

Naturlige drepeceller og deres rolle i forsvaret mot tumorutvikling

Massoud Mousavi



Prosjektoppgave ved Det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mars 2014

Forord

Denne oppgaven handler om naturlige drepeceller. Jeg hadde nesten ingen bakgrunnskunnskap om disse cellene da jeg begynte med denne oppgaven men arbeidet med denne oppgaven gav meg mye faglig. Jeg håper også at oppgaven kan gi oppdatert kunnskap om naturlige drepeceller for de som velger å lese om disse cellene på norsk. Jeg vil takke mine veiledere doktorstipendiat Johannes Rolin og professor Azzam Maghazachi, ved Universitetet i Oslo, Institutt for medisinsk basalfag, avdeling for fysiologi, for god veiledning og oppfølging under skriveprosessen. Jeg vil også takke professor Azzam Maghazachi for å ha gitt meg muligheten til å ta denne oppgaven ved Institutt for medisinsk basalfag, avdeling for fysiologi.

Innhold

Innledning.....	4
Metode.....	4
1- Kreft, en kort oversikt.....	5
1.1- Generelle kjennetegn for kreftceller.....	5
1.2- Molekylære årsaker til kreft.....	6
1.3- Immunsystemets rolle i bekjempelse av kreft.....	7
1.4- Bevis for tumorovervåking tumorimmuneditering hos menneske.....	8
2- Naturlige drepeceller, en kort oversikt.....	9
2.1- Egenskaper til hvilende NK celler.....	10
2.2- Aktivering av NK- celler.....	11
2.3- Kjemokiner/kjemoattraktanter og deres rolle i NK- cellebiologi.....	14
2.4- Samspill mellom NK celler og andre immunceller i forsvaret mot kreftceller.....	16
3- Terapeutiske perspektiver.....	18
Oppsummering.....	19
Litteratur.....	20

Forkortelser benyttet i oppgaven: ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity, DNAM-1, DNAX accessory molecule-1; IFN- γ , interferon- γ ; IL-2, interleukin 2; MHC, major histocompatibility complex, KIR, killer cell-Ig-like reseptor; NK celler, natural killer cells, NKG2D, natural killer group 2D; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand.

Innledning

Naturlige drepeceller (natural killer cells, NK-cells, heretter kalt NK celler) er en del av det medfødte immunsystemet og er vist å spille en viktig rolle i tumorovervåking. Ved hjelp av inhibitoriske og aktiverende reseptorer som uttrykkes på dets overflate kan de diskriminere mellom kroppens normale celler og kreftceller. Gjenkjenning av kreftceller av NK celler medfører til at NK cellene aktiveres og dette fører til drap av kreftceller. I tillegg til deres rolle i tumorovervåking har NK celler andre viktige funksjoner inkludert eliminering av virusinfiserte celler og regulering av adaptive immunresponser.

Målsettingen med denne oppgaven er å se hvilke mekanismer NK celler tar i bruk for å bekjempe kreftceller. Oppgaven ble mer oppfattende enn først antatt, slik at det ble nødvendig å dele den opp i to deler. Den første delen av oppgaven er ment som bakgrunnsstoff som setter hovedtemaet for oppgaven i et større perspektiv. Her vil først gis en kortfattet oversikt over hva kreft er, hvilke faktorer påvirker kreftutvikling, generelle kjennetegn for kreft, samt molekylære årsaker til kreft. Deretter vil gis en kort oversikt over immunsystemets rolle i bekjempelse av kreft og gjøre rede for immunovervåkingshypotesen og immunredigeringshypotesen. I andre del av oppgaven vil det først gis en beskrivelse av funksjoner av NK celler innen immunsystemet, gjøre rede for overflateproteiner som uttrykkes av hvilende NK celler og er av betydning for funksjonen av NK celler i bekjempelse av kreftceller, samt drøfte kort hypotesene som er satt frem for å forklare hvordan hvilende NK celler kan skille mellom kroppens normale celler og transformerte celler. Deretter sees det nærmere på hvordan aktivering av NK celler skjer og beskrive ulike mekanismer som er involvert i kreftcelledrap utført av NK celler. Her inngår det også en diskusjon av kjemokiner og kjemoattraktanter og deres rolle i NK- cellebiologi samt samarbeid mellom NK celler og andre immunceller. Siste delen av oppgaven tar for seg hvordan kunnskap om NK cellebiologi og kjemokiner kan brukes i målrett immunterapi.

Metode

Oppgaven er basert på oversiktsartikler som ble funnet ved søk i databasen PubMed med kombinert bruk av ulike søkeord. Søk på oversiktsartikler var ikke systematisk, men basert på relevans i forhold til oppgavens problemstilling og bakgrunnsstoff.

1- Kreft, en kort oversikt

Kreft er hovedsakelig en genetisk sykdom og utvikles fra en enkelt celle som ved ukontrollert replikasjon kan etablere en klon. En slik klon har akkumulert tilstrekkelige genetiske endringer (mutasjoner og/eller epigenetiske silencing) som er nødvendig for malign transformasjon. Om lag 90 % av krefttyper hos mennesket er forårsaket av mutasjoner som oppstår i somatiske celler etter fødselen eller under fosterutviklingen og om lag 10 % av tilfellene skyldes nedarvede mutasjoner (Grivennikov og medarbeidere 2010, Watson og medarbeidere 2013). Det er viktig å merke seg at en mutasjon er definert som enhver endring i sekvensen av genomet og omfatter både punktmutasjoner (endring i et enkelt basepar), små delesjoner og insersjoner, amplifikasjoner og fusjonsproteiner som genereres ved kromosom translokasjoner (Vogelstein og Kinzler 2004). Mutasjoner i somatiske celler kan oppstå tilfeldig (spontane mutasjoner) under DNA replikasjon eller fordi cellene har vært eksponert for eksogene faktorer som forårsaker DNA skade/mutasjoner slik som ultrafiolett stråling fra solen eller faktorer som øker intracellulær oksidativt stress. Tobakksbruk, høy alkoholforbruk, overvekt/fedme og arvelige faktorer er også vist til å øke risikoen eller predisponere for utvikling av kreft. Videre er det kjent at kronisk infeksjon med en rekke virus inkludert hepatitt B- og C-virus, humant papillomvirus, humant herpesvirus, og Epstein-Barr virus er assosiert med økt risiko for kreftutvikling. En assosiasjon mellom kronisk inflammasjon og utvikling av mange typer kreft er også etablert hos mennesker og mange av såkalte risikofaktorer for kreft synes også å være assosiert med en eller annen form for kronisk inflammasjon (Grivennikov og medarbeidere 2010).

