lymfocytů inhibována. iDC totiž neexprimují molekuly HLA-E, které by inhibovaly cytolytickou aktivitu NK buněk. Vzájemná komunikace probíhá prostřednictvím receptorů NK buněk NKp30 a zatím neznámého ligandu (Kaifu et al., 2011; Raulet, 2004; viz. Obr. 3).



Obr. 3: NK buňky prostřednictvím dendritických buněk ovlivňují adaptivní imunitní odpovědi (převzato z Raulet, 2004)

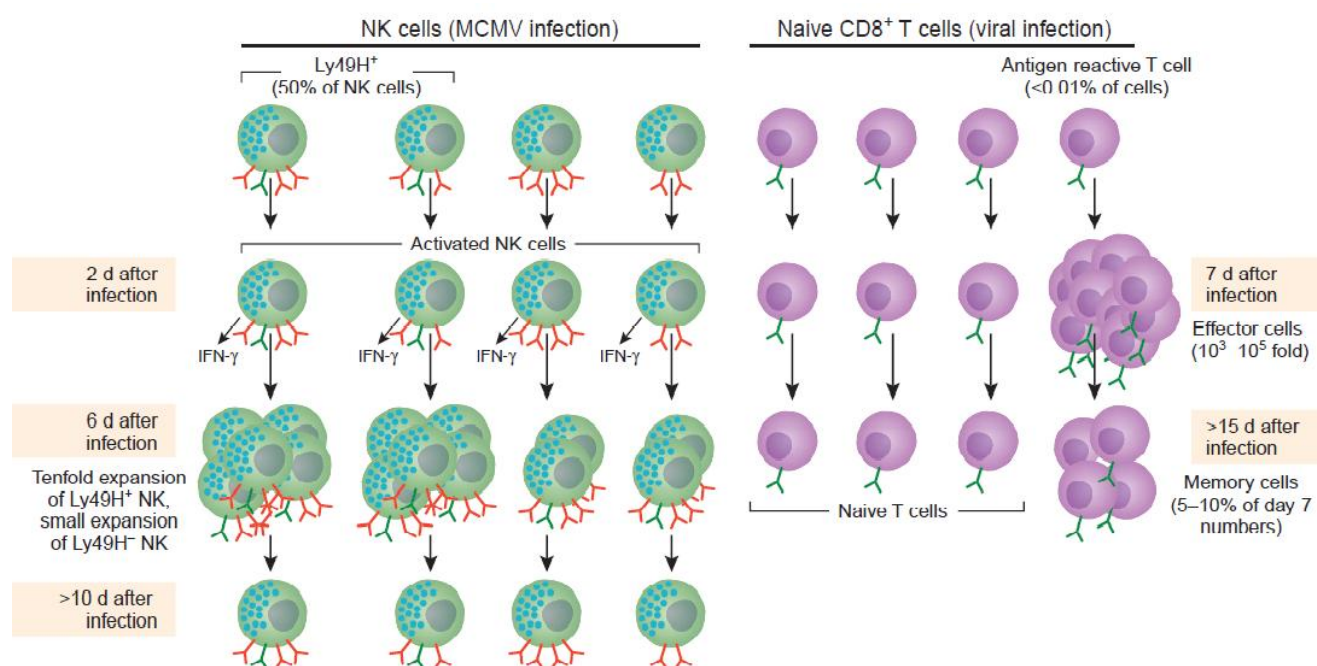
5.1.1 NK buňky, T a B lymfocyty

NK buňky se řadí mezi lymfocyty, s nimiž mají mnoho společného. Jsou vybaveny stejně jako T a B lymfocyty receptory specifickými pro cílovou buňku, rozdílem však je, že nepodstupují během svého vývoje proces přeuspořádání genových segmentů, tzv. V(D)J rekombinace (tímto způsobem lymfocyty generují množství variant receptorů, které by se teoreticky mohly uplatnit jako účinná zbraň v boji proti nějaké cizorodé struktuře). Během svého vývoje každá NK buňka exprimuje různé skupiny aktivačních a inhibičních receptorů (výběr genů pro tyto receptory, které budou přepisovány, je náhodný), vznikají tedy odlišné typy NK buněk podobně jako klony T a B lymfocytů (Raulet et al., 2001). Jednotlivé „klony“ NK buněk se tedy odlišují svými receptorovými repertoáry. V případě lymfocytů má každý klon na svém povrchu jeden typ specifického receptoru. Tento proces výběru genů např. v případě receptorů NK buněk Ly49 probíhá na principu monoalelické exprese (Held et al., 1995). Buňky s heterozygotním Ly49 většinou exprimují jen jednu z jeho alel, což přispívá k rozšíření receptorového repertoáru buňky. Jednotlivé formy receptoru se mohou lišit svou specifitou (Raulet et al., 2001). Frekvence přepisování genu pro Ly49 na NK buňkách je do určité míry zpětně regulována v závislosti na vazbě MHC ligandů na inhibiční receptory (tento mechanismus fungování NK buněk bude zmíněn dále v textu) během vývoje těchto buněk (Tanamachi et al., 2001). Určitou podobnost lze spatřovat v selekci imunoglobulinů B lymfocytů nebo receptorů T lymfocytů (*T-cell receptor*, TCR), kdy jsou během vývoje buněk vybírány vysoce specifické receptory podle konkrétní variabilní části svých genů - na základě zpětné vazby je uplatňována monoalelická exprese (Raulet et al., 2001).

Naopak společnou vlastností s ostatními buňkami vrozené imunity je to, že NK buňky mají na svém povrchu množství odlišných receptorů a koreceptorů (oproti jednomu druhu na T či B lymfocytech). Teprve podle jejich kombinace a vazby příslušných ligandů po střetu s cílovou buňkou dochází buď k aktivaci, nebo inhibici NK buněk. Jedna NK buňka tedy může rozeznávat jak transformované, tak normální buňky (Moretta et al., 2001). Většina z těchto receptorů byla objevena na NK buňkách (proto jsou nazývány „NK receptory“), mnoho z nich se však vyskytuje i na T lymfocytech (receptory specifické pro MHC glykoproteiny I. třídy se objevují na několika klonech T lymfocytů u člověka i myši v periferní krvi; z drtivé většiny se jedná o CD8⁺ T lymfocyty, které jsou NK buňkám z lymfocytů nejbližší a stejně jako ony vykazují cytotoxickou aktivitu) nebo buňkách myeloidní linie (Raulet et al., 2001).

Pokud NK buňkám chybí inhibiční receptory zabraňující útokům proti strukturám organismu vlastním nebo jsou aktivační receptory autoreaktivní, buňky jsou uvedeny do neaktivního stavu podobnému anergii u T či B lymfocytů – jsou umlčeny (Raulet, 2004). NK buňkám a lymfocytům je tedy společná negativní selekce autoreaktivních klonů.

Další shodu mezi NK buňkami a T lymfocyty (konkrétně $CD8^+$) lze najít v jejich aktivaci a pomnožení potřebného buněčného klonu či v případě NK buněk typu (viz. Obr. 4). V klidovém stavu nevykazuje ani jeden z buněčných typů aktivitu. Ta je spuštěna až během imunitní odpovědi organismu na nějaký podnět – infekci, i když v jiných časových rozmezích. Nejprve dochází k pomnožení odpovídajícího buněčného klonu/typu. U T lymfocytů je značné, u NK buněk mnohem mírnější (a nastává u nich až po produkci interferonu- γ , $IFN-\gamma$). Po několika dnech od vypuknutí infekce je množství buněk redukováno, v případě T lymfocytů je ponecháno 5 – 10 % daného klonu z původního množství, jedná se o tzv. paměťové buňky, naproti tomu hladina NK buněk klesne zhruba na úroveň před infekcí (Raulet, 2004).



Obr. 4: Aktivace a expanze konkrétních „klonů“ NK buněk a $CD8^+$ T lymfocytů po napadení organismu virem (MCMV je myši cytomegalovirus; převzato z Raulet, 2004)

Vznik paměťových buněk, které v organismu přetrvávají měsíce až roky, byl připisován vždy jen T a B lymfocytům. Imunitní odpověď po opakovaném střetu s daným patogenem je díky nim rychlejší a mnohem efektivnější. U buněk vrozené imunity se mělo za to, že sekundární imunitní odpověď je kvalitativně i kvantitativně identická s tou primární, což je

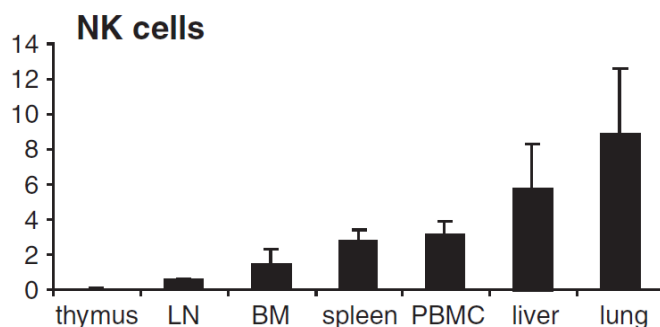
následek krátkého života buněk (řádově hodiny až dny). Vlastnost podobná paměti již však byla popsána i u NK buněk, a to pomocí transkripčního profilu Ly49H⁺ NK buněk v různých fázích jejich diferenciaci během cytomegalovirové infekce (viz. Obr. 4). Bylo dokázáno, že profily inaktivních a paměťových NK buněk se liší jak mezi sebou, tak i od právě aktivovaných buněk a buněk, které prodělaly klonální expanzi (Sun et al., 2011).

Do skupiny T lymfocytů mohou být řazeny NKT buňky exprimující povrchové receptory typické pro T i NK buňky. Jedná se o TCR (specifické receptory T lymfocytů), které však místo komplexů MHC glykoproteinů I. nebo II. třídy (MHC gp I nebo II) s peptidem rozeznávají lipidové či glykolipidové antigeny ve vazbě na CD1d (glykoprotein příbuzný MHC gp I) na antigen-prezentujících buňkách (Brigl, Brenner, 2004). Mezi receptory pocházející z NK buněk patří NK1.1 nebo několik členů receptorové rodiny Ly49 (Kaer et al., 2010). Většina NKT buněk je tvořena typem I. Na svém povrchu mají invariantní TCR, proto se též nazývají iNKT (*invariant natural killer T cell*). Buňky typu II, neboli vNKT (*variant natural killer T cell*), jsou různorodější (Arrenberg et al., 2009). Posledním typem buněk majících na svém povrchu receptory T i NK buněk jsou „NKT-like“ buňky (Godfrey et al., 2004).

