

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Pavla Boháčová

**Mechanismy imunoregulačního působení B lymfocytů
produkujících IL-10 v závislosti na cytokinovém prostředí**

**Mechanisms of immunoregulatory action of IL-10-producing
B lymphocytes in dependence on the cytokine environment**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Vladimír Holáň, DrSc.

Praha 2015

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne.....

.....
Pavla Boháčová

Děkuji svému školiči prof. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc. za věnovaný čas, odborné vedení a cenné rady při zpracování předložené diplomové práce. Rovněž bych ráda poděkovala Mgr. Elišce Javorkové, Ph.D. za ochotu a všestrannou pomoc a všem ostatním členům Oddělení transplantační imunologie. Velké díky patří také mojí rodině za podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Abstrakt

Regulační B lymfocyty (Bregs, *regulatory B lymphocytes*) představují malou heterogenní subpopulaci B buněk, která se podílí na regulaci imunitních odpovědí mechanismy nezávislými na produkci protilátek. Mezi mechanismy, kterými mohou Bregs působit, patří produkce protizánětlivých cytokinů nebo přímý buněčný kontakt prostřednictvím jejich povrchových molekul. Tato práce se zabývá indukcí supresivních Bregs ze slezinných B lymfocytů u myši *in vitro*. Cílem je popsat vliv vybraných cytokinů na indukci Bregs z B lymfocytů stimulovaných lipopolysacharidem (LPS, *lipopolysaccharide*) a stanovit, jakým mechanismem takto indukované Bregs působí. V této souvislosti byla analyzována jejich schopnost produkovat interleukin-10 (IL, *interleukin*) a exprimovat molekuly FasL (*Fas ligand*) a PD-L1 (*programmed death ligand*). Z testovaných cytokinů měl schopnost podporovat vývoj Bregs ze slezinných B lymfocytů stimulovaných LPS pouze IL-12 a interferon- γ (IFN- γ , *interferon- γ*). Exogenní IFN- γ vyvolával u B lymfocytů stimulovaných LPS zvýšenou produkci IL-10 i expresi genu pro FasL a PD-L1. Dále byl u indukovaných Bregs analyzován vliv na makrofágy a jejich následné působení na T lymfocyty. Za účelem stanovení mechanismů působení makrofágů na T lymfocyty byla měřena exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86, exprese genu pro IL-1 α a produkce IL-6 u makrofágů. Makrofágy ovlivněné Bregs měly sníženou schopnost stimulovat proliferaci aktivovaných CD8⁺ T lymfocytů. T lymfocyty kultivované s ovlivněnými makrofágy také vykazovaly sníženou produkci prozánětlivého cytokinu IL-17. Výsledky ukázaly, že IL-12 a IFN- γ podporují vývoj Bregs v populaci B buněk stimulovaných LPS a že tyto Bregs jsou schopné prokazatelně suprimovat imunitní odpovědi. Možnost indukovat Bregs *in vitro* by mohla mít zásadní význam pro jejich budoucí klinické využití.

Klíčová slova: regulační B lymfocyty, produkce IL-10, cytokiny, imunosuprese

Abstract

Regulatory B lymphocytes (Bregs) represent a small heterogeneous subpopulation of B cells which participate in a regulation of immune responses by the antibody-independent mechanisms. The main mechanisms of Breg action is a production of anti-inflammatory cytokines or a direct cell contact through their surface molecules. This study deals with an induction of suppressive Bregs from mouse spleen B cells *in vitro*. We were aiming for a description of an influence of the selected cytokines to the induction of Bregs from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated B cells and a determination of the mechanism of Breg action. We also analyzed the ability of induced Bregs to produce interleukin-10 (IL-10) and to express genes for Fas ligand (FasL) and programmed death ligand 1 (PD-L1) molecules. We found that only two cytokines, IL-12 and IFN- γ , supported development of Bregs in a population of LPS-stimulated B cells. IFN- γ enhanced production of IL-10 and gene expression of FasL and PD-L1. Furthermore, we analyzed effects of Bregs on macrophages and their following action on T cells. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86, gene expression of IL-1 α and the production of IL-6 were tested to determine the effects of macrophages on T cells. Macrophages influenced by Bregs had decreased ability to stimulate proliferation of activated CD8⁺ T cells. Cocultivation of T cells with the influenced macrophages resulted in a decreased production of proinflammatory cytokine IL-17. Our results showed that IL-12 and IFN- γ enhanced activation of Bregs in a population of LPS-stimulated B cells and Bregs are capable to suppress immune response. A possibility to induce Bregs *in vitro* may have a great impact for their potential use in a clinical setting.

Key words: regulatory B lymphocytes, IL-10 production, cytokines, immunosuppression

Obsah

1. Použité zkratky	8
2. Úvod	10
3. Cíle diplomové práce.....	11
4. Literární přehled	12
4.1. Poznání Bregs	12
4.2. Charakterizace a diferenciací Bregs.....	12
4.2.1. Fenotypová charakterizace Bregs	12
4.2.2. Indukce a vývoj Bregs	14
4.3. Mechanismy působení Bregs.....	16
4.3.1. Cytokiny produkované Bregs	16
4.3.1.1. IL-10	16
4.3.1.2. TGF- β	18
4.3.1.3. IL-35	19
4.3.2. Imunomodulační povrchové molekuly Bregs.....	20
4.3.2.1. FasL	20
4.3.2.2. PD-L1 a PD-L2.....	21
4.3.2.3. TRAIL	21
4.3.2.4. GITRL	22
4.3.2.5. CD72.....	22
4.3.2.6. CD39 a CD73	23
4.4. Možnosti indukce Bregs	23
5. Materiál a metody	25
5.1. Zvířata.....	25
5.2. Roztoky a média	25
5.3. Použité technické vybavení	25
5.4. Použitý software	26
5.5. Izolace a kultivace buněk	27
5.5.1. B lymfocyty	27
5.5.2. T lymfocyty.....	27
5.5.3. Makrofágy.....	27
5.6. Magnetická separace.....	28
5.7. Stimulace a ovlivnění buněk.....	28
5.8. Proliferační testy	29
5.8.1. Test metabolické aktivity buněk pomocí WST-1	29

5.8.2. CFSE značení.....	29
5.9. Průtoková cytometrie.....	29
5.10. Mikroskopie.....	31
5.11. Detekce cytokinů ELISA testem	32
5.11.1. Příprava supernatantů pro detekci cytokinů.....	32
5.11.2. ELISA	32
5.12. Izolace RNA a reverzní transkripce.....	34
5.12.1. Příprava buněk na stanovení genové exprese	34
5.12.2. Izolace RNA	34
5.12.3. Reverzní transkripce	35
5.13. RT-PCR	35
5.14. Průkaz funkční aktivity stimulovaných B lymfocytů	36
5.15. Statistická analýza	37
6. Výsledky.....	38
6.1. Fenotypová charakterizace izolovaných B lymfocytů.....	38
6.2. Efekt cytokinů na produkci IL-10 B lymfocyty	39
6.3. Efekt cytokinů na procento B lymfocytů produkujících IL-10	41
6.4. Fenotyp stimulovaných B lymfocytů.....	43
6.5. Efekt cytokinů na expresi genů pro FasL a PD-L1 ve stimulovaných B lymfocytech.....	45
6.6. Efekt cytokinů na proliferaci B lymfocytů	45
6.7. Charakterizace adherentních peritoneálních buněk	46
6.8. Průkaz funkční aktivity stimulovaných B lymfocytů	47
6.8.1. Fenotyp T lymfocytů	47
6.8.2. Vliv ovlivněných makrofágů na proliferaci T lymfocytů	48
6.8.3. Fenotyp proliferujících T lymfocytů.....	50
6.8.4. Vliv stimulovaných B lymfocytů na produkci IL-17 T lymfocyty	51
6.9. Mechanismy působení ovlivněných adherentních peritoneálních buněk	52
6.9.1. Expres kostimulačních molekul u adherentních peritoneálních buněk.....	52
6.9.2. Vliv stimulovaných B lymfocytů na produkci IL-6 a expresi genu pro IL-1 α adherentními peritoneálními buňkami	53
7. Diskuze	55
8. Závěr.....	59
9. Literatura	60

1. Použité zkratky

APC	allophycocyanin
BCR	B-cell receptor
Bregs	regulatory B lymphocytes
BSA	bovine serum albumine
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHS	contact hypersensitivity
CIA	collagen-induced arthritis
ConA	concanavalin A
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	deoxyribonucleic acid
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FasL	Fas ligand
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FO	follicular
FoxP3	forkhead box P3
GAPDH	glyceraldehyde dehydrogenase
GIFT15	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-15 fusokine
GITRL	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand
HIV	human immunodeficiency virus
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide
MHC	major histocompatibility complex
MZ	marginal zone

NK	natural killers
NKT	natural killer T cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	phycoerythrin
PD-L	programmed death ligand
RA	rheumatoid arthritis
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
SD	standard deviation
SLE	systemic lupus erythematosus
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
T2-MZP	transitional-2-marginal zone precursor
TACI	transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
TGF	transforming growth factor
Th	T helper cells
TIM-1	T cell immunoglobulin mucin 1
TLR	toll-like receptor
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Tregs	regulatory T cells
WST-1	water soluble tetrazolium 1

2. Úvod

Regulační B lymfocyty (Bregs, *regulatory B lymphocytes*) představují heterogenní populaci B buněk, které regulují imunitní odpovědi jinými mechanismy než produkcí protilátek. Heterogenita v populaci Bregs omezuje možnost jejich jednoznačné fenotypové charakterizace u myšího i lidského modelu.

Bregs mohou působit pomocí produkce protizánětlivých cytokinů nebo přímým buněčným kontaktem prostřednictvím svých povrchových molekul. Prvním popsáným a v současnosti nejvíce testovaným mechanismem působení Bregs je produkce interleukinu-10 (IL, *interleukin*). Mezi další cytokiny produkované Bregs patří transformující růstový faktor- β (TGF, *transforming growth factor*) a IL-35. Kromě produkce protizánětlivých cytokinů mohou Bregs modulovat imunitní odpovědi také přímým buněčným kontaktem. Mezi povrchové molekuly Bregs účastnící se v regulaci imunity patří například molekula FasL (*Fas ligand*), PD-L1 (*programmed death ligand*), PD-L2, TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) a další.

Mechanismy působení Bregs jsou nejčastěji testovány na modelech autoimunitních onemocnění, kde mohou významně regulovat imunitní odpovědi zprostředkované T lymfocyty. Bregs snižují nebo potlačují imunopatologické reakce u těchto onemocnění. Imunosupresivní účinky Bregs mohou mít důležitý terapeutický potenciál také při navození imunologické tolerance vůči alotransplantátu. Působení Bregs však může mít i negativní vliv na imunitní dohled, protože se tyto buňky mohou podílet na oslabení protinádorové imunity. Bregs hrají významnou roli ve fungování imunitního systému a udržení jeho homeostázy a představují významnou populaci buněk s potenciálem pro klinickou praxi.

3. Cíle diplomové práce

Studium možností indukce Bregs a analýza mechanismů jejich působení je v současnosti významným tématem výzkumu. Znalosti o způsobech indukce Bregs a mechanismech jejich působení mohou mít zásadní význam pro jejich budoucí klinické využití, například v transplantační imunologii nebo při léčbě autoimunitních onemocnění.

Tato práce si klade za cíl charakterizovat vliv stimulace lipopolysacharidem (LPS, *lipopolysaccharide*) a vybranými cytokiny na indukci Bregs *in vitro* a stanovit, jakým mechanismem tyto indukované Bregs působí. Dalším cílem je popsat funkční aktivitu Bregs indukovaných v přítomnosti vybraných cytokinů pomocí *in vitro* modelu proliferace aktivovaných T lymfocytů v přítomnosti makrofágů ovlivněných Bregs. Dalším cílem je popsání mechanismů působení makrofágů po stimulaci Bregs indukovanými LPS a vybranými cytokiny na T lymfocyty.

4. Literární přehled

4.1. Poznání Bregs

Existence B lymfocytů se supresivními vlastnostmi byla popsána již v 70. letech 20. století na modelu oddálené hypersenzitivity u morčat (Neta and Salvin 1974). U myšího modelu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE, *experimental autoimmune encephalomyelitis*) byla v roce 1996 prokázána role B lymfocytů v potlačení onemocnění. Navrženým mechanismem působení B lymfocytů byl posun rovnováhy produkce cytokinů pomocných T lymfocytů (Th, *T helper cells*) od Th1 k Th2 cytokinům (Wolf et al. 1996). Dále byla prokázána role Bregs například u myšího modelu systémového lupusu erythematodes (SLE, *systemic lupus erythematosus*) (Douglas et al. 1997) nebo artritidy indukované kolagenem (CIA, *collagen-induced arthritis*) (Mauri et al. 2003).

Výzkum se v dalších letech zaměřil také na mechanismy působení a možnosti indukce Bregs, zejména u modelů autoimunitních onemocnění. Významným mechanismem působení Bregs je produkce IL-10 (Skok et al. 1999). Bylo prokázáno, že závažnost CIA může záviset na aktivaci B lymfocytů antigenem a stimulaci molekuly CD40 (*cluster of differentiation*) (Mauri et al. 2003). Rovněž byl prokázán vliv molekuly B7 exprimované Bregs na průběh EAE (Mann et al. 2007). U EAE byla také zjištěna schopnost indukovat Bregs pomocí molekuly GIFT15 (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-15 fusokine*) (Rafei et al. 2009). U myšího modelu karcinomu dlaždicového epitelu bylo prokázáno, že Bregs mohou potlačovat protinádorovou imunitu prostřednictvím produkce faktoru nekrotizující nádory- α (Schioppa et al. 2011).

4.2. Charakterizace a diferenciací Bregs

Jednoznačná fenotypová charakterizace Bregs může být obtížná, neboť tyto buňky vykazují rozdílnou expresi povrchových znaků v závislosti na subpopulaci B lymfocytů, z které vznikly a dále se vyvíjely (Mauri and Bosma 2012).

