

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Ana M. Vuletić

**Funkcionalne i imunofenotipske
karakteristike NK ćelija regionalnih limfnih
čvorova obolelih od melanoma i njihova
in vitro aktivacija IL-2 i IL-15**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

University of Belgrade

Faculty of biology

Ana M. Vuletić

**Functional and immunophenotypic
characteristics of NK cells from regional
lymph nodes of melanoma patients and their
in vitro activation with IL-2 and IL-15**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2013.

Podaci o mentorima i članovima komisije

Mentori:

prof dr Gordana Matić

redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beograd

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković

prof dr Gordana Konjević

naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije,

vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi:

dr Nikola Tanić

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković

prof dr Milena Kataranovski

redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beograd

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja Siniša Stanković

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ovaj doktorski rad je urađen u Laboratoriji za imunologiju na Odeljenju za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, pod neposrednim rukovodstvom prof dr Gordane Konjević. Ovaj rad je realizovan u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja broj 145056 „Izučavanje regulatornih mehanizama vezanih za imunomodulaciju u malignim bolestima“ kojim je rukovodila prof dr Gordana Konjević i broj 4103 „Identifikacija molekulskih markera za predikciju, progresiju tumora, odgovora na terapiju i ishoda bolesti“ kojim rukovodi n sav dr Nikola Tanić.

Želim da se zahvalim svom mentoru prof dr Gordani Konjević na svemu što me je naučila tokom ovih godina rada u Laboratoriji za imunologiju. Prof Gordani Matić, mentoru ove doktorske teze zahvaljujem se na sugestijama tokom pisanja ovog rada. Zahvaljujem se i članovima Komisije: Dr Nikoli Taniću, na pomoći tokom završne faze eksperimentalnog rada, a prof dr Mileni Katarnovski na veoma korisnim ispravkama teksta ove doktorske teze.

Koleginici iz moje laboratorije dr Katrini Mirjačić Martinović zahvaljujem se na pruženoj podršci i ohrabrenju, kao i na korisnim savetima tokom pisanja teskta. Mojim kolegama iz sobe: dr sci Emimi Mališić i dr sci Milanu Markićeviću zahvaljujem se na podršci i strpljenju, a dr sci Željku Žižku pored toga i na pomoći u izradi ilustracija. Dr Sandri Radenković zahvaljujem se na mnogobrojnim prijateljskim savetima i podršci. Zahvaljujem se Jasni Popovoć Basić, laboratorijskom tehničaru koja mi je tokom ovih godina bila nezamenljiva pomoć i oslonac u laboratorijskom radu.

I naravno hvala Pavlu, Mileni, Vladimiru i mojim roditeljima na neizmernoj podršci i strpljenju.

Funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma i njihova *in vitro* aktivacija IL-2 i IL-15

Sažetak

Uvod: Melanom, maligni tumor melanocita, iako ima brojna imunogenična svojstva, predstavlja tumor kože sa najvišom incidencom smrtnosti. Za antitumorsku imunost u melanomu posebno su značajne ćelije prirodne ubice (NK ćelije), efektorske ćelije sistema urođene imunosti koje mogu neposredno da prepoznaju maligno transformisane ćelije i da ih liziraju citolitičkim enzimima (perforin i granzimi) kao i da produkcijom citokina i hemokina regulišu adaptivnu i urođenu antitumorsku imunost. NK ćelije su prisutne u mnogim tkivima i organima. Kod melanoma su uglavnom proučavane NK ćelije u perifernj krvi i u tumorskom tkivu, dok NK ćelije regionalnih limfnih čvorova (LČ) obolelih nisu do sada ispitivane.

NK ćelije su $CD3^-CD56^+$ i obuhvataju dve funkcionalno različite subpopulacije, imunoregulatornu, $CD3^-CD56^{sjažno+}$ i citotoksičnu, $CD3^-CD56^{potmulo+}$. Funkcija NK ćelija je regulisna balansom signala koji potiču od aktivacionih i inhibitornih NK-ćelijskih receptora. Aktivacioni receptori prepoznaju stresogene ligande na tumorskim ćelijama, dok inhibitorni ubilački receptori slični imunoglobulinima (engl. Immunoglobulin-like Killer Receptors, KIR) vezivanjem za MHC molekule klase I inhibiraju NK ćelijsku funkciju i pored toga omogućavaju toleranciju NK ćelija na ćelije sopstvenog organizma.

NK ćelije su prisutne u T ćelijskoj zoni LČ, gde se odvija njihovo sazrevanje i diferencijacija. U fiziološkim uslovima u LČ perifernom cirkulacijom dospeva uglavnom nezrela ($CD3^-CD56^{sjažno+}$) NK ćelijska subpopulacija koja čini veći deo NK ćelijske populacije u mirujućim limfnim čvorovima. Pod uticajem endogenih citokina u LČ ova subpopulacija sazreva u citotoksičnu $CD3^-CD56^{potmulo+}$ perforin⁺CD16⁺KIR⁺ subpopulaciju koja zatim napušta LČ. U patološkim stanjima

dolazi do povećane zastupljenosti CD16⁺KIR⁺ NK ćelija u reaktivnim LČ što može biti posledica povećane produkcije citokina urođene imunosti od strane dendritičnih ćelija, kao i Th1 citokina od strane stimuliranih T ćelija antigenima u LČ, kao i selektivne migracije CD16⁺KIR⁺ NK ćelija u LČ.

Među citokinima γ c familije, interleukini IL-2 i IL-15 su posebno značajni za diferencijaciju i sazrevanje NK ćelija, a takođe su pokazali i najizraženiji stimulatívni efekat na citotoksičnu aktivnost NK ćelija.

Ciljevi rada: S obzirom na to da regionalni LČ predstavljaju prvu barijeru u limfogenom širenju tumora kao i na značaj uticaja mikrosredine na funkciju i fenotip NK ćelija, cilj ovog rada bio je da se uporede funkcionalne i imunofenotipske karakteristike CD3⁻CD56⁺ NK ćelija u tumor-infiltriranim (infiltriranim) i neinfiltriranim regionalnim LČ bolesnika sa melanomom.

S obzirom na to da je melanom imunogeničan tumor koji je slabo osetljiv na zračnu i na hemioterapiju, cilj ovog rada bio je da se ispita sposobnost IL-2, citokina koji se već više od dve decenije primenjuje u lečenju metastatskog melanoma i citokina novije generacije IL-15, koji je neophodan za razvoj i sazrevanje NK ćelija, da indukuju citotoksičnu aktivnost NK ćelija ispitivanih regionalnih LČ.

Materijal i metode: Uzorci tkiva regionalnih LČ 45 bolesnika sa melanomom kože u kliničkim stadijumima bolesti II-IV uzeti su neposredno nakon hirurške intervencije. Iz uzetih uzoraka tkiva LČ izolovane su mononuklearne ćelije (MNC). Citotoksična aktivnost NK ćelija određivana je u odnosu na NK-osetljivu K562 tumorsku ćelijsku liniju radioaktivnim ⁵¹Cr testom iz sveže izolovanih MNC kao i nakon 72 h i 7 dana *in vitro* tretmana medijumom za ćelijsku kulturu, medijumom sa IL-2 (200 IU/ml) i medijumom sa IL-15 (25 ng/ml) na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Metodom protočne citometrije određivani su: produkcija IFN γ u CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama, procenat CD3⁻CD56⁺ NK ćelija, CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija, kao i ekspresija aktivacionih (NKG2D, CD16), inhibitornih KIR (CD158a, CD158b) receptora kao i aktivacionih antigena (CD25, CD69, HLA-DR) na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama i njihovim subpopulacijama. RT-

PCR metodom nakon 72 h *in vitro* tretmana ovim citokinima je praćena transkripcija gena za perforin, a Western blot metodom ekspresija perforina, pSTAT1, pSTAT5 i Bcl-2 molekula. Za poređenja ispitivanih parametra infiltrisanih u odnosu na neinfiltisane LČ korišćen je statistički Mann Whitney test, a značajnost promena nakon tretmana citokinima je utvrđivana Wilcoxon testom sume rangova. U statističkoj analizi korelacione povezanosti korišćen je Spearman test.

Rezultati: U neinfiltisanim i infiltrisanim regionalnim LČ bolesnika sa melanomom dobijena je slična niska citotoksićna funkcija NK ćelija. Produkcija IFN γ kao drugog merila funkcionalnosti NK ćelija, snižena u ukupnoj populaciji CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK ćelija samo u tumor-infiltrisanim LČ što može biti posledica prisustva imunosupresivnih citokina i drugih biološki aktivnih molekula koji kod ovih bolesnika mogu biti kako lokalnog, tako i sistemskog porekla. U infiltrisanim LČ naćena je veća zastupljenost CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK ćelija usled povećanja zastupljenosti CD3 $^{-}$ CD56^{potmulo+} subpopulacije. Ovaj rezultat zajedno sa povećanjem zastupljenosti CD16 $^{+}$ i CD158b $^{+}$ CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK ćelija u infiltrisanim LČ ukazuje na zreliji fenotip NK ćelija usled ulaska tumora u LČ. Naćena povećana ekspresija CD69 antigena na CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK ćelijama u infiltrisanim LČ ukazuje na aktivaciju ove populacije sa invazijom tumora u LČ, pri ćemu ekspresija NKG2D citotoksićnog receptora ostaje nepromenjena. Ove razlike u imunofenotipskim parametrima usled infiltrisanosti LČ tumorskim ćelijama su više ispoljene kada je zahvaćen veći broj LČ kao i kada je stepen invazije primarnog tumora u kožu veći.

Nakon *in vitro* tretmana citokinima pokazano je da za razliku od tretmana interleukinom IL-15, tretman interleukinom IL-2 dovodi do porasta ukupne populacije CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK ćelija uvećanjem CD3 $^{-}$ CD56^{sjajno+} subpopulacije u neinfiltisanim i u infiltrisanim regionalnim LČ bolesnika sa melanomom. *In vitro* tretmani interleukinima IL-2 i IL-15 višestruko povećavaju nisku citotoksićnost NK ćelija, kao i transkripciju i sintezu perforina u obe grupe regionalnih LČ. Ova dva citokina na CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK ćelijama obe grupe regionalnih LČ povećavaju ekspresiju ranog aktivacionog antigena CD69, citotoksićnog NKG2D receptora, a

povećanjem ekspresije CD16 i CD158b inhibitornog KIR-a doprinose njihovom zrelijem fenotipu. Uočeni efekti ispitivanih citokina praćeni su povećanjem nivoa fosforilisanog STAT5 signalnog molekula.

Zaključak: U ovom radu opisani su funkcija i fenotip do sada neispitivane populacije NK ćelija regionalnih LČ bolesnika sa melanomom. Dobijeni rezultati ukazuju na to da metastiziranje melanoma u regionalne LČ nije dovelo do promene citotoksićne funkcije prisutnih NK ćelija, već do povećane zastupljenosti CD3⁻CD56⁺ NK ćelija zrelijeg CD16⁺CD158b⁺ fenotipa. *In vitro* tretmanima sa IL-2, citokinom koji se primenjuje u terapiji ovog tumora i sa IL-15, citokinom ćija se terapijska primena još uvek ispituje, postignuto je višestruko povećanje citotoksićne aktivnosti NK ćelija regionalnih LČ bolesnika sa melanomom koje može da ukaže na potencijalni znaćaj ove populacije NK ćelija u novijim terapijskim pristupima kao što je adoptivni trarnsfer NK ćelija kod bolesnika sa melanomom.

Ključne reći: NK ćelije, limfni ćvorovi, melanom, citotoksićnost, perforin, NKG2D, CD16, KIR, IL-2, IL-15

UDK broj: 616-006-076.5-097

Naućna oblast: Biologija

Uća naućna oblast: Imunologija tumora

Maligni tumori

NK ćelije

Imunološki parametri

Functional and immunophenotypic characteristics of NK cells from regional lymph nodes of melanoma patients and their *in vitro* activation with IL-2 and IL-15

SUMMARY

Introduction: Melanoma, malignant neoplasm of melanocytes, despite of its immunogenicity is skin cancer with the highest mortality rate. In antitumor immunity in melanoma, natural killer (NK) cells as innate immune system effector cells play an important role as they are able to recognize malignantly transformed cells, lyse them by cytotoxic enzymes (perforin and granzymes) and also regulate adaptive and innate antitumor immunity by production of cytokines and chemokines. NK cells are present in many tissues and organs. In melanoma NK cells have been studied mostly in peripheral blood and in tumor tissue, while NK cells in regional lymph nodes (LN)s have not been investigated.

NK cells are CD3⁻CD56⁺ and comprise two functionally distinct subsets, immunoregulatory, CD3⁻CD56^{bright+} and cytotoxic, CD3⁻CD56^{dim+}. NK cell function is regulated by the balance of signals mediated by activating and inhibitory NK cell receptors. Activating receptors recognize stress induced ligands on tumor cells, while the inhibitory immunoglobulin-like killer receptors (KIR) by binding to MHC class I molecules inhibit NK cell function and enable self tolerance.

NK cells are located mostly in T cell zone of LNs, where NK cell differentiation and maturation may occur. In physiological conditions, by peripheral circulation mostly immature CD3⁻CD56^{bright+} NK cell subset migrates to LNs and represents the majority of NK cell population in resting LNs. Endogenous cytokines in LN mediate maturation of this subset into cytotoxic CD3⁻CD56^{dim+} perforin⁺CD16⁺KIR⁺ subset that subsequently leaves LN. In pathological conditions, increase in CD16⁺KIR⁺ NK cell population in reactive LNs may be the consequence of increased production of innate immunity cytokines by dendritic

cells, as well as Th1 cytokine production by antigen stimulated T cells in LNs, or selective migration of CD16⁺KIR⁺ NK cells into LNs.

Among γ c cytokines, IL-2 and IL-15 are most important for NK cell differentiation and maturation, and are also the most potent stimulators of NK cell cytotoxic activity.

Objectives: As regional LNs represent first barrier to lymphogenic tumor invasion and considering the importance of microenvironment in shaping NK cell function and phenotype, the aim of this study was to compare functional and immunophenotypic characteristics of CD3⁻CD56⁺ NK cells from tumor-infiltrated (infiltrated) and not infiltrated regional LNs of melanoma patients.

Since melanoma is an immunogenic tumor insensitive to irradiation and chemotherapy, the aim of this study was to investigate the ability of IL-2, cytokine that has been used more than two decades in metastatic melanoma treatment and IL-15, cytokine of novel generation which is essential for NK cell differentiation and maturation, to induce cytotoxic activity of NK cells from investigated regional LNs.

Material and methods: Tissue samples of regional LNs were obtained from 45 melanoma patients in clinical stages II-IV immediately after surgical intervention. Mononuclear cells (MNC) were isolated from obtained LN samples. NK cell cytotoxic activity was evaluated against NK-cell sensitive K562 tumor cell line using radioactive ⁵¹Cr test on freshly isolated MNC as well as after 72 h and 7 day *in vitro* treatments in cell culture medium alone, medium supplemented with IL-2 (200 IU/ml) and with IL-15 (25 ng/ml) on 37°C in humid atmosphere with 5% CO₂. Flow cytometry method was used for evaluation of: IFN γ production in CD3⁻CD56⁺ NK cells, percentage of CD3⁻CD56⁺ NK cells, CD3⁻CD56^{dim+} and CD3⁻CD56^{bright+} NK cell subsets, as well as the expression of activating receptors (NKG2D, CD16), inhibitory KIRs (CD158a, CD158b) and activation antigens (CD25, CD69, HLA-DR) on CD3⁻CD56⁺ NK cells and their two subsets. After 72 h *in vitro* cytokine treatments perforin transcription was estimated by RT-PCR, while perforin, pSTAT1, pSTAT5 and Bcl-2 expression was estimated by Western blot.

The investigated parameters between infiltrated and not infiltrated regional LNs were compared by statistical Mann Whitney test, while the significance of differences after cytokine *in vitro* treatments was evaluated by Wilcoxon rank sum test. For correlation analysis Spearman's correlation coefficient was evaluated.

Results: In both not infiltrated and tumor- infiltrated regional LNs of melanoma patients were shown similar low levels of NK cell cytotoxic activity. Production of $\text{IFN}\gamma$, as another aspect of NK cell function, in entire $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ NK cell population was lower only in tumor-infiltrated LNs which could be influenced by immunosuppressive cytokines and other biologically active molecules that might be of local or systemic origin. Tumor-infiltrated LNs also show higher percentage of $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ NK cells due to the increased presence of $\text{CD3}^+\text{CD56}^{\text{dim}+}$ subpopulation. This finding, together with increased percentage of CD16^+ and $\text{CD158b}^+\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ NK cells in tumor-infiltrated LNs, indicates more mature NK cell phenotype in LNs invaded by tumor cells. Furthermore, $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ NK cells in infiltrated LNs show increased expression of CD69 antigen which may indicate NK cell activation alongside with tumor invasion into LNs, while the expression of NKG2D cytotoxic receptor remained similar. The obtained differences in immunophenotypic parameters caused by tumor infiltration of LN are more apparent when more regional LNs are involved as well as if the degree of primary tumor invasion into skin was higher.

After cytokine *in vitro* treatments it was shown that unlike IL-15, IL-2 treatment increased the percentage of $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ NK cell population by increasing $\text{CD3}^+\text{CD56}^{\text{bright}+}$ subset in both not infiltrated and tumor-infiltrated regional LNs of melanoma patients. Both IL-2 and IL-15 *in vitro* treatments increased low NK cell cytotoxicity, as well as perforin transcription and synthesis in both groups of regional LNs. These two cytokines on $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ NK cells in both regional LN groups increased the expression of early activating antigen CD69, cytotoxic NKG2D receptor, and also by increasing the expression of CD16 receptor and CD158b inhibitory KIR contributed to more mature NK cell phenotype. The effects

of investigated cytokines are followed by increased level of phosphorylated STAT5 signaling molecule.

Conclusion: In this study were analyzed the function and immunophenotype of NK cell population from regional LNs of melanoma patients which have not been investigated before. The obtained results indicate that metastatic invasion of melanoma into regional LNs did not alter cytotoxic function of resident NK cells, while it increased the percentage of CD3⁻CD56⁺ NK cells of more mature CD16⁺CD158b⁺ phenotype. *In vitro* treatments with IL-2, cytokine that has been used in melanoma treatment and IL-15, cytokine that is still under investigation for its therapeutic application, strongly induced the increase in NK cell cytotoxic activity which may indicate the therapeutic potential of this NK cell population in novel approaches such as adoptive NK cell transfer in melanoma patients.

Key words: NK cell, lymph nodes, melanoma, cytotoxicity, perforin, NKG2D, CD16, KIR, IL-2, IL-15

Spisak skraćenica

ADCC- citotoksičnost zavisna od antitela

ATM- ataxia telangiektazia mutirana kinaza

CMV- citomegalovirus

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

EBV- Epstein- Bar virus

EGFR- receptor za epidermalni faktor rasta

FITC- fluorescein izotiocijanat

GM-CSF- granulocitno monocitni faktor rasta

HSP- heparin sulfat proteoglikani

ICAM-1- interćelijski adhezioni molekul-1

IFN- interferon

Ig- imunoglobulini

IL- interleukin

IL-15R- interleukin-15 receptor

IL-2R- interleukin- 2 receptor

JAK- Janus tirozin kinaza

KIR- ubilački receptori slični imunoglobulinima

LAK- limfocinima aktivirane ćelije ubice

LFA-1- limfocitni funkcionalni antigen-1

MAPK- mitogenom aktivirana protein kinaza

MDSC mijeloidne supresivne ćelije

MEK- mitogenom aktivirana kinaza protein kinaze

MMP- matriks metaloproteinaza

MNĆ- mononuklearne ćelije

NCR- prirodni citotoksični receptori

NK ćelije- ćelije prirodne ubice

NKG2DL- ligand NKG2D receptora

NSCLC- nesitnoćeljski karcinom pluća

PCR- polimerazna lančana reakcija

PE- fikoeritrin

PerCP- peridinin hlorofil protein

PGE2- prostaglandin E2

PI3K- fosfatidil inozitol 3 kinaza

PIP3- fosfatidil inozitol-3,4,5-trifosfat

PMA- forbol-12-miristat-13-acetat

RNK- ribonukleinska kiselina

ROS- reaktivne kiseonične vrste

RT-PCR- reakcija reverzne transkripcije pri polimeraznoj lančanoj reakciji

SCF- faktor rasta matičnih ćelija

STAT- aktivator signalne transdukcije i transkripcije

TAM- tumor asocirani makrofagi

TCR- T ćelijski receptor

TGF- β - transformišući faktor rasta- β

TIL- tumor infiltrišući limfociti

TNF- α - faktor nekroze tumora- α

Treg- regulatorne T ćelije

VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta

Sadržaj

1	Uvod.....	1
1.1	NK ćelije i njihove subpopulacije.....	1
1.2	Razvoj NK ćelija.....	3
1.3	Limfni čvorovi.....	6
1.4	NK ćelijski receptori.....	12
1.4.1	Aktivacioni receptori.....	12
1.4.2	Inhibitorni receptori.....	18
1.5	Efektorske funkcije NK ćelija.....	23
1.6	Citokini značajni za razvoj i funkciju NK ćelija.....	28
1.6.1	Citokini γ c familije.....	28
1.6.2	Imunosupresivni citokini.....	38
1.7	Melanom.....	39
1.7.1	Melanom i imunski odgovor.....	41
1.7.2	Terapija melanoma.....	45
2	Ciljevi rada.....	50
3	Materijal i metode.....	52
3.1	Pacijenti i klasifikacija.....	52
3.2	Izolacija mononuklearnih ćelija iz regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma.....	52
3.3	Određivanje citotoksične aktivnosti NK ćelija.....	53
3.4	Određivanje intraćelijskog IFN γ u CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK ćelijama.....	54
3.5	Protočna citometrija.....	55
3.6	Westen blot.....	56
3.7	Izolacija RNK.....	59
3.8	RT-PCR.....	60
3.9	Statističke analize.....	61
4	Rezultati.....	62
4.1	Funkcionalne karakteristike NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma.....	62
4.2	Zastupljenost NK ćelija i njihovih CD3 $^{-}$ CD56 $^{\text{potmulo}+}$ i CD3 $^{-}$ CD56 $^{\text{sjajno}+}$ subpopulacija u regionalnim limfnim čvorovima obolelih od melanoma.....	63
4.3	Produkcija IFN γ u CD3 $^{-}$ CD56 $^{\text{potmulo}+}$ i CD3 $^{-}$ CD56 $^{\text{sjajno}+}$ subpopulacijama NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma.....	64

4.4	Imunofenotipske karakteristike CD3 ⁻ CD56 ⁺ NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma	64
4.5	<i>In vitro</i> efekti interleukina IL-2 i IL-15 na citotoksičnu funkciju i imunofenotip NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma.....	73
4.5.1	<i>In vitro</i> efekti interleukina IL-2 i IL-15 na citotoksičnu funkciju NK ćelija.....	73
4.5.2	<i>In vitro</i> efekti interleukina IL-2 i IL-15 na transkripciju perforina	75
4.5.3	<i>In vitro</i> efekti interleukina IL-2 i IL-15 na sintezu perforina.....	75
4.5.4	<i>In vitro</i> efekti interleukina IL-2 i IL-15 na zastupljenost NK ćelija i njihovih CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+} i CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+} subpopulacija.....	77
4.5.5	<i>In vitro</i> efekti interleukina IL-2 i IL-15 na ekspresiju receptora na CD3 ⁻ CD56 ⁺ NK ćelijama regionalnih limfnih čvorova.....	78
4.5.6	<i>In vitro</i> efekti interleukina IL-2 i IL-15 na zastupljenost receptora u CD3 ⁻ CD56 ^{potmulo+} i CD3 ⁻ CD56 ^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija.....	83
4.6	Poređenje efekta interleukina IL-2 i IL-15 na citotoksičnu aktivnost NK ćelija neinfiltrisanih i tumor-infiltrisanih limfnih čvorova	87
4.7	<i>In vitro</i> efekti interleukina IL-2 i IL-15 na ekspresiju STAT1 i STAT5 signalnih molekula.....	89
4.8	<i>In vitro</i> efekti interleukina IL-2 i IL-15 na ekspresiju Bcl-2 molekula.....	90
5	Diskusija.....	92
6	Zaključci.....	115
7	Literatura.....	117

1 Uvod

1.1 NK ćelije i njihove subpopulacije

Ćelije prirodne ubice, NK ćelije (engleski „natural killer cells“) su subpopulacija ćelija sistema urođene imunosti čija je osnovna uloga da eliminišu kako virusima i intracelularnim bakterijama inficirane tako i maligno transformisane ćelije (Robertson i Ritz, 1990). Prvi put su opisane 1975. godine (Herberman *et al.*, 1975; Kiessling *et al.*, 1975). Na osnovu svoje morfologije, mnogobrojnih limfoidnih antigena koje ispoljavaju i porekla koje vode od zajedničkih limfoidnih progenitorskih ćelija u kostnoj srži, NK ćelije se svrstavaju u populaciju limfocita. Morfološki, većina NK ćelija su veliki granulirani limfociti sa bubrežastim jedrom i obilnom citoplazmom u kojoj se nalaze granule ispunjene citolitičkim enzimima perforinom i granzimima.

NK ćelije mogu neposredno da prepoznaju izmenjene ćelije i da brzo na njih bez prethodne stimulacije deluju citotoksično po čemu su i dobile ime- prirodne ubice (Robertson i Ritz, 1990). Pored citotoksične, NK ćelije imaju i imunoregulatornu ulogu i sintetišu brojne citokine i hemokine i tako utiču na adaptivnu i na urođenu imunost (Vivier *et al.*, 2011).

NK ćelije mogu da posredstvom svojih aktivacionih receptora, neposredno prepoznaju stresogene ligande na maligno transformisanim kao i na ćelijama koje su inficirane virusima, što dovodi do aktivacije NK ćelijske citotoksičnosti. Pored toga, svojim inhibitornim receptorima NK ćelije mogu da prepoznaju molekule glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase I (MHC molekule klase I) koji inhibiraju NK ćelijsku citotoksičnost. Prema hipotezi “missing self” koju su postavili Karre i saradnici još 1986. godine (Karre *et al.*, 1986), ustanovljeno je da NK ćelije prepoznaju sopstvene MHC molekule klase I i da vezivanje za njih dovodi do inhibicije aktivnosti NK ćelija. Na taj način, NK ćelije liziraju samo one ćelije koje ne ispoljavaju ili slabije ispoljavaju MHC molekule klase I, a sopstvene ćelije u organizmu su zaštićene od lize NK ćelijama. Molekularna osnova ove pojave potvrđena je devedesetih godina identifikacijom grupe ubilačkih receptora sličnih imunoglobulinima, KIR (engl. Immunoglobulin-like Killer Receptors) koji se vezuju za MHC molekule klase I

(Colonna i Samaridis 1995; Yokoyama, 1995; Moretta *et al.*, 1995) i inhibiraju citotoksičnu funkciju NK ćelija.

NK ćelije se odlikuju prisustvom CD56 antigena, neuralnog adhezionog molekula koji ima ulogu u uspostavljanju veze između NK i ciljnih ćelija, (Cooper *et al.*, 2001). S obzirom da je pokazano njegovo prisustvo i na subpopulacijama dendritičnih ćelija koje imaju citotoksični potencijal, u novije vreme CD56 antigenu se pripisuje uloga u citotoksičnoj funkciji mada njegova uloga u tom procesu nije do sada u potpunosti definisana (Roothans *et al.*, 2013). Za razliku od T limfocita NK ćelije nemaju CD3 molekul, te se mogu fenotipski odrediti kao CD3⁻CD56⁺.

Na osnovu gustine CD56 antigena NK ćelije se mogu podeliti na dve subpopulacije koje se razlikuju po svojim funkcionalnim karakteristikama: citotoksičnu, CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciju, sa nižom gustinom CD56 antigena i imunoregulatornu, CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciju, sa većom gustinom CD56 antigena koja sintetiše citokine, a slabo je citotoksična (Cooper *et al.*, 2001). CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija se odlikuje brojnim granulama ispunjenim proteolitičkim enzimima pomoću kojih mogu brzo delovati citotoksično prema izmenjenoj ciljnoj ćeliji, kao i visokim nivoom ekspresije CD16 aktivacionog receptora. Imunoregulatorna CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija se smatra nezrelijom i odlikuje se smanjenom citotoksičnošću i nižom ekspresijom CD16 receptora. U početku je imunoregulatorna funkcija pripisivana isključivo CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija, da bi novija istraživanja De Maria i saradnika 2011. Godine (De Maria *et al.*, 2011) pokazala da se i u dominantno citotoksičnoj, CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija, ubrzo nakon kontakta sa izmenjenom ćelijom indukuje sinteza IFN γ koji se brzo izlučuje i nije ga moguće detektovati pri kasnijim praćenjima. Prema najnovijem linearnom modelu diferencijacije NK ćelija, slabo citotoksična CD3⁻CD56^{sjajno+}, a nezrelja subpopulacija može se pod određenim uslovima diferencirati u zreliju CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciju NK ćelija (Freud *et al.*, 2006; Mujaj *et al.*, 2011; Eissens *et al.*, 2012).

NK ćelije su osim u perifernoj krvi prisutne u mnogim drugim organima: koži, organima limfnim organima, mukozi creva, jetri, uterusu, plućima... Poznato je da su u limfocitnoj populaciji NK ćelije najzastupljenije u perifernoj krvi (10-20%) i slezini (5-15%), a manje u limfnim čvorovima (0.5-7%) i krajnicima (manje od 0.4%) (Ferlazzo *et*

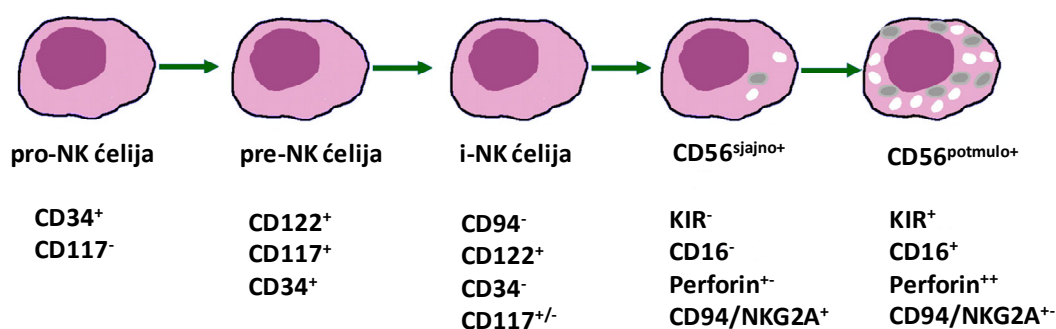
al., 2004). S obzirom na to da limfni čvorovi sadrže 40% svih limfocita, a periferna krv svega 2%, NK ćelije u ovim sekundarnim limfoidnim organima predstavljaju većinu NK ćelija u ljudskom organizmu. U perifernoj krvi čoveka zastupljenija je CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacija koja čini oko 95% ukupnih NK ćelija, dok u limfnim čvorovima dominira imunoregulatorna CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija NK ćelija. Osim u krvi i sekundarnih limfnih organa, specifične subpopulacije NK ćelija su prisutne i u drugim organima poput jetre, creva, materice, pluća i drugih (Cooper *et al.*, 2009).

1.2 Razvoj NK ćelija

Proces razvoja NK ćelija je regulisan urođenim signalima kao i brojnim spoljnim i unutrašnjim stimulusima koji mogu delovati aktivirajuće i inhibitorno. Kod ljudi, razvojni put NK ćelija počinje od hematopoetske progenitorske ćelije zajedničke za limfoidnu lozu, a koja je po svom fenotipu CD34⁺Lin⁻CD10⁺ (Di Santo, 2006).

Prvobitno se smatralo da se razvoj NK ćelija odvija samo u kostnoj srži što je opovrgnuto kada su u sekundarnim limfnim organima identifikovane CD34⁺CD45RA⁺ hematopoetske progenitorske ćelije koje mogu da se diferenciraju u NK ćelije, T ćelije i mijeloidne dendritične ćelije (Freud *et al.*, 2005). Ovaj stadijum razvoja NK ćelija označen je kao stadijum pro-NK ćelija i predstavlja prvi od pet stadijuma razvoja (Slika 1). Pro-NK ćelije tokom svog daljeg razvoja stiču CD117(c-Kit) receptor za faktor rasta matičnih ćelija (SCF, engl. Stem Cell Factor) i prelaze u drugi razvojni stadijum pre-NK ćelija (CD34⁺CD117⁺). U stadijumu pre-NK ćelija dolazi do pojave β subjedinice (interleukin-2) IL-2 i (interleukin-15) IL-15 receptora (IL-2/15Rβ) CD122, čime ove ćelije postaju osetljive na citokin IL-15 koji uslovljava njihov dalji razvoj i na IL-2, koji sa IL-15 ima zajednički β lanac receptora (Freud *et al.*, 2006; Eissens *et al.*, 2012). U trećem razvojnem stadijumu označenom kao nezrele, iNK ćelije (engl. immature) dolazi do gubitka CD34 markera nezrelosti, te ove CD34⁻CD117⁺ ćelije gube sposobnost da se diferenciraju u ćelije drugih limfoidnih loza, već se mogu diferencirati isključivo u NK ćelije. iNK ćelije pokazuju i varijabilnu ekspresiju CD94/NKG2A inhibitornog receptora čiji je ligand HLA-E (MHC molekul klase Ia), koja se u ovom stadijumu postepeno povećava da bi ovaj receptor bio prisutan na svim ćelijama u sledećem, CD56^{sjajno+} razvojnem stadijumu.

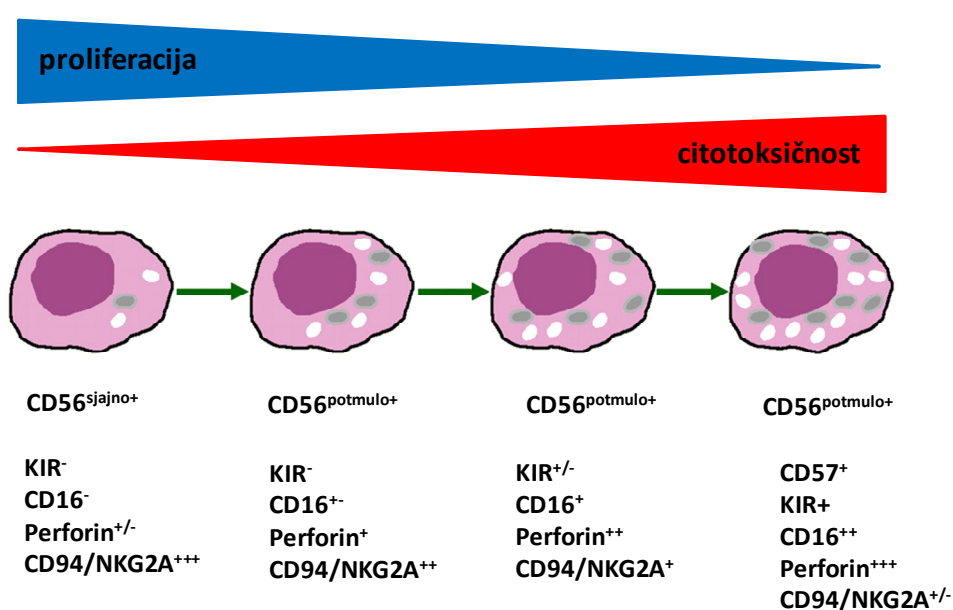
Ekspresija CD56 antigena koji predstavlja obeležje fenotipa NK ćelija počinje postepeno, od stadijuma iNK ćelija i povećava se, da bi ovaj antigen bio prisutan na CD56^{sjajno+} NK ćelijama. NK ćelije CD56^{sjajno+} stadijuma mogu da sintetišu citokine, najčešće nemaju granule sa perforinom i nisu citotoksične. Mada je ekspresija CD56 antigena obeležje svih NK ćelija, peti krajnji CD56^{potmulo+} stadijum razvoja NK ćelija odlikuje se nižom gustinom ekspresije CD56 antigena u odnosu na CD56^{sjajno+}, kao i smanjenom ekspresijom inhibitorynog CD94/NKG2A receptora. Najvažnija promena u ovom stadijumu razvoja koja doprinosi funkcionalnoj zrelosti NK ćelija je pojava CD16 aktivacionog receptora i KIR receptora kao i povećanje nivoa citotoksičnog medijatora perforina (Freud *et al.*, 2005; 2006). Ekspresija gena za KIR receptore je suprimirana u manje zrelim razvojnim stadijumima (Chan *et al.*, 2003; 2005; Cichocki *et al.*, 2011), a KIR receptori se u procesu razvoja NK ćelija pojavljuju istovremeno sa granulama ispunjenim citotoksičnim medijatorima (perforin i granzimi).



Slika 1. Pet stadijuma razvoja NK ćelija. Pro-NK ćelije migriraju iz kostne srži u sekundane limfne organe i diferenciraju se u pre-NK ćelije, koje se zatim diferenciraju u i-NK (nezrele) ćelije koje pojavom gusto raspoređenog CD56 antigena prelaze u stadijum CD56^{sjajno+} NK ćelija. CD56^{sjajno+} NK ćelije sa pojavom KIR receptora, CD16 aktivacionog receptora i granula sa perforinom postaju funkcionalno zrelije citotoksične CD56^{potmulo+} NK ćelije.

Na osnovu dužih telomera NK ćelija CD56^{sjajno+} subpopulacije kao i na osnovu toga što se pod određenim uslovima u cirkulaciji i u perifernim tkivima mogu diferencirati u citotoksičnu CD56^{potmulo+} subpopulaciju, smatra se da je CD56^{sjajno+} nezrelja subpopulacija NK ćelija (Romagnani *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). Ove dve

subpopulacije se razlikuju ne samo po citotoksičnosti i produkciji citokina, već i po sposobnosti da proliferišu. CD56^{sjajno+} subpopulacija NK ćelija koja ima pretežno imunoregulatornu ulogu, nije citotoksična i bolje proliferiše u prisustvu interleukina IL-2 (Caligiuri *et al.*, 1990). Diferencijacija CD56^{sjajno+} u CD56^{potmulo+} NK ćelije se odvija povećanjem njihove citotoksičnosti i ekspresije CD16 i KIR receptora, a smanjenjem proliferativnog potencijala (Slika 2). Pokazano je da CD56^{potmulo+} NK ćelije koje ispoljavaju CD57 marker terminalne diferencijacije, slabo proliferišu i izarazito su citotoksične (Lopez-Vergès *et al.*, 2010; Moretta, 2010).



Slika 2. Model diferencijacije CD56^{sjajno+} u CD56^{potmulo+} subpopulaciju NK ćelija. Smanjenje sposobnosti proliferacije i povećanje citotoksičnosti praćeni su pojavom KIR i CD16, a smanjenjem ekspresije CD94/NKG2A receptora (Moretta, 2010).

Prema novijim saznanjima prelazak iz CD56^{sjajno+} u CD56^{potmulo+} razvojni stadijum obuhvata nekoliko među-faza u kojima dolazi i do gubitka adhezionog molekula L-selektina (CD62L), koji se vezuje za sijalinske glikoproteine na ćelijama endotela krvnih sudova i omogućava ekstravazaciju ovih ćelija u tkiva i organe, a zastupljeniji je na CD56^{sjajno+} NK ćelijama. Na osnovu prisustva CD62L molekula identifikovana je CD56^{potmulo+}CD62L⁺ subpopulacija NK ćelija (Moretta *et al.*, 2010) koja može da sintetiše citokine i citotoksična je, pa iz tih razloga kao i zbog dužine telomera

predstavlja intermedijarni stadijum između manje zrele CD56^{sjajno+} i zrele CD56^{potmulo+} subpopulacije (Juelke *et al.*, 2010; Malhotra i Shanker, 2011).

1.3 Limfni čvorovi

Limfni čvorovi su periferni organi imunskog sistema koji imaju važnu ulogu u imunskom odgovoru na strane antigene. Limfni čvor se sastoji od fibroznog omotača koji zalazi u unutrašnjost limfnog čvora i formira brojne trabekle, parakortikalne oblasti (zone T ćelija) u kojoj naivne T ćelije iz susjednih venula dolaze u kontakt sa antigen prezentujućim dendritičnim ćelijama i zone B ćelija koju čine germinativni folikuli smešteni u spoljašnjem korteksu, gde naivne B ćelije stiču sposobnost da sintetišu specifična antitela. Limfni čvorovi su smešteni svuda u telu osim u centralnom nervnom sistemu, a posebno na čvorištima limfnih sudova kojima limfa dospeva iz određenih delova tela (regionalni limfni čvorovi). Aferentnim sudovima limfnog sistema dendritične ćelije iz perifernih tkiva zajedno sa antigenima, makrofagima, memorijskim T ćelijama i NK ćelijama dospevaju u subkortikalnu zonu limfnog čvora (Randolph *et al.*, 2005; Martin-Fortecha *et al.*, 2009).

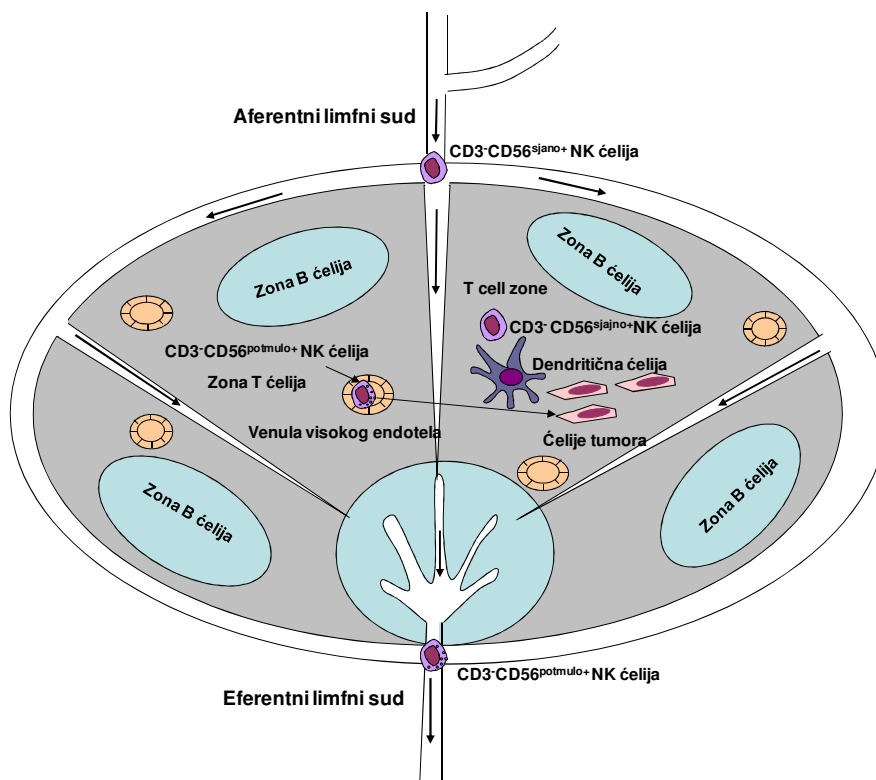
Dendritične ćelije u limfnom čvoru pored toga što imaju važnu ulogu u prezentovanju antigena naivnim T ćelijama, su značajne i u aktivaciji NK ćelija (Lucas *et al.*, 2007; Chijioke i Münz, 2011). U infekcijama i u tumorima vezivanje antigenih determinanti virusa, bakterija i tumora za TLR (engl. TOLL-like receptors) receptore na dendritičnim ćelijama dovodi do njihovog sazrevanja tj. do povećanja ekspresije MHC molekula klase I, kostimulatornih i adhezionih molekula, receptora za hemokine kao i do sinteze citokina u dendritičnim ćelijama. U tim uslovima aktivirane dendritične ćelije mogu iz perifernih tkiva u kojima se odvija susret sa patogenom i zapaljenjski proces da zahvaljujući receptorima za hemokine koje su stekle u procesu sazrevanja migriraju u drenirajuće limfne čvorove. Naime, tokom sazrevanja dendritičnih ćelija dolazi do povećanja ekspresije CCR7 hemokinskog receptora čiji su ligandi CCL21, koga proizvode endotelne ćelije limfnih sudova i CCL19, ligand koga proizvode ćelije strome i dendritičnih ćelija limfnog čvora. Ovim je omogućena migracija dendritičnih ćelija u subkortikalnu zonu drenirajućeg limfnog čvorova (Martin-Fortecha *et al.*, 2009).

Limfni čvorovi ljudi sadrže većinu svih NK ćelija u organizmu pri čemu je zastupljenija CD56^{sjajno+} subpopulacija NK ćelija koja se aktivira u kontaktu sa zrelim dendritičnim ćelijama. U tom smislu, zrele mijeloidne dendritične ćelije sekrecijom interleukina IL-12 i IL-18 stimulišu sintezu citokina interferona γ (IFN γ), faktora nekroze tumora- α (TNF- α , engl. Tumor Necrosis Factor α) i granulocitno monocitnog faktora rasta (GM-CSF) u NK ćelijama (Chijioko i Münz, 2011). Ova interakcija dendritičnih i NK ćelija u limfnom čvoru nije jednosmerna, pa tako IFN γ i TNF- α koga sintetišu CD56^{sjajno+} NK ćelije dovode do sazrevanja nezrelih dendritične ćelije u limfnom čvoru (Vitale *et al.*, 2005). GM-CSF koji sintetišu NK ćelije stimuliše diferencijaciju CD14⁺ monocita u makrofage (Ferlazzo i Munz, 2009). Pored toga, sintezom IFN γ , NK ćelije stimulišu sintezu interleukina IL-12 u dendritičnim ćelijama kao i ekspresiju IL-12 receptora na naivnim T ćelijama, a time i sintezu Th1 citokina i adaptivni imunski odgovor. Pri virusnim infekcijama, zrele plazmacitoidne dendritične ćelije sintezom IFN tipa I dovode do povećanja citotoksične aktivnosti NK ćelija. Zrele dendritične ćelije su u limfnom čvoru zaštićene od lize NK ćelijama povećanom ekspresijom MHC molekula klase I koji se vezuju za inhibitorne KIR i CD94/NKG2A receptore na NK ćelijama i time inhibiraju NK ćelijsku citotoksičnost (Ferlazzo i Munz, 2009)

Dendritične ćelije i ćelije strome limfnog čvora, sintetišu IL-15 koji se vezuje za α lanac IL-15 receptora na membrani ovih ćelija i na taj način stimulišu sazrevanje CD56^{sjajno+} NK ćelija u zrelije citotoksične CD56^{potmulo+} NK ćelije (Chijioko i Münz, 2011). U novije vreme pokazano je i da NK ćelije posredstvom svojih NKp30, NKp46 i DNAM 1 receptora uništavaju nezrele dendritične ćelije, dok su zrele dendritične ćelije zaštićene od lize NK ćelijama povećanom ekspresijom MHC molekula klase I (Morandi *et al.*, 2012).

Migracija NK ćelija najvećim delom je uslovljena ekspresijom hemokinskih receptora. U toku zapaljenskih procesa kao što su infekcije i prisutvo TLR liganada na patogenim mikroorganizmima, aktivirane mijeloidne i plazmacitoidne dendritične ćelije sekretuju različite hemokine koji utiču na migraciju NK ćelijskih subpopulacija u zavisnosti od toga koje receptore za hemokine ispoljavaju. Tako, CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelije ispoljavaju CXCR1 i CX3CR1 receptore za hemokine IL-8 (CXCL8) i CXCL1.

Hemokin CXCL1 posreduje u adheziji ćelija za endotel kapilara i stimuliše sleđstvenu hemotaksičnu migraciju prema IL-8. $CD3^-CD56^{sjajno+}$ NK ćelije ispoljavaju CCR5, CXCR3 i CXCR4 hemokinske receptore koji im omogućavaju da se kreću prema CCL5 (RANTES), CCL4 (MIP-1 β), CXCL11 i CXCL10, hemokinima koje proizvode dendritične ćelije. Na ovaj naćin, tokom zapaljenskih procesa mođe doći do migracije NK ćelija obe subpopulacije u limfni ćvor (Ferlazzo i Munz, 2009).



Slika 3. Dinamika NK ćelijskih subpopulacija u limfnom ćvoru infiltrisanom tumorom.

U subkortikalnoj T-ćelijskoj zoni limfnog ćvora u fiziološkim uslovima zastupljenija je $CD3^-CD56^{sjajno+}$ subpopulacija NK ćelija i smatra se da je to posledica povećane ekspresije CD62L (Frey *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005) adhezionog molekula i CCR7 receptora za hemokine koji se vezuje za CCL19 i CCL21 ligande, kao i CXCR3 receptora koji se vezuje za CXCL9, CXCL10, i CXCL11 ligande (Campbell *et al.*, 2001; Ferlazzo *et al.*, 2004). Ekspresija ovih hemokinskih receptora reguliše migraciju i pospešuje nakupljanje ove subpopulacije NK ćelija u sekundarnim limfnim organima. Znaćajno je da $CCR7^+$ NK ćelije učestvuju u uništavanju tumorskih ćelija koje sintetišu hemokine CCL19 i CCL21 (Robertson, 2002).

2005. godine opisana je subpopulacija hematopoetskih ćelija koja odgovara razvojnem stadijumu pro-NK ćelija i ispoljava CD45RA marker i $\beta 7$ integrine ($CD34^{potmulo+}CD45RA^+ \beta 7^{sjajno+}$) i koja zahvaljujući prisutvu CD62L i $\alpha 4\beta 7$ integrina migrira u sekundarne limfne organe (Freud *et al.*, 2005). Ova subpopulacija pro-NK ćelija je visoko-zastupljena u limfnim čvorovima i u prisutvu endogenih citokina limfnog čvora diferencira se najpre u $CD56^{sjajno+}$ subpopulaciju (Ferlazzo *et al.*, 2004), a zatim u funkcionalno zrelije $CD56^{potmulo+}$ subpopulaciju NK ćelija koje postepeno gube CD62L i $\beta 7$ integrine i kasnije napuštaju sekundarne limfne organe (Campbell *et al.*, 2001; Malhotra i Shanker, 2011).

Edukacija NK ćelija

NK ćelije mogu da prepoznaju izmenjene ćelije i liziraju ih, a tolerantne su prema ćelijama sopstvenog organizma. Ovo svojstvo NK ćelija omogućeno je prisustvom aktivacionih receptora koji neposredno prepoznaju ligande na izmenjenim ćelijama i inhibitornih receptora koji prepoznaju MHC molekule klase I na ćelijama sopstvenog organizma. Inhibitorni receptori i njihovi ligandi (MHC I molekuli) su izrazito polimorfni i kodiraju ih familije gena sa velikim brojem alela koji se nesleđuju nazavisno.

U procesu koji se naziva edukacija ili drugačije licenciranje NK ćelija, ove ćelije stiču sposobnost da obavljaju svoje efektorske funkcije, a pored toga stiču i toleranciju prema ćelijama vlastitog organizma. Proces edukacije odvija se interakcijom-kontaktom inhibitornih receptora NK ćelija sa MHC molekulima klase I ispoljenim na vlastitim ćelijama u organizmu. Edukacija NK ćelija se najčešće odvoja u sekundarnim limfnim organima, mada se može odvijati i u tkivima mnogih drugih organa (Elliott i Yokoyama, 2011).

Istraživanja vršena na MHC I deficitnim miševima (Höglund *et al.*, 1991; Liao *et al.*, 1991) i ljudima (Zimmer *et al.*, 1998) pokazala su slabu reaktivnost NK ćelija ovih organizama nakon stimulacije aktivacionih receptora, pri čemu su usled slabe reaktivnosti ove NK ćelije tolerantne u odnosu na ćelije organizma u kome se razvijaju. Ove NK ćelije se odlikuju niskom citotoksičnošću i slabom produkcijom IFN γ . Smatra se da u uslovima MHC I deficijencije usled nedostatka inhibitornih stimulusa koji

potiču od aktiviranih inhibitornih KIR receptora, česte stimulacije aktivacionih receptora na NK ćelijama dovode do desenzitizacije i slabe reaktivnosti NK ćelija (Fernandez *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Vezivanje inhibitornih KIR receptora za MHC molekule klase I pored toga što određuje prepoznavanje i toleranciju na sopstvene ćelije, neophodan je uslov da bi NK ćelije mogle da postanu funkcionalno kompetentne. Sa tim u vezi, predložena su dva osnovna modela edukacije NK ćelija i još dva iz njih izvedena modela (Holgrund *et al.*, 2010).