NK buňky byly donedávna jedinými lymfocyty vrozené imunity. Byly však objeveny další jim podobné – LTi (*lymphoid tissue inducer*) a NH (*natural helper*) buňky, které se nápadně podobají pomocným T (Th2) lymfocytům. Chybí jim markery typické pro hematopoetické kmenové buňky, ale zároveň jsou na jejich povrchu molekuly, které se vyskytují i na lymfoidních prekurzorech (Moro et al., 2010).

5.2 Anatomická lokalizace a typy NK buněk

Za normálních podmínek se NK buňky nacházejí v kostní dřeni (kde vznikají), v periferní krvi a slezině, ale pod vlivem různých chemoatraktantů mohou migrovat do tkání postižených zánětem (Moretta et al., 2002). Náhradními zdroji NK buněk, které se však svým fenotypem liší od těch vzniklých v kostní dřeni, mohou být lymfatické uzliny, thymus (CD127⁺ NK buňky) nebo játra (Vosshenrich et al., 2006). Avšak není zcela vyloučeno, že jde pouze o buňky, které se do těchto tkání dostaly z kostní dřene díky cirkulaci krve – není jasné, zda jde o proces lokální diferenciaci NK buněk nebo zda přímo pocházejí z dané tkáně (*Garni-Wagner et al., 1990; cit. dle Vosshenrich et al., 2006). Jelikož NK buňky chrání organismus před infekcemi, je důležité, že se vyskytují i v plicích, v případě myši dokonce v hojnějším počtu než kde jinde. NK buňky reprezentují z celkového počtu lymfocytů minoritní část (viz. Obr. 5; Grégoire et al., 2007).



Obr. 5: Distribuce NK buněk v tkáních myši (zleva v brzlíku, lymfatických uzlinách, kostní dřeni, slezině, periferní krvi, játrech, plicích). Osa y udává procentuální zastoupení NK buněk vzhledem k celkovému počtu lymfocytů v uvedených tkáních (převzato z Grégoire et al., 2007)

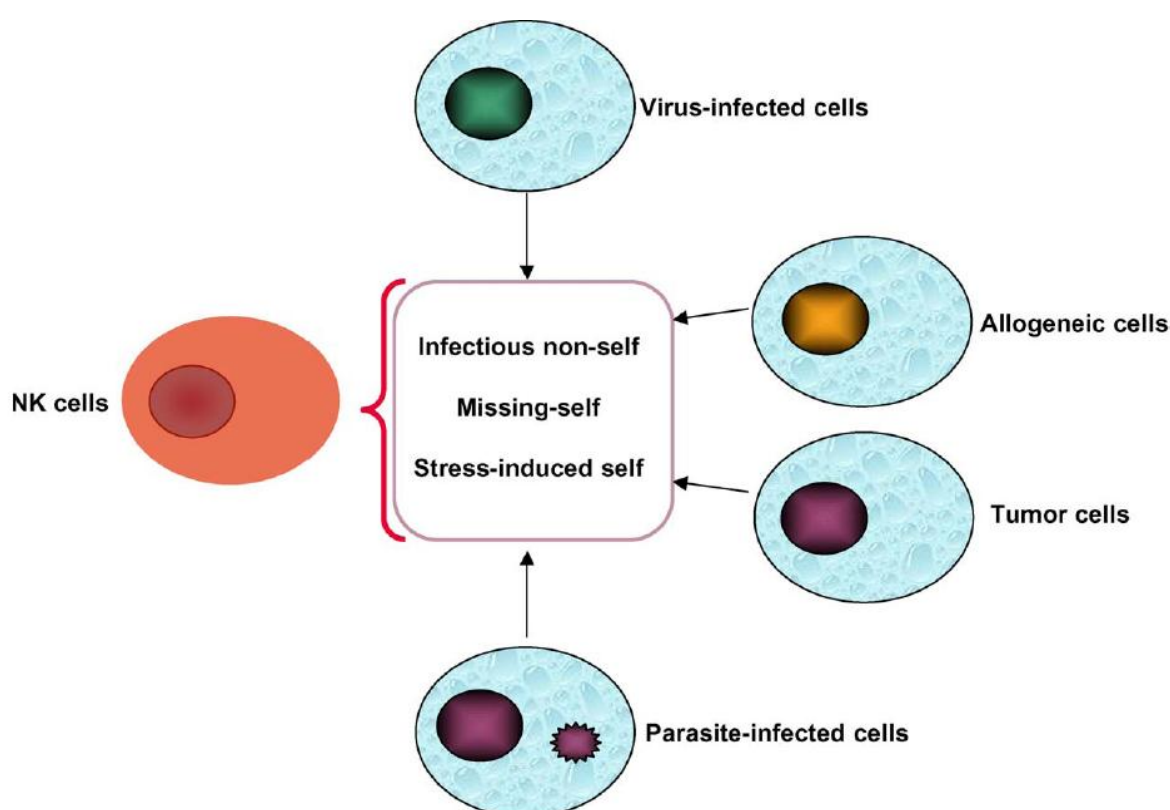
Na základě odlišného fenotypu, funkcí a anatomických rysů byly definovány různé skupiny NK buněk. U myši byly objeveny čtyři lišící se expresí molekul CD11b a CD27 – $CD11b^{low}CD27^{low}$, $CD11b^{low}CD27^{high}$, $CD11b^{high}CD27^{high}$ a $CD11b^{high}CD27^{low}$ NK buňky (*Kim et al., 2002 a Hayakawa et al., 2006; cit. dle Chiossone et al., 2009). U člověka se rozlišují $CD56^{dim}$ a $CD56^{bright}$ NK buňky (Cooper et al., 2001). Rozdíly spočívají ve výskytu v různých tkáních a produkci jiných proteinů (Vivier et al., 2008).

Pomocí vpravení splenocytů do syngenní myši a následného měření procentuálního zastoupení NK buněk v krvi, slezině, lymfatických uzlinách, kostní dřeni a játrech bylo dokázáno, že distribuce přenesených buněk odpovídala rozmístění NK buněk recipientní myši. Také podíl přijatých a vlastních $CD11b^{low}$ a $CD27^{low}$ NK buněk byl podobný v každém orgánu. NK buňky pocházející ze sleziny tedy nejsou naprogramovány, aby se vracely zase zpět do stejného orgánu, nýbrž umístění odpovídá konkrétnímu typu NK buňky. Kostní dřeň a lymfatické uzliny jsou znovu osidlovány především $CD11b^{low}$ buňkami, krev, slezina a plíce zase $CD27^{low}$ buňkami (Grégoire et al., 2007).

Oproti dendritickým buňkám a T a B lymfocytům se o distribuci NK buněk neví mnoho. Ale protože hrají důležitou roli v ochraně tkání, je známo, že za normálních podmínek jich cirkuluje v krvi dostatečné množství na to, aby mohly v případě zánětu rychle proniknout přes stěnu cév k postiženému místu (Grégoire et al., 2007).

5.3 Funkce NK buněk

Hlavním úkolem NK buněk je chránit organismus před transformovanými, alogenními a virem či parazitem infikovanými buňkami, a přitom ušetřit „zdravé“ buňky (Vivier, 2006). Rozpoznávají tedy „cizí“ struktury - virové proteiny nebo PAMP (*Trinchieri, 1989; cit. dle Vivier et al., 2008). Důležitější ale je, že dokáží identifikovat změnu množství MHC gp I na povrchu cílových buněk. Nádorové nebo virem infikované buňky jich totiž produkují buď více, než je běžné (tato rozpoznávací strategie je nazývána *induced-self recognition*) nebo naopak méně (*missing-self recognition*; NK buňky preferenčně reagují na buňky, jež mají na svém povrchu méně MHC gp I; Raulet, 2004; viz. Obr. 6).



Obr. 6: Funkce NK buněk a jejich mechanismy rozpoznávání cílových buněk (převzato z Vivier, 2006)

Cytotoxické T lymfocyty jsou schopny rozpoznávat proteiny nádorového či virového původu prezentované na MHC gp I. Transformované či některé virem infikované buňky však potlačují expresi těchto glykoproteinů, čímž by se staly pro imunitní systém neviditelné. Proto rozpoznávací strategie, kterou používají NK buňky, je pro obranu organismu velice významná.