4.2.1. Fenotypová charakterizace Bregs

Bregs na svém povrchu exprimují rozdílné molekuly v závislosti na modelovém stavu, při kterém byly indukovány. U TCR $\alpha^{-/-}$ myši, které spontánně vyvíjí chronický střevní zánět, byla v mesenterických lymfatických uzlinách nalezena populace Bregs, která vykazovala

zvýšenou expresi CD1d molekuly. Bregs u tohoto modelu byly dále CD21⁺, CD62⁻, CD23^{high} a IgM⁺ (*immunoglobulin*) (Mizoguchi et al. 2002). U myši infikovaných helmintem *Schistosoma mansoni* byly také identifikovány Bregs, které silně exprimovaly molekulu CD1d a vykazovaly fenotyp CD5⁺, CD21^{high}, CD23⁺, IgD⁺ a IgM^{high} (Amu et al. 2010). Bregs, které se účastnily prevence CIA u myši, exprimovaly molekuly CD21, CD23 a IgM (Evans et al. 2007). Naopak po stimulaci B lymfocytů CpG bakteriální deoxyribonukleovou kyselinou (DNA, *deoxyribonucleic acid*) byly nalezeny Bregs s CD5⁺, CD1d⁻, CD21^{high} a CD23^{high} fenotypem. Infekce prvokem *Leishmania major* indukovala Bregs s CD5⁺, CD1d⁺, CD21^{low} a CD23^{low} fenotypem (Ronet et al. 2010). Pro Bregs u myši s kontaktní hypersenzitivitou (CHS, *contact hypersensitivity*) byla typická exprese CD5 a CD1d molekuly (Yanaba et al. 2008). Zároveň byl význam Bregs s tímto fenotypem prokázán u myšního modelu SLE (Watanabe et al. 2010) a EAE (Matsushita et al. 2008). Také u myši infikovaných bakterií *Listeria monocytogenes* byly B lymfocyty produkující IL-10 CD1d⁺ a CD5⁺ (Horikawa et al. 2013). Naproti tomu při indukci tolerance alogenních štěpů pouze 22 % slezinných Bregs vykazovalo fenotyp CD5⁺ a CD1d⁺, ale přibližně 71 % exprimovalo molekulu TIM-1 (*T cell immunoglobulin mucin 1*) (Ding et al. 2011). Role molekuly TIM-1 byla prokázána také u modelu kožní transplantace u myši (Moreau et al. 2015). Po stimulaci slezinných B lymfocytů pomocí regulačních dendritických buněk byly nalezeny Bregs produkující IL-10, které byly CD19^{high} a FcγRIIb^{high} (Qian et al. 2012).

Existence Bregs byla prokázána také u lidí. Většina lidských nestimulovaných Bregs periferní krve exprimovala CD24 a CD27 molekuly, přibližně polovina z nich dále vykazovala vysokou expresi IgM a IgD a zvýšenou expresi molekul CD19 a CD25. Po 48hodinové inkubaci Bregs s rekombinantní molekulou CD40L a CpG bakteriální DNA následované 5hodinovou inkubací s LPS, forbol esterem a ionomycinem došlo u těchto buněk ke zvýšené expresi molekul CD1d, CD19, CD20, CD21, CD23, CD24, CD25, CD27 a CD38 v porovnání s B lymfocyty, které neprodukovaly IL-10. Také lidské slezinové Bregs byly převážně CD27 pozitivní (Iwata et al. 2011). Lidské Bregs periferní krve se vyskytovaly převážně v populaci CD19⁺CD38^{high}CD24^{high} B lymfocytů. Tyto buňky byly schopné tlumit produkci prozánětlivých cytokinů CD4⁺ T lymfocyty. CD19⁺CD38^{high}CD24^{high} B lymfocyty pacientů se SLE tuto schopnost nevykazovaly (Blair et al. 2010). Dále byla prokázána snížená funkčnost populace CD19⁺CD38⁺CD24⁺ B lymfocytů u pacientů s revmatoidní artritidou (RA, *rheumatoid arthritis*). CD19⁺CD38⁺CD24⁺ B lymfocyty u pacientů s RA nebyly schopné tlumit diferenciaci CD4⁺ T lymfocytů na Th17 lymfocyty (Flores-Borja et al. 2013). Oproti tomu bylo zjištěno, že čerstvě izolované lidské B lymfocyty periferní krve, které

spontánně produkovaly IL-10, vykazovaly vysokou expresi molekuly CD25. CD19⁺CD25^{high} Bregs byly dále charakterizovány a bylo ukázáno, že exprimovaly v porovnání s CD19⁺CD25^{low} B lymfocyty ve zvýšené míře molekuly CD86, CD27 a CD1d. Čerstvě izolované Bregs potlačovaly proliferaci CD4⁺ T lymfocytů a zároveň u regulačních T lymfocytů (Tregs, *regulatory T cells*) zvyšovaly expresi molekul CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) a FoxP3 (*forkhead box P3*). Tento efekt byl zprostředkovaný TGF-β, který byl produkován Bregs (Kessel et al. 2012). Po stimulaci B lymfocytů periferní krve přes receptor podobný proteinu Toll 9 (TLR, *toll-like receptor*) pomocí CpG bakteriální DNA B lymfocyty produkovaly IL-10 a vykazovaly fenotyp CD73⁻, CD25⁺, CD71⁺ a PD-L1⁺ (van de Veen et al. 2013). Následně byly také stanoveny transkripční profily lidských B lymfocytů periferní krve za účelem nalezení molekul významných pro odlišení B lymfocytů produkujících nebo naopak neprodukujících IL-10 po stimulaci CpG bakteriální DNA nebo protilátkou anti-Ig. Lidské B lymfocyty, které neexprimovaly molekulu CD11c, vykazovaly po stimulaci schopnost produkovat IL-10 (Lin et al. 2014).

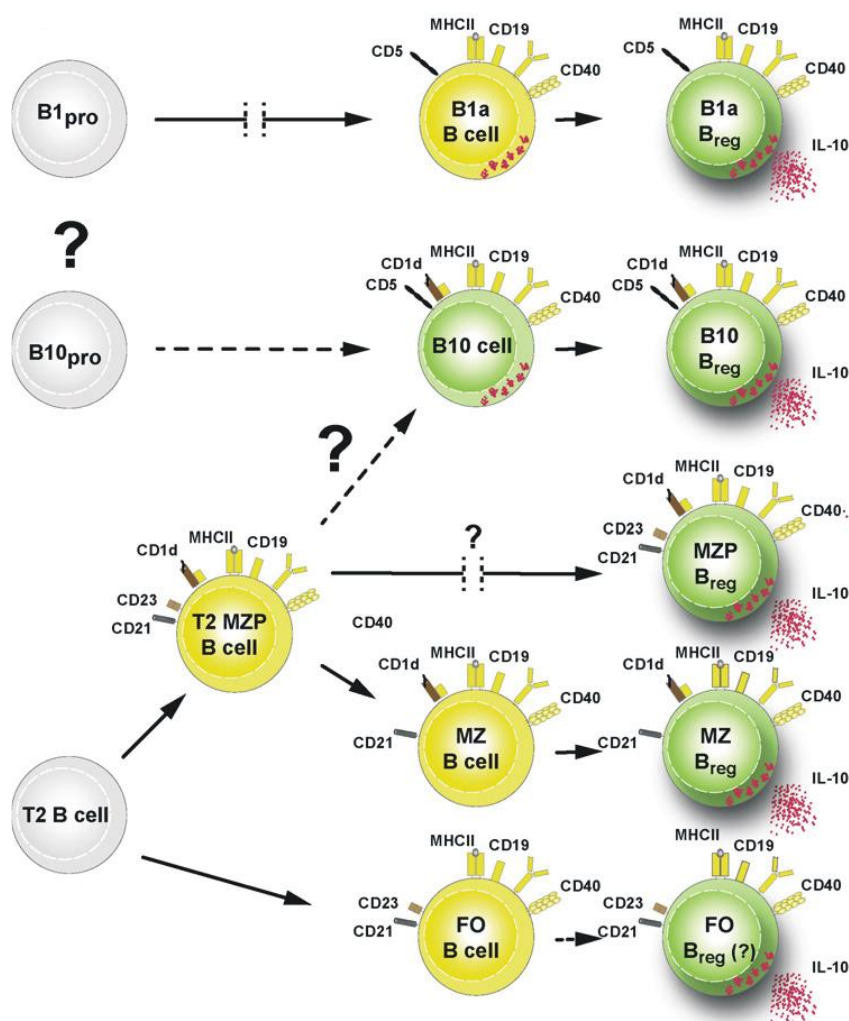
Doposud nebyla identifikována specifická kombinace povrchových molekul jednoznačně určujících populaci Bregs. Jedním z důvodů je značná podobnost povrchových molekul Bregs s povrchovými molekulami ostatních subpopulací B lymfocytů. Hlavním znakem Bregs proto dosud zůstává jejich schopnost produkovat IL-10, nebo obecně tlumit imunitní reakce pomocí různých mechanismů.

4.2.2. Indukce a vývoj Bregs

Identifikování prekurzorů Bregs a s tím související popsání jejich vývojových drah nebylo dosud jednoznačně provedeno, jelikož Bregs sdílí společné povrchové znaky s jinými subpopulacemi B lymfocytů. Dále záleží na stimulaci, případně použitém modelu, při kterém byly Bregs indukovány (Yanaba et al. 2009).

B lymfocyty lze rozlišit na B1 a B2 subpopulaci, kterou je možné dále rozdělit na folikulární (FO, *follicular*) B lymfocyty a B lymfocyty marginální zóny (MZ, *marginal zone*) (Vitale et al. 2010). Je pravděpodobné, že při vhodné stimulaci je možné indukovat Bregs ze všech subpopulací B lymfocytů. Bylo ukázáno, že CD5⁺ B1 lymfocyty po stimulaci rekombinantním IL-12 mohou produkovat IL-10 (Spencer and Daynes 1997). U myšího modelu SLE stimulace CpG bakteriální DNA navodila produkci IL-10 u MZ B lymfocytů (Brummel and Lenert 2005). Za účelem navození produkce IL-10 u T lymfocytů byly

T lymfocyty kultivovány s ovalbuminem, apoptickými buňkami a FO nebo MZ B lymfocyty. K indukci Tregs byl nezbytný IL-10 produkovaný B lymfocyty, přičemž obě subpopulace B lymfocytů IL-10 produkovaly (Gray et al. 2007). Jako možné prekurzory Bregs byly popsány také T2-MZP buňky (*transitional-2-marginal zone precursor*), které jsou prekurzory pro MZ B lymfocyty (Evans et al. 2007, Pillai et al. 2004). Schéma potenciálních prekurzorů a vývojových drah Bregs zahrnující i povrchové znaky je znázorněno na Obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Schéma potenciálních prekurzorů a vývojových drah Bregs. Bregs se mohou diferenciovat z B1 i B2 lymfocytů, které zahrnují FO a MZ B lymfocyty včetně jejich prekurzorů. Předpokládá se i existence specifického prekurzoru pro Bregs. Indukovatelnost Bregs z různých subpopulací B lymfocytů, s kterými následně sdílí povrchové znaky, omezuje možnost určení jednoznačného fenotypu Bregs (převzato a upraveno z Vitale et al. 2010).

4.3. Mechanismy působení Bregs

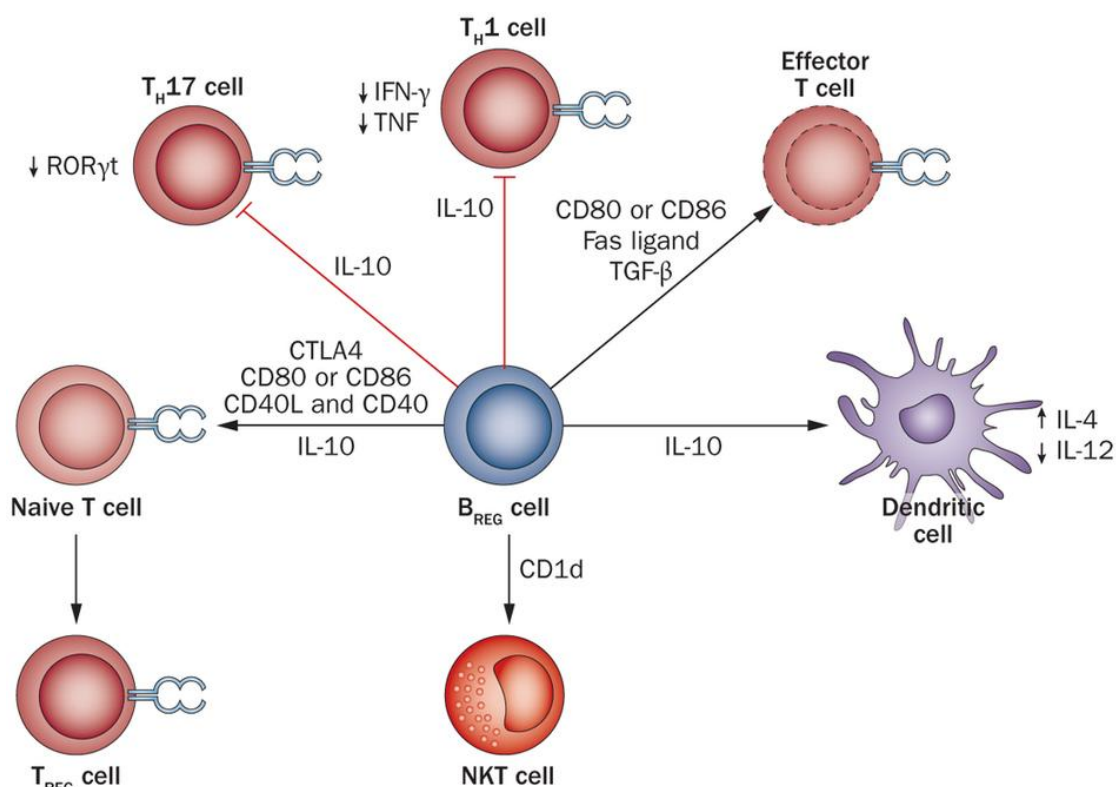
Bregs mohou modulovat imunitní odpovědi prostřednictvím různých mechanismů, a to jak pomocí produkce protizánětlivých cytokinů, tak pomocí exprese imunomodulačních molekul na svém povrchu. Kvůli podobnosti některých funkčních mechanismů Bregs a Tregs proběhly snahy o analogické rozdělení subtypů Bregs podle subtypů Tregs. Proto je možné se setkat s označením B lymfocytů produkujících IL-10 jako Br1 a B lymfocytů produkujících TGF- β jako Br3 (Berthelot et al. 2013). Protože Bregs mohou regulovat imunitní odpovědi celou řadou mechanismů, toto dělení se v posledních letech téměř nepoužívá. Také byla popsána populace lidských CD19⁺CD5⁺ B lymfocytů exprimující transkripční faktor FoxP3, který je významný pro diferenciaci Tregs (Noh et al. 2010). Tento typ Bregs ale dosud nebyl potvrzen dalšími autory, proto zatím lze existenci této subpopulace Bregs považovat za spornou.