1.1- Generelle kjennetegn for kreftceller

Utviklingen av kreft hos menneske involverer en kompleks prosess som omfatter en rekke forskjellige trinn som vanligvis skjer over mange år/tiår. Hvert av disse trinnene forutsetter erverving av spesielle egenskaper hos først normale og deretter hos transformerte celler. Til tross for at mer enn 100 distinkte krefttyper er karakterisert hos mennesker, synes kreftceller av nesten alle typer å ha 6 generelle kjennetegn eller "hallmarks": 1) autonom vekst, 2) ubegrenset celledeling, 3) resistens mot eksogene inhibitoriske vekstsignaler, 4) resistens mot programmert celledød (apoptose), 5) nydanning av blodkar (angiogenese), og 6) i mer avanserte kreft, invasjon av omliggende vev og spredning til andre organer/vev (metastasing) (Hahn og Weinberg 2002, Hanahan og Weinberg 2011). Evne til å unnsnippe immunovervåking (immunevasjon) er nylig forslått som den syvende kjennetegn for kreft (Hanahan og Weinberg 2011).

1.2- Molekylære årsaker til kreft

Kreft som ikke er forårsaket av virale infeksjoner oppstår hovedsakelig som følge av dysregulering av protoonkogener og tumorsuppressorgener. Protoonkogener er normale versjoner av virale gener som fremkaller kreft, kalt onkogener, hos mennesker og andre dyr. Overuttrykk av onkoproteiner som skyldes amplifikasjon av det normale genet eller mutasjoner som medfører konstant aktivering av det muterte proteinet gjør at celleproliferasjonen skjer uavhengig av vekstfaktorstimulering (Hahn og Weinberger 2002, Vogelstein og Kinzler 2004).

Protoonkogener som ofte er funnet mutert i kreftceller inkluderer gener som koder for vekstfaktorreseptorer slik som epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR), Her-2, et annet medlem av EGFR- familien, og c-Kit som er reseptor for stammecellefaktor eller gener som koder for komponenter som fungerer nedstrøms for vekstfaktorreseptorer, dvs. intracellulære signalproteiner som viderefører vekstsignaler til cellekjernen, blant annet små GTPaser slik som H- og K-Ras og ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Harris og McComick 2010). Under de fleste omstendigheter er inaktiverende mutasjoner i tumorsuppressorgener, eller tap av ett eller begge alleler av genet, er nødvendig for at onkoproteiner skal kunne indusere malign transformasjon. For eksempel er inaktiverende mutasjoner i tumorsuppressorgenet p53 funnet hos omtrent halvparten av kreftpasienter. p53 er en viktig transkripsjonsfaktor som blir oppregulert ved DNA-skade forårsaket av onkogenaktivering eller ved hypoksi. Økte nivåer av p53-proteinet fører til induksjon av en rekke gener som initierer cellesyklusarrest som dermed hindrer ukontrollert celledeling hos celler med DNA-skade eller induserer apoptose dersom DNA- skaden ikke kan repareres. Derimot vil bortfall av p53-funksjon føre til at hastigheten på ukontrollert celleproliferasjon øker ytterligere slik som er tilfelle hos kreftceller (Brady og Attardi 2010).

Som en oppsummering kan vi si at genetiske endringer i både protoonkogener og suppressorgener er nødvendig for malign transformasjon. Genetiske endringer i disse genene kan skje via endring i funksjon (aktivitet) eller ekspresjonsnivå (mengde).

1.3- Immunsystemets rolle i bekjempelse av kreft

Immunsystemet er vist å være veldig effektivt i å beskytte verten mot inntrengende patogene mikroorganismer og kreft som er forårsaket av virale infeksjoner. Når det gjelder kreft som oppstår som følge av spontane genetiske endringer i somatiske celler synes immunsystemet imidlertid å ha to motsatte funksjoner. På den ene side er det holdepunkter som tyder på at immunsystemet kan beskytte mot kreftutvikling og på den annen side ser det ut til at det kan være med på å fremme utvikling av kreft (Zitvogel og medarbeidere 2006, Reiman og medarbeidere 2007, Ostrand-Rosenberg 2008). En ny hypotese, kalt “cancerimmunediting” (cancer immunoediting), ser imidlertid ut til å kunne forklare dette paradokset på en tilfredsstillende måte.

Immunvåkingshypotesen som ble satt fram av Sir Macfarlane Burnet og Lewis Thomas på 1950-tallet (se Dunn og medarbeidere 2002 for referanser) hevder at immunsystemet må, fra et evolusjonært synspunkt, være i stand til å hindre tumorvekst ved å eliminere premaligne/maligne celler i de tidlige stadiene av kreft uten å etterlate seg klinisk tegn. En prediksjon av denne hypotesen er at immundefekte individer/dyr vil ha høyere forekomst av spontan eller kjemisk induserte tumorer enn immunkompetente individer/dyr. En rekke dyrestudier ble gjennomført i 1970- og delvis i 1980-årene for å teste denne hypotesen men resultatene viste at det var liten eller ingen signifikant forskjell mellom immundefekte og immunkompetente mus med tanke på tumorutvikling. Denne hypotesen var derfor lenge kontroversiell. Mus som mangler av genekspresjon av recombination-activating gene 2, dvs. Rag2 knockout mus, danner ikke funksjonelle T- og B-celler. Senere forskning som brukte denne musemodellen eller mus som manglet funksjonell reseptor for interferon- γ (IFN- γ -R), og/eller dens ligand (IFN- γ) hadde atskillig høyere forekomst av tumorutvikling enn villtype mus (Dunn og medarbeidere 2002, Swann og Smyth 2007, Chow og medarbeidere 2012). Disse resultatene tydet på at T- og B-cellerreseptorer og IFN- γ -medierte immunresponser spiller viktige roller i forsvaret mot kreftutvikling. Men kreft oppstår på tross av intakt og funksjonelt immunforsvar. I følge cancerimmuneditingshypotesen, skjer immunovervåking under en initial fase som kalles “eliminerasjonsfasen”. Det kan imidlertid hende at tumorovervåkingen feiler å eliminere alle kreftcellene og enkelte kreftcellevarianter overlever tumorovervåkingen. Disse kreftcellene vil deretter gå inn i et dynamisk samspill med immunsystemet i en prosess som kalles “likevektfasen”. Under likevektprosessen utsettes overlevende kreftceller for intens seleksjonspress fra immunsystemet og mens mange av de