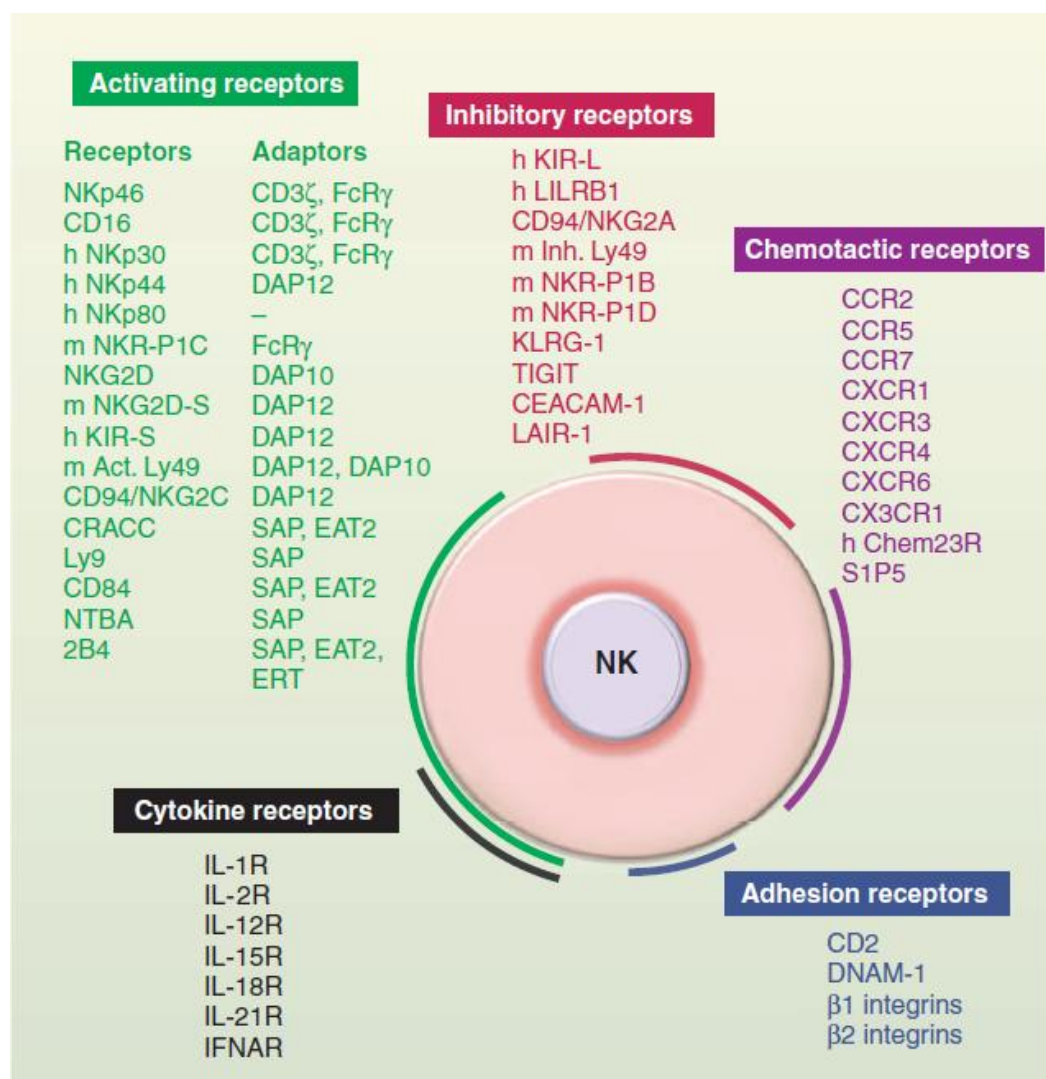
Jestliže NK buňka identifikuje cílovou buňku jako nebezpečnou pro organismus, tedy splňuje výše zmíněné podmínky, je spuštěna její cytotoxická aktivita (vede ke smrti cílové buňky). Průběh tohoto procesu stejně jako u CD8⁺ T lymfocytů zahrnuje působení perforinu a granzymu, enzymů uložených v cytotoxických granulích (Lanier, 2005). Po jejich exocytóze perforin vytvoří v membráně buňky póry, kterými dovnitř pronikne granzym a zahájí apoptózu dané buňky. Cytotoxicita může být započata pomocí aktivačního Fc receptoru NK buněk CD16, který jim umožňuje rozpoznat buňky opsonizované protilátkou (třídy IgG). Jedná se o tzv. cytotoxickou reakci závislou na protilátkách (ADCC, *antibody-dependent cell cytotoxicity*; Vivier et al., 2008).

NK buňky mají také regulační funkci, produkují chemokiny a zánětlivé i imunosupresivní cytokiny. Mezi chemokiny patří například CCL-3 (*CC chemokine ligand 3*), CCL-4 nebo CCL-5 (Walzer et al., 2005), mezi cytokiny IFN- γ , TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), růstové faktory GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) a G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), IL-3 (*interleukin-3*), a za určitých okolností i IL-10 (Vivier et al., 2011), čímž spouští odpovídající imunitní odpovědi (IFN- γ pomáhá zahájit Th1, IL-10 Th2 imunitní odpověď). Dále mají vliv na hematopoézu, růst i funkce monocytů a granulocytů, a modulují činnost adaptivní imunity (viz. Obr. 2; *Trinchieri, 1989; cit. dle Raulet, 2004 a Moretta et al., 2002).

6 RECEPTORY NK BUNĚK

NK buňky exprimují velké množství receptorů, které lze rozdělit do pěti skupin podle jejich funkce: aktivační, inhibiční, adhezivní, cytokinové a chemokinové/chemotaktické (viz. Obr. 7; Vivier et al., 2011). Podle struktury se receptory dělí na C-lektinové a imunoglobulinové (Colonna et al., 2000; Brown et al., 2008).

Receptory interagují jak s ligandy organismu vlastními, tak i s „cizími“ (viz. předchozí kapitola). Některé z těchto receptorů jsou funkčně aktivní pouze u některých organismů, tj. ne všechny receptory mají plně funkční ortology u studovaných organismů (myš, potkan, přežvýkavec, prase a člověk). Nejvíce prozkoumanými organismy jsou člověk a myš, z toho důvodu je právě o jejich receptorech pojednáno níže.



Obr. 7: Receptory NK buněk. Zeleně jsou vypsány aktivační, červeně inhibiční, modře adhezivní, černě cytokinové a fialově chemokinové (převzato z Vivier et al., 2011)

6.1 Receptory podle jejich funkce

6.1.1 Adhezivní, chemokinové a cytokinové receptory

NK buňky jsou schopny vazbou na endotelové buňky extravazace do tkáně postižené zánětem. Tuto interakci umožňují selektiny, integriny (adhezivní molekuly) a chemokinové receptory (Obr. 7).

Integrinů existuje celá řada, dokonce se jejich exprese liší v závislosti na stádiu vývoje NK buňky. Například CD49b a CD11b se vyskytují na zralých NK buňkách, zatímco množství CD11c a CD61 (β -integrin) se v tu dobu snižuje. Nejdůležitější pro extravazaci všech lymfocytů je LFA1 (*leukocyte function-associated antigen-1*; Grégoire et al., 2007; Kim et al., 2002).

NK buňky se váží prostřednictvím selektinů a integrinů na endotelové buňky u postižené tkáně a dochází k jejich průniku mezi buňkami cév k zánětu. Adhezivní molekuly jsou exprimovány pod vlivem zánětlivých cytokinů či chemokinů, které slouží jako hlavní chemotaktické molekuly.

Chemokiny jsou tedy mediátory zánětu. Typ chemokinů závisí na lokalizaci zánětu v rámci organismu a jejich hlavním úkolem je aktivovat NK buňky prostřednictvím jejich příslušných receptorů (Grégoire et al., 2007).

6.1.2 Inhibiční receptory

Úlohou inhibičních receptorů je brzdit cytotoxickou aktivitu NK buněk a produkci zánětlivých cytokinů (IFN- γ , GM-CSF a TNF- α ; Moretta et al., 2001). Tedy pokud došlo k dostatečné vazbě příslušných ligandů na tyto receptory, je cílová buňka rozpoznána jako organismu vlastní a je vůči ní ustavena tolerance.

NK buňky exprimují především inhibiční receptory specifické pro MHC gp I, ale také pro non-MHC ligandy (Obr. 7). Genů pro tyto receptory je mnoho a náhodně jsou v buňkách transkribovány jen některé z nich, a to zřejmě po předchozí stimulaci (antigenem či jiným signálem; Raulet et al., 2001).

Každý inhibiční MHC-specifický receptor se vyskytuje na povrchu některého konkrétního klonu NK buněk v kombinaci s jinými takovými receptory. Tento komplexní receptorový repertoár od sebe jednotlivé buňky odlišuje a dává jim možnost rozpoznávat různé alelické isoformy MHC gp I (Raulet et al., 2001).

Existují tři skupiny inhibičních MHC-specifických receptorů: Ly49, KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptor*) a CD94/NKG2A (*NK group 2*) rodiny. Jejich prostřednictvím NK buňka rozpoznává MHC gp I na cílových buňkách. To se děje přímo - receptory Ly49 u myši a KIR u člověka se váží rovnou na MHC gp I, nebo nepřímo - CD94/NKG2 se váže na peptid odvozený od MHC gp I, který se nachází na neklasických MHC gp I (HLA-E u člověka, Qa-1 u myši, podrobněji popsáno v kapitole 6.3.1.2; Raulet et al., 2001).

Ligandy inhibičních receptorů, jež nejsou příbuzné s MHC gp I exprimují v organismu různé typy buněk (viz. Tabulka 1; to je důležité z hlediska tolerance vlastních struktur, a to především v případě jedinců, kteří zcela postrádají MHC gp I). Objevení těchto ligandů tedy částečně vyvrací hypotézu, že NK buňky zabíjejí buňky, jimž chybí MHC gp I (*missing-self hypothesis*) a přináší nové cíle pro terapeutické manipulace NK buněčných odpovědí. Zároveň ale představuje i další způsob, jak se patogeny mohou skrývat před imunitním systémem. Kromě toho, že některé jsou schopny potlačit prezentaci antigenů na MHC gp I a jiné dokáží vytvářet molekuly podobné MHC gp I, existují i takové, co využívají non-MHC ligandy organismu k vlastní protekci před NK buňkami (Kumar et al., 2005).

Receptor	Alternative names	Species	Receptor expression	Host ligand	Alternative names	Ligand expression
2B4	CD244	Mouse and human	NK cells, memory CD8 ⁺ T cells and other leukocytes	CD48	–	Nucleated haematopoietic cells and human endothelial cells
CEACAM1	CD66a or BGP	Mouse and human	Ubiquitous	CEACAM1 CEACAM5	CD66a CD66e or CEA	Ubiquitous Some types of epithelial cell
gp49B1	–	Mouse	Activated NK cells, activated T cells, mast cells and macrophages	$\alpha_v\beta_3$ -Integrin	Vitronectin receptor or CD51–CD61	Low levels by most cells and high levels by certain cell types
IRp60	–	Human	NK cells, some subsets of T cells, monocytes and granulocytes	Unknown, probably not an MHC molecule	–	–
KLRG1	MAFA	Mouse and human	Some subsets of NK cells, activated T cells, mast cells and basophils	Unknown, probably not an MHC molecule	–	–
LAIR1	–	Mouse and human	NK cells and most leukocytes	Unknown, probably not an MHC molecule	–	–
NKR-P1B	CD161b, KLRB1B or Ly55b	Mouse	NK cells	CLR-B	OCIL	Nucleated haematopoietic cells and some types of non-haematopoietic cell
NKR-P1D	CD161d, KLRB1D or Ly55d	Mouse	Most NK cells	CLR-B	OCIL	Nucleated haematopoietic cells and some types of non-haematopoietic cell
SIGLEC7	AIRM1 or p75	Human	NK cells, monocytes and some subsets of CD8 ⁺ T cells	Sialic acid	–	Ubiquitous
SIGLEC9	–	Human	50% of NK cells	Sialic acid	–	Ubiquitous
SIGLEC-E	–	Mouse	50% of NK cells	Sialic acid	–	Ubiquitous

AIRM1, adhesion inhibitory receptor molecule 1; BGP, biliary glycoprotein; CEA, carcinoembryonic antigen; CEACAM, CEA-related cell-adhesion molecule; CLR-B, C-type-lectin-related B; gp49B1, glycoprotein 49 B1; IRp60, inhibitory receptor protein 60; KLR, killer-cell lectin-like receptor; LAIR1, leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1; MAFA, mast-cell-function-associated antigen; NK, natural killer; NKR-P1, NK-cell receptor protein 1; OCIL, osteoclast inhibitory lectin; SIGLEC, sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin.