Model koji su predložili Yokoyama i saradnici (Yokoyama *et al.*, 2006) označen je kao model „licenciranja“, a drugačije se naziva i model naoružavanja (engl. „arming model“). U ovom modelu presudan značaj u dostizanju pune funkcionalne kompetentnosti NK ćelija se pridaje vezivanju inhibitornih KIR receptora za MHC molekul klase I. Nasuprot ovom modelu, model razoružavanja (engl. „disarming model“) koji su predložili Raulet i saradnici (Fernandez *et al.*, 2005) podrazumeva da za dostizanje funkcionalne kompetentnosti je potrebna stimulacija aktivacionih receptora njihovim ligandima kao i inhibitornih KIR receptora MHC molekulima klase I, dok hronična stimulacija aktivacionih receptora dovodi do smanjene sposobnosti NK ćelija da budu funkcionalno aktivne. Treći model, izveden iz modela „licenciranja“ je model *cis* interakcije. Prema ovom modelu, za razliku od „arming“ modela koji podrazumeva vezivanje inhibitornog KIR receptora samo za MHC I molekul na susednoj ćeliji (*trans* vezivanje) tokom edukacije NK ćelija, dovoljan uslov za punu funkcionalnu kompetentnost NK ćelija je vezivanje inhibitornog KIR receptora za sopstveni MHC molekul klase I (*cis* vezivanje). Ovaj model je našao eksperimentalnu potvrdu samo kod miševa (Andersson *et al.*, 2007). Četvrti model sticanja funkcionalne kompetentnosti NK ćelija je model reostata koji predstavlja dinamički pogled na edukaciju NK ćelija i u izvesnom smislu objedinjuje „arming“ i „disarming“ modele. Model reostata podrazumeva da je funkcionalnost NK ćelija uslovljena inhibitornim stimulusima koji potiču vezivanjem za MHC I molekule koji moraju da prevladaju aktivacione signale nastale vezivanjem liganda za aktivacione receptore na NK ćelijama (Borodin *et al.*, 2009; Holgrund *et al.*, 2010).

U eksperimentima transfera funkcionalno nekompetentnih NK ćelija iz MHC I deficijentnih u normalne miševe pokazano je da NK ćelije u organizmu primaoca

postaju funkcionalno kompetentne (Joncker *et al.*, 2010). Slično tome, pokazano je da pri transferu NK ćelija iz normalnih u MHC I deficitne miševske NK ćelije gube funkcionalnu kompetentnost (Elliott *et al.*, 2010). Ovi podaci ukazuju na to da NK ćelije mogu biti ponovo edukovane u zavisnosti od prisustva MHC molekula klase I u okruženju, kao i da edukacija NK ćelija predstavlja reverzibilan proces. Tokom edukacije dolazi do promene na nivou lipidnog dvosloja plazma membrane NK ćelije, pri čemu nakon kontakta KIR receptora na NK ćeliji sa MHC I ligandom na ćeliji organizma, na membrani NK ćelije dolazi do grupisanja aktivacionih receptora u tzv. nanodomene koji su smeštinu u ekstracitoplazmatskom sloju membrane i predstavljaju regione membrane koji su pogodni za „prijem“ i transdukciju spoljašnjih signala (Guia *et al.*, 2011).

Mada edukacija dovodi do generisanja NK ćelija koje imaju izražena efektorska svojstva prema izmenjenim ćelijama, aktivnost NK ćelije zavisi od prisustva liganada za aktivacione receptore na izmenjenoj ćeliji kao i od citokina u okruženju. U tom smislu kod miševa je pokazano mnogo izraženije citotoksično dejstvo „needukovanih“ u poređenju sa „edukovanim“ NK ćelijama, prema ćelijama koje su inficirane citomegalovirusom (CMV) (Orr *et al.*, 2010; Jaeger i Vivier, 2012). Bolje citotoksično dejstvo ovih „needukovanih“ NK ćelija može da bude uslovljeno time što se aktivacioni Ly49 mišiji receptori vezuju direktno za virusne proteine i time stimulušu NK ćelijsku aktivnost (Kielczewska *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2012). Ispitivanjem uticaja edukacije na antitumorsku citotoksičnost NK ćelija, pokazano je da kod neuroblastoma NK ćelije obolelih koje ne ispoljavaju KIR receptore za sopstvene MHC molekule klase I (needukovane NK ćelije) pokazuju veću citotoksičnost prema ovom malignom tumoru u odnosu na NK ćelije koje su edukovane kontaktom sa MHC molekulima klase I (Tarek *et al.*, 2012). Ovi podaci ukazuju na to da u uslovima stresa, kao što su tumori i virusne infekcije, NK ćelije koje nisu edukovane pokazuju bolje citotoksično dejstvo.

"Priming"-senzibilizacija NK ćelija

Prema važećim teorijama da bi NK ćelije bile funkcionalno kompetentne, pored edukacije koja se ostvaruje kontaktom inhibitornih KIR receptora NK ćelija sa MHC molekulima klase I, potrebno je da NK ćelije budu senzibilisane interleukinima IL-15 ili IL-18. Smatra se da se ovaj proces najčešće odvija u limfnim čvorovima i ostalim

sekundarnim limfnim organima. Ovaj proces se označava kao "priming" pri čemu IL-15 vezan za α subjedinicu IL-15 receptora (IL-15R α) na dendritičnim ćelijama se vezuje za komplementarne $\beta\gamma$ subjedinice IL-15 receptora na NK ćeliji. Za razliku od IL-15 koji je u ovom procesu *trans* prezentovan vezivanjem za dendritične ćelije, IL-18 deluje na NK ćelije kao solubiln molekul. Proces "priming"-a je neophodan za citotoksičnu funkciju NK ćelija i za sposobnost produkcije IFN γ samo kod onih organizama koji ispoljavaju MHC molekule klase I, dok nije za sada poznato da li se "priming" odvija i kod MHC I-deficijentnih organizama čije NK ćelije nisu edukovane (Long 2007; Hoglund i Borodin, 2010).

1.4 NK ćelijski receptori

Za razliku od ćelija adaptivnog imunskog sistema T i B limfocita, NK ćelije kao efektorske ćelije sistema urođene imunosti, nemaju klonski rasprostranjene receptore specifične za određeni antigen. NK ćelije ispoljavaju aktivacione i inhibitorne receptore posredstvom kojih su regulisane njihove efektorske funkcije.

1.4.1 Aktivacioni receptori

Aktivacioni receptori stimulišu efektorske funkcije NK ćelija i obuhvataju više strukturno različitih familija. U ove receptote ubraja se nekoliko grupa: NKG2D, predstavnik C-lektinima sličnih receptora (NKG2) (engl. Natural Killer cell lectin-like receptor 2), CD16 receptor niskog afiniteta za Fc fragment Ig (FcRIIIa), prirodni citotoksični receptori NCR (engl. Natural Cytotoxicity Receptors), aktivacioni KIR receptori i DNAM-1. Pored ovih receptora brojni koreceptori kao što su 2B4, CD48 i NKp80 mogu takođe da doprinesu aktivaciji NK ćelija. Pojedini receptori kada su pojedinačno stimulisani ne dovode do citotoksične aktivnosti NK ćelija, ali snižavaju prag aktivacije NK ćelija (Moretta *et al.*, 2002) te se NK ćelije mogu aktivirati istovremenom stimulacijom više receptora (Bryceson *et al.*, 2006). Aktivacioni receptori ne sadrže u svojoj strukturi aktivacioni domen, već su svojim citoplazmatskim domenom povezani sa adaptorskim molekulima koji sadrže ITAM (engl. Immunodominant Tyrosine based Activation Motif) aktivacioni domen sa aminokiselinom tirozinom (Y) u određenom, YXX(I/L) redosledu, koji učestvuje u

prenosu aktivacionih signala. Aktivacioni receptori mogu da budu povezani sa više adaptorskih molekula što omogućava bolju regulaciju aktivacije NK ćelija u različitim fiziološkim uslovima (Lanier, 2008).

NKG2D

NKG2D aktivacioni receptor po svojoj strukturi pripada NKG2 (engl. Natural Killer cell lectin-like receptor 2) familiji C-lektina tipa II zavisnih od kalcijuma. Prisutan je na NK ćelijama i na $\gamma\delta$ T, $\alpha\beta$ CD8⁺ i NKT ćelijama ljudi (Eagle i Trowsdale, 2007). Vezivanjem za svoje ligande NKG2D receptor može da aktivira citotoksičnu funkciju i sintezu citokina u NK ćelijama samostalno i nezavisno (Zafirova *et al.*, 2011).

Ligandi NKG2D receptora (NKG2DL) nisu prisutni na ćelijama zdravih tkiva osim na ćelijama epitela timusa i mukoze gastrointestinalnog trakta. Patološki uslovi kao što su virusne infekcije i maligna transformacija dovode do povećanog ispoljavanja ovih molekula. Kod ljudi postoje dve familije NKG2DL: daleki homologi MHC molekula klase I (MICA i MICB) i familija ULBP proteina koji se vezuju za UL16 protein virusa CMV, a koja obuhvata 5 članova (ULBP1-4 i REA1G) (Raulet, 2003; Spear *et al.*, 2013). *MIC* geni imaju 28-35% nukleotidnih sekvenci sličnih *MHC I* genima, veoma su polimorfni i obuhvataju 60 MICA i 25 MICB alela (Eagle i Trowsdale, 2007). Slično MHC molekulima klase I, MICA/B u svojoj strukturi poseduju $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ vanćelijske domene i transmembranski rep, ali se ne vezuju za $\beta 2$ mikroglobuline i ne učestvuju u prezentaciji antigena (Groh *et al.*, 1996).

Stresni uslovi kao što su toplotni šok, oksidativni stres, genotoksični agensi i zaustavljena replikacija DNK u ćeliji, povećavaju ekspresiju NKG2DL (Gasser *et al.*, 2005). Inducibilnost gena za NKG2DL u stresnim uslovima je prvobitno pokazana za protein toplotnog šoka Hsp70 koji se vezuje za promotore *MICA* i *B* gena i indukuje njihovu transkripciju. Transkripciju ovih gena indukuju i oštećenja DNK molekula nastala usled dejstva jonizujućeg zračenja ili alkilirajućih agenasa koji stvaraju prekide u DNK molekulu. U tom smislu, ATM (engl. Ataxia Telangiectasia Mutated) kinaza koja se aktivira usled pojave dvolančanih prekida u DNK molekulu i ATR (engl. Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein) kinaza koja se aktivira usled zaustavljene replikacije DNK, povećavaju ekspresiju NKG2DL (Gasser *et al.*, 2005). Značajno je da

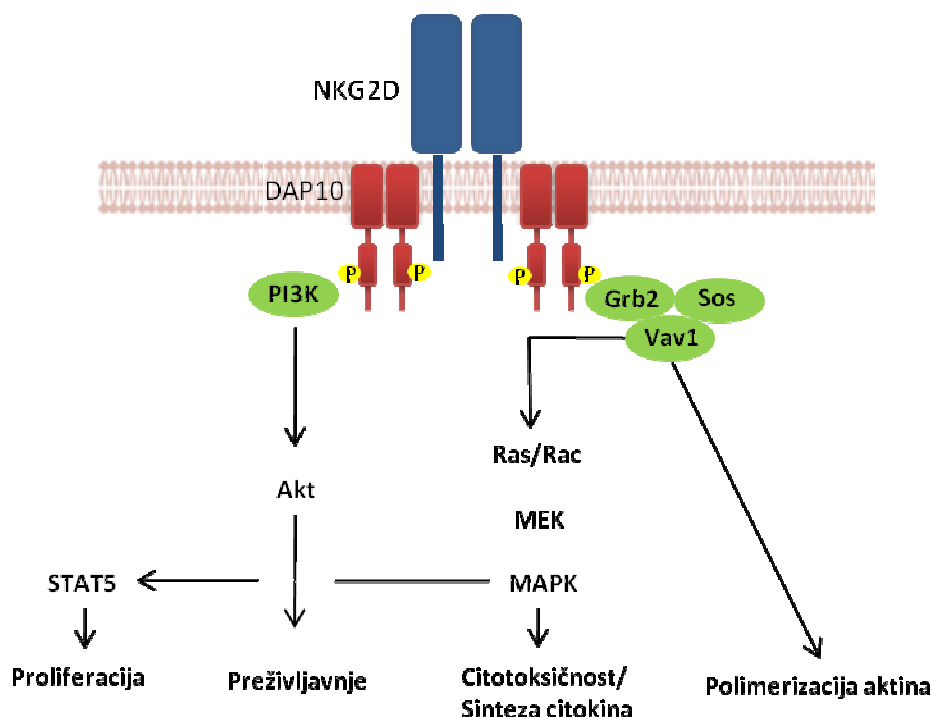
terapija malignih tumora jonizujućim zračenjem i hemioterapijskim agensima koji dovode do oštećenja DNK molekula, povećava ekspresiju NKG2DL i na taj način pospešuje NKG2D zavisnu eliminaciju malignih klonova (Spear *et al.*, 2013). Pokazano je i da inhibitori proteazoma koji se primenjuju u terapiji multiplog mijeloma takođe posredstvom ATM/ATR signalnog puta dovode do povećane ekspresije ULBP1 liganda na ćelijama tumora (Krieg i Ullrich, 2013). Pored toga pokazano je i da produkti virusa CMV koji deluju kao inhibitori histon deacetilaza povećavaju ekspresiju iRNK za MICA. Na ekspresiju NKG2DL slično deluju i inhibitori histon deacetilaza i *all trans* retinoična kiselina koje se primenjuju u terapiji akutne mijeloidne leukemije, promijelocitne leukemije i hepatocelularnog karcinoma (Lopez-Larrea *et al.*, 2008; Spear *et al.*, 2013).

Nivo NKG2DL je regulisan i na nivou translacije, a iRNK za MICA i MICB su prisutne i u ćelijama zdravih tkiva koja, u fiziološkim uslovima, ne ispoljavaju ove proteine. Translaciju NKG2DL regulišu male iRNK (miRNK) koje vezujući se za 3' UTR region iRNK ovih liganada inhibiraju ekspresiju ovih proteina i održavaju je ispod određenog praga, a pri stresnim uslovima u ćeliji omogućavaju njihovu sintezu (Stern-Glossar i Mandelboim, 2009). Ovakva regulacija ekspresije NKG2DL je značajna jer sprečava neželjenu NK ćelijsku lizu ćelija sopstvenog organizma. Pokazano je i da virusi CMV takođe produkuju miRNK koje inhibiraju ekspresiju NKG2D L (Stern-Glossar, *et al.*, 2008).

Već u prvim fazama maligne transformacije usled oštećenja DNK molekula dolazi do ekspresije NKG2DL (Diefenbach *et al.*, 2000; Champsaur i Lanier, 2010). Međutim, u uznapredovalim stadijumima rasta tumora pokazano je da povećan nivo NKG2DL može da doprinese internalizaciji i degradaciji NKG2D receptora, kao i da može doći do odbacivanja ovih liganada sa površine maligne ćelije delovanjem proteolitičkih enzima matriks metaloproteinaza (MMP), što čini maligne ćelije manje podložnim lizi od strane NK ćelija (Groh *et al.*, 2002; Dubrovina *et al.*, 2003). Pored toga, maligne ćelije kao i imunoregulatorne ćelije koje su prisutne u tumorima, sintetišu transformišući faktor rasta- β (engl. Transforming Growth Factor- β , TGF- β) koji sprečava ispoljavanje samog NKG2D receptora i na taj način omogućavaju otpornost malignih ćelija na lizu NK ćelijama (Castracioni *et al.*, 2003).

NKG2D receptor putem disulfidnih veza formira homodimere i svoju aktivirajuću funkciju ostvaruje posredstvom DAP10 adaptorskog molekula. Svaki monomer NKG2D receptora udružuje se sa po 2 DAP10 molekula i na ovaj način formiran je heksamerni kompleks koji se aktivira vezivanjem liganda (Slika 4).

Vezivanje NKG2D receptora za ligand dovodi do aktivacije DAP10 molekula fosforilacijom tirozina (Y) u YXXM domenu koji zatim može da veže i aktivira fosfatidil inozitol 3 kinazu (PI3K) ili Grb2 protein (engl. Growth factor receptor binding protein 2) (Slika 4). S obzirom na to da je intracitoplazmatski domen DAP10 molekula dugačak svega 21 aminokiselinu i da se sekvence aminokiselina koje vezuju SH2 domen p38 subjedinice PI3K i Grb2 proteina međusobno preklapaju, svaki DAP10 molekul može da veže samo jedan od ovih molekula (Lanier, 2008). Aktivirani Grb2 molekul indukuje fosforilaciju Vav1, SLP-76 i fosfolipaze C- γ (PLC- γ).



Slika 4. Signalni put NKG2D receptora. Stimulacija NKG2D receptora dovodi do aktivacije NK ćelija: vezivanjem PI3K i Grb2-Vav1-Sos1 kompleksa za fosforilisanu aminokiselinu tirozin (pY) u YINM strukturnom motivu () citoplazmatskog domena DAP10.

Vav1 molekul se nalazi uzvodno u ovom signalnom putu i kada je aktiviran, prilikom formiranja imunološke sinapse sa ciljnom ćelijom, dovodi do reorganizacije aktinskih filamenata u citoskeletu, otpuštanja Ca^{2+} kao i do pokretanja i sekrecije citotoksičnih

granula. Aktivirana p85 subjedinica PI3K fosforiliše membranski fosfatidil inozitol(4,5) bifosfat i time ga prevodi u sekundarni glasnik fosfatidil inozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3) i aktivira Akt kinazu u imunološkoj sinapsi formiranoj između NK ćelije i ciljne ćelije koja ispoljava NKG2DL. Pokazano je da je Grb2 aktiveran kada je u Sos1-Vav1-Grb2 kompleksu i da tada odlazi ka delu membrane bogatom PIP3 koji nastaje delovanjem PI3K (Upshaw *et al.*, 2006). Procesi koji se odvijaju u NKG2D signalnoj putanji nizvodno od PI3K i Grb2-Vav1 kompleksa nisu u potpunosti razjašnjeni, ali je pokazano da vezivanjem NKG2DL mogu da se aktiviraju i Akt, mitogenom aktivirana kinaza protein kanaze (MEK)/ mitogenom aktivirana protein kinaza (MAPK) i Janus tirozin kinaza 2 (JAK2), a takođe i STAT5 signalni molekul. Pokazano je da i PI3K i i Grb2 molekuli podjednako doprinose citotoksičnosti NK ćelija kao i da mutacije u jednom od njih umanjuju NK ćelijsku citotoksičnost (Upshaw *et al.*, 2006; Lanier, 2008; Zafirova *et al.*, 2011). Pored uloge u citotoksičnosti, NKG2D/ DAP10 signalni put učestvuje i izlučivanju citokina, a smatra se de aktivacija PI3K–Akt signalnog puta može da stimuliše i preživljavanje NK ćelija (Lanier, 2009).

NK ćelije, tokom svog razvoja, ispoljavaju NKG2D receptor relativno rano, već u stadijumu iNK ćelija. Ovaj receptor je podjednako prisutan i na CD56^{potmulo+} i na CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija (Zafirova *et al.*, 2011).

NCR

NCR receptori su po svojoj strukturi membranski proteini tipa I koji u svom vanćelijskom domenu sadrže jedan ili dva Ig slična domena. Ova grupa obuhvata NKp46 i NKp30, receptore koji su konstitutivno eksprimirani na svim NK ćelijama i NKp44, receptor koji je prisutan na NK ćelijama aktiviranim sa IL-2 i na plazmacitoidnim dendritičnim ćelijama (Fusch *et al.*, 2005; Hudspeth *et al.*, 2013). NKp46 i NKp30 receptori su interspecijski prisutni, te se smatraju markerima NK ćelija. Ligandi za NCR receptore nisu precizno definisani, ali je pokazano da se visokim afinitetom vezuju za heparin sulfat proteoglikane (HSP) hemaglutinina različitih virusa, kao i za njima slične antigene determinante na tumorskim ćelijama (Bloushtain *et al.*, 2004). U novije vreme identifikovani su i drugi logandi ovih receptora kao što su BAT3 (engl. nuclear factor HLA-B-associated Transcript 3), ligand koga putem egzozoma izlučuju dendritične ćelije i tako aktiviraju NK ćelije, kao i B7-H9 ligand koji je

prisutan na ćelijama tumora. NCR receptori učestvuju u ubijanju malignih ćelija putem citotoksičnosti pri čemu je NKp46 najmoćniji aktivator citotoksičnosti NK ćelija (Brandt *et al.*, 2009). NKp30 i NKp46 ineteraguju i sa dendritičnim ćelijama i dovode do njihovog sazrevanja posredstvom citokina koje sintetišu na ovaj način stimilsane NK ćelije, a pored toga učestvuju i u procesu ubijanja nezrelih dendritičnih ćelija (Ferlazzo, 2005; Morandi *et al.*, 2012; Hudspeth *et al.*, 2013). Iako je do sada uglavnom pokazana izrazito aktivirajuća uloga NCR receptora, postoje novi podaci o postojanju različitih alela *NKp30* od kojih produkt *NKp30c* forme inhibira funkciju NK ćelija (Delahaye *et al.*, 2011).

CD16

CD16 je po svojoj funkciji receptor niskog afiniteta za Fc fragment IgG (Fc γ RIII). Strukturu CD 16 čini α lanac koji u svom vanćelijskom regionu sadrži dva Ig slična domena i koji prepoznaje Fc fragmente IgG1 i IgG3 antitela. Kod ljudi postoje dva gena za Fc γ RIII molekul: A i B. Produkt A gena je Fc γ RIIIA isoforma koja je prisutna na NK ćelijama, a podukt B gena je Fc γ RIIIB izoforma koja se prisutna na neutrofilima.

CD16 receptor na NK ćelijama se niskim afinitetom vezuje za Fc fragment IgG na ciljnoj ćeliji koja je obeležena antitelima i tako sprovodi citotoksičnost zavisnu od antitela-ADCC (engl. Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity) (Lanier *et al.*, 1986). Ovim putem aktivirane NK ćelije sintetišu i sekretuju citokine ili oslobađaju perforin i granzime iz citotoksičnih granula i liziraju ciljne ćelije. Pored toga što učestvuje u ADCC, pokazano je da CD16 može da se direktno veže za ćelije tumora i da time dovodi do citototoksične aktivnosti NK ćelija (Mandelboim *et al.*, 1999; Grier *et al.*, 2012). CD16 receptor je nekovalentno vezan sa homodimerom koga čine FcR γ lanci ili homodimerom TCR ζ lanaca ili heterodimerom FcR γ i TCR ζ koji su značajni u signalnom putu CD16 receptora. Vezivanjem liganda za CD16 receptor dolazi do aktivacije NK ćelija preko Src-tirozin kinaze, koja fosforiliše tirozin ITAM-a u citoplazmatskom delu FcR γ i TCR ζ lanaca (Vivier *et al.*, 1991). Aktivacijom CD16, takođe dolazi i do fosforilacije i aktivacije ZAP70 signalnog molekula, koji aktivira fosfolipazu C, kao i do aktivacije PI3K i MAPK protein kinaza i translokacije nuklearnog faktora aktiviranih T ćelija (engl. Nuclear Factor of Activated T-cells,

NFAT) (Lanier, 1998). Zastupljen je najviše na zrelijoj i citotoksičnoj CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija. Pokazano je da CD16 od svih aktivacionih NK ćelijskih receptora poseduje najveći potencijal da aktivira citotoksičnu funkciju NK ćelija i sintezu citokina (Bryceson *et al.*, 2006).

DNAM-1

DNAM-1 (CD226) po strukturi pripada superfamiliji Ig i osim NK ćelija ispoljavaju ga T i B ćelije, monociti i trombociti (Lanier, 2005). Prepoznaje ligande CD155 (receptor za Polio virus) i CD112 (nektin-2) (Bottino *et al.*, 2003) i pospešuje antitumorsku citotoksičnu funkciju NK ćelija i produkciju citokina, a pored toga i lizu nezrelih dendritičnih ćelija (Pende *et al.*, 2006; Morandi *et al.*, 2012).

1.4.2 Inhibitorni receptori

Postoje dve grupe inhibitornih receptora na NK ćelijama u zavisnosti od liganada koje prepoznaju: MHC I zavisni inhibitorni receptori koji se vezuju za klasične i neklasične MHC molekule klase I i receptori koji se vezuju za ostale ligande. Kod ljudi su na osnovu strukture identifikovane dve familije MHC I-zavisnih inhibitornih receptora: Ig superfamilija receptora koja obuhvata KIR receptore i leukocitne Ig slične receptore (engl. Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors, LIR) i familija receptora sličnih C-lektinima. Inhibitorni receptori pokazuju različitu specifičnost za MHC I molekule, pa u tom smislu neki prepoznaju samo određene alele antigenih determinanti za MHC molekule klase I, dok drugi prepoznaju širok spektar MHC I liganda (Stern-Ginossar i Mandelboim, 2010). Za urođeni imunski odgovor je važno da svaka NK ćelija ispoljava više inhibitornih receptora u različitim kombinacijama, tako da su različite subpopulacije NK ćelija u mogućnosti da prepoznaju gubitak nekog od MHC I molekula (Moretta *et al.*, 1996; Gazit *et al.*, 2004).

KIR receptori

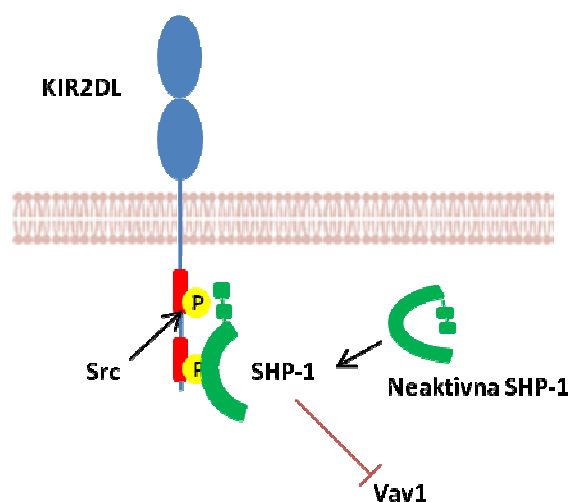
KIR receptori su familija inhibitornih receptora koji po svojoj strukturi pripadaju superfamiliji imunoglobulina i specifično intereaguju sa MHC molekulima klase I. Ispoljavaju ih uglavnom NK ćelije i mali broj $\alpha\beta^+$ i $\gamma\delta^+$ T ćelija (Lanier, 2005).

KIR receptori predstavljaju najpolimorfiju familiju NK ćelijskih receptora. Vezujući se za svoje ligande, MHC molekule klase I (HLA-A, -B i -C) koji su prisutni na gotovo svim nukleisanim somatskim ćelijama, omogućavaju toleranciju NK ćelija na sopstvene ćelije u organizmu. U patološkim stanjima kao što su tumori i virusne infekcije često dolazi do gubitka MHC molekula klase I čime je onemogućena aktivacija citotoksičnosti T ćelija prepoznavanjem antigena vezanih za ove molekule posredstvom TCR. U tim uslovima NK ćelije deluju citotoksično prema izmenjene, MHC I- deficijentne, ćelije. Takođe, prethodno je već u ovom tekstu opisana i uloga KIR receptora reaktivnih u odnosu na sopstvene MHC molekule klase I u procesu dostizanja pune funkcionalne zrelosti NK ćelija u procesu njihove edukacije.

KIR receptori se prema CD (engl. Cluster of Differentiation) nomenklaturi označavaju sa CD158. Ovi receptori su transmembranski glikoproteini koji u svom vanćelijskom regionu sadrže 2 ili 3 C2 tipa Ig slična domena koji učestvuju u vezivanju liganda. Na osnovu broja Ig domena u vanćelijskom regionu KIR receptori se mogu podeliti na subfamilije KIR2D, sa 2 i KIR3D, sa 3 Ig slična domena (Moretta *et al.*, 1996). Inhibitorne KIR receptore odlikuje dugačak (engl. long, L) citoplazmatski region (KIRDL) koji sadrži jedan ili dva strukturalna motiva sa aminokiselinom tirozinom (engl. Immune Tyrosine-based Inhibitory Motif, ITIM) u određenom redosledu (Ile/Val/Leu/Ser-X-Tyr-X-X-Leu/Val) i koji je odgovoran za prenos inhibitornih signala (Cambell *et al.*, 2011).

Inhibitorni KIR receptori svojim vanćelijskim Ig domenima se specifično vezuju samo za određene alele podgrupa MHC molekula klase I. Tako, KIR2DL receptori prepoznaju alotipove HLA-C grupe MHC molekula klase I pri čemu posredstvom svoja 2 Ig domena formiraju vodinične veze sa $\alpha 1$ i $\alpha 2$ domenima teških lanaca HLA-C molekula. Na taj način, KLR2DL1 (CD158a) receptor prepoznaje HLA-C molekule C2 tipa koji na osamdesetom mestu u $\alpha 1$ domenu teškog HLA lanca sadrže aminokiselinu lizin (HLA-Cw2, HLA-Cw4, HLA-Cw5 i HLA-Cw6), a KIR2DL2/3 (CD158b_{1/2}) receptori prepoznaju HLA-C molekule C1 tipa koji na ovom mestu u $\alpha 1$ domenu sadrže asparagin (HLA-Cw1, HLA-Cw3, HLA-Cw7 i HLA-Cw8) (Mandelboim *et al.*, 1996). KIR3DL receptori prepoznaju HLA-A i HLA-B alotipove. *KIR3DL1* gen je najpolimorfiji *KIR* gen i prepoznaje najčešći Bw4 epitop HLA-B molekula koji je takođe najpolimorfiji MHC molekul klase I u humanoj populaciji (Campbell *et al.*,

2013) a pored toga i HLA-A3 i –A11 molekule. Značajno je da KIR receptori pored svojih visoko-specifičnih HLA liganada mogu i da niskim afinitetom vežu i druge HLA molekule. U tom smislu KIR2DL2/3 pored visoko-afinitetnog vezivanja C1 može da niskim afinitetom veže i C2 alotipove HLA-C molekula, a takođe prepoznaje i neke HLA-B molekule. Ovo svojstvo KIR2DL2/3 receptora je značajno jer može da doprinese inhibiciji efektorskih funkcija KIR2DL2/3⁺ NK ćelija prema ciljnim ćelijama koje ispoljavaju C2 HLA-C molekule (Older Aguillar *et al.*, 2010). S obzirom na to da većina HLA-A i HLA-B molekula ne može biti prepoznata pomoću KIR2D receptora kao HLA-C, smatra se da su HLA-C molekuli evoluirali da bi sopstvene ćelije u organizmu bile zaštićene od citotoksične aktivnosti NK ćelija (Thielens *et al.*, 2012).



Slika 5. Signalni put inhibitorynog KIR receptora. Vezivanje HLA-C liganda za vanćelijske Ig sličane domene (●)KIR2DL dovodi do fosforilacije tirozina u ITIM (■)domenu citoplazmatskog regiona koju vrši Src kanaza. Zatim dolazi do vezivanja SHP-1 fosfataze koja se nakon toga aktivira i defosforiliše Vav1 i inhibira ga .

Vezivanje odgovarajućeg MHC I liganda za inhibitoryni KIR receptor dovodi do aktivacije Src kinaze koja fosforiliše tirozin u ITIM strukturnom domenu KIR-a. Zatim dolazi do premeštanja specifične tirozin fosfataze u neposrednu blizinu ćelijske membrane posredstvom β arestina 2 (Yu *et al.*, 2008) i njenog vezivanja za fosforilisani tirozin. U ovu grupu specifičnih fosfataza ubrajaju se SHP-1, SHP-2 i inozitol-5 fosfataza (SHIP) koje odlikuje prisustvo SH2 domena, kojim se vezuju za fosforilisani tirozin i prelaze u katalitički aktivnu, otvorenu, konformaciju (Bakker *et al.*, 2000).

Aktivirane fosfataze defosforilišu mnoge signalne molekule (TCR, Syk, Zap-70, PLC γ , Lat i SLP-76) kao i aktivacione receptore i koreceptore (NKG2D i 2B4) koji sadrže fosforilisan tirozin i na taj način ometaju signalne puteve aktivacionih receptora (Long, 2008). Najvažniji supstrat SHP-1 je Vav1 čijom defosforilacijom su inhibirana sekrecija citotoksičnih granula i signalni putevi mnogih aktivacionih receptora (Long *et al.*, 2001; Stebbins *et al.*, 2003). Pri kontaktu NK ćelije sa ciljnom ćelijom dolazi do vezivanja adhezionih molekula, limfoctinog funkcionalnog antigena-1 (LFA-1) i interćelijskog adhezionpg molekula-1(ICAM-1) što dovodi do fosforilacije Vav-1 koja je nezavisna od aktivacije NKG2D i drugih aktivacionih receptora koji sadrže ITAM, a koja takođe može da bude inhibirana vezivanjem inhibitornog KIR-a za HLA-C ligand (Riteau *et al.*, 2003).

Osim inhibitornih, postoje i aktivacioni KIR receptori koji pospešuju aktivnost NK ćelija, a čija svojstva su slabije proučena. Smatra se da imaju ulogu u reprodukciji i u odgovorima na virusne infekcije, kao i u osetljivosti na autoimunske bolesti (Hiby *et al.*, 2004; Alter *et al.*, 2007; Kulkarni *et al.*,2008). Za razliku od inhibitornih, aktivacioni KIR receptori u svom transmembranskom domenu imaju aminokiselinu lizin sa pozitivnim električnim nabojem (Biassoni *et al.*, 1996) kojim su prostorno povezani sa DAP12 adaptorskim proteinom koji sadrži aktivacioni ITAM strukturni motiv sa negativnim električnim nabojem i kratak (engl. short, S) citoplazmatski rep. Smatra se da su aktivacioni postali od inhibitornih KIR receptora duplikacijom i konverzijom gena (Abi-Rached i Parham, 2005) i u tom smislu je pokazano da za gotovo svaki aktivacioni KIRDL postoji njegov inhibitorni KIRDS parnjak (Campbell *et al.*, 2011).

U humanoj populaciji postoje 2 osnovna KIR haplotipa A i B i oba sadrže inhibitorne KIRL specifične forme za HLA-C1 i -C2 molekule, a razlikuju se po prisustvu KIR-S formi. A za razliku od B KIR haplotip ne sadrži većinu KIR2DS formi (Perham, 2008). S obzirom na homologiju vanćelijskih domena aktivacionih KIR receptora sa svojim inhibitornim parnjacima, smatra se da aktivacioni KIR receptori mogu da se slabim afinitetom vežu za MHC I ligande svojih aktivacionih parnjaka, mada je biohemijski i funkcionalno ovo sa sigurnošću utvrđeno samo za KIRD2S1 koji vezujući se za HLA-C1 ligand na ciljnim ćelijama aktivira NK ćelijsku efektorsku funkciju (Pende *et al.*, 2009)

KI2DL4 (CD158d) KIR receptor je jedini KIR koji ima dugačak citoplazmatski rep koji sadrži inhibični ITIM strukturni motiv, a koji aktivira efektorske funkcije NK ćelija. Ovaj KIR najčešće je prisutan na NK ćelijama uterusa gde se vezuje za HLA-G, neklaasičan MHC molekula klase I koga proizvode ćelije trofoblasta embriona i deluje na angiogenezu i remodelovanje krvnih sudova u procesu formiranja krvo tkivne placentalne barijere (Rajagopalan i Long, 2012). Za razliku od ostalih pripadnika KIR familije receptora koji su najvećim delom prisutni na CD56^{potmulo+} NK ćelijama, KI2DL4 je prisutan uglavnom samo na nezrelim, CD56^{sjajno+} NK ćelijama i aktivira sintezu citokina, a slabije NK ćelijsku citotoksičnost (Campbell *et al.*, 2011).

Inhibični receptori slični C-lektinima

Ovu grupu inhibičnih C lektinskih receptora zavisnih od kalcijuma čine heterodimeri sastavljeni CD94 molekula i od NKG2-A ili NKG2-B molekula NKG2 grupe (engl. Natural Killer cell lectin-like receptor 2). Ovi receptori se u ontogenetskom razvoju NK ćelija ranije javljaju u odnosu na KIR receptore i u većoj gustini su prisutni na CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija, a slabije na terminalno diferenciranim CD56^{potmulo+} NK ćelijama (Yu *et al.*, 2010). Slično inhibičnim KIR receptorima, inhibični lektinski receptori sadrže ITIM strukturni motiv u svom citoplazmatskom domenu koji učestvuje u prenošenju inhibičnih signala. Važan predstavnik ove grupe receptora je CD94/NKG2A, heterodimer koji prepoznaje HLA-E, neklaasični MHC molekul I klase (Carretero *et al.*, 1998; Malhotra i Shanker, 2011) koji se formira u endoplazmatičnom retikulumu od vodećih peptidnih sekvenci HLA-A, HLA-B i HLA-C molekula te njegova ekspresija zavisi od ekspresije ovih klasičnih MHC I molekula. Smatra se da ovaj mehanizam sinteze HLA-E omogućava NK ćelijama da prepoznaju promenu u ekspresiji MHC molekula klase I. Pri infekcijama virusima grupe CMV, UL40 protein povećava vezivanje HLA-E molekula za površinu inficirane ćelije, što inhibira citotoksičnu funkciju NK ćelija, a time pospešuje preživljavanje inficirane ćelije (Tomasec *et al.*, 2000).

MHC I- nezavisni inhibični receptori

Prema „missing self“ hipotezi MHC molekuli klase I imaju važnu ulogu u inhibiciji citotoksične aktivnosti NK ćelija. Međutim pokazano je da NK ćelije MHC I

deficijentnih miševa i ljudi ipak ne liziraju sopstvene, a mogu da liziraju ćelije tumora. Stoga se pretpostavilo se da osim inhibitornih receptora koji prepoznaju MHC molekule klase I postoje i inhibitorni receptori koji prepoznaju druge ligande i omogućavaju da NK ćelije budu tolerantne na autologne ćelije koje nemaju MHC molekule klase I.

U ovu grupu receptora ubrajaju se protein sličan karcino-embriionalnom antigenu 1 (CECAM1) koji je prisutan na većini ćelija imunskog sistema. Ovaj molekul posredstvom homotipskih interakcija inhibira funkciju NK ćelija, a njegov značaj u održavanju periferne tolerancije pokazan je kod MHC I deficijentnih ljudi (Maerker *et al.*, 2002). Ostali značajni inhibitorni receptori ove grupe su: KLRG1 (engl. Killer cell Lectin-Like Receptor G1) receptor koji inhibira funkciju NK ćelija vezivanjem za proteine iz grupe kadherina, CD161 receptor iz grupe C lektinskih receptora koji prepoznaje LLT1 (engl. Lectin Like Transcript) i LIAR1 (engl. Leukocyte-Associated Ig-like Receptor 1) koji se visokim afinitetom vezuje za kolagen (Maerker *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2006; Meyaard, 2008).

1.5 Efektorske funkcije NK ćelija

Postoje dve osnovne efektorske funkcije NK ćelija: citotoksična i imunoregulatorna. Citotoksična funkcija NK ćelija je usmerena prema izmenjenim maligno transformisanim ćelijama i ćelijama inficiranim virusima, kao i prema ćelijama koje su pretrpele različita hemijska i fizička oštećenja. NK ćelijska citotoksična aktivnost može biti direktna koja podrazumeva lizu izmenjenih ćelija proteolitičkim enzimima kao i izazivanjem smrti ovih ćelija apoptozom. Pored direktne, NK ćelije sprovode i citotoksičnost zavisnu od antitela (ADCC), a sintezom brojnih citokina i hemokina utiču na urođenu i na adaptivnu imunost.

Citotoksična funkcija NK ćelija

NK ćelije direktnu citotoksičnu funkciju vrše kao i citotoksične CD8⁺ T ćelije lučenjem granula sa citolitičkim enzimima i posredstvom Fas liganda iz TNF familije receptora. Za razliku od citotoksičnih T limfocita, da bi NK ćelija prepoznala i lizirala ciljnu ćeliju nije potrebno prepoznavanje antigena u sklopu MHC molekula.

Citotoksična aktivnost NK ćelija regulisana je balansom signala koji potiču sa aktivacionih i inhibitornih NK ćelijskih receptora. Kada ciljne ćelije na svojoj površini ispoljavaju ligande za aktivacione NK ćelijske receptore, a ne poseduju MHC molekule klase I ili kada ligandi za aktivacione receptore (NKG2DL, NCR ligandi) preovlađuju u odnosu na MHC I molekule na ciljnim ćelijama, dolazi do citotoksične aktivnosti NK ćelija. Nakon specifičnog vezivanja NK ćelijskih receptora za ligande na ciljnim ćelijama, NK ćelije posredstvom adhezionih molekula LFA-1 i ICAM-1 formiraju sa ciljnom ćelijom imunološku sinapsu čime je omogućeno izlučivanje citotoksičnih granula i citokina (McCann *et al.*, 2003; Voskoboinik *et al.*, 2010). U aktiviranoj NK ćeliji dolazi do polarizacije mikrotubula i na taj način do usmeravanja granula sa citolitičkim enzimima, koje nakon fuzionisanja sa plazma membranom oslobađaju citolitičke enzime (perforin) i serin proteaze (granzimi) u međućelijski prostor. NK ćelije CD56^{potmulo+} subpopulacije karakteriše obilno prisustvo citotoksičnih granula, a sledstveno tome i izražena citotoksičnost, za razliku od CD56^{sjajno+} subpopulacije koja je slabo citotoksična (Konjevic *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 2001).

Perforin je prvobitno uočen u granulama CD8⁺ T, a kasnije i NK ćelija. Ovaj protein sprovodi svoju ubilačku funkciju tako što polimeriše i formira pore prečnika 16 nm u lipidnom dvosloju plazma membrane ciljne ćelije (Dannert i Podack, 1983). Humani perforin se sintetiše u neaktivnoj formi u lumenu endoplazmatskog retikuluma i kao glikoprotein molekulske mase 70KD prelazi u Goldžijev kompleks da bi se aktivirao prelaskom u sekretorne granule u kojima se skladišti. U tom smislu, u endozomima dolazi do proteolitičkog otkidanja C-terminalne signalne sekvence dugačke 21 aminokiselinu sa asparaginom u glikozilovanoj formi, a koja „prekriva“ katalitički centar molekula. Ovakvom enzimskom degradacijom nastaje funkcionalno zrelija, aktivna forma proteina molekulske mase 60KD koja se skladišti u sekretornim granulama (Uellner *et al.*, 1997; Voskoboinik *et al.*, 2010).

Pored toga što se sintiše u neaktivnoj formi, nepoželjno destruktivno dejstvo perforina na membranu ćelije koja ga sintetiše sprečava povećana kiselost u sekretornim granulama koja dovodi do nakupljanja pozitivnog naelektrisanja na asparaginu u C2 domenu perforina i time sprečava vezivanje jona Ca²⁺ (Voskoboinik *et al.*, 2005; Voskoboinik *et al.*, 2010). U prostoru imunološke sinapse koja se odlikuje neutralanim

pH i visokom koncentracijom jona Ca^{2+} , oko 6500 puta većom nego u ćeliji, dolazi do vezivanja Ca^{2+} i do promene konformacije perforina, njegove polimerizacije i formiranja pora na plazma membrani ciljne ćelije, što dovodi do osmotske lize ciljne ćelije. Na delovima membrane u kojima je ciljna ćelija oštećena dolazi do pinocitoze kojom granzimi i druge litičke komponente prisutne u imunološkoj sinapsi dospevaju u unutarćelijski prostor (Arma i Podack, 2010; Voskoboinik *et al.*, 2010). Nepoželjnu proteolitičku aktivnost perforina u odnosu na NK ćeliju koja ga sintetise sprečava katepsin B takođe uskladišten u sekretornim granulama sa perforinom koji nakon egzocitoze vrši proteolizu monomera perforina da bi sprečio njihovu destruktivnu spontanu difuziju u NK ćeliju (Balaji *et al.*, 2002; Krzewski i Coligan, 2013).

Mutacije u *PRF1*, genu za perforin, kod ljudi dovode do oboljenja hamofagocitne limfocitocitoze. Usled ove mutacije NK i ostale ćelije obolelih se odlikuju nedostatkom perforina ili prisustvom njegove izmenjene nefunkcionalne forme ili malom količinom perforina, pa je sledstveno tome veoma niska citotoksičnost NK i T ćelija. Smatra se da je hemofagocitoza kod obolelih koji nose ovu mutaciju najčešće neposredno izazvana EBV i CMV virusnim infekcijama (Risma *et al.*, 2006).

Granzimi su serinske proteaze koje direktno ulaze u ciljnu ćeliju i delujući na različite supstrate dovode do apoptotske smrti ćelije. Kod ljudi je do sada opisano pet vrsta granzima: A, B, H, M i triptaza-2/ granzim 3 (Hameed *et al.*, 1988). Granzim B je najbolje opisan enzim ove grupe koji pored toga što posredno izaziva apoptozu aktivacijom kaspaza može i da ošteti DNK molekul i time direktno dovede do apoptoze (Russell i Lay, 2002). Granzim A direktno deluje proapoptotski praveći jednonančane prekide u molekulu DNK (Trapani i Suttom, 2003), dok u mitohondrijama generiše reaktivne kiseonične vrste (engl. Reactive Oxygen Species, ROS) i na taj način dovodi do smrti ciljne ćelije nekrozom (Martinval *et al.*, 2008; Krzewski i Coligan, 2013).

Pored citotoksičnosti koju NK ćelije sprovode posredstvom perforina, NK ćelije mogu da unište ciljne ćelije apoptozom, posredstvom liganda TNF familije receptora (TRAIL) i FasL. Ovi procesi često se odvijaju istovremeno. Vezivanjem TRAIL molekula za TNF receptor kao i FasL molekula za Fas (CD95) dovodi do apoptotske smrti ciljne ćelije. Značajno je da usled povećane sinteze $\text{IFN}\gamma$ koga izlučuju NK ćelije može doći do povećanja nivoa Fas molekula na ćelijama tumora čime one postaju

podložnije lizi od strane NK ćelija (Screpanti *et al.*, 2001). Međutim, maligne ćelije takođe mogu da ispoljavaju FasL što može da dovode do apoptoze NK ćelija i time do izbegavanja imunskog odgovora (Khar *et al.*, 1998). Stimulacije citokinima kao što su IL-2, IL-15 i IFN- α povećavaju nivo TRAIL receptora na NK ćelijama (Smyth *et al.*, 2005).

Imunoregulatorna funkcija NK ćelija

NK ćelije mogu da sintetišu brojne citokine i hemokine i tako regulišu urođenu i adaptivnu imunost. U početku je smatrano da isključivo NK ćelije CD56^{sjajno+} subpopulacije mogu da produkuju citokine, a kasnije je pokazano da i CD56^{potmulo+} subpopulacija sintetiše citokine neposredno nakon kontakta sa izmenjenom ćelijom (DeMaria *et al.*, 2010). Pored IFN γ koga najviše sintetišu, NK ćelije produkuju i brojne druge pro-inflamatorne citokine kao što su TNF- α , IL-5 i IL-13, imunosupresivne citokine kao što je IL-10 i faktore rasta kao što su GM-CSF i IL-3. NK ćelije sintetišu i brojne β hemokine CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP1- α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES) i α hemokine XCL1 (limfoatraktin) i CXCL (IL-8) (Walzer *et al.*, 2005; Viver *et al.*, 2011) kojima utiču na migraciju i drugih ćelija imunskog sistema i posredstvom kojih mogu da u zapaljenskim procesima dospeju u periferna tkiva i stupe u kontakt sa hematopoetskim i antigen prezentujućim ćelijama (Martín-Fontecha *et al.*, 2004; Vivier *et al.*, 2011).

Ulogu posrednika između ćelija nespecifične i specifične imunosti, NK ćelije sprovode interakcijom sa dendritičnim ćelijama. NK ćelije lizirajući tumorske ćelije ostavljaju za sobom ostatke ćelijskih antigena, koji dendritične ćelije prezentuju na svojoj površini i aktiviraju T limfocite. Isto tako, NK ćelije putem citokina koje sintetišu i to prvenstveno IFN γ deluju na T limfocite i na antigen prezentujuće ćelije i stimulišu sintezu Th1 citokina i dovode do aktivacije i sazrevanja monocita i dendritičnih ćelija (Walzer *et al.*, 2005). Aktivirane dendritične ćelije sintetišu citokine od kojih IL-12 direktno indukuje oslobađanje IFN γ iz NK ćelija i aktiviranih T limfocita i indirektno stimuliše razvoj Th1 adaptivnog imunskog odgovora. Pored toga, NK ćelije dodatno stimulišu Th1 odgovor posredstvom IFN γ koji u sinergiji sa T ćelijskim receptorom povećava ekspresiju IL-12 receptora na naivnim CD4⁺ T ćelijama (Afkirian *et al.*, 2002) i time pospešuje efekat IL-12 (Chijioke i Münz, 2011).

NK ćelije mogu da sintetišu i Th2 citokine IL-5 i IL-13 kada su stimulisane sa IL-4. Produkcijom ovih citokina NK ćelije mogu da doprinosu povećanju sinteze antitela na vanćelijske patogene indukujući Th2 ćelije. Pored toga povećana produkcija IL-5 može da dodovede do povećanje nivoa IgE antitela, a time i do alergijske reakcije. Pokazano je da pri infekcijama bakterijskim patogenima u uslovima sistemske inflamacije, stimulacija NK ćelija interleukinom IL-12 produkovanim od strane dendritičnih ćelija dovodi do sinteze IL-10 u NK ćelijama koji deluju antiinflamatorno i inhibira Th1 odgovor (Vivier i Ugolini, 2009; Chambers, 2010).

NK-22 subpopulacija NK ćelija

U limfoidnim tkivima mukoze digestivnog trakta i u krajnicima ljudi opisana je NK-22 imuoregulatorna subpopulacija NK ćelija koja za razliku od ostalih NK ćelija ne sintetše IFN γ i nije citotoksična. NK-22 ćelije ispoljavaju NKp44 NCR receptor, a slično Th17 T ćelijama i ROR γ transkripcioni faktor. Za razliku od ostalih NK ćelija za razvoj ove subpopulacije nije neophodan IL-15, već IL-7. Stimulacijom sa IL-23 koga proizvode dendritične ćelije mukoze digestivnog trakta, NK-22 ćelije sintetišu IL-22, IL-26 i LIF koji se svrstavaju u citokine Th17 familije, ali ne sintetišu IL-17. IL-22 deluje antiinflamatorno stimulišući sintezu IL-10 i štiti epitelijalnu barijeru gastrointestinalnog trakta kao i kože povećanjem nivoa antipoptotičkih molekula i baktericidnih proteina. Pokazano je da se u Th17 polarizujućim uslovima NK ćelije periferne krvi mogu diferencirati u NK-22 subpopulaciju (Cooper *et al.*, 2009).

Memorijske NK ćelije

Novija istraživanja su pokazala da NK ćelije mogu da imaju i karakteristike adaptivne imunosti i da mogu da ispoljavaju imunološku memoriju. Memorijska svojstva NK ćelija su prvobitno uočena kod miševa inficiranih CMV kod kojih je pokazano da Ly49H aktivacioni receptora iz grupe c-lektina pokazuje antigensku specifičnost za virusni protein m157, kao i da se Ly49H⁺ NK ćelije umnožavaju nakon infekcije i pokazuju povećanu citotoksičnu aktivnost i produkciju IFN γ pri ponovnom susretu sa antigenom. Memorijske NK ćelije su nakon virusnih infekcija opisane i kod ljudi pri čemu je ova subpopulacija po fenotipu NKG2C⁺ NK ćelije (Min-Oo *et al.*, 2013). Imunološka memorija je pokazana i kod NK ćelija miševa deficijentnih za T

ćelije u reakciji kontaktne preosetljivosti, pri čemu nakon ponovnog susreta sa haptenom koji je izazvao ovu reakciju NK ćelije ispoljavaju pojačanu citotoksičnost (Paust *et al.*, 2010). Smatra se da je ovo memorijsko svojstvo NK ćelija zavisno od ekspresije mišijih analoga inhibitronih KIR receptora (Ly49C) i MHC I zavisne edukacije NK ćelija, a pokazano je i da memorijske NK ćelije ispoljavaju CXCR6 hemokinski receptor koji dovodi do njihovog nakupljanja u jetri (Paust *et al.*, 2010). U novije vreme i kod NK ćelija aktiviranih sa inflamatornim citokinima IL-1, IL-12, IL-15 i IL-18 koje proizvode antigen prezentujuće ćelije, nakon ponovnih stimulacija pokazana je pojačana produkcija IFN γ kao i proliferacija NK ćelija koje ga proizvode, što takođe predstavlja vid imunološke memorije (Cooper *et al.*, 2009; Romee *et al.*, 2012; Min-Oo *et al.*, 2013).