Mezi mechanismy, kterými Bregs regulují imunitní odpovědi, patří produkce protizánětlivých cytokinů - a to především IL-10 (Fillatreau et al. 2002, Flores-Borja et al. 2013), TGF- β (Lee et al. 2014, Natarajan et al. 2012) nebo IL-35 (Shen et al. 2014). Dále Bregs také mohou imunitní odpovědi modulovat pomocí přímého buněčného kontaktu prostřednictvím molekuly FasL (Lundy and Fox 2009, Montandon et al. 2013), PD-L1 (Bodhankar et al. 2011), PD-L2 (Bodhankar et al. 2014), TRAIL (Kemp et al. 2004), ligand receptoru GITR (GITRL, *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand*) (Ray et al. 2012), CD72 (Vadasz et al. 2014), CD39 a CD73 (Kaku et al. 2014). Některé z možných mechanismů působení Bregs na imunitní odpovědi jsou znázorněny na Obrázku č. 2.

4.3.1. Cytokiny produkované Bregs

4.3.1.1. IL-10

Klíčovým mechanismem působení Bregs je produkce IL-10. Produkce IL-10 B lymfocyty je často považována za charakteristický znak Bregs, který odlišuje Bregs od ostatních subpopulací B lymfocytů. IL-10 je protizánětlivý cytokin, který inhibuje aktivitu především Th1 lymfocytů, NK buněk (*natural killers*) a makrofágů (Couper et al. 2008).



Obrázek č. 2: Efektorové mechanismy působení Bregs. Produkci protizánětlivých cytokinů a expresí povrchových molekul mohou Bregs ovlivnit řadu složek imunitního systému. Bregs produkující IL-10 tlumí Th1 imunitní odpověď tím, že potlačují diferenciaci T lymfocytů v Th1 lymfocyty a snižují produkci Th1 cytokinů. Dále Bregs produkující IL-10 potlačují diferenciaci T lymfocytů v Th17 lymfocyty, podporují vznik Tregs a mění poměr produkce IL-4 a IL-12 dendritickými buňkami tak, že dochází k útlumu Th1 typu imunitní odpovědi a naopak k podpoře Th2 typu imunitní odpovědi. Interakce Bregs s T lymfocyty přes jejich povrchové molekuly může vést k diferenciaci Tregs a apoptóze efektorových T lymfocytů. Navíc mohou Bregs přes CD1d molekulu interagovat s NKT lymfocyty (*natural killer T cells*), což může představovat další regulační potenciál Bregs (převzato z Stolp et al. 2014).

Schopnost Bregs produkovat IL-10 a jeho prostřednictvím regulovat imunitní odpovědi T lymfocytů byla prokázána u řady experimentálních modelů autoimunitních onemocnění. Tento mechanismus byl popsán u EAE (Fillatreau et al. 2002), CIA (Mauri et al. 2003), CHS (Yanaba et al. 2008) nebo SLE (Blair et al. 2009).

Význam Bregs a jimi produkovaného IL-10 byl ukázán také u lidí. $CD19^{\text{high}}CD24^{\text{high}}CD38^{\text{high}}$ Bregs produkující IL-10 byly podstatné pro vývoj Tregs. Snížené množství $CD19^{\text{high}}CD24^{\text{high}}CD38^{\text{high}}$ Bregs produkujících IL-10 bylo zjištěno u pacientů s RA, což mohlo souviset s rozvojem této nemoci (Flores-Borja et al. 2013). Naproti tomu se však supresivní vlastnosti Bregs mohou podílet také na snížené schopnosti organismu

reagovat na různé nákazy. U pacientů s chronickou hepatitidou B a C množství cirkulujících Bregs produkujících IL-10 pozitivně korelovalo s množstvím sérové alanin transaminázy, jejíž sérová aktivita je indikátorem akutního poškození hepatocytů. Bregs produkující IL-10 mohly rovněž narušit eradikaci patogenů (Wang et al. 2014). Naopak na terapeutický potenciál Bregs bylo poukázáno v transplantační imunologii, kde byl popsán jejich vliv na potlačení rejekce alotransplantátu. U pacientů se stabilní a funkční transplantovanou ledvinou přežívající bez podávání imunosupresivních léků nejméně po dobu jednoho roku v porovnání s pacienty vykazujícími chronickou rejekci byla zjištěna zvýšená míra fosforylace transkripčního faktoru STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), který je součástí aktivační signální dráhy vedoucí k produkci IL-10 u Bregs. Fosforylace STAT3 u těchto pacientů byla srovnatelná se zdravými kontrolami (Silva et al. 2012). Při experimentální transplantaci Langerhansových ostrůvků byl obdobně prokázán vliv B lymfocytů produkujících IL-10 na navození transplantační tolerance po léčbě protilátkami anti-CD45RB a anti-TIM-1 (Lee et al. 2012).

Prvním popsaným mechanismem působení Bregs byla produkce IL-10. Význam Bregs produkujících IL-10 byl prokázán u myši i lidí. Tyto buňky mají vliv na průběh různých autoimunitních onemocnění. Bregs produkující IL-10 mohou hrát důležitou roli například při navození transplantační tolerance. V posledních letech se navíc podstatně rozvíjí výzkum dalších mechanismů, kterými Bregs působí na imunitní odpovědi.

4.3.1.2. TGF- β

TGF- β patří mezi významné protizánětlivé cytokiny (Letterio and Roberts 1998) a jeho produkce je jedním z mechanismů, kterými mohou Bregs regulovat imunitní odpovědi.

Jeho role společně s molekulou FasL byla prokázána v útlumu projevů nemoci u myšního kmene NOD, což je model diabetu 1. typu (Tian et al. 2001). Působení Bregs produkujících TGF- β bylo popsáno také při experimentální transplantaci Langerhansových ostrůvků, kde hrály tyto buňky roli v navození transplantační tolerance. V tomto modelu byly Bregs produkující TGF- β indukovány působením protilátek anti-CD45RB a anti-TIM-1 a mechanismus jejich účinku spočíval v indukci Tregs, které následně navozovaly transplantační toleranci (Lee et al. 2014). Dále u myšního modelu astmatu bylo zlepšení onemocnění dýchacích cest spojeno s rozvojem lokální inhalační tolerance, při které došlo k selektivnímu zvýšení počtu CD5⁺ B lymfocytů produkujících TGF- β . Tyto buňky byly schopné indukovat expresi transkripčního faktoru FoxP3 u CD4⁺CD25⁻ T lymfocytů *in vitro*. Adoptivní přenos těchto B lymfocytů zvyšoval navíc počet FoxP3⁺CD4⁺ T lymfocytů

v plicích a docházelo k inhibici eozinofilie dýchacích cest u pokusných zvířat (Natarajan et al. 2012).

Produkce TGF- β B lymfocyty byla prokázána u různých experimentálních modelů. Klíčovým mechanismem působení TGF- β produkovaného B lymfocyty je zřejmě jeho schopnost zprostředkovat indukci Tregs.

4.3.1.3. IL-35

IL-35 je protizánětlivý cytokin, který se na modulaci imunitních odpovědí podílí mimo jiné indukcí Tregs a současnou supresí vývoje Th17 lymfocytů (Niedbala et al. 2007).

Pro testování regulačních vlastností Bregs exprimujících gen pro IL-35 byl připraven myší kmen B-p35^{-/-}, u něhož měly B lymfocyty deletovaný gen pro molekulu p35, podjednotku IL-35. U tohoto myšího kmene byl zkoumán vliv delece p35 v B lymfocytech na průběh EAE. B-p35^{-/-} myši po imunizaci myelinovým oligodendrocytickým glykoproteinem vyvíjely závažnější formu EAE oproti kontrolním myším. B-p35^{-/-} myši dále vykazovaly zvýšenou produkci interferonu- γ (IFN, *interferon*) a IL-17 a v centrálním nervovém systému docházelo k akumulaci CD4⁺ T lymfocytů a mononukleárních fagocytů. B lymfocyty z B-p35^{-/-} myši exprimovaly zvýšené množství aktivačních molekul (CD44, CD69) a molekul nezbytných pro presentaci antigenu CD4⁺ T lymfocytům (MHC-II (*major histocompatibility complex*), CD80, CD86). V důsledku toho B-p35^{-/-} B lymfocyty působily jako účinnější buňky presentující antigen (Shen et al. 2014).

U myšího kmene B-p35^{-/-} byl rovněž testován vliv Bregs exprimujících gen pro IL-35 na průběh infekce bakterií *Salmonella typhimurium*, která je u myši původcem onemocnění sloužícího jako model pro břišní tyfus u lidí. Bylo zjištěno, že B-p35^{-/-} myši přežívaly delší dobu oproti kontrolním myším, což korelovalo s lepší kontrolou bakteriálního zatížení ve slezině a v játrech související se zvýšenou akumulací makrofágů v těchto orgánech a se silnější zánětlivou odpovědí T lymfocytů proti patogenům (Shen et al. 2014). Dále byly porovnávány Bregs exprimující gen pro IL-35 a Bregs exprimující gen pro IL-10. B lymfocyty exprimující gen pro IL-10 a IL-35 patřily výhradně do populace CD138^{high} plazmatických buněk. Tyto buňky dále exprimovaly molekuly IgM, CD80, CD86, MHC-II, CD40, CD69, CD44, CD43, TACI (*transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*), CXCR4, CD1d a TIM-1. Analýza genové exprese jednotlivých buněk ukázala, že přibližně 6–10 % CD138^{high} buněk exprimovalo gen pro IL-10 a podobné množství těchto buněk exprimovalo gen pro IL-35, k expresi IL-10 a IL-35 ale nedocházelo zároveň v jedné buňce (Shen et al. 2014).

Bregs exprimující gen pro IL-35 mohou představovat novou subpopulaci Bregs významnou pro regulaci imunitních odpovědí.

4.3.2. Imunomodulační povrchové molekuly Bregs

4.3.2.1. FasL

Aktivace Fas receptoru cílové buňky pomocí jeho ligandu FasL vede k indukci apoptózy u této buňky (Nagata and Suda 1995) a může hrát významnou roli při regulaci imunitních odpovědí. Například B lymfocyty stimulované LPS nebo protilátkou anti-CD40 exprimovaly FasL a byly schopné přímo zabíjet 4T1 nádorové buňky (Tao et al. 2015).

Závažnost CIA pozitivně korelovala se snížením počtu $CD19^+CD5^+$ B lymfocytů. U těchto B lymfocytů byla prokázána vyšší exprese FasL v porovnání se všemi ostatními myšími lymfocyty. To poukazuje na možnou roli $CD19^+CD5^+FasL^+$ B lymfocytů v potlačení T lymfocytů zprostředkované CIA (Lundy and Fox 2009). Role $CD19^+CD5^+FasL^+$ B lymfocytů byla také prokázána v průběhu infekce helmintem *Schistosoma mansoni*. Tyto B lymfocyty měly vliv na apoptózu $CD4^+$ T lymfocytů (Lundy and Boros 2002). Dále u myšího kmene NOD, který spontánně rozvíjí diabetes 1. typu, B lymfocyty stimulované LPS efektivně tlumily reakci Th1 lymfocytů proti antigenům beta buněk Langerhansových ostrůvků, což vedlo ke zpomalení progresu diabetu u těchto myší. Zmíněné B lymfocyty stimulované LPS na svém povrchu exprimovaly ve zvýšené míře FasL a dále produkovaly vysoké množství TGF- β . Terapeutický účinek aktivovaných B lymfocytů na rozvoj diabetu u NOD myší pravděpodobně souvisí s apoptózou a inhibicí funkce autoreaktivních T lymfocytů zprostředkovanou stimulovanými B lymfocyty (Tian et al. 2001). V jiné práci přirozené progenitorové pro-B lymfocyty nesoucí fenotyp $FasL^{high}$, $c-kit^+$, $B220^+$ a IgM^{low} snižovaly podíl aktivovaných T lymfocytů produkujících IL-21 a hrajících roli v patogenezi diabetu 1. typu. Vysokou expresi FasL si přirozené progenitorové pro-B lymfocyty navíc udržely i v průběhu diferenciaci ve zralé B lymfocyty, což by mohlo poskytovat dlouhodobou ochranu před diabetem 1. typu (Montandon et al. 2013).

Mezi regulační mechanismy Bregs patří také exprese molekuly FasL, jejíž exprese na Bregs měla vliv například u modelu CIA nebo diabetu u myší.