Tabulka 1: Inhibiční receptory NK buněk a non-MHC ligandy, které rozpoznávají (převzato z Kumar et al., 2005)

6.1.3 Aktivační receptory

Tyto receptory spouštějí po interakci s ligandem signální kaskády, které jsou popsány v následující kapitole.

NK buňky mají na svém povrchu různé aktivační receptory (a také koreceptory), které mohou být rozděleny do dvou základních kategorií – rozpoznávající ligandy podobné MHC gp (*MHC-like ligands*) a non-MHC ligandy. Konkrétní příklady jsou uvedeny na Obr. 7.

Aktivační MHC-specifické receptory reagují především na buňky, jejichž exprese MHC gp je vyšší než normálně (to může být důsledkem virové infekce, kdy jsou v daném místě uvolňovány interferony). Působením některých virů se zase na povrchu napadených buněk objevují molekuly podobné MHC gp, které aktivační receptory také rozpoznávají, nebo se

jejich cílem stávají epitopy MHC gp, které jsou virového či nádorového původu. Evidentně váží i ligandy patřící „normálním“ buňkám (Raulet et al., 2001).

Expresí MHC-specifických aktivačních receptorů na povrchu jedné konkrétní buňky se překrývá s expresí MHC-specifických inhibičních receptorů (avšak musí jít o různé isoformy MHC gp, aby cílová buňka nebyla v případě ztráty inhibičních MHC-ligandů příliš snadno napadnutelná NK buňkami; Raulet et al., 2001).

6.2 NK buněčná signalizace

Signalizace aktivačními a inhibičními receptory NK buněk je zajištěna konzervovanými sekvencemi v jejich cytoplasmatické doméně nebo v adaptorových proteinech, které jsou s nimi asociovány.

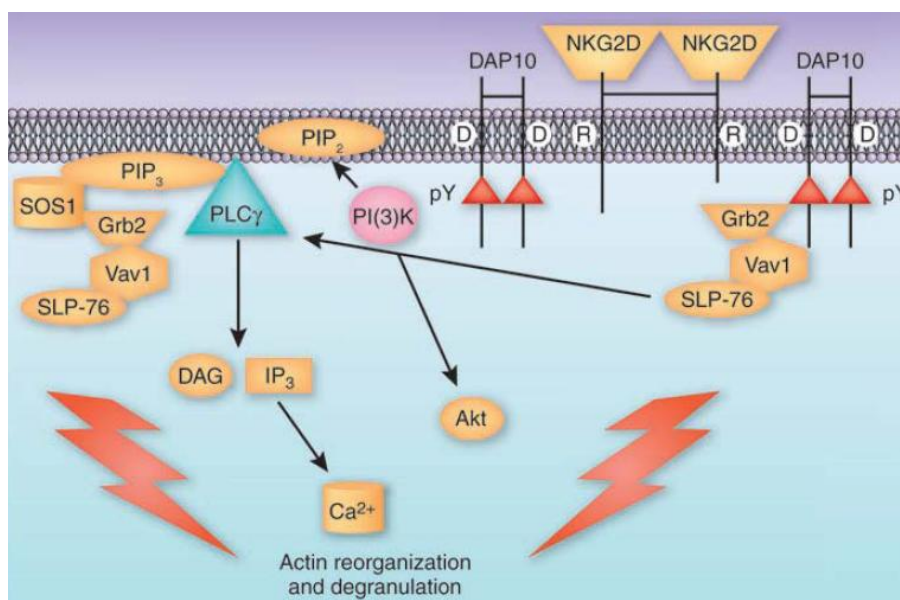
V případě inhibičních receptorů jde o ITIM (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*), který je přímo součástí receptoru a je definován sekvencí (I/L/V/S)_xYxx(L/V). X představuje jakoukoli aminokyselinu a lomítka alternativní aminokyseliny na dané pozici. Po vazbě ligandu na takový receptor dojde k fosforylaci tyrosinového zbytku v ITIM, pravděpodobně kinázami z rodiny Src. To umožňuje vazbu tyrosin fosfatázy SHP-1, SHP-2 nebo SHIP. Jedna z nich poté defosforyluje substráty tyrosin kináz patřících do aktivačních kaskád, a tím potlačuje aktivaci NK buňky (Lanier, 2008 a Höglund et al., 2010).

U myši a člověka byly identifikovány tři signalizační dráhy zprostředkované aktivačními receptory.

První využívá motiv ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*) nacházející se v cytoplasmatické části transmembránových adaptorových proteinů – FcεRI-γ, CD3-ζ nebo DAP12 (Lanier, 2008) asociovaných s aktivačními receptory. (D/E)xxYxx(L/I)_{x₆₋₈}Yxx(L/I) je aminokyselinová sekvence, kterou obsahují a _{x₆₋₈} jakýchkoli 6 až 8 aminokyselin. Po vazbě ligandu na tyto receptory dochází k jejich asociaci s adaptory, a to díky rozdílně nabitým aminokyselinovým zbytkům v jejich cytoplasmatických doménách. Tak vzniká funkční signalizační komplex a může dojít k fosforylaci tyrosinu v sekvenci ITAM, nejspíše kinázami z rodiny Src. Adaptory jsou pak schopny vázat tyrosin kinázy Syk a ZAP-70, a spouští se signalizační kaskáda vedoucí k reorganizaci aktinového cytoskeletu (je potřeba k polarizaci NK buňky a uvolnění cytotoxických granulí s perforinem a granzymem) a transkripci mnoha cytokinových a chemokinových genů. Podobně probíhá i signalizace u T a B lymfocytů po vazbě antigenu na jejich specifické receptory (Lanier, 2008).

Na počátku druhé signalizační kaskády stojí aktivační receptor NKG2D, který po vazbě příslušného ligandu asocioje s transmembránovým proteinem DAP10 v případě člověka (u

myši navíc i s DAP12, ale další průběh je poněkud odlišný). Cytoplasmatická doména DAP10 se skládá pouze z 21 aminokyselin a obsahuje jeden známý signalizační motiv (YINM). Pokud dojde k jeho fosforylaci na tyrosinu (pravděpodobně opět kinázami z rodiny Src, nebo Jak3; Horng et al., 2007), může se na něj vázat podjednotka fosfatidylinositol-3-OH kinázy p85, nebo adaptor Grb2. Další průběh dráhy znázorňuje Obr. 8 (Lanier, 2008).



Obr. 8: Signalizační kaskáda zprostředkovaná receptorem NKG2D a s ním asociovaným DAP10 (převzato z Lanier, 2008)

Poslední signalizační dráha začíná membránovým receptorem CD244, jinak zvaným také 2B4. Ten obsahuje sekvenci ITSM (*immunoreceptor tyrosin-based switch motif*; TIYxx(V/I)). Po vazbě ligandu (glykoproteinu CD48, jenž se nachází na povrchu hematopoetických buněk) dochází k fosforylaci tyrosinu v ITSM (Lanier, 2008), což vede k interakci s adaptorovou doménou SH2 jednoho z těchto proteinů: SAP nebo EAT-2 u člověka, u myši je třetí možností ERT. SAP je schopen vázat SH3 doménu kinázy Fyn z rodiny Src, čímž je ve výsledku NK buňka aktivována, zatímco EAT-2 ani ERT toho schopny nejsou, tudíž je NK buňka inhibována (Veillette et al., 2006).

Protože mají NK buňky na svém povrchu velké množství receptorů, ať už aktivačních nebo inhibičních, dostávají najednou několik signálů od různých ligandů na povrchu cílové buňky, které musí integrovat a na základě toho nějak zareagovat. Záleží na tom, jaké signály převáží - aktivační nebo inhibiční. Chování NK buněk je rovněž ovlivněno i prostřednictvím jejich cytokinových a chemokinových receptorů (Vivier et al., 2008; Vivier et al., 2011; Lanier et al., 2005).

6.3 Receptory podle jejich struktury

6.3.1 C-lektinové receptory

C-lektinové receptory jsou transmembránovými proteiny typu II u NK buněk (ale i jiných imunokompetentních buněk), jež rozeznávají hlavně MHC gp I na cílových buňkách. Řadí se sem homodimery z rodiny Ly49 (též KLRa), které váží H-2 molekuly, NKG2/CD94 heterodimery vážící myši Qa-1 či lidské HLA-E (Colonna et al., 2000), a NKR-P1 receptory (*NK-cell receptor protein 1*, též KLRb; Yokoyama et al., 2003), jejichž ligandem jsou molekuly Clr (*C-lectin related*, Clec 2; Carlyle et al., 2004; Chen et al., 2011). Geny kódující tyto receptory a Clr proteiny jsou uloženy na chromozómu v klastrech, v tzv. NK genovém komplexu (NKC; *NK-gene complex*). V případě myši se jedná o chromozóm 6, v případě lidí 12 (Colonna et al., 2000).

Avšak NKC byl popsán u různých druhů živočichů od ryb přes ptáky a vačnatce až po savce (Hao et al., 2005).

Receptory NK genového komplexu mohou být jak aktivační, tak inhibiční. U některých však funkce není dosud určena, na základě jejich sekvenční homologie lze ale predikovat (většinou se shoduje více než 80 % aminokyselin). Stejně tak zbývá identifikovat i některé ligandy těchto receptorů (viz. Tabulka 2; Yokoyama et al., 2003).