opprinnelige varianter destrueres oppstår nye muterte varianter som har nedregulert ekspresjonen av visse overflateproteiner og/eller uttrykker tumorspesifikke antigener som har lav immunogenisitet. Kreftcellen som er blitt selektert (immunredigerte krefcellene) kan ikke lenger oppfattes som fremmede av T-lymfocytene og kan dermed uhindret vokse og utvikle seg til tumor. Det må understrekes at her er det snakk om solide tumorer og ikke blodkreft. Denne prosessen hvor selekterte krefceller unnslipper antitumorimmunresponser kalles "escape fasen" (Dunn og medarbeidere 2002, Swann og Smyth 2007). Det viktigste med denne hypotesen er at ikke bare immunsystemet kan bekjempe krefceller i de tidlige stadiene av tumorutvikling, men at også det kan bidra til tumorutvikling ved å selektere (velge ut) krefceller varianter som er mindre immunogene, noe som fører til at krefcellene kan unnslipe antitumorimmunitet.

1.4- Bevis for tumorovervåking og tumorimmuneditering hos menneske

Immunsuppresjon forårsaket av medfødt eller ervervet immundefekt eller som følge av behandling med immunsuppressive legemidler, som brukes for å forhindre avstøting det transplanterte organet, er ofte assosiert med økt risiko (3-til-100-folds økning) for utvikling av visse typer av kreft som ikke er assosiert med spesifikke virustyper (Swann og Smyth 2007). For eksempel har AIDS pasienter betydelig økt risiko for Kaposi sarkom, som er en sjelden form for hudkreft. Disse observasjonene kan tyde på at immunsuppresjon fører til redusert tumorimmunovervåking som dermed fører til redusert kontroll og eliminasjon av krefceller i tidlige stadier av spontan kreftutvikling. Det er imidlertid andre alternative forklaringer. For eksempel kunne immunsupprimerte pasienter ha pre- eksisterende hvilende (dormant) tumorer og tumorvekst kunne derfor være som følge av redusert tumorimmunovervåking på grunn av immunsuppresjon (Swann og Smyth 2007). Fraværende ekspresjon av MHC klasse I molekyler er observert i mange krefttyper og er hittil det mest overbevisende bevis på at immuneditering av krefceller hos mennesker skjer (Reiman og medarbeidere 2007).

2- Naturlige drepeceller, en kort oversikt

Naturlige drepeceller er en type hvite blodceller som tilhører en gruppe medfødte lymfocytter som kalles “innate lymphoid cells” (ILCs) (Walker og medarbeidere 2013). De ble først beskrevet i cellekultur i 1975 for deres evne til å indusere spontan “naturlig” drap (dvs. uten noen tidligere sensibilisering/stimulering eller MHC klass I restriksjon) av tumorceller (Sabry og Lowdell 2013, Walker og medarbeidere 2013). Senere forskning viste at NK celler spiller viktige roller i eliminering av virusinfiserte celler, hemming av tumordanning i en tidlig fase, dvs. tumorimmunvåking. De kan også regulere adaptiv antitumorimmunitet og dermed sammenkoble det medfødte og ervervede immunforsvaret (Gerwenka og Lanier 2001, Smyth og medarbeidere 2002).

Det er en rekke holdepunkter for at NK celler deltar i tumorimmunovervåking. Mangel på NK celler forekommer sjelden, men individer som selektivt mangler NK celler har mye høyere forekomst av kreft sammenlignet med friske individer (Orange 2006). Andre bevis for tumorimmunovervåking utført av NK celler hos mennesker er en prospektiv studie av pasienter med levercirrhose som viste at lav NK celleaktivitet var assosiert med økt risiko av hepatocellulær cancer (se Prestwich og medarbeidere 2008 for referanse). I en 11-års oppfølging studie av 3625 friske individer i Japan var det store variasjoner i cytotoksisk aktivitet av lymfocytter i perifert blod. Lav cytotoksisk aktivitet var assosiert med økt hyppighet av kreft. Disse resultatene tyder på at redusert NK cellemediert tumorovervåking fører til redusert kontroll og eliminering av kreftceller i tidlige faser av kreftutvikling (Prestwich og medarbeidere 2008, Sabry og Lowdell 2013).

2.1- Egenskapene til hvilende NK celler

Ved diskusjon av NK celler er det viktig å skille mellom “hvilende” og “aktiverende” NK celler. Hos menneske utgjør hvilende NK celler om lag 10-15% av det totale antall lymfocytter men bare en liten andel (1 %) av leukocytter i perifert blod (Maghazachi 2005, Maghazachi 2010). Hvilende NK celler uttrykker mange forskjellige reseptorer på celleoverflaten. Den relative ekspresjonen av CD56, en adhesjonsreseptor, og Fc γ RIIIA (også kalt CD16), en aktiverende Fc- γ reseptor, brukes vanligvis til å skille mellom to undergrupper av NK celler i perifert blod: Den største undergruppen (80-90 %) av NK celler har høy ekspresjon av CD16 men uttrykker lite CD56 og er kjent som CD56^{dim} CD16^{bright}, og de som har høy ekspresjon av CD56 men uttrykker lite eller ingen CD16 utgjør omtrent 10-20 % av NK celler og er kjent som CD56^{bright} CD16^{dim}. Disse to undergruppene har hver sin distinkte funksjoner. CD56^{dim} CD16^{bright} har høy cytotoksisk aktivitet og medierer en tidlig respons mot kreftceller og virusinfiserte celler via en rekke mekanismer (forklart i mer detalj nedenfor), mens CD56^{bright} CD16^{dim} undergruppen viser lavere cytotoksisk aktivitet og medierer en sen men persisterende respons via frigjøring av en rekke cytokiner og kjemokiner (Maghazachi 2010, Seidel og medarbeidere 2013).