4.3.2.2. PD-L1 a PD-L2

Molekuly PD-L1 a PD-L2 představují významné povrchové ligandy podílející se na tlumení imunitních odpovědí T lymfocytů (Latchman et al. 2001). Význam molekuly PD-L1 byl popsán u EAE, kde PD-L1^{-/-} myši vykazovaly závažnější průběh EAE (Carter et al. 2007). Rovněž byl popsán vliv 17 β -estradiolu na prevenci EAE. Myši kmene μ MT^{-/-} trpící deficitem B lymfocytů po působení 17 β -estradiolu nevykazovaly zlepšení průběhu EAE související se snížením infiltrace leukocytů a produkce prozánětlivých faktorů v centrální nervové soustavě (Bodhankar et al. 2011, Gonnella et al. 2001). Bylo prokázáno, že léčba EAE pomocí 17 β -estradiolu závisí na expresi molekuly PD-L1 na B lymfocytech (Bodhankar et al. 2011). Negativní role Bregs exprimujících PD-L1 byla prokázána v průběhu infekce virem lidské imunitní nedostatečnosti (HIV, *human immunodeficiency virus*), po které CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} Bregs silně expimovaly PD-L1. Bylo ukázáno, že při dlouhodobé antiretrovirové terapii využívající blokování molekuly PD-L1 nebo PD-1 dochází k efektivní indukci cytotoxických T lymfocytů specifických pro HIV (Siewe et al. 2014). Naproti tomu při porovnání pacientů trpících SLE se zdravými kontrolami nebyl nalezen žádný rozdíl v expresi PD-L1 na plasmatických buňkách (Zampoylakis et al. 2013). Naopak význam molekuly PD-L2 byl prokázán například u hyperreakivity dýchacích cest. PD-L2^{-/-} myši vykazovaly závažnější formu hyperreakivity dýchacích cest oproti kontrolám (Akbari et al. 2010). Při výzkumu imunitních dějů následujících po mozkové mrtvici byl prokázán význam molekuly PD-L2 při kontrole odpovědi CD4⁺ T lymfocytů. Po mrtvici došlo ve slezině k nárůstu počtu Bregs exprimujících PD-L2. U PD-L2^{-/-} myší kleslo množství mozkových mrtvic po přenosu PD-L2⁺ Bregs. Naproti tomu míra exprese molekuly PD-L1 na B lymfocytech neměla vliv na četnost mrtvic u pokusných zvířat (Bodhankar et al. 2014).

Dalším funkčním mechanismem, který mohou Bregs využívat k modulaci imunitních odpovědí je exprese inhibičních molekul PD-L1 a PD-L2, což bylo prokázáno například u modelu EAE nebo hyperreakivity dýchacích cest.

4.3.2.3. TRAIL

Bylo zjištěno, že molekula TRAIL zajišťovala regulaci apoptózy periferních lymfocytů a hrála roli v buněčné smrti indukované aktivací zejména u CD4⁺ T lymfocytů (Sedger et al. 2010). Lidské B lymfocyty periferní krve po stimulaci CpG bakteriální DNA expimovaly TRAIL a byly schopné vyvolat lýzu u nádorových buněk melanomové linie WM793. Také IFN- α vyvolával dostatečnou indukci exprese TRAIL na B lymfocytech.

Navíc současná stimulace molekuly CD40 na B lymfocytech vedla k zesílení exprese TRAIL oproti B lymfocytům stimulovaným pouze IFN- α (Kemp et al. 2004).

Expresi molekuly TRAIL poskytuje aktivovaným B lymfocytům schopnost vyvolávat apoptózu u cílových buněk a tím modulovat reakce imunitního systému.

4.3.2.4. GITRL

Při hledání dalších možných mechanismů působení Bregs na průběh EAE byly pokusným myším odstraněny B lymfocyty pomocí protilátky anti-CD20. U těchto myší došlo k signifikantní redukci počtu Tregs ve slezině. Obdobně myši kmene μ MT^{-/-} vykazovaly ve slezině a v lymfatických uzlinách snížený počet Tregs, které navíc měly sníženou expresi CD25 molekuly, což ale nemělo vliv na jejich funkčnost. Bylo prokázáno, že B lymfocyty přispívají k homeostáze Tregs pomocí indukce jejich proliferace prostřednictvím ligandu receptoru GITR (GITRL, *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand*) exprimovaného na B lymfocytech. Ačkoliv blokování GITRL na B lymfocytech vedlo k signifikantnímu snížení počtu Tregs, efekt nebyl úplný, což mohlo být způsobeno například neúplnou blokáci GITRL na B lymfocytech nebo syntézou GITRL *de novo* (Ray et al. 2012).

Expresi povrchové molekuly GITRL na B lymfocytech může představovat další způsob regulace imunitního systému pomocí B lymfocytů.

4.3.2.5. CD72

U pacientů se SLE byla sledována účast molekuly CD72 exprimované na B lymfocytech v rozvoji a aktivitě SLE. Expresi CD72 na aktivovaných B lymfocytech byla signifikantně nižší u pacientů se SLE v porovnání se zdravými kontrolami a korelovala s aktivitou SLE podle indexu aktivity onemocnění SLE. Jako významná mez v expresi molekuly CD72 na aktivovaných B lymfocytech se jevila hranice, při které 40 % B lymfocytů expimovalo CD72. Pacienti mající více než 40 % CD72⁺ B lymfocytů nevykazovali lupusovou nefritidu a hladina komplementu byla v normě. Naopak u pacientů s méně než 40 % aktivovaných B lymfocytů exprimujících CD72 byly přítomny anti-dsDNA protilátky (Vadasz et al. 2014).

Další molekulu podílející se na regulačních vlastnostech Bregs může představovat molekula CD72.

4.3.2.6. CD39 a CD73

Molekuly CD39 a CD73 jsou ektoenzymy, které se účastní tvorby adenosinu. Molekula CD39 přeměňuje adenosintrifosfát na adenosinmonofosfát a následně molekula CD73 z adenosinmonofosfátu vytváří adenosin (Kaku et al. 2014). Molekula adenosintrifosfátu v extracelulárním prostoru představuje signální molekulu nebezpečí a má prozánětlivý efekt a naopak adenosin má protizánětlivé účinky (Haskó and Cronstein 2004).

Byla identifikována populace B lymfocytů exprimujících na svém povrchu molekuly CD39 a CD73, které v přítomnosti substrátu byly schopné vytvářet molekuly adeninu. CD73^{-/-} myši byly více náchylné k indukci kolitidy pomocí dextran sulfátu a následný přenos CD73⁺ B lymfocytů zmírňoval závažnost kolitidy. Produkce adeninu u IL-10^{-/-} myší byla také zhoršena, jelikož u těchto zvířat došlo rovněž k redukci exprese molekuly CD73 na B lymfocytech (Kaku et al. 2014).

Tvorba adenosinu může být dalším mechanismem, kterým mohou Bregs působit na imunitní odpovědi.

4.4. Možnosti indukce Bregs

Byla popsána řada možností indukce Bregs produkujících IL-10. Jedním z těchto mechanismů je stimulace B lymfocytů prostřednictvím TLR. Stimulace TLR2/4 pomocí LPS vedlo u B lymfocytů ke zvýšené produkci IL-10 (Lampropoulou et al. 2008, Lenert et al. 2005, Yanaba et al. 2008). Obdobně stimulace TLR9 pomocí CpG bakteriální DNA vyvolala u B lymfocytů produkci IL-10 u C57BL/6 myší (Lampropoulou et al. 2008) i u myší kmene PN, které spontánně rozvíjí SLE. Nicméně u PN myší bylo množství IL-10 produkovaného B lymfocyty po stimulaci LPS sníženo v porovnání se stimulací CpG bakteriální DNA (Lenert et al. 2005).

Dalším mechanismem indukce Bregs produkujících IL-10 může být jejich stimulace přes povrchovou molekulu CD40. *In vitro* kultivace B lymfocytů z myší se SLE s protilátkou anti-CD40 a jejich následný adoptivní přenos vedl ke zmírnění onemocnění u pokusných myší, a to mechanismem závislým na produkci IL-10 stimulovanými B lymfocyty (Blair et al. 2009). Naopak u myšího modelu EAE stimulace pouze protilátkou anti-CD40 nebyla dostatečná k indukci produkce IL-10 B lymfocyty. U tohoto modelu byla pro efektivní produkci IL-10 B lymfocyty nezbytná současná stimulace B lymfocytů protilátkami anti-CD40 a anti- κ . Bylo tedy potřebné stimulovat B lymfocyty prostřednictvím jejich povrchových molekul CD40 a B-buněčného receptoru (BCR, *B-cell receptor*) (Fillatreau et al.

2002). Oproti tomu B lymfocyty z C57BL/6 myši neprodukovaly IL-10 po stimulaci přes molekuly CD40 a BCR (Lampropoulou et al. 2008).

K indukci Bregs mohou být využity také cytokiny. K účinné expresi FasL na B lymfocytech bylo potřebné spolupůsobení vajíček *Schistosoma mansoni*, IL-4 a IL-10 (Lundy and Boros 2002). Myši, u jejichž B lymfocytů byl deletován receptor pro IL-6 a receptor 1 pro IL-1, měly snížený počet Bregs produkujících IL-10 a rozvíjely závažnější formu RA oproti kontrolám (Rosser et al. 2014). Stimulace purifikovaných B lymfocytů pomocí IL-21 vedla ke zvýšení počtu Bregs a produkce IL-10 (Yoshizaki et al. 2012). Současná stimulace B lymfocytů IL-21 a LPS ale vedla ke snížení produkce IL-10 Bregs oproti kontrolním buňkám stimulovaných pouze LPS. Ke zvýšení produkce IL-10 u Bregs došlo po současné stimulaci B lymfocytů IFN- γ a LPS (Holan et al. 2014). Dále podání IL-33 do peritoneální dutiny vedlo u myši kmene C57BL/6 k indukci Bregs produkujících IL-10 a majících CD19⁺, CD25⁺, CD1d^{high}, IgM^{high}, CD5⁻, CD23⁻ a TIM-1⁻ fenotyp. Při intravenózním adoptivním přenosu těchto buněk do myši kmene IL-10^{-/-}, který spontánně rozvíjí chronickou enterokolitidu, došlo k zastavení rozvoje idiopatického střevního zánětu (Sattler et al. 2014).

Doposud byla popsána řada různých mechanismů, které mohou vést k indukci supresivních Bregs. U některých modelů docházelo k rozvoji Bregs po stimulaci TLR, CD40 a/nebo BCR. Významný je také vliv cytokinů na vývoj Bregs. Mezi cytokiny, u kterých byla prokázána role v indukci Bregs, patří například IL-4, IL-6, IL-10, IL-21 nebo IFN- γ .

5. Materiál a metody

5.1. Zvířata

Pro pokusy byly využity myši inbredního kmene BALB/c. Používány byly pouze samice ve věku 10–16 týdnů chované za standardních podmínek v chovu Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v. v. i. (ÚMG AV ČR).

5.2. Roztoky a média

Buňky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Toto médium bylo obohaceno o 5 nebo 10 % tepelně inaktivovaného fetálního telecího séra (FCS, *fetal calf serum*, Gibco, Saranac, NY). Dále bylo médium doplněno penicilinem (v koncentraci 100 U/ml, Sigma Aldrich), streptomycinem (v koncentraci 100 µg/ml, Sigma Aldrich), 2-merkaptoethanolem (v koncentraci 5×10^{-5} M, Serva, Heidelberg, Německo) a HEPES pufr (v koncentraci 10mM, Sigma Aldrich). V dalším textu je toto médium označováno jako kompletní RPMI 1640 médium.

Pro analýzu pomocí průtokové cytometrie byl použit fosfátový pufr (PBS, *phosphate buffered saline*) připravovaný v servisní laboratoři ÚMG AV ČR (0,2 g KCl, 8 g NaCl, 0,24 g KH₂PO₄, 1,44 g Na₂PO₄ a 1 l destilované vody, pH upraveno na 7,2).

Pro fluorescenční mikroskopii byl používán blokační a permeabilizační roztok (25 ml PBS, 125 µl TRITONU X-100 (Sigma Aldrich), 50 mg hovězího sérového albuminu (BSA, *bovine serum albumine*, Sigma Aldrich)).

Při detekci cytokinů pomocí ELISA testu (*enzyme-linked immunosorbent assay*) byl používán roztok 1 l PBS a 0,5 ml Tween 20 (Sigma Aldrich).

Pro uvolnění adherovaných peritoneálních buněk byla používána směs 0,01M kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*, Sigma Aldrich) v PBS s 0,5% roztokem trypsinu (Sigma Aldrich) v poměru 1 : 1.

5.3. Použité technické vybavení

- Centrifuga Universal 32 (Hettich, Beverly, MA)
- Centrifuga Universal 320R (Hettich)
- CO₂ inkubátor (Sanyo Electric, Osaka, Japonsko)
- Cykler PTV-200 (MJ research, Warertoen, MA)

- Cykler StepOne Plus RT-PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)
- Invertovaný mikroskop Olympus IX81, vybavený kamerou Hamamatsu ORCA C4742-80-12AG (Olympus, Munster, Německo)
- Laminární box Clean Air (Telstar, JA Woerden, Nizozemsko)
- Magnetický separátor AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)
- Minicentrifuga Cleaver (Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, UK)
- Optický mikroskop Olympus CKX31(Olympus)
- Optický mikroskop Olympus CKX41 (Olympus)
- Průtokový cytometr LSR II (BD, Franklin Lakes, NJ)
- Spektrofotometr Nanodrop ND 1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE)
- Spektrofotometr Sunrise (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
- Třepačka IKA MS3 digital shaker (IKA Works, Wilmington, NC)
- Vortex IKA MS1 minishaker (IKA Works)

5.4. Použitý software

- FACSDiva Software (BD) – ovládací software pro průtokový cytometr
- FlowJo 9.2.6. (LCC, Ashland, OR) – vyhodnocovací software pro data získaná na průtokovém cytometru
- GraphPad Prism5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) – program pro statistické zpracování výsledků
- Kim 32 (Schoeller instruments, s.r.o., Praha, Česká republika) – software pro zpracování spektrofotometrických dat
- Olympus Soft Imaging Solutions 31 (Olympus) – software pro invertovaný mikroskop
- StepOne Software 2.2.2 (Applied Biosystems) – software pro zpracování dat z kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-PCR, *real-time PCR*)

5.5. Izolace a kultivace buněk

Všechny typy buněk byly kultivovány při 37 °C a v atmosféře 5% CO₂.

5.5.1. B lymfocyty

B lymfocyty byly izolovány ze suspenze slezinných buněk metodou magnetické separace. Slezina byla homogenizována pomocí skleněného homogenizátoru v kompletním 5% RPMI 1640 médiu. Buněčná suspenze byla přefiltrována přes nylonovou gázu a centrifugována (8 minut, 170 g). Peleta byla resuspendována v autoMACS pufru (Miltenyi Biotec) a koncentrace buněk byla stanovena pomocí Bürkerovy komůrky. Dále následovala příprava buněk podle protokolu pro magnetickou separaci, viz kapitola 5.6. Magnetická separace.