Receptor	Gene	Species*	Function	Ligands†
KLRG1 ⁵ (MAFA-L)	<i>Klrg1/KLRG1</i>	M/H	Not known	Not known
NKRP1A (KLRB1 ⁵)	<i>NKRP1A</i>	H	Activation	Not known
Nkrp1a	<i>Nkrp1a</i>	M	Activation	Not known
Nkrp1b	<i>Nkrp1b</i>	M (SJL, SWR)	Inhibition	Not known
Nkrp1c (NK1.1)	<i>Nkrp1c</i>	M	Activation	Not known
Nkrp1d	<i>Nkrp1d</i>	M	Inhibition	Not known
Nkrp1f	<i>Nkrp1f</i>	M	Activation	Not known
Clrb, Clrf, Clrg	<i>Clrb, Clrf, Clrg</i>	M	Not known	Not known
LLT1	<i>LLT1</i>	H	Not known	Not known
AICL	<i>AICL</i>	H	Not known	Not known
KLRF1	<i>KLRF1</i>	H	Activation	Not known
CLEC1	<i>CLEC1</i>	H	Not known	Not known
CLEC2	<i>Clec2/CLEC2</i>	M/H	Not known	Not known
DECTIN1	<i>Dectin1/ DECTIN1</i>	M/H	Not known	β-glucan
LOX1 (ORL1)	<i>LOX1</i>	M/H	Not known	LDL, HSPAP
NKG2D (KLRK1 ⁵)	<i>Nkg2d/NKG2D</i>	M/H	Activation, co-stimulation	Rae1/60, Mult1/MIC, ULBP
CD94 ^I -NKG2A (KLRK1 ⁵)	<i>CD94- Nkg2a/NKG2A</i>	M/H	Inhibition	Qa-1/HLA-E
CD94 ^I -NKG2C (KLRK2 ⁵)	<i>CD94- Nkg2c/NKG2C</i>	M/H	Activation	Qa-1/HLA-E
CD94 ^I -NKG2E (KLRK3 ⁵)	<i>CD94- Nkg2e/NKG2E</i>	M/H	Activation	Qa-1/HLA-E
CD94 ^I -NKG2F (KLRK4 ⁵)	<i>CD94-NKG2F</i>	H	Not known	Not known
Ly49a	<i>Ly49a</i>	M	Inhibition	H-2D ^d , H-2D ^k , H-2D ^p
Ly49c	<i>Ly49c</i>	M	Inhibition	H-2K ^b , H-2D ^p , H-2K ^d , H-2D ^d , H-2D ^k
Ly49d	<i>Ly49d</i>	M	Activation	H-2D ^d , Hm1-C4
Ly49e	<i>Ly49e</i>	M	Inhibition	Not known
Ly49g (LGL1)	<i>Ly49g</i>	M	Inhibition	H-2D ^d
Ly49h	<i>Ly49h</i>	M	Activation	m157

Tabulka 2: NKC receptory, jejich funkce a ligandy. „M“ znamená myš, „H“ člověk (převzato z Yokoyama et al., 2003). Ligandem receptorů NKR-P1 jsou molekuly Clr, neboli Clec2 (budou zmíněny níže v textu)

6.3.1.1 Receptory z rodiny Ly49

Receptory z rodiny Ly49 jsou doposud nejlépe popsány zástupci ze všech NK receptorů. Jsou to transmembránové proteiny typu II tvořící homodimery (Smith et al., 1998) a nejspíše se vyskytují pouze u hlodavců. U myšního kmene C57BL/6 bylo dokonce popsáno celkem 16 různých genů pro tyto receptory (Wilhelm et al., 2002). U člověka byl nalezen gen Ly49I, který je ale kvůli bodové mutaci, předčasně zařazenému stop kodónu, nefunkční (Westgaard et al., 1998).

Většina Ly49 receptorů rozpoznává H-2 ligandy (myší MHC gp I), výsledkem může být jak aktivace, tak inhibice efektorových funkcí NK buňky. Receptory Ly49D a H mají motiv ITAM, který po vazbě ligandu asociuje s DAP12 a NK buňka je stimulována (Smith et al., 1998). K inhibici dochází ve většině případů, receptory tedy obsahují ve své cytoplasmatické části motiv ITIM (Ly49A, C, E a G; viz. Tabulka 2).

Například pomocí receptoru Ly49H dokáží NK buňky rozpoznat přímo virový protein m157 podobný MHC gp I, který exprimují buňky napadené MCMV (viz. Obr. 4; Arase et al., 2002), nebo Ly49P váže H-2D^k protein na virem infikovaných buňkách (Desrosiers et al., 2005). Inhibiční receptory Ly49 rozeznávají vlastní molekuly, MHC gp I (Brown et al., 2008).

6.3.1.2 Receptory z rodiny NKG2/CD94

Členy této receptorové rodiny jsou NKG2A, B, C, D, E, F a H (Lanier, 2005). Geny pro tyto receptory jsou kódovány genomem hlodavců a lidí (Berg et al., 1998). Aby byly NKG2 proteiny schopny signalizace, musí dimerizovat s molekulou CD94, která má krátkou cytoplasmatickou doménu bez zjevných funkčních motivů. Receptory jsou heterodimery spojené disulfidickou vazbou, výjimkou je pouze homodimer NKG2D (Lazetic et al., 1996).

Stejně jako předchozí skupina receptorů, i tyto mohou být aktivační i inhibiční (Tabulka 2). NKG2A a B obsahují dvě sekvence ITIM (Berg et al., 1998). NKG2C, E a H interagují s proteinem DAP12, NKG2D především s DAP10, jsou tedy aktivační. O receptoru NKG2F se toho prozatím mnoho neví (Yokoyama et al., 2003).

Cílem receptorů této rodiny, hlavně NKG2A a C, jsou neklasické MHC gp I. U člověka se jedná o molekuly HLA-E, u myši Qa-1 (Tabulka 2; Lanier, 2005). Strukturně se tyto molekuly podobají klasickým MHC gp I, prezentují však především peptidy odvozené od signálních peptidů MHC gp I. Touto cestou, přímou interakcí NKG2/CD94 receptorů s HLA-E či Qa-1, mohou NK buňky nepřímou kontrolou exprese klasických MHC gp I a stejně tak i exprese samotných molekul HLA-E nebo Qa-1, a podle toho vyvozovat důsledky. Pokud

jedna NK buňka exprimuje oba tyto receptory (NKG2A i C), převažují inhibiční účinky receptoru NKG2A nad těmi aktivačními NKG2C (Yokoyama et al., 2003).

Receptor NKG2D se od ostatních členů této rodiny liší. Kromě toho, že se jedná o homodimer a že interaguje hlavně se signalizační molekulou DAP10, vykazuje pouze 28% shodu v aminokyselinové sekvenci s ostatními NKG2 receptory (jinak jsou receptory identické zhruba ze 70 %; Yokoyama et al., 2003). U lidí je ligandem receptoru NKG2D homolog MHC gp I MICA (*MHC class I-chain-related protein A*; Bauer et al., 1999), MICB a ULBP (*UL-16 binding protein*; Cosman et al., 2001). MICA a MICB jsou exprimovány epitelovými a endotelovými buňkami a jejich produkce stoupá během nádorového onemocnění či zánětu, a též pod vlivem různých forem buněčného stresu. Prostřednictvím vazby těchto ligandů na receptor NKG2D tedy může být spuštěna žádoucí imunitní odpověď (Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001). ULBP je exprimován konstitutivně v různých tkáních a stimuluje NK buňky k produkci cytokinů a chemokinů. Pokud je buňka rezistentní na „útoky“ NK buněk a je jí produkován ULBP, zvyšuje se její citlivost na cytotoxicitu NK buněk. Jestliže se na ULBP (případně i na MICB) váže glykoprotein UL16 pocházející z lidského cytomegaloviru, blokuje ho, čímž se infikovaná buňka stává pro imunitní systém neviditelná (Cosman et al., 2001).

Ligandem myších NKG2D receptorů jsou molekuly H-60, pět variant Rae1 (*retinoic acid early transcript 1*; Diefenbach et al., 2000) a Mult1 (*mouse ULBP-like transcript 1*; Carayannopoulos et al., 2002). H-60 a Rae1 jsou podobné MHC gp I a jsou produkovány transformovanými buňkami ve větším množství, než je obvyklé u „normálních“ buněk. To u NK buněk vyvolává cytotoxickou odpověď a produkci IFN- γ , tyto ligandy jsou tedy stimulatory vrozené imunitní odpovědi (Diefenbach et al., 2000).

6.3.1.3 Receptory z rodiny NKR-P1

Zatím bylo na NK buňkách myši identifikováno celkem 7 členů této rodiny: NKR-P1 A, B, C (též NK1.1), D, E, F a G (Plougastel et al., 2001; Lanier, 2005; Yokoyama et al., 2003). U člověka byl popsán pouze receptor NKR-P1A, neboli CD161 (Lanier et al., 1994).

Cytoplasmatická doména NKR-P1D obsahuje motiv ITIM, jedná se tedy o inhibiční receptor. NKR-P1A, C a F jej nemají a jsou aktivační (Lanier, 2005). NKR-P1C asociuje s adaptorem Fc ϵ RI- γ , u něhož byla nalezena sekvence ITAM (Arase et al., 1997), obdobné interakce lze přisuzovat i zbylým dvěma aktivačním receptorům (Lanier, 2005). Později byl NKR-P1B zařazen mezi inhibiční receptory obsahující ITIM (Carlyle et al., 1999), stejně tak i

NKR-P1G (Kveberg et al., 2010). NKR-P1E byl identifikován jako pseudogen, není tedy funkční (Plougastel et al., 2001).

Dosud nebyly určeny ligandy pro všechny NKR-P1 receptory, některé jsou však již známy. NKR-P1B a D váží proteiny Clr-b, neboli Ocil (*osteoclast inhibitory lectin*). Expresí těchto molekul na myších transformovaných buňkách je blokována cytotoxická aktivita NK buněk. Ovšem jejich množství na takových buňkách bývá obvykle nižší než na těch „zdravých“, proto hrají důležitou roli ve strategii *missing-self recognition* (Carlyle et al., 2004). Receptory NKR-P1F a G interagují s ligandy Clr-c, Clr-f, Clr-g a Clr-d/x (Kveberg et al., 2010).

O jediném lidském receptoru z této rodiny dosud není mnoho známo (Lanier, 2005), nedávno byl však identifikován jeho ligand – LLT1 protein (*lectin-like transcript 1*), lidský ortolog myších Clr molekul (Kamishikiryo et al., 2011).

6.3.2 Imunoglobulinové receptory

Imunoglobulinové receptory zahrnují skupiny KIR a LILR, neboli také ILT2 či LIR-1 (*human Ig-like transcript 2, leukocyte inhibitory receptor 1*), které u člověka rozeznávají MHC gp I, tedy molekuly HLA (viz. Tabulka 3; Colonna et al., 2000). Třetí skupinou jsou receptory NCR (*natural cytotoxicity receptors*; Moretta et al., 2000).

V případě KIR se jedná se o transmembránové glykoproteiny typu I se dvěma až třemi imunoglobulinovými doménami v extracelulární oblasti NK buněk i jiných imunokompetentních buněk, které jsou odděleny od transmembránové části krátkým řetězcem. Některé receptory mají intracelulárně lokalizované motivy ITIM (jeden až dva), u jiných je tato část kratší a ITIM nemají. Jsou tedy schopny jak aktivace, tak inhibice (viz. Tabulka 3). LILRB1 je jediným genem ze skupiny receptorů LILR, který je exprimován NK buňkami. Je to povrchový glykoprotein se čtyřmi extracelulárně lokalizovanými imunoglobulinovými doménami a čtyřmi ITIM sekvencemi (Lanier, 2005).