Hvilende NK celler uttrykker også et mangfold av inhibitoriske og aktiverende reseptorer. Flere inhibitoriske reseptorer inkludert natural killer group 2A (NKG2A, et medlem av C-type lektin familien) som uttrykkes som en heterodimerisk reseptor kalt CD94/NKG2A og en rekke reseptorer som tilhører drepecelle- immunglobulinliknende reseptoren (killer cell-Ig-like reseptor, KIR) familien blir uttrykt av hvilende NK celler. Blant de aktiverende reseptorer som uttrykkes av hvilende NK celler er NKG2D som uttrykkes som en homodimerisk reseptor, DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1), og en rekke reseptorer som kollektivt kalles natural cytotoxicity receptor (NCRs) inkludert NKp30 og NKp46 (Becknell og Caligiuri 2008, Rault og Guerra 2009). Det er viktig å merke seg at ingen av disse overflateproteinene er selektivt uttrykt på NK celler. Unntaket er NKp46 som betraktes som en spesifikk markør for hvilende NK celler (Seidel og medarbeidere 2013).

Oppdagelsen av NK celler reiste et viktig spørsmål: Hvordan kan NK celler skille egne normale celler fra egne unormale celler? Med andre ord, hva er det som gjør NK cellene tolerante overfor egne normale celler. Basert på observasjonen at NK celler kan drepe måleceller som ikke uttrykker eller har nedregulert ekspresjonen av MHC klasse I molekyler

på celleoverflaten (en strategi som brukes av kreftceller og virusinfiserte celler for å unngå møte med CD8⁺ T celler, se nedenfor), foreslo Kärre og medarbeidere "Missing self" hypotesen som hevder at fraværet av MHC klasse I molekyler på tumorceller (missing self) utløser cytotoxisk aktivitet hos NK celler og dette fører til eliminering av kreftceller. I følge denne hypotesen utgjør NK celler en ekstra overvåkingssystem som spesifikt kan gjenkjenne og eliminere slike måleceller (Kärre 2008). Senere studier viste imidlertid at NK celler som er aktivert av interleukin 2 (IL-2) er i stand til å drepe tumorceller som uttrykker MHC klasse I molekyler. På den andre side ble det vist at NK celler ikke alltid dreper tumorceller som mangler ekspresjon av MHC klasse I molekyler, noe som tyder på at under visse omstendigheter er tilstedeværelse av disse molekylerne verken nødvendig eller tilstrekkelig for beskyttelse mot NK celledmediert celledrap (Becknell og Caligiuri 2008, Sabry og Lowdell 2013). Det er nå blitt helt klart at aktivering av NK cellen, og dermed utløsning av en cytotoxisk respons, bestemmes av det relative bidraget av negative og positive signaler som NK cellene mottar når inhibitoriske og aktiverende reseptorer binder til deres respektive ligander på målecellen (Sabry og Lowdell 2013).

2.2- Aktivering av NK- celler

Aktiverende NK cellerreseptorer mangler selv signaloverføringsevne men assosieres med adaptermolekyler som kan koble ligandbinding av aktiverende reseptorer til intracellulære signalveier som fører til aktivering av NK celler. For eksempel kan FcγRIIIA danne kompleks med flere adaptermolekyler inkludert FcεRI-γ og CD3ζ, mens NKG2D danner kompleks med adaptermolekylet DAP10. På cytoplasmatiske domener av disse adaptermolekylene er det aminosyresekvenser eller motiver som kalles ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif). Ligandbinding fører til at en eller flere tyrosinresiduer i ITAM fosforyleres av Src-kinaser og dette fører til rekruttering og aktivering av signalmolekyler som deltar i signalformidling nedstrøms for den aktiverende reseptoren (Lanier 2008, Chan og medarbeidere 2014). Killer inhibitoriske reseptorer (KIRs) gjenkjenner spesifikke strukturer på klassiske MHC klasse I molekyler (HLA-A, HLA-B, og HLA-C), mens CD94/NKG2A reseptorkomplekset gjenkjenner den ikke-klassiske varianten HLA-E (Sabry og Lowdell 2013). På cytoplasmatiske domener av disse reseptorene er det aminosyresekvenser eller motiver som kalles ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Ligandbinding fører til at en tyrosinresidu i ITIM blir fosforylert av en Src-kinase og dette fører til rekruttering av SHIP-1, SHP-1 eller SHP-2. SHIP-1 er en lipidfosfatase som degraderer PIP3

(fosfoinositoltrifosfat) som er nødvendig for blant annet lokalisering av PI3 kinaser til plasmamembranen. SHP-1 og SHP-2 er tyrosinfosfataser som defosforylerer og dermed inaktiverer intracellulære proteintyrosinkinaser som viderefører signaler fra aktiverende reseptorer (Lanier 2008, Chan og medarbeidere 2014). Ved tilstrekkelig hemmende signaler, for eksempel når NK celler binder til celler som uttrykker normale nivåer av MHC klasse I molekyler og lave nivåer av ligander til aktiverende reseptorer, kan inhibitoriske reseptorer oppheve stimulatoriske signaler fra ITAM- bærende adaptermolekyler (Chan og medarbeidere 2014).

NK cellemediert cytotoxicitet kan deles inn i naturlig cytotoxicitet, som ikke trenger tidligere stimulering, og antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (se nedenfor). Man antar at aktivering av NK celler og induksjon av naturlig cytotoxicitet mot tumorceller er en prosess som skjer gjennom flere trinn som involverer adhesjon, dannelse av en immunologisk synapse, polarisering av lytiske granula, og eksocytose. Den best studerte adhesjonsmolekylet som uttrykkes av NK celler LFA-1 (leukocyte functional antigen 1). Dette er en heterodimer integrin bestående av α_L (CD11a) og en β_2 (CD18) kjeder som binder til ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1) som uttrykkes på kreftceller. Det dannes derved en tett kontakt mellom NK cellen og målcellen, altså en immunologisk synapse, hvor de ulike reseptorene på NK cellen interagerer med de korresponderende ligander på kreftcellen. Ved tilstrekkelig stimulering utløses et "drapsprogram" og dette fører til at lytiske granula polariseres mot synapsen hvor de smelter sammen med plasmamembranen og løselige substanser som finnes i dem, slik som perforin, granzym, og IFN- γ , frigjøres i spalten mellom NK cellen og målcellen (Orange 2008, Sabry og Lowdell 2013). Det er holdepunkter at NK celler som har utført drap av målceller dissosierer fra målcellene og blir i stand til å gjenoppta deres cytotoxicke evne ved blant annet oppregulering av aktiverende reseptorer og dannelse av nye lytiske granula. Det er vist at aktiveringsprosessen og dermed målcelledrap induisert av NK celler kan gjentas flere ganger (Orange 2008, Sabry og Lowdell 2013). For eksempel kan IL-2-aktiverte NK celler drepe opptil fire tumorceller (Sabry og Lowdell 2013). Det er også viktig å merke seg at aktiverte NK celler erverver en rekke nye egenskaper inkludert oppregulering av NKp44, en aktiverende reseptor (Seidel og medarbeidere 2013), økt ekspresjon av CD57 som er en markør av terminal differensiering hos NK celler og flere andre typer immunceller (Nielsen og medarbeidere 2013), og G2A (G2 accumulation) som tilhører G-proteinkoblede reseptorfamilien (Rolin og Maghazachi 2011, se nedenfor).