5.5.2. T lymfocyty

T lymfocyty byly získávány ze suspenze slezinných buněk metodou separace na nylonové vatě. Slezina byla homogenizována pomocí skleněného homogenizátoru v kompletním 5% RPMI 1640 médiu. Buněčná suspenze byla přefiltrována přes nylonovou gázu a centrifugována (8 minut, 170 g). Peleta byla resuspendována ve 4 ml kompletního 5% RPMI média nahřátého na 37 °C.

Sterilizovaná nylonová vata (Fenwal Labs, Deerfield, IL) byla inkubována v kompletním bezsérovém RPMI 1640 médiu 30 minut při 37 °C. Poté byla vata inkubována v předehřátém kompletním 5% RPMI 1640 médiu dalších 30 minut při 37 °C. Dále byly na vatu opatrně nanесeny 4 ml suspenze splenocytů v nahřátém médiu, buňky byly na vatě inkubovány 40 minut při 37 °C. Po inkubaci byla vata promývána předehřátým kompletním 5% RPMI 1640 médiem a vytékající suspenze buněk byla zachytávána, centrifugována (8 minut, 170 g) a peleta resuspendována v 1,5 ml kompletního 5% RPMI 1640 média nahřátého na 37 °C. Tato suspenze byla nanесena na další sterilní vatu připravenou dle předchozího popisu. Buňky na nylonové vatě byly inkubovány 40 minut při 37 °C. Po inkubaci byla vata opatrně promyta teplým kompletním 5% RPMI 1640 médiem a vytékající suspenze T lymfocytů byla zachytávána a dále použita.

5.5.3. Makrofágy

Makrofágy byly získávány výplachem peritoneální dutiny myši 12 ml chlazeného kompletního 5% RPMI 1640 média pomocí injekční stříkačky (B Braun, Melsungen,

Německo) a 21 G jehly (B Braun). Suspenze peritoneálních buněk byla centrifugována (8 minut, 170 g). Peleta byla resuspendována v kompletním 10% RPMI 1640 médiu a pomocí Bürkerovy komůrky byla stanovena koncentrace buněk. V 96jamkové kultivační destičce (Nunc, Waltham, MA) bylo inkubováno 100 μ l peritoneálních buněk (z koncentrace $1,2 \times 10^6$ buněk/ml) nebo ve 24jamkové destičce (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) bylo inkubováno 1000 μ l peritoneálních buněk (z koncentrace 1×10^6 buněk/ml). Po 24hodinové inkubaci při 37 °C byly odmyty neadherentní peritoneální buňky kompletním 5% RPMI 1640 médiem nahřátým na 37 °C.

5.6. Magnetická separace

Magnetická separace byla využívána pro izolaci B lymfocytů ze suspenze splenocytů. Pro separaci byl použit magnetický separátor autoMACS Pro (Miltenyi Biotec) a CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec) obsahující konjugát magnetických mikropartikulí a anti-CD19 protilátky.

Jednobuněčná suspenze splenocytů byla převedena do autoMACS pufru (Miltenyi Biotec). Na každých 10^7 buněk bylo přidáno 90 μ l pufru. Následně bylo přidáno 10 μ l CD19 MicroBeads na každých 10^7 splenocytů a suspenze byla inkubována 15 minut při 4 °C. Po inkubaci byly přidány 1–2 ml autoMACS pufru na každých 10^7 buněk a suspenze byla centrifugována (8 minut, 170 g). Peleta byla resuspendována v 500 μ l autoMACS pufru a separována autoMACS Pro separátorem (Miltenyi Biotec) na program Possel.

5.7. Stimulace a ovlivnění buněk

B lymfocyty byly kultivovány v přítomnosti cytokinů IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ (PeproTech, Rocky Hill, NJ) v konečné koncentraci 10 ng/ml, IL-21 (PeproTech) v konečné koncentraci 2 ng/ml a TGF- β (PeproTech) v konečné koncentraci 1 ng/ml. Dále byly B lymfocyty stimulovány pomocí LPS (Difco Laboratories, Detroit, MI) v konečné koncentraci 10 μ g/ml.

T lymfocyty byly stimulovány konkanavalinem A (ConA, *concanavalin A*, Sigma Aldrich) v konečné koncentraci 1 μ g/ml. Makrofágy byly stimulovány LPS v konečné koncentraci 5 μ g/ml.

5.8. Proliferační testy

5.8.1. Test metabolické aktivity buněk pomocí WST-1

Ke stanovení vlivu cytokinů na proliferaci B lymfocytů byl proveden test metabolické aktivity stimulovaných B lymfocytů pomocí tetrazoliové soli 1 (WST-1, *water soluble tetrazolium 1*, Millipore, Billerica, MA).

V 96jamkové kultivační destičce (Nunc) bylo inkubováno v celkovém objemu 160 μ l kompletního 10% RPMI 1640 média 80 μ l B lymfocytů (z koncentrace 2×10^6 buněk/ml), které byly stimulovány cytokiny (v koncentraci dle kapitoly 5.7.), nebo cytokiny (v koncentraci dle kapitoly 5.7.) a LPS (v koncentraci 10 μ g/ml).

Po 72 hodinách kultivace při 37 °C bylo do kultury přidáno WST-1 činidlo (Millipore) v poměru 1 : 10, tj. bylo přidáno 16 μ l zásobního roztoku WST-1. Proliferace B lymfocytů byla měřena po 5 hodinách inkubace při 37 °C pomocí spektrofotometru Sunrise (Tecan) s užitím měřicího (450 nm) a referenčního (550 nm) filtru.

5.8.2. CFSE značení

Ke stanovení proliferace T lymfocytů byla použita metoda sledování snižování intenzity fluorescence v buňkách značených karboxyfluorescein succinimidyl esterem (CFSE, *carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Molecular Probes, Eugene, OR) pomocí průtokové cytometrie.

Po separaci bylo 10^7 T lymfocytů naředěno v PBS a centrifugováno (8 minut, 170 g). Peleta byla resuspendována v 5 ml PBS nahřátého na 37 °C a suspenze byla značena 0,7 μ g/ml CFSE. Buňky byly inkubovány 10 minut při 37 °C. Dále byla suspenze naředěna 3,5 ml studeného kompletního 5% RPMI 1640 média a inkubována 7 minut při 4 °C. Poté byla suspenze centrifugována (8 minut, 170 g) a peleta byla resuspendována ve studeném kompletním 5% RPMI 1640 médiu. Tento promývací krok byl opakován 3krát.

5.9. Průtoková cytometrie

V průtokové cytometrii jsou značeny povrchové, případně intracelulární molekuly pomocí protilátek konjugovaných s fluorochromy. V naší laboratoři jsou nejčastěji používány monoklonální protilátky konjugované s fluorochromy: alofykocyanin (APC, *allophycocyanine*), fluorescein isothiokyanát (FITC, *fluorescein isothiocyanate*) a fykoerytrin

(PE, *phycoerythrin*), dále viz Tabulka č. 1. Pomocí průtokové cytometrie bylo stanoveno procentuální zastoupení jednotlivých populací leukocytů u čerstvě separovaných B lymfocytů a B lymfocytů po stimulaci LPS a cytokiny.

Suspenze čerstvě separovaných B lymfocytů v PBS byla rozpipetována do mikrokultivační destičky s kulatým dnem (Nunc) přibližně po $0,5 \times 10^6$ buněk/jamku. Destička byla centrifugována (3 minuty, 140 g) a promyta PBS. Následně byla rozvolněna peleta a ke vzorkům bylo pipetováno 10 μ l roztoku protilátky v PBS v koncentraci dle Tabulky č. 1. Následovala inkubace 30 minut ve tmě při 4 °C. Po inkubaci byly vzorky 2krát promyty 200 μ l PBS. Po promytí byly buňky resuspendovány v 200 μ l PBS a ke značení mrtvých buněk bylo přidáno 20 μ l fluorescenční barvy Hoechst 33258 (v koncentraci 1 μ g/ml, Sigma Aldrich).

Tabulka č. 1: Seznam použitých monoklonálních protilátek pro průtokovou cytometrii

Detekovaný znak	Klon protilátky	Konjugovaný fluorochrom	Použitá koncentrace (μ g/ml)	Výrobce	Značení
B220	RA3-6B2	PerCP-Cy5.5	4	BioLegend	povrchové
CD1d	1B1	PE	4	BioLegend	povrchové
CD3	17A2	APC	4	BioLegend	povrchové
CD4	GK 1.5	Alexa Fluor 700	10	BioLegend	povrchové
CD5	53-73	Alexa Fluor 647	10	BioLegend	povrchové
CD8	53-6.7	PE	4	BioLegend	povrchové
CD11b	M1/70	APC	4	BioLegend	povrchové
CD14	Sa 14-2	PE	4	BioLegend	povrchové
CD19	6D5	FITC	10	BioLegend	povrchové
CD22	OX-97	Alexa Fluor 647	10	BioLegend	povrchové
CD23	B3B4	PE	4	BioLegend	povrchové
CD80	16-10A1	APC	4	BioLegend	povrchové
CD86	(B7-2) (GL1)	PE	4	PharMingen	povrchové
CD93	AA4.1	APC	4	BioLegend	povrchové
F4/80	BM8	PE	4	BioLegend	povrchové
IL-10	JES5-16E3	APC	2,9	eBioscience	intracelulární

U B lymfocytů stimulovaných LPS a cytokiny byl kromě povrchových znaků měření intracelulární IL-10. Ve 24jamkové destičce byly B lymfocyty inkubovány 48 hodin s LPS a cytokiny. Pro měření intracelulárního cytokinu musí být nejdříve provedena restimulace buněk a zablokování transportu pomocí 0,5 µg/ml ionomycinu (eBioscience, Aachen, Německo), 20 ng/ml forbol-12-myristát-13-acetátu (eBioscience) a 7,5 µg/ml brefeldinu A (eBioscience) po dobu 4,5 hodiny při 37 °C. Poté byly buňky přeneseny do kultivační destičky s kulatým dnem (Nunc) a 2krát promyty 200 µl PBS. V roztoku Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) ředěného 1 : 1000 v PBS (značení mrtvých buněk) byly naředěny protilátky v koncentraci dle Tabulky č. 1 a po 10 µl přidávány k resuspendovaným peletám buněk. Destička byla 30 minut inkubována ve tmě při 4 °C. Poté byly vzorky 2krát promyty PBS a centrifugovány (3 minuty, 140 g). Po resuspendování pelety buněk bylo přidáno 100 µl IC fixačního pufru (eBioscience) a destička byla inkubována 30 minut ve tmě při 20 °C. Po inkubaci byly vzorky 2krát promyty 200 µl permeabilizačního roztoku (eBioscience) a centrifugovány (4 minuty, 270 g). Po promytí buněk byla peleta resuspendována a bylo přidáno 10 µl roztoku protilátky anti-IL-10 (eBioscience) naředěné v permeabilizačním roztoku. Vzorky byly inkubovány 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Následně byly centrifugovány (4 minuty, 270 g) a 2krát promyty PBS. Buňky byly resuspendovány v 200 µl PBS.

Všechny vzorky byly měřeny pomocí cytometru LSR II (BD).

5.10. Mikroskopie

Za účelem ověření fenotypu adherentních peritoneálních buněk byly připraveny fluorescenčně značené mikroskopické preparáty.

Na krycí mikroskopická sklíčka potažená vrstvou poly-L-lysinu (Sigma Aldrich) a umístěná do 24jamkové destičky byl nanesen 1 ml suspenze peritoneálních buněk (z koncentrace $0,8 \times 10^6$ buněk/ml). Peritoneální buňky byly kultivovány 24 hodin při 37 °C. Po inkubaci byly neadherentní peritoneální buňky odmyty kompletním 5% RPMI 1640 médiem nahřátým na 37 °C. Adherentní peritoneální buňky byly 60 minut fixovány ve 4% paraformaldehydu (Sigma Aldrich) při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla sklíčka promyta v PBS. V dalším kroku byla sklíčka inkubována 20 minut v blokačním a permeabilizačním roztoku. Následně byla 6krát promyta PBS. Fixované buňky byly 120 minut inkubovány ve tmě ve 20 µl roztoku protilátky anti-F4/80 (z koncentrace 4 µg/ml, BioLegend) značené PE při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla sklíčka 3krát promyta PBS a

montována na podložní sklíčko roztokem Mowiol 4-88 Reagent (Calbiochem, San Diego, CA) s 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole).

5.11. Detekce cytokinů ELISA testem

5.11.1. Příprava supernatantů pro detekci cytokinů

Pomocí ELISA testu byla stanovována produkce cytokinů IL-6, IL-10 a IL-17. V případě měření IL-6 byly ve 24jamkové destičce (TPP) inkubovány v celkovém objemu 1000 μ l kompletního 10% RPMI 1640 média adherentní peritoneální buňky s LPS (v koncentraci 5 μ g/ml). Tyto buňky byly před stimulací LPS opůsobeny stimulovanými B lymfocyty v poměru 1 : 1. Po 48 hodinách byly z kultury odebrány supernatanty a zamraženy v - 20 °C.

Produkce IL-10 byla měřena v kultuře stimulovaných B lymfocytů. V 96jamkové destičce (Nunc) bylo v celkovém objemu 160 μ l kompletního 10% RPMI 1640 média kultivováno 80 μ l B lymfocytů (z koncentrace 2×10^6 buněk/ml) s roztokem cytokinů (v koncentraci dle kapitoly 5.7.) a LPS (v koncentraci 10 μ g/ml). Po 72 hodinách kultivace při 37 °C byly z kultury odebrány supernatanty a zamraženy při - 20 °C.

Produkce IL-17 byla měřena v kultuře stimulovaných T lymfocytů. V 96jamkové destičce (Nunc) bylo v celkovém objemu 200 μ l kompletního 10% RPMI 1640 média kultivováno 100 μ l T lymfocytů (z koncentrace $1,5 \times 10^6$ buněk/ml) s ConA (v koncentraci 1 μ g/ml) a ovlivněnými adherentními peritoneálními buňkami. Po 72 hodinách byly z kultury odebrány supernatanty a zamraženy při - 20 °C.