1.6 Citokini značajni za razvoj i funkciju NK ćelija

Citokini su proteini koje sekretuje veliki broj ćelija kako nespecifične tako i specifične imunosti pod uticajem mikroorganizama i drugih antigena. Citokini vrše ulogu prenosioca međućelijskih signala i imaju važnu ulogu u razvoju, aktivaciji i regulaciji adaptivne i urođene imunosti. Kao pozitivni regulatori razvoja NK ćelija, njihove aktivacije, preživljavanja i efektorskih funkcija značajni su sledeći citokini: IL-2, IL-15, IL-18, IL-21 i IFN- α . U novije je proučavan efekat IL-23 i IL-27, citokina koji po strukturi i po svojim receptorima pripadaju IL-12 familiji, na aktivnost NK ćelija pri čemu su dobijeni kontroverzni rezultati. Efektorske funkcije NK ćelija su negativno regulisane imunosupresivnim citokinima TGF- β i IL-10 (Zwirner i Domaica, 2010).

1.6.1 Citokini γ c familije

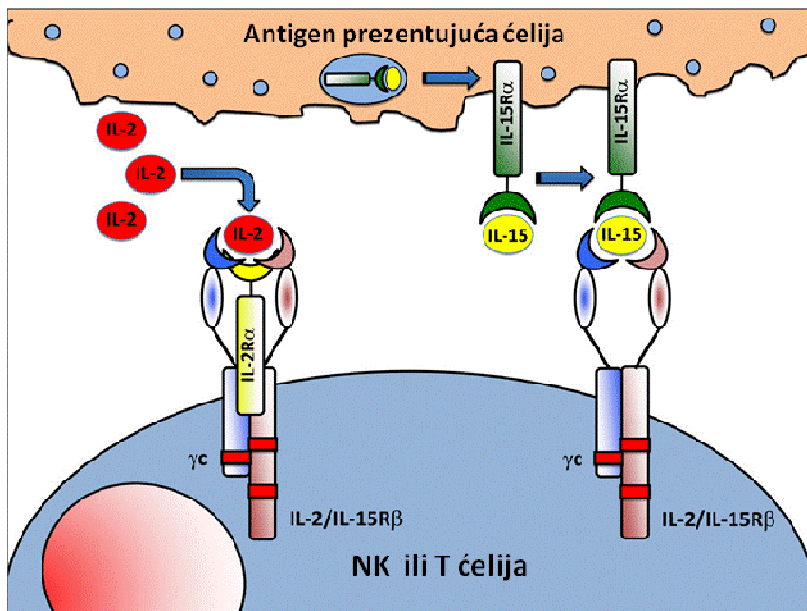
U citokine γ c familije ubrajaju se IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 i IL-21. Od ovih citokina za razvoj, sazrevanje i aktivaciju NK ćelija posebno su značajni IL-2 i IL-15. Strukturu ovih citokina čine 4 antiparalelna α heliksa. Receptori svih citokina ove familije sadrže istu γ c subjedinicu (CD132). Pored toga što mogu da deluju zajedno i regulišu imunski odgovor i održavaju homeostazu limfnog sistema, svaki od ovih citokina ima i svoja specifična biološka dejstva (Rochman *et al.*, 2009; Meazza *et al.*, 2011).

Za razliku od ostalih članova γ c familije, IL-2 i IL-15 mogu da se vežu visokim afinitetom za svoje receptore koji se sastoje od 3 subjedinice (lanca) α , β i γ . Ovi receptori se razlikuju u α subjedinici, pa tako IL-2 receptor (IL-2R) ima IL-2R α (CD25) a IL-15 receptor (IL-15R) IL-15R α , specifičnu α subjedinicu. Za razliku od α subjedinica koje su specifične za IL-2R i za IL-15R, IL-2/15 R β (CD122) i γ c subjedinice su zajedničke za IL-2R i IL-15R (Bamford *et al.*, 1994) (Slika 6).

Prenos signala sa IL-2R i IL-15R se odvija putem γ c subjedinice koja intereaguje sa JAK-3 (Ghoreschi *et al.*, 2009) kinazom koja fosforiliše specifične molekule aktivatore signalne transdukcije i transkripcije (engl. Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT) (O'Shea *et al.*, 2002). Prenos signala sa IL-2R i IL-15R vrši se najvećim delom posredstvom γ c subjedinice i posredovan je uglavnom STAT5 molekulom. Naime, kinaza JAK-3 fosforiliše specifičan tirozin u aminokiselinskom lancu receptora za citokin i formira mesto za vezivanje STAT monomera koji se vezuju za receptorski kompleks preko svojih SH2 domena. Fosforililisani STAT molekuli formiraju dimere koji odlaze u jedro i vezuju se za promotore gena čiju transkripciju regulišu. γ c lanac receptora i JAK-3 su neophodni za funkciju svih receptora γ c familije citokina, a mutacije u njihovim genima su pogubne za razvoj ćelija imunskog sistema i dovode do deficijencije T, B i NK ćelija kod miševa i ljudi (Gilmour *et al.*, 2001; Buckley, 2004). Pokazano je da γ c subjedinica receptora pored STAT5 molekula aktivira i Syk i Zap-70 tirozin kinaze kao i Ras/Raf/MEK/MAPK signalni put. IL-2/15R β subjedinica, pak, aktivira JAK-1 kinazu koja, pored STAT5 može da fosforiliše i da aktivira STAT3 i STAT1 signalne molekule, kao i Src familiju kinaza (Lck, Fyn i Lyn), Ras/Raf/MEK /MAPK i PI3K/Akt signalne puteve i da indukuje ekspresiju c-Fos, C-Jun, NF- κ B transkripcionih faktora (O'Shea *et al.*, 2002; Ghoreschi *et al.*; 2009, Jakobisiak *et al.*, 2011).

IL-2 i IL-15 ispoljavaju slična biološka dejstva s obzirom da oba citokina imaju zajedničke dve (IL-2R β i γ c) od ukupno 3 subjedinice receptora kao i da dele istu signalnu putanju. Oba citokina stimulišu proliferaciju, preživljavanje i funkciju NK ćelija i aktiviranih T i B ćelija. Ipak, svaki od ova dva citokina ispoljava svoja specifična dejstva koja su uslovljena njihovom sintezom u različitim tipovima ćelija,

različitom regulacijom sinteze, različitom rasprostranjenosti, a prvenstveno funkcionalno različitim IL-2R α i IL-15R α subjedinicama (Meazza *et al.*, 2011).



Slika 6. Receptori za IL-2 i IL-15. Vezivanje interleukina IL-2 za visokoafinitetni IL-2R $\alpha\beta\gamma$ receptor na ciljnoj ćeliji i vezivanje IL-15 *trans* prezentovanog na IL-15R α subjedinici antigen prezentujuće ćelije za IL-15R $\beta\gamma$ na ciljnoj NK ili T ćeliji (Steel *et al.*, 2012).

Pored interleukina IL-2 i IL-15 kao najvažnijih citokina γc familije, za razvoj i funkciju NK ćelija značajan je i IL-21 koji stimuliše preživljavanje i efektorske funkcije NK ćelija. IL-21 sintetišu CD4⁺ T ćelije u odgovoru na antigensku stimulaciju dendritičnih ćelija tokom adaptivnog imunskog odgovora. Naime, ovaj citokin nakon delovanja interleukina IL-12 i IL-15 koje proizvode dendritične ćelije stimuliše proliferaciju NK ćelija, sintezu IFN γ , ekspresiju preforina i granzima, a time i citotoksičnost NK ćelija. Pored toga IL-21 povećava ekspresiju CD16 receptora na NK ćelijama, a time i ADCC citotoksičnost. IL-21 takođe povećava ekspresiju NKG2D aktivacionog receptora, ali i nekih inhibitornih KIR receptora na NK ćelijama (Zwirner i Domaica, 2010).

IL-4, citokin γc familije koji je prvenstveno značajan u razvoju i funkciji Th2 T ćelija, na NK ćelije deluje tako što inhibira njihovu citotoksičnu funkciju, produkciju IFN γ i snižava ekspresiju NKG2D aktivacionog receptora. Pokazano je da IL-4

negativno utiče na interakciju NK ćelija sa dendritičnim ćelijama i inhibira Th1, a stimuliše tolerogeni Th2 odgovor. Za razliku od prethodno opisanih citokina γ_c familije koji uglavnom regulišu imunski odgovor, IL-7 ima važnu ulogu u održavanju homeostaze i u razvoju imunskog sistema. IL-7 reguliše razvoj NK ćelija u timusu i ima centralnu ulogu u razvoju NK-22 subpopulacije u krajnicima i limfoidnim tkivima mokože creva (Meazza *et al.*, 2011).

IL-2

IL-2 je prvi citokin iz γ_c familije koji je detaljno proučen. Otkriven je 1965. godine i opisan kao faktor rasta T ćelija da bi kasnije bila pokazana i ostala njegova svojstva (Kasakura i Lowenstein, 1965; Gordon i MacLean, 1965; Smith, 2006). Humani IL-2 je mali globularni protein mase 15.5 KD i sastoji se od 133 aminokiseline. Po svojoj strukturi IL-2 je tipičan tip I citokin. Sintetišu ga uglavnom T limfociti pri čemu su glavni izvor ovog citokina aktivirani $CD4^+$ T limfociti, a najviše Th1 limfociti nakon $CD4^+$ diferencijacije. Takođe, određenu, znatno manju količinu sekretuju i aktivirani $CD8^+$ limfociti, dok B limfociti i dendritične ćelije proizvode veoma male količine ovog interleukina (Liao *et al.*, 2013).

IL-2 deluje posredstvom receptora sačinjenog od 3 nekovalentno vezana lanca-subjedinice (α , β i γ). U zavisnosti od toga koje subjedinice ulaze u njegov sastav postoje tri vrste IL-2 receptora. α subjedinica (IL-2R α) najčešće nije prisutna na mirujućim T i NK ćelijama, već se može indukovati na T ćelijama stimulacijom TCR kao i na T i NK ćelijama stimulacijom samim interleukinom IL-2. IL-2R α subjedinica vezuje IL-2 veoma niskim afinitetom. Drugi receptorski kompleks koga čine β i γ subjedinice (IL-2R $\beta\gamma_c$) ima srednji afinitet vezivanja liganda i zastupljen je na malom procentu T ćelija i na većini NK ćelija periferne krvi (Tsuda *et al.*, 1987; Meazza *et al.*, 2011). Receptorski kompleks koji je sastavljen od sve tri subjedinice (IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$) vezuje IL-2 visokim afinitetom (Slika 6). Visoko afinitetni IL-2 receptori su prisutni uglavnom na aktiviranim T i na NK ćelijama imunoregulatorne $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulacije koje proliferišu i pri niskim, pikomolarnim, koncentracijama ovog citokina (Caligiuri *et al.*, 1990).

IL-2R α subjedinica, bez obzira na to što vezuje svoj ligand slabim afinitetom i ne učestvuje u prenosu signala sa receptora, neophodna je za formiranje visokoafinitetnog trimernog receptorskog kompleksa. Značajno je da se ekspresija IL-2R α (CD25) povećava na T ćelijama tokom aktivacije, ali i da ovu subjedinicu konstitutivno ispoljavaju sve imunosupresivne T regulatorne ćelije (Treg) (Itoh *et al.*, 1999) koje imaju ulogu u održavanju periferne tolerancije, a nepoželjno dejstvo u antitumorskom imunskom odgovoru (Malek *et al.*, 2010).

IL-2 ispoljava svoja biološka dejstva uglavnom kao slobodan molekul koji se vezuje za svoje receptore srednjeg i visokog afiniteta. Noviji podaci ukazuju da IL-2, slično kao i IL-15, može delovati putem *trans* prezentacije koja podrazumeva da IL-2 koji je vezan za IL-2R α i to najčešće na ćeliji koja ga sintetiše, se vezuje za IL-2R $\beta\gamma_c$ na susednoj ćeliji (Wuest *et al.*, 2011). Smatra se da IL-2 deluje putem *trans* prezentacije samo kada je prisutan u visokim koncentracijama. IL-2R α lanac, pored toga što je uglavnom prisutan na ćelijskoj membrani, u patološkim stanjima može da se „otkine“ sa membrane i da se nađe u slobodnoj formi kao što je pokazano u infekcijama, u transplantacijama pri odbacivanju kalema, u autoiminskim inflamatornim stanjima i u hematološkim malignitetima. IL-2R α lanac može da bude prisutan i na plazmacitoidnim dendritičnim ćelijama nakon stimulacije CD40 koreceptora, na mijeloidnim dendritičnim ćelijama nakon stimulacija pomoću TNF- α i prostaglandina E2 i na tumor asociiranim dendritičnim ćelijama. Dendritične ćelije na taj način mogu da vezuju IL-2 i time smanje nivo slobodnog interleukina IL-2 raspoloživog za proliferaciju T ćelija i tako deluju imunosupresivno. Pored toga pokazano je i da dendritične ćelije mogu da vezani IL-2 *trans* prezentuju susednim ćelijama i tako da deluje agonistički (Liu *et al.*, 2013).

Ekspresija svakog od tri lanca IL-2R je nezavisno regulisana. Ekspresija IL-2R α se može indukovati stimulacijom TCR, dejstvom citokina (IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, TNF- α , TGF- β) i stimulatorima protein kinaze C (Kim *et al.*, 2006). IL-2R β subjedinica je prisutna na: NK ćelijama, neaktiviranim T ćelijama, monocitima, neutrofilima, T ćelijama kako nakon stimulacije TCR tako i nakon stimulacija pomoću PMA i interleukina IL-2 i IL-4 (Kim *et al.*, 2006) i na populacijama hematopoetskih ćelija. Kao i IL-2R β , γ_c subjedinica je konstitutivno prisutna na većini limfocita i ostalih leukocita i

može da se poveća stimulacijama pomoću IL-2 i IFN- γ , dok TGF- β inhibira njegovu ekspresiju na monocitima (Liu *et al.*, 2013).

Nakon vezivanja IL-2 za receptor, kompleks receptor-ligand brzo ulazi u ćeliju, a nakon ulaska u ćeliju IL-2R α subjedinica recirkuliše i vraća se na površinu ćelije, dok IL-2R β i γc subjedinice podležu degradaciji. IL-2 može da dovode do aktivacije nekoliko signalnih puteva. U tom smislu, vezivanje ovog citokina za IL-2R $\beta\gamma c$ heterodimer aktivira JAK1 (posredstvom IL-2R β) i JAK3 (posredctvom γc). JAK kinaze aktiviraju jedna drugu i fosforilišu tirozin 338 u IL-2R β lancu receptora čime je omogućeno vezivanje Shc adaptorskog molekula što zatim dovodi do aktivacije Ras/Raf/MEK/MAPK signalnog puta, a time i do proliferacije i rasta ciljne ćelije. JAK1 kinaza fosforiliše tirozin na 392 i 510 mestu polipeptidnog lanca STAT1, STAT3, STAT5A i STAT5B signalnih molekula i aktivira ih, pri čemu je najviše i najduže aktiviran STAT5 molekul (Lin *et al.*, 2012). Fosforilisani STAT5A i STAT5B molekuli dimerizuju i odlaze u jedro gde se vezuju za promotore gena koji regulišu proliferaciju, diferencijaciju i efektorske funkcije T i NK ćelija. U tom smislu, IL-2 deluje uglavnom kao aktivator transkripcije s obzirom na to da više gena aktivira nego što suprimira. Osim toga što dimerizuju, STAT5 signalni molekuli preko svojih N-terminalnih domena mogu da formiraju tetramere i druge oligomere. Pokazano je da miševi čiji su STAT5 molekuli izmenjni tako da ne mogu da formiraju tertramere imaju smanjen broj CD8⁺ T i NK ćelija kao i poremećenu ekspresiju gena koje regulišu interleukini IL-2 i IL-15 (Lin *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2013).

IL-2 pokazuje veliki broj različitih biološki dejstava od kojih su najbrojnija njegova dejstva na T ćelije. U tim smislu, IL-2 dovodi do aktivacije, proliferacije i diferencijacije CD8⁺ limfocita i povećava njihovu citotoksičnost posredstvom povećanja sinteze perforina i granzima i stimuliše sekreciju IFN- γ (Pipkin *et al.*, 2012). IL-2 dovodi i do proliferacije mirujućih CD8⁺ T ćelija koje ispoljavaju IL-2 receptor srednjeg afiniteta i to svoje dejstvo ostvaruje posredstvom STAT5 tetramera (Lin *et al.*, 2012). Takođe, pored naivnih, IL-2 indukuje i proliferaciju memorijskih CD8⁺ limfocita.

IL-2 aktivira CD4⁺ T ćelije i dovodi do njihove proliferacije posredstvom c-myc i c-fos transkripcionih faktora kao i do oslobađanja citokina iz ovih ćelija. U tom smislu, u prisustvu IL-12, interleukina koji deluje preko STAT4 molekula i povećava ekspresiju

svog IL-12R β 2 receptora (Afkarian *et al.*, 2002), IL-2 posredstvom STAT5 molekula stimuliše sintezu IFN- γ i dovodi do Th1 diferencijacije. Pored toga i sam IL-2 povećava ekspresiju IL-12R β 2 receptora i time pojačava dejstvo interleukina IL-12 u smeru Th1 diferencijacije (Liao *et al.*, 2012).

Međutim, pokazano je i da IL-2 delujući posredstvom STAT5 molekula može da poveća ekspresiju IL-4R α receptora i samog IL-4 i na taj način stimuliše Th2 diferencijaciju CD4⁺ T ćelija. Ovakvo dejstvo pokazano je i za interleukine IL-7 i IL-15 koji pripadaju γ c familiji (Liao *et al.*, 2008). IL-2 deluje i na B ćelije i stimuliše njihovu proliferaciju kao i sintezu IgE antitela u B ćelijama (Waldmann, 2006).

IL-2 ima značajnu ulogu u održavanju homeostaze imunskog sistema time što stimuliše diferencijaciju i funkciju Treg, uvodi T ćelije u post-aktivacionu smrt apoptozom (Rafaeli *et al.*, 1998) povećavajući ekspresiju FasL na površini aktiviranih T limfocita i povećava ekspresiju citotoksičnog T limfocitnog antigena 4-CTLA4 (engl. Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) koji je antagonist kostimulatornog molekula CD28.

Osim dejstva na T ćelije, IL-2 stimuliše proliferaciju NK ćelija i pospešuje njihovu citotoksičnu tzv. "ubilačku", LAK funkciju (engl. Lymphokine Activated Killer). Pored toga, IL-2 sam ili u kombinaciji sa IL-12 i povećava sintezu i oslobađanje citokina IFN- γ , TNF- α i GM-CSF iz aktiviranih NK ćelija. Pokazano je da *in vitro* stimulacije interleukinom IL-2 dovode do povećanja ekspresije aktivacionog NKG2D receptora na NK ćelijama, a time i do povećanja NK ćelijske citotoksičnosti (Konjević *et al.*, 2009).

IL-15

IL-15 je otkriven 1994. godine od strane dve nezavisne laboratorije, nepune tri decenije nakon otkrića IL-2. Prvobitno je, kao i IL-2, opisan kao faktor rasta T limfocita (Burton *et al.*, 1994; Grabstein. *et al.*, 1994). Humani IL-15 je glikoprotein mase 14 do 15 KD, a po svojoj strukturi je takođe tip I citokin.

IL-15 sintetišu uglavnom antigen prezentujuće ćelije i to najviše dendritične ćelije, monociti, makrofagi, ali i stromalne ćelije kostne srži i sekundarnih limfnih

organa (Carson *et al.*, 1995; Jonuleit *et al.*, 1997; Lodolce *et al.*, 1998). iRNK za IL-15 je prisutna i u ćelijama mnogih tkiva fibroblastima, mišićnim ćelijama, keratinocitima, ćelijama bubrega (Jakobisiak *et al.*, 2011), a i u ćelijama tumora koje usled veoma složene regulacije translacije veoma retko sintetizuju funkcionalan IL-15 molekul (Meazza *et al.*, 1996; 2011).

Postoje dve forme IL-15 koje se razlikuju u dužini signalne sekvence peptida: sa dužom signalnom sekvencom LSP (engl. Long Signalling Peptide) i sa kraćom signalnom sekvencom SSP (engl. short signalling peptide). LPS forma IL-15 se izlučuje van ćelije, dok SSP forma (Tagaya *et al.*, 1997) ostaje u ćeliji i po principu negativne povratne sprege reguliše transkripciju *IL-15* gena (Nashimuri *et al.*, 2005).

IL-15 se u veoma niskoj koncentraciji (reda veličine 1 pg/ml) može naći u međućelijskom prostoru i vezati se za visoko-afinitetni IL-15 receptor. U fiziološkim uslovima najdominatnija forma ovog citokina u organizmu je IL-15 vezan za α lanac svog receptora na ćelijskoj membrani pri čemu formira IL-15/IL-15R α kompleks, koji zatim biva prepoznat posredstvom komplementarnih heterodimera $\beta\gamma$ lanaca receptora (IL-15R $\beta\gamma$ c) na ciljnoj ćeliji (Slika 6). Ovakav način biološkog dejstva IL-15 vezanog za membranu naziva se *trans* prezentacija. Značajno je da se IL-15, već u endoplazmatičnom retikulumu ćelije koja ga sintetizuje, vezuje za IL-15R α i nakon toga transportuje na površinu membrane i prezentuje ciljnim ćelijama. Značajno je i da ovaj kompleks može da recirkuliše što omogućava efikasnije dejstvo ovog citokina na susedne ciljne (NK ili T) ćelije (Dubois *et al.*, 2002). *Trans* prezentovani IL-15 stimuliše diferencijaciju i sazrevanje NK ćelija (Anderson *et al.*, 1995), a pokazano je da pored dendritičnih ćelija i monocita mogu da je vrše i stromalne i epitelijalne ćelije limfoidnih organa (Lucas *et al.*, 2005, Huntington *et al.*, 2009).

Delovanjem enzima MMP može doći do otkidanja IL-15R α lanca sa površine ćelije koji tada kao slobodan molekul može da deluje antagonistički i inhibira dejstvo ovog citokina u IL-15/IL-15R α kompleksu na susednim ćelijama (Mortier *et al.*, 2004). Pokazano je i da prisustvo solubilnog α lanca korelira sa progresijom tumora (Badoual *et al.*, 2008). Nasuprot ovom antagonističkom dejstvu, rekombinantni IL-15R α koji sadrži u svom vanćelijskom N terminalnom regionu modifikovan tzv. "suši" domen može da veže slobodan IL-15 izuzetno visokim afinitetom i da deluje kao veoma dobar

stimulator funkcije NK i T ćelija (Mortier *et al.*, 2006). U tom smislu, u terapijske svrhe se ispituje i primena solubilnih kompleksa interleukina IL-15 sa rekombinantnom IL-15R $\alpha\Delta$ formom koji vezuje IL-15 visokim afinitom i koji deluju kao „super-agonisti“ i pojačavaju efekat interleukina IL-15 na ćelije koje ispoljavaju komplementarni IL-15R $\beta\gamma$ heterodimer (Giron-Michel *et al.*, 2005).

Osim delovanja na susedne ćelije *trans* prezentacijom, IL-15 može da deluje na ćeliju koja ga sintetiše *cis* prezentacijom tj. vezivanjem IL-15/IL-15R α kompleksa za IL-15R $\beta\gamma$ heterodimer na istoj ćeliji (Olsen *et al.*, 2007). Smatra se da *cis* prezentovani IL-15 pored uloge u fiziološkim procesima može da učestvuje i u patogenezi limfoproliferativnog poremećaja krupnih granuliranih limfocita koji se odlikuje proliferacijom CD3⁻ i CD3⁺ neoplastičnih ćelija koje na svojoj površini imaju IL-15 vezan za IL-15R α (Zambello *et al.*, 1997). Smatra se da ovi maligni klonovi koji ispoljavaju IL-15R α i proliferišu pod dejstvom interleukina IL-15, mogu da za svoj IL-15R α vežu IL-15 iz spoljne sredine i putem *cis* prezentacije pospeše efekat ovog citokina (Meazza *et al.*, 2011).

Nakon vezivanja kompleksa IL-15/IL-15R α za dimer $\beta\gamma$ na ciljnoj ćeliji dolazi do aktivacije STAT signalnih molekula. Naime, β lanac aktivira JAK1, a γ lanac JAK3 kinazu koje dovode do aktivacije STAT3 i STAT5 signalnih molekula. β lanac takođe može da aktivira i Src familiju protein tirozin kinaza, Ras/Raf/MEK i PI3K signalne puteve, a γ lanac Syk/Zap70 familiju protein tirozin kinaza (Jakobisiak *et al.*, 2011).

Međutim, pokazano je da sam kompleks IL-15/IL-15R α može da deluje i recipročno tj. da aktivira procese u ćeliji koja ga ispoljava kao i da tom prilikom aktivira signalne putanje Rho familije (Rac) kinaza i MAPK signalnog puta, kao i da može da aktivira međućelijsku adheziju i sintezu interleukina IL-8 u monocitima (Neely *et al.*, 2004). Pored toga, pokazano je da *trans* prezentovan IL-15 može i da recipročnom signalnom putanjom dovede do diferencijacije hematopoetskih prekursora NK ćelija u necitotoksične zrele regulatorne NK ćelije (NKireg) koje ispoljavaju imunosupresivni molekul HLA-G. Pokazano je da se ova malobrojna subpopulacija NKp46⁺HLA-G⁺IL-10⁺ imunosupresivnih NK ćelija nalazi u tkivu placente (Giuliani *et al.*, 2008).

IL-15 ispoljava mnogobrojna slična dejstva kao i IL-2. Ima važnu ulogu u razvoju, održavanju homeostaze i funkcije CD8⁺ T, NK, i NKT ćelija (Kennedy *et al.*, 2000; Lodolce *et al.*, 1998; Waldmann, 2006). IL-15 idukuje proliferaciju naivnih CD8⁺ i memorijskih CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija. Pored toga pokazano je i da IL-15 svojim hemotaksičnim dejstvom utiče na migraciju T ćelija. Mada ne aktivira mirujuće B ćelije, IL-15 stimuliše proliferaciju aktiviranih B ćelija i zajedno sa CD40L stimuliše sekreciju Ig. Pored toga IL-15 deluje i na ćelije koje ga sintetišu, pa tako tako stimuliše proliferaciju, produkciju citokina, ekspresiju MHC II, C40 i CD86 kostimulatornih molekula i sazrevanje dendritičnih ćelija (Gil *et al.*, 2010). IL-15 aktivira monocite i makrofage, indukuje sintezu hemokina u monocitima i time pospešuje migraciju inflamatornih ćelija i eliminaciju bakterija i parazita (Musso *et al.*, 1998).

IL-15 ima posebno važnu ulogu u razvoju i sazrevanju NK ćelija. U tom smislu, kod transgenih miševa je pokazano da nedostatak samog interleukina IL-15 (Kennedy *et al.*, 2000), lanaca njegovih receptora IL-15R α (Lodolce *et al.*, 1998), IL-2/IL-15R β (Suzuki *et al.*, 1997), γ c (DiSanto *et al.*, 1997), molekula njegovog signalnog puta JAK-3 i STAT5 (Park *et al.*, 1995), dovode do gubitka NK ćelija ili do smanjenja njihovog broja. Kod ljudi nisu opisane mutacije koje dovode do deficijencije IL-15R α , dok mutacije u genima za JAK-3, kao i za IL2/IL-15R β i γ c subjedinice zajedničke za IL-2 i IL-15 receptore, onemogućavaju razviće NK ćelija ili dovode do smanjenja njihovog broja (Buckley, 2004). Pored toga što reguliše razvoj NK ćelija, IL-15 stimuliše i sintezu citotoksičnih medijatora perforina i granzima B, a time i NK ćelijsku citotoksičnu funkciju (Fehniger *et al.*, 2007).

Za razliku od IL-2 koji uvodi aktivirane T ćelije u apoptozu, IL-15 inhibira apoptozu ne samo T već i ostalih limfocitnih subpopulacija i granulocita povećavajući ekspresiju antiapoptoskih molekula (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1), a snižavajući ekspresiju apoptotskih molekula (Bax, Bad, Bid) Bcl-2 familije (Huntington *et al.*, 2007). IL-15 deluje antiapoptotski i stimulacijom aktivnosti NF- κ B i inhibicijom kaspaza -3 i -8 (Bouchard *et al.*, 2004).

Pored dejstva na ćelije imunskog sistema, IL-15 utiče i na druge tipove ćelija kao što su adipociti, miociti, endotelijalne i nervne ćelje. U tom smislu, IL-15 deluje

anabolički na mišićne ćelije kod kojih pospešuje sintezu kontraktilnih proteina i diferencijaciju, pospešuje angiogenezu i rast mikroglije (Budagian *et al.*, 2006).

S obzirom da stimuliše proliferaciju i sprečava apoptozu NK, T i B ćelija, IL-15 može da ima ulogu u patogenezi hematoloških maligniteta što je i pokazano kod T ćelijskih leukemija i limfoma, kod miševa (Sato *et al.*, 2011). Isto tako pokazano je da IL-15 može da utiče na preživljavanje malignih klonova i u tom smislu povećana ekspresija IL-15 u ćelijama akutne limfoblastne leukemije dovodi do lošijeg preživljavanja obolelih (Wu *et al.*, 2010). U novije vreme pokazano da membranski interleukin IL-15 u IL-15/IL-15R α kompleksu vezivanjem za slobodni IL-15R α lanac stimuliše epitelijalno-mezenhimsku tranziciju u patogenizi karcinoma bubrega (Khawam *et al.*, 2009). U tom smislu na ćelijama karcinoma bubrega, tokom maligne transformacije dolazi do gubitka γ lanca IL-15R i JAK3 kinaze kao i da može doći i do fuzionisanja α i β lanca IL-15R u $\alpha\beta$ dimer koji pri fiziološkim koncentracijama citokina IL-15 smanjuje ekspresiju E katherina i time stimuliše epitelijalno mezenhimsku tranziciju (Giron-Michel *et al.*, 2012).

1.6.2 Imunosupresivni citokini

Citotoksična aktivnost NK ćelija u fiziološkim uslovima regulisana tako da ne dođe do oštećenja zdravih tkiva u organizmu pri čemu centralnu ulogu u negativnoj regulaciji NK ćelija imaju citokini TGF- β i IL-10. Međutim, za razliku od fizioloških uslova ovi citokini inhibicijom efektorskih funkcija NK ćelija imaju nepoželjno dejstvo u tumorima.

TGF- β je familija pleiotropnih imunosupresivnih citokina koju čini nekoliko veoma sličnih formi (TGF- β 1, - β 2 i - β 3) koje ispoljavaju isto inhibitorno dejstvo na proliferaciju i aktivaciju limfocita i ostalih leukocita, a pored toga stimulišu i rast tumora. Najveći izvori TGF- β su Treg i mijeloidne supresivne ćelije (Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSC), a sintetišu ga i maligne ćelije. Najzastupljenija forma je TGF- β 1 koju sintetišu ćelije imunskog sistema. TGF- β deluje imunosupresivno na NK ćelije tako što inhibira njihovu proliferaciju, citotoksičnu funkciju, a takođe i sintezu IFN γ . TGF- β deluje na NK ćelije kada je vezan za membranu ćelija koje ga sintetišu i snižava ekspresiju NKp30 i NKG2D aktivacionih receptora, receptora za IFN α , CD25

(IL-2R α) (Flavell *et al.*, 2010). Ovaj citokin pored toga što direktno inhibira signalni put NKG2D receptora, snižava i nivo NKG2DL na tumorskim ćelijama (Allan *et al.*, 2010). Pored toga, sam TGF- β delujući zajedno sa IL-21 stimuliše diferencijaciju Treg, a samim tim i sopstvenu sintezu (Zwirner i Domaica, 2010).

IL-10 je tip II citokin značajan po svom antiinflamatornom dejstvu. Ovaj citokin ispoljava svoje imunosupresivno dejstvo delujući na aktivirane makrofage i dendritične ćelije. IL-10 produkuju maligne ćelije, tumor asocirani makrofagi (TAM), Treg, a pored njih i same NK ćelije kada je njihov inhibitorna forma NKp30c receptora stimulirana kontaktom sa nezrelom dendritičnom ćelijom (Delahaye *et al.*, 2012; Schiavoni *et al.*, 2013) i u hroninim inflamatornim stanjima pri bakterijskim i virusnim infekcijama (Vivier i Ugolini, 2009). IL-10 ne inhibira efektorske funkcije NK ćelija direktno, već putem inhibicije sinteze citokina IL-12, IL-15 i IL-18 u antigen prezentujućim ćelijama što u organizmu sprečava prekomernu aktivaciju NK ćelija i doprinosi održavanju njihove homeostaze (Zwirner i Domaica, 2010).

1.7 Melanom

Melanom je maligni tumor melanocita, pigmentnih ćelija koje vode poreklo od neuroektodermalnih ćelija neuralne kreste i tokom embrionalnog razvoja migriraju u bazalni sloj epidermisa. Melanom je i veoma agresivan tumor sa visokim metastatskim potencijalom usled visoke pokretljivosti ćelija od kojih melanocite vode embrionalno poreklo (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Melanom je prvenstveno tumor kože, ali se može naći i na očima, ušima, leptomeningeama, sluznicama gastrointestinalnog i genitourinarnog trakta. Bez obzira na zaštitnu ulogu koje melanocite imaju u koži u odnosu na ultravioletno (UV) zračenje, dosadašnje epidemiološke studije pokazuju da melanom kože predstavlja tumor kože sa najlošijom prognozom preživljavanja i da čini 75% svih umrlih od karcinoma kože (Garbe i Leiter, 2009).

Proces maligne transformacije normalnih melanocita je veoma složen i uključuje brojne mutacije u genima koji regulišu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu kao i mutageno dejstvo UV zračenja. Proces patogeneze melanoma je multifaktorijalan, a faktori rizika su pre svega, preterana izloženost sunčevim zracima naročito u mlađem životnom dobu, fenotipske karakteristike same osobe kao što je svetao ten, pozitivna

porodična anamneza za melanom i druge karcinome kože, kao i postojanje tzv. prekursorskih pigmentnih lezija kod same osobe. Postoji pet kliničkopatoloških tipova melanoma kože. Najčešća forma je površinsko šireći melanom koji čini oko 70% obolelih, a sledeći po učestalosti je nodularni melanom koji se odlučuje lošijom prognozom preživljavanja. Poseban oblik nodularnog tipa melanoma je amelanonični melanom koji je agresivniji i karakteriše ga odsustvo melanina. Treći tip melanoma po učestalosti (5 do 10%) je lentigo melanom i obično se javlja na regijama kože koje su izložene suncu kao što su lice i vrat i ima bolju prognozu lečenja. Akralni lentiginozni melanom je najređa forma melanoma a ujedno i jedini tip melanoma koji se javlja u pripadnika bele i u crne rase. Tipična lokalizacija ove forme melanoma su dlanovi, tabani i podnokatna regija. Mukozno lentiginozni melanom se javlja u svega oko 3% u odnosu na sve melanome pojavljujući se najčešće na epitelnim mukozama respiratornog, gastrointestinalnog i genitourinarnog trakta kao i na bilo kojoj mukoznoj površini uključujući i konjunktive i svrstava se u izuzetno agresivnu formu melanoma.

Debljina tumora je najznačajniji klinički prognostički faktor kod bolesnika sa primarnim melanomom kože. U tom smislu, kod melanoma kože na osnovu histopatološke analize određuju se klinički parametri koji opisuju invazivnost tumora: Clark klinički parametar koji ukazuje na nivo anatomsko-histološke invazije tumora u slojeve kože (epidermis, dermis, i subcutis) (Clark *et al.*, 1969) i Breslow klinički parametar koji je uveden godinu dana kasnije i označava debljinu primarnog tumora u mm (Breslow, 1970). Pored kliničkih parametara koji opisuju debljinu tumora epidemiološka istraživanja su ukazala i na značaj lokalizacije primarnog tumora za prognozu toka bolesti.

Prema TNM (engl. Tumor-Node-Metastasis) sistemu klasifikacije koji se najviše primenjuje u svetu, a koji je 2002. godine ustanovilo Američko udruženje za rak-AJCC (engl. American Joint Committee on Cancer Staging) kod melanoma su ustanovljena IV klinička stadijuma. Prema ovom sistemu prognoza melanoma prvenstveno zavisi od debljine primarnog tumora. Debljina tumora do 1mm označava I, a preko toga II klinički stadijum, dok metastaze u regionalnim limfnim čvorovima označavaju III a udaljene metastaze IV klinički stadijum. Kada se govori o primarnom melanomu veoma značajni negativni prognostički faktori su visok mitotski indeks, nepostojanje tumor

infiltrirajućih limfocita-TIL (engl. Tumor-Infiltrating Lymphocytes), postojanje patološke regresije tumora, ulceracija primarne lezije, lokalizacija primarne lezije na glavi, vratu ili leđima kao i muški pol (Garbe i Leiter, 2009).

Ispitivanja iz oblasti molekularne onkologije pokazala su značajnu ulogu prekomerne aktivacije Ras/Raf/MEK/MAPK signalnog puta u procesu maligne transformacije melanocita. Ovaj signalni put se aktivira pod uticajem faktora rasta posredstvom receptorskih tirozin kinaza i stimuliše proliferaciju i preživljavanje ćelija, a konstitutivno je aktivan kod oko 90% malenoma. Dva najčešća načina aktivacije MAPK signalnog puta u melanomu su mutacije u *B-Raf* genu (40% do 60%) i *N-Ras* onkogenu (15% do 30% tumora) (Chapman *et al.*, 2011). Ova saznanja našla su svoju terapijsku primenu, te se u lečenju bolesnika sa *B-Raf* mutacijom uspešno primenjuje B-Raf inhibitor sorafenib. S obzirom na to da može doći do pojave rezistencije na B-Raf inhibitor u novije vreme uz ovaj inhibitor se primenjuju i molekularni terapeutici koji inhibiraju nizvodne komponente MAPK signalnog puta od kojih je MEK inhibitor pokazao dobar terapijski efekat (Cifola *et al.*, 2013). U ćelijama melanoma takođe može doći i do konstitutivne aktivacije PI3K/Akt/mTOR signaling puta u kome su najčešće mutirani Akt kinaza i mTOR serin/treonin kinaza koji fosforilacijom brojnih supstrata stimulišu proliferaciju, preživljavanje i metastaziranje. Osim navedenih mutacija u 30% do 60% melanoma je nađena delecija *PTEN* tumor supresora, specifične fosfataze koja defosforilacijom PIP3 poništava dejstvo PI3K (Monzon i Dancey, 2012). U ćelijama melanoma nađene su i aktivacione mutacije u genima za receptor faktora rasta c-Kit (CD117) i u genu za ciklin zavisnu kinazu 4 (CDK4) koje koegzistiraju sa mutacijama u genu za MEK kinazu MAPK signalnog puta (Posch i Ortiz-Urda, 2013).

1.7.1 Melanom i imunski odgovor

Postoji više svojstava melanoma na osnovu kojih se on može smatrati imunogeničnim tumorom. Identifikovani su brojni melanoma specifični antigeni (Barrow *et al.*, 2006), a pokazani su i slučajevi spontane regresije ovog tumora (Kalialis *et al.*, 2009). Na imunogeničnost melanoma ukazuje i postojanje TIL u tumorskom tkivu što predstavlja pozitivan prognostički faktor kod obolelih od melanoma (Cipponi *et al.*, 2011). Pored toga, u melanomskom tumorskom tkivu prisutne su i brojne tumor

infiltrirajuće dendritične ćelije koje su najčešće mijeloidnog, a ređe plazmacitoidnog tipa i koje prezentuju tumorske antigene naivnim T limfocitima (Gerlini *et al.*, 2013; Schiavoni *et al.*, 2013). U uznapredovalim stadijumima bolesti nađena i visoka zastupljenost memorijskih CD8⁺ cirkulišućih T limfocita specifičnih za Melan-A/MART-1, MAGE-10 i NY-ESO-12 melanomske antigene (Fuertes *et al.*, 2011). S obzirom na imunogenična svojstva melanoma ispitivana je primena različitih imunoterapijskih pristupa zasnovanih na antigen-specifičnoj, kao i na nespecifičnoj imunostimulaciji i na adoptivnom transferu T ćelija aktiviranih melanoma specifičnim antigenima (Umansky i Sevko, 2012).

Međutim, u melanomu dolazi i do imunosupresije koja je uslovljena različitim mehanizmima koji obuhvataju kako promene na ćelijama tumora tako i promene u stromalnim ćelijama. Pokazano je da na ćelijama melanoma dolazi do gubitka kostimulatornih molekula kao što su molekuli B7 familije, smanjenja ekspresije tumorskih antigena, MHC molekula klase I i liganda za aktivacione NK ćelijske receptore, a pored toga u ćelijama melanoma je pokazana i intenzivna sekrecija imunosupresivnih molekula kao što su TGF- β i IL-10, angiogenog faktora (engl. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), biološki aktivnih molekula kao što su azot oksid (NO), ROS i prostaglandina E2 (PGE2) (Umansky i Sevko, 2012). Mada su hemokini prvobitno opisani kao faktori koji utiču prvenstveno na migraciju limfocita, pokazano je da mogu da regulišu rast tumora, angiogenezu, metastaziranje i migraciju ćelija u tumorskom okruženju, a pored toga i da mogu da ih sintetišu ćelije tumora (Telmadge, 2011). U tom smislu, pokazano je i da ćelije melanoma sintetišu brojne β (CCL2, CCL5) i α (CXCL1-3,5-8, 10) hemokine (Richmond i Yang, 2009). Isto tako, ćelije melanoma ovime mogu da stimulišu sintezu hemokina (CCL2, CXCL8 i CXCL12), TGF- β i inflamatornih citokina (IL-1, IL-6, IL-8) u okolnim fibroblastima i stromalnim ćelijama koje zatim stimulišu sintezu hemokina u ćelijama tumora što rezultuje autorkilnom stimulacijom rasta tumora (Umansky i Sevko, 2012). Naime, Ras/Raf signalni put koji je veoma često konstitutivno aktiviran u ćelijama melanoma, posredstvom NF- κ B transkripcionog faktora indukuje produkciju hemokina i drugih proinflamatornih medijatora kao što su TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, ciklooksigenaze, kao i produkciju MMP i VEGF i da na taj način stimuliše progresiju tumora. Prisustvo ovih faktora u tumorskom tkivu dovodi do nakupljanja imunosupresivnih ćelija kao što su

MDSC, Treg, tumor asocirani makrofagi (TAM), N2 polarizovani neutrofil i regulatorne/tolerogene dendritične ćelije (Gabrilovich i Nagaraj, 2009; Umansky i Sveko, 2012). MDSC proizvode NO, imaju pojačanu aktivnost arginaze i time inhibiraju funkciju T ćelija i uvode ih u apoptozu, a posredstvom sinteze IL-10 i TGF- β aktiviraju Treg dok je sinteza IL-12 u dendritičnim ćelijama snižena i time suprimirana aktivnost T i NK ćelija (Umansky, 2012; 2013). U uznapredovalim kliničkim stadijumima melanoma u perifernoj krvi kao i u tumor-infiltriranim limfnim čvorovima obolelih pokazan je da povećan nivo TGF- β i IL-10 dovodi do povećanja ekspresije inhibitornih molekula na T, a ređe i na NK ćelijama (Kubica i Brewer, 2012). Na T ćelijama bolesnika sa melanomom pokazana je povećana ekspresija citotoksičnog T limfocitnog antigena-4 (CTLA-4) svojstvenog funkcionalno iscrpljenim T ćelijama koji inhibitora njihovu funkciju sprečavajući vezivanje CD28 molekula za B7 kostimulatorne molekule na antigen prezentujućim ćelijama kao i aktivaciju TCR-a. Primena monoklonskog antitela koje sprečava interakciju CTLA-4 sa B7 sprečava ovaj negativni signal i indukuje antitumorski imunski odgovor. Promena IgG1 monoklonskog anti-CTLA-4 antitela (ipilimumab) je pokazala dobar terapijski efekat kod metastatskog melanoma. Najnoviji podaci ukazuju da CTLA-4 antigen može biti ispoljen i na ćelijskim linijama melanoma. U tom smislu, primena anti-CTLA-4 antitela čiji Fc fragment stimulira ADCC citotoksičnost NK ćelija doprinosi uništavanju ovih malignih ćelija (Laurent *et al.*, 2013). Na tumor infiltrirajućim i cirkulišućim antigen specifičnim T ćelijama, a ređe i na NK ćelijama, kod melanoma je pokazana i povećana ekspresija imunisupresivnog PD-1 molekula koji vezivanjem za PD-1 ligand dovodi do apoptoze ovih ćelija. Ovo saznanje je doprinelo uvođenju blokirajućeg anti-PD-1 antitela u imunoterapiju melanoma (Lipson, 2013). Na T ćelijama bolesnika sa melanomom je pokazana i povećana ekspresija i T ćelijskog Ig mucina 3 (TIM3) inhibitornog molekula koji u fiziološkim uslovima terminalno diferencirane Th1 CD4⁺ i CD8⁺ T ćelije vezivanjem e za galektin-9 uvodi T ćelije u apoptozu (Sakuishi *et al.*, 2013).

Za imunost u melanomu posebno su značajne NK ćelije kako zbog toga što mogu da direktno unište tumorske ćelije putem citotoksičnosti i proizvode citokine, tako i zbog njihove sposobnosti da ubijaju tolerogene dendritične ćelije (engl. DC editing) (Morrandi *et al.*, 2012). Citotoksična aktivnost NK ćelija perifernoj krvi ispitivana je kod

mnogih maligniteta, a kod melanoma je pokazano njeno smanjenje u uznapredovalim kliničkim stadijumima (Sibbitt *et al.*, 1984; Seidel *et al.*, 1998; Konjevic *et al.*, 2007; 2009). Uz smanjenu citotoksičnu aktivnost kod bolesnika sa metastatskim melanomom, pokazana je i smanjena produkcija IFN γ u NK ćelijama u odnosu na zdrave kontrolne osobe (Konjević *et al.*, 2007; 2009). U perifernoj krvi bolesnika sa metastatskim melanomom pokazana je veća zastupljenost nezrele CD56^{sjajno+}, a smanjenje zrele citotoksične CD56^{potmuo+} subpopulacije NK ćelija u odnosu na perifernu krv zdravih osoba (Konjević *et al.*, 2009). Pokazana je važna uloga ekspresije NKG2D, CD16, DNAM-1, NKp46, NKp30 aktivacionih receptora na NK ćelijama u antitumorskoj imunosti (Levy *et al.*, 2011), a smanjenje ekspresije NKG2D aktivacionog receptora kod obolelih od metastatskog melanoma korelisano je sa njihovom sniženom citotoksičnošću (Konjević *et al.*, 2010). Takođe je u eksperimentalnim uslovima na miševima pokazano da imunosupresivni molekuli koji su prisutni u tumorskoj mikrosredini (TGF- β , indoleamin 2,3-dioksigenaza i PGE2) dovode do smanjenja nivoa aktivacionih NK ćelijskih receptora NKp30, NKp44, i NKG2D kao i do snižene citotoksične funkcije NK ćelija (Pietra *et al.*, 2012).

Pored toga što ćelije melanoma modifikuju funkciju i fenotip NK ćelija pokazano da NK ćelije kultivisane sa ćelijama melanoma produkcijom IFN γ dovode do povećanja ekspresije MHC molekula kalse I (Balsamo *et al.*, 2012) kao i do sniženja nivoa NKG2DL (Schwinn *et al.*, 2009) na ćelijama tumora, što doprinosi stvaranju NK-rezistentnog fenotipa timora. Pokazano je da IFN γ povećanjem sinteze PGE2 suprimira NK ćelijsku citotoksičnost tako što snižava ekspresiju aktivacionih NKG2D i NCR receptora te predstavlja loš prognostički parametar kod obolesnika sa malignitetima. Kao još jedno imunosupresivno dejstvo ne samo IFN γ , već i ostalih medijatora koje sintetišu NK ćelije (GM-CSF i IL-10), javlja se i povećavanje nivoa imunosupresivnog HLA-G molekula na malignim ćelijama. Naime, HLA-G, neklasični MHC I molekul, svojim vezivanjem za inhibitorni ILT-2 receptor iz grupe LIR receptora na NK ćelijama povećava prag aktivacije NK ćelija, a pored toga može da uvede NK ćeliju u apoptozu (Stojanović *et al.*, 2012). Pored toga, HLA-G molekul može da sa membrane antigen prezentujuće ćelije pređe na NK ćeliju stvarajući na taj način HLA-G⁺ NK ćeliju sa regulatornom funkcijom (Rouas-Freiss *et al.*, 2007).

1.7.2 Terapija melanoma

Pored hirurške terapije koja predstavlja osnovni vid lečenja melanoma, kod metastatskih melanoma i kod obolelih sa visokim rizikom za pojavu metastaza primenjuje se i adjuvantna terapija.

Melanom je maligni tumor neosetljiv na zračenje i slabo osetljiv na hemioterapiju usled niskog stepena kako spontane apoptoze tako i apoptoze indukovane dejstvom hemioterapijskih agenasa maligno transformisanih melanocita (Gray-Shopfer *et al.*, 2007). Kao zvanični hemioterapeutik u lečenju metastatskog melanoma koji je prihvaćen od strane Američke administracije za hranu i lekove-FDA (engl. the Food and Drug Administration), je alkilirajući agens dakarbazin (DTIC). Međutim, pokazani klinički odgovor ovog hemioterapijika je manji od 10% (Monzon i Dancey, 2012). Osim hemioterapije, kako uz hemioterapiju tako i samostalno se primenjuje i nespecifična imunoterapija citokinima kao i specifična imunoterapija terapijskim vakcinama. Postoji i relativno nov podatak da hemioterapeutik DTIC povećava ekspresiju NKG2DL na ćelijama melanoma (Hervieu *et al.*, 2012) što doprinosi boljem terapijskom efektu pri istovremenoj primeni ovog hemioterapeutika i citokina koji stimulišu ekspresiju NKG2D aktivacionog receptora na NK i T ćelijama.

U imunoterapiji melanoma se kod visoko-rizičnih bolesnika u visokim dozama primenjuje IFN- α , a pokazan je i povoljan efekat ovog citokina na citotoksičnu aktivnost NK ćelija (Konjević *et al.* 2007, Jiang *et al.*, 2013). U lečenju bolesnika sa metastatskim melanomom kao zvanični terapeutik, prihvaćen od strane FDA, se primenjuje IL-2 u visokim dozama. Dugogodišnja primena ovog citokina pokazala relativno nizak klinički odgovor od 16% kao i da kod 6% bolesnika dovodi do kompletne ili dugotrajne remisije (Monzon i Dancey, 2012). Međutim, ozbiljan problem u primeni ove terapije predstavlja velika toksičnost interleukina IL-2. Iz tog razloga se danas u mnogim prekliničkim i kliničkim studijama IL-2 u nižim dozama kombinuje sa drugim citokinima (IFN- α , IL-12, IL-18), monoklonskim antitelima, pepetidnim vakcinama. Pored IL-2 i mnogi citokini novije generacije (IL-12, IL-15 i IL-18) se još uvek ispituju kako samostalno tako i u kombinacijama (IL-12 i IL-15; IL-12 i IL-18) (Capitini *et al.*, 2009; Fewkes i Mackall, 2010).