NKG2D og DNAM-1 spiller viktige roller i NK cellemediert naturlig cytotoxicitet. Flere ligander som binder til NKG2D tilhører MHC klasse Ib familien inkludert MIC-A (MHC class-I related sequence A) og MIC-B. I tillegg fungerer NKG2D som reseptor for flere UL16 bindende proteiner (ULBP-1 til ULBP-4) (Becknell og Caligiuri 2008). Ligander for DNAM1 inkluderer CD112 (også kjent som nectin2, PVRL2) og CD155 (også kjent som PVR, necl-5) (Rault og Guerra 2009, Chan og medarbeidere 2014). Disse ligandene er vanligvis ikke uttrykt i normale celler, men oppreguleres i forbindelse med cellulær stress inkludert malign transformasjon. Det er holdepunkter for at ligander til NKG2D og DNAM-1 oppreguleres i en rekke typer kreftceller i respons på DNA-skade. Dette skjer gjennom aktivering av en viktig kontrollmekanisme som kalles DNA-damage checkpoint pathway. Dette medfører til at NK celler får mulighet til å gjenkjenne og eliminere kreftceller som uttrykker disse ligandene (Chan og medarbeidere 2014, Zitvogel og medarbeidere 2006).

Fc γ RIIIA (CD16) gir NK celler evne til å drepe måleceller som er dekket (opsonisert) med antistoffer gjennom en prosess som kalles antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (antibody-dependent cellular cytotoxicity ADCC). Dette skjer ved at Fc γ RIIIA binder Fc delen av IgG antistoffer som er bundet til antigenproteiner på overflaten av måleceller (Seidel og medarbeidere 2013). Dette leder, som tidligere nevnt, til fosforylering av tyrosinresiduer i ITAM av adoptermolekylet som er assosiert med reseptoren, aktivering av NK celler, frigjøring av lytiske granula og til slutt drap av kreftceller.

I tillegg til de ulike aktiverende og hemmende reseptorene uttrykker NK celler (og mange andre typer immunceller) andre overflateproteiner som tilhører tumornekrosefaktor (tumor necrosis factor, TNF) familien inkludert Fas ligand (FasL, også kalt CD95), og TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Smyth og medarbeidere 2002). Det er vist at stressede celler som kreftceller oppregulerer uttrykket av dødsreseptorene Fas (også kalt CD95) og TRAIL reseptor 1 (TRAIL-R1) og TRAIL-R2. Fas ligand som uttrykkes på NK celler binder seg til sin reseptor Fas som uttrykkes på kreftceller. Dette induserer dannelsen av et kompleks bestående av tre Fas og det intracellulære adoptermolekylet FADD. Dette komplekset kalles DISC (death-inducing signalling kompleks) og aktiverer kaspaser gjennom en rekke enzymatiske kløvinger av det inaktive pro-kaspaser. Aktivering av kaspase-8 initierer en kaskade av kaspase aktiveringer som fører til aktivering av kaspase-3 og dette leder til induksjon av apoptose og celledød hos kreftcellene. Binding av TRAIL til TRAIL-R1 og TRAIL-R2 fører også til dannelse av DISC og aktivering av kaspase-8 som til slutt fører til til

induksjon av apoptose og celledød hos kreftcellene (Micheau og medarbeidere 2013). Det er vist at NK celler er i stand til å inducere visse tumorceller til å oppregulere ekspresjonen av Fas for deretter å drepe dem i en Fas- avhengig mekanisme (Smyth og medarbeidere 2002).

2.3- Kjemokiner/kjemoattraktanter og deres rolle i NK- cellebiologi

Kjemokiner, eller kjemotaksiske cytokiner, er en type signalmolekyler som er essensielle for rekruttering av immunceller til betennelsesområder. Om lag 50 humane gener koder for kjemokiner. Avhengig av posisjonen til en konservert cysteinresidu, inndeles kjemokinene i fire ulike grupper, CXC, CC, CX3C og C (Balkwill 2012). Kjemokiner virker gjennom spesifikke overflatereseptorer som tilhører G-proteinkoblete reseptorfamilien. Hvilede NK celler uttrykker en rekke kjemokinreseptorer blant annet CXCR2, CCR4, og CCR7. Når NK celler blir aktivert vil de uttrykke nye (eller oppregulerer) kjemokinreseptorer slik som CXCR1, CXCR3, CCR1, CCR2 og CCR3 (Maghazachi 2003).

Det er også viktig å merke seg at, i tillegg til i perifert blod, befinner NK celler seg i andre vev, som lymfeknuter, tonsiller, lever, hud, tarm, lunger, i uterint vev under svangerskap, men mest i milten og at kjemokiner er essensielle for rekruttering av NK celler til disse organene (Maghazachi 2010, Carregga og Ferlazzo 2012). IL-18-mediert aktivering av NK celler er for eksempel vist til å føre til oppregulering av CCR7 og dette induserer migrasjon til lymfeknuter (Maghazachi 2010). Infiltrering av NK celler er påvist i flere tumortyper og IFN- γ -induserte kjemokiner som CXCL9, CXCL10 og CXCL11 synes å spille en viktig rolle i rekruttering av NK celler og andre immunceller til områder med tumorvekst (Maghazachi 2010, Raman og medarbeidere 2011, Viola og medarbeidere 2012). Disse kjemokinene er også i stand til å hemme angiogenese ved å blokkere proliferasjon og migrasjon av endotelceller som uttrykker kjemokinreseptoren CXCR3 ((Viola og medarbeidere 2012). Det må også understrekes at kjemokiner ikke bare styrer rekruttering av NK celler til andre organer/vev, men de er også med på å aktivere disse cellene til å bli potente effektorceller mot kreftceller. Kjemokiner som er vist å være viktige i forhold til NK celleaktivering er CCL2, CCL3 og CCL5 (Maghazachi 2010).