5.11.2. ELISA

Koncentrace IL-6 v supernatantu byla detekována následujícím postupem. Vysokoadsorbční 96jamková destička (Costar, Cambridge, MA) byla potažena 50 μ l primární protilátky anti-IL-6 (z koncentrace 2,2 μ g/ml, Pharmigen, San Diego, CA) naředěné v NaHCO₃ (z koncentrace 0,1M, pH 8,2, Sigma Aldrich) přes noc při 4 °C. Po inkubaci byla destička 3krát promyta promývacím roztokem (0,5% Tween-20 v PBS) a zablokována 250 μ l blokovacího roztoku (7,5% FCS v PBS) po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Destička byla 3krát promyta promývacím roztokem, bylo přidáno 100 μ l analyzovaných vzorků včetně 100 μ l ředící řady standardu (Genzyme, Boston, MA). Destička byla

inkubována přes noc při 4 °C. Po inkubaci byla destička 4krát promyta promývacím roztokem, do jamek bylo přidáno 100 µl sekundární biotinylované protilátky anti-IL-6 (z koncentrace 1,1 µg/ml, Pharmigen) v blokovacím roztoku s následnou inkubací 1 hodinu při laboratorní teplotě. Destička byla 6krát promyta, bylo přidáno 100 µl avidin peroxidázy (z koncentrace 2,5 µg/ml, Sigma Aldrich) v blokovacím roztoku a byla inkubována 45 minut při laboratorní teplotě. Následně byla destička 8krát promyta a bylo přidáno 100 µl roztoku substrátu (120 mg 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonové kyseliny (Sigma Aldrich), 7,68 g kyseliny citronové (Sigma Aldrich), 400 ml H₂O, 11 µl 30% H₂O₂ (Sigma Aldrich), pH upraveno na 4,35). Vzorky byly měřeny na spektrofotometru Sunrise (Tecan) pomocí měřicího (405 nm) a referenčního (630 nm) filtru.

Produkce IL-10 a IL-17 byla měřena pomocí DuoSet ELISA testu (R&D Systems, Mineapolis, MN). Na vysokoadsorbční 96jamkovou destičku (Costar) bylo nanášeno 100 µl primární protilátky anti-IL-10 (z koncentrace 4 ng/ml, R&D Systems) nebo anti-IL-17 (z koncentrace 2 µg/ml, R&D Systems) s následnou inkubací přes noc při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla destička 3krát promyta promývacím roztokem a zablokována 250 µl blokovacího roztoku (1% BSA v PBS) po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla destička 3krát promyta promývacím roztokem a bylo přidáno 100 µl analyzovaných vzorků a 100 µl ředící řady standardu (R&D Systems). Destička byla inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla destička 3krát promyta promývacím roztokem, do jamek bylo přidáno 100 µl sekundární biotinylované protilátky anti-IL-10 (z koncentrace 0,3 µg/ml, R&D Systems) nebo anti-IL-17 (z koncentrace 0,4 µg/ml, R&D Systems) v blokovacím roztoku a inkubováno 2 hodiny při laboratorní teplotě. Destička byla 3krát promyta, bylo přidáno 100 µl streptavidin peroxidázy (ředěné 1 : 200 v blokovacím roztoku, R&D Systems) a destička byla inkubována 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Následně byla destička 3krát promyta a bylo přidáno 100 µl substrátu (H₂O₂ a tetramethylbenzidín v poměru 1 : 1). Destička byla inkubována 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Reakce byla zastavena 50 µl inhibičního roztoku (z koncentrace 2N H₂SO₄, PENTA, Praha, Česká republika) a vzorky byly měřeny na spektrofotometru Sunrise (Tecan) pomocí měřicího (450 nm) a referenčního (550 nm) filtru.

5.12. Izolace RNA a reverzní transkripce

5.12.1. Příprava buněk na stanovení genové exprese

Genová exprese FasL a PD-L1 byla měřena v kultuře stimulovaných B lymfocytů. V 96jamkové destičce (Nunc) bylo v celkovém objemu 160 μ l kompletního 10% RPMI 1640 média kultivováno 80 μ l B lymfocytů (z koncentrace 2×10^6 buněk/ml) s roztokem cytokinů (v koncentraci dle kapitoly 5.7.) a LPS (v koncentraci 10 μ g/ml). Po 48 hodinách kultivace při 37 °C byly buňky z kultury odebrány do 500 μ l TRI REAGENT činidla (Molecular Research Center, Cincinnati, ME) a 3,5 μ l roztoku Polyacryl carrier (Molecular Research Center) a zamraženy na - 80 °C.

V případě měření genové exprese IL-1 α byly ve 24jamkové destičce (TPP) v celkovém objemu 1000 μ l kompletního 10% RPMI média inkubovány adherentní peritoneální buňky s LPS (v koncentraci 5 μ g/ml). Adherentní peritoneální buňky byly před stimulací LPS kultivovány různě stimulovanými B lymfocyty v poměru 1 : 1. Po 48 hodinách byly buňky z kultury odebrány do 500 μ l TRI REAGENT činidla (Molecular Research Center) a 3,5 μ l roztoku Polyacryl carrier (Molecular Research Center) a zamraženy na - 80 °C.

5.12.2. Izolace RNA

Ribonukleová kyselina (RNA, *ribonucleic acid*) byla izolována podle následujícího postupu. K roztoku 500 μ l TRI REAGENT činidla (Molecular Research Center) a 3,5 μ l roztoku Polyacryl carrier (Molecular Research Center) bylo přidáno 100 μ l chloroformu (PENTA). Směs byla důkladně promíchána, 10 minut inkubována při laboratorní teplotě a centrifugována (15 minut, 12000 g, 4 °C). Horní vodná fáze byla odebrána do nové mikrozkuhavky a bylo přidáno stejné množství izopropanolu (PENTA). Směs byla promíchána, 10 minut inkubována při laboratorní teplotě a centrifugována (10 minut, 12000 g, 4 °C). Peleta byla promyta v 500 μ l 75% etanolu (PENTA) a centrifugována (5 minut, 1610 g). Po centrifugaci byl odsát supernatant, peleta byla vysušena při laboratorní teplotě a následně resuspendována v 10 μ l PCR vody (*polymerase chain reaction*, Top-Bio, Praha, Česká republika). Vzorky byly zamraženy na - 80 °C.

5.12.3. Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepsána do komplementární DNA (cDNA, *complementary DNA*) podle následujícího postupu. 1 µg RNA byl doplněn do celkového objemu 8 µl PCR vodou (Top-Bio) a k roztoku byly přidány 2 µl směsi reakčního pufru DNase I (Promega, Madison, WI) a DNázy I (z koncentrace 1 U/µl, Promega) v poměru 1 : 1. Vzorky byly inkubovány 30 minut v cykleru při 37 °C. K vzorkům byl přidán 1 µl roztoku RQ1 DNase Stop Solution (Promega) a byly zahřáty 10 minut v cykleru při 65 °C. Vzorky byly schlazeny na ledu a bylo přidáno 14 µl mixu složeného z 5 µl M-MLV Reaction Buffer (Promega), 5 µl dNTP (z koncentrace 40mM, Promega), 1 µl Random primerů (z koncentrace 100 ng/µl, Promega), 0,5 µl inhibitoru ribonukleáz (z koncentrace 40 U/µl, Promega), 0,5 µl reverzní transkriptázy M-MLV (z koncentrace 200 U/µl, Promega) a 2 µl PCR vody (Top-Bio). Přepsání RNA do formy cDNA probíhalo v cykleru po dobu 60 minut při 37 °C.

5.13. RT-PCR

Připravená cDNA byla dále analyzována pomocí RT-PCR. Relativní genová exprese byla stanovena vzhledem k referenčnímu genu glyceraldehyd dehydrogenázy (GAPDH, *glyceraldehyde dehydrogenase*). Primery použité pro RT-PCR jsou uvedeny v Tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Seznam použitých primerů pro RT-PCR

Primer	Sekvence
GAPDH S	5'-AGAACATCATCCCTGCATCC-3'
GAPDH A	5'-ACATTGGGGGTAGGAACAC-3'
FasL S	5'-TGGGTAGACAGCAGTGCCAC-3'
FasL A	5'-GCCCACAAGATGGACAGGG-3'
IL-1α S	5'-TTGGTTAAATGACCTGCAACA-3'
IL-1α A	5'-GAGCGCTCACGAACAGTTG-3'
PD-L1 S	5'-CTACGGTGGTGCGGACTACA-3'
PD-L1 A	5'-CATGCTCAGAAGTGGCTGGAT-3'

S – sense, A – antisense

K přepsané cDNA bylo přidáno v 50 µl PCR vody (Top-Bio). Do 96jamkové destičky pro PCR (Life Technologies) bylo přeneseno 7 µl mixu složeného z 1 µl PCR vody (Top-Bio), 1 µl sense a antisense primerů (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika)

a 5 μ l roztoku Power SYBR Green PCR master MIX (Applied Biosystems), dále byly přidány 3 μ l cDNA testovaného vzorku.

PCR reakce proběhla na cykleru StepOne Plus RT-PCR a její nastavení bylo:

- denaturace 3 minuty při 95 °C
- 40krát opakovaný cyklus – denaturace 20 sekund při 95 °C, hybridizace 30 sekund při 60 °C, elongace 30 sekund při 72 °C, načítání fluorescence 5 sekund při 78 °C
- analýza křivek tání zvyšováním teploty o 0,5 °C každých 10 sekund při 55 °C až 95 °C

Specifita primerů byla ověřována pomocí křivek tání a k výpočtu exprese genu sloužil relativní model kvantifikace v porovnání s genem GAPDH.

5.14. Průkaz funkční aktivity stimulovaných B lymfocytů

Ve 24jamkové destičce (TPP) bylo v celkovém objemu 2000 μ l kompletního 10% RPMI 1640 média inkubováno 1000 μ l B lymfocytů (z koncentrace 2×10^6 buněk/ml) s roztokem cytokinů (v koncentraci dle kapitoly 5.7.) a LPS (v koncentraci 10 μ g/ml) při 37 °C. Po 48 hodinách byly B lymfocyty převedeny do zkumavek, které byly doplněny kompletním 5% RPMI 1640 médiem a centrifugovány (8 minut, 170 g). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, pelety byly resuspendovány v kompletním 10% RPMI 1640 médiu a koncentrace buněk byla stanovena pomocí Bürkerovy komůrky. V 96jamkové destičce (Nunc) bylo v celkovém objemu 200 μ l kompletního 10% RPMI 1640 média kultivováno 100 μ l stimulovaných B lymfocytů (z koncentrace 2×10^6 buněk/ml) s adherentními peritoneálními buňkami (připravené dle kapitoly 5.5.3.) při 37 °C. Po 48hodinové inkubaci byly B lymfocyty odmyty kompletním 5% RPMI 1640 médiem nahřátým na 37 °C. Do 96jamkové destičky (Nunc) s ovlivněnými adherentními peritoneálními buňkami bylo přidáno 100 μ l T lymfocytů (z koncentrace $1,5 \times 10^6$ buněk/ml) značených CFSE a tato směs byla kultivována v celkovém objemu 200 μ l kompletního 10% RPMI 1640 média a stimulována ConA (v koncentraci 1 μ g/ml) po dobu 72 hodin při 37 °C. Po inkubaci byly T lymfocyty odebrány a byla měřena jejich proliferace pomocí průtokové cytometrie.

5.15. Statistická analýza

Presentovaná data jsou uváděna jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou (SD, *standard deviation*). Statistická signifikance byla stanovena pomocí Studentova t-testu nebo Studentova t-testu s využitím Welchovy korelace dle rozptylu daného souboru dat. Hodnoty $P \leq 0,05$ (*), $P \leq 0,01$ (**) a $P \leq 0,001$ (***) byly považovány za signifikantní.

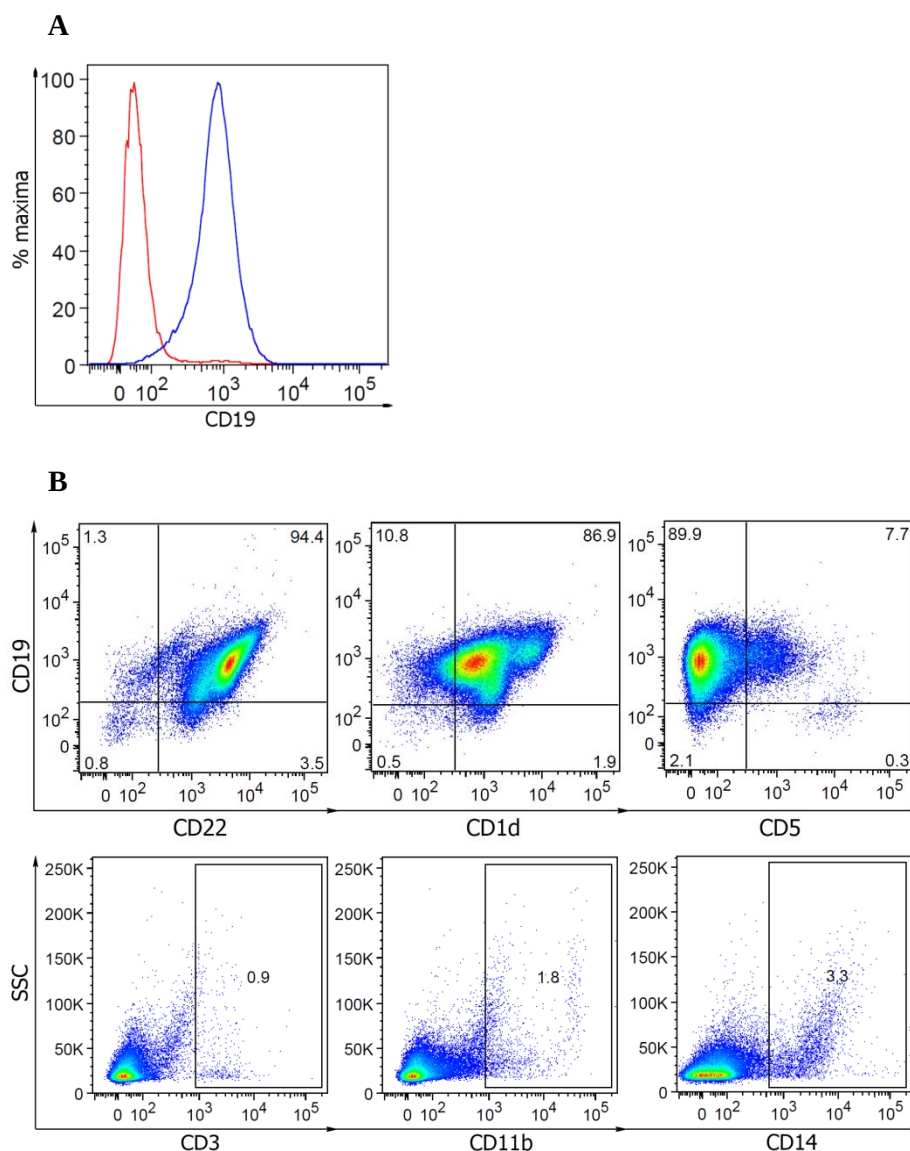
6. Výsledky

Dle literárních zdrojů byly vybrány cytokiny, které by mohly mít potenciální vliv na indukci Bregs, a to IL-4, IL-6, IL-12, IL-21, IFN- γ a TGF- β . Při prokazování funkční aktivity B lymfocytů stimulovaných LPS a cytokiny pomocí *in vitro* modelu proliferace aktivovaných T lymfocytů v přítomnosti makrofágů ovlivněných Bregs byl efekt IL-4 a IL-6 nevýznamný, proto tyto cytokiny nebyly používány v následných pokusech.