Receptorové rodiny KIR a LILR jsou kódovány jedním genovým komplexem ležícím na chromozómu 19 u lidí – LRC (*leukocyte receptor complex*). Ten se vyskytuje i u primátů (Wilson et al., 1997; Colonna et al., 2000).

NCR se od zbylých zástupců imunoglobulinových receptorů poměrně značně liší. Pouze jeden z nich obsahuje imunoglobulinovou doménu a také typické signální motivy nejsou přímo jejich součástí. Asociují s adaptory majícími ITAM, a tím NK buňky aktivují. Geny pro tyto receptory jsou u lidí uloženy na chromozómu 6 a 19 a vyskytují se i u jiných živočichů (Moretta et al., 2000).

Gene	Other Names	CD	Function	Signaling	Ligand
LILRB1	ILT2/LIR1	CD85j	Inhibition	ITIM	HLA-A,B,C,E,F,G, CMV UL18
KIR3DL3		CD158z	Inhibition	ITIM	?
KIR2DL3		CD158b2	Inhibition	ITIM	HLA-C S77/N80
KIR2DL2		CD158b1	Inhibition	ITIM	HLA-C S77/N80
KIR2DL1		CD158a	Inhibition	ITIM	HLA-C N77/K80
KIR2DL4		CD158d	Inhibition/ Activation?	FcεRIγ/ITIM?	HLA-G?
KIR3DL1		CD158e1	Inhibition	ITIM	HLA-Bw4
KIR3DS1		CD158e2	Activation	DAP12 ^a	?
KIR2DL5A		CD158f	Inhibition	ITIM	?
KIR2DL5B			Inhibition	ITIM	?
KIR2DS3			Activation	DAP12	?
KIR2DS5		CD158g	Activation	DAP12	?
KIR2DS1		CD158h	Activation	DAP12	HLA-C, weakly
KIR2DS2		CD158j	Activation	DAP12	?
KIR2DS4		CD158i	Activation	DAP12	HLA-C, weakly
KIR3DL2		CD158k	Inhibition	ITIM	HLA-A?

Tabulka 3: Receptor LILRB1 a receptory ze skupiny KIR. Jejich funkce, způsob signalizace a ligandy (převzato z Lanier, 2005). Ligandem pro KIR3DS1 je nejspíše HLA-Bw4, pro KIR2DS3 a KIR2DS2 HLA-C skupiny I. Ostatní prozatím známy nejsou (Campbell et al., 2011).

6.3.2.1 Rodina KIR

Do této receptorové rodiny spadá u člověka celkem 17 různých členů, v Tabulce 3 nejsou jmenovány KIR2DP1 a KIR3DP1. Názvosloví těchto receptorů se odvíjí od jejich struktury a molekul, které kódují. Číslo následující „KIR“ udává počet imunoglobulinových domén, „D“ znamená doména. Následující písmeno L značí dlouhý řetězec v cytoplasmě (*long*), S krátký řetězec (*short*), nebo P pseudogen. Poslední číslice je rovna počtu genů, jež kódují protein se strukturou odpovídající rysům rodiny KIR (Marsh et al., 2002). Počet KIR genů se však může lišit v závislosti na dané populaci. Geny z této rodiny byly identifikovány i u primátů, krav a koní, dva geny podobné lidskému KIR3DL také u myši (Lanier, 2005).

KIR s cytoplasmatickou doménou S mají ve své transmembránové části lysin, který je důležitý pro asociaci s adaptorovým proteinem DAP12, jenž obsahuje motiv ITAM. Signalizace dále pokračuje vazbou tyrosin kináz Syk/ZAP-70 na DAP12 a končí aktivací NK buňky. Receptory vlastní doménu L jsou inhibiční (je v ní uložena sekvence ITIM, na kterou se váží tyrosin fosfatázy). Jedinou výjimkou je KIR2DL4, který asociuje s adaptorem FcεRI-γ obsahujícím ITAM a slouží spíše jako aktivátor produkce cytokinů. Všechny tyto aktivační a inhibiční receptory jsou kódovány jednotlivými geny, nejsou generovány alternativním sestřihem (Lanier, 2005; Campbell et al., 2011).

U primátů nebyly popsány receptory Ly49, ale vyvinuly se u nich jiné receptory (KIR) schopné je v jejich funkcích nahradit, což je příkladem konvergence evoluce. Obě receptorové rodiny mají tedy mnoho společného. Jsou kódovány malými genovými rodinami, jednotlivé geny vznikaly duplikací nebo se rozlišily genovou konverzí. Receptory vykazují značný genetický polymorfismus a využívají monoalelickou expresi. Dále se objevují na některých NK buňkách a paměťových T lymfocytech a repertoár receptorů je vybírán náhodně v závislosti na haplotypu MHC gp I. Obsahují geny, které kódují inhibiční receptory s ITIM motivem v cytoplasmatické doméně, a aktivační receptory, jež asociují s adaptorem DA12 majícím ITAM. Obě rodiny také rozeznávají polymorfní determinanty na MHC gp I (Lanier, 2005).

KIR tedy rozpoznávají HLA proteiny a peptidy na nich prezentované, už ale nedokáží rozlišit, zda se jedná o peptidy vlastní nebo cizí. Biologická relevance toho není zcela jasná. I malé rozdíly v aminokyselinové sekvenci jednotlivých receptorů vedou k rozdílům ve vazbě na HLA molekuly a v její síle. Poruchy aktivačních receptorů mohou vést k autoimunitním chorobám. Vazba příslušných HLA ligandů na inhibiční receptory KIR způsobuje supresi cytotoxicity a zastavuje i cytokinovou sekreci (Lanier, 2005).

Úpravou exprese KIR by mohla být léčena rakovina, virové infekce (konkrétně HIV) a komplikace způsobené transplantací hematopoetických kmenových buněk (Parham et al., 2003; Campbell et al., 2003).

6.3.2.2 Rodina LILR

Tuto receptorovou rodinu tvoří celkem 13 LILR genů. Z nich pouze dva, LILRB1 (ILT2, LIL1) a LILRB2 (ILT4, LIR2), jsou inhibiční, a jak bylo zmíněno výše, jen LILRB1 je receptorem NK buněk (Lanier, 2005). LILR rozpoznávají spíše MHC gp I samostatně než v komplexu s peptidem (Colonna et al., 2000).

LILRB1 má poměrně širokou specifitu, váže s nízkou afinitou konzervovanou oblast na $\alpha 3$ doméně molekul HLA-A, B, C, E, F a G. Rozpoznává také homolog MHC gp I, protein UL18 pocházející z lidského cytomegaloviru, a to s tisícinásobně vyšší afinitou než ligandy hostitele. To, a i jiné strategie, viru zajišťuje bezpečí před imunitním systémem (Chapman et al., 1999).

I když jsou LILR receptory velmi důležité pro potlačení aktivace NK buněk, zdá se, že receptory KIR a NKG2/CD94 hrají v regulaci NK buněčných odpovědí důležitější roli (Lanier, 2005).

6.3.2.3 Receptory NCR

Tato rodina je tvořena aktivačními receptory NKp46, NKp44 a NKp30, které jsou exprimovány striktně jen NK buňkami. Jsou schopny rozpoznat cílovou buňku přímo a způsobit její smrt. Strukturně mezi imunoglobulinové receptory příliš nezapadají a ani vzájemně nejsou homologní (Colonna et al., 2000).

NKp46 je hlavním aktivačním receptorem NK buněk schopným vyvolat jak cytotoxicitu, tak produkci cytokinů (Moretta et al., 2000). Je exprimován aktivovanými i neaktivovanými NK buňkami (Sivori et al., 1997). Jedná se o transmembránový protein typu I se dvěma extracelulárně lokalizovanými imunoglobulinovými doménami. V transmembránové oblasti obsahuje nabitou aminokyselinu arginin, která je nejspíše důležitá pro interakci s adaptorem obsahujícím ITAM (CD3 ζ a/nebo Fc ϵ R γ ; Sivori et al., 1997; Cantoni et al., 1999), řetězec v cytoplasmě je dlouhý 30 aminokyselin (Moretta et al., 2000). Homology lidského NKp46 byly objeveny i u myši (Biassoni et al., 1999) a krysy (Falco et al., 1999).

Glykoprotein NKp44 je NK buňkami exprimován po stimulaci IL-2. Vyskytuje se tedy pouze na aktivovaných buňkách, a tudíž je markerem pro aktivované NK buňky (Vitale et al., 1998). Vyznačuje se jednou extracelulární doménou V-typu (podobná imunoglobulinovým doménám), v jeho transmembránové části se nachází kladně nabitý lysin. Ten asociuje s adaptorem DAP12 (Cantoni et al., 1999). NKp44 jsou vzdáleně příbuzné dva aktivační receptory, TREM-1 a TREM-2. Nacházejí se na buňkách myeloidní linie, což by mohlo znamenat, že tyto buňky využívají stejný aktivační mechanismus jako NK buňky (Colonna et al., 2000).

NKp30 je na povrchu všech NK buněk. Spolupracuje s druhými dvěma NCR receptory (Moretta et al., 2000), ale v zabíjení některých nádorů je hlavním receptorem, který spouští cytotoxickou aktivitu NK buněk (Pende et al., 1999). Má též doménu V-typu a v transmembránové oblasti arginin. Stejně jako NKp46, i tento receptor váže CD3 ζ (Pende et al., 1999). NKp30 také umožňuje komunikaci s DC (viz. Obr. 3).

NCR váží non-MHC ligandy – zatím jsou známy některé virové proteiny a pp65. Ligandy, s jejichž pomocí NCR identifikují nádorové buňky, ale doposud objeveny nebyly (Lanier, 2005). NKp46 hraje hlavní úlohu v apoptóze cílových buněk – autologních, alogenních a xenogenních, transformovaných, ale i normálních buněk (Sivori et al., 1999). Jeho zamaskováním specifickými monoklonálními protilátkami je inhibováno zabíjení většiny lidských nádorů (jedná se např. o karcinomy plic, jater, prsu, nebo o melanomy; Sivori et al., 1999; Vitale et al., 1998). Stejně tak zamaskování receptoru NKp44 částečně zabraňuje ničení

některých nádorových buněk (Vitale et al., 1998). Pokud jsou blokovány oba receptory současně, míra inhibice významně stoupá (Moretta et al., 2000).