Kliničkom primenom rekombinantnog humanog IL-2 (rhIL-2), kako samostalnog tako i sa LAK ćelijama, pokazano je da aktivacijom imunskog sistema može doći do smanjenja tumora čak i kod uznapredovale bolesti (Atkins *et al.*, 1999). U tom smislu, IL-2 predstavlja prekretnicu u imunoterapiji malignih bolesti i više od dve decenije se primenjuje u lečenju metastatskog melanoma i karcinoma bubrega. Poželjno terapijsko dejstvo ovog citokina kod tumora zasniva se na povećanju citotoksične funkcije NK i CD8⁺ T ćelija, povećanju proliferacije memorijskih CD8⁺ i proliferacije i aktivacije CD4⁺ T ćelija. IL-2 dovodi i do proliferacije imunoregulatorne CD56^{sjajno+} subpopulacije NK ćelija koja ispoljava visokoafinitetni trimerni receptor IL2R $\alpha\beta\gamma$ i odgovorna je za sintezu citokina TNF- α i IFN γ . Kao nepoželjno dejstvo interleukina IL-2, pored visoke sistemske toksičnosti, je i povećanje broja imunosupresivnih Treg (Atkins *et al.*, 1999). Istraživanja u oblasti imunoterapije tumora razvijala su se u smeru ipitivanja dejstava novih rekombinantnih citokina koji bi se pokazali što bolje antitumorsko dejstvo, a što manje neželjenih dejstava na sisteme organa i što nižu toksičnost (Capitini *et al.*, 2009; Fewkes i Mackall, 2010).

S obzirom da za razliku od IL-2, IL-15 ne stimuliše Treg i s obzirom na njegovu nižu sistemsku toksičnost u odnosu na IL-2 pokazanu na mišijim modelima (Munger *et al.*, 1995, Meazza *et al.*, 2011), IL-15 se smatra dobrim potencijalnim kandidatom za primenu u terapiji ne samo melanoma već malignih tumora uopšte. IL-15 aktivira brojne antitumorske mehanizme od kojih je najvažnija citotoksična aktivnost CD8⁺ T i NK ćelija, a stimuliše i diferencijaciju, proliferaciju i preživljavanje ovih ćelija. Pored toga IL-15 ima ulogu i u održavanju homeostaze plazmacitoidnih dendritičnih ćelija koje proizvode IFN tipa I i na taj način stimulišu antitumorsku citotoksičnost NK ćelija. Antitumorski efekat IL-15 se ispoljava i kroz stimulaciju produkcije TNF- α i IFN γ (Avice *et al.*, 1998; Comes *et al.*, 2002; Jakobisiak *et al.*, 2011). Pokazano je da transfekcija IL-15 u trajne tumorske ćelijske linije smanjuje sposobnost ovih ćelija da generišu tumore u eksperimentalnim životinjama (Meazza *et al.*, 2000).

Najveći biološki efekat u organizmu IL-15 ostvaruje kada je vezan za α lanac IL-15R na dendritičnim ćelijama pa se stoga u toj formi ispituje i terapijska primena ovog citokina. U tom smislu je kod melanoma na eksperimentalnim modelima pokazan izražen antitumorski efekat IL-15/IL-15R α kompleksa u formi kada je konjugovan sa

IgG1 antitelom koje svojim Fc fragmentom stimuliše ADCC aktivnost NK ćelija, a time dovodi i do efikasnijeg uništavanja malignih ćelija (Epardaud *et al.*, 2008; Bessard *et al.*, 2009). Da bi se postigao veći afinitet vezivanja IL-15 za IL-15R $\beta\gamma$ subjedinicu receptora na ciljnoj ćeliji, a time i bolji biološki efekat ispitivane su i forme IL-15 različitih aminokiselinskih sekvenci. U tom smislu, veći afinitet vezivanja IL-15 za IL-15R $\beta\gamma$ subjedinicu na ciljnoj ćeliji postignut je zamenom asparagina na 72 poziciji u polipeptidnom lancu IL-15 čime se biološka aktivnost IL-15 petostruko povećava (Zhu *et al.*, 2009).

In vivo ispitivanja vršena na primatima pokazala su da IL-15 dovodi do povećanja procenta tumorocidnih NK i CD8⁺ T ćelija (Lugli *et al.*, 2010), dok se primena ovog citokina na bolesnicima sa metastatskim melanomom i karcinomom bubrega još uvek ispituje. U kliničkim studijama poslednjih godina ispituje se primena IL-15 kod pedijatrijskih sarkoma kako samostalno, tako i kao stimulatora TIL ćelija koje se nakon *in vitro* aktivacije ovim citokinom primenjuju u terapiji (Meazza *et al.*, 2011; Steel *et al.*, 2012). Pored toga, ispitivana je primena IL-15 kod melanoma kao dodatka imunoterapijskim vakcinama sa dendritičnim ćelijama s obzirom na njegovo svojstvo da stimuliše ekspresiju MHC molekula klase II, CD40 i CD86 kostimulatornih molekula na dendritičnim ćelijama (Steel *et al.*, 2012).

Terapijska primena IL-15 ispitivana je i u kombinaciji sa drugim citokinima. U tom smislu, IL-15 primenjen istovremeno sa IL-21 se pokazao kao dobar *in vitro* stimulator citotoksičnosti i produkcije IFN γ u TIL obolelih od melanoma (Huarte *et al.*, 2009), a njegovom *in vivo* primenom istovremenom sa IL-12 na mišijim modelima melanoma takođe je dobijeno povećanje NK ćelijske citotoksičnosti i produkcije IFN γ (Jakobisiak *et al.*, 2011).

IL-15 ispoljava i neželjena dejstva koja mogu da budu uzrokovana povećanom sintezom proinflamatornih hemokina i citokina kao što su TNF- α , IL-1, IL-6 i GM-CSF, a isto tako i aktivacijom auto-reaktivnih T ćelija koja dovodi do autoimunskih reakcija. Smatra se da autoimunskom dejstvu IL-15 doprinosi i njegov antiapoptotski efekat s obzirom na to da apoptoza može biti jedan od perifernih mehanizama sprečavanja autoimunosti (Jakobisiak *et al.*, 2011).

Primena adoptivnog transfera NK ćelija u terapiji se sve intenzivnije ispituje kako kod hematoloških tako i kod solidnih maligniteta. Kod hematoloških maligniteta, a posebno kod akutne mijeloine leukemije i mijelodisplastičnog sindroma, adoptivni transfer NK ćelija donora različitih MHC molekulima klase I u odnosu na primaoca se pokazao veoma uspešnim (Giebel *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2005). U ovakvim uslovima, koji se označavaju kao "KIR mismatch" transplantacija, pospešena je eliminacija malignih klonova usled nepodudarnosti MHC I liganda na ćelijama tumora primaoca i inhibitornog KIR-a na NK ćelijama donora. Ovakav vid adoptivnog transfera NK ćelija je ispitivan i kod melanoma u *in vitro* pretkliničkim ispitivanjima, pri čemu je primena alogeničkih NK ćelija *in vitro* stimulisanih interleukinom IL-2 takođe pokazala veću citotoksičnost prema ćelijama melanoma u uslovima kada se MHC I profil donora ne podudara sa MHC I profilom tumora (Besser *et al.*, 2013). Međutim, za sada kod melanoma klinička primena autolognih NK ćelija koje su u *in vitro* uslovima stimulisane sa IL-2 nije dovela do poželjnog terapijskog ishoda (Parkhurst *et al.*, 2011).

Radi poboljšanja citotoksičnog dejstva NK ćelija prema tumoru u adoptivnom transferu NK ćelija korišćene su NK ćelije donora koje ispoljavaju aktivacione receptore za ligande na ćelijama tumora (Markel *et al.*, 2009). U ciljanoj terapiji malignih tumora sve više primenjuju blokirajuća monoklonska antitela kao što su anti-HER-2 kod karcinoma dojke, anti-EGFR kod karcinoma kolona i anti-CD19 kod Hodgkin limfoma koja svojim Fc fragmentom vezivanjem za CD16 receptor na NK ćelijama stimulišu ADCC aktivnost (Siedel *et al.*, 2013). U tom smislu je u *in vitro* uslovima kod melanoma ispitivano antitelo za GD3 melanomski antigen pri čemu je takođe došlo do povećanja ADCC aktivnosti NK ćelija i postignuto antitumorsko dejstvo (Besser *et al.*, 2013).

Primena blokirajućih antitela u imunoterapiji melanoma predstavlja jedan relativno nov pristup u lečenju. Pored CTLA-4 i PD-1 blokirajućih antitela koja se od skoro primenjuju u terapiji melanoma u kliničkim studijama se ispituje i primena anti-KIR i anti-TGF- β antitela (Vahlne *et al.*, 2010; Mellero *et al.*, 2013). U preliminarnim pretkliničkim ispitivanjima dobre rezultate je pokazala primena humanizovanog mišijeg blokirajućeg antitela koje prepoznaje grupu KIR2DL1/L2/L3 inhibitornih KIR receptora koji su prisutni na više od polovine NK ćelija. Primena ovog antitela sprečava inhibiciju

NK ćelijske funkcije do koje bi došlo prepoznavanjem bilo kog HLA-C alela. Iz tih razloga se ovo antitelo može primenjivati bez obzira na KIR i HLA genotip bolesnika (Vahne *et al.*, 2010; Thielenes *et al.*, 2012). Sprečavajući dejstvo inhibitornih KIR receptora ovo antitelo povećava citotoksičnost NK ćelija prema tumorima koji ispoljavaju ligande za aktivacione receptore, a pored toga sprečava i autoimunske reakcije u odnosu na „zdrave“ ćelije koje ne ispoljavaju ligande za aktivacione receptore. Pored toga, pokazano je da više-nedeljna primena ovog antitela na miševima nije narušila NK-citotoksičnost te se stoga smatra da nije time ometena edukacija NK ćelija (Vivier *et al.*, 2012).

U dosadašnjim ispitivanjima samo kod hematoloških maligniteta je pokazan poželjan terapijski efekat NK ćelija koje su aktivirane prethodno već pomenutim citokinima u *in vitro* uslovima. *In vitro* aktivacija NK ćelija radi njihove primene u terapiji solidnih tumora, pa i melanoma se još uvek ispituje. Poznato je da IL-2, citokin koji stimuliše citotoksičnu aktivnost NK ćelija i zvanično se primenjuje u terapiji melanoma i IL-15, citokin novije generacije, povećavaju antitumorsku citotoksičnost NK ćelija ali njihov efekat na do sada slabo ispitvanu populaciju NK ćelija regionalnih limfnih čvorova nije ispitivan. S obzirom na značaj regionalnih limfnih čvorova u sprečavanju limfogenog širenja tumora i formiranja metastaza u visceralnim organima, povećanje citotoksične funkcije ovih NK ćelija može biti od značaja za potencijalno terapijsko tretiranje tumora.

2 Ciljevi rada

Regionalni limfni čvorovi predstavljaju prvu barijeru u limfogenom širenju tumora. NK ćelije kao nosioci urođene antitumorske imunosti su do sada u malignitetima najviše proučavane u perifernoj cirkulaciji i u tumorskom tkivu, a manje u regionalnim limfnim čvorovima. Uvidom u funkcionalna i imunofenotipska svojstva NK ćelija regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom i njihovim poređenjem između neinfiltrisanih i tumor-infiltrisanih regionalnih limfnih čvorova mogu da se dobiju novi podaci o uticaju tumorskog okruženja na ova svojstva NK ćelija.

Cilj ovog istraživanja je stoga da se na sveže izolovanim mononuklearnim ćelijama neinfiltrisanih i tumor-infiltrisanih regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom ispituju i uporede:

1. funkcionalna svojstva NK ćelija: citotoksična aktivnost i intraćelijska produkcija IFN γ
2. zastupljenost CD3 $^+$ CD56 $^+$ NK ćelija, kao i CD3 $^+$ CD56 $^{\text{potmulo}^+}$ i CD3 $^+$ CD56 $^{\text{sjajno}^+}$ NK ćelijskih subpopulacija
3. ekspresija aktivacionih (NKG2D i CD16) i inhibitornih KIR (CD158a i CD158b) receptora, aktivacionih antigena (CD25, CD69, HLA-DR) na NK ćelijama i u njihovim subpopulacijama

Drugi cilj ovog istraživanja je da ispita efekat IL-2, citokina γ c familije koji stimuliše citotoksičnu aktivnost NK ćelija i već dve decenije se primenjuje u terapiji metastatskog melanoma i IL-15, takođe citokina γ c familije koji je neophodan za razvoj i sazrevanje NK ćelija, na citotoksičnu funkciju i fenotip NK ćelija regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom. U tom smislu ciljevi ovog rada su da se nakon *in vitro* tretmana citokinima IL-2 i IL-15 kod neinfiltrisanih i tumor-infiltrisanih regionalnih limfnih čvorova ispituju:

1. citotoksična aktivnost NK ćelija i procenat NK ćelija i njihovih CD3 $^+$ CD56 $^{\text{potmulo}^+}$ i CD3 $^+$ CD56 $^{\text{sjajno}^+}$ subpopulacija.
2. transkripcija i nivo sintetisanog citotoksičnog medijatora perforina

3. nivo fosforilisanih i aktiviranih STAT1 i STAT5 molekula uključenih u signalne putanje ovih citokina
4. ekspresija aktivacionih (NKG2D i CD16) i inhibitornih (CD158a i CD158b) KIR receptora i CD69 aktivacionog antigena na NK ćelijama i u njihovim subpopulacijma neinfiltrisanih i tumor-infiltrisanih limfnih čvorova

3 Materijal i metode

3.1 Pacijenti i klasifikacija

U ovom istraživanju korišćen je materijal regionalnih limfnih čvorova odstranjenih u cilju hirurškog lečenja 45 bolesnika sa melanomom u kliničkim stadijumima bolesti II-IV (Tabela 1). Za potrebe patohistološke analize u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, tkivo regionalnih limfnih čvorova je parafinizirano. Sečenjem dobijenih prafinskih kalupa mikrotomom načinjeni su preseci debljine 5 μ m koji su zatim podvrgnuti standardnom hamatoksilin/eozin bojenju (Kiernan, 2008). Nakon analize bar dva preseka utvrđeno je da li je ispitivani regionalni limfni čvor infiltrisan tumorskim ćelijama.

Tabela 1. Opis i kliničko-patološke karakteristike ispitivanih bolesnika sa melanomom

Klinički stadijum		I-II	III	IV
		20	20	5
Godište	Opseg	33-84	36-73	37-60
	Medijana	58	59	42
Pol	Muški	10	11	3
	Ženski	10	9	2
	Glavai vrat	1	4	
	Trup	7	9	5
Primarni tumor	Gornji ekstremiteti	5	4	
	Doni ekstremiteti	7	3	
	Vulva	1		

3.2 Izolocija mononuklearnih ćelija iz regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma

Deo svežeg tkiva regionalnog limfnog čvora je u RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Nemačka) hranljivoj podlozi za ćelijsku kulturu mehanički isitnjen, a zatim je

potiskivanjem kroz mrežicu dobijena jednoćelijska suspenzija. Iz dobijene suspenzije ćelija izolovane su mononuklearne ćelije (MNC) nakon 30 minuta centrifugiranja na 1600 obrtaja u minutu (rpm) na gustinskom gradijentu Histopaque (Sigma-Aldrich, Nemačka). Dobijeni talog MNC je zatim 2 puta ispiran u po 2 ml medijuma za ćelijsku kulturu centrifugiranjem na 1800 rpm u trajanju od 10 minuta.

***In vitro* tretmani**

Izolovane MNC su kultivisane 72 sata i 7 dana u RPMI1640 hranljivom medijumu za ćelisku kulturu, medijumu sa 200 IU/ml rekombinantnog humanog IL-2 (Sigma-Aldrich, Nemačka) i medijumu sa sa 25ng/ml IL-15 (BD Pharmingen, SAD) na 37°C u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. Kod sedmodnevnih *in vitro* tretmana, četvrtog dana kultivacije ćelijama je dodavana podloga sa citokinima u navedenim koncentracijama.

3.3 Određivanje citotoksične aktivnosti NK ćelija

Kod sveže izolovanih i *in vitro* tretiranih MNC regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom citotoksična aktivnost NK ćelija određivana je, standardnim ⁵¹Cr testom (Brown *et al.*, 1985). Za potrebe ovog testa, K562 ćelije eritromijeloidne leukemije osetljive na lizu NK ćelijama su prethodno obeležene ⁵¹Cr (Na₂Cr₆O₄, Amersham, Vel. Britanija) specifičnog aktiviteta As=3.7 MBq. Ovom metodom se na posredan način, merenjem oslobođenog γ zračenja nastalog otpuštanjem radioaktivnog ⁵¹Cr u toku lize obeleženih K562 ćelija od strane NK ćelija, određuje citotoksična aktivnost NK ćelija. Naime, ovim testom se određuje procenat lize K562 ćelija NK ćelijama u odnosu na količinu radioaktivnog ⁵¹Cr koji se oslobađa tretiranjem K562 ćelija detredžentom (Triton X 100) koji razgrađuje njihovu ćelijsku membranu. U ovom testu K562 ćelije koncentracije 0.05 x 10⁶ ćelija/ ml medijuma su kultivisane sa ispitivanim MNC izolovanim iz limfnih čvorova (Brown *et al.*, 1985). Napravljeno je osnovno razblaženje MNC- efektorskih ćelija (E) koncentracije 4 x 10⁶ ćelija/ml medijuma koje je dva puta sukcesivno razblaženo u odnosu 1:1 da bi se ostvarila tri odnosa efektorskih prema ciljnim ćelijama (E:T): 80:1, 40:1 i 20:1. Naime, u mikropločama, po 100 μ l suspenzije MNC je pomešano sa po 100 μ l obeleženih K562-ciljnih ćelija (T). Za svako razblaženje test je postavljen u triplikatu. Nakon 4 sata

inkubacije na 37°C u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, mikroploče su kratko centrifugirane. Nakon centrifugiranja 100µl supernatanta uzeto je iz svakog uzorka i aktivnost radioaktivnog ⁵¹Cr otpuštenog iz liziranih K562 tumorskih ćelija, merena je kao broj otkucaja u minutu (cpm) na γ-brojaču (Berthold, Nemačka). Procenat specifične citotoksične aktivnosti NK ćelija izračunat je prema formuli:

$$\frac{\text{cpm (eksperimentalno otpuštanje)} - \text{cpm (spontano otpuštanje)}}{\text{cpm (maksimalno otpuštanje)} - \text{cpm (spontano otpuštanje)}} \times 100$$

gde je spontano otpuštanje dobijeno inkubacijom ciljnih K562 tumorskih ćelija u medijumu a maksimalno otpuštanje je dobijeno tretiranjem K562 ćelija 5% rastvorom Triton-a X 100.

3.4 Određivanje intraćelijskog IFN γ u CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama

Za određivanje prisustva sintetisanog IFN γ u CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama metodom protočne citometrije pripremljen je uzorak od 5x10⁵ MNC izolovanih iz regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom koje su resuspendovane u 500µl medijuma. Ovako prpremljene MNC kultivisane su na temperturi od 37°C u polistirenskim epruvetama za protočnu cetometriju sa 50 ng/ ml forbol-12-miristat-13-acetata (PMA) (Sigma, SAD) i 500 ng/ml jonomicina (Sigma, SAD) koji stimulišu sintezu IFN- γ . Nakon 1 sat inkubacije sa PMA i jonomicinom dodavano je 10 g /ml brefeldina A (Sigma, SAD) da bi se sprečio transport sintetsanih proteina iz ćelija u spoljašnju sredinu. Nakon dodatnih 3 sata (ukupno 4 sata) tretmana, spoljašnji antigeni koji određuju imunofenotip NK ćelija obeleženi su sa po 10 µl monklonskih antitela konjugovanih sa fluorescentnim bojama CD56PE i CD3PerCP (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) i inkubirani 30 minuta na 4°C. Nakon toga uzorci su po dva puta ispirani centrifugiranjem na 1600 rpm u hladnom rastvoru fosfatnog pufera (CellWASH, Becton Dickinson, SAD). Nakon bojenja spoljašnjih antigena, prema standardnom postupku za permeabilizaciju talog MNC je izlagan dejstvu komercijalnog BD FACS rastvora 2 za permeabilizaciju ćelija koji sadrži deterdžent saponin (BD Biosciences, SAD) i nakon toga za obležavanje unutarćelijskog IFN γ svakom uzorku dodavano je po 10 µl anti-IFN γ FITC (Becton Dickinson, SAD) monoklonskog antitela. Nakon dva ispiranja u u hladnom rastvoru fosfatnog pufera, za analizu na protočnom

citometru FACSCalibur (Becton Dickinson, SAD) uzorci su rastvoreni u 1% paraformaldehidu (CellFIX, Becton Dickinson, SAD). U populaciji limfocita koja je na protočnom citometru prepoznata na osnovu veličine i granularnosti ćelija, određivan je procenat CD3⁻CD56⁺ NK ćelija koje sadrže IFN γ .

3.5 Protočna citometrija

Zastupljenost CD3⁻CD56⁺ NK ćelija u populaciji limfocita kako u sveže izolovanim, tako i u kultivisanim MNC^ć poreklom iz regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma, određivana je metodom protočne citometrije korišćenjem monoklonskih antitela obeleženih fluorescentnim bojama. Uzorci za analizu su pripremljeni po metodi Jacson-a i saradnika (Jackson *et al*, 1985). Naime, 5 x 10⁵ sveže izolovanih MNC^ć u suspenziji od 100 μ L (koncentracija 5 x 10⁶ ćelija/ml) su inkubirani 30 minuta na 4°C sa 10 μ l odgovarajuće kombinacije monoklonskih antitela i nakon toga ispirani dva puta centrifugiranjem na 1600 rpm u hladnom rastvoru fosfatnog pufera i za analizu na protočnom citometru resuspendovani u 1% paraformaldehidu. Analiza procentualne zastupljenosti ispitivanih receptora na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama vršena je u CellQuest programu pri čemu je sakupljano 50000-100000 događaja (ćelija po uzorku). Tom prilikom, limfocitna populacija je određivana na osnovu veličine i granularnosti i unutar nje na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama praćen procenat ekspresije CD16 i NKG2D aktivacionih receptora, CD158a i CD158b inhibitornih KIR receptora i procenat CD25, CD69 i HLA-DR aktivacionih antigena. U radu su korišćene sledeće kombinacije monoklonskih antitela koja su obeležena fluorescentnim bojama:

- CD56FITC/CD16PE/CD3PerCP,
- CD56FITC/CD25PE/CD3PerCP,
- CD56FITC/CD69PE/CD3PerCp,
- CD56FITC/NKG2DPE/CD3PerCP,
- CD56PE/CD158aFITC/CD3PerCP,
- CD56FITC/CD158bPE/CD3PerCP,
- CD56FITC/HLA-DRPE/CD3PerCP (Becton Dickinson, SAD, R&D, SAD).

Procenat zastupljenosti ispitivanih receptora analiziran je unutar populacije CD3⁻CD56⁺ NK ćelija.

CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije NK ćelija su na protočnom citometru na osnovu MFI (engl. Mean Fluorescence Intensity) parametra koji opisuje srednji intenzitet fluorescence CD56 površinskog antigena, odnosno gustinu ekspresije po ćeliji. Naime, CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelije se odlikuju nižom gustinom CD56 antigena u odnosu na CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciju, a procenat ekspresije ispitivanih receptora određivan je unutar CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija NK ćelija. Za analizu intenziteta ekspresije CD56 antigena (CD56^{potmulo+} i CD56^{sjajno+}) na protočnom citometru prikupljeno je od 50000 do 100000 pojedinačnih događaja.

3.6 Westen blot

Izolacija proteina

Na talog od oko 5×10^6 MNC ćelija izolovanih iz regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma dodavano je 150 μ l RIPA pufera (50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, NP-40 1%, Na-deoksiholat 0.5%, SDS 0.1%) za liziranje ćelija. Ova smesa je nakon 30 minuta inkubacije na ledu centrifugirana 30 minuta pri brzini od 12000 rpm na temperaturi od 4°C i izdvojen je supernatant sa rastvorenim proteinima. Ovako izolovani proteini čuvani su na temperaturi od -20°C do sledećeg korišćenja. Na ovaj način su izolovani proteini iz MNC regionalnih limfnih čvorova nakon 72 sata *in vitro* tretmana RPMI 1640, RPMI 1640 sa 200 IU IL-2 i sa 25 ng/ml IL-15.

Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-ju

Određivanje proteina Lowry metodom se zasniva na reaktivnosti Cu²⁺ jona sa peptidnim vezama u baznoj sredini i sledstvenom redukcijom folina. Ova reakcija se manifestuje pojavom plave boje usled oksidacije aromatičnih aminokiselinskih ostataka u proteinu u reakciji koju katalizuje Cu²⁺. Apsorbanca dobijenog rastvora izmerena na 600nm talasne dužine proporcionalna je koncentraciji proteina.

U ovom radu proteini izolovani iz regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanima rastvoreni u RIPA puferu su razblaženi 10 puta u destilovanoj vodi. Reganesi za određivanje koncentracije proteina rastvor A (2% Na₂CO₃, 0.02% Na K tartarat rastvoreni u 0.1N NaOH, 2g Na₂CO₃, 0,02685 NaK tartarata x 4H₂O rastvorenih u 100 ml 0,1N NaOH) i rastvor B (0.5% CuSO₄ x 5 H₂O) sjedinjeni su u odnosu 50:1 (20 ml

A : 0,4 ml B). 0.8 ml tako dobijenog rastvora AB je dodavano na 0.2 ml vodenog rastvora proteina i inkubirano na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon toga dodavano je 0.1 ml 1 N rastvora folana i inkubirano na sobnoj temperaturi sat vremena. Apsorbanca je merena na 660 nm talasne dužine a koncentracije rastvorenih proteina su očitane sa standardne prave. Korišćena standardna prava konstruisana je tako što su na apcisu nanošene poznate koncentracije proteina govedeg serum albumina (BSA) a na ordinatu izmerene apsorbance. Prava je povučena kroz osam tačaka koje predstavljaju apsorbance rastvora BSA u rasponu koncentracija od 0.25×10^{-4} g/ml do 2.5×10^{-4} g/ml.

Elektroforeza proteina

Uzorci proteina u RIPA puferu su pomešani sa puferom za nanošenje uzorka (Tris pH 6.8, glicerol, 10% SDS, 2-merkaptotanol, 1% Bromphenol-blue) u zapreminskom odnosu uzorka prema puferu 1:1 i nakon toga denaturisani kuvanjem 5 minuta na 100°C a zatim ohlađeni na ledu. Proteini su razdvajani SDS denaturišućom elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu. Nakon polimerizacije 8% poliakrilamidnog gela za razdvajanje (5.3 ml 1.5M Tris pH 8.8, 5.3 ml 30 % bis/akrilamid (29:1), 200 µl 10% SDS, 200 µl 10%APS, 12 µl TEMED, 9.3ml destilovane vode) naliven je 5% gel za koncentrisanje (6.8 ml 1.5M Tris pH 6.8, 1.7 ml 30 % akrilamid/bis-akrilamid (29:1), 100 µl 10% SDS, 100 µl 10%APS, 10 µl TEMED) nakon čije polimerizacije je u bunarčice naneto po 25 µg proteina po uzorku. Elektroforeza proteina je vršena u puferu za elektroforezu pH 8.3 (Tris baza 25mM, glicin 192mM i 0.10% SDS) razblaženom 10 puta u destilovanoj vodi na 100 V.

Elektrotransfer proteina na membranu

Nakon elektroforeze odsečen je gel za koncentrisanje a gel sa razdvojenim proteinima i nitrocelulozna (NC) membrana čija površina odgovara dimenzijama gela su potopljeni u pufer za transfer pH8.3 (25mM Tris baza, glicin 192mM) sa 20% metanola koji je 10 puta razblažen u destilovanoj vodi. Da bi se obavio elektrotransfer proteina, NC membrana i gel su u orijentisani tako da je gel smešten do negativne elektrode u sistemu za elektrotransfer a NC membrana do pozitivne. Transfer je vršen 1 sat u ohlađenom puferu za transfer pri naponu od 100 V uz hlađenje. Da bi se proteini čvrsto vezali za NC membranu, membrana je uranjana u vodeni rastvor za fiksaciju koji

sadrži 45% metanola i 7% glacijalne sirćetne kiseline i nakon 15 minuta inkubacije nekoliko puta ispirana destilovanom vodom. Da bi se proverila uspešnost transfera proteina sa poliakriamidnog gela na NC membranu, vršeno je reverzibilno bojenje 1% komercijalnom Ponceau S bojom (Sigma-Aldrich, Nemačka) sa 5% glacijalne sirćetne kiseline, 2 do 3 minuta na sobnoj temperaturi na mešalici. Na taj način sve trake proteina su nespecifično obojene u crveno i nakon bojenja NC membrane su ispirane destilovanom vodom.

Imunodetekcija proteina

Da bi se sprečila pojava nespecifičnog vezivanja antitela za proteine, NC membrane su potopljene u rastvor 5% obranog mleka u prahu (Sigma-Aldrich, Nemačka) u TBS puferu (20 mM Tris, 150 mM NaCl) pH7.6 razblaženom 10 puta u koji je dodat deterdžent Tween-20 u kranjoj koncentraciji 0.1% (TBST) i inkubirane sat vremena na sobnoj temperaturi uz mešanje. Na ovaj način se postiže da protein kazein iz mleka sprečava nespecifično vezivanje antitela za protein.

Inkubacija NC membrane sa primarnim antitelom je vršena preko noći u hladnoj sobi na mešalici. Monoklonska antitela rastvorena su u 1 x TBST-u u zapremini rastvarača od 150 μ l po cm^2 površine NC membrane. Nakon 72 sata tretmana MNC izolovanih iz regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma u medijumu sa 200 IU/ml, medijumu sa 25 ng/ml IL-15 praćena je indukcija fosforilisanih formi STAT1 i STAT5 signalnih molekula kao i indukcija perforina (PRF1) u odnosu na kontrolne tretmane medijumu. Na ovaj način su korišćena sledeća monoklonska antitela u odgovarajućim razblaženjima: mišje anti-PRF1 (Sigma, SAD) razblaženo 0.5 : 1000 puta; mišje anti-Bcl-2 izotipa IgG1 (Sigma, SAD) razblaženo 1:2000 puta; mišje anti-STAT1 (Becton Dickinson, SAD) specifično za fosforilisanu formu STAT1 molekula (PY701) razblaženo 1:1000; mišje anti-STAT5 (Becton Dickinson Transduction laboratories, SAD) specifično za fosforilisanu formu STAT1 molekula (PY694) razblaženo 1:1000. Nakon toga membrane su ispirane 3 puta po 10 minuta u TBST-u na sobnoj temperaturi na mešalici. Korišćeno je anti-mišje IgG sekundarno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (Sigma-Aldrich, Nemačka) rastvoreno u TBST-u razblaženo 1:5000.

Detekcija traka sa ispitivanim proteinima hemiluminiscencijom, zasniva se na emitovanju svetlosnog signala koji nastaje usled reakcije enzima peroksidaze vezane za sekundarno antitelo i supstrata (vodonik peroksid i luminol). Ukratko, nakon ispiranja viška sekundarnog antitela TBST-om i odlivanja viška tečnosti na NC membranu je nanošena tečnost za detekciju. Korišćen je reagens za hemiluminiscenciju SuperSignal West PICO (TMO Pierce Protein, SAD) sadrži supstrat za enzim peroksidazu i luminol. Nakon 60 s inkubacije u mraku, odliven je višak reagensa i NC membrana uvijena u providnu celofansku foliju i nakon toga prekrivena rentgen filmom (Kodak X-Omat Blue). Nakon 1 do 5 minuta ekspozicije u mraku, film je uronjen u rastvor za razvijanje sve dok nisu uočene trake sa specifičnim proteinima a nakon toga u rastvor za fiksaciju.

Filmovi koji su dobijeni na prethodno opisan način su skenirani i dobijeni dokument je preveden u tif format. Ova slika je zatim analizirana u Image J programom gde je intenzitet- debljina trake obeležene odgovarajućim antitelom za određivani protein određivana u odnosu na kontrolu dobijenu u istom uzorku. Kao unutrašnja kontrola korišćen je β aktin.

3.7 Izolacija RNK

Nakon 72 sata kultivacije 5×10^6 ćelija u pločama za gajenje ćelija u kulturi sa 6 bunarčića, u 2 ml medijuma sa ili bez 200 IU/ml IL-2, sa ili bez 25 ng/ml IL-15 je izolovana RNK korišćenjem monofaznog rastvora fenola i guanidinizotiocianata (Trizol, Sigma, SAD). Nakon 72 sata tretmana, suspenzija MNC prebaćna je u plastičnu Ependorf epruvetu i centrifugirana 10 minuta na 2000 rpm. Na preostale MNC koje su se vezale za plastičnu podlogu posuda za gajenje ćelija sipano je po 1ml Trizol-a i onakon 5 minuta na sobnoj temperaturi sadržaj prebaćen u plastičnu epruvetu u kojoj su već prethodno istaložene ćelije. Zatim je dodato po 200 μ l hloroforma (odnos hloroform:trizol 1:5), sadržaj dobro promućkan epruveta na vorteksu i posle 20 minuta inkubacije na 4°C centrifugiran 15 minuta na 12000 rpm na temperaturi od 2 do 8°C. Izdvojena je gornja bezbojna faza sa RNK i dodata ista zepremina izopropanola, sadržaj promućkan i ostavljen 30 minuta na sobnoj temperaturi. Posle 15 minuta centrifugiranja na 12000 rpm odliven je supernatant i dodato je 1ml 75% etanola i nakon toga vršeno centrifugiranje 15 minuta na 12000 rpm. Posle toga ponovo je dodat 1ml etanol i centrifugirano 5 minuta na 12000 rpm. Tako pripremljen talog RNK čuvan je u

zamrzivaču na -20°C do očitavanja koncentracije na spektrofotometru. Talog RNK je za merenje rastvaran u 20 µl demineralizovane vode a koncentracija očitavana na spektrofotometru (Eppendorf BioPhotometer, Velika Britanija) na 260/280nm.

3.8 RT-PCR

Za prevođenje u cDNK rt-PCR metodom uzeto je po 1 µg izolovane RNK i dodato po 4 µl 5 x pufera za MuLV reverznu transkriptazu (Fermentas, SAD) (krajnja koncentracija 1x), 2 µl 10mM dNTP smese (krajnja koncentracija 1mM), 1 µl inhibitora ribonukleaze (20 U) i dodata voda do zapremine od 19 µl. Ova smesa inkubirana je 5 minuta na 25°C a zatim joj je dodat po 1µl MuLV (1U) . Prevođenje RNK u komplementarnu DNK (cDNA) vršeno je u sledećim uslovima: 10 minuta na 25°C, 60 minuta na 42 °C i 10 minuta na 70°C i uzorci nakon toga ohlađeni na ledu.

PCR

PCR reakcija je rađena u 20µl ukupne racione zapremine. Za umnožavanje ciljne sekvence perforina koja je dugačka 436 bp, korišćene su sledeće sekvence prajmera uzvodni (engl. upstream) 5'AAAGTCAGCTCCACTGAAGCTGTG3' i nizvodni (engl. Downstream) 3'AGTCCTCCACCTCGTTGTCCGTGA5'. Radi kvantifikacije nivoa transkripcije PRF1 gena umnožena je ciljna sekvenca β aktina duga 685 bp korišćenjem sledeće sekvence prajmera: 5' TGGGTCAGAAGGATTCCTAT i 3'AAGGAAGGCTGGAAGAGT.

Na 1 µl cDNA po uzorku dodavano je 5.7 µl vode, 2 µl 5xPCR pufera (Fermentas, SAD), 1.2 µl MgCl₂, 2 µl 2mM smese dNTP, 0.8µl 5' i 3' prajmera za β aktin (krajnja koncentracija 0.8mM) i po 1.2 µl 5' i 3' prajmera za PRF1 (krajnja koncentracija 1.2mM) i 4 µl (2U) Taq polimeraze (Fermentas, SAD). cDNA je dalje umnožena pod sledećim uslovima: denaturacija 5 minuta na 95°C, aniling 30 s na 56°C, ekstenzija 45 s na 72°C i završna ekstenzija 7 minuta na 72°C. Za ekspresiju PRF1 i β aktina nađen je optimalan broj od 35 ciklusa a PCR produkti su provereni elektroforezom na 1.5% agaroznom gelu. Intenzitet traka je izmeren densitometrom i semi-kvantifikovan korišćenjem Scion Image programa. Intenzitet traka dobijen umnožavanjem PRF1 svakog uzorka izražen je u odnosu na intenzitet odgovarajuće trake dobijene umnožavanjem β aktina.

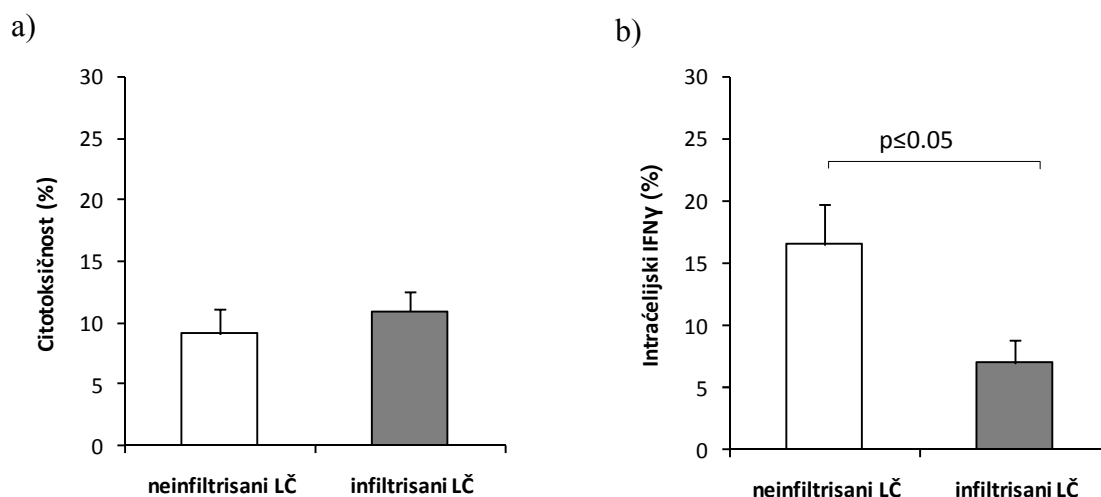
3.9 Statističke analize

Vrednosti ispitivanih parametara kod tumor-infiltriranih u odnosu na neinfiltrirane limfne čvorove poređene su Mann Whitney neparametrijskim statističkim testom. Za utvrđivanje značajnosti promena ispitivanih parametrima kod tumor-neinfiltriranih i kod infiltriranih limfnih čvorova nakon 72 sata i nakon 7 dana *in vitro* tretmana IL-2 i IL-15 u odnosu na kontrolne tretmane vršena je Wilcoxon testom sume rangova. U statističkoj analizi korelacione povezanosti između imunofenotipskih svojstava NK ćelija u regionalnim limfnim čvorovima sa brojem regionalnih limfnih čvorova zahvaćenih tumorom i stepena invazije primarnog tumora u kožu korišćen je Spearman test.

4 Rezultati

4.1 Funkcionalne karakteristike NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma

Citotoksična aktivnost NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma određivana je u odnosu na ciljnu tumorsku K562 ćelijsku liniju standardnim četвороčasovnim radioaktivnim ^{51}Cr testom koji je pokazao kod tumor-infiltrisanih limfnih čvorova (infiltrisani LČ) i kod limfnih čvorova koji nisu infiltrisani tumorom (neinfiltrisani LČ) slične niske vrednosti citotoksične aktivnosti NK ćelija (vrednosti su $9.17 \pm 1.20 \%$ za neinfiltrisane i $10.97 \pm 1.57 \%$ za infiltrisane LČ) (Slika 1a).

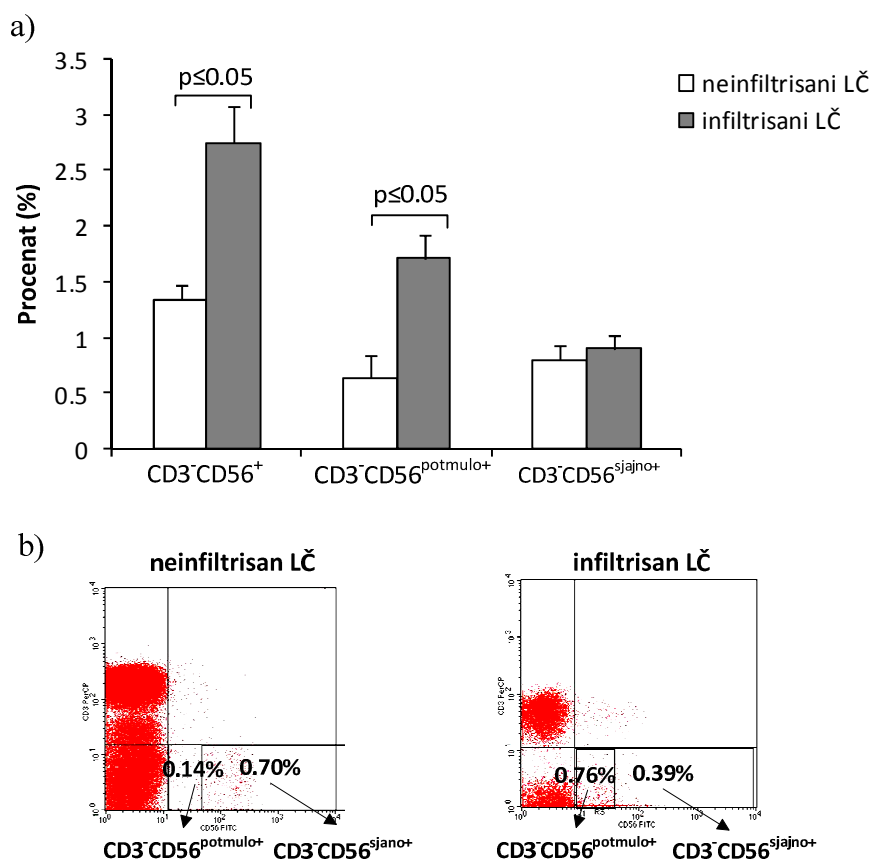


Slika 1. a) Slična citotoksična aktivnost NK ćelija neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih limfnih čvorova (LČ) obolelih od melanoma za odnos efektorskih (E) prema ciljnim ćelijama (C) 80:1 (E:C, 80:1). b) Sniženi nivo produkcije IFN γ u CD3 $^+$ CD56 $^+$ NK ćelijama infiltrisanih u odnosu na neinfiltrisane regionalne LČ obolelih od melanoma ($p \leq 0.05$, MannWhitney test). Predstavljene su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Sposobnost NK ćelija regionalnih LČ obolelih od melanoma da sintetišu IFN- γ je praćena nakon 4 sata standardne *in vitro* stimulacije PMA i jonomicinom, metodom protoćne citometrije. Određivanjem procenta CD3 $^+$ CD56 $^+$ NK ćelijama koje sadrže IFN γ u infiltrisanim LČ pokazana je statistički značajno niža ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) produkcija IFN γ u odnosu na neinfiltrisane LČ (vrednosti su $7.02 \pm 1.79 \%$ za infiltrisane i $16.54 \pm 3.21 \%$ za neinfiltrisane LČ) (Slika 1b).

4.2 Zastupljenost NK ćelija i njihovih $CD3^-CD56^{potmulo+}$ i $CD3^-CD56^{sjajno+}$ subpopulacija u regionalnim limfnim čvorovima obolelih od melanomoma

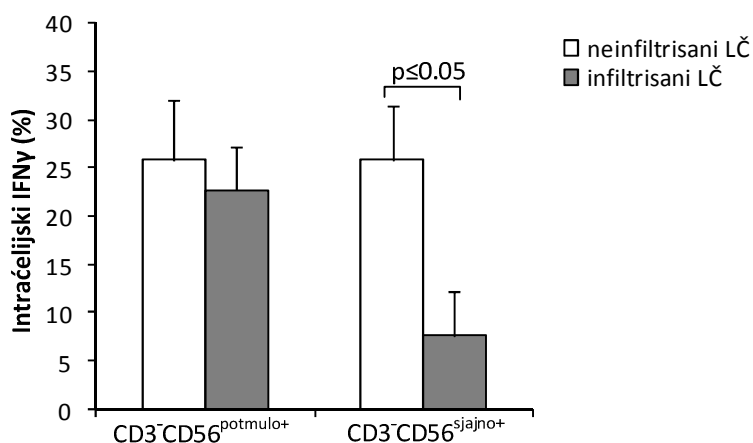
Analizom zastupljenosti $CD3^-CD56^+$ NK ćelija u limfocitnoj populaciji regionalnih LČ obolelih od melanoma, metodom protočne citometrije, je dobijen statistički značajno veći ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) procenat NK ćelija u infiltrisanim (2.76 ± 0.33 %) u odnosu na neinfiltrisane (1.34 ± 0.12 %) LČ (Slika 2). Dobijena je statistički značajno veća ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) zastupljenost citotoksične $CD3^-CD56^{potmulo+}$ subpopulacije NK ćelija u infiltrisanim (1.71 ± 0.39 %) u odnosu na neinfiltrisane (0.64 ± 0.17 %) LČ, a slična zastupljenost imunoregulatorne $CD3^-CD56^{sjajno+}$ NK ćelija u infiltrisanim (0.9 ± 0.21 %) i neinfiltrisanim (0.8 ± 0.16 %) regionalnim LČ (Slika 2a,b).



Slika 2. a) Veći procenat $CD3^-CD56^+$ NK ćelija i $CD3^-CD56^{potmulo+}$ subpopulacije u infiltrisanim LČ u odnosu na neinfiltrisane regionalne LČ obolelih od melanoma ($p \leq 0.05$, MannWhitney test). Predstavljene su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) Reprezentativni tačkasti dijagrami dobijeni protočnom citometrijom.

4.3 Produkcija IFN γ u CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanomoma

Analizom produkcije IFN γ u subpopulacijama NK ćelija regionalnih LČ obolelih od melanoma nakon 4 sata stimulacije PMA i jonomicinom dobijen je sličan procenat NK ćelija CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacije koje sadrže IFN γ i u neinfiltrisanim (25.91 \pm 6.26 %) i u infiltrisanim (25.90 \pm 4.42 %) LČ, dok je procenat IFN γ pozitivnih imunoregulatornih CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelija statistički značajno niži (p \leq 0.05, Mann Whitney test) u infiltrisanim (7.69 \pm 5.63 %) u odnosu na neinfiltrisane (22.78 \pm 6.26 %) LČ (Slika 3).



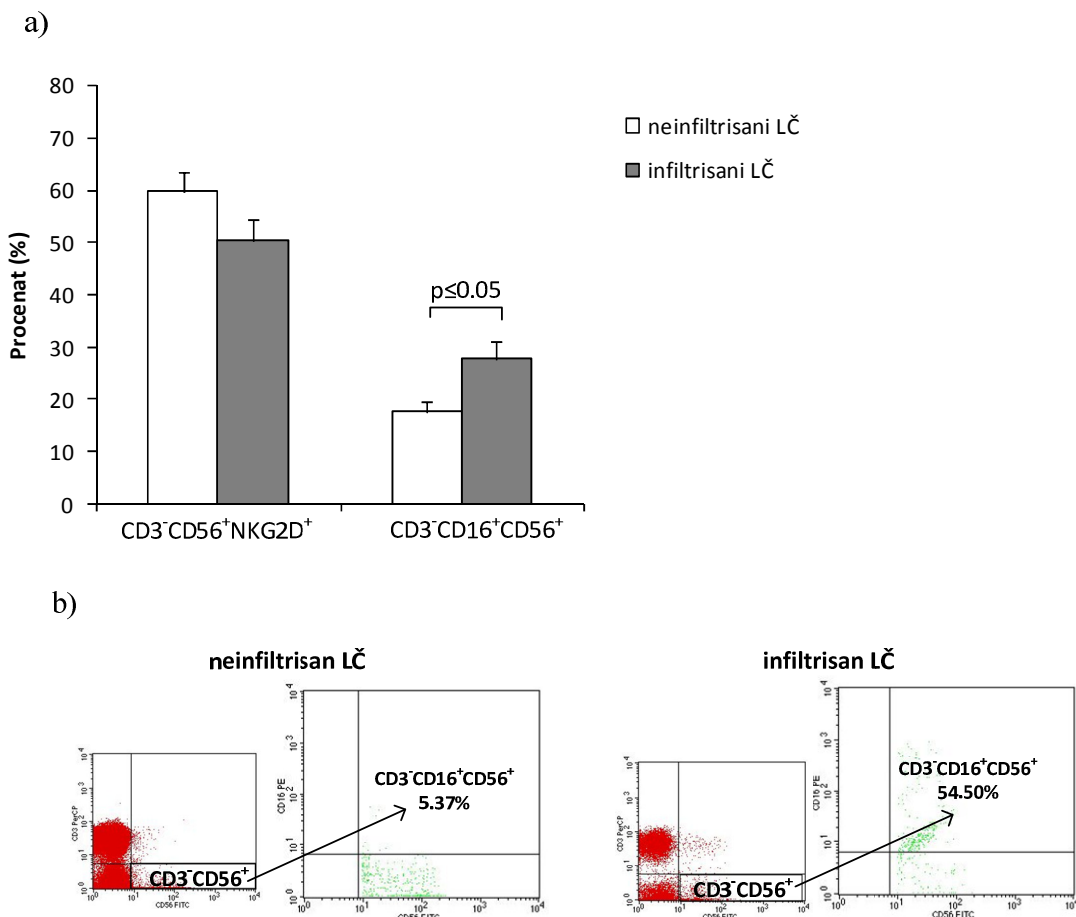
Slika 3. Snižena produkcija IFN γ u CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija infiltrisanih u odnosu na neinfiltrisane regionalne LČ. Rezultati su prikazani kao procenat IFN γ pozitivnih NK ćelija u NK ćelijskoj subpopulaciji. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama (p \leq 0.05, Mann Whitney test).

4.4 Imunofenotipske karakteristike CD3⁻CD56⁺ NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma

Ekspresija aktivacionih receptora na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma

Analiza zastupljenosti aktivacionih receptora u populaciji CD3⁻CD56⁺ NK ćelija metodom protočne citometrije je za NKG2D receptor pokazala sličan procenat ekspresije u neinfiltrisanim (59.60 \pm 3.61 %) i infiltrisanim (50.18 \pm 4.24 %)

regionalnim LČ, dok je za CD16 aktivacioni receptor dobijena statistički značajno veća zastupljenost ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) u infiltrisanim (27.55 ± 3.34 %) u odnosu na neinfiltrisane (17.52 ± 1.91 %) LČ (Slika 4a,b).