6.1. Fenotypová charakterizace izolovaných B lymfocytů

Separované B lymfocyty byly charakterizovány pomocí průtokové cytometrie za účelem určení fenotypu B lymfocytů izolovaných ze suspenze slezinných buněk pomocí magnetické separace.

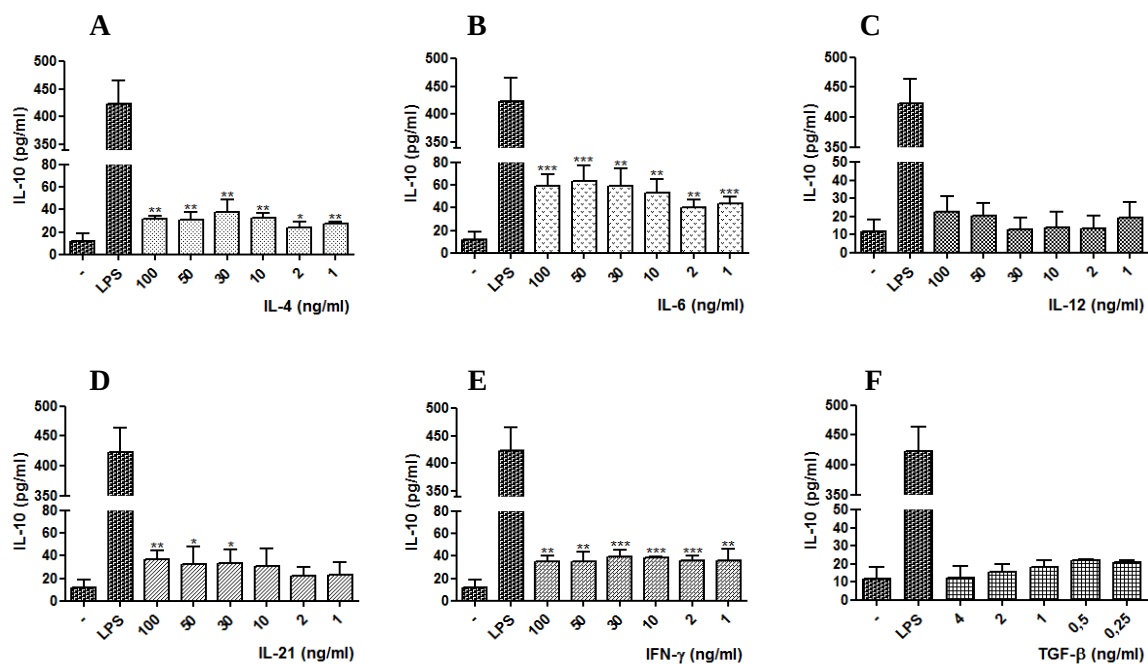
Bylo zjištěno, že populace separovaných B lymfocytů obsahovala > 97 % CD19⁺ buněk. Tato populace zahrnovala přibližně 94 % CD19⁺CD22⁺ buněk, 87 % CD19⁺CD1d⁺ buněk, 8 % CD19⁺CD5⁺ buněk, 0,9 % CD3⁺ buněk, 1,8 % CD11b⁺ buněk a 3,3 % CD14⁺ buněk (Obrázek č. 3).



Obrázek č. 3: Fenotypová charakterizace B lymfocytů. Čerstvě separované slezinné CD19⁺ buňky byly charakterizovány za účelem ověření účinnosti purifikace B lymfocytů (**A**). Dále byla analyzována přítomnost povrchových znaků CD22, CD1d, CD5, CD3, CD11b a CD14 na těchto buňkách (**B**). Uveden je jeden výsledek ze 3 nezávislých pokusů.

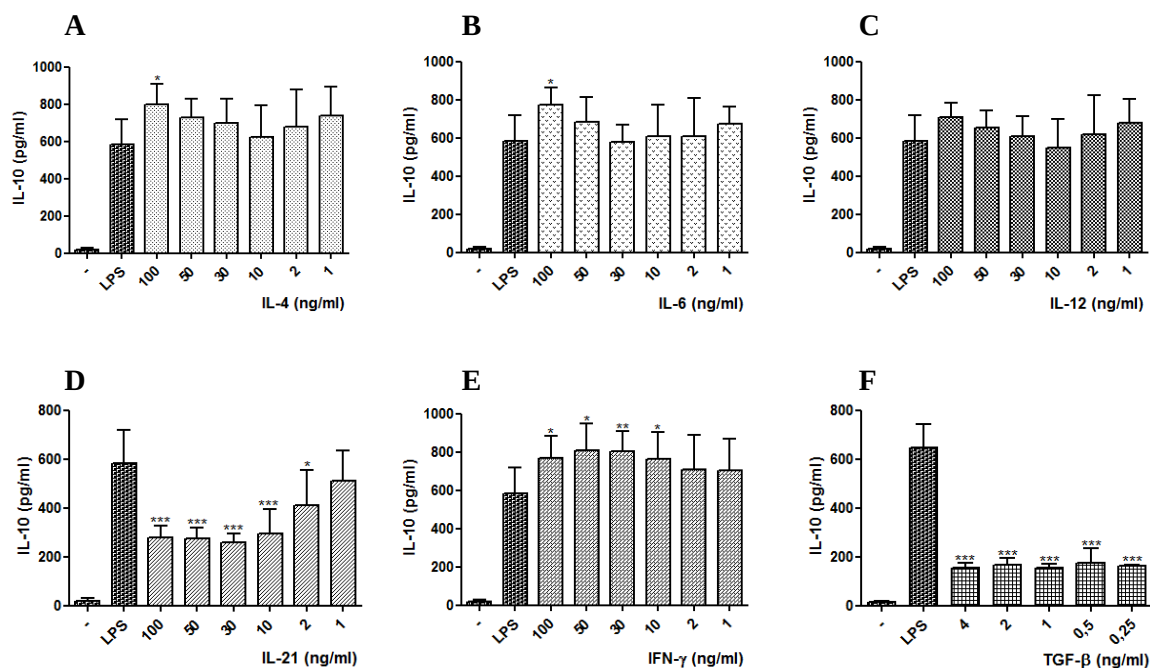
6.2. Efekt cytokinů na produkci IL-10 B lymfocyty

Separované B lymfocyty byly kultivovány 72 hodin samotné nebo v přítomnosti různých koncentrací cytokinů. Produkce IL-10 stimulovanými B lymfocyty byla měřena pomocí ELISA testu. Testované cytokiny kromě IL-12 a TGF- β signifikantně zvyšovaly produkci IL-10 B lymfocyty oproti nestimulovaným B lymfocytům (Obrázek č. 4). Stimulace LPS však vedla k řádově vyšší produkci IL-10 B lymfocyty oproti stimulaci pouze cytokiny.



Obrázek č. 4: Efekt různých koncentrací cytokinů na produkci IL-10 B lymfocyty. Separované B lymfocyty byly kultivovány 72 hodin v přítomnosti různých koncentrací IL-4 (**A**), IL-6 (**B**), IL-12 (**C**), IL-21 (**D**), IFN- γ (**E**) nebo TGF- β (**F**) a ELISA testem byla měřena produkce IL-10. Data představují aritmetické průměry + SD ze 2 nezávislých pokusů (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ oproti nestimulovaným B lymfocytům).

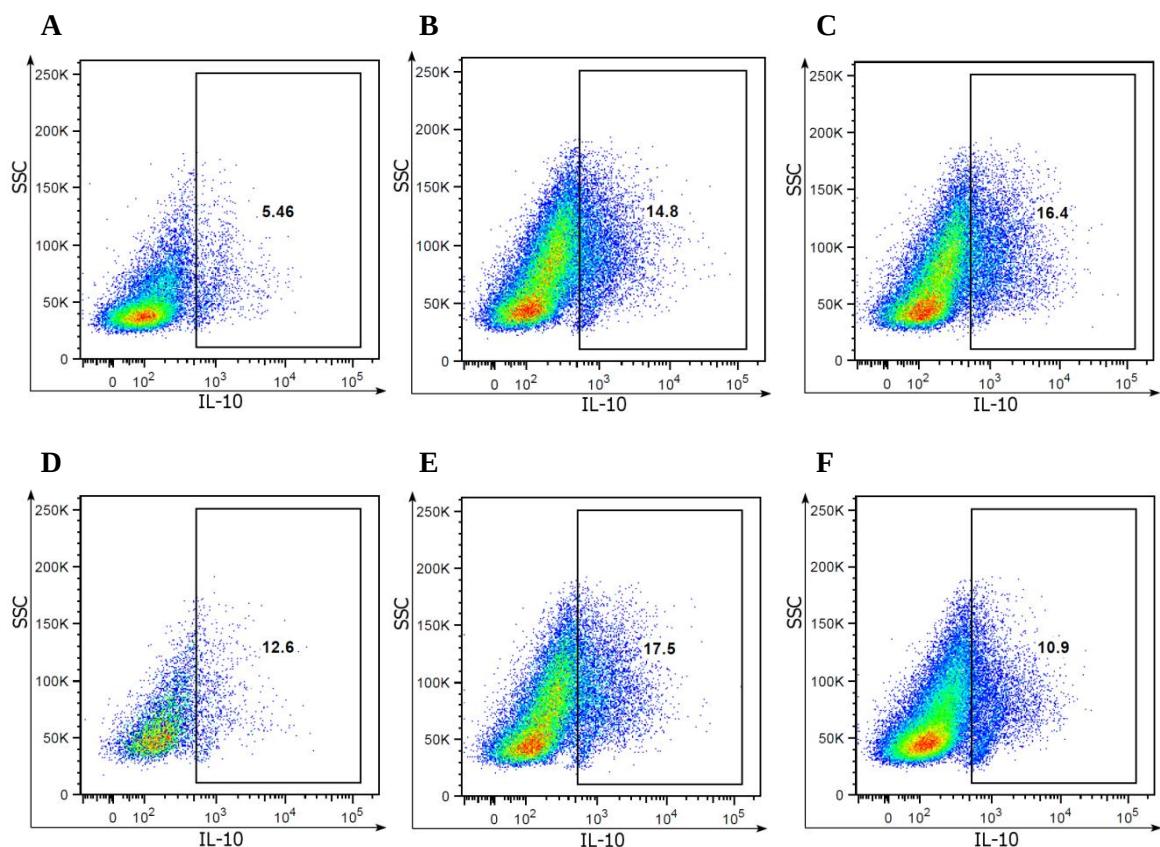
Separované B lymfocyty byly rovněž kultivovány 72 hodin v přítomnosti LPS a různých koncentrací cytokinů. Produkce IL-10 stimulovanými B lymfocyty byla měřena pomocí ELISA testu. Z testovaných cytokinů pouze IFN- γ signifikantně zvyšoval produkci IL-10 u B lymfocytů stimulovaných LPS. K signifikantnímu snížení produkce IL-10 B lymfocyty vedla stimulace LPS v přítomnosti IL-21 nebo TGF- β (Obrázek č. 5).



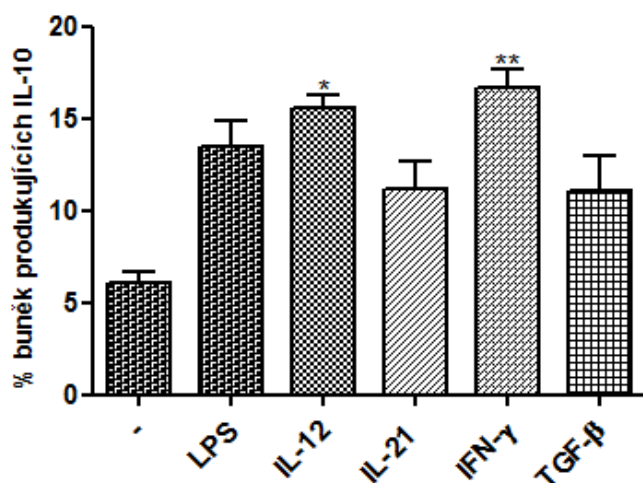
Obrázek č. 5: Efekt LPS a různých koncentrací cytokinů na produkci IL-10 B lymfocyty. Separované B lymfocyty byly kultivovány 72 hodin v přítomnosti LPS a IL-4 (A), IL-6 (B), IL-12 (C), IL-21 (D), IFN- γ (E) nebo TGF- β (F) a ELISA testem byla měřena produkce IL-10. Data představují aritmetické průměry + SD ze 2 nezávislých pokusů (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 oproti B lymfocytům stimulovaným LPS).