Studiem blokování NCR receptorů monoklonálními protilátkami se ukázalo, že se s nimi na spouštění NK buněk podílejí další receptory. Tuto funkci by mohla u člověka zastávat molekula 2B4, kterou kromě NK buněk exprimují také některé CD8⁺ T lymfocyty, monocyty a bazofily. Strukturně se řadí do skupiny imunoglobulinových receptorů a její další funkcí je spuštění produkce IFN- γ . U myši naopak slouží jako inhibiční receptor (Colonna et al., 2000; Vaidya et al., 2006).

7 VYUŽITÍ NK BUNĚK PRO IMUNOTERAPIE

NK buňky (deciduální CD56^{bright}) se během reprodukce uplatňují jako velmi důležité regulátory vývoje plodu. Vyskytují se v děložní sliznici žen, kde jsou v přímém kontaktu se semialogenními buňkami trofoblastu. NK buňky u nich nevyvolávají apoptózu, ale podílejí se na jejich invaginaci, a to produkcí IL-8 a jiných chemokinů. Dále sekretují růstové faktory umožňující vaskularizaci decidua. Tyto funkce jsou regulovány interakcemi aktivačních i inhibičních receptorů NK buněk s ligandy přítomnými na trofoblastu. Invaginace a vaskularizace je podporována receptory NCR (Hanna et al., 2006) a naopak inhibována pomocí receptorů KIR nebo LILR. Porozumění fungování deciduálních NK buněk by mohlo pomoci v diagnostice a řešení některých poruch spojených s těhotenstvím a vývojem plodu (Terme et al., 2008).

V obraně organismu před virem HIV-1 hrají důležitou roli NK buňky společně s DC. Hlavním problémem je, že humorální odpověď zprostředkovaná B lymfocyty začne virus eliminovat nejdříve až tři měsíce po nákaze. Specifické T lymfocyty jsou sice aktivní již po jednom až dvou týdnech, ale nejsou dostatečně efektivní. DC a NK buňky jakožto součást vrozené imunity reagují na infekci hned v jejích počátcích a přímo ovlivňují adaptivní imunitní odpovědi. NK buňky nejdříve brzdí rozšiřování viru v organismu produkcí zánětlivých cytokinů nebo přímo zabíjením infikovaných buněk, interagují také s T lymfocyty. Nejspíše se zásadně podílejí i na aktivaci DC, jež následně stimulují T lymfocyty ke klonální expanzi. DC také rozpoznávají virus přímo pomocí receptorů, které jsou již známy. Receptory NK buněk, pomocí nichž jsou schopné přímo identifikovat infikované buňky, zatím popsány nejsou, ale hlavní úlohu by mohly hrát KIR, konkrétně aktivační KIR3DS1 vážící HLA-Bw4 (Altfeld et al., 2011). Na eliminaci jiných virových infekcí (doposud však nebylo zjištěno, o které všechny se jedná; platí ale pouze pro myši) se podílejí receptory z rodiny Ly49, jak bylo zmíněno v kapitole 6.3.1.1.

U myši bylo dokázáno, že NK buňky rozpoznávají transformované buňky, jež neexprimují MHC gp I nebo mají na svém povrchu více NKG2D ligandů, než je běžné. Příčinou aktivace buněk mohou být i jiné kostimulační signály. Mezi hlavní receptory účastnící se rozpoznání tumoru u lidí patří: NKp46, NKp30, NKp44, DNAM-1 a NKG2D (Viver et al., 2011; DNAM-1, *DNAX accessory molecule-1*, je aktivační imunoglobulinový receptor). Některé nádory ale dokáží NK buňkám unikát, např. mají schopnost snižovat množství rozpustných NKG2D ligandů (melanomy a rakovina prostaty; Groh et al., 2002, Terme et al., 2008).

Ligandy receptoru NKG2D již byly objeveny a popsány a mají velký význam v obraně organismu při nádorových onemocněních, zánětech a jiných formách buněčného stresu, jak je uvedeno v kapitole 6.3.1.2. To ligandy pro NCR zůstávají zatím neznámy, ale jak naznačují dosavadní studie, nepochybně naleznou využití v léčbě virových infekcí a rakoviny.

Transplantace hematopoetických kmenových buněk se využívá pro léčbu leukémie a lymfomů. Největší komplikace po operacích jsou zapříčiněny rozdílností HLA haplotypů dárce a příjemce. Aloreaktivita je způsobována jednak T lymfocyty (dochází k reakci štěpu proti hostiteli, GVHD, *graft-versus-host disease*), ale i NK buňkami (tzv. reakce štěpu proti leukémii, GVL, *graft-versus-leukemia*). Příjemci totiž chybí některé ligandy (HLA molekuly I. třídy) pro dárcovy KIR receptory. U pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML, *acute myeloid leukemia*), kteří podstoupili transplantaci kostní dřeně a jejich KIR ligandy se lišily od dárcovských, bylo prokázáno zlepšení v jejich nemoci a v GVHD. Díky aloreaktivitě NK buněk totiž došlo k eliminaci AML buněk, a též DC (Ruggeri et al., 2002).

Pacienti trpící autoimunitní chorobou často vykazují poškození funkcí NK buněk (dysfunkci aktivačních KIR) a jejich menší množství, než je u zdravých jedinců. NK buňky mohou naopak i autoimunitu navodit. Manipulacemi NK buněk (např. blokací produkce TNF) by se daly léčit nemoci jako revmatoidní artritida (Terme et al., 2008).

8 ZÁVĚR

Stále nejsou objasněny vzájemné interakce receptorů NK buněk s jejich ligandy, a to i přesto, že byla popsána většina aktivačních a inhibičních NK receptorů, ligandů i signalizačních drah. Studium funkcí NK buněk *in vitro* jsou zredukovány podmínky, za jakých se vyskytují v organismu. Chybí konkrétní mikroprostředí tvořené různými rozpustnými mediátory, které mají vliv na zpracování signálů uvnitř buněk a na sílu NK buněčných odpovědí (Lanier, 2008).

Podle doposud získaných dat o myších a lidských NK buňkách se dá usuzovat, že hrají významnou roli v reprodukci, kontrole brzkých stádií parazitárních a virových infekcí (včetně herpesviru, poxviru, influenzy či viru HIV-1) a rakoviny. Využití by našly i při odstraňování komplikací po transplantaci hematopoetických kmenových buněk, v léčbě autoimunitních chorob a astmatu (Vivier et al., 2008).

Některé dosud známé informace o receptorových rodinách jsou shrnuty v Tabulce 4.

RECEPTOR	NK BUŇKA	LIGAND	VYUŽITÍ - TERAPIE
Rodina Ly49 (myš)	aktivace/inhibice	H-2, virové proteiny	u člověka není
Rodina NKG2	aktivace/inhibice	neklasické MHC glykoproteiny	-
NKG2D	aktivace, kostimulace	MICA/B, ULBP (člověk)	rakovina, záněty
Rodina NKR-P1 (člověk jen A)	aktivace	LLT1	modulace imunitní odpovědi na patogeny
Rodina KIR	aktivace/inhibice	HLA a jimi prezentované peptidy	autoimunitní choroby, rakovina, virové infekce (HIV-1), poruchy vývoje plodu, komplikace po transplantaci kostní dřeně
Rodina LILR (člověk LILRB1)	inhibice	HLA, protein UL18 z lidského cytomegaloviru	poruchy vývoje plodu
Rodina NCR	aktivace	non-MHC ligandy	rakovina, poruchy vývoje plodu

Tabulka 4: Receptory, jejich vliv na NK buňky, ligandy, využití pro terapii. Modře receptory C-
lektinového, růžově imunoglobulinového typu.

Otázek o NK buňkách, o způsobu jejich studia a fungování, o jejich působení a využití, zůstává ještě mnoho nezodpovězeno. Stále nejsou identifikovány všechny NK receptory, neznámých ligandů je ještě více. Málo se také ví o jejich distribuci v organismu, vývoji,

paměti či molekulárních základech NK buněčné tolerance (např., i když NK buňkám zcela chybí inhibiční receptory, nejsou autoreaktivní).

Působení NK buněk v rámci organismu je velmi komplexní, proto je potřeba vyvinout nové přístupy, s jejichž pomocí bychom byli schopni dát do kontextu vazby příslušných ligandů na receptory, vzájemný vliv různých právě interagujících receptorů, mikroprostředí, ve kterém se daná NK buňka nachází a komunikaci s ostatními imunokompetentními buňkami.

Budoucnost NK buněk je bez pochyby v nejrůznějších imunoterapiích. Ty by mohly spočívat ve změně exprese jejich povrchových receptorů, vazbě určitých ligandů, úpravě senzitivity cílových buněk vůči apoptóze zprostředkované NK buňkami nebo ovlivnění jejich komunikace s DC.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- Altfeld, M., Fadda, L., Frleta, D., Bhardway, J. (2011), *DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1*. *Nat Rev Immunol.* 11 (3): 176 – 186
- Arase, H., Mocarski, ES., Campbell AE., Hill, AB., Lanier, LL. (2002), *Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cells receptors*. *Science.* 296 (5571): 1323 – 1326
- Arase, N., Arase, H., Park, SY., Ohno, H., Ra, C., Saito, T. (1997), *Association with FcR γ is essential for NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1⁺ T cells*. *J Exp Med.* 186 (12): 1957 – 1963
- Arrenberg, P., Halder, R., Kumar, V. (2009), *Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens*. *J. Cell. Physiol.* 218: 246 – 250
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, JH., Lanier, LL., Spies, T. (1999), *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. *Science.* 285 (5428): 727 – 729
- Berg, SF., Dissen, E., Westgaard, IH., Fossum, S. (1998), *Two genes in the rat homologous to human NKG2*. *Eur J Immunol.* 28 (2): 444 – 450
- Biassoni, R., Pessino, A., Bottino, C., Pende, D., Moretta, L., Moretta, A. (1999), *The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity*. *Eur J Immunol.* 29 (3): 1014 – 1020
- Brigl, M., Brenner MB. (2004), *CD1: antigen presentation and T cell function*. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 817 – 890
- Brown, MG., Scalzo, AA. (2008), *NK gene complex dynamics and selection for NK cell receptors*. *Semin Immunol.* 20 (6): 361 – 368
- Campbell, KS., Purdy, AK. (2011), *Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations*. *Immunology.* 132 (3): 315 – 325
- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., Biassoni, R. (1999), *NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily*. *J Exp Med.* 189 (5): 787 – 796
- Carayannopoulos, LN., Naidenko, OV., Fremont, DH., Yokoyama, WM. (2002), *Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D*. *J Immunol.* 169 (8): 4079 – 4083
- Carlyle, JR., Jamieson, AM., Gasser, S., Clingan, CS., Arase, H., Raulet, DH. (2004), *Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (10): 3527 – 3532
- Carlyle, JR., Martin, A., Mehra, A., Attisano, L., Tsui, FW., Zúñiga-Pflücker, JC. (1999), *Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function*. *J Immunol.* 162: 5917 – 5923