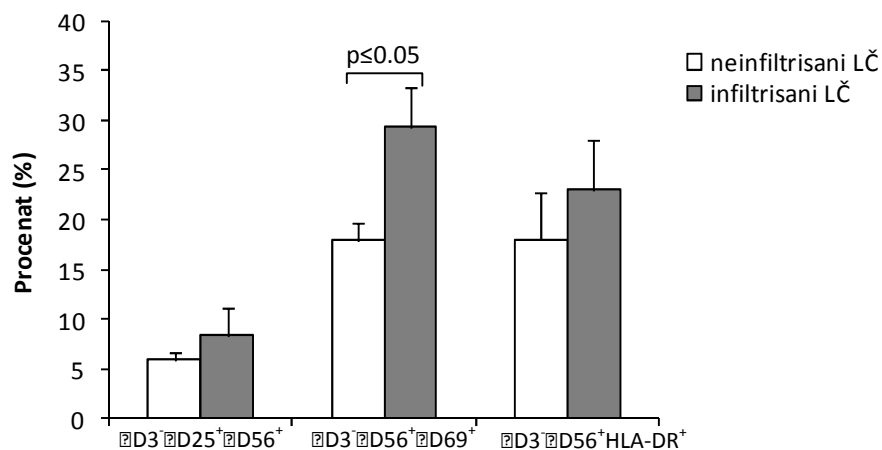
Slika 4. a) Povećan procenat ekspresije CD16 receptora u populaciji CD3⁺CD56⁺ NK ćelija infiltrisanih u odnosu na neinfiltrisane regionalne LČ ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) Reprezentativni tačkasti dijagrami dobijeni protočnom citometrijom

Ekspresija aktivacionih antigena na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama regionalnih limfnih čvorovima obolelih od melanoma

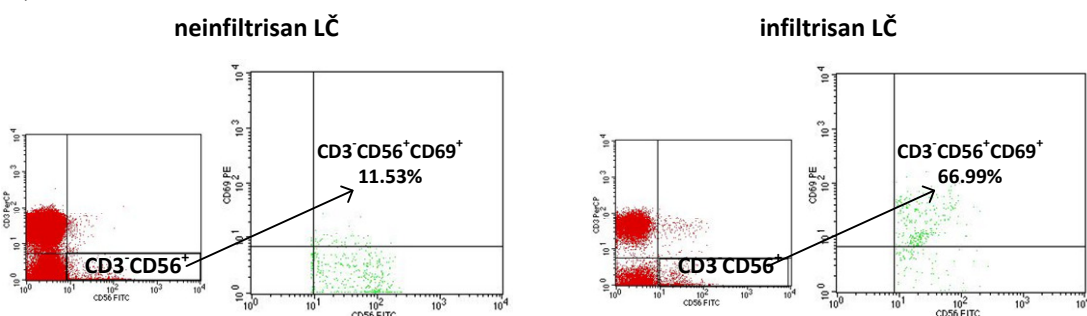
Analizom zastupljenosti aktivacionih antigena u populaciji CD3⁺CD56⁺ NK ćelija regionalnih LČ obolelih od melanoma za CD25 i HLA-DR antigene je dobijena slična ekspresija u neinfiltrisanim (vrednosti za CD25 i HLA-DR su 5.90 ± 0.77 % i 48.03 ± 5.15 %) i infiltrisanim (vrednosti za CD25 i HLA-DR su 8.30 ± 2.90 % i 50.60 ± 4.66 %) regionalnim LČ. Za razliku od ova dva antigena, CD69 rani aktivacioni antigen je statistički značajno ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) više zastupljen u populaciji

NK ćelija infiltrisanih ($29.41 \pm 4.08 \%$) u odnosu na neinfiltrisane ($17.67 \pm 1.7 \%$) regionalne LČ (Slika 5a,b).

a)



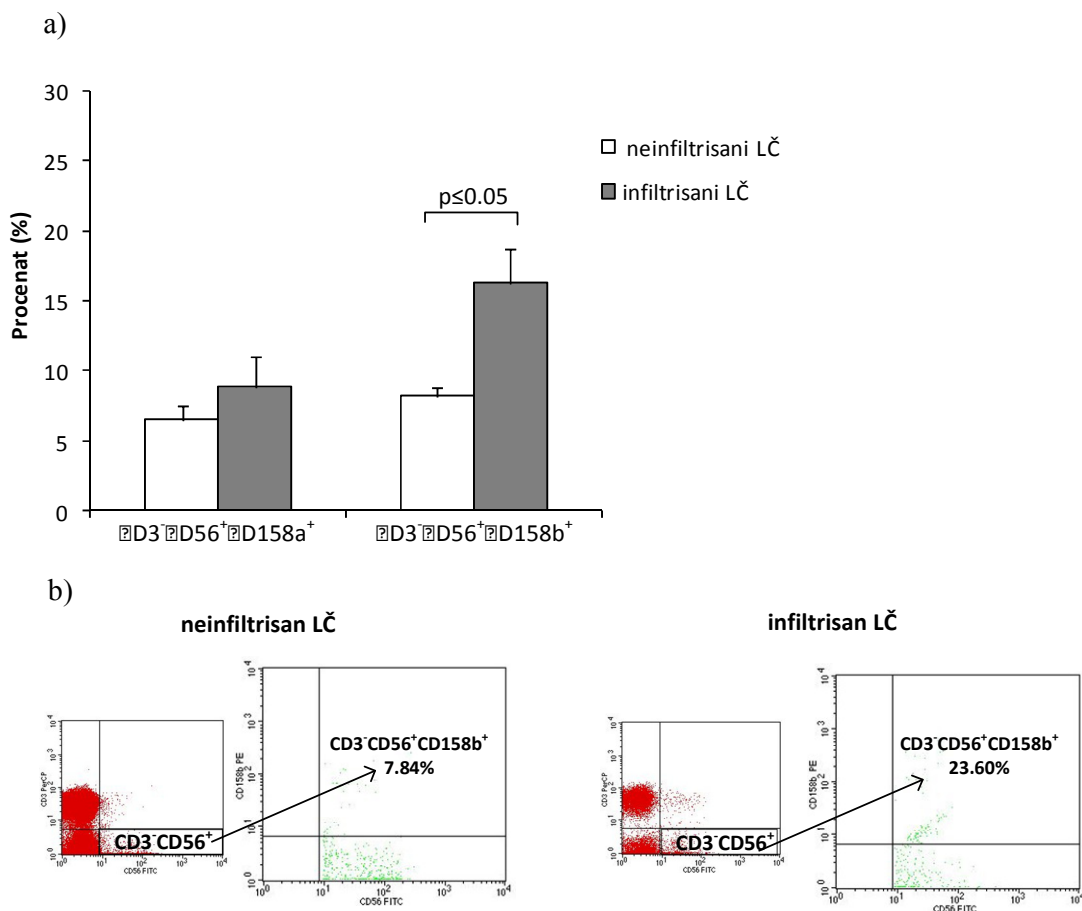
b)



Slika 5. a) Povećan procenat ekspresije CD69 aktivacionog antigena u populaciji CD3⁺CD56⁺NK ćelija infiltrisanih u odnosu na neinfiltrisane regionalne LČ ($p \le 0.05$, Mann Whitney test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) Reprezentativni tačkasti dijagrami dobijeni protočnom citometrijom .

Ekspresija inhibitornih KIR receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma

Analiza zastupljenosti CD158a i CD158b inhibitornih KIR receptora u populaciji CD3⁺CD56⁺ NK ćelija regionalnih LČ je pokazala sličnu ekspresiju CD158a receptora u obe grupe isptivanih regionalnih LČ (vrednosti su $6.52 \pm 0.99 \%$ u neinfiltrisanim i $8.85 \pm 2.179 \%$ u infiltrisanim LČ), dok je za CD158b dobijena statistički značajno veća ekspresija ($p \le 0.05$, Mann Whitney test) u infiltrisanim ($16.33 \pm 2.36 \%$) u odnosu na neinfiltrisane ($8.19 \pm 0.59 \%$) LČ (Slika 6a, b).



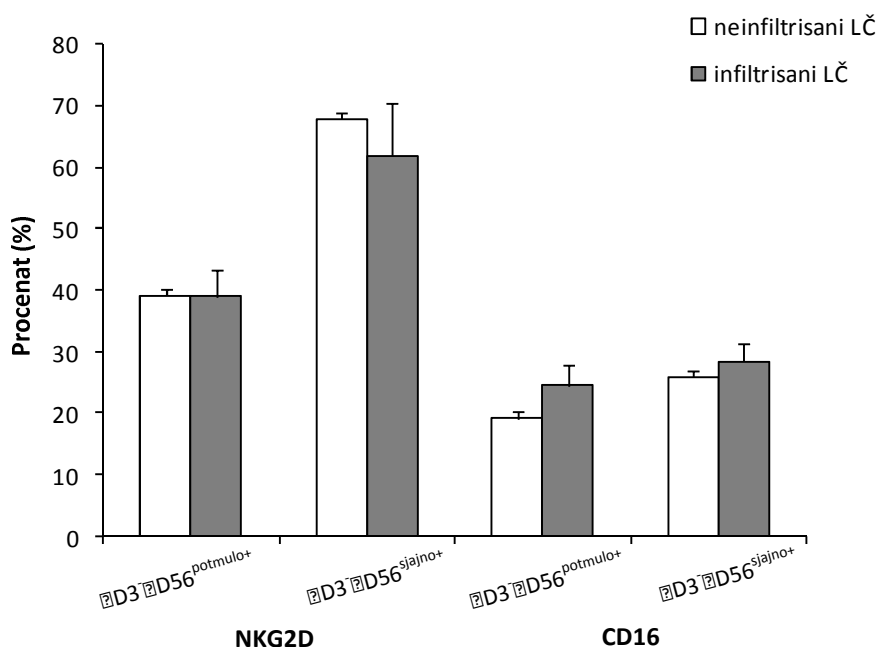
Slika 6. a) Povećan procenat ekspresije CD158b inhibitornog KIR receptora u populaciji CD3⁺CD56⁺NK ćelija infiltrisanih u odnosu na neinfiltrisane regionalne LČ ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) Reprezentativni tačkasti dijagram dobijen protočnom citometrijom.

Ekspresija receptora u CD3⁺CD56^{potmulo+} i CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija

Analiza zastupljenosti NKG2D aktivacionog receptora u subpopulacijama NK ćelija, pokazala je njegovu sličnu ekspresiju u citotoksičnoj, CD3⁺CD56^{potmulo+}, subpopulaciji neinfiltrisanih (39.17 ± 3.25 %) i infiltrisanih (39.00 ± 5.05 %) LČ kao i u imunoregulatornoj, CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija obe grupe regionalnih LČ (vrednosti su 67.87 ± 4.29 % za neinfiltrisane i 61.86 ± 8.65 % za infiltrisane LČ) (Slika 7).

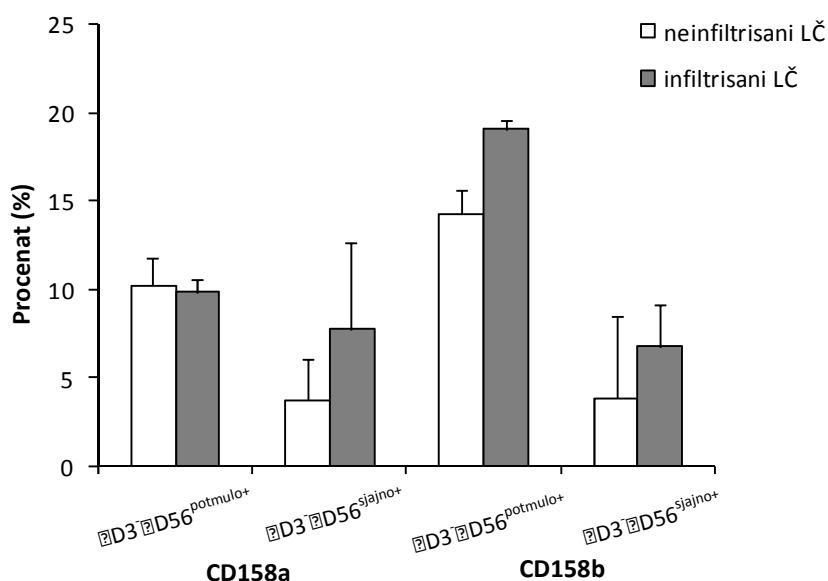
Za CD16 aktivacioni receptor dobijena je veća zastupljenost u CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji tumor-infiltrisanih LČ (24.46 ± 3.89 %) u odnosu na neinfiltrisane (19.26 ± 3.09 %) LČ koja, međutim, nije statistički značajno različita ($p \geq 0.05$, Mann Whitney

test). U imunoregulatornoj $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji obe grupe ispitivanih LČ dobijena je slična ekspresija CD16 receptora (vrednosti su $25.95 \pm 3.46 \%$ za neinfiltrisane i $28.40 \pm 3.00\%$ za infiltrisane LČ) (Slika 7).



Slika 7. Procentat ekspresije NKG2D i CD16 aktivacionih receptora u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ i $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulacijama NK ćelija neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih LČ obolelih od melanoma. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Analizom zastupljenosti inhibitornih KIR receptora u subpopulacijama NK ćelija, za CD158a KIR receptor dobijene su slične vrednosti ekspresije u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji neinfiltrisanih ($10.19 \pm 1.54 \%$) i infiltrisanih ($9.83 \pm 2.27 \%$) LČ, a i u $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji NK ćelija obe grupe ispitivanih regionalnih LČ (vrednosti su $3.77 \pm 0.67 \%$ za neinfiltrisane i $7.7 \pm 4.95 \%$ za infiltrisane LČ) (Slika 8). Zastupljenost CD158b KIR-a u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ populaciji NK ćelija je niža u neinfiltrisanim ($14.30 \pm 1.31 \%$) nego u infiltrisanim ($19.05 \pm 4.63\%$) LČ, mada ne statistički značajno ($p \geq 0.05$, Mann-Whitney test), a u $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji je slična i u neinfiltrisanim ($3.85 \pm 0.50 \%$) i u infiltrisanim regionalnim LČ ($6.76 \pm 2.34 \%$) (Slika 8).

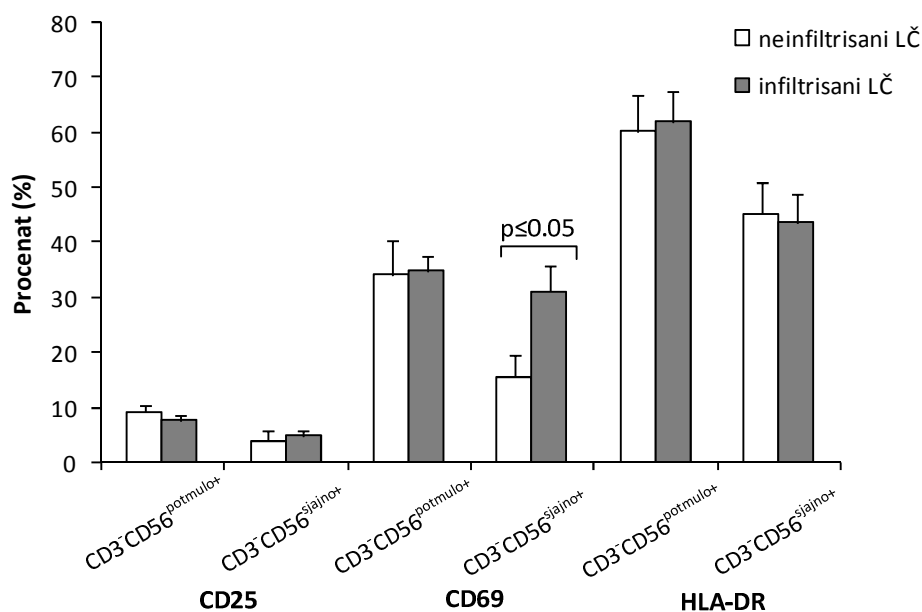


Slika 8. Procenat ekspresije CD158a i CD158b inhibitornih KIR receptora u CD3⁺CD56^{potmulo+} i CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih LČ obolelih od melanoma. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Analizom zastupljenosti aktivacionih antigena u funkcionalnim subpopulacijama NK ćelija regionalnih LČ pokazana je sličan nivo ekspresije CD25 antigena u CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji neinfiltrisanih (9.23 ± 1.21 %) i infiltrisanih (7.58 ± 1.66 %) LČ kao i u CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulaciji obe grupe regionalnih LČ (vrednosti su 3.93 ± 0.86 % za neinfiltrisane i 4.67 ± 1.87 % za infiltrisane LČ) (Slika 9).

Za CD69 rani aktivacioni antigen pokazan je sličan procenat ekspresije u CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji neinfiltrisanih (34.08 ± 6.41 %) i infiltrisanih (34.85 ± 3.96 %) LČ, dok je u CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulaciji dobijena statistični značajno veća (p ≤ 0.05, Mann Whitney test) zastupljenost CD69 antigena u infiltrisanim (31.05 ± 4.62 %) u odnosu na neinfiltrisane (15.53 ± 2.72 %) regionalne LČ (Slika 9).

Slično CD25 antigenu i za HLA-DR aktivacioni antigen dobijena je slična zastupljenost u CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija neinfiltrisanih (60.19 ± 6.66 %) i infiltrisanih (62.06 ± 5.70 %) LČ, a takođe i u CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulaciji obe ispitivane grupe regionalnih LČ (vrednosti su 45.28 ± 5.54 % za neinfiltrisane i 43.71 ± 4.99 % za infiltrisane LČ) (Slika 9).



Slika 9. Procentat ekspresije CD25, CD69 i HLA-DR aktivacionih antigena u CD3⁺CD56^{potmulo+} i CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija regionalnih LČ obolelih od melanoma. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Korelacija broja tumor-infiltrisanih limfnih čvorova i kliničkog Klark parametra sa procentom i fenotipom NK ćelija u limfnom čvoru

Na osnovu AJCC sistema kalsifikacije 2001. godine za melanom kože je na osnovu broja broja regionalnih LČ koji su infiltrisani tumorom određuje se N klinički stadijum bolesti. Prema ovom sistemu klasifikacije sa N0 se označavaju tumori kod kojih regionalni LČ nisu infiltrisani tumorom, sa N1 se označavaju tumori gde je jedan LČ od svih patohistološki pregledanih regionalnih LČ infiltrisan tumorom, sa N2 tumori kod kojih su 2 do 3 regionalna LČ infiltrisana tumorom i sa N3 oni kod kojih je 4 i više regionalnih LČ infiltrisano tumorom.

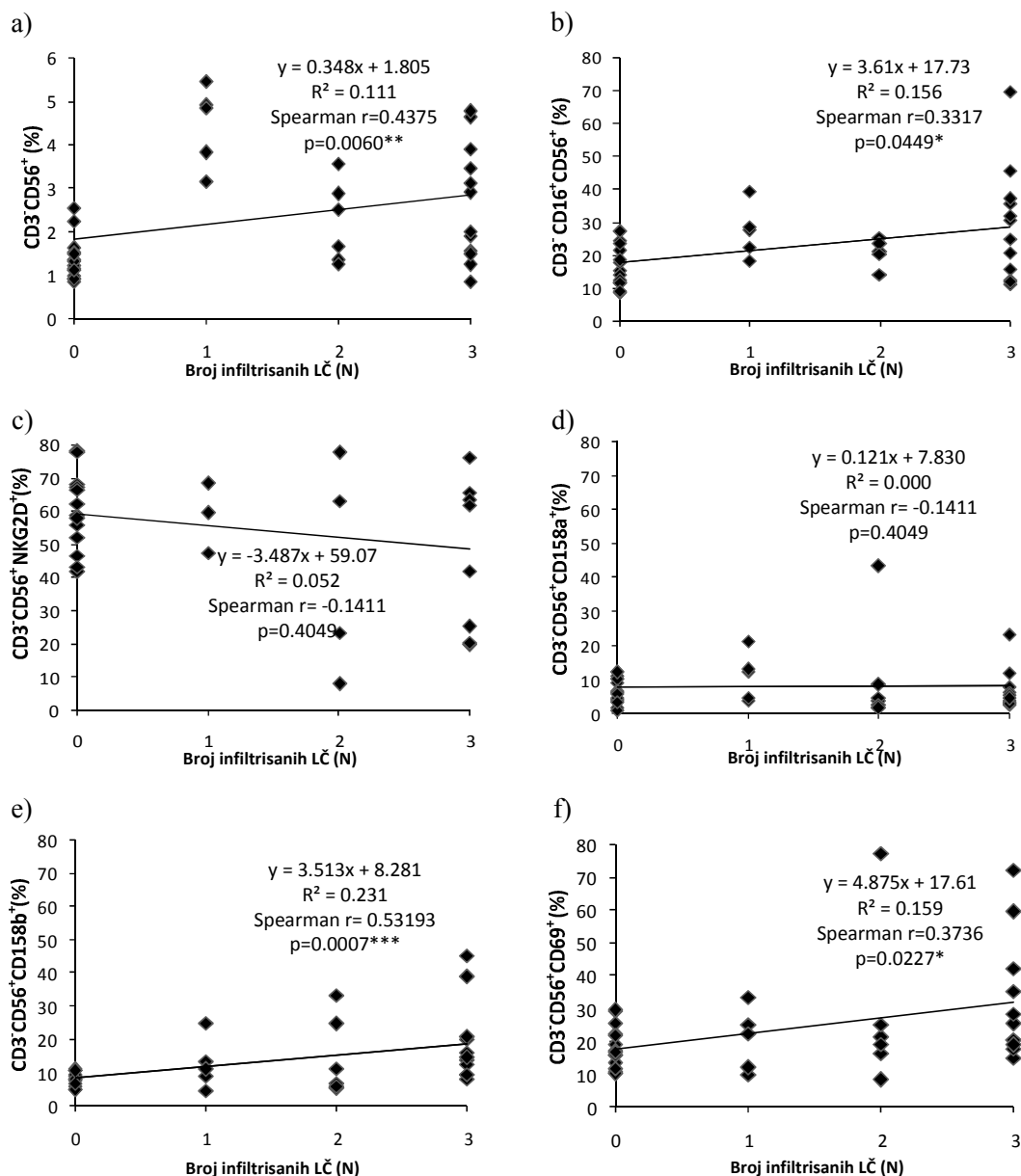
Spearman statističkim testom ispitivana je korelaciona povezanost N kliničkog stadijuma bolesti sa procentom CD3⁺CD56⁺ NK ćelija u LČ kao i sa procentom ekspresije receptora u CD3⁺CD56⁺ populaciji NK ćelija regionalnih LČ. Na ovaj način je kod obolelih od melanoma pokazana pozitivna korelacija između broja tumor-infiltrisanih regionalnih LČ (N) i procenta CD3⁺CD56⁺ NK ćelija u regionalnim LČ (p=0.0060, r=0.4375, Spearman test) (Slika 10a). Ispitivanjem korelacije procenta ekspresije aktivacionih receptora u populaciji CD3⁺CD56⁺ NK ćelija LČ sa N, za CD16

receptor pokazana je statistički značajna pozitivna korelacija ($p=0.0449$, $r=0.3317$, Spearman test) (Slika 10b), dok za NKG2D receptor nije pokazana korelacija sa N ($p=0.4049$, $r=-0.4049$, Spearman test) (Slika 10c). Daljom analizom, za ekspresiju CD158a KIR-a na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama nije pokazana korelacija ($p=0.4375$, $r=-0.1411$, Spearman test), dok je za CD158b KIR receptor pokazana izražena pozitivna korelacija sa N ($p=0.0007$, $r=0.53193$, Spearman test) (Slika 10d, e). Pokazana je i pozitivna korelacija između ekspresije ranog CD69 aktivacionog antigena na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama sa N ($p=0.0227$, $r=0.3736$, Spearman test) (Slika 10f).

Dobijene vrednosti za r Spearman-ov koeficijent korelacije ukazuju na najizraženiju pozitivnu korelaciju N sa ekspresijom CD158b inhibitornog KIR receptora na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama LČ ($r \geq 0.5$ označava umerenu do dobru korelacionu povezanost). Od dobijenih statistički značajnih ($p \leq 0.05$) korelacionih povezanosti sledeća po veličini dobijene vrednosti r je korelacija N sa procentom $CD3^+CD56^+$ NK ćelija u regionalnim LČ, zatim sledi korelacija sa ekspresijom CD69 antigena na NK ćelijama, da bi najniži koeficijent r ukazao na najslabiju korelaciju sa ekspresijom CD16 na NK ćelijama regionalnih LČ.

Prema AJCC klasifikaciji melanoma klinički stadijum bolesti po Klark-u je patohistološki parametar koji opisuje nivo anatomske invazije melanoma u kožu i dugo je korišćen kao primarni faktor u ranijoj klasifikaciji melanoma. Prema Klarku, postoji pet anatomskih nivoa invazije tumora:

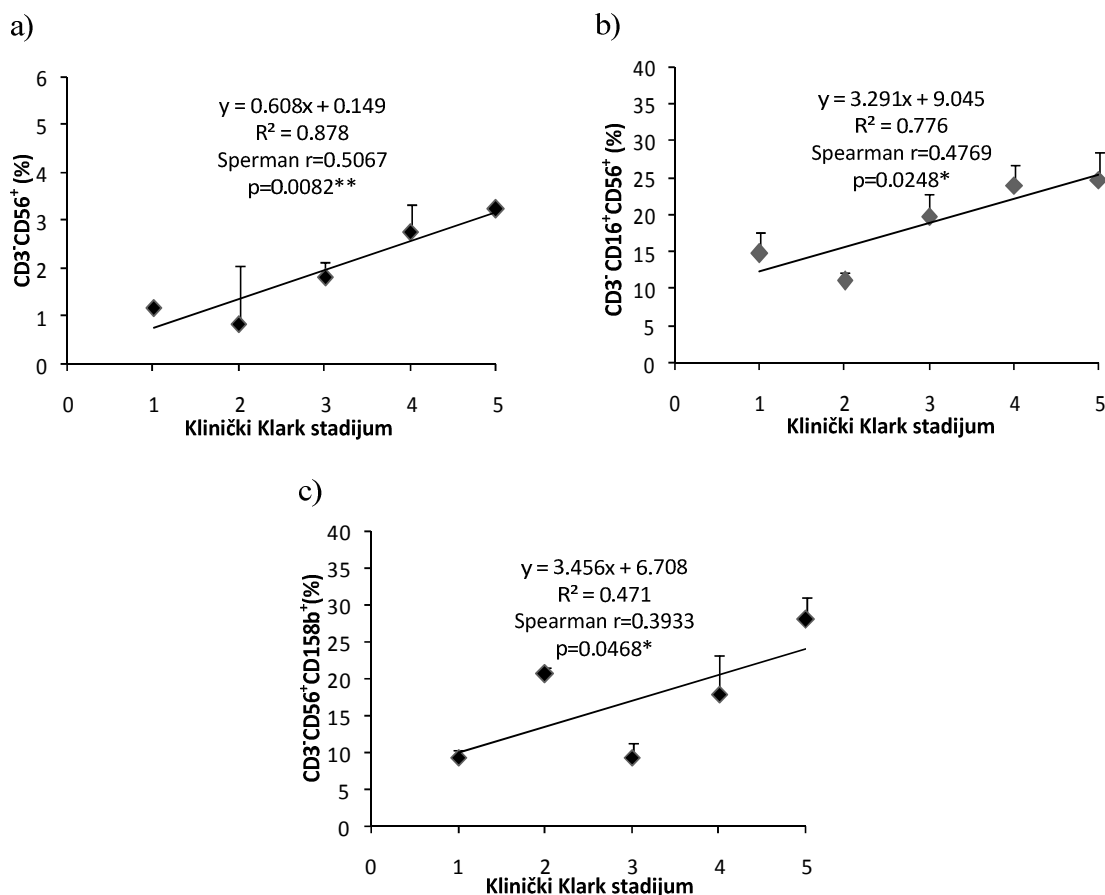
1. melanom je ograničen na epidermis kože
2. invazija melanoma u papilarni dermis
3. invazija melanoma u prostor između papilarnog i retikularnog dermisa
4. invazija melanoma u potkožno masno tkivo (Clark *et al.*, 1969).



Slika 10. Korelacija broja tumor infiltriranih regionalnih LČ (N) sa a) procentom CD3⁺CD56⁺ NK ćelija u regionalnim LČ i sa ekspresijom b) CD16, c) CD158a, d) CD158b i e) CD69 receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Spearman test).

Ispitivanjem korelacije između kliničkog stadijuma bolesti po Klarku koji opisuje invazivnost melanoma i procenta CD3⁺CD56⁺ NK ćelija u LČ pokazana je statistički značajna ($p = 0.0082$, $r = 0.5067$, Spearman test) “umerena do dobra” pozitivna korelaciona povezanost (Slika 11a). Analizom korelacione povezanosti kliničkog Klark parametra sa zastupljenosću receptora na NK ćelijama regionalnih LČ obolelih od melanoma pokazano je postojanje statistički značajne korelacije sa ekspresijom CD16 receptora ($p = 0.0248$,

$r=0.4769$, Spearman test) (Slika 11b) i sa ekspresijom CD158b inhibitorynog KIR receptora ($p=0.00468$, $r=0.3033$, Spearman test) (Slika 11c) u populaciji CD3⁺CD56⁺ NK ćelija regionalnih LČ.



Slika 11. Pozitivna korelacija između kliničkog stadijuma bolesti po Klarku i a) procenta CD3⁺CD56⁺ NK ćelija u regionalnom LČ i ekspresije b) CD16 i c) CD158b receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelijama (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Spearman test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

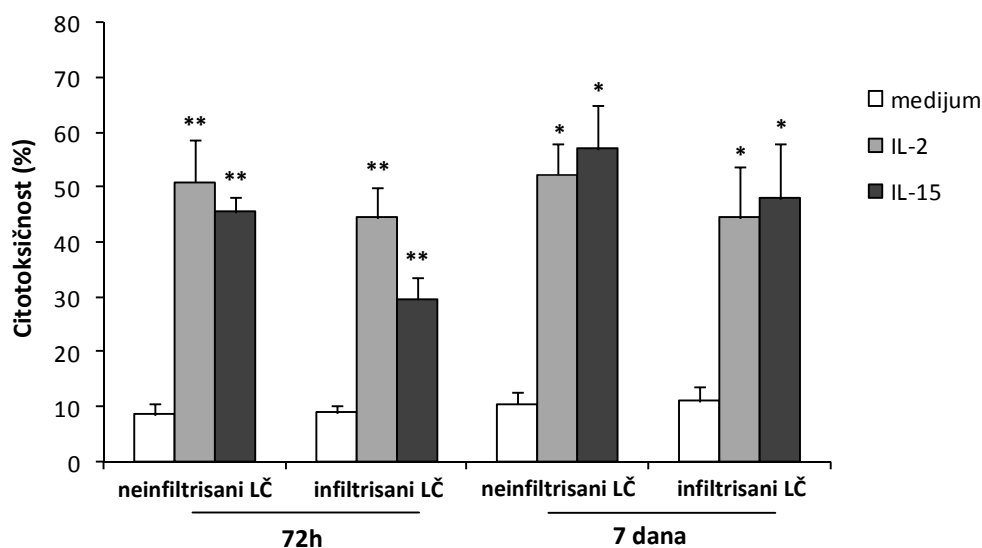
4.5 *In vitro* efekti interleukina IL-2 i IL-15 na citotoksičnu funkciju i imunofenotip NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma

4.5.1 *In vitro* efekti interleukina IL-2 i IL-15 na citotoksičnu funkciju NK ćelija

Citotoksična aktivnost NK ćelija je određivana u odnosu na ciljnu tumorsku K562 ćelijsku liniju nakon 72 sata i 7 dana *in vitro* kultivacije MNC regionalnih LČ obolelih od melanoma u RPMI 1640 medijumu za ćelisku kulturu (medijum) sa 200 IU/ml IL-2 i u medijumu sa 25 ng/ml IL-15.

Nakon 72 sata *in vitro* tretmana citokinima IL-2 i IL-15 citotoksična aktivnosti NK ćelija obe grupe regionalnih LČ se višestruko i visoko statistički značajnog povećala ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) u odnosu na kontrolnu vrednost dobijenu u medijumu. NK ćelijska citotoksičnost neinfiltrisanih LČ povećala se sa $8.67 \pm 1.88 \%$ u medijumu na $50.92 \pm 7.85 \%$ nakon tretmana sa IL-2 i na $45.50 \pm 2.69 \%$ nakon tretmana sa IL-15, a infiltrisanih LČ sa $8.95 \pm 1.46 \%$ u medijumu na $44.60 \pm 5.47 \%$ nakon tretmana sa IL-2 i na $29.67 \pm 4.14 \%$ nakon tretmana sa IL-15 (Slika 12).

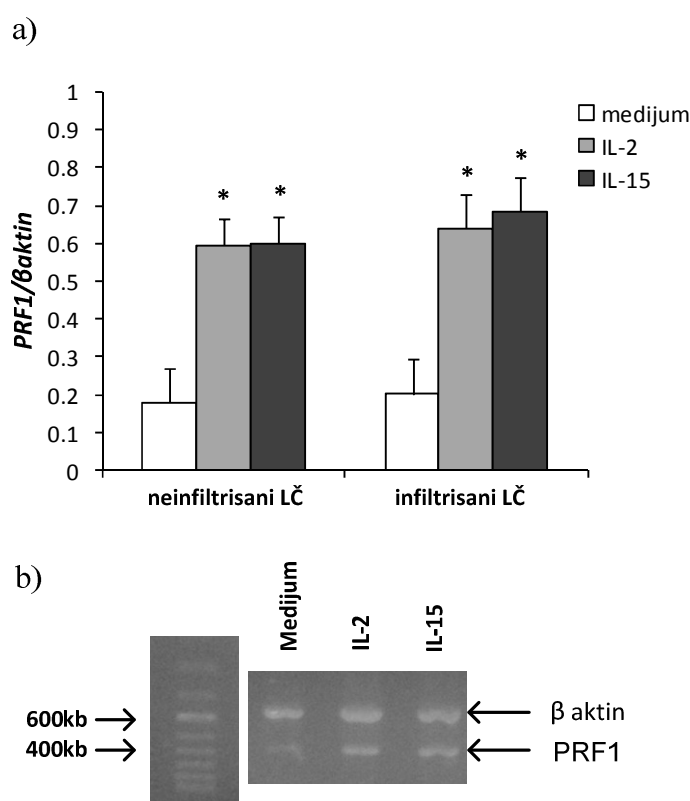
Nakon 7 dana *in vitro* tretmana citokinima takođe je došlo do statistički značajnog povećanja ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) citotoksične aktivnosti NK ćelija obe grupe regionalnih LČ se u odnosu na kontrolu. Vrednosti citotoksičnosti dobijene za neinfiltrisane LČ su $10.59 \pm 2.23 \%$ u medijumu, $52.39 \pm 2.22 \%$ nakon tretmana sa IL-2 i $57.06 \pm 7.95 \%$ nakon tretmana sa IL-15, a za infiltrisane LČ su $11.13 \pm 2.67 \%$ u medijumu, $44.54 \pm 9.34 \%$ nakon kultivacije sa IL-2 i $47.96 \pm 9.99 \%$ nakon tretmana sa IL-15 (Slika 12).



Slika 12. Povećanje citotoksične aktivnosti NK ćelija neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih LČ obolelih od melanoma nakon 72h i 7 dana *in vitro* tretmana interleukinima IL-2 (200 IU/ml) i IL-15 (25 ng/ml) u odnosu na kontrolu (medijum) (** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

4.5.2 *In vitro* efekti interleukina IL-2 i IL-15 na transkripciju perforina

Nakon 72 sata *in vitro* kultivacije MNC regionalnih LČ bolesnika sa melanomom interleukinima IL-2 i IL-15 rt-PCR metodom pokazano je statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) trostruko povećanje nivoa transkripcije *PRF1* gena za perforin u odnosu na kontrolni tretman medijumom kod neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih LČ (Slika 13a,b).

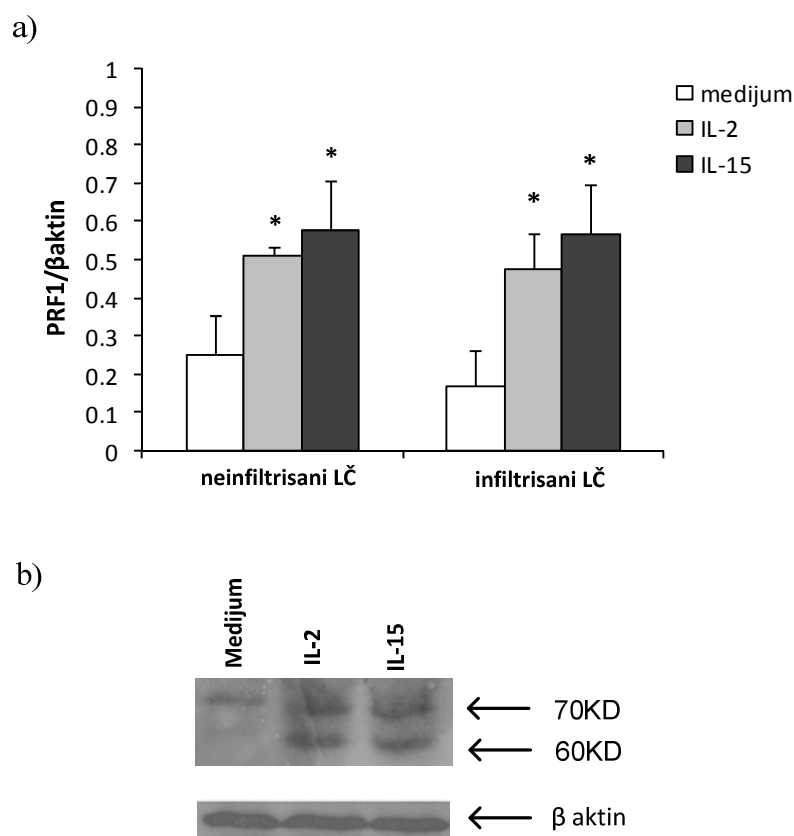


Slika 13. a) Povećanje transkripcije *PRF1* izraženo u odnosu na β aktin gen nakon 72 sata *in vitro* tretmana MNC neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih LČ interleukinima IL-2 (200 IU/ml) i IL-15m (25 ng/ml) u odnosu na kontrolu (medijum) ($*p \leq 0.05$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) Reprerzentativna elektroforeza rt-PCR produkata na agaroznom gelu.

4.5.3 *In vitro* efekti interleukina IL-2 i IL-15 na sintezu perforina

Nakon 72 sata *in vitro* kultivacije izloveni su proteini i podvrgnuti su denaturišućoj SDS elektroforezi na poliakrilamidnom gelu da bi se razdvojile teža 70KD frakcija glikozilovanog i funkcionalno nezreljeg perforina i lakša frakcija

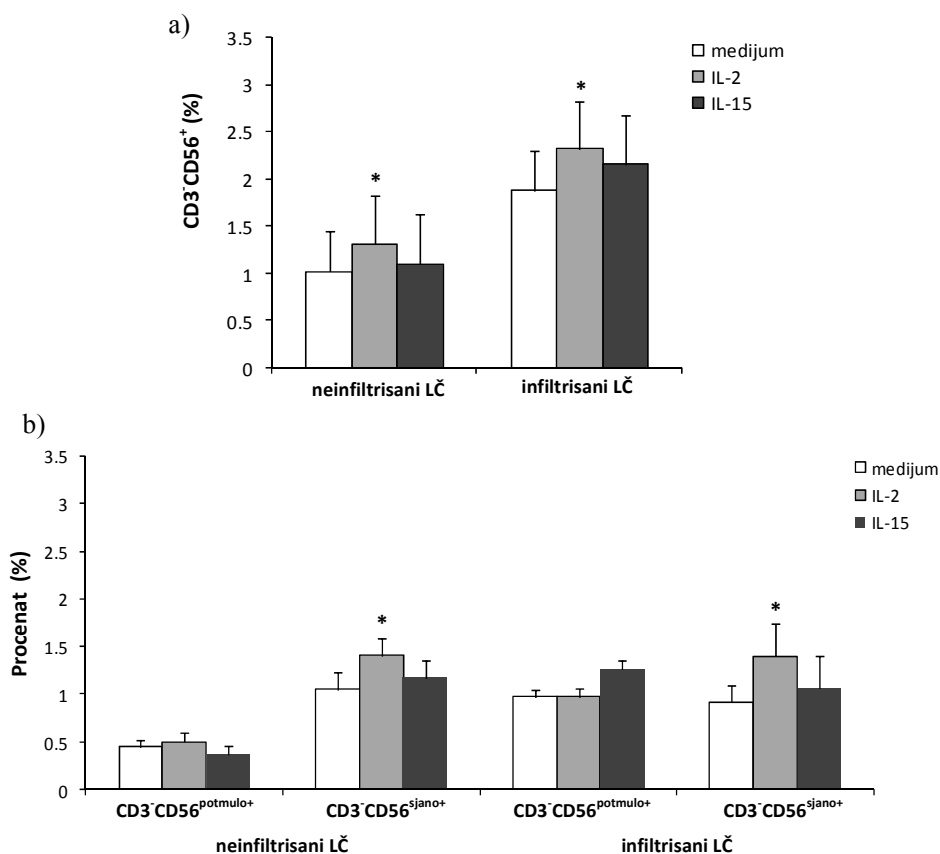
funkcionalno zrelog perforina mase 60KD (Uellner *et al.*, 1997). Western blot metodom nakon tretmana interleukinima IL-2 i IL-15 detektovano je statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećanje ekspresije ukupnog perforina u odnosu na kontrolni tretman medijumom i kod neinfiltrisanih i kod tumor-infiltrisanih regionalnih LČ (Slika 14a). Nakon elektroforeze u neredukujućim uslovima, u uzorku proteina izlovanih iz MNC kultivisanih u medijumu uočava se intenzivna traka težine 70KD nezrelije i slabo uočljiva traka 60KD frakcije funkcionalno zrelog perforina, dok se nakon tretmana interleukinima IL-2 i IL-15 nivo zrelije (60KD) frakcije povećava kod uzoraka poreklom iz obe grupe regionalnih LČ (Slika 14b).



Slika 14. Povećanje nivoa ukupnog proteina perforina izraženog u odnosu na β aktin nakon 72 sata *in vitro* tretmana MNC neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih LČ obolelih od melanoma interleukinima IL-2 (200 IU/ml) i IL-15 (25 ng/ml) u odnosu na kontrolni tretman (medijum) ($*p \leq 0.05$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) Reprezentativni Westrn blot rezultat ekspresije funkcionalno zrelije (60KD) i nezrelije (70KD) forme perforina

4.5.4 *In vitro* efekti interleukina IL-2 i IL-15 na zastupljenost NK ćelija i njihovih CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija

Nakon 7 dana *in vitro* tretmana MNC regionalnih LČ obolelih od melanoma citokinima IL-2 i IL-15 procenat NK ćelija i njihovih subpopulacija analiziran je na protočnom citometru i poređen u odnosu na kontrolne tretmane medijumom. Nakon tretmana interleukinom IL-2 došlo je do statistički značajnog povećanja ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) procenta CD3⁻CD56⁺ NK ćelija u odnosu na kontrolu i to kod neinfiltrisanih LČ sa 1.02 ± 0.09 % u kontroli na 1.32 ± 0.12 % nakon tretmana, a kod infiltrisanih LČ sa 1.88 ± 0.34 % u kontroli na 2.32 ± 0.34 % nakon tretmana ovim interleukinom (Slika 15a). Za razliku od IL-2, tretmani interleukinom IL-15 nisu doveli do značajne promene procenta CD3⁻CD56⁺ NK ćelija u odnosu na kontrolu kod obe grupe ispitivanih regionalnih LČ (Slika 15a).



Slika 15. a) Povećanje procenta CD3⁻CD56⁺ NK ćelija i njihove b) CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih LČ obolelih od melanoma nakon 7 dana *in vitro* nakon tretmana interleukinom IL-2(200 IU/ml) u odnosu na kontrolu (medijum) (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Procenat CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacije NK ćelija kod obe grupe regionalnih LČ se nije značajno promenio u odnosu na kontrolu nakon tretmana interleukinima IL-2 i IL-15, dok se procenat CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije nakon tretmana interleukinom IL-2 statistički značajno povećao ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) kod neinfiltrisanih LČ sa $1.05 \pm 0.08 \%$ u kontroli na $1.41 \pm 0.09 \%$ i kod infiltrisanih LČ sa $0.92 \pm 0.16 \%$ u kontroli na $1.40 \pm 0.34 \%$ (Slika 15b),

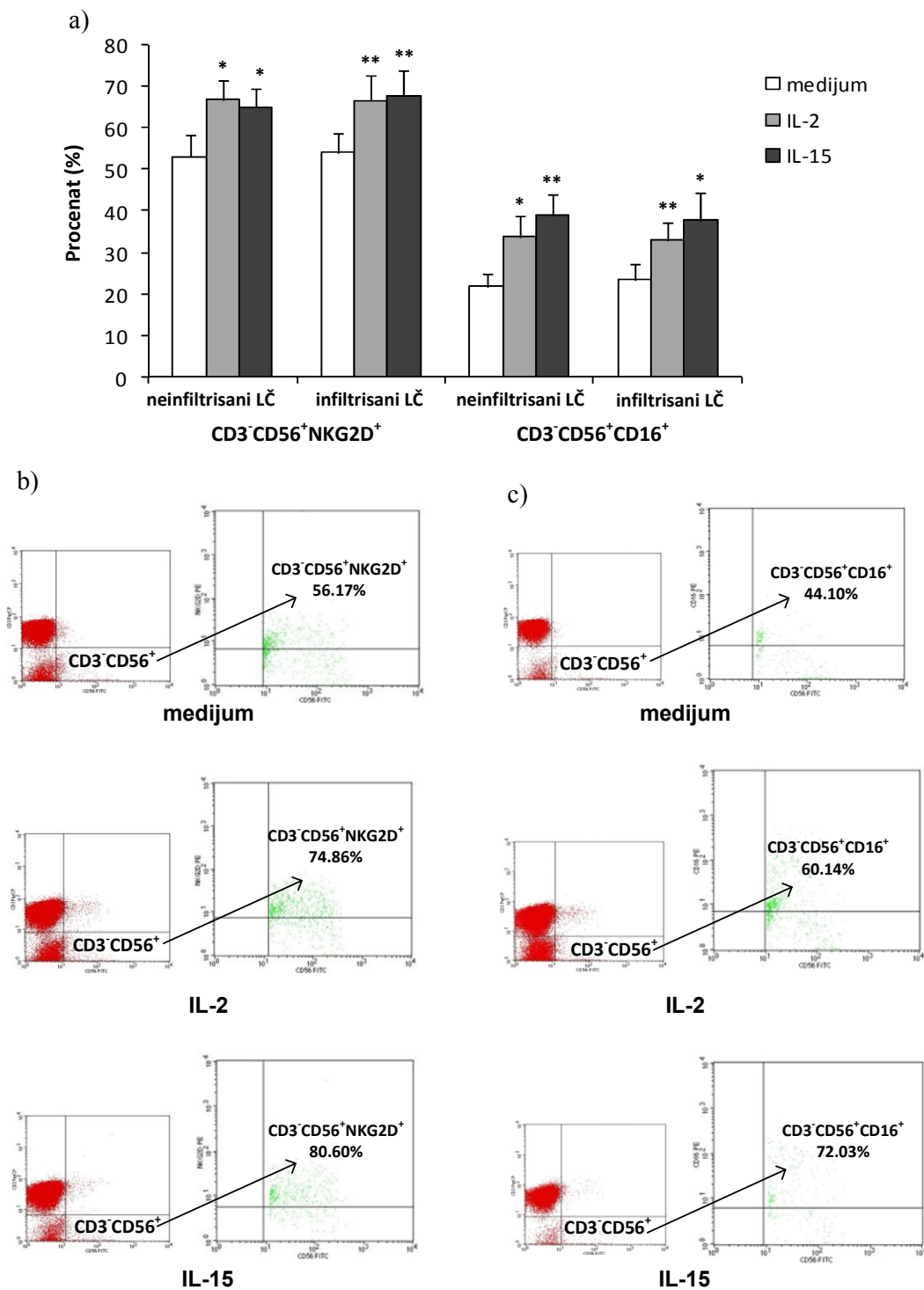
4.5.5 *In vitro* efekti interleukina IL-2 i IL-15 na ekspresiju receptora na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama regionalnih limfnih čvorova

Nakon 7 dana *in vitro* kultivacije MNC izolaovanih iz regionalnih LČ obolelih od melanoma citokinima IL-2 i IL-15, na protočnom citometru je analizirana ekspresija nekoliko receptora u CD3⁻CD56⁺ populaciji NK ćelija i poređena u odnosu na kontrolni tretman medijumom.

Efekti interleukina IL-2 i IL-15 na zastupljenost CD16 i NKG2D aktivacionih receptora

Nakon 7 dana tretmana interleukinima IL-2 i IL-15 došlo je povećanja ekspresije NKG2D aktivacionog receptora u populaciji CD3⁻CD56⁺ NK ćelija obe grupe regionalnih LČ obolelih od melanoma i to kod neinfiltrisanih LČ do statistički značajnog povećanja ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) sa $53.13 \pm 5.32 \%$ u kontroli na $66.87 \pm 4.78 \%$ nakon tretmana sa IL-2 i na $65.07 \pm 4.55 \%$ nakon tretmana sa IL-15, a kod tumor-infiltrisanih LČ do visoko statistički značajnog ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećanja sa $54.04 \pm 4.72 \%$ u kontroli na $66.65 \pm 6.07 \%$ nakon tretmana sa IL-2 i na $67.78 \pm 6.23 \%$ nakon tretmana sa IL-15 (Slika 16a, b).

Ekspresija CD16 aktivacionog receptora u populaciji CD3⁻CD56⁺ NK ćelija obe grupe regionalnih LČ bolesnika sa melanomo se nakon tretmana citokinima povećala i to kod neinfiltrisanih LČ sa $22.71 \pm 3.40 \%$ u kontroli nakon tretmana sa IL-2 statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) na $33.78 \pm 5.14 \%$ i visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) na $38.92 \pm 5.32 \%$ nakon tretmana sa IL-15. Kod infiltrisanih LČ ekspresija CD16 se sa $23.51 \pm 3.72 \%$ u kontroli visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećala na $32.87 \pm 4.45 \%$ nakon tretmana sa IL-2 i statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) na $37.62 \pm 7.04 \%$ nakon tretmana sa IL-15 (Slika 16a, c).



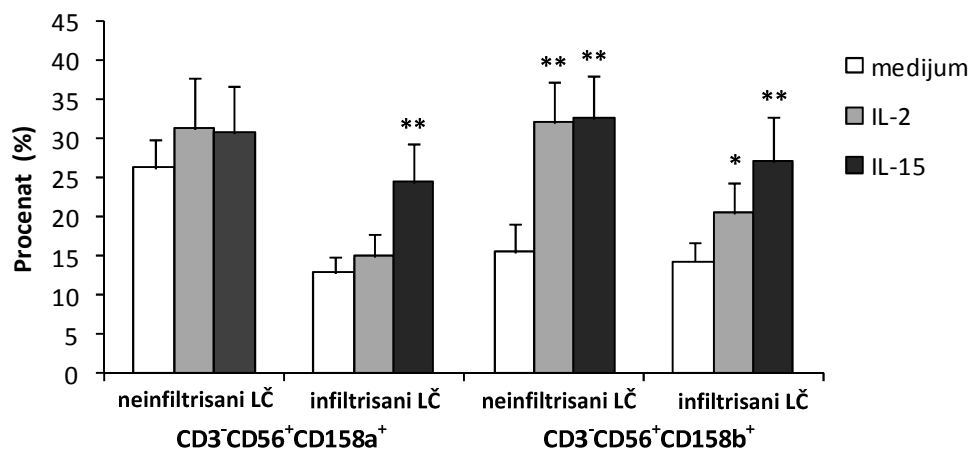
Slika 16. a) Povećanje procenta ekspresije NKG2D i CD16 aktivacionih receptora u populaciji CD3⁺CD56⁺ NK ćelija neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih LČ nakon 7 dana *in vitro* tretmana interleukinima IL-2(200 IU/ml) i IL-15 (25ng/ml) u odnosu na kontrolu (medijum) (*p<0.05, **p<0.01, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) i c) Reprezentativni tačkasti dijagrami dobijeni protočnom citometrijom.

Efekti interleukina IL-2 i IL-15 na zastupljenost CD158a i CD158b inhibitornih KIR receptora

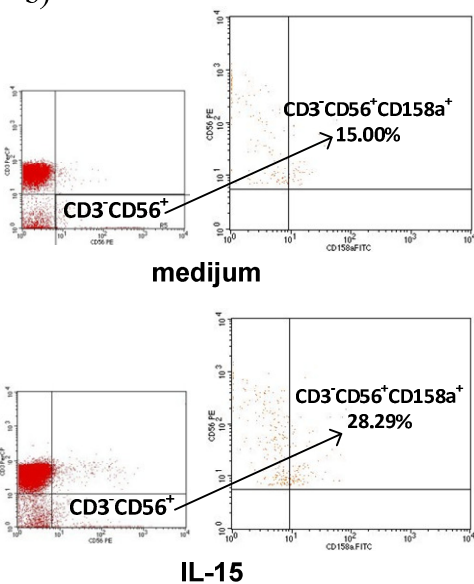
Nakon 7 dana *in vitro* tretmana citokinima IL-2 i IL-15 nije došlo do promene ekspresije CD158a inhibitornog KIR-a u populaciji CD3⁻CD56⁺ NK ćelija neinfiltiranih LČ, dok se na NK ćelijama infiltriranih LČ nakon tretmana interleukinom IL-15 ekspresija ovog receptora dvostruko i visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećala sa 12.89 ± 2.14 % u medijumu na 24.52 ± 4.96 % (Slika 17a, b).