Andre overflatereseptorer som ikke tilhører G-proteinkoblete reseptorfamilien kan også binde kjemokiner. Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) er en slik reseptor. DARC er hovedsakelig uttrykt på erytrocytter og vaskulære endotelceller og kan binde en rekke

inflammatorisk kjemokiner inkludert CXCL1, CXCL5, CXCL5, CXCL8, CCL5. Det er forslått at DARC kan fungere som en “decoy” eller scavenger reseptor for post-inflammatorisk fjerning av kjemokiner (Mantovani og medarbeidere 2010, Lazenec og Richmond 2010).

Senere års forskning har også vist at lysofosfolipider, slik som sphingosine 1-phosphate (S1P) og lysophosphatidic acid (LPA), kan fungere som kjemoattraktanter for leukocytter. Disse er bestanddeler av cellemembraner som utskilles under fysiologiske forhold av mange ulike celletyper, inkludert plater, endotelceller, og røde blod celler. Reseptorer som binder S1P (S1P₁ til S1P₅) tilhører G-proteinkoblede reseptorfamilien og blir uttrykt av nesten alle immunceller. Det er også vist at mange typer kreftceller kan frigjøre S1P/LPA som vil dirigere immunceller til tumorstedet. Både hvilende og IL-2 aktiverte NK celler uttrykker reseptorer for S1P. Aktiverte NK celler uttrykker også reseptorer for LPA og kan dermed ved hjelp av kjemotaksi bevege seg mot konsentrasjonsgradienten av S1P og LPA. Binding av S1P og/eller LPA hemmer cytotoxiske aktiviteten til NK celler og stimulerer dem til å frigjøre blant annet CCL3 og CCL4 som i sin tur fremmer tumorvekst (Rolin og Maghazachi 2011). Lysophosphatidylcholine (LPC) og en rekke oksiderte lipider kan i likhet med S1P og LPA indusere kjemotaksisk bevegelse av NK celler mot tumorceller i cellekulturer og det er holdepunkter at dette medieres av G2A. I motsetning til S1P og LPA, medfører dette ikke til redusert cytotoxiske aktivitet til NK celler mot tumorceller (Rolin og medarbeidere 2013).

2.4- Samspill mellom NK celler og andre immunceller i forsvaret mot kreftceller

Antitumor immunrespons begynner ved at medfødte immunceller slik som vevsmakrofager oppdager tilstedeværelsen av en utvikling tumor. Dette skjer som følge av lokal vevsskade som er forårsaket av remodelering av ekstracellulær matriks der fibroblaster spiller en viktig rolle. Medfødte immunceller utskiller signalstoffer som kjemokiner som tiltrekker andre immunceller til tumorstedet. I startfasen er det NK celler, NKT celler (natural killer T cells, NKT), og inflammatoriske immunceller som infiltrerer tumorstedet. Senere kommer CD8⁺ og CD4⁺, T-celler til tumorstedet (Sengupta og medarbeidere 2010). Vekselvirkningene mellom maligne celler og ikke-maligne celler skaper tumorens mikromiljø (Balkwill og medarbeidere 2012).

Profesjonelle antigenpresenterende celler slik som modne dendritiske celler og makrofager spiller en viktig rolle i aktivering av naive CD8⁺ og CD4⁺ T-celler ved å presentere peptider fra tumorassosierte proteiner til disse cellene. Naive CD8⁺ T-celler som gjenkjenner peptider presenter på MHC klasse I molekyler og i tillegg blir kostimulert via CD28 differensieres til cytotoksisk CD8⁺ T-celler. Naive CD4⁺ T-celler som gjenkjenner peptider presenter på MHC klasse II molekyler og i tillegg blir kostimulert kan, avhengig av type stimulering, differensiere seg til en rekke funksjonelle undergrupper som type 1 CD4⁺ T-hjelpeceller (Th1 celler) som utskiller IFN- γ , type 2 CD4⁺ T-hjelpeceller (Th2 celler) som utskiller IL-4 IL-5 og IL-15, CD4⁺ T-hjelpeceller 17 (Th17 celler) som utskiller blant annet IL-17A, eller CD4⁺ T-regulatoriske celler som utskiller TGF- β (transforming growth factor β) og IL-10 (Ostrand-Rosenberg 2008, Burkholder og medarbeidere 2014). Via sin utskilling av ulike cytokiner og celle-celle kontakt samarbeider de ulike immuncellene med hverandre. Utfallet av dette samarbeidet er avhengig av tumormikromiljøets komplekse nettverk av cytokiner og signalering via cytokinreseptorer som kan føre til enten eliminering av kreftceller eller kreftutvikling (Burkholder og medarbeidere 2014). Mens cytokiner produsert av Th1 celler vil føre til økt aktivitet av cytotoksisk CD8⁺ T-celler og dermed til økt beskyttelse mot kreftceller, fører cytokiner produsert av Th2 celler til aktivering av B-celler og dermed bidrar til å dreie immunresponsen fra gunstig cellemediert antitumorrespons til antistoffproduksjon. Årsaken til dette er at økt humoral immunitet fremmer et kronisk inflammatorisk mikromiljø som igjen fører til tumorutvikling (Ostrand-Rosenberg 2008).