6.3. Efekt cytokinů na procento B lymfocytů produkujících IL-10

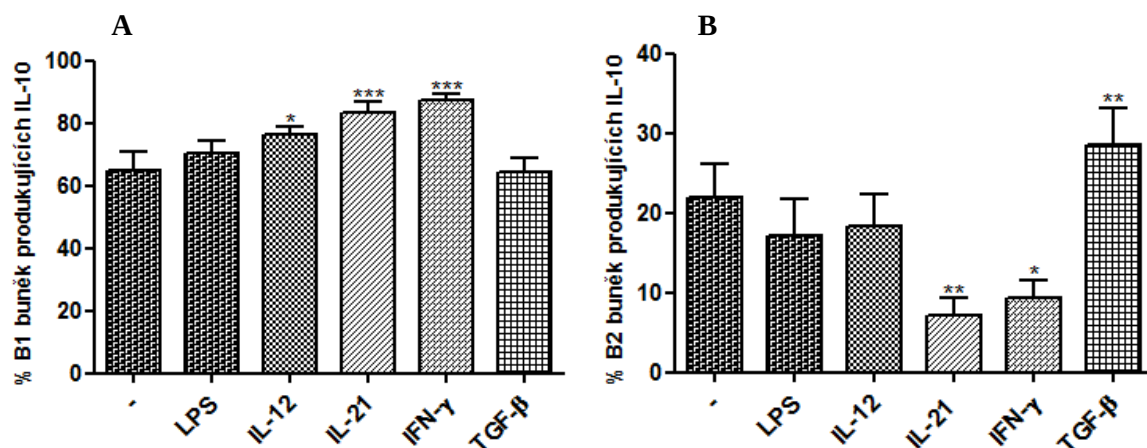
Separované B lymfocyty byly kultivovány 48 hodin v přítomnosti LPS a cytokinů. Procento B lymfocytů produkujících IL-10 bylo měřeno pomocí průtokové cytometrie a intracelulárního značení IL-10. Působení LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ vedlo k signifikantnímu zvýšení procenta B lymfocytů produkujících IL-10. Působení LPS v přítomnosti IL-21 nebo TGF- β vedlo ke snížení procenta B lymfocytů produkujících IL-10 (Obrázek č. 6 a Obrázek č. 7). Dále bylo měřeno procento B220⁺CD23⁻ B1 lymfocytů a B220⁺CD23⁺ B2 lymfocytů, které produkovaly IL-10 po stimulaci LPS a cytokiny (Obrázek č. 8).



Obrázek č. 6: Reprezentativní dotploty ukazující efekt LPS a cytokinů na procento B lymfocytů produkujících IL-10. Separované B lymfocyty byly kultivovány 48 hodin bez stimulace (A), v přítomnosti LPS (B) a v přítomnosti LPS a IL-12 (C), IL-21 (D), IFN- γ (E) nebo TGF- β (F). Procento B lymfocytů produkujících IL-10 bylo měřeno pomocí průtokové cytometrie. Uveden je jeden výsledek ze 3 nezávislých pokusů.



Obrázek č. 7: Efekt LPS a cytokinů na procento B lymfocytů produkujících IL-10. Separované B lymfocyty byly kultivovány 48 hodin v přítomnosti LPS a cytokinů, procento B lymfocytů produkujících IL-10 bylo měřeno pomocí průtokové cytometrie. Data představují aritmetické průměry + SD ze 3 nezávislých pokusů (*P < 0,05; **P < 0,01 oproti B lymfocytům stimulovaným LPS).

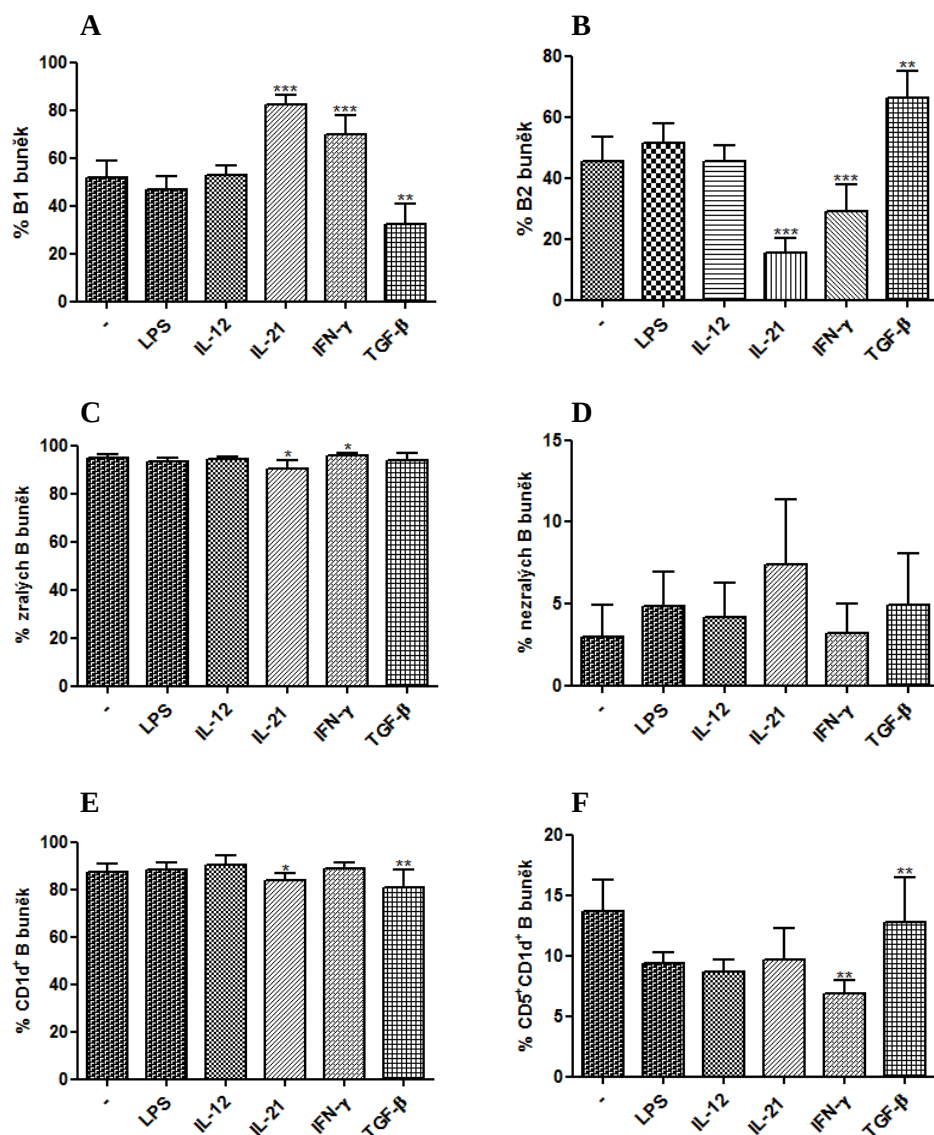


Obrázek č. 8: Efekt LPS a cytokinů na procentuální zastoupení B1 a B2 lymfocytů produkujících IL-10. Separované B lymfocyty byly kultivovány 48 hodin v přítomnosti LPS a cytokinů, procento B220⁺CD23⁻ B1 lymfocytů produkujících IL-10 (A) nebo B220⁺CD23⁺ B2 lymfocytů produkujících IL-10 (B) bylo měřeno pomocí průtokové cytometrie. Data představují aritmetické průměry + SD ze 3 nezávislých pokusů (*P < 0,05; **P < 0,01 oproti B lymfocytům stimulovaným LPS).

6.4. Fenotyp stimulovaných B lymfocytů

Separované B lymfocyty byly kultivovány 48 hodin v přítomnosti LPS a cytokinů. Následně byly fenotypově charakterizovány pomocí průtokové cytometrie za účelem určení vlivu stimulace LPS a daným cytokinem na expresi povrchových znaků B lymfocytů.

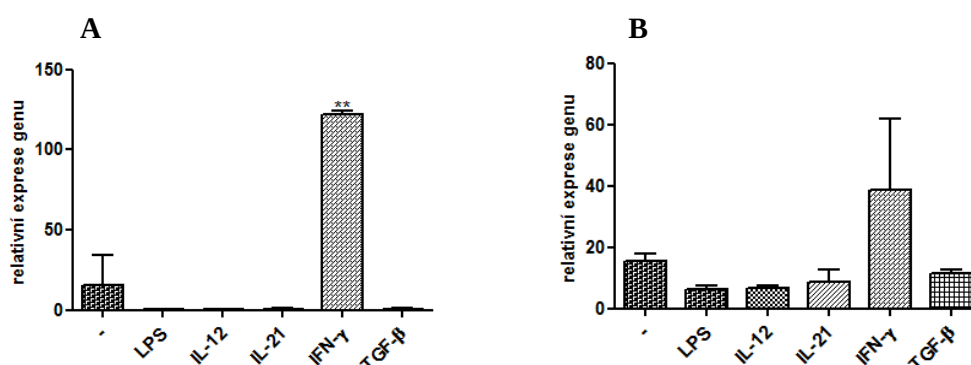
Působení LPS v přítomnosti IL-21 nebo IFN-γ vedlo k signifikantnímu zvýšení procenta B220⁺CD23⁻ B1 lymfocytů, působení LPS v přítomnosti TGF-β vedlo k signifikantnímu snížení procenta B1 lymfocytů oproti B lymfocytům stimulovaným pouze LPS (Obrázek č. 9). Po stimulaci LPS v přítomnosti IL-21 nebo IFN-γ došlo k signifikantnímu snížení procenta B220⁺CD23⁺ B2 lymfocytů, po stimulaci LPS v přítomnosti TGF-β došlo k signifikantnímu zvýšení procenta B2 lymfocytů oproti B lymfocytům stimulovaným LPS. Působením LPS v přítomnosti IL-21 na B lymfocyty došlo k signifikantnímu snížení podílu zralých B220⁺CD93⁺ B lymfocytů a vlivem LPS v přítomnosti IFN-γ na B lymfocyty došlo k signifikantnímu zvýšení procenta těchto buněk oproti B lymfocytům stimulovaným pouze LPS. Působení LPS v přítomnosti IL-21 nebo TGF-β vedlo k signifikantnímu snížení procenta CD1d⁺ B lymfocytů oproti kontrole. Po stimulaci LPS v přítomnosti IFN-γ došlo k signifikantnímu snížení podílu CD5⁺CD1d⁺ B lymfocytů a naopak po stimulaci LPS v přítomnosti TGF-β došlo k signifikantnímu zvýšení procenta těchto B lymfocytů oproti B lymfocytům stimulovaným LPS (Obrázek č. 9).



Obrázek č. 9: Efekt LPS a cytokinů na fenotyp B lymfocytů. Separované B lymfocyty byly kultivovány 48 hodin v přítomnosti LPS a cytokinů a byly charakterizovány pomocí průtokové cytometrie. V populaci CD19⁺ B lymfocytů bylo určeno procento B220⁺CD23⁻ B1 lymfocytů (**A**), B220⁺CD23⁺ B2 lymfocytů (**B**), zralých B220⁺CD93⁺ B lymfocytů (**C**), nezralých B220⁺CD93⁻ B lymfocytů (**D**), CD1d⁺ B lymfocytů (**E**) a CD5⁺CD1d⁺ B lymfocytů (**F**). Data představují aritmetické průměry + SD ze 3 nezávislých pokusů (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 oproti B lymfocytům stimulovaným LPS).

6.5. Efekt cytokinů na expresi genů pro FasL a PD-L1 ve stimulovaných B lymfocytech

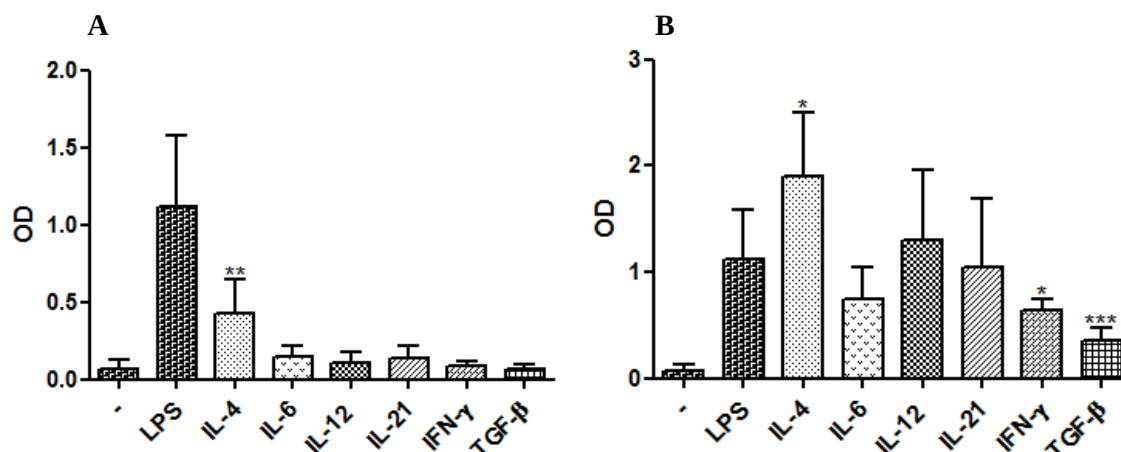
Separované B lymfocyty byly kultivovány 48 hodin v přítomnosti LPS a cytokinů. Genová exprese FasL a PD-L1 molekul byla měřena pomocí RT-PCR. Stimulace pomocí LPS v přítomnosti IFN- γ u B lymfocytů zvyšovala genovou expresi FasL a PD-L1. Stimulace LPS a ostatními cytokiny neovlivnila genovou expresi testovaných inhibičních povrchových molekul (Obrázek č. 10).



Obrázek č. 10: Efekt LPS a cytokinů na expresi genů v B lymfocytech. Separované B lymfocyty byly kultivovány 48 hodin v přítomnosti LPS a cytokinů a pomocí RT-PCR byla měřena relativní exprese genu pro FasL (A) a PD-L1 (B). Data představují aritmetické průměry + SD ze 3 nezávislých pokusů (**P < 0,01 oproti B lymfocytům stimulovaným LPS).

6.6. Efekt cytokinů na proliferaci B lymfocytů

Proliferace B lymfocytů stimulovaných cytokiny nebo LPS a cytokiny byla měřena proliferčním testem využívajícím WST-1 činidlo. Kultivace buněk s IL-4 signifikantně zvyšovala proliferaci B lymfocytů oproti nestimulovaným B lymfocytům. V dalším pokusu byly B lymfocyty kultivovány společně s LPS a cytokiny. Stimulace LPS v přítomnosti IL-4 signifikantně zvyšovala proliferaci B lymfocytů, stimulace LPS v přítomnosti IFN- γ nebo TGF- β proliferaci B lymfocytů signifikantně snižovala oproti B lymfocytům stimulovaným LPS