Ekspresija CD158b inhibitornog KIR receptora u populaciji CD3⁻CD56⁺ NK ćelija neinfiltiranih LČ se nakon 7 dana tretmana visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećala sa 15.48 ± 3.69 % u kontroli nakon tretmana sa IL-2 na 32.06 ± 5.23 %, a nakon tretmana sa IL-15 na 32.67 ± 5.56 % (Slika 17a, c). Kod infiltriranih LČ takođe je dobijeno statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećanje ekspresije CD158b KIR-a sa 14.31 ± 2.49 % u kontroli nakon tretmana sa IL-2 na 20.46 ± 3.99 %, a nakon tretmana sa IL-15 visoko statistički značajno povećanje ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) na 26.99 ± 5.96 % (Slika 17a, c).

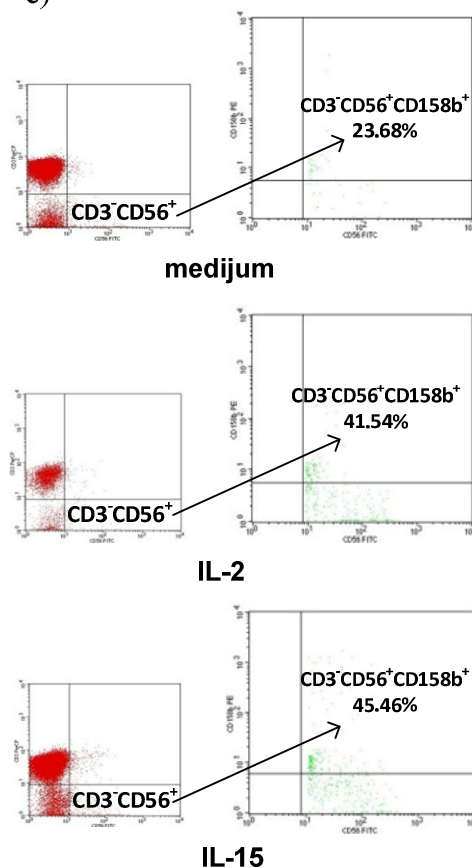
a)



b)



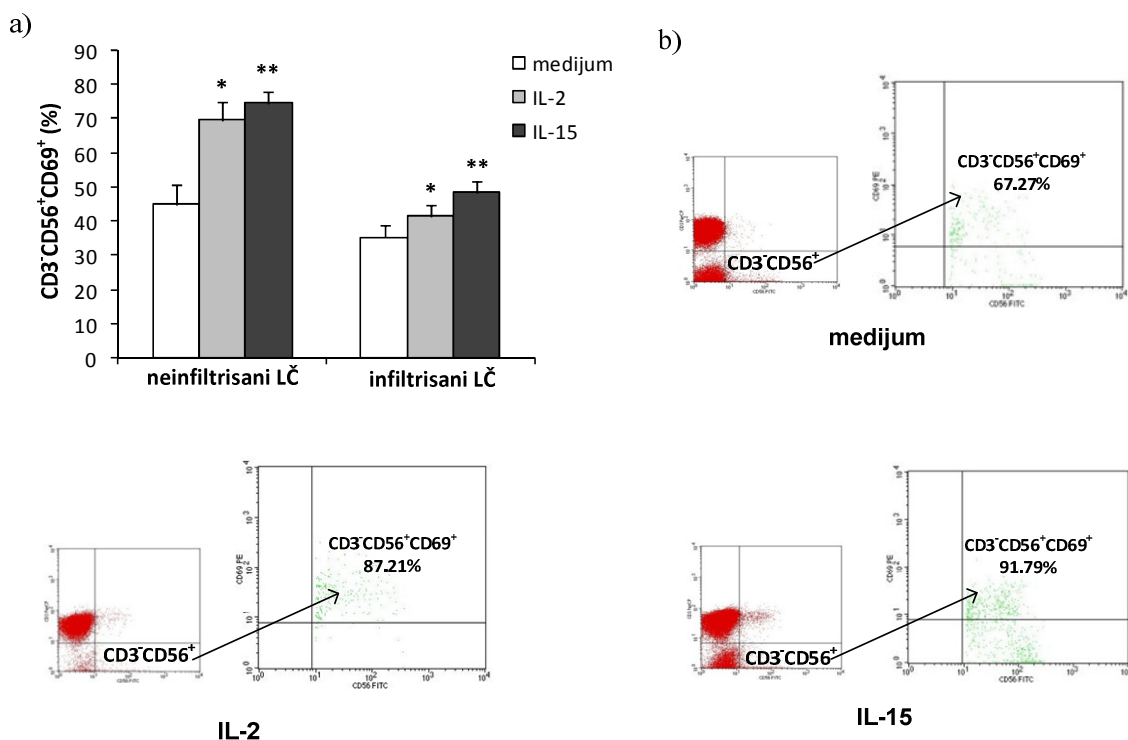
c)



Slika 17. a) Povećanje procenata ekspresije CD158a inhibitorynog KIR receptora u populaciji CD3⁺CD56⁺ NK ćelija infiltrisanih LČ nakon 7 dana *in vitro* tretmana interleukinom IL-15(25 ng/ml) i CD158b KIR-a neinfiltisanih i infiltrisanih regionalnih LČ nakon tretmana interleukinima IL-2(200IU) i IL-15 u odnosu na kontolu (medijum) (*p<0.05, **p<0.01, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) i c) Reprerentativni tačkasti dijagram dobijeni na protočnom citometru.

Efekti interleukina IL-2 i IL-15 na zastupljenost ranog aktivacionog antigena CD69

Procenat ekspresije CD69 ranog aktivacionog antigena u populaciji CD3⁻CD56⁺ NK ćelija neinfiltrisanih i infiltrisanih LČ se nakon 7 dana tretmana interleukinom IL-2 statistički značajno povećao ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) sa vrednosti u medijumu (45.03 ± 5.83 % kod neinfiltrisanih i 35.29 ± 3.74 % kod infiltrisanih LČ) na 69.52 ± 5.30 % kod neinfiltrisanih LČ i na 41.50 ± 3.46 % kod infiltrisanih LČ. Nakon tretmana interleukinom IL-15 ekspresija CD69 se visoko značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećala na 74.49 ± 3.09 % kod neinfiltrisanih LČ i na 48.31 ± 3.32 % kod infiltrisanih LČ (Slika 18a,b).

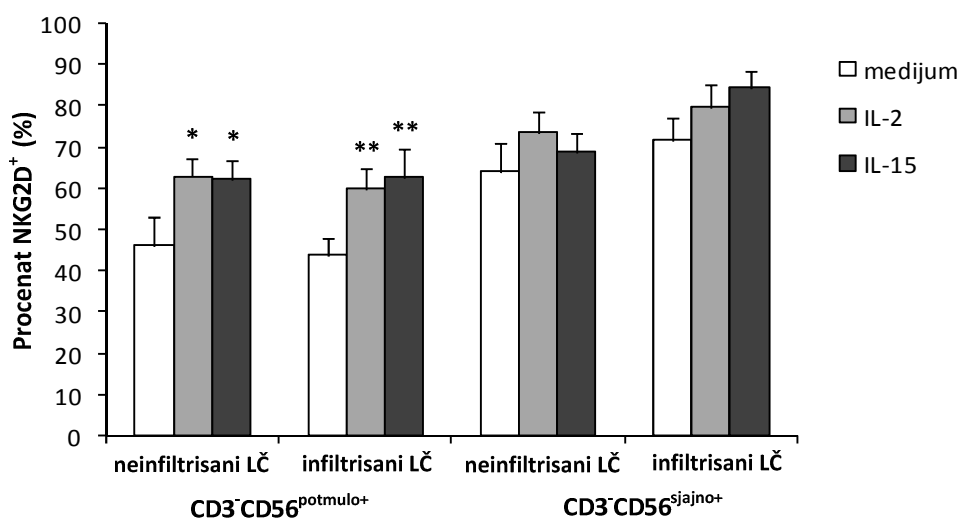


Slika 18. Povećanje procenta ekspresije ranog aktivacionog antigena CD69 u populaciji CD3⁻CD56⁺ NK ćelija regionalnih LČ nakon 7 dana *in vitro* tretmana interleukinima IL-2 (200 IU/ml) i IL-15 (25 ng/ml) u odnosu na kontrolu (medium) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) Reprezentativni tačkasti dijagrami dobijeni na protočnom citometru.

4.5.6 *In vitro* efekti interleukina IL-2 i IL-15 na zastupljenost receptora u CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija

Osim efekata interleukina IL-2 i IL-15 na ekspresiju receptora u populaciji ukupnih CD3⁻CD56⁺ NK ćelija, praćeni su i efekti ovih citokina na ekspresiju receptora u funkcionalno različitim CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija.

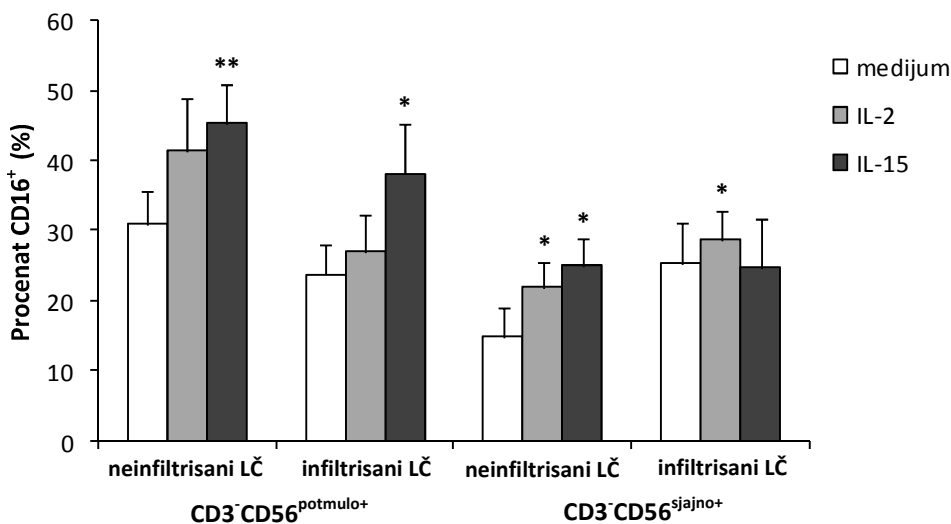
Ekspresija NKG2D aktivacionog receptora u CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija se nakon 7 dana *in vitro* kultivacije statistički značajno povećala ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) kod neinfiltrisanih LČ sa 46.21 ± 7.01 % u kontroli na 62.96 ± 4.54 % nakon tretmana sa IL-2, i na 62.16 ± 4.59 % nakon tretmana sa IL-15. Kod tumor-infiltrisanih LČ, u CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija se takođe povećala ekspresija NKG2D receptora sa 43.70 ± 4.40 % u kontroli na 60.02 ± 5.18 % nakon tretmana sa IL-2 i na 62.55 ± 7.01 % nakon tretmana sa IL-15, pri čemu su ove promene visoko statistički značajne ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) (Slika 19). Za razliku od CD3⁻CD56^{potmulo+}, u CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija ekspresija NKG2D receptora se nije značajno promenila u odnosu na kontrolu nakon tretmana pomoću ispitivanih citokina u obe grupe regionalnih LČ obolelih od melanoma (Slika 19).



Slika 19. Povećanje procenta ekspresije NKG2D aktivacionog receptora u CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih LČ nakon 7 dana *in vitro* kultivacije interleukinima IL-2 (200 IU/ml) i IL-15 (25 ng/ml) u odnosu na kontrolu (medijum) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Nakon 7 dana tretmana, ekspresija CD16 aktivacionog receptora u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji NK ćelija neinfiltrisanih regionalnih LČ se nakon tretmana sa IL-15 visoko statistički značajno povećala ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) sa $31.00 \pm 4.73 \%$ u medijumu na $45.35 \pm 5.65 \%$, a kod infiltrisanih LČ statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) sa $23.71 \pm 4.38 \%$ u kontroli na $38.11 \pm 7.27\%$ (Slika 20). Za razliku od IL-15, tretman sa IL-2 nije statistički značajno ($p \geq 0.05$, Wilcoxon test) povećao ekspresiju CD16 receptora u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji NK ćelija (Slika 20).

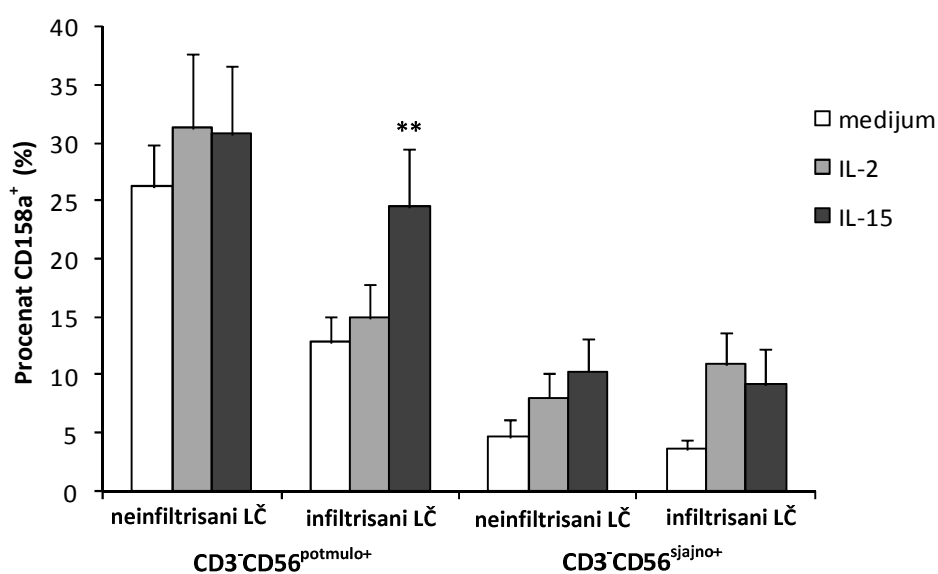
Nakon 7 dana *in vitro* tretmana ekspresija CD16 u $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji NK ćelija neinfiltrisanih LČ se statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećala sa $14.92 \pm 4.07 \%$ u medijumu nakon tretmana sa IL-2 na $21.84 \pm 3.77\%$, a nakon tretmana sa IL-15 na $25.10 \pm 3.90\%$. Kod infiltrisanih LČ u ovoj subpopulaciji tretman sa IL-2 je statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećao ekspresiju CD16 sa $25.29 \pm 6.04\%$ u kontroli na $28.72 \pm 4.16\%$ (Slika 20).



Slika 20. Povećanje procenta ekspresije CD16 aktivacionog receptora u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji NK ćelija neinfiltrisanih i infiltrisanih regionalnih LČ nakon 7 dana *in vitro* kultivacije sa IL-15 (25 ng/ml) u odnosu na kontrolu (medijum). Povećanje ekspresije CD16 receptora u $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji neinfiltrisanih LČ nakon tretmana sa IL-2 (200 IU) i IL-15 i infiltrisanih LČ nakon tretmana sa IL-2, u odnosu na kontrolu (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Nakon 7 dana tretmana kod tumor-infiltriranih LČ došlo je do povećanja ekspresije ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) CD158a inhibitorynog KIR receptora u $CD3^+CD56^{\text{potmulo}+}$ subpopulaciji NK ćelija sa $12.88 \pm 2.15 \%$ u medijumu na $24.52 \pm 4.96 \%$ nakon tretmana sa IL-15 (Slika 21), dok se kod neinfiltriranih LČ ekspresija CD158a u ovoj subpopulaciji NK ćelija nije značajno promenila.

Ekspresija CD158a KIR-a u $CD3^+CD56^{\text{sjajno}+}$ subpopulaciji NK ćelija obe grupe regionalnih LČ obolelih od melanoma se nije značajno promenila nakon tretmana ispitivanim citokinima u odnosu na kontrolu (Slika 21).

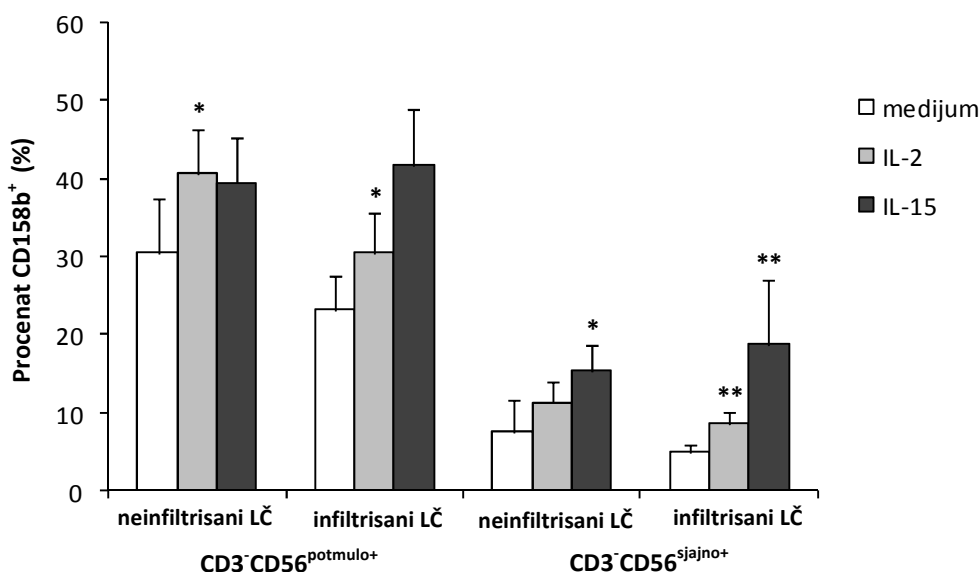


Slika 21. Povećanje procenta ekspresije CD158a inhibitorynog KIR receptora u $CD3^+CD56^{\text{potmulo}+}$ subpopulaciji NK ćelija infiltriranih regionalnih LČ nakon 7 dana *in vitro* tretmana sa IL-15 (25 ng/ml) u odnosu na kontrolu (medijum) (** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Ekspresija CD158b inhibitorynog KIR receptora se nakon 7 dana tretmana sa IL-2 statistički značajno povećala ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) u $CD3^+CD56^{\text{potmulo}+}$ subpopulaciji NK ćelija neinfiltriranih LČ sa $30.42 \pm 7.12 \%$ u kontroli na $40.73 \pm 5.78 \%$, a kod infiltriranih LČ sa $23.25 \pm 5.18 \%$ u kontroli na $30.53 \pm 5.18 \%$ (Slika 22). Nakon tretmana sa IL-15 kod obe grupe LČ dobijena su povećanja ekspresije koja nisu statistički značajna u odnosu na kontrolu ($p \geq 0.05$, Wilcoxon test) (Slika 22).

Ekspresija CD158b KIR receptora u $CD3^+CD56^{\text{sjajno}+}$ subpopulaciji NK ćelija se nakon tretmana sa IL-15 kod neinfiltriranih LČ statistički značajno

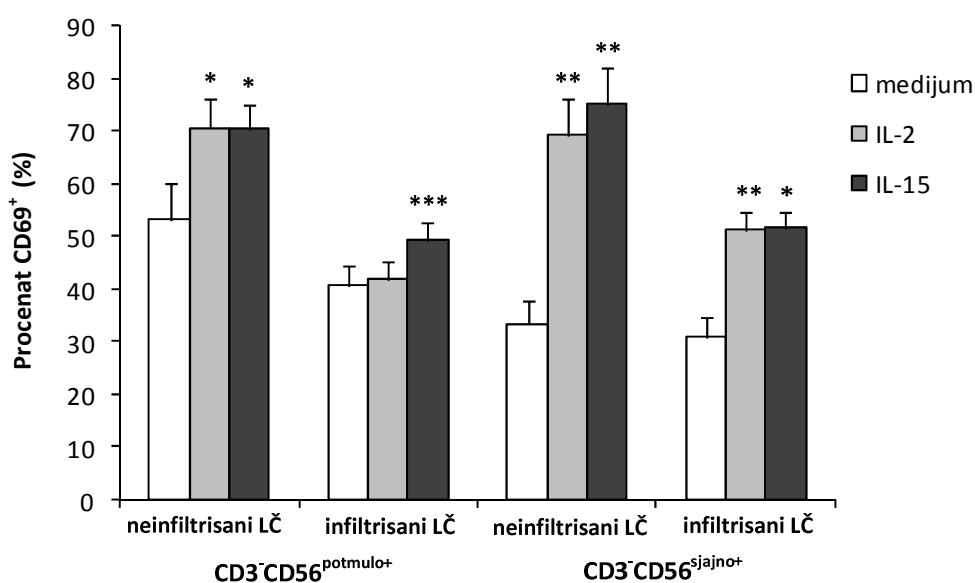
povećala ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) sa $7.52 \pm 4.09 \%$ u medijumu na $15.32 \pm 3.36 \%$, a kod tumor-infiltriranih LČ visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) sa $4.85 \pm 1.14 \%$ medijumu na $18.75 \pm 8.43 \%$ (Slika 22). Nakon tretmana sa IL-2 kod neinfiltriranih LČ povećanje ekspresije CD158b na $11.29 \pm 2.79 \%$ nije dostiglo statističku značajnost ($p \geq 0.05$, Wilcoxon test), dok je kod infiltriranih LČ povećanje na $8.56 \pm 1.59 \%$ visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) (Slika 22).



Slika 22. Povećanje procenta ekspresije CD158b inhibitornog KIR receptora u CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija neinfiltriranih i infiltriranih regionalnih LČ nakon 7 dana *in vitro* tretmana sa IL-2 (200 IU/ml) u odnosu na kontrolu (medijum). Povećanje ekspresije CD158b KIR-a u CD3⁺CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija neinfiltriranih LČ nakon 7 dana tretmana sa IL-15 (25 ng/ml) i infiltriranih LČ nakon tretmana interleukinima IL-2 i IL-15, u odnosu na kontrolu (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Ekspresija CD69 ranog aktivacionog antigena u CD3⁺CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija neinfiltriranih regionalnih LČ se statistički značajno povećala ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) sa $53.17 \pm 7.00 \%$ u medijumu na $70.61 \pm 5.47 \%$ nakon tretmana sa IL-2 i na $70.52 \pm 4.42 \%$ nakon tretmana sa IL-15. Slično tome kod tumor-infiltriranih regionalnih LČ dobijeni je visoko statistički značajno povećanje ($p \leq 0.005$, Wilcoxon test) ekspresije CD69 antigena sa $40.58 \pm 3.74 \%$ u medijumu na $49.31 \pm 3.32 \%$ nakon tretmana sa IL-15 (Slika 23).

U $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji NK ćelija neinfiltrisanih regionalnih LČ ekspresija CD69 aktivacionog antigena se statistički značajno povećala ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) sa $33.41 \pm 4.37\%$ u kontroli na $69.16 \pm 3.32\%$ nakon tretmana sa IL-2 i na $75.03 \pm 7.09\%$ nakon tretmana sa IL-15 (Slika 23). Slični rezultati dobijeni su i kod infiltrisanih LČ gde se ekspresija CD69 antigena sa $30.97 \pm 3.74\%$ u kontroli visoko statistički značajno ($p \leq 0.01$, Wilcoxon test) povećala nakon tretmana sa IL-2 na $51.07 \pm 3.46\%$ i statistički značajno ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) na $51.52 \pm 0.01\%$ nakon tretmana sa IL-15 (Slika 23).



Slika 23. Povećanje procenta ekspresije ranog aktivacionog antigena CD69 u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji NK ćelija neinfiltrisanih LČ nakon 7 dana *in vitro* tretmana sa IL-2 (200IU/ml) i IL-15 (25ng/ml) i infiltrisanih regionalnih LČ nakon tretmana sa IL-15, u odnosu na kontrolu (medijum). Povećanje ekspresije CD69 antigena u $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji NK ćelija neinfiltrisanih i infiltrisanih LČ nakon 7 dana tretmana sa IL-2 i IL-15, u odnosu na kontrolu (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.005$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

4.6 Poređenje efekta interliukina IL-2 i IL-15 na citotoksičnu aktivnost NK ćelija neinfiltrisanih i tumor-infiltrisanih limfnih čvorova

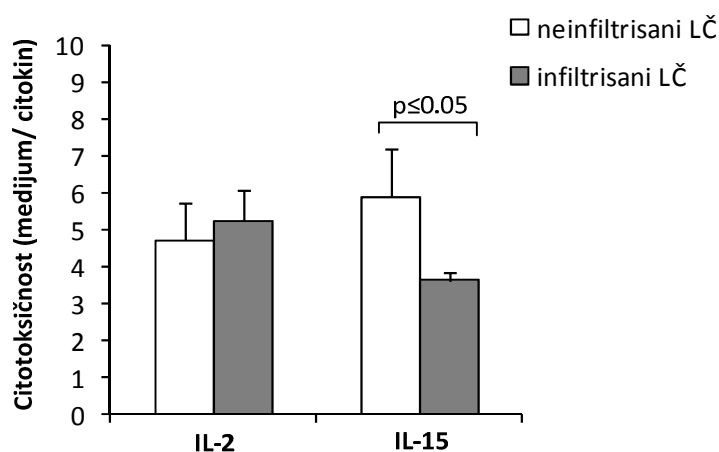
Da bi se nivo povećanja citotoksične aktivnosti NK ćelija uporedio između dve grupe regionalnih LČ obolelih od melanoma izračunati su indeksi dobijeni kada se vrednost NK ćelijske aktivnosti u svakoj grupi posle tretmana citokinom podeli sa

vrednošću NK ćelijske aktivnosti dobijene posle tretmana samom medijumom prema sledećoj formuli:

Citotoksična aktivnost NK ćelija posle tretmana citokinom

Citotoksična aktivnost NK ćelija u medijumu

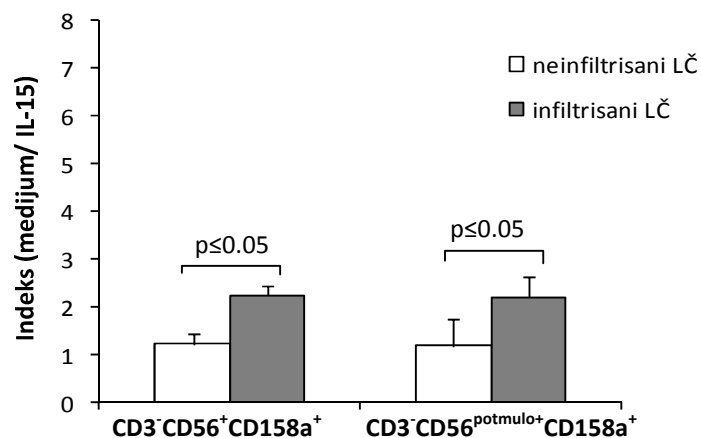
Nakon 7 dana tretmana interleukinom IL-2 dobijen je sličan indeks promene citotoksične aktivnosti NK ćelija kod neinfiltrisanih (4.69 ± 1.01) i kod infiltrisanih (5.23 ± 1.31) LČ, dok je nakon 7 dana tretmana interleukinom IL-15 kod neinfiltrisanih LČ (5.87 ± 1.01) dobijen statistički značajno ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) veći indeks povećanja NK-citotoksičnosti u odnosu na tumor-infiltrisane (3.62 ± 0.24) regionalne LČ (Slika 24).



Slika 24. Veći indeks povećanja citotoksične aktivnosti NK ćelija neinfiltrisanih u odnosu na infiltrisane LČ nakon 7 dana tretmana interleukinom IL-15 (* $p \leq 0.05$, Mann Whitney test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

Indeks promene ekspresije receptora nakon tretmana citokinima je izračunavan po istom principu kao i za citotoksičnu aktivnost NK ćelija. Analizom indeksa promene ekspresije CD158a inhibitornog KIR receptora u $CD3^+CD56^+$ populaciji NK ćelija nakon tretmana interleukinom IL-15 kod tumor-infiltrisanih LČ dobijen je statistički u značajno veći ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) indeks promene ekspresije u odnosu na neinfiltrisane LČ (vrednosti indeksa su 1.21 ± 0.21 za neinfiltrisane i 2.23 ± 0.58 za infiltrisane LČ) (Slika 25). Sličan nalaz dobijen je i analizom indeksa promene

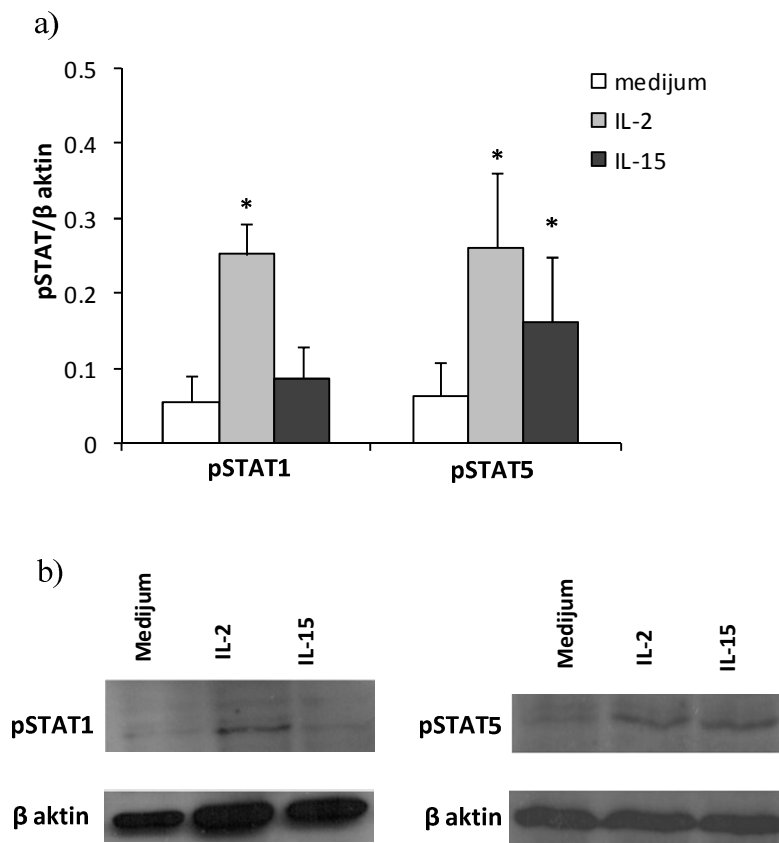
ekspresije CD158a inhibitornog KIR receptora u $CD3^-CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji NK ćelija gde je indeks promene ekspresije dobijen u infiltrisanim LČ (2.19 ± 0.44) statistički u značajno veći ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test) u odnosu na indeks dobijen kod neinfiltrisanih LČ (1.17 ± 0.19) (Slika 25).



Slika 25. Veći indeks promene ekspresije CD158a inhibitornog KIR receptora u populaciji $CD3^+CD56^+$ i u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji NK ćelija infiltrisanih regionalnih LČ u odnosu na neinfiltrisane regionalne LČ nakon 7 dana *in vitro* tretmana interleukinom IL-15 ($p \leq 0.05$, Mann Whitney test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama.

4.7 *In vitro* efekti interleukina IL-2 i IL-15 na ekspresiju STAT1 i STAT5 signalnih molekula

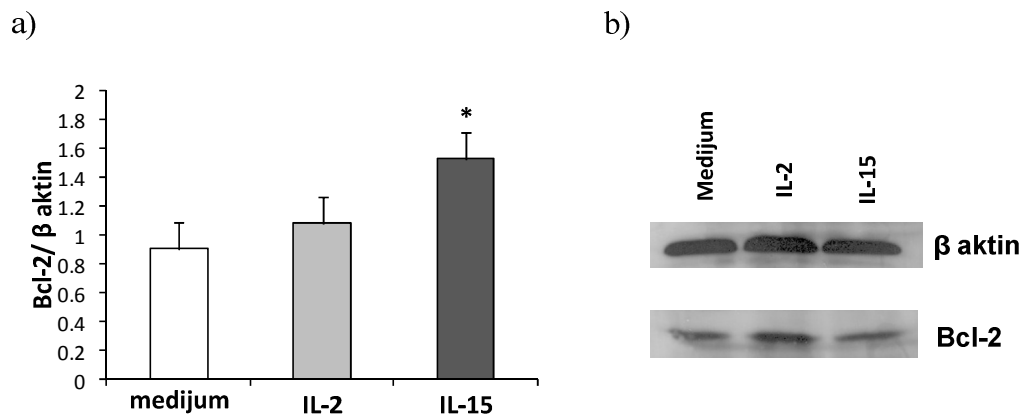
Western blot metodom nakon 72h *in vitro* kultivacije praćena je indukcija fosforilisane forme STAT1 i STAT5 signalnih molekula u regionalnim LČ bolesnika sa melanomom. Ekspresija STAT1p i STAT5p signalnih molekula izražena je u odnosu na β aktin i pokazano je da nakon tretmana interleukinom IL-2 dolazi do statistički značajnog ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test) povećanja nivoa pSTAT1 i pSTAT5 molekula u odnosu na kontrolni tretman medijumom, dok tretman interleukinom IL-15 aktivira specifično povećava nivo pSTAT5 molekula kod ispitivanih regionalnih LČ obolelih od melanoma (Slika 26a,b).



Slika 26. Povećanje ekspresije fosforilisanih formi signalnih molekula u regionalnim LČ izraženo u odnosu na β aktin: pSTAT1 nakon 72 sata *in vitro* tretmana interleukinom IL-2 (200 IU/ml) i pSTAT5 nakon 72 sata tretmana interleukinima IL-2 i IL-15 (25 ng/ml) (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test) u odnosu na kontrolu (medijum). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) Reprerentativni Western blot rezultat.

4.8 *In vitro* efekti interleukina IL-2 i IL-15 na ekspresiju Bcl-2 molekula

Da bi se dobio bolji uvid u delovanje ovih citokina na apoptozu nakon 72 sata Western blot metodom je praćena ekspresija antiapoptotskog Bcl-2 molekula i izražena u odnosu na β aktin. Nakon 72 sata tretmana pokazano je povećanje ekspresije Bcl-2 molekula nakon tretmana interleukinom IL-15, dok tretman interleukinom IL-2 nije promenio nivo ovog molekula u odnosu na kontrolni tretman (medijum) (Slika 27 a,b).



Slika 27. a) Povećanje ekspresije Bcl-2 antiapoptotskog molekula u odnosu na β aktin nakon 72 h *in vitro* tretmana MNC regionalnih LČ obolelih od melanoma IL-15 (25 ng/ml) u odnosu na kontrolu (medijum) (* $p \leq 0.05$, Wilcoxon test). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim greškama. b) Reprerzantativni Western blot rezultat.

5 Diskusija

NK ćelije kao efektorske ćelije sistema urođene imunosti predstavljaju prvu liniju odbrane organizma od malignih tumora te su funkcija i fenotipska svojstava NK ćelija bolesnika sa malignitetima često proučavani. Kod obolelih od malignih bolesti do sada su NK ćelije izučavane uglavnom u perifernoj krvi (Sibbitt *et al.*, 1984; Siedell *et al.*, 1998; Konjević *et al.*, 2007; 2010; 2012; Szczepanski *et al.*, 2009) dok su NK ćelije regionalnih limfnih čvorova obolelih, slabo ispitivane bez obzira na značaj limfnih čvorova kao prve barijere u limfogenom širenju tumora. Malobrojni podaci o NK ćelijama regionalnih limfnih čvorova su dobijeni na životinjskim modelima (Chen *et al.*, 2005), dok efekat prisustva ćelija tumora u limfnom čvoru na funkciju i fenotip NK ćelija do sada nije u potpunosti razjašnjen. Usled etičkih i praktičnih problema tkivo regionalnih limfnih čvorova zdravih osoba je teško dostupno. Iz tih razloga prave kontrolne vrednosti za funkciju NK ćelija, zastupljenost subpopulacija NK ćelija i fenotip NK ćelija u limfnim čvorovima zdravih osoba nisu još uvek precizno ustanovljene. Dosadašnje studije koje su vršene na ljudima prikazivale su fenotip NK ćelija limfnih čvorova u fiziološkim uslovima, a da su pri tome uzorci tkiva uzimani uglavnom nakon različitih hirurških intervencija (Frerlazzo *et al.*, 2004; Romagnani *et al.*, 2007). Do sada nisu vršena poređenja u funkcionalnim i imunofenotipskim karakteristikama NK ćelija između tumor-infiltrisanih i neinfiltrisanih regionalnih limfnih čvorova obolelih od malignih tumora, te su rezultati dobijeni u ovom radu na obolelima od melanoma prvi podaci te vrste dobijeni za regionalne limfne čvorove ne samo kod melanoma, već i kod malignih tumora uopšte.

U ovom istraživanju poređene su dve važne funkcionalne karakteristike NK ćelija u tumor-infiltrisanim i neinfiltrisanim regionalnim limfnim čvorova obolelih od melanoma: citotoksična funkcija NK ćelija i produkcija IFN γ u CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK ćelijama. U malignitetima je do sada ispitivana citotoksična funkcija uglavnom NK ćelija periferne krvi, pri čemu je pokazano da je NK ćelijska citotoksičnost često snižena u odmaklim stadijumima bolesti u odnosu na zdrave osobe (Sibbitt *et al.*, 1984; Siedell *et al.*, 1998; Konjevic *et al.*, 2012). Značaj očuvane citotoksične funkcije NK ćelija u sprečavanju pojave maligniteta je pokazan u retrospektivnim epidemiološkim

istraživanjima koja su pokazala da snižena NK-citotoksičnost predstavlja faktor rizika za pojavu malignih tumora (Imai *et al.*, 2000). U ovom radu ispitivanjem citotoksične aktivnosti NK ćelija prema NK-osetljivoj K562 ćelijskoj liniji eritromijeloidne leukemije kod obe grupe regionalnih limfnih čvorova dobijene su slične vrednosti NK-citotoksičnosti. Dobijeni rezultati za citotoksičnost NK ćelija regionalnih limfnih čvorova kod melanoma su u saglasnosti sa niskom citotoksičnošću ove subpopulacije limfocita u limfnim čvorovima u odnosu na citotoksičnost NK ćelija u perifernoj krvi (Ferlazzo *et al.*, 2004; Romagnano *et al.*, 2007). Isto tako, ove vrednosti citotoksičnosti dobijene za regionalne limfne čvorove su niže od citotoksičnosti NK ćelija periferne krvi bolesnika sa melanomom koje su dobijene u našim prethodnim istraživanjima (Konjević *et al.*, 2007). Za razliku od NK ćelija periferne krvi gde je kod metastatskog melanoma pokazano smanjenje citotoksične funkcije NK ćelija u odnosu na zdrave osobe i na manje uznapredovale kliničke stadijume bolesti (Sibbitt *et al.*, 1984; Siedell *et al.*, 1998; Konjević *et al.*, 2007; Mirjačić Martnović *et al.*, 2011), invazija tumora u regionalne limfne čvorove nije dovela do smanjenja citotoksične aktivnosti NK ćelija tumor-infiltriranih u odnosu na neinfiltrirane regionalne limfne čvorove.

Pored citotoksične aktivnosti, druga funkcionalna karakteristika važna za antitumorsko dejstvo NK ćelija, je njihova imunoregulatorna uloga čiji je jedan od aspekata sinteza $IFN\gamma$ čime NK ćelije deluju na sintezu Th1 citokina i na sazrevanje dendritičnih ćelija (Biron *et al.*, 1999; Martín-Fontecha *et al.*, 2004; Morandi *et al.*, 2006). Analizom na protočnom citometru nakon stimulacije PMA i jonomicinom, dobijen je niži procenat $CD3^+CD56^+$ NK ćelija koje proizvode $IFN\gamma$ u infiltriranim u odnosu na neinfiltrirane limfne čvorove obolelih od melanoma. Detaljna analiza produkcije $IFN\gamma$ u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ i $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulacijama NK ćelija, pokazala je da je snižen nivo ovog citokina u tumor-infiltriranim limfnim čvorovima uslovljen smanjenom sposobnošću sinteze $IFN\gamma$ u imunoregulatornoj $CD3^+CD56^{sjajno+}$ subpopulaciji NK ćelija. Produkcija $IFN\gamma$ dobijena u subpopulaciji citotoksičnih $CD3^+CD56^{potmulo+}$ NK ćelija koja se prema najnovijim saznanjima odlikuje sposobnošću da ubrzo nakon stimulacije sintetišu $IFN\gamma$ (DeMaria *et al.*, 2010) je slična kod obe grupe regionalnih limfnih čvorova.

Smanjena produkcija IFN γ u NK ćelijama tumor-infiltrisanih regionalnih limfnih čvorova najverovatnije je uslovljena prisutvom imunosupresivnih molekula IL-10, TGF- β i PGE2 koje mogu da sintetišu i luče tumorske ćelije (Yue *et al.* 1997; Kubica i Brewer, 2012) u limfnom čvoru kao i imunosupresivne ćelije imunskog sistema kao što su MDSC, Treg, TAM i tolerogene dendritične ćelije (Geissmann *et al.*, 2002; Cochran *et al.*, 2006; Umansky i Sevko, 2013). Ovi imunosupresivni citokini inhibiraju sazrevanje dendritičnih ćelija, stimulišu stvaranje imunosupresivnih tolerogenih dendritičnih ćelija, sprečavaju aktivaciju T ćelija i na taj način, posredno, i sintezu IFN γ u NK ćelijama (Takayama *et al.*, 2001). Pored toga, u ćelijama melanoma konstitutivno aktivan Ras/Raf signalni put, posredstvom NF- κ B transkripcionog faktora indukuje produkciju hemokina i drugih proinflamatornih medijatora kao što su TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8. Prisustvo ovih faktora u tumorskom tkivu dovodi do nakupljanja imunosupresivnih ćelija koje sintezom mogu da IL-10 i TGF- β inhibiraju sintezu IFN γ (Gabrilovich i Nagaraj, 2009; Umansky i Sveko, 2012). Snižen procenat NK ćelja koje sintetišu IFN γ u tumor-infiltrisanim limfnim čvorovima koji je dobijen u ovom radu u saglasnosti je sa objavljenim podacima o sniženom nivou IFN γ u celokupnoj populaciji mononuklearnih ćelija u limfnim čvorovima sa metastatskim promenama (Leong *et al.*, 2002). U literaturi takođe postoje podaci o sniženom nivou produkcije IFN γ i u NK ćelijama u tumor-infiltrirajućim limfocitima (TIL) (Platonova *et al.*, 2011). Za sniženu produkciju IFN γ u tumor-infiltrisanim limfnim čvorovima koja je dobijena u ovom radu značajan je i podatak dobijen u jednoj studiji koji govori o povećanom nivou Th2 citokina (IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13) kao i hemkina (CCL15, CCL11 i CXCL-10) u perifernoj krvi bolesnika sa metastatskim melanomom u odnosu na serume zdravih kontrolenih osoba i bolesnika na kojima je izvršena hirurška resekcija melanoma, a u kojima prevladavaju Th1 citokini. Prema ovoj studiji Th2 citokinski profil nađen kod metastatskog melanoma je posledica povećanog nivoa VEGF koji produkuje tumor (Nevala *et al.*, 2009).

Veći procenat CD3⁻CD56⁺ NK ćelija u tumor-infiltrisanim u odnosu na neinfiltrisane limfne čvorove obolelih od melanoma koji je dobijen u ovom radu, može da ukaže na to da je metastaziranje ovog tumora u regionalne limfne čvorove praćeno i invazijom NK ćelija u limfne čvorove zahvaćene tumorom. Do sada su objavljene samo dve studije koje se bave analizom subpopulacija limfocita u regionalnim limfnim

čvorovima bolesnika sa malignim tumorima, a koje takođe ukazuju na veću zastupljenost celokupne CD56⁺ subpopulacije limfocita u tumor-infiltrisanim limfnim čvorovima karcinoma dojke (Morton *et al.*, 1986) i melanoma (Farzad *et al.*, 1990).

Pored povećanog procenta CD3⁻CD56⁺ NK ćelija, analizom funkcionalnih subpopulacija NK ćelija u regionalnim limfnim čvorovima bolesnika sa melanomom pokazana je veća zastupljenost CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacije u infiltrisanim u odnosu na neinfiltrisane limfne čvorove. S obzirom na to da su NK ćelije veoma pokretljive i da recirkulišu u i van limfoidnih organa (Garrod *et al.*, 2007; Walzer i Vivier, 2011), može se pretpostaviti da kod obolelih od melanoma NK ćelije vrše invaziju u regionalne limfne čvorove zahvaćene tumorom gde mogu da liziraju maligne ćelije, intereaguju sa susednim antigen prezentujućim ćelijama, svojom citotoksičnošću i sintezom IFN γ pospeše efikasnost prezentacije antigena i deluju stimulativno na aktivaciju i sazrevanje dendritičnih ćelija (Martín-Fontecha *et al.*, 2004). U ovom radu pored korelacione povezanosti broja tumor-infiltrisanih regionalnih limfnih čvorova (N) sa zastupljenošću CD3⁻CD56⁺ NK ćelija u limfnom čvoru, pokazana je i pozitivna korelacija zastupljenosti NK ćelija u limfnom čvoru sa Klark kliničkim parametrom koji opisuje invazivnost melanoma u anatomske slojeve kože. Povećana zastupljenost CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelija u tumor-infiltrisanim limfnim čvorovima može da se sagleda i u svetlu novijih saznanja o diferencijaciji nezrelih CD3⁻CD56^{sjajno+} u funkcionalno zrelije CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelije u reaktivnim limfnim čvorovima, koje zatim napuštaju limfni čvor i cirkulišu do perifernih tkiva u kojima se odvija određeni patološki proces zapaljenje ili maligna transformacija (Romagnani *et al.*, 2007). U tom smislu, pokazano je i da se CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelije u eksperimentalnim uslovima *in vitro* kultivacije sa normalnim i maligno transformisanim fibroblastima diferenciraju u CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelije (Chan *et al.*, 2007, Balsamo *et al.*, 2009). Pored diferencijacije CD3⁻CD56^{sjajno+} u CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelije, povećanje procenta CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelija može biti posledica i njihove migracije putem periferne krvi i limfe u limfne čvorove zahvaćene tumorom (Carrega i Ferlazzo, 2012).

Sa gledišta uticaja neposrednog prisustva malignih ćelija na fenotip i funkciju NK ćelija, do sada su analizirane uglavnom NK ćelije u tumorskom tkivu. U TIL nesitnoćelijskog karcinoma pluća (NSCLC, engl. Non Small Cell Lung Cancer)

pokazana je veća zastupljenost NK ćelija u većim u odnosu na manje tumore (Carrega *et al.*, 2008). Međutim, postojeći podaci o subpopulacijama NK ćelija u populaciji TIL su različiti za različite vrste tumora, pa je tako kod karcinoma bubrega pokazana povećana zastupljenost CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacije u TIL koji sadrže veliki procenat NK ćelija u odnosu na TIL u kojima CD3⁻CD56⁺ NK ćelije predstavljaju manji udeo populacije limfocita (Schleypen *et al.*, 2006). Nasuprot ovim podacima, u pomenutoj studiji rađenoj na NSCLC nađena je veću zastupljenost CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije NK ćelija u TIL (Carrega *et al.*, 2008).

Analiza ekspresije NKG2D aktivacionog receptora u populaciji CD3⁻CD56⁺ NK ćelija je pokazala sličnu zastupljenost ovog receptora koji je svojstven kako funkcionalno zrelijim tako i nezrelijim NK ćelijama (Yokoyama *et al.*, 2004; Huntington *et al.* 2007; Zafirova *et al.*, 2011), u neinfiltrisanim i u tumor-infiltrisanim limfnim čvorovima. Pored toga, u ovom radu dobijena je i slična ekspresija NKG2D receptora u obe ispitivane grupe regionalnih limfnih čvorova i u CD3⁻CD56^{potmulo+} i u CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija. Za CD16 aktivacioni receptor koji je za razliku od NKG2D svojstven zrelijim razvojnim stadijumima u ovom radu je dobijena veća zastupljenost u tumor-infiltrisanim u odnosu na neinfiltrisane limfne čvorove. Međutim, bez obzira na veću zastupljenost CD16 receptora u populaciji ukupnih CD3⁻CD56⁺ NK ćelija u infiltrisanim limfnim čvorovima nije zapažena razlika u njegovoj zastupljenosti u funkcionalno različitim CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija. Pored toga, bez obzira na povećanu ekspresiju CD16 aktivacionog receptora na NK ćelijama tumor-infiltrisanih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom i na veću zastupljenost CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacije NK ćelija u ovoj grupi regionalnih limfnih čvorova, njihova citotoksična funkcija je slična kao i kod NK ćelija neinfiltrisanih limfnih čvorova. Pokazana neizmenjena citotoksičnost zajedno sa sličnom ekspresijom NKG2D aktivacionog receptora može da ukaže na veći značaj NKG2D u odnosu na CD16 aktivacioni receptor na citotoksičnu funkciju NK ćelija regionalnih limfnih čvorova.

Do sada je ekspresija NKG2D i CD16 aktivacionih receptora na NK ćelijama u melanomu izučavana uglavnom u perifernoj krvi pri čemu je nađeno sniženje ekspresije oba receptora kod bolesnika sa metastatskim melanomom u odnosu na zdrave kontrolne

osobe (Konjević *et al.*, 2007; Holtan *et al.*, 2011). U literaturi postoje podaci uglavnom o ekspresiji receptora na NK ćelijama u tumorskom tkivu, ali ne i na NK ćelijama tumor-infiltriranih i neinfiltriranih regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa malignitetima. Jedna studija je pokazala da u TIL u melanomu CD3⁻CD56⁺ NK ćelije kako na obodima tumora tako i unutar tumora ispoljavaju NKG2D aktivacioni receptor (Maccalli *et al.*, 2007). O ekspresiji CD16 na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama TIL podaci su različiti za različite tumore, pa je u TIL karcinoma bubrega pokazan veći udeo CD16⁺ NK ćelja u većim tumorima, a za NSCLC pored podataka o sniženoj ekspresiji CD16 na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama u tumoru (Platonova *et al.*, 2011) postoje i nedavno objavljeni podaci o veoma sličnoj ekspresiji ovog receptora na NK ćelijama u tumoru i u okolnom tkivu (Gillard-Bocquet *et al.*, 2013).

Ekspresija inhibitornih KIR receptora je posebno značajna kod melanoma s obzirom na to da je njihova povećana ekspresije na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama periferne krvi često povezana sa većom verovatnoćom obolevanja od ovog tumora (Naumova *et al.*, 2007). Pored toga pokazan je i uticaj ekspresije parova KIR2DL alela i njima komplemantarnih HLA-C alela na verovatnoću obolevanja od melanoma kao i na prognozu toka bolesti (Campillo *et al.*, 2013). CD158a (KIR2DL1) i CD158b (KIR2DL2/3) su dva najzastupljenija inhibitorna KIR receptora na NK ćelijama čoveka. Poznato je da su inhibitorni KIR receptori više prisutni na NK ćelijama u perifernoj krvi u odnosu na NK ćelije u limfnim čvorovima (Ferlazzo *et al.*, 2004; Freud i Caligiuri 2006) i da su KIR receptori svojstveniji zrelijoj CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija (Cooper *et al.*, 2001a). U ovom istraživanju je pokazana povećana ekspresija CD158b inhibitornog KIR receptora na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama u tumor-infiltriranim u odnosu na neinfiltrirane regionalne limfne čvorove obolelih od melanoma, dok su za CD158a inhibitorni KIR dobijene slične niske vrednosti ekspresije u obe grupe ispitivanih limfnih čvorova. Pored toga, pokazano je i da ekspresija CD158b KIR-a na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama pokazuje umerenu do dobru pozitivnu korelaciju povezanost sa brojem limfnih čvorova zahvaćenih tumorom i sa Klark kliničkim parametrom invazivnosti primarnog tumora. S obzirom na to da inhibitorni KIR receptori vezivanjem za MHC molekule klase I inhibiraju lizu ciljnih ćelija, posledice povećanog prisustva inhibitornih KIR receptora na NK ćelijama tumor-infiltriranih regionalnih limfnih čvorova mogu da budu sagledavane u sklopu ekspresije MHC I liganda na

ćelijama tumorskih infiltrata. Mada maligne ćelije često imaju snižen nivo ekspresije MHC I molekula, dešava se i da tumorske ćelije zadržavaju MHC I molekule na svojoj površini (Rodriguez *et al.*, 2005), a u odmaklim stadijumima melanoma je pokazan i povećan nivo MHC molekula klase I na ćelijama tumora (Campoli i Ferrone, 2011). Prema novijim teorijama kontakt inhibitornih KIR receptora na NK ćelijama sa njihovim MHC I ligandima na ćelijama sopstvenog organizma u procesu edukacije je neophodan za funkcionalnu kompetentnost i samim tim i za citotoksičnost NK ćelija. U eksperimentalnim *in vitro* uslovima je pokazano i da ekspresija inhibitornog KIR-a na NK ćelijama koji je komplementaran MHC I ligandu na ćelijskoj liniji melanoma nije *per se* dovoljna da inhibira citotoksičnu aktivnost NK ćelija (Carrega *et al.*, 2009).