Aktivering av NK celler må også forstås ut fra samspillet mellom disse cellene og andre immunceller. For eksempel fører celle-celle kontakt mellom NK celler og modne dendritiske celler i lymfeknuter nær tumorstedet til at dendritiske celler frisetter en rekke cytokiner som IL-12, IL-18, og IL-15, noe som fører til aktivering av NK celler og utskilling av IFN- γ . Derimot fører celle-celle kontakt mellom NK celler og umodne dendritiske celler som mangler kostimulatoriske molekyler for CD28 på T celler til induksjon av celledød i umodne dendritiske celler. På denne måten spiller NK celler og dendritiske celler på lag til å dreie immunresponsen i Th1-retning og dermed økt aktivitet av CD8⁺ T-celler (Chijioko og Munz 2013). Økt antall av T-regulatoriske celler i flere tumortyper er vist å være assosiert med redusert antall og nedsatt funksjon av NK celler, noe som indikerer på at T-regulatoriske celler virker undertrykkende på NK celler. Det er holdepunkter for at membranbundet TGF- β på T-regulatoriske celler er hovedmekanismen bak NK celleundertrykkelsen som skjer ved celle-celle kontakt mellom disse cellene (Pedroza-Pacheco og medarbeider 2013). Økt tilstedeværelse av NK celler i tumorer er korrelert med god prognose og økt overlevelse hos pasienter. Kjemokiner som virker på CXCR3 og CX3CR1 er antatt til å være viktig for tumorinfiltrasjon av NK celler (Mantovani og medarbeider 2010)

Til forskjell fra tidlige stadier av kreftutvikling der NK celler er antatt å spille en viktig rolle i eliminering av maligne celler, er det uenighet blant forskere om hvilke rolle de har i bekjempelse av kreft i etablerte tumorer. Noen forskere mener at NK celler kan bidra til kontroll av kreftceller i solide tumorer (Gajewski og medarbeider 2013, Baginska og medarbeidere 2013), mens andre forskere mener at TGF- β som utskilles av kreftceller holder infiltrerende NK celler i en anergisk tilstand og at NK cellenes beskyttende rolle mot kreftceller er begrenset til tidlige stadier av kreftutvikling (Fridman og medarbeidere 2012).

Kreftceller kan unngå møte med cytotoksiske CD8⁺ T celler ved hjelp av ulike mekanismer inkludert nedregulering av MHC klasse I molekyler (Sengupta og medarbeidere 2010, Campbell og Hasegawa 2013). Slike kreftceller er imidlertid utsatt for angrep fra NK celler som er klart til å tre i aksjon umiddelbar etter aktivering. Men kreftceller kan også unngå angrep fra NK celler via ulike mekanismer. Tumorer kan for eksempel beskytte seg mot NKG2D-mediert celledrap ved å klippe av ligander til NKG2D (MIC-A, MIC-B, og ULBP-1-4), ved å nedregulere MHC klasse I molekyler og dermed forhindre NK cellene til å gjenkjenne kreftcellene, eller ved å aktivere T-regulatoriske celler (Sabry og Lowdell 2013, Sengupta og medarbeidere 2010).

3- Terapeutiske perspektiver

NK celler ansees å ha et klart terapeutisk potensial ved kreft, og det er stor forskningsaktivitet på dette feltet. En hovedstrategi for NK cellebasert immunterapi består i å utvikle tumorspesifikke monoklonale antistoffer (mAb) rettet mot overflatereseptorer som er overuttrykt i tumorceller (Terme og medarbeider 2008). Behandling av kreftpasienter med slike antistoffer føre til at kreftcellene blir dekket med antistoffer og dette gjør det mulig for NK celler til å utføre Fc γ RIIIA-mediert antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC) (Seidel og medarbeidere 2013, Campbell og Hasegawa 2013). Flere terapeutiske antistoffer som er godkjent for behandling av kreft slik som cetuximab (et mAb mot EGFR), trastuzumab (et mAb mot Her-2), og mogamulizumab (et mAb mot kjemokinreseptoren CCR4), synes å virke gjennom NK cellemediert ADCC (Campbell og Hasegawa 2013). Når det gjelder tumorer som uttrykker MHC klasse I molekyler er det vist at ADCC kan forsterkes gjennom blokkering av inhibitoriske reseptorer (KIRs) for å redusere terskelen for NK celleaktivering. Det er for eksempel utviklet anti-KIR antistoffer som konkurrerer med ligandbinding. Inhibitoriske reseptorer på NK celler blir dermed forhindret fra å binde seg til MHC klasse I molekyler og inhibitoriske signaler reduseres (Cheng og medarbeider 2013, Campbell og Hasegawa 2013). En annen form for NK cellebasert immunterapi er å få tumorer som er resistent til p53-indusert apoptose til å gå i apoptose ved TRAIL- mediert celledød. Dette kan gjøres enten ved bruk av komponenter som oppregulerer TRAIL på NK celler, eller ved adoptiv overføring av spesifikke undergrupper av NK celler som har evne til å utøve TRAIL-avhengig apoptose. TRAIL- mediert apoptose i kombinasjon med kjemoterapi er vist å være mer effektiv enn TRAIL- mediert apoptose alene (Terme og medarbeider 2008).

I det følgende fokuseres det på noen eksempler på terapeutiske strategier som er basert på kjemokin-kjemokinreseptor systemer. Kjemokiner deltar i alle trinn av tumorutvikling inkludert tumorvekst, tumorangiogenese og metastasering ved å skape et gunstig tumormikromiljø. Disse kjemokinene utskilles av både kreftceller og normale celler som befinner seg i tumorens mikromiljø (Lazennec og Richmond 2010). Angiogenese er, som nevnt, en egenskap som kjennetegner tumorer og er avgjørende for invasjon og spredning av kreftcellene fordi nydanning av blodkar muliggjør tilførsel av oksygen og næring til kreftcellene. Intervensjoner som tar sikte på å hindre tumorangiogenese er rettet mot tumorassosierte endotelceller som danner blodkar. Det er vist at peptider fra kjemokiner kan virke hemmende på angiogenese og dermed tumorvekst gjennom å hemme migrasjon og

proliferasjon av endotelceller. For eksempel kan et peptid fra CXCL1, kalt chemokinostatin-1, hemme brysttumorevekst ved å binde seg til CXCR3 på endotelceller og hemme signalering via denne reseptoren. Dette medfører at endotelcellene blir forhindrede fra å danne blodkar (Rosca og medarbeidere 2011). CXCR4 (CD184, også kjent som stromal cell-derived factor-1, SDF-1) er reseptor for CXCL12 og er vist til å være overuttrykt i et stort antall krefttyper. Overuttrykk av CXCR4 er generelt assosiert med progresjon (progresjon) og metastasering av tumorer og dårlig prognose hos kreftpasienter (Ramsey og McAlpine 2013, Mantovani og medarbeidere 2010). Måltrettet immunterapi mot CXCL12/CXCR4 systemet tar sikte på å hemme spredning av kreftceller som uttrykker CXCR4. En rekke CXCR4 antagonister slik som AMD3100 har vist seg å kunne hemme tumormetastasering, hovedsakelig gjennom blokkering av signalering via CXCR4 (Ramsey og McAlpine 2013).