- Chapman, TL., Heikema, AP., Bjorkman, PJ. (1999), *The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homologue UL18*. *Immunity*. 11 (5): 603 – 613
- Chen, P., Bélanger, S., Aguilar, OA., Zhang, Q., St.-Laurent, A., Rahim, MMA., Makrigiannis, AP., Carlyle, JR. (2011), *Analysis of the mouse 129-strain Nkrp1-Clr gene cluster reveals conservation of genomic organization and functional receptor-ligand interactions despite significant allelic polymorphism*. *Immunogenetics*. 63 (10): 627 – 640
- Chiossone L., Chaix, J., Fuseri, N., Roth, C., Vivier, E., Walzer, T. (2009), *Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program*. *Blood*. 113 (22): 5488 – 5496
- Colonna, M., Moretta, A., Vély, F., Viver, E. (2000), *A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function*. *Immunol Today*. 21 (9): 428 – 431
- Cooper, MA., Fehniger, TA., Caligiuri, MA. (2001), *The biology of human natural killer-cell subsets*. *TRENDS in Immunology*. 22 (11): 633 – 640
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, CL., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, NJ. (2001), *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*. *Immunity*. 14 (2): 123 – 133
- Desrosier, MP., Kielczewska, A. Loredó-Osti, JC., Adam, SG., Makrigiannis, AP., Lemieux S., Pham, T., Lodoen, MB., Morgan, K., Lanier, LL., Vidal, SM. (2005), *Epistasis between mouse Klra and major histocompatibility complex class I loci is associated with a new mechanism of natural killer cell-mediated innate resistance to cytomegalovirus infection*. *Nat Genet*. 37 (6): 593 – 599
- Diefenbach, A., Jamieson, AM., Liu, SD., Shastri, N., Raulet, DH. (2000), *Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages*. *Nat Immunol*. 1 (2): 119 – 126
- Falco, M., Cantoni, C., Bottino, C., Moretta, A., Biassoni, R. (1999), *Identification of the rat homologue of the human Nkp46 triggering receptor*. *Immunol Lett*. 68 (2 – 3): 411 – 414
- Godfrey, DI., MacDonald HR., Kronenberg M., Smyth, MJ., Kaer LV. (2004), *NKT cells: what's in a name?* *Nat Rev Immunol*. 4 (3): 231 - 237
- Grégoire C., Chasson, L., Carmelo, L., Tomasselo, E., Geissmann, F., Vivier, E., Walzer, T. (2007), *The trafficking of natural killer cells*. *Immunol Rev*. 220: 169 – 182
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T. (2002), *Tumor-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation*. *Immunol Lett*. 120 (1 – 2): 65 – 71
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y. et al. (2006), *Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface*. *Nat Med*. 12 (9): 1065 – 1074
- Hao, L., Klein, J., Nei, M. (2005), *Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103 (9): 3192 – 3197
- Held, W., Roland, J., Raulet, DH. (1995), *Allelic exclusion of Ly49-family genes encoding class I MHC-specific receptors on NK cells*. *Nature* 376 (6538): 355 – 358

- Höglund, P., Brodin, P. (2010), *Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules*. Nat Rev Immunol. 10 (10): 724 – 734
- Horng, T., Bezbradica JS., Medzhitov, R. (2007), *NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway*. Nat Immunol. 8 (12): 1345 – 1352
- Kaifu, T., Escalière, B., Gastinel, LN., Vivier, E., Baratin, M. (2011), *B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors*. Cell. Mol. Life Sci. 68: 3531 – 3539
- Kamishikiryo, J., Fukuhara, H., Okabe, Y., Kuroki, K., Maenaka, K. (2011), *Molecular basis for LLT1 protein recognition by human CD161 protein (NKR-PIA/KLRB1)*. J Biol Chem. 286 (27): 23823 – 23830
- Kim, S., Iizuka, K., Kang, HS., Dokun A., French, AR., Greco, S., Yokoyama WS. (2002), *In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation*. Nat Immunol. 3 (6): 523 – 528
- Kumar, V., McNerney, ME. (2005), *A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance*. Nat Rev Immunol. 5 (5): 363 – 374
- Kveberg, L., Dai, KZ., Inngjerdigen, M., Brooks, CG., Fossum, S., Vaage, JT. (2010), *Phylogenetic and functional conservation of the NKR-PIF and NKR-PIG receptors in rat and mouse*. Immunogenetics. 63 (7): 429 – 436
- Lanier, LL. (2005), *NK cell recognition*. Annu. Rev. Immunol. 23: 225 – 274
- Lanier, LL. (2008), *Upon on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition*. Nat Immunol. 9 (5): 495 – 502
- Lanier, LL., Chang, C., Phillips, JH. (1994), *Human NKR-PIA: a disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes*. J Immunol. 153 (6): 2417 – 2428
- Lanier, LL., Phillips, JH., Hackett, J., Tutt, M., Kumar, V. (1986), *Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function*. J Immunol. 137 (9): 2735 – 2739
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, JP., Lanier, LL., Phillips, JH. (1996), *Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits*. J Immunol. 157 (11): 4741 – 4745
- Marsh, SGE., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, DE., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Vitt, C., Guethlein, LA., Shilling, H., Garcia, CA., Hsu, KC., Wain, H. (2002), *Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002*. Immunogenetics. 55 (4): 220 – 226
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, MC., Moretta, L. (2000), *Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity*. Immunol Today. 21 (5): 228 – 234
- Moretta, A., Bottino, C., Mingari, MC., Biassoni, M., Moretta, L. (2002), *What is a natural killer cell?* Nat Immunol. 3 (1): 6 – 8
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, MC., Biassoni, M., Moretta, L. (2001), *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Annu. Rev. Immunol. 19: 197 – 223

- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., Koyasu, S. (2010), *Innate production of T_H2 cytokines by adipose tissue-associated $c\text{-Kit}^+ \text{Sca-1}^+$ lymphoid cells*. *Nature*. 463 (7280): 540 – 544
- Parham, P., McQueen, KL. (2003), *Alloreactive killer cells: hindrance and help for hematopoietic transplants*. *Nat Rev Immunol*. 3 (2): 108 – 122
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. (1999), *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells*. *J Exp Med*. 190 (10): 1505 – 1516
- Plougastel, B., Matsumoto, K., Dubbelde, C., Yokoyama, WM. (2001), *Analysis of a 1-Mb BAC contig overlapping the mouse *Nkrp1* cluster of genes: cloning of three new *Nkrp1* members, *Nkrp1d*, *Nkrp1e* and *Nkrp1f**. *Immunogenetics*. 53 (7): 592 – 598
- Raulet, DH. (2004), *Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response*. *Nat Immunol*. 5 (10): 996 – 1002
- Raulet, DH., Vance, RE., McMahon, CW. (2001), *Regulation of the natural killer cell receptor repertoire*. *Annu. Rev. Immunol*. 19: 291 – 330
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, WD., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, MF., Velardi, A. (2002), *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. *Science*. 295 (5562): 2097 – 2100
- Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L., Moretta, A. (1999), *NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogenic or xenogeneic target cells*. *Eur J Immunol*. 29 (5): 1656 – 1666
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A. (1997), *p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation*. *J Exp Med*. 186 (7): 1129 – 1136
- Smith, KM., Wu, J., Bakker, ABH., Phillips, JH., Lanier, LL. (1998), *Cutting edge: Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors*. *J Immunol*. 161: 7 – 10
- Sun, JC., Lopez-Verges, S., Kim, CC., DeRisi, JL., Lanier, LL. (2011), *NK cells and immune “memory”*. *J Immunol*. 186: 1891 – 1897
- Tanamachi, DM., Hanke, T., Takizawa, H., Jamieson, AM., Raulet, DH. (2001), *Expression of natural killer cell receptor alleles at different Ly49 loci occurs independently and is regulated by major histocompatibility complex class I molecules*. *J Exp. Med*. 193 (3): 307 – 315
- Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, NF., Chaput, N., Zitvogel, L. (2008), *Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies*. *Nat Immunol*. 9 (5): 486 – 494
- Vaidya, SV., Mathew, PA. (2006), *Of mice and men: different functions of the murine and human 2B4 (CD244) receptor on NK cells*. *Immunol Lett*. 105 (2): 180 – 184
- Van Kaer, L., Parekh, W., Wu, L. (2010), *Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity*. *Cell Tissue Res*. 343 (1): 43 - 55

- Veillette, A. (2006), *NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters*. Immunol Rev. 214: 22 – 34
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A. (1998), *NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis*. J Exp Med. 187 (12): 2065 – 2072
- Vivier, E. (2006), *What is natural in natural killer cells?* Immunol Lett. 107 (1): 1 -7
- Vivier, E., Raulet, DH., Moretta, A., Caligiuri, MA., Zitvogel, L., Lanier, LL., Yokoyama WM., Ugolini, S. (2011), *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science. 331 (6013): 44 – 49
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S. (2008), *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol. 9 (5): 503 – 510
- Vosshenrich CAJ., García-Ojeda ME., Samson-Villéger SI., Pasqualetto V., Enault, L., Richard-Le Goff, O., Corcuff, E., Guy-Grand D., Rocha, B., Cumano, A., Rogge, L., Ezine, S., Di Santo, JP. (2006), *A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127*. Nat Immunol. 7 (11): 1217 – 1224
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, SH., Zitvogel, L., Vivier, E. (2005), *Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force”*. Blood. 106 (7): 2252 – 2258
- Westgaard, IH., Berg, SF., Ørstavik, S., Fossum, S., Dissen, E. (1998), *Identification of a human member of the Ly49 multigene family*. Eur J immunol. 28 (6): 1839 – 1846
- Wilson, MJ., Torkar, M., Trowsdale, J. (1997), *Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene*. Tissue Antigens. 49 (6): 574 – 579
- Yokoyama, WM., Plougastel, BFM. (2003), *Immune functions encoded by the natural killer gene complex*. Nat Rev Immunol. 3 (4): 304 – 316