Povećana ekspresija aktivacionog CD16 i inhibitornog CD158b KIR receptora koja je u ovom radu dobijena na NK ćelijama u tumor-infiltrisanim regionalnim limfnim čvorovima bolesnika sa melanomom, je u literaturi opisana u reaktivnim limfnim čvorovima koji se odlikuju prisustvom brojnih sekundarnih folikula sa izraženom proliferacijom limfocita (Romagnani *et al.*, 2007). Rezultati koji su dobijeni u ovom radu su u saglasnosti sa nalazima iz literature, s obzirom da je ovakva morfologija izraženija kod tumor-infiltrisanih regionalnih limfnih čvorova. U fiziološkim uslovima je pokazano da NK ćelije u limfnim čvorovima mogu i da *de novo* steknu CD16 i KIR receptore pod uticajem citokina (IL-2, IL-12 i IL-15) koje u reaktivnim limfnim čvorovima sintetišu T ćelije i dendritične ćelije i da zatim eferentnim krvnim i limfnim sudovima napuste limfni čvor kao funkcionalno zrele CD16⁺KIR⁺ NK ćelije (Freud *et al.*, 2006; Romagnani *et al.*, 2007; Carrega i Ferlazzo, 2012). Međutim, prisustvo CD16⁺ i KIR⁺ NK ćelija u tumor-infiltrisanim limfnim čvorovima može da bude i posledica njihove selektivne migracije. Kao eksperimentalna potvrda migracije NK ćelija CD16⁺ KIR⁺ zrelijeg fenotipa u reaktivne limfne čvorove u *in vitro* uslovima je pokazano da stimulacija CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelija pomoću IL-18 može da dovede do povećanja ekspresije CCR7 hemokinskog receptora koji omogućava njihovo nakupljanje u limfnim čvorovima (Mailliard *et al.*, 2005; Carrega i Ferlazzo, 2012;).

Razlike u ekspresiji CD16 i CD158b receptora na NK ćelijama neinfiltisanih i tumor-iniflitranih limfnih čvrova koje su u ovom radu pokazane na celokupnoj populaciji CD3⁻CD56⁺ NK ćelija nisu dobijene analizom ekspresije ovih receptora u

CD3⁻CD56^{potmulo+} i CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacijama NK ćelija. Izgleda kao da invazija NK ćelija u limfne čvorove zahvaćene tumorom i povećana brojnost CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacije NK ćelija, ne dovodi unutar subpopulacija do porasta ekspresije ovih receptora svojstvenih zrelijim NK ćelijama. Naime, novi podaci dobijeni u ovom radu ukazuju na to da ekspresija CD16 i CD158b receptora ima sličnu raspodelu između dve subpopulacije NK ćelija, bez obzira na infiltrisanost limfnog čvora tumorom.

Pored povećane ekspresije CD16 aktivacionog receptora i CD158b inhibitornog KIR receptora, NK ćelije tumor-infiltriranih limfnih čvorova odlikuje i povećana ekspresija CD69 ranog aktivacionog antigena. Poznato je da CD69 kao kostimulatorni molekul učestvuje u proliferaciji NK ćelija, izlučivanju citokina i citotoksičnoj aktivnosti NK ćelija (Borrego *et al.*, 1999) i ispoljava se ubrzo po njihovoj aktivaciji. Povećan nivo ekspresije CD69 u tumor infiltriranim limfnim čvorovima i korelacija njegove ekspresije na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama sa brojem limfnih čvorova zahvaćenih tumorom (N) i stepenom invazije melanoma u kožu (klinički Klark parametar), može da ukaže na invaziju NK ćelija koje se ili aktiviraju u limfnom čvoru koji je infiltrisan tumorom, ili na aktivaciju tu već prisutnih NK ćelija. Pored toga, dobijeni povećan nivo ekspresije CD69 u CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji ali ne i u CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji NK ćelija infiltriranih limfnih čvorova, može biti posledica izraženije sposobnosti CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije da proliferiše (Fehniger *et al.*, 2003; Romagnani *et al.*, 2007). Povećan nivo ekspresije CD69 pokazan je i na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama i to na njihovoj CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji u samom tumoru u odnosu na NK ćelije u okolnom tkivu kod NSCLC i karcinoma dojke (Carrega *et al.*, 2008; Mamessier *et al.*, 2011; Levy *et al.*, 2011; Stojanović *et al.*, 2012). Analizom zastupljenosti aktivacionog antigena HLA-DR, svojstvenog nezrelijim stadijumima razvoja NK ćelija (Freud *et al.*, 2005) i CD25 aktivacionog antigena, je pokazana njihova slična ekspresija na NK ćelijama tumor-infiltriranih i neinfiltriranih limfnih čvorova.

Ispitivanjem distribucije dve funkcionalno različite subpopulacije NK ćelija u regionalnim limfnim čvorovima obolelih od melanoma, u ovom radu je pokazano da sa invazijom melanoma u regionalne limfne čvorove dolazi do povećane zastupljenosti CD3⁻CD56⁺ NK ćelija koje najvećim delom pripadaju CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji.

Analiza ekspresije NKG2D, CD16, CD158a i CD158b receptora na NK ćelijama i njihovim subpopulacijama ukazala je na povećanu ekspresiju CD16 aktivacionog receptora i CD158b inhibitornog KIR receptora na NK ćelijama u limfnim čvorovima zahvaćenim tumorom. Slična niska citotoksičnost NK ćelija tumor-infiltriranih i neinfiltriranih regionalnih limfnih čvorova može biti posledica slične ekspresije NKG2D aktivacionog receptora na CD3⁺CD56⁺ NK ćelija, bez obzira na povećanu ekspresiju CD16 aktivacionog receptora na ovoj populaciji u tumor-infiltriranim limfnim čvorovima. Kako je u eksperimentalnim uslovima kod melanoma pokazano da su metastatske tumorske ćelije u limfnom čvoru usled ispoljavanja specifičnih stresogenih proteina podložnije lizi NK ćelijama u odnosu na tumorske ćelije koje su mestastazirale u visceralne organe (Lakshmikanth *et al.*, 2009), novi podaci o ekspresiji grupe aktivacionih i inhibitornih receptora kod neinfiltriranih i tumor-infiltriranih limfnih čvorova mogu da ukažu na kompenzatornu ulogu koju NK ćelije imaju u tumor-infiltriranim limfnim čvorovima.

Melanom kože je invazivan malignim tumorom koga odlikuju neosetljivost na zračnu terapiju i slaba osetljivost na hemioterapiju usled malog stepena indukcije apoptoze ovih tumorskih ćelija pri primeni hemioterapijskih agenasa (Gray-Shopfer *et al.*, 2007). S obzirom na imunogeničnost melanoma, u novije vreme u lečenju melanoma, bilo samostalno, bilo u kombinaciji sa hemioterapijskim agensima sve više se primenjuje nespecifična imunoterapija citokinima (Fewkes i Mackall, 2010). U tom smislu do sada se u lečenju metastatskog melanoma već više od dve decenije primenjuje IL-2, a citokini novije generacije se intenzivno ispituju u pretkliničkim istraživanjima. Ozbiljan kandidat za kliničku primenu u lečenju melanoma, karcinoma bubrega i pedijatrijskih solidnih tumora (Fehniger *et al.*, 2002; Steel *et al.*, 2012) je IL-15, citokin čija je nedvosmislena uloga u razvoju i sazrevanju NK ćelija već pokazana u fiziološkim uslovima (Kennedey *et al.*, 2000; Huntington *et al.*, 2009).

Iako regionalni limfni čvorovi zbog svoje povezanosti sa lokalizacijom primarnog tumora imaju značajnu ulogu u sprečavanju metastaziranja, efekti citokina na NK ćelije regionalnih limfnih čvorova obolelih od malignih tumora do sada nisu izučavani. U ovom radu ispitivani su *in vitro* efekti citokina IL-2, koji povećava citotoksičnost NK ćelija i koristi se u lečenju melanoma i IL-15, citokina neophodnog

za sazrevanje NK ćelija, na imunofenotip i citotoksičnu funkciju NK ćelija regionalnih limfnih čvorova obolelih od melanoma. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se relativno niska NK-citotoksičnost koja je pokazana kod svežih uzoraka limfnih čvorova pre tretmana, nakon 72 sata *in vitro* kultivacije u prisustvu interleukina IL-2 i IL-15 značajno i višestruko povećava kod obe grupe regionalnih limfnih čvorova. Povećanje citotoksične aktivnosti NK ćelija u odnosu na kontrolni tretman se nastavlja i produžavanjem trajanja ovih tretmana na 7 dana.

Povećanje citotoksičnosti NK ćelija regionalnih limfnih čvorova koje je dobijeno u ovom radu nakon *in vitro* tretmana pomoću citokina IL-2 i IL-15 je u skladu sa postojećim podacima u literaturi dobijenim nakon ispitivanja dejstava ovih citokina na citotoksičnost NK ćelija poreklom iz sekundarnih limfnih organa (krajnici, slezina i limfni čvorovi) zdravih osoba (Ferlazzo *et al.*, 2004; Romagnani *et al.*, 2007), kao i na mišijim modelima (Fheniger *et al.*, 2007) i to uglavnom praćenjem sadržaja citotoksičnih medijatora perforina i granzima u NK ćelijama metodom protočne citometrije nakon tretmana slične dužine i istim koncentracijama citokina kao u ovom radu.

Povećanje citotoksične aktivnosti NK ćelija pod dejstvom interleukina IL-2 u *in vitro* uslovima je još osamdesetih godina prošlog veka pokazano na NK ćelijama periferne krvi (London *et al.*, 1986; Trinchieri *et al.*, 1984) i doprinelo je uvođenju ovog citokina u terapiju melanoma i karcinoma bubrega gde se ovaj citokin primenjuje od 1992. godine (Rosenberg *et al.*, 1994). Ovakav efekat interleukina IL-2 na citotoksičnost NK ćelija periferne krvi je dobro proučen u *in vitro* uslovima kod zdravih osoba i bolesnika sa malignitetima (Zhang *et al.*, 2008; Konjević *et al.*, 2007; 2010; 2012) i na trajnim NK ćelijanskim linijama (Zhang *et al.*, 2008). S obzirom na njegovu visoku toksičnost kada se direktno primenjuje kod ljudi, sve više se ispituju i načini *ex vivo* primene ovog citokina u cilju generisanja visoko-citotoksičnih NK ćelija radi njihove terapijske primene kod bolesnika sa malignitetima (Saito *et al.*, 2013; Geller i Miller, 2011). U tom smislu i rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju na potencijalni značaj *ex vivo* primene interleukina IL-2 na NK ćelije poreklom iz regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom.

Povećanje citotoksičnosti NK ćelija nakon *in vitro* tretmana interleukinom IL-15 je prvobitno pokazano na ćelijama periferne krvi zdravih osoba i to nakon stimulacija u trajanju od 18, 24 i 48 sata primenom iste koncentracije ovog citokina koja je korišćena u ovom radu (Siedel *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2013). Pored ovih podataka u literaturi je pokazano i povećanje NK-citotoksičnosti primenom duplo niže koncentracije interleukina IL-15 u dužim tretmanima prema standardnoj NK-osetljivoj K562 eritromijeloidnoj ćelijskoj liniji, tako i prema ćelijama Ewingovog sarkoma (Verhoven *et al.*, 2008). Efekat interleukina IL-15 na citotoksičnu aktivnost NK ćelija periferne krvi bolesnika sa malignitetama koja je često snižena u odnosu na NK-citotoksičnost zdravih osoba je počeo da se ispituje u novije vreme. U tom smislu, postoje objavljeni podaci o tome da IL-15 kod obolelih od akutne mijeloidne leukemije indukuje citotoksičnost NK ćelija prema K562 ciljnoj ćelijskoj liniji (Szczepanski *et al.*, 2009), kao i kod obolelih od osteosarkoma prema ćelijama ovog malignog tumora (Buddingh *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2010; Verhoven *et al.*, 2010). Povećanje NK citotoksičnosti pokazano je nakon transfekcije *IL-15* gena u trajnu NK ćelijsku liniju, NK-92 (Zhang *et al.*, 2004). U novije vreme, s obzirom na to da IL-15 ispoljava izraženiji biološki efekat kada je *trans* prezentovan, u odnosu na svoju solubilnu formu, vršeni su eksperimenti u kojima su NK ćelije kultivisane u prisustvu K562 ćelijske linije koja je modifikovana tako da na svojoj membrani poseduje IL-15 vezan za IL-15R α lanac i 41-BBL (CD137L) kostumulatorni molekul. Pokazano je da ovako modifikovane K562 ćelije visoko-specifično aktiviraju NK ćelije (Fujisaki *et al.*, 2009). Na ovaj način su dobijene visoko-citotoksične NK ćelije čija se terapijska primena u tumorima intenzivno ispituje (Geller i Miller, 2011). U tim uslovima IL-15 koji je *trans* prezentovan na IL-15R α lancu doveo je do povećanja citotoksičnog dejstva NK ćelija prema multipnom mijelomu (Garg *et al.*, 2012), Ewing sarkomu i rambdomiosarkomu (Cho *et al.*, 2010).

U ovom radu nakon 72 sata *in vitro* tretmana ineterleukinima IL-2 i IL-15 je praćena sinteza perforina, proteolitičkog enzima koji direktno učestvuje u citotoksičnom ubijanju malignih ćelija. Naime, pored povećanja NK-citotoksičnosti, nakon 72 sata Rt-PCR metodom kod obe grupe ispitivanih limfnih ćvorova pokazano je povećanje transkripcije *PRF1*, gena za perforin. Ovakav efekat interleukina IL-2 i IL-15 na transkripciju perforina već je ranije opisan na mononuklearnim ćelijama periferne krvi

zdravih osoba i bolesnika sa melanomom (Gamerro *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1999; Janas *et al.*, 2005), a kasnije i na izolovanim NK ćelijama periferne krvi kao i na trajnim NK-ćelijskim linijama (Zhou *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2008). Prema našim saznanjima u literaturi ne postoje podaci o efektu ovih citokina na transkripsiju *PRF1* u limfocitima regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa malignitetima. Značajno je da je tokom razvoja NK ćelija *PRF1* gen transkripciono neaktivan u CD34⁺ progenitorskim ćelijama NK ćelijske loze i da se njegova iRNK može detektovati nakon dve nedelje *in vitro* kultivacije u prisustvu citokina IL-15 i SCF koja dovodi do diferencijacije progenitora u zrelije stadijume NK ćelija (Meade *et al.*, 2009).

Praćenjem nivoa sintetisanog proteina perforina Western blot metodom pokazana je indukcija njegove ekspresije pomoću citokina IL-2 i IL-15 kod obe grupe limfnih čvorova obolelih od melanoma. Najizraženiji efekat ovi citokini su pokazali na povećanje prisustva lakše i funkcionalno zrelije frakcije perforina molekulske težine 60 KD. Ova lakša frakcija predstavlja funkcionalno aktivnu formu perforina i u stanju je da se veže za fosfolipidnu membranu ciljne ćelije, da polimerizuje, formira pore, omogući ulazak granzima i dovede do sledstvene lize ciljne ćelije. U procesu translacije *PRF1* gena, kao prvi produkt nastaje polipeptid od 65KD koji ubrzo glikozilacijom prelazi u 70KD formu čiji je C2 domen koji ima ulogu u vezivanju za fosfolipidnu membranu "prekriven" i stoga neaktivan. Otkidanjem proteoglikanskog lanaca sa C-terminalnog domena u kiseloj sredini sekretornih granula dolazi do njegovog prevođenja u formu manje težine (60KD) sa "otvorenim" mestom vezivanja za membranu ciljne ćelije (Uellner *et al.*, 1997). S obzirom da NK ćelije nastaju diferencijacijom hematopoetskih progenitora koji su dosta zastupljeni i u limfnim čvorovima kao i da se ekspresija perforina povećava prelaskom iz trećeg razvojnog stadijuma iNK ćelija u četvrti stadijum CD3⁻CD56^{sjajno+} NK ćelija (Freud *et al.*, 2006), povećanje ukupnog nivoa perforina koje je dobijeno nakon tretmana ovim citokinima može posredno da ukaže i na diferencijaciju nezrelijih stadijuma NK ćelija poteklom iz limfnog čvora. Postoje podaci da i tokom ontogenetskog razvoja u procesu diferencijacije NK ćelija od CD34⁺ progenitora iz pupčane vrpce, dolazi do povećanja udela brzo-migrirajuće, lakše, frakcije perforina mase 60KD (Meade *et al.*, 2009). Povećanje nivoa perforina je direktno pokazano u NK ćelijama limfnih čvorova nakon dužih *in vitro* tretmana u prisustvu interleukina IL-2 i IL-15 (Ferlazzo *et al.*, 2004; Moretta *et al.*, 2008), kao i

nakon 48 sati kultivacije NK ćelija poreklom iz slezine miša (Fehniger *et al.*, 2007). Povećanje nivoa perforina pod uticajem ova dva citokina koje odvija u procesu diferencijacije NK ćelija (Freud i Caligiuri, 2006) pokazano je i na eksperimentalnom modelu u *in vitro* uslovima pri čemu CD34⁺ progenitori produkuju perforin nakon 20 i 30 dana kultivacije sa IL-15 slične koncentracije koja je korišćena u ovom istraživanju na regionalnim limfnim čvorovima bolesnika sa melanomom (Zamai *et al.*, 2013).

U ovom radu, prećenjem transkripcije i translacije perforina, pokazano je da je kod obe grupe limfnih čvorova prisutan bazalni nivo ove iRNK, kao i da je u netretiranim, kontrolnim limfnim čvorovima zastupljenija nezrelija i teža frakcija perforina. Stimulacije citokinima IL-2 i IL-15 dovele su kod obe grupe limfnih čvorova do povećane transkripcije *PRF1* gena, kao i do povećanja nivoa proteina, što je najizraženije u zrelijoj, a po molekulskoj masi lakšoj frakciji. Na osnovu toga može da se zaključi da je dobijeno povećanje citotoksične aktivnosti NK ćelija direktno uslovljeno povećanjem transkripcije PRF-1 gena i sinteze proteina i to uglavnom povećanjem nivoa njegove funkcionalno zrelije forme.

Pored povećanja citotoksične aktivnosti NK ćelija nakon 7 dana *in vitro* kultivacije, kod obe grupe limfnih čvorova čije su ćelije tretirane interleukinom IL-2 dobijeno je značajno povećanje procenta CD3⁻CD56⁺ NK ćelija kao i procenta CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije. Dobijena povećanja su najverovatnije posledica proliferacije CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije koja, za razliku od citotoksične CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacije, ispoljava visokoafinitetni IL-2R α receptor (Baume *et al.*, 1992) i bolje proliferiše u prisustvu IL-2 (Fehniger *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2007; Zamai *et al.*, 2013). Sličan efekat ovog citokina na brojnost CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije NK ćelija pokazan je na izolovanim NK ćelijama limfnih čvorova i krajnika nakon *in vitro* kultivacije interleukinom IL-2 (Romagnani *et al.*, 2007; Ferlazzo *et al.*, 2004). Za razliku od IL-2, IL-15 iako je pripadnik iste, γ c, familije citokina nakon istog vremena kultivacije povećao je citotoksičnost, ali ne i procenat zastupljenosti NK ćelija i njihovih funkcionalnih subpopulacija kod obe grupe ispitivanih regionalnih limfnih čvorova. U literaturi, na trajnoj NK-92 NK ćelijskoj liniji nakon 48 sata tretmana interleukinom IL-15 (Zhang *et al.*, 2008), slično kao i u ovom radu, je takođe opisan nepromenjen procenat NK ćelija i njihovih subpopulacija.

Dobijeni rezultati ukazuju pored povećanja citotoksičnosti NK ćelija regionalnih limfnih čvorova nakon *in vitro* tretmana interleukinima IL-2 i IL-15, IL-2 povećava procenat CD3⁻CD56⁺ NK ćelija i njihove CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije, dok IL-15 deluje samo na citotoksičnu funkciju NK ćelija. Značajno je da oba citokina povećavaju nivo perforina u CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija koja u limfnom čvoru predstavlja većinu NK ćelijske populacije, što rezultuje u povećanju citotoksičnosti (Vukićević *et al.*, 2010; Romagnani *et al.*, 2007). Povećanje procenta NK ćelija samo nakon tretmana interleukinom IL-2 može da bude posledica toga što CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacija NK ćelija koja predstavlja većinu NK ćelijske populacije u limfnom čvoru ispoljava visoko-afinitetni trimerni IL-2R $\alpha\beta\gamma$ i proliferiše u prisustvu ovog citokina, dok ne postoji razlika u ispoljavanju IL-15R različitih afiniteta između dve subpopulacije NK ćelija (Meazza *et al.*, 2011).

Podaci iz literature ukazuju na veći značaj citokina IL-15 u održavanju homeostaze NK ćelija i njihovog preživljavanja (Carson *et al.*, 1997, Pillet *et al.*, 2011), kao i u regulaciji ćelijske smrti (Cooper *et al.*, 2002; Jamieson *et al.*, 2004). U ovom radu, nakon *in vitro* kultivacije u prisustvu IL-15 došlo je do povećanja ekspresije antiapoptotskog molekula Bcl-2. Slični nalazi dobijeni su na mišijim modelima gde je pokazano da IL-15 stimuliše preživljavanje NK ćelija tako što reguliše ekspresiju proteina Bcl-2 familije: snižava nivo apoptotskog Bid molekula, a povećava nivoe antiapoptotskih Mcl-2 (Huntington *et al.*, 2007) i Bcl-2 molekula (Cooper *et al.*, 2002; Pillet *et al.*, 2011; Ranson *et al.*, 2003).

U ovom radu nakon 7 dana *in vitro* kultivacije praćeni su efekti citokina IL-2 i IL-15 na ekspresiju receptora na NK ćelijama regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom. Svaki od ova dva ispitivana citokina povećava ekspresiju NKG2D i CD16 aktivacionih receptora u celokupnoj populaciji CD3⁻CD56⁺ NK ćelija, kod obe grupe limfnih čvorova obolelih od melanoma. U okviru izučavanja aktivacije NK ćelija poreklom iz sekundarnih limfnih organa, u literaturi su opisani efekti interleukina IL-2 i IL-15 uglavnom samo na ekspresiju CD16, KIR receptora i NCR (Ferlazzo *et al.*, 2004; Romagnani *et al.*, 2007), ali ne i na ekspresiju NKG2D receptora. Dejstvo ovih citokina na ekspresiju NKG2D receptora do sada je najviše ispitivano na NK ćelijama periferne krvi kako zdravih osoba tako i bolesnika sa malignitetima. U literaturi postoje podaci da

IL-2 povećava ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama periferne krvi obolelih od melanoma (Konjević *et al.*, 2010), kontrolnih zdravih osoba (Sutherland *et al.*, 2002; Konjević *et al.*, 2010; Hromadnikova *et al.*, 2013), kod miševa (Smyth *et al.*, 2004) kao i na trajnim NK ćelijskim linijama (Zhang *et al.*, 2005). Značajno je i da tretman interleukinom IL-2 ne povećava samo ekspresiju NKG2D receptora na NK ćelijama, već i DAP10 molekula koji predstavlja sastavni deo signalnog puta ovog receptora (Park *et al.*, 2011). Slično kao i za IL-2, u literaturi postoje podaci i za IL-15 o povećanju ekspresije NKG2D receptora pod dejstvom ovog citokina na NK ćelijama periferne krvi zdravih osoba (Sutherland *et al.*, 2006; Verhoeven *et al.*, 2008; Zhang *et al.* 2008), bolesnika sa malignitetima (Szczepanski *et al.*, 2009; Decot *et al.*, 2010) i na trajnim NK ćelijskim linijama (Zhang *et al.*, 2008). Indukcija ekspresije NKG2D receptora tretmanima interleukinima IL-2 i IL-15 dobijena je i na NK ćelijama koje su kultivisane u prisustvu ćelija melanoma (Balsamo *et al.*, 2012). Isto tako pokazano je i da visoko-citotoksične NK ćelije koje su dobijene nakon *in vitro* kultivacije NK ćelija u prisustvu modifikovane K562 tumorske ćelijske linije koja poseduje *trans* prezentovan IL-15 imaju povećan nivo ekspresije NKG2D aktivacionog receptora (Cho *et al.*, 2010, Fujisaki *et al.*, 2009).

Za efekat interleukina IL-15 na ekspresiju NKG2D receptora, značajno je da su signalni putevi IL-15R i NKG2D receptora međusobno povezani (Horng *et al.*, 2007). Naime, pokazano je da JAK-3, kao deo IL-15R signalnog puta, fosforiliše i DAP10 adapterski molekul koji je povezan sa NKG2D receptorom i zatim dovodi do aktivacije STAT5 signalnog molekula. Aktivirani DAP10, slično kao i u signalnom putu NKG2D receptora, dovodi do sledstvene aktivacije PI3K i Grb2 transkripcionog faktora, koji rezultuju u citotoksičnoj aktivnosti NK ćelija (Welte *et al.*, 2003; Bennett *et al.*, 2010).

Pored povećanja ekspresije NKG2D receptora u celokupnoj populaciji CD3⁻ CD56⁺ NK ćelija, kod obe grupe limfnih čvorova nakon tretmana interleukinima IL-2 i IL-15 je dobijeno i povećanje ekspresije ovog receptora unutar citotoksične CD3⁻ CD56^{potmulo+} subpopulacije. S obzirom na to da je ova subpopulacija nosilac citotoksične funkcije NK ćelija i da aktivacija NKG2D receptora dovodi do optužavanja citotoksičnih granula sa perforinom (Smyth *et al.*, 2004), povećanje njegove ekspresije u ovoj subpopulaciji može da doprinese povećanju citotoksičnosti koje je postignuto

tretmanima ovim citokinima. Osim rezultata dobijenih u ovom radu, povećanje ekspresije NKG2D u citotoksičnoj subpopulaciji NK ćelija nakon tretmana interleukinom IL-2 pokazano je na NK ćelijama periferne krvi zdravih osoba (Konjević *et al.*, 2010) i obolelih od melanoma (Konjević *et al.*, 2010), dok o efektu interleukina IL-15 na ekspresiju NKG2D unutar funkcionalnih subpopulacija NK ćelija ne postoje podaci.

Pored NKG2D receptora, u ovom radu je kod obe grupe regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom tretmanima interleukinima IL-2 i IL-15 postignuto i povećanje ekspresije CD16 aktivacionog receptora na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama. Ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature koji su dobijeni na NK ćelijama poreklom iz limfnih čvorova kao i na njima po imunofenotipu sličnim NK ćelijama tonzila, zdravih osoba (Ferlazzo *et al.*, 2004; Romagnani *et al.*, 2007). Prema podacima iz literature povećanje ekspresije CD16 aktivacionog receptora moguće je samo na NK ćelijama limfnih čvorova i tonzila, ali ne i na NK ćelijama periferne krvi (Ferlazzo *et al.*, 2004). Povećanje ekspresije CD16 receptora koje je pokazano u *in vitro* uslovima u ovom radu, može da predstavlja analogiju fizioloških uslova u samom limfnom čvoru gde su NK ćelije izložene dejstvu interleukina IL-2 poreklom iz aktiviranih T ćelija lokalizovanih u neposrednoj blizini (Martín-Fontecha *et al.*, 2004; Ferlazzo i Münz, 2009).

Kod obe grupe regionalnih limfnih čvorova nakon tretmana interleukinom IL-2 došlo je do povećanja zastupljenosti CD16 receptora u CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija. Ovo može da ukaže na sazrevanje ove subpopulacije s obzirom da se prema linearnom modelu diferencijacije NK ćelija povećanje ekspresije CD16 povezuje sa prelaskom CD3⁻CD56^{sjajno+} u funkcionalno zreliju, citotoksičnu CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciju (Freud *et al.*, 2006, Freud i Caligiuri, 2006; Romagnani *et al.*, 2007; Caligiuri, 2008). Značaj CD16 kao molekula koji ima ulogu u citotoksičnoj aktivnosti NK ćelija je pokazan još 1999. godine (Madelboim *et al.*, 1999), mada tada tačan mehanizam kojim CD16 učestvuje u citotoksičnoj aktivnosti NK ćelija nije pokazan i nisu identifikovani njegovi ligandi za koje se on vezuje pri formiranju imunološke sinapse. Međutim, novija istraživanja su pokazala da svoju ulogu u NK ćeljskoj citotoksičnosti CD16 receptor ispoljava *cis* interakcijom sa CD2 adhezionim

molekulom što može da dovede do fosforilacije i aktivacije ζ lanca TCR i do sledstve ne NK ćelijske citotoksičnosti (Grier *et al.*, 2012). Osim toga, pokazano je da prisustvo CD2 adhezionog molekula na NK ćelijama je neophodno za NK-citotoksičnost prema većini tumorskih ćelijskih linija melanoma (Casado *et al.*, 2009). Nakon tretmana interleukinom IL-15 dobijeno je povećanje ekspresije CD16 receptora kod tumor-infiltriranih limfnih čvorova samo u $CD3^+CD56^{potmulo+}$ subpopulaciji, za razliku od neinfiriranih limfnih čvorova kod kojih se ekspresija CD16 povećala u obe subpopulacije NK ćelija što takođe možda može da doprinese većem povećanju NK-citotoksičnosti kod ove grupe limfnih čvorova.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da tretmani interleukinima IL-2 i IL-15 mogu da indukuju ekspresiju CD16 aktivacionog receptora na $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama limfnih čvorova obolelih od melanoma bez obzira na njihovu infiltrisanost tumorom. Ovo povećanje ekspresije CD16 aktivacionog receptora kao i povećanje citotoksičnosti i nivoa zrelog citotoksičnog molekula perforina, doprinosi sticanju pune funkcionalne zrelosti NK ćelija (Ferlazzo *et al.*, 2004; Romagnanai *et al.*, 2007) kod obe grupe limfnih čvorova

U ovom radu nakon 7 dana tretmana citokinima IL-2 i IL-15 pokazano je i da se ekspresija CD158a inhibitornog KIR receptora na NK ćelijama povećava samo nakon tretmana interleukinom IL-15 i to samo kod tumor-infiltriranih limfnih čvorova. Za razliku od CD158a, ekspresija CD158b inhibitornog KIR receptora na ukupnim $CD3^+CD56^+$ NK ćelijama nakon tretmana se povećava kod obe grupe limfnih čvorova pod uticajem oba ispitivana citokina. Bez obzira na to što signalni put inhibitornih KIR receptora inhibira sekreciju citotoksičnih granula, a time i citotoksičnu aktivnost NK ćelija, pokazano je da su ekspresija inhibitornih KIR receptora i njihovo vezivanje za MHC I ligande važni za dostizanje funkcionalne zrelosti, a time i za citotoksičnost NK ćelija (Fernandez *et al.*, 2005; Yokoyama *et al.*, 2006; Holgrund *et al.*, 2010). Ova pojava je u novijim radovima i detaljnije objašnjenja na osnovu praćenja dinamike receptora na membrani NK ćelija. U tom smislu na miševima je pokazano da u NK ćelijama koje nisu edukovane kontaktom sa sopstvenim MHC I molekulom, inhibitorni KIR receptori kao i NKG2D i drugi aktivacioni c-lektinima slični receptori su „zatvoreni“ u aktinskoj mreži vezanoj za plazma membranu. U "needucovanim" NK

ćelijama nakon vezivanja inhibitornih KIR-ova za njihove MHC I ligande dolazi do premeštanja aktivacionih receptora u tzv. nanodomene koji predstavljaju regione plazma membrane pogodne za prenos signala (Guia *et al.*, 2011).

Efekti interleukina IL-2 i IL-15 na ekspresiju KIR receptora na NK ćelijama regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa malignitetima nisu do sada izučavani. U tom smislu, u literaturi postoje podaci koji su dobijeni u ispitivanjima vršenim na NK ćelijama poreklom iz limfnih čvorova i krajnika zdravih osoba. U ovim istraživanjima je korišćenjem antitela koja pored inhibitornih prepoznaju i aktivacione (S, engl. short) forme CD158a (KIR2DL1/S1) i CD158b (KIR2DL2,3/S2,3) KIR receptora, nakon tretmana interleukinima IL-2 (Ferlazzo *et al.*, 2004; Romagnani *et al.*, 2007) i IL-15 (Romagnani *et al.*, 2007) takođe postignuto povećanje ekspresije KIR receptora na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama.

Podaci iz literature ukazuju na to da se za razliku od CD16 aktivacionog receptora čija se ekspresija ne može indukovati na NK ćelijama periferne krvi (Ferlazzo *et al.*, 2004), ekspresija CD158a i CD158b KIR receptora može povećati na ovoj populaciji NK ćelija i kraćim *in vitro* tretmanima (48 i 72 sata) primenom nižih koncentracija interleukina IL-2 (Kogure *et al.*, 1999; Chrul *et al.*, 2006) kao i interleukina IL-15 (Kogure *et al.*, 2002) od koncentracija korišćenih u ovom radu. U novije vreme se sve više ispituju načini dobijanja većeg broja citotoksičnih NK ćelija za primenu u adoptivnoj terapiji malignih tumora i tom prilikom nakon više-nedeljnih *in vitro* tretmanima mononuklearnih ćelija periferne krvi interleukinom IL-2 pored povećanja ekspresije aktivacionih receptora (NKG2D i NKp46) je takođe dobijeno i povećanje nivoa CD158a i CD158b KIR receptora na NK ćelijama (Bonanno *et al.*, 2010). Isto tako, interleukini IL-2 i IL-15 se istovremeno primenjuju u već uspostavljenim zvaničnim protokolima za dobijanje aloreaktivnih KIR⁺ NK ćelija koji se koriste u adoptivnoj imunoterapi akutne mijeloidne leukemije (Siegler *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2013). Povećanje ekspresije CD158a i CD158b KIR receptora na NK ćelijama nakon *in vitro* tretmana interleukinima IL-2 i IL-15 sa istovremenim povećanjem citotoksične aktivnosti je osim na NK ćelijama periferne krvi i limfnih čvorova, pokazano i na NK ćelijama poreklom iz pupčane vrpce (Satwani *et al.*, 2011).

Praćenjem efekata citokina na ekspresiju KIR receptora u subpopulacijama NK ćelija pokazano je da se ekspresija CD158a receptora, slično kao i na ukupnim CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama, nakon tretmana interleukinom IL-15 povećala kod tumor-infiltriranih limfnih čvorova i to u CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji. Ekspresija CD158b KIR receptora se, kod obe grupe regionalnih limfnih čvorova nakon tretmana interleukinom IL-2 povećala u CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji, dok se nakon tretmana interleukinom IL-15 povećala u CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulaciji NK ćelija. Postignuto povećanje ekspresije CD158b KIR receptora može da ukaže na sazrevanje nezrelije CD3⁻CD56^{sjajno+} subpopulacije NK ćelija u prisustvu IL-15.

Promene u ekspresiji KIR receptora koje su dobijene u ovom radu na subpopulacijama NK ćelija su u saglasnosti sa podacima iz literature koji ukazuju na to da tretmani interleukinima IL-2 i IL-15 mogu da indukuju ekspresiju inhibitornih KIR receptora na svim KIR⁻ NK ćelijama obe funkcionalne subpopulacije NK ćelija poreklom iz limfnih čvorova zdravih osoba (Romagnani *et al.*, 2007). U literaturi je slična pojava pokazana i na NK ćelijama periferne krvi nakon 7 dana kultivacije interleukinima IL-2 i IL-15 gde se KIR receptori pojavljuju *de novo* na KIR⁻ NK ćelijama uglavnom nevezano za pripadnost subpopulaciji (deRham *et al.*, 2007).

Povećanja ekspresije inhibitornih CD158a i CD158b KIR receptora koja su dobijena u ovom radu, mogu da se objasne u svetlu regulacije *KIR* gena. Naime, ekspresija *KIR* gena je uglavnom regulisana epigenetski, metilacijom promotora koja suprimira njihovu transkripciju, a pored toga pokazana je i pozitivna regulacija ovih gena c-Myc transkripcionim faktorom koji se vezuje za distalni promotor *KIR* gena i bez obzira na metilaciju stimuliše njegovu transkripciju. Pored toga, pokazano je da se *in vitro* tretmanom NK ćelija periferne krvi interleukinom IL-15 povećava transkripcija gena za c-Myc (Cichocki *et al.*, 2009), a time i ekspresija KIR receptora. Indukcija ekspresije *KIR* gena interleukinima IL-15 i IL-2 pokazana je i na NK ćelijama iz pupčane vrpce (Satwani *et al.*, 2011), a za gen inhibitornog KIR receptora *KIR3DL1* je direktno pokazano da ovi citokini stimulišu njegovu transkripciju posredstvom STAT5 signalnog molekula (Presnell *et al.*, 2013).

Povećanje citotoksične aktivnosti NK ćelija nakon 7 dana *in vitro* tretmana interleukinima IL-2 i IL-15, praćeno je i povećanjem ekspresije ranog aktivacionog

antigena CD69 na NK ćelijama obe grupe regionalnih limfnih čvorova. Mada je konstitutivno prisutan na malom broju ćelija, CD69 antigen se brzo indukuje na aktiviranim NK ćelijama (Lanier *et al.*, 1988; Testi *et al.*, 1994), a njegova ekspresija je povezana sa proliferacijom i indukcijom citotoksične aktivnosti NK ćelija (Borrego *et al.*, 1999; Konjevic *et al.*, 2007). Kod NK ćelija stimuliranih interleukinom IL-2, aktivacija CD69 receptora dovodi do selektivne i brze aktivacije Syk tirozin kinaze koja fosforiliše i aktivira fosfolipazu C γ 2 i Vav1 transkripcioni faktor koji u svojoj daljoj signalnoj putanji dovodi do sledstvene aktivacije NK ćelijeske citotoksičnosti (Pisegna *et al.*, 2002). U tom smislu, u ovom radu je pokazano povećanje ekspresije CD69 antigena nakon stimulacija interleukinima IL-2 i IL-15 na obe subpopulacije NK ćelija, kod obe grupe regionalnih limfnih čvorova.

U ovom radu nakon 72 sata *in vitro* tretmana interleukinima IL-2 i IL-15 je kod obe grupe ispitivanih regionalnih limfnih čvorova dobijen i povećan nivo fosforilisanog STAT5 signalnog molekula kojim ovi citokini deluju na procese u ćeliji, što je u ovom radu pokazano povećanjem nivoa perforina koji kod obe grupe regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom, dovodi do povećanja citotoksičnosti NK ćelija. Poznato je da se fosforilacija STAT5 molekula odvija posredstvom JAK-3 kinaze (Meazza *et al.*, 2011). Nakon tretmana interleukinom IL-2 kod obe grupe regionalnih limfnih čvorova došlo je do povećanja niva fosforilisanog STAT1, dok je tretman interleukinom IL-15 povećao samo nivo fosforilisanog STAT5 molekula. U tom smislu, poznato je da IL-2 može da aktivira i JAK-1 i JAK-3 tirozin kanaze koje svojim citoplazmatskim domenima intereaguju sa IL-2R β i γ c lancima IL-2 receptora i fosforilišu ih, kao i da u zavisnosti od toga koji je tirozin u polipeptidnom lancu receptora ovim putem fosforilisan se aktivira određeni STAT molekul (Meazza *et al.*, 2011). Takođe, pokazano je da se STAT5 vezuje za specifični fosforilisani tirozin510 u IL-2R β C-terminalnom regionu, a STAT1 i STAT3 intereaguju sa kiselim subdomenom IL-2R β lanca čak i u odsustvu fosforilacije tirozina (Lin i Leonard, 2000; Delespine-Carmagnat *et al.*, 2000). Poznato je da IL-2 i IL-15 povećavaju citotoksičnost posredstvom aktivacije *PRF1* gena kao i da tu funkciju ostvaruju direktno posredstvom fosforilisanog STAT5 signalnog molekula (Imada *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Pillet *et al.*, 2011; Sahm *et al.*, 2012) i aktivacije NF- κ B transkripcionog faktora (Zhou *et al.*, 2002).

Poređenjem indeksa povećanja citotoksične aktivnosti NK ćelija nakon tretmana citokinima između neinfiltriranih i tumor-infiltriranih limfnih čvorova, pokazano je da tretman interleukinom IL-2 kod obe grupe limfnih čvorova dovodi do sličnog stepena povećanja u odnosu na kontrolu, dok tretman interleukinom IL-15 dovodi do nižeg stepena povećanja citotoksičnosti kod tumor-infiltriranih u odnosu na neinfiltrirane limfne čvorove. Pored toga, nakon tretmana interleukinom IL-15, kod tumor-infiltriranih limfnih čvorova dobijen je veći stepen povećanja ekspresije inhibitrnog CD158a KIR receptora na ukupnim CD3⁻CD56⁺ i na CD3⁻CD56^{potmulo+} NK ćelijama u odnosu na neinfiltrirane limfne čvorove. Ipak, ovo povećanje ekspresije CD158a inhibitrnog KIR-a u tumor-infiltriranim limfnim čvorovima ne može se smatrati činiocem koji bi smanjio citotoksičnost u tumor-infiltriranim limfnim čvorovima nakon tretmana interleukinom IL-15, s obzirom na to da je citotoksičnost određivana prema K562 eritromijeloidnoj ćelijskoj liniji koja ne ispoljava MHC molekule klase I koji su ligandi za ove KIR receptore. Mada, s druge strane tretmani interleukinom IL-15 kod tumor-infiltriranih limfnih čvorova povećavaju ekspresiju CD16 receptora samo u CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulaciji, dok kod neinfiltriranih limfnih čvorova dovode do značajnog povećanja ekspresije CD16 receptora u obe subpopulacije NK ćelija što kod neinfiltriranih limfnih čvorova možda utiče na veće povećanje NK ćelijske citotoksičnosti u *in vitro* tretmanima interleukinom IL-15.

U novije vreme se intenzivno ispituje primena adoptivnog transfera NK ćelija u terapiji malignih tumora. Ova ispitivanja se već duže vreme sprovode kod hematoloških maligniteta, da bi kasnije obuhvatila i solidne tumore. Kod melanoma je do sada ispitivana citotoksičnost alogenih NK ćelija periferne krvi stimuliranih interleukinom IL-2 (Igarashi *et al.*, 2004), kao i NK ćelija poreklom iz TIL koje su stimulirane interleukinom IL-15 (Steel *et al.*, 2012). U tom smislu povećanje citotoksične funkcije NK ćelija poreklom iz regionalnih limfnih čvorova bolesnika i nivoa citotoksičnog molekula perforina koji su dobijeni nakon *in vitro* tretmana interleukinima IL-2 i IL-15 mogu da ukažu na mogućnost ispitivanja terapijske primene ove populacije NK ćelija kod melanoma. S obzirom na visoku sistemsku toksičnost koju ispoljava IL-2 takođe je ispitivana i direktna lokalna primena ovog citokina u metastatske promene kod melanoma (Ridoli i Ridoli, 2002) i kod karcinoma bubrega (Vogelzang *et al.*, 1994). U tom smislu, rezultati dobijeni u *in vitro* uslovima u ovom radu mogu da budu model

sistem i ukažu na efekat koji bi na NK ćelijsku citotoksičnost imala primena ovih citokina na NK ćelije regionalnih limfnih čvorova koje su zbog svog položaja u odnosu na primarni tumor značajne u kontroli limfogenog širenja tumora.

U ovom radu su dobijeni novi podaci o do sada slabo izučavanoj subpopulaciji NK ćelija u regionalnim limfnim čvorovima koja može imati veoma važnu ulogu u sprečavanju i u kontroli širenja tumora. Poređenjem funkcionalnih svojstva NK ćelija neinfiltriranih i infiltriranih limfnih čvorova pokazana je slična niska citotoksičnost, a snižena produkcija IFN γ u CD3 $^-$ CD56 $^+$ NK ćelijama i njihovoj imunoregulatornoj CD3 $^-$ CD56 $^{\text{sjajno}^+}$ subpopulaciji koja može da bude posledica prisustva imunosupresivnih faktora poreklom od tumorskih ćelija kao i od ćelija imunskog sistema u tumor-infiltriranim limfnim čvorovima. Bez obzira na sličnu citotoksičnost u tumor-infiltriranim limfnim čvorovima pokazano je povećanje procenta CD3 $^-$ CD56 $^+$ NK ćelija usled povećanog prisustva njihove zrelije citotoksične CD3 $^-$ CD56 $^{\text{potmulo}^+}$ subpopulacije, kao i povećana ekspresija CD69 aktivacionog antigena, a i CD16 i CD158b receptora koji su svojstveni funkcionalno zrelijim NK ćelijama.

Podaci koji su dobijeni u ovom radu nakon *in vitro* tretmana interleukinima IL-2 i IL-15 ukazuju na to da oba citokina povećavaju inače veoma nisku citotoksičnu aktivnost NK ćelija u neinfiltriranim i u tumor-infiltriranim regionalnim limfnim čvorovima bolesnika sa melanomom. Pored toga dobijeno je da za razliku od *in vitro* tretmana interleukinom IL-15, tretman interleukinom IL-2 dovodi do porasta ukupne populacije CD3 $^-$ CD56 $^+$ NK ćelija uvećanjem CD3 $^-$ CD56 $^{\text{potmulo}^+}$ subpopulacije u neinfiltriranim i u tumor-infiltriranim regionalnim limfnim čvorovima bolesnika sa melanomom. Izražena sposobnost citokina IL-2 i IL-15 da indukuju citotoksičnu aktivnost NK ćelija u obe grupe regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom, postignuta je putem indukcije transkripcije i sinteze citotoksičnog medijatora perforina, a preventivno njegove funkcionalno zrele forme. Oba citokina na CD3 $^-$ CD56 $^+$ NK ćelijama neinfiltriranih i tumor-infiltriranih regionalnih limfnih čvorova povećavaju ekspresiju ranog aktivacionog antigena CD69 i citotoksičnih NKG2D receptora, a pored toga povećanjem ekspresije CD16 i CD158b receptora doprinose zrelijem fenotipu ove populacije NK ćelija. Povećanje citotoksičnosti NK ćelija regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom koje je u ovom radu dobijeno *in vitro* tretmanima

interleukinima IL-2 i IL-15 ukazuje na potencijalni značaj NK ćelija regionalnih limfnih čvorova u novijem terapijskom pristupima kao što je adoptovni transfer NK ćelija kod bolesnika sa melanomom.

6 Zaključci

I Funkcionalne i imunofenotipske karakteristike NK ćelija regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom

Infiltrisanost tumorskim ćelijama regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom:

- ne menja citotoksičnu funkciju NK ćelija u limfnom čvoru, ali je praćena sniženom produkcijom IFN γ , još jednog merila funkcionalnosti NK ćelija
- praćena je povećanjem ukupne populacije CD3⁻CD56⁺ NK ćelija usled povećanja CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacije
- praćena je povećanom ekspresijom CD69 ranog aktivacionog antigena
- ne menja ekspresiju NKG2D aktivacionog receptora
- praćena je povećanom ekspresijom CD158b inhibitornog KIR receptora

na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama.

Pokazane razlike u ovim imunofenotipskim parametrima su više ispoljene kada je tumorskim ćelijama infiltrisan veći broj regionalnih limfnih čvorova kao i kada je veći stepen invazije primarnog tumora u kožu.

II Efekti in vitro tretmana interleukinima IL-2 i IL-15 na citotoksičnost i imunofenotipska svojstva NK ćelija regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom

Za razliku od *in vitro* tretmana interleukinom IL-15, tretman interleukinom IL-2 dovodi do porasta ukupne populacije CD3⁻CD56⁺ NK ćelija uvećanjem CD3⁻CD56^{potmulo+} subpopulacije u neinfiltiranim i u infiltiranim regionalnim limfnim čvorovima bolesnika sa melanomom.

In vitro tretmani interleukinima IL-2 i IL-15 u obe grupe regionalnih limfnih čvorova bolesnika sa melanomom:

- povećavaju citotoksičnost NK ćelija
- povećavaju transkripciju i sintezu perforina
- povećavaju ekspresiju ranog aktivacionog antigena CD69, citotoksičnih NKG2D i CD16 receptora kao i CD158b inhibitorynog KIR receptora na CD3⁻CD56⁺ NK ćelijama obe grupe regionalnih limfnih čvorova.

Oba citokina ispoljavaju svoje efekte povećanjem nivoa fosforilisanog STAT5 signalnog molekula

7 Literatura

Abi-Rached L, Parham P. Natural selection drives recurrent formation of activating killer cell immunoglobulin-like receptor and Ly49 from inhibitory homologues. *J Exp Med.* 2005; 201(8):1319-32.

Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2002 ; 3(6):549-57.

Allan DS, Rybalov B, Awong G, Zúñiga-Pflücker JC, Kopcow HD, Carlyle JR, Strominger JL. TGF- β affects development and differentiation of human natural killer cell subsets. *Eur J Immunol.* 2010; 40(8):2289-95

Alter G, Martin MP, Teigen N, Carr WH, Suscovich TJ, Schneidewind A, Streeck H, Waring M, Meier A, Brander C, Lifson JD, Allen TM, Carrington M, Altfeld M. Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes. *J Exp Med.* 2007; 204(12):3027-36.

Anderson DM, Kumaki S, Ahdieh M, Bertles J, Tometsko M, Loomis A, Giri J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. *J Biol Chem.* 1995; 270(50):29862-9.

Andersson KE, Williams GS, Davis DM, Höglund P. Quantifying the reduction in accessibility of the inhibitory NK cell receptor Ly49A caused by binding MHC class I proteins in cis. *Eur J Immunol.* 2007;37(2):516-27.

Arma LR, Podack ER. Natural Killer cytolytic activity. In: Lotze MT, Thomson AW: *Natural Killer Cells-Basic Science and Clinical Application.* Elsevier; 2010. p. 215-27.

Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Abrams J, Sznol M, Parkinson D, Hawkins M, Paradise C, Kunkel L, Rosenberg SA. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol.* 1999;17(7):2105-16.

Avice MN, Demeure CE, Delespesse G, Rubio M, Armant M, Sarfati M. IL-15 promotes IL-12 production by human monocytes via T cell-dependent contact and may contribute to IL-12-mediated IFN-gamma secretion by CD4+ T cells in the absence of TCR ligation. *J Immunol.* 1998; 161(7):3408-15.

Badoual C, Bouchaud G, Agueznay Nel H, Mortier E, Hans S, Gey A, Fernani F, Peyrard S, -Puig PL, Bruneval P, Sastre X, Plet A, Garrigue-Antar L, Quintin-Colonna F, Fridman WH, Brasnu D, Jacques Y, Tartour E. The soluble alpha chain of interleukin-15 receptor: a proinflammatory molecule associated with tumor progression in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2008; 68(10):3907-14.

Bakker AB, Wu J, Phillips JH, Lanier LL. NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Hum Immunol.* 2000;61(1):18-27.

Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med.* 2002; 196(4):493-503.

Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, Queirolo P, Vermi W, Facchetti F, Moretta A, Moretta L, Mingari MC, Vitale M. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:20847-20852.

Balsamo M, Vermi W, Parodi M, Pietra G, Manzini C, Queirolo P, Lonardi S, Augugliaro R, Moretta A, Facchetti F, Moretta L, Mingari MC, Vitale M. Melanoma cells become resistant to NK-cell-mediated killing when exposed to NK-cell numbers compatible with NK-cell infiltration in the tumor. *Eur J Immunol.* 2012; 42(7):1833-42.

Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E, Waldmann TA. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(11):4940-4.

Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(3 Pt 1):764-71.

Baume DM, Robertson MJ, Levine H, Manley TJ, Schow PW, Ritz J. Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur J Immunol.* 1992; 22(1):1-6

Bennett NJ, Ashiru O, Morgan FJ, Pang Y, Okecha G, Eagle RA, Trowsdale J, Sissons JG, Wills MR. Intracellular sequestration of the NKG2D ligand ULBP3 by human cytomegalovirus. *J Immunol.* 2010;185:1093–1102.

Berger C, Berger M, Hackman RC, Gough M, Elliott C, Jensen MC, Riddell SR. Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates. *Blood.* 2009; 114(12):2417-26.

Bessard A, Solé V, Bouchaud G, Quémener A, Jacques Y. High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Mol Cancer Ther.* 2009 ; 8(9):2736-45.

Besser MJ, Shoham T, Harari-Steinberg O, Zabari N, Ortenberg R, Yakirevitch A, Nagler A, Loewenthal R, Schachter J, Markel G. Development of allogeneic NK cell adoptive transfer therapy in metastatic melanoma patients: in vitro preclinical optimization studies. *PLoS One.* 2013;8(3):e57922.

Biassoni R, Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, Conte R, Poggi A, Moretta A, Moretta L. The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med.* 1996; 183(2):645-50.

Bloushtain N, Qimron U, Bar-Ilan A, Hershkovitz O, Gazit R, Fima E, Korc M, Vlodaysky I, Bovin NV, Porgador A. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol.* 2004; 173(4):2392-401.

Bonanno G, Iudicone P, Mariotti A, Procoli A, Pandolfi A, Fioravanti D, Corallo M, Perillo A, Scambia G, Pierelli L, Rutella S. Thymoglobulin, interferon- γ and interleukin-2 efficiently expand cytokine-induced killer (CIK) cells in clinical-grade cultures. *J Transl Med.* 2010; 8:129.

Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Peña J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology.* 1999;97:159-160.

Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.* 2003; 198(4):557-67.

Bouchard A, Ratthé C, Girard D. Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(5):893-900.

Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, Haldeman B, Ostrander CD, Kaifu T, Chabannon C, Moretta A, West R, Xu W, Vivier E, Levin SD. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med.* 2009;206(7):1495–1503

Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg.* 1970, 172, 902–908.

Brodin P, Kärre K, Höglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol.* 2009; 30(4):143-9.

Brown RL, Ortaldo JR, Griffith RL, Blanca I, Rabin H. The proliferation and function of human mononuclear leukocytes and natural killer cells in serum-free medium. *J Immunol Methods* 1985;81:207-14.

Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood.* 2006; 107(1):159-66.

Buckley RH. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annu. Rev. Immunol* 2004; 22 : 625 – 655.

Buddingh EP, Schilham MW, Ruslan SE, Berghuis D, Szuhai K, Suurmond J, Taminiau AH, Gelderblom H, Egeler RM, Serra M, Hogendoorn PC, Lankester AC. Chemotherapy-resistant osteosarcoma is highly susceptible to IL-15-activated allogeneic and autologous NK cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60(4):575-86.

Burton JD, Bamford RN, Peters C, Grant AJ, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E, Waldmann TA. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(11):4935-9.

Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med.* 1990; 171(5):1509-26.

Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008; 112(3):461-9.

Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, Wu L, Butcher EC. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol.* 2001; 166(11):6477-82.

Campillo JA, Legaz I, López-Álvarez MR, Bolarín JM, Las Heras B, Muro M, Minguela A, Moya-Quiles MR, Blanco-García R, Martínez-Banaclocha H, García-Alonso AM, Alvarez-López MR, Martínez-Escribano JA. KIR gene variability in cutaneous malignant melanoma: influence of KIR2D/HLA-C pairings on disease susceptibility and prognosis. *Immunogenetics.* 2013; 65(5):333-43.

Campoli M, Ferrone S. HLA antigen and NK cell activating ligand expression in malignant cells: a story of loss or acquisition. *Semin Immunopathol.* 2011; 33(4):321-34.

Campoli M, Ferrone S. Tumor escape mechanisms: potential role of soluble HLA antigens and NK cells activating ligands. *Tissue Antigens*. 2008;72:321-34.

Capitini CM, Fry TJ, Mackall CL. Cytokines as Adjuvants for Vaccine and Cellular Therapies for Cancer. *Am J Immunol*. 2009; 5(3):65-83.

Carrega P, Ferlazzo G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol*. 2012;3:347.

Carrega P, Morandi B, Costa R, et al. Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* 2008; 112:863-875.

Carrega P, Pezzino G, Queirolo P, Bonaccorsi I, Falco M, Vita G, Pende D, Misefari A, Moretta A, Mingari MC, Moretta L, Ferlazzo G. Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells. *PLoS One* 2009;4: e8132

Carretero M, Palmieri G, Llano M, Tullio V, Santoni A, Geraghty DE, López-Botet M. Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur J Immunol*. 1998; 28(4):1280-91.

Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, Eckhert K, Lindemann MJ, Lai CF, Croce CM, Baumann H, Caligiuri MA. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest*. 1997; 99(5):937-43.

Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K, Caligiuri MA. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest*. 1995; 96(6):2578-82.

Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression

of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(7):4120-5.

Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immuneresponses. *Immunol Rev*. 2010 May;235(1):267-85.

Chan A, Hong DL, Atzberger A, Kollnberger S, Filer AD, Buckley CD, McMichael A, Enver T, Bowness P. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 2007; 179:89-94.

Chan HW, Kurago ZB, Stewart CA, Wilson MJ, Martin MP, Mace BE, Carrington M, Trowsdale J, Lutz CT. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med*. 2003; 197(2):245-55.

Chan HW, Miller JS, Moore MB, Lutz CT. Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles. *J Immunol*. 2005; 175(9):5966-74.

Chen S, Kawashima H, Lowe JB, Lanier LL, Fukuda M. Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. *J Exp Med*. 2005; 202(12):1679-89.

Cho D, Shook DR, Shimasaki N, Chang YH, Fujisaki H, Campana D. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(15):3901-9.

Chrul S, Polakowska E, Szadkowska A, Bodalski J. Influence of interleukin IL-2 and IL-12 + IL-18 on surface expression of immunoglobulin-like receptors KIR2DL1, KIR2DL2, and KIR3DL2 in natural killer cells. *Mediators Inflamm*. 2006;2006(4):46957.

Cichocki F, Hanson RJ, Lenvik T, Pitt M, McCullar V, Li H, Anderson SK, Miller JS. The transcription factor c-Myc enhances KIR gene transcription through direct binding to an upstream distal promoter element. *Blood*. 2009; 113(14):3245-53.

Cichocki F, Miller JS, Anderson SK. Killer immunoglobulin-like receptor transcriptional regulation: a fascinating dance of multiple promoters. *J Innate Immun*. 2011;3(3):242-8.

Cipponi A, Wieers G, van Baren N, Coulie PG. Tumor-infiltrating lymphocytes: apparently good for melanoma patients. But why? *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60(8):1153-60.

Clark, WH, Jr. From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969; 29, 705–727

Cochran AJ, Huang RR, Lee J, Itakura E, Leong SP, Essner R. Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(9):659-70.

Colonna M, Nakajima H, Cella M. Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells. *J Leukoc Biol.* 1999; 66(5):718-22.

Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science.* 1995; 268(5209):405-8.

Comes A, Di Carlo E, Musiani P, Rosso O, Meazza R, Chiodoni C, Colombo MP, Ferrini S. IFN-gamma-independent synergistic effects of IL-12 and IL-15 induce anti-tumor immune responses in syngeneic mice. *Eur J Immunol.* 2002; 32(7):1914-23

Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, VanDeusen JB, Waite RE, Liu Y, Aguila HL, Caligiuri MA. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood.* 2002; 100(10):3633-8.

Cooper MA, Colonna M, Yokoyama WM. Hidden talents of natural killers: NK cells in innate and adaptive immunity. *EMBO Rep.* 2009;10(10):1103-10.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22(11): 633-40.

Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 2004; 25(1):47-52.

Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001b; 97(10): 3146-51.

De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(2):728-32.

de Rham C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, Schneiter G, Dayer JM, Villard J. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(6):R125.

Decot V, Voillard L, Latger-Cannard V, Aissi-Rothe L, Perrier P, Stoltz JF, et al. Natural-killer cell amplification for adoptive leukemia relapse immunotherapy: comparison of three cytokines, IL-2, IL-15, or IL-7 and impact on NKG2D, KIR2DL1, and KIR2DL2 expression. *Exp Hematol* 2010;38:351–62.

Delahaye NF, Rusakiewicz S, Martins I, Ménard C, Roux S, Lyonnet L, Paul P, Sarabi M, Chaput N, Semeraro M, Minard-Colin V, Poirier-Colame V, Chaba K, Flament C, Baud V, Authier H, Kerdine-Römer S, Pallardy M, Cremer I, Peaudecerf L, Rocha B, Valteau-Couanet D, Gutierrez JC, Nunès JA, Commo F, Bonvalot S, Ibrahim N, Terrier P, Opolon P, Bottino C, Moretta A, Tavernier J, Rihet P, Coindre JM, Blay JY, Isambert N, Emile JF, Vivier E, Lecesne A, Kroemer G, Zitvogel L. Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med.* 2011; 17(6):700-7.

Delespine-Carmagnat, M.,G. Bouvier, J. Bertoglio. Association of STAT1, STAT3 and STAT5 proteins with the IL-2 receptor involves different subdomains of the IL-2 receptor beta chain. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 59–68.

Di Santo JP, Vosshenrich CA. Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol Rev.* 2006; 214:35-46.

Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol.* 2000; 1(2):119-26.

DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor β chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:377-381.

DiSanto JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:257-86.

Dobrovina ES, Dobrovin MM, Vider E, Sisson RB, O'Reilly RJ, Dupont B, Vyas YM. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J Immunol*. 2003; 171(12):6891-9.

Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15R α recycles and presents IL-15 *In trans* to neighboring cells. *Immunity*. 2002; 17(5):537-47.

Dubois S, Patel HJ, Zhang M, Waldmann TA, Muller JR. Preassociation of IL-15 with IL-15R α -IgG1-Fc enhances its activity on proliferation of NK and CD8⁺/CD44^{high} T cells and its antitumor action. *J Immunol* 2008;180:2099– 106.

Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(9):737-44.

Eissens DN, Spanholtz J, van der Meer A, van Cranenbroek B, Dolstra H, Kwekkeboom J, Preijers FW, Joosten I. Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PLoS One*. 2012;7(2):e30930.

Endt J, McCann FE, Almeida CR, Urlaub D, Leung R, Pende D, Davis DM, Watzl C. Inhibitory receptor signals suppress ligation-induced recruitment of NKG2D to GM1-rich membrane domains at the human NK cell immune synapse. *J Immunol*. 2007; 178(9):5606-11.

Epardaud M, Elpek KG, Rubinstein MP, Yonekura AR, Bellemare-Pelletier A, Bronson R, Hamerman JA, Goldrath AW, Turley SJ. Interleukin-15/interleukin-15R α complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8⁺ T cells. *Cancer Res*. 2008; 68(8):2972-83.

Epling-Burnette, Sheng W, Djeu JY. Signaling events in natural killer cells. In: Lotze MT, Thomson AW: Natural Killer Cells-Basic Science and Clinical Application. Elsevier; 2010. p95-112.

Farzad Z, Cochran AJ, McBride WH, et al. Lymphocyte subset alterations in nodes regional to human melanoma. *Cancer Res* 1990;50:3585-3588.

Fehniger TA, Cai SF, Cao X, Bredemeyer AJ, Presti RM, French AR, Ley TJ. Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity*. 2007; 26(6):798-811.

Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002; 13(2):169-83.

Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003; 101(8):3052-7.

Ferlazzo G, Münz C. Dendritic cell interactions with NK cells from different tissues. *J Clin Immunol*. 2009; 29(3):265-73.

Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, Bougras G, Muller WA, Moretta L, Münz C. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(47):16606-11.

Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Münz C. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol*. 2004; 172(3):1455-62.

Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*. 2002; 195(3):343-51.

Ferlazzo G. Natural killer and dendritic cell liaison: recent insights and open questions. *Immunol Lett.* 2005; 101(1):12-7.

Fernández L, Portugal R, Valentín J, Martín R, Maxwell H, González-Vicent M, Díaz MÁ, de Prada I, Pérez-Martínez A. In vitro Natural Killer Cell Immunotherapy for Medulloblastoma. *Front Oncol.* 2013; 3:94..

Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood.* 2005; 105(11):4416-23.

Fewkes NM, Mackall CL. Novel gamma-chain cytokines as candidate immunomodulators in immune therapies for cancer. *Cancer J.* 2010;16(4):392-8.

Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(8):554-67

Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, Mao HC, Ferketich AK, Nuovo GJ, Hughes TL, Marburger TB, Sung J, Baiocchi RA, Guimond M, Caligiuri MA. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity.* 2005;22(3):295

Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev.* 2006; 214:56-72.

Freud AG, Yokohama A, Becknell B, Lee MT, Mao HC, Ferketich AK, Caligiuri MA. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med.* 2006; 203(4):1033-43.

Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, Stewart CC, Caligiuri MA, Evans SS. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol.* 1998;161(1):400-8.

Fuchs A, Cella M, Kondo T, Colonna M. Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood.* 2005; 106(6):2076-82.

Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, Gajewski TF. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J Exp Med*. 2011; 208(10):2005-16.

Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, Eldridge P, Leung WH, Campana D. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*. 2009;69(9):4010-7.

Gamero AM, Ussery D, Reintgen DS, Puleo CA, Djeu JY. Interleukin 15 induction of lymphokine-activated killer cell function against autologous tumor cells in melanoma patient lymphocytes by a CD18-dependent, perforin-related mechanism. *Cancer Res*. 1995; 55(21):4988-94.

Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*. 2009; 27(1):3-9.

Garg TK, Szmania SM, Khan JA, Hoering A, Malbrough PA, Moreno-Bost A, Greenway AD, Lingo JD, Li X, Yaccoby S, Suva LJ, Storrie B, Tricot G, Campana D, Shaughnessy JD Jr, Nair BP, Bellamy WT, Epstein J, Barlogie B, van Rhee F. Highly activated and expanded natural killer cells for multiple myeloma immunotherapy. *Haematologica*. 2012; 97(9):1348-56.

Garrod KR, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. Natural killer cells actively patrol peripheral lymph nodes forming stable conjugates to eliminate MHC-mismatched targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(29):12081-6.

Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005; 436(7054):1186-90.

Gazit R, Garty BZ, Monselise Y, Hoffer V, Finkelstein Y, Markel G, Katz G, Hanna J, Achdout H, Gruda R, Gonen-Gross T, Mandelboim O. Expression of KIR2DL1 on the entire NK cell population: a possible novel immunodeficiency syndrome. *Blood*. 2004;103(5):1965-6.

Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, Leborgne M, Brousse N, Saeland S, Davoust J. Accumulation of immature Langerhans cells in

human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med*. 2002; 196(4):417-30.

Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev*. 2009; 228(1):273-87.

Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, Maccario R, Bonetti F, Wojnar J, Martinetti M, Frassoni F, Giorgiani G, Bacigalupo A, Holowiecki J. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2003; 102(3):814-9.

Gil M, Park SJ, Chung YS, Park CS. Interleukin-15 enhances proliferation and chemokine secretion of human follicular dendritic cells. *Immunology*. 2010; 130(4):536-44.

Gillard-Bocquet M, Caer C, Cagnard N, Crozet L, Perez M, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Cremer I. Lung tumor microenvironment induces specific gene expression signature in intratumoral NK cells. *Front Immunol*. 2013; 4:19.

Gilmour KC, Fujii H, Cranston T, Davies EG, Kinnon C, Gaspar HB. Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. *Blood*. 2001; 98(3):877-9.

Giron-Michel J, Azzi S, Khawam K, Mortier E, Caignard A, Devocelle A, Ferrini S, Croce M, François H, Lecru L, Charpentier B, Chouaib S, Azzarone B, Eid P. Interleukin-15 plays a central role in human kidney physiology and cancer through the γ c signaling pathway. *PLoS One*. 2012;7(2):e31624.

Giron-Michel J, Giuliani M, Fogli M, Brouty-Boyé D, Ferrini S, Baychelier F, Eid P, Lebousse-Kerdilès C, Durali D, Biassoni R, Charpentier B, Vasquez A, Chouaib S, Caignard A, Moretta L, Azzarone B. Membrane-bound and soluble IL-15/IL-15R α complexes display differential signaling and functions on human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2005; 106(7):2302-10.

Giuliani M, Giron-Michel J, Negrini S, Vacca P, Durali D, Caignard A, Le Bousse-Kerdiles C, Chouaib S, Devocelle A, Bahri R, Durrbach A, Taoufik Y, Ferrini S, Croce M, Mingari MC, Moretta L, Azzarone B. Generation of a novel regulatory NK cell subset from peripheral blood CD34+ progenitors promoted by membrane-bound IL-15. *PLoS One*. 2008; 3(5):e2241.

Gordon J, MacLean LD. A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro. *Nature*. 1965; 208(5012):795-6.

Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*. 1994; 264(5161):965-8.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007; 445(7130):851-7.

Grier JT, Forbes LR, Monaco-Shawver L, Oshinsky J, Atkinson TP, Moody C, Pandey R, Campbell KS, Orange JS. Human immunodeficiency-causing mutation defines CD16 in spontaneous NK cell cytotoxicity. *J Clin Invest*. 2012; 122(10):3769-80.

Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(22):12445-50.

Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002; 419(6908):734-8.

Gründemann C, Bauer M, Schweier O, von Oppen N, Lässig U, Saudan P, Becker KF, Karp K, Hanke T, Bachmann MF, Pircher H. Cutting edge: identification of E-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor G1. *J Immunol*. 2006; 176(3):1311-5.

Guia S, Jaeger BN, Piatek S, Mailfert S, Trombik T, Fenis A, Chevrier N, Walzer T, Kerdiles YM, Marguet D, Vivier E, Ugolini S. Confinement of activating receptors at

the plasma membrane controls natural killer cell tolerance. *Sci Signal*. 2011; 4(167):ra21.

Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol*. 2004; 35(3):309-18.

Hameed A, Lowrey DM, Lichtenheld M, Podack ER. Characterization of three serine esterases isolated from human IL-2 activated killer cells. *J Immunol*. 1988; 141(9):3142-7.

Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*. 1975 ;16(2):230-9.

Hervieu A, Mignot G, Ghiringhelli F. Dacarbazine mediate antimelanoma effects via NK cells. *Oncoimmunology*. 2013; 2(4):e23714

Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*. 2004; 200(8):957-65.

Hodi FS. Well-defined melanoma antigens as progression markers for melanoma: insights into differential expression and host response based on stage. *ClinCancer Res*. 2006; 12(3 Pt 1):673-8.

Höglund P, Brodin P. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10:724-34.

Höglund P, Ohlén C, Carbone E, Franksson L, Ljunggren HG, Latour A, Koller B, Kärre K. Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(22):10332-6.

Hromadnikova I, Pirkova P, Sedlackova L. Influence of In Vitro IL-2 or IL-15 Alone or in Combination with Hsp-70-Derived 14-mer Peptide (TKD) on the Expression of NK Cell Activatory and Inhibitory Receptors. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:405295.

Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K, O'Reilly RJ, Horowitz MM, Dupont B. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*. 2005; 105(12):4878-84.

Huarte E, Fisher J, Turk MJ, Mellinger D, Foster C, Wolf B, Meehan KR, Fadul CE, Ernstoff MS. Ex vivo expansion of tumor specific lymphocytes with IL-15 and IL-21 for adoptive immunotherapy in melanoma. *Cancer Lett*. 2009; 285(1):80-8.

Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D. Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol*. 2013;4:69.

Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, Corcuff E, Mortier E, Jacques Y, Spits H, Di Santo JP. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med*. 2009; 206(1):25-34

Huntington ND, Puthalakath H, Gunn P, Naik E, Michalak EM, Smyth MJ, Tabarias H, Degli-Esposti MA, Dewson G, Willis SN, Motoyama N, Huang DC, Nutt SL, Tarlinton DM, Strasser A. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol*. 2007; 8(8):856-63.

Huntington ND, Vosshenrich CAJ, Di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(9):703–714.

Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R, Becknell B, McCoy JP Jr, Takahashi Y, Suffredini DA, Linehan WM, Caligiuri MA, Childs RW. Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood*. 2004; 104(1):170-7.

Imada K, Bloom ET, Nakajima H, Horvath-Arcidiacono JA, Udy GB, Davey HW, Leonard WJ. Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *J Exp Med*. 1998; 188(11):2067-74.

Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000; 356(9244):1795-9

Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med*. 2006; 203(2):289-95.

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*. 1999;162(9):5317-26.

Jackson A, Warner N. Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose N, Friedmah H, Fahey J, editors. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1986. p. 226-35.

Jakobisiak M, Golab J, Lasek W. Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011; 22(2):99-108.

Jamieson AM, Isnard P, Dorfman JR, Coles MC, Raulet DH. Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *J Immunol*. 2004; 172(2):864-70.

Janas ML, Groves P, Kienzle N, Kelso A. IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8+ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol*. 2005; 175(12):8003-10.

Jiang J, Wu C, Lu B. Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity. *J Transl Med*. 2013; 11:83.

Jonuleit H, Wiedemann K, Müller G, Degwert J, Hoppe U, Knop J, Enk AH. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *J Immunol*. 1997; 158(6):2610-5.

Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res.* 2009; s19(5):275-82.

Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 1986; 319(6055):675-8.

Kasakura S, Lowenstein L. A factor stimulating DNA synthesis derived from the medium of leukocyte cultures. *Nature.* 1965; 208(5012):794-5.

Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S, Peschon JJ. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med.* 2000; 191(5):771-80.

Khar A, Varalakshmi C, Pardhasaradhi BV, Mubarak Ali A, Kumari AL. Depletion of the natural killer cell population in the peritoneum by AK-5 tumor cells overexpressing fas-ligand: a mechanism of immune evasion. *Cell Immunol.* 1998; 189(2):85-91.

Khawam K, Giron-Michel J, Gu Y, Perier A, Giuliani M, Caignard A, Devocelle A, Ferrini S, Fabbi M, Charpentier B, Ludwig A, Chouaib S, Azzarone B, Eid P. Human renal cancer cells express a novel membrane-bound interleukin-15 that induces, in response to the soluble interleukin-15 receptor alpha chain, epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2009; 69(4):1561-9.

Kielczewska A, Kim HS, Lanier LL, Dimasi N, Vidal SM. Critical residues at the Ly49 natural killer receptor's homodimer interface determine functional recognition of m157, a mouse cytomegalovirus MHC class I-like protein. *J Immunol.* 2007; 178(1):369-77.

Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.* 2008: 4th ed. Bloxham, UK: Scion.

Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; 5(2): 112-7.

Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005;436(7051):709-13.

Kogure T, Fujinaga H, Niizawa A, Hai LX, Shimada Y, Ochiai H, Terasawa K. Killer-cell inhibitory receptors, CD158a/b, are upregulated by interleukin-2, but not interferon-gamma or interleukin-4. *Mediators Inflamm*. 1999;8(6):313-8.

Kogure T, Mantani N, Goto H, Shimada Y, Tamura J, Terasawa K. The effect of interleukin-15 on the expression of killer-cell immunoglobulin-like receptors on peripheral natural killer cells in human. *Mediators Inflamm*. 2002; 11(4):219-24.

Kogure T, Mantani N, Sakai S, Shimada Y, Tamura J, Terasawa K. Natural killer cytolytic activity is associated with the expression of killer cell immunoglobulin-like receptors on peripheral lymphocytes in human. *Mediators Inflamm*. 2003; 12(2):117-21.

Konjevic G, Jurisic V, Jovic V, Vuletic A, Mirjagic Martinovic K, Radenkovic S, Spuzic I. Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies. *Immunol Res*. 2012; 52(1-2):139-56.

Konjević G, Jović V, Vuletić A, Radulović S, Jelić S, Spuzić I. CD69 on CD56+ NK cells and response to chemoimmunotherapy in metastatic melanoma. *Eur J Clin Invest*. 2007; 37(11):887-96.

Konjević G, Mirjagic Martinovic K, Vuletic A, Jović V, Jurisić V, Babović N, Spuzić I. Low expression of CD161 and NKG2D activating NK receptor is associated with impaired NK cell cytotoxicity in metastatic melanoma patients. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:1–11.

Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Babović N. In-vitro IL-2 or IFN- α -induced NKG2D and CD161 NK cell receptor expression indicates novel aspects of NK cell activation in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res*. 2010; 20(6):459-67.

Konjević G, Mirjačić Martinović K, Vuletić A, Radenković S. Novel aspects of in vitro IL-2 or IFN- α enhanced NK cytotoxicity of healthy individuals based on NKG2D and CD161 NK cell receptor induction. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(10):663-71.

Konjević G, Schlesinger B, Cheng L, Olsen KJ, Podack ER, Spuzic I. Analysis of perforin expression in human peripheral blood lymphocytes, CD56+ natural killer cell subsets and its induction by interleukin-2. *Immunol Invest.* 1995; 24(3):499-507.

Kovanen PE, Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev.* 2004; 202:67-83.

Krieg S, Ullrich E. Novel immune modulators used in hematology: impact on NK cells. *Front Immunol.* 2012;3:388.

Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol.* 2012;3:335.

Kubica AW, Brewer JD. Melanoma in immunosuppressed patients. *Mayo Clin Proc.* 2012; 87(10):991-1003.

Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol.* 2008; 20(6):343-52.

Kündig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science.* 1993; 262(5136):1059-61.

Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L, Capanni M, Umansky V, Paschen A, Sucker A, Pende D, Groh V, Biassoni R, Höglund P, Kato M, Shibuya K, Schadendorf D, Anichini A, Ferrone S, Velardi A, Kärre K, Shibuya A, Carbone E, Colucci F. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 2009; 119(5):1251-63.

Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136:4480-86.

Lanier LL. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev.* 2009; 227(1):150-60.

Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:225-74.

Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2008 May;9(5):495-502.

Laurent S, Queirolo P, Boero S, Salvi S, Piccioli P, Boccardo S, Minghelli S, Morabito A, Fontana V, Pietra G, Carrega P, Ferrari N, Tosetti F, Chang LJ, Mingari MC, Ferlazzo G, Poggi A, Pistillo MP. The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF- α production. *J Transl Med.* 2013; 11:108

Leong SP, Peng M, Zhou YM, Vaquerano JE, Chang JW. Cytokine profiles of sentinel lymph nodes draining the primary melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2002; 9(1):82-7.

Liao NS, Bix M, Zijlstra M, Jaenisch R, Raulet D. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science.* 1991;253(5016):199-202.

Liao W, Schones DE, Oh J, Cui Y, Cui K, Roh TY, Zhao K, Leonard WJ. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat Immunol.* 2008; 9(11):1288-96

Lin JX, Li P, Liu D, Jin HT, He J, Ata Ur Rasheed M, Rochman Y, Wang L, Cui K, Liu C, Kelsall BL, Ahmed R, Leonard WJ. Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity.* 2012; 36(4):586-99.

Lin, JX., Leonard WJ. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene.* 2000; 19: 2566–2576.

Lipson EJ. Re-orienting the immune system: Durable tumor regression and successful re-induction therapy using anti-PD1 antibodies. *Oncoimmunology.* 2013; 2(4):e23661.

Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*. 1998; 9(5):669-76.

London L, Perussia B, Trinchieri G. Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells. *J Immunol*. 1986; 137(12):3845-54.

Long EO, Barber DF, Burshtyn DN, Faure M, Peterson M, Rajagopalan S, Renard V, Sandusky M, Stebbins CC, Wagtmann N, Watzl C. Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol Rev*. 2001;181:223-33.

Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, Norris PJ, Nixon DF, Lanier LL. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010; 116(19):3865-74.

López-Larrea C, Suárez-Alvarez B, López-Soto A, López-Vázquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med*. 2008; 14(4):179-89.

Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*. 2007; 26(4):503-17.

Maccalli C, Nonaka D, Piris A, Pende D, Rivoltini L, Castelli C, Parmiani G. NKG2D-mediated antitumor activity by tumor-infiltrating lymphocytes and antigen-specific T-cell clones isolated from melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(24):7459-68.

Mailliard RB, Alber SM, Shen H, Watkins SC, Kirkwood JM, Herberman RB, Kalinski P. IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med*. 2005; 202(7):941-53.

Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*. 2010; 33(2):153-65.

Mamessier E, Sylvain A, Thibult ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F, Moretta A, Olive D. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2011; 121(9):3609-22.

Mandelboim O, Malik P, Davis DM, Jo CH, Boyson JE, Strominger JL. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(10):5640-4.

Mandelboim O, Reyburn HT, Valés-Gómez M, Pazmany L, Colonna M, Borsellino G, Strominger JL. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med*. 1996; 184(3):913-22.

Marcenaro E, Cantoni C, Pesce S, Prato C, Pende D, Agaogué S, Moretta L, Moretta A. Uptake of CCR7 and acquisition of migratory properties by human KIR+ NK cells interacting with monocyte-derived DC or EBV cell lines: regulation by KIR/HLA-class I interaction. *Blood*. 2009;114(19):4108-16.

Markel G, Seidman R, Besser MJ, Zabari N, Ortenberg R, Shapira R, Treves AJ, Loewenthal R, Orenstein A, Nagler A, Schachter J. Natural killer lysis receptor (NKLR)/NKLR-ligand matching as a novel approach for enhancing anti-tumor activity of allogeneic NK cells. *PLoS One*. 2009;4(5):e5597.

Markel G, Wolf D, Hanna J, Gazit R, Goldman-Wohl D, Lavy Y, Yagel S, Mandelboim O. Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *J Clin Invest*. 2002; 110(7):943-53.

Marras F, Bozzano F, De Maria A. Involvement of activating NK cell receptors and their modulation in pathogen immunity. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:152430.

Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*. 2004; 5(12):1260-5.

Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J. Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell*. 2008; 133(4):681-92.

McCann FE, Vanherberghen B, Eleme K, Carlin LM, Newsam RJ, Goulding D, Davis DM. The size of the synaptic cleft and distinct distributions of filamentous actin, ezrin, CD43, and CD45 at activating and inhibitory human NK cell immune synapses. *J Immunol.* 2003; 170(6):2862-70

Meade JL, Wilson EB, Holmes TD, de Wynter EA, Brett P, Straszynski L, Ballard PA, Trapani JA, McDermott MF, Cook GP. Proteolytic activation of the cytotoxic phenotype during human NK cell development. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):803-13.

Meazza R, Azzarone B, Orengo AM, Ferrini S. Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:861920.

Meazza R, Lollini PL, Nanni P, De Giovanni C, Gaggero A, Comes A, Cilli M, Di Carlo E, Ferrini S, Musiani P. Gene transfer of a secretable form of IL-15 in murine adenocarcinoma cells: effects on tumorigenicity, metastatic potential and immune response. *Int J Cancer.* 2000; 87(4):574-81.

Meazza R, Verdiani S, Biassoni R, Coppolecchia M, Gaggero A, Orengo AM, Colombo MP, Azzarone B, Ferrini S. Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene.* 1996; 12(10):2187-92.

Melero I, Grimaldi AM, Perez-Gracia JL, Ascierto PA. Clinical development of immunostimulatory monoclonal antibodies and opportunities for combination. *ClinCancer Res.* 2013; 19(5):997-1008.

Meyaard L. The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *J Leukoc Biol.* 2008; 83(4):799-803.

Mirjačić Martinović K, Konjević G, Babović N, Inić M. The stage dependent changes in NK cell activity and the expression of activating and inhibitory NK cell receptors in melanoma patients. *J Surg Res.* 2011; 171(2):637-49

Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:619-48.

Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ.* 2008; 15(2):226-33.

Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol.* 2002; 32(5):1205-11

Mortier E, Bernard J, Plet A, Jacques Y. Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J Immunol.* 2004; 173(3):1681-8.

Mortier E, Quémener A, Vusio P, Lorenzen I, Boublik Y, Grötzinger J, Plet A, Jacques Y. Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. *J Biol Chem.* 2006; 281(3):1612-9.

Mortier E, Woo T, Advincula R, Gozalo S, Ma A. IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med.* 2008; 205(5):1213-25.

Morton BA, Ramey WG, Paderon H, et al. Monoclonal antibody-defined phenotypes of regional lymph node and peripheral blood lymphocyte subpopulations in early breast cancer. *Cancer Res* 1986; 4 Pt 2: 2121-2126.)

Mujaj SA, Spanevello MM, Gandhi MK, Nourse JP. Molecular mechanisms influencing NK cell development: implications for NK cell malignancies. *Am J Blood Res.* 2011;1(1):34-45.

Munger W, DeJoy SQ, Jeyaseelan R Sr, Torley LW, Grabstein KH, Eisenmann J, Paxton R, Cox T, Wick MM, Kerwar SS. Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2. *Cell Immunol.* 1995;165(2):289-93

Murphy WJ, Parham P, Miller JS. NK cells--from bench to clinic. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012; 18(1 Suppl):S2-7.

Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Puliti M, Bulfone-Paus S, Merlino C, Savoia D, Cavallo R, Ponzi AN, Badolato R. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. *Infect Immun*. 1998; 66(6):2640-7

Naumova E, Mihaylova A, Ivanova M, Mihailova S. Impact of KIR/HLA ligand combinations on immune responses in malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56: 95–100.

Neely GG, Epelman S, Ma LL, Colarusso P, Howlett CJ, Amankwah EK, McIntyre AC, Robbins SM, Mody CH. Monocyte surface-bound IL-15 can function as an activating receptor and participate in reverse signaling. *J Immunol*. 2004; 172(7):4225-34.

Nevala WK, Vachon CM, Leontovich AA, Scott CG, Thompson MA, Markovic SN; Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(6):1931-9.

Older Aguilar AM, Guethlein LA, Adams EJ, Abi-Rached L, Moesta AK, Parham P. Coevolution of killer cell Ig-like receptors with HLA-C to become the major variable regulators of human NK cells. *J Immunol*. 2010;185(7):4238-51.

Olsen SK, Ota N, Kishishita S, Kukimoto-Niino M, Murayama K, Uchiyama H, Toyama M, Terada T, Shirouzu M, Kanagawa O, Yokoyama S. Crystal Structure of the interleukin-15.interleukin-15 receptor alpha complex: insights into trans and cis presentation. *J Biol Chem*. 2007; 282(51):37191-204.

Orr MT, Murphy WJ, Lanier LL. 'Unlicensed' natural killer cells dominate the response to cytomegalovirus infection. *Nat Immunol*. 2010; 11(4):321-7.

O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*. 2002 Apr;109 Suppl:S121-31.

Park SY, Saijo K, Takahashi T, Osawa M, Arase H, Hirayama N, Miyake K, Nakauchi H, Shirasawa T, Saito T. Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity*. 1995; 3(6):771-82.

Park YP, Choi SC, Kiesler P, Gil-Krzewska A, Borrego F, Weck J, Krzewski K, Coligan JE. Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the γ c cytokines and TGF- β 1. *Blood*. 2011; 118(11):3019-27.

Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(19):6287-97.

Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcenaro S, Nanni M, Biassoni R, Bottino C, Moretta A, Moretta L. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol*. 2001; 31(4):1076-86.

Pende D, Castriconi R, Romagnani P, Spaggiari GM, Marcenaro S, Dondero A, Lazzeri E, Lasagni L, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Moretta L, Moretta A, Bottino C. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood*. 2006; 107(5):2030-6.

Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, Romeo E, Cognet C, Martinetti M, Maccario R, Mingari MC, Vivier E, Moretta L, Locatelli F, Moretta A. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2009; 113(13):3119-29.

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. Identification and molecular characterization of Nkp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*. 1999; 190(10):1505-16.

Pillet AH, Thèze J, Rose T. Interleukin (IL)-2 and IL-15 have different effects on human natural killer lymphocytes. *Hum Immunol.* 2011;72(11):1013-7.

Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, Lichtenheld MG, Bevan MJ, Rao A. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity.* 2010; 32(1):79-90.

Pisegna S, Zingoni A, Pirozzi G, Cinque B, Cifone MG, Morrone S, Piccoli M, Frati L, Palmieri G, Santoni A.. Src-Dependent Syk Activation controls CD69-mediated signaling and function on human NK cells. *J Immunol* 2002; 169:68-74.

Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, André P, Dieu-Nosjean MC, Alifano M, Régnard JF, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Cremer I. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 2011; 71(16):5412-22.

Podack ER, Dennert G. Assembly of two types of tubules with putative cytolytic function by cloned natural killer cells. *Nature.* 1983; 302(5907):442-5.

Presnell SR, Chan HW, Zhang L, Lutz CT. IL-2/IL-15 activate the human clonally restricted KIR3DL1 reverse promoter. *Genes Immun.* 2013; 14(2):107-14.

Rajagopalan S, Long EO. Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(50):20596-601

Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(8):617-28.

Ranson T, Vosshenrich CA, Corcuff E, Richard O, Müller W, Di Santo JP. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood.* 2003; 101(12):4887-93.

Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:291-330.

Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:781–790.

Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*. 1998; 8(5):615-23.

Richmond A, Yang J, Su Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009; 22(2):175-86.

Ridolfi L, Ridolfi R. Preliminary experiences of intralesional immunotherapy in cutaneous metastatic melanoma. *Hepatogastroenterology*. 2002; 49(44):335-9.

Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, Sumegi J. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest*. 2006; 116(1):182-92.

Riteau B, Barber DF, Long EO. Vav1 phosphorylation is induced by beta2 integrin engagement on natural killer cells upstream of actin cytoskeleton and lipid raft reorganization. *J Exp Med*. 2003; 198(3):469-74.

Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76(12): 2421-38.

Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol*. 2002; 71(2):173-83.

Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(7):480-90.

Rodriguez T, Mendez R, Roberts CH, Ruiz-Cabello F, Dodi IA, López Nevot MA, Paco L, Maleno I, Marsh SG, Pawelec G, Garrido F. High frequency of homozygosity of the HLA region in melanoma cell lines reveals a pattern compatible with extensive loss of heterozygosity. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:141

Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, Ratto G, Forte G, Carrega P, Lui G, Conte R, Strowig T, Moretta A, Münz C, Thiel A, Moretta L, Ferlazzo G. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 2007; 178:4947-4955.

Roothans D, Smits E, Lion E, Tel J, Anguille S. CD56 marks human dendritic cell subsets with cytotoxic potential. *Oncoimmunology*. 2013; 2(2):e23037.

Rosenberg S. Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75(4): 595-603.

Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86(15):1159-66.

Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002; 295(5562):2097-100.

Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:323-70.

Sahm C, Schönfeld K, Wels WS. Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(9):1451-61.

Saito S, Harada Y, Morodomi Y, Onimaru M, Yoshida K, Kyuragi R, Matsubara H, Yonemitsu Y. Ex vivo generation of highly purified and activated natural killer cells from human peripheral blood. *Hum Gene Ther Methods*. 2013; 24(4):241-52.

Sato N, Sabzevari H, Fu S, Ju W, Petrus MN, Bamford RN, Waldmann TA, Tagaya Y. Development of an IL-15-autocrine CD8 T-cell leukemia in IL-15-transgenic mice requires the cis expression of IL-15R α . *Blood*. 2011; 117(15):4032-40.

Satwani P, van de Ven C, Ayello J, Cairo D, Simpson LL, Baxi L, Cairo MS. Interleukin (IL)-15 in combination with IL-2, fms-like tyrosine kinase-3 ligand and anti-CD3 significantly enhances umbilical cord blood natural killer (NK) cell and NK-cell subset expansion and NK function. *Cytotherapy*. 2011; 13(6):730-8.

Schleypen JS, Baur N, Kammerer R, Nelson PJ, Rohrman K, Gröne EF, Hohenfellner M, Haferkamp A, Pohla H, Schendel DJ, Falk CS, Noessner E. Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:718-725

Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG, Grandien A. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol.*2001; 167(4):2068-73.

Seidel MG, Freissmuth M, Pehamberger H, Micksche M. Stimulation of natural killer activity in peripheral blood lymphocytes of healthy donors and melanoma patients in vitro: synergism between interleukin (IL)-12 and IL-15 or IL-12 and IL-2. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998; 358(3):382-9.

Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol.* 2013; 4:76.

Sevko A, Umansky V. Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: thick as thieves. *J Cancer.* 2013;4(1):3-11.

Sibbitt WL Jr, Bankhurst AD, Jumonville AJ, Saiki JH, Saiers JH, Doberneck RC. Defects in natural killer cell activity and interferon response in human lung carcinoma and malignant melanoma. *Cancer Res.* 1984; 44(2):852-6.

Siegler U, Meyer-Monard S, Jörger S, Stern M, Tichelli A, Gratwohl A, Wodnar-Filipowicz A, Kalberer CP. Good manufacturing practice-compliant cell sorting and large-scale expansion of single KIR-positive alloreactive human natural killer cells for multiple infusions to leukemia patients. *Cytotherapy.* 2010; 12(6):750-63.

Smith KA. The structure of IL2 bound to the three chains of the IL2 receptor and how signaling occurs. *Med Immunol* 2006; 5: 3.

Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2005; 42(4):501-10.

Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* 2004; 202: 275-93.

Smyth MJ, Swann J, Kelly JM, Cretney E, Yokoyama WM, Diefenbach A, Sayers TJ, Hayakawa Y. NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med* 2004; 200(10): 1325-35.

Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun.* 2013; 13:8.

Stebbins CC, Watzl C, Billadeau DD, Leibson PJ, Burshtyn DN, Long EO. Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity. *Mol Cell Biol.* 2003;23(17):6291-9.

Steel JC, Waldmann TA, Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2012; 33(1):35-41.

Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, Horwitz E, Prokocimer Z, Prichard M, Hahn G, Goldman-Wohl D, Greenfield C, Yagel S, Hengel H, Altuvia Y, Margalit H, Mandelboim O. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science.* 2007;317(5836):376-81.

Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, Horwitz E, Elboim M, Stanietsky N, Mandelboim M, Mandelboim O. Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol.* 2008; 9(9):1065-73.

Stern-Ginossar N, Mandelboim O. Receptors on NK cells In: Lotze MT, Thomson AW: *Natural Killer Cells-Basic Science and Clinical Application.* Elsevier; 2010 p.155-75.

Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol.* 2002; 168(2):671-9.

Sutherland CL, Rabinovich B, Chalupny NJ, Brawand P, Miller R, Cosman D. ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity with enhancement by IL-15. *Blood*. 2006; 108(4):1313-9.

Suzuki H, Duncan GS, Takimoto H, Mak TW. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor β chain. *J Exp Med*. 1997; 185:499-505.

Szczepanski MJ, Szajnik M, Welsh A, Foon KA, Whiteside TL, Boyiadzis M. Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors. *Cancer Immunol Immunother*. 2010; 59(1):73-9.

T. Taniguchi, H. Matsui, and T. Fujita, "Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2," *Nature*, vol. 302, no. 5906, pp. 305–310, 1983.

Tagaya Y, Kurys G, Thies TA, Losi JM, Azimi N, Hanover JA, Bamford RN, Waldmann TA. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(26):14444-9.

Takahashi E, Kuranaga N, Satoh K, Habu Y, Shinomiya N, Asano T, Seki S, Hayakawa M. Induction of CD16⁺ CD56^{bright} NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16⁻ CD56^{bright} NK Cells but also from CD16⁻ CD56^{dim} NK cells. *Scand J Immunol*. 2007; 65(2):126-38.

Takayama T, Tahara H, Thomson AW. Differential effects of myeloid dendritic cells retrovirally transduced to express mammalian or viral interleukin-10 on cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell functions and resistance to tumor growth. *Transplantation*. 2001; 71(9):1334-40.

Talmadge JE. Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: mechanisms and clinical impact. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21(2):131-8.

Tarek N, Le Luque JB, Gallagher MM, Zheng J, Venstrom JM, Chamberlain E, Modak S, Heller G, Dupont B, Cheung NK, Hsu KC. Unlicensed NK cells target

neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest.* 2012; 122(9):3260-70.

Thielens A, Vivier E, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol.* 2012; 24(2):239-45.

Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, Cerundolo V, Borysiewicz LK, McMichael AJ, Wilkinson GW. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science.* 2000; 287(5455):1031.

Trapani JA, Sutton VR. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15(5):533-43.

Trinchieri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Seehra J, London L, Perussia B. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med.* 1984; 160(4):1147-69.

Tsuda M, Goldman CK, Bongiovanni KF, Chan WC, Winton EF, Yagita M, Grimm EA, Waldmann TA. The p75 peptide is the receptor for interleukin 2 expressed on large granular lymphocytes and is responsible for the interleukin 2 activation of these cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(15):5394-8.

Uellner R, Zvelebil MJ, Hopkins J, Jones J, MacDougall LK, Morgan BP, Podack E, Waterfield MD, Griffiths GM. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J.* 1997; 16(24):7287-96

Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity.* 1997;7(6):753-63.

Umansky V, Sevko A. Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Semin Cancer Biol.* 2012; 22(4):319-26.

Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD, Leibson PJ. NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and

phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol.* 2006; 7(5):524-32.

Vahlne G, Lindholm K, Meier A, Wickström S, Lakshmikanth T, Brennan F, Wilken M, Nielsen R, Romagné F, Wagtmann NR, Kärre K, Johansson MH. In vivo tumor cell rejection induced by NK cell inhibitory receptor blockade: maintained tolerance to normal cells even in the presence of IL-2. *Eur J Immunol.* 2010; 40(3):813-23.

Valiante NM, Lienert K, Shilling HG, Smits BJ, Parham P. Killer cell receptors: keeping pace with MHC class I evolution. *Immunol Rev.* 1997;155:155-64.

Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity.* 1997;7(6):739-51

Verhoeven DH, de Hooge AS, Mooiman EC, Santos SJ, ten Dam MM, Gelderblom H, Melief CJ, Hogendoorn PC, Egeler RM, van Tol MJ, Schilham MW, Lankester AC. NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. *Mol Immunol.* 2008; 45(15):3917-25.

Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A. 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.* 1998; 187(12):2065-72.

Vitale M, Falco M, Castriconi R, Parolini S, Zambello R, Semenzato G, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur J Immunol.* 2001; 31(1):233-42.

Vivier E, Morin P, O'Brien C, Druker B, Schlossman SF, Anderson P. Tyrosine phosphorylation of the Fc gamma RIII(CD16): zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J Immunol.* 1991;146(1):206-10.

- Vivier E, Ugolini S. Regulatory natural killer cells: new players in the IL-10 anti-inflammatory response. *Cell Host Microbe*. 2009; 6(6):493-5.
- Vogelzang NJ, Lestingi TM, Sudakoff G, Kradjian SA. Phase I study of immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma by direct gene transfer into metastatic lesions. *Hum Gene Ther*. 1994; 5(11):1357-70.
- Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ, Trapani JA. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem*. 2005; 280(9):8426-34.
- Vukicevic M, Chalandon Y, Helg C, Matthes T, Dantin C, Huard B, Chizzolini C, Passweg J, Roosnek E. CD56bright NK cells after hematopoietic stem cell transplantation are activated mature NK cells that expand in patients with low numbers of T cells. *Eur J Immunol*. 2010; 40(11):3246-54.
- Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(8):595-601.
- Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*. 2005; 106(7):2252-8.
- Walzer T, Vivier E. G-protein-coupled receptors in control of natural killer cell migration. *Trends Immunol*. 2011; 32(10):486-92.
- Welte SA, Sinzger C, Lutz SZ, Singh-Jasuja H, Sampaio KL, Eknigk U, Rammensee HG, Steinle A. Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol*. 2003; 33:194-203.
- Wu J, Chalupny NJ, Manley TJ, Riddell SR, Cosman D, Spies T. Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *J Immunol*. 2003; 170(8):4196-200.
- Wu S, Fischer L, Gökbuget N, Schwartz S, Burmeister T, Notter M, Hoelzer D, Fuchs H, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. Expression of interleukin 15 in primary adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2010; 116(2):387-92.

Wuest SC, Edwan JH, Martin JF, Han S, Perry JS, Cartagena CM, Matsuura E, Maric D, Waldmann TA, Bielekova B. A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nat Med.* 2011; 17(5):604-9.

Yokoyama WM, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev.* 2006; 214:143-54.

Yokoyama WM. Natural killer cell receptors specific for major histocompatibility complex class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(8):3081-5.

Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park IK, Liu S, McClory S, Marcucci G, Trotta R, Caligiuri MA. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood.* 2010; 115(2):274-81.

Yu MC, Su LL, Zou L, Liu Y, Wu N, Kong L, Zhuang ZH, Sun L, Liu HP, Hu JH, Li D, Strominger JL, Zang JW, Pei G, Ge BX. An essential function for beta-arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008;9(8):898-907.

Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, Burg G. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer.* 1997; 71(4):630-7.

Zafirova B, Wensveen FM, Gulin M, Polić B. Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(21):3519-29.

Zamai L, Del Zotto G, Buccella F, Galeotti L, Canonico B, Luchetti F, Papa S. Cytotoxic functions and susceptibility to apoptosis of human CD56(bright) NK cells differentiated in vitro from CD34⁺ hematopoietic progenitors. *Cytometry A.* 2012; 81(4):294-302.

Zambello R, Facco M, Trentin L, Sancetta R, Tassinari C, Perin A, Milani A, Pizzolo G, Rodeghiero F, Agostini C, Meazza R, Ferrini S, Semenzato G. Interleukin-15 triggers the proliferation and cytotoxicity of granular lymphocytes in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood.* 1997;89(1):201-11.

Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhang J, Tian Z. Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine*. 2008; 42(1):128-36.

Zhang J, Scordi I, Smyth MJ, Lichtenheld MG. Interleukin 2 receptor signaling regulates the perforin gene through signal transducer and activator of transcription (Stat)5 activation of two enhancers. *J Exp Med*. 1999; 190(9):1297-308.

Zhang J, Sun R, Wei H, Zhang J, Tian Z. Characterization of interleukin-15 gene-modified human natural killer cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. *Haematologica*. 2004; 89(3):338-47.

Zhou J, Zhang J, Lichtenheld MG, Meadows GG. A role for NF-kappa B activation in perforin expression of NK cells upon IL-2 receptor signaling. *J Immunol*. 2002; 169(3):1319-25.

Zhu X, Marcus WD, Xu W, Lee HI, Han K, Egan JO, Yovandich JL, Rhode PR, Wong HC. Novel human interleukin-15 agonists. *J Immunol* 2009; 183:3598–607.

Zimmer J, Donato L, Hanau D, Cazenave JP, Tongio MM, Moretta A, de la Salle H. Activity and phenotype of natural killer cells in peptide transporter (TAP)-deficient patients (type I bare lymphocyte syndrome). *J Exp Med*. 1998;187(1):117-22.

Biografija

Ana M Vuletić je rođena 10.12.1973 u Beogradu. Osnovne studije završila je 1999. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa molekularna biologija i fiziologija. Magistarsku tezu pod nazivom „Uticaj 13 *cis* retinoične kiseline na proliferaciju i diferencijaciju HL-60 ćelija promijelocitne leukemije“ odbranila je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2007. godine.

Od novembra 1999. godine zaposlena je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije kao istraživač pripravnik. Od 2002. do danas učestvovala je u radu 3 projekta koje je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Stručno se usavršavala na Evropskoj školi onkologije 2001. godine u Beogradu i Evropskoj letnjoj školi onkologije 2002. godine u Bordou, Francuska.

Ana Vuletić je član Srpskog društva istraživača raka (SDIR), Evropskog društva za istraživanje raka (European Association for Cancer Research, EACR) i Društva imunologa Srbije. Autor je 3 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 5 radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), 2 rada u međunarodnim časopisima (M23) i 13 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M24).

.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана

Ана Вулетић

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Функционалне и имунофенотипске карактеристике NK ћелија регионалних

лимфних чворова оболелих од меланома и њихова *in vitro* активација IL -2 и IL-15

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 21.10.2013



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Вулетић

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада Функционалне и имунофенотипске карактеристике NK ћелија регионалних лимфних чворова оболелих од меланома и њихова *in vitro* активација IL -2 и IL-15

Ментор Проф др Гордана Матић

Потписана Ана Вулетић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 21.10.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Функционалне и имунофенотипске карактеристике NK ћелија регионалних лимфних чворова оболелих од меланома и њихова *in vitro* активација IL -2 и IL-15
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 21.10.2013.

Потпис докторанда