Oppsummering

NK celler er en type lymfocytter som tilhører det medfødte immunsystemet. I tillegg til perifert blod, befinner NK cellene seg i andre vev inkludert milt, lymfeknuter, og lever. NK celler spiller en viktig rolle i tumorovervåking, primært ved at de er i stand til å indusere celledød ved direkte cytolytisk aktivitet på tumorceller, både gjennom naturlig og antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet. NK celleaktivering og cytotoxicitet er underlagt komplekse kontrollmekanismer og til syvende og sist bestemmes av balansen mellom hemmende og aktiverende signaler som NK celler mottar via henholdsvis inhibitoriske og aktiverende reseptorer. Vår forståelse av disse kontrollmekanismene er fortsatt ufullstendig. Som for andre immunceller bestemmes vandringsveien av NK celler til andre vev og tumorsteder av kjemokiner og kjemoattraktanter som NK cellen har reseptor for. Mens det er sterke holdepunkter for at NK celler spiller en viktig rolle i tidlige stadier av kreftutvikling, er det fortsatt uklart hvilke roller de har i bekjempelsen av kreftceller i solide tumorer. Fremskrittene i vår forståelse av biologiske egenskaper ved NK celler har dannet grunnlag for utvikling av nye strategier for immunterapi ved kreft.

Litteratur

- Baginska J, Viry E, Paggetti J, Medves S, Berchem G, Moussay E, Janji. The Critical Role of the Tumor Microenvironment in Shaping Natural Killer Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity. *Front Immunol* 2013; 4; Article 490.
- Balkwill FR. The chemokine system and cancer. *J Pathol* 2012; 226: 148-157.
- Balkwill FR, Capasso M, Hagemann R. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 2012; 125: 5591-5596.
- Becknell B, Caligiuri MA. Natural killer cells in innate immunity and cancer. *J immunother* 2008; 31: 685-692.
- Brady CA, Attardi LD. p53 at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123: 2527-2532.
- Burkholder B, Huang RY, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, Lv ZQ, Gao CY, Wang BL, Zhang YM, Huang RP. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1854: 182-201.
- Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 536-544.
- Carrega P, Ferlazzo G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol* 2012; 3: 1-6.
- Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ* 2014; 21: 5-14.
- Cheng N, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* 2013; 10: 230-252.
- Chijioke O, Munz C. Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation. *Front Immunol* 2013; 4: Article 365.
- Chow MT, Moller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol* 2012; 22:23-32.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-998.
- Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C; Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 298-306.
- Gajewski TF, Schreiber H, Eu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:1014-1022.
- Gerwenka A, Lanier LL. Natural Killer Cells, Viruses and Cancers. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 41-49.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell* 2010; 140: 883-889.
- Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347: 1593-1603.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
- Harris TJ, McComick F. The molecular pathology of Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7: 251-265.
- Karre K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol* 2008, 9: 477-480.
- Lanier LL. Up on tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat immunol* 2008; 9: 495-502.
- Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* 2010; 16: 133-144.
- Maghazachi AA. G Protein-coupled receptors in natural killer cells. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 16-24.

Maghazachi AA. Compartmentalization of human natural killer cells. *MOL Immunol* 2005; 42: 523-529.

Maghazachi AA. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 341: 37-58.

Mantovani A, Savino B, Locati M, Zammataro L, Allavena P, Bonecchi R. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21: 27-39.

Micheau O, Shirley S, Dufour F. Death receptors as targets in Cancer. *Br J Pharmacol* 2013; 169: 1723-1744.

Nielsen CM, White MJ, Goodier MR, Riley EM. Functional Significance of CD57 Expression on Human NK cells and Relevance to Disease. *Front Immunol* 2013; 4: 1-8.

Orange JS. Human natural killer cell deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6: 399-409.

Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 713-725.

Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 11-18.

Pedroza-Pacheo I, Madrigal A, Saudemont A. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 2013; 10: 222-229.

Prestwich RJ, Errington F, Hatfield P, Merrick AE, Ilett EJ, Selby PJ, Melcher AA. The immune system--is it relevant to cancer development, progression and treatment? *Clin Oncol* 2008; 20: 101-112.

Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A; 2011. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res* 2011; 317: 575-589.

Ramsey DM, McAlpine SR. Halting metastasis through CXCR4 inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23: 20-25.

Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, Knutson KL. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. 2007; 17: 275-287.

Ralet DH, Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 568-580.

Rolin J, Maghazachi AA. Effects of lysophospholipids on tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 2011; 4: 393-403.

Rolin J, Al-Jaderi Z, Maghazachi AA. Oxidized lipids and lysophosphatidylcholine induce the chemotaxis and intracellular calcium influx in natural killer cells. *Immunobiology* 2013; 218: 393-403.

Rosca EV, Koskimaki JE, Rivera CG, Pandey NB, Tamiz AP, Popel AS. Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12: 101-116.

Sabry M, Lowdell MW. Tumor-primed NK Cells: Waiting for the Green Light. *Front Immunol* 2013; 4: 1-7.

Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol* 2013; 4: 1-8.

Sengupta N, MacFie TS, MacDonald TT, Pennington D, Silver AR. Cancer immunoediting and "spontaneous" tumor regression. *Pathol Res Pract*; 2010; 206: 1-8.

Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 850-861.

Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 2007; 117: 1137-1146.

Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, Chaput N, Zitvogel. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* 2008; 9: 486-494.

Viola A, Sarukhan A, Bronte V, Molon B. The pros and cons of chemokines in tumor immunology. *Trends Immunol* 2012; 33: 496-504.

Vogelstein B, and Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10: 789-799.

Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. Innate lymphoid cells- how did we miss them? *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 75-87.

Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging pattern of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 703- 718.

Zitvogel L, Tesniere A, Kromer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 715-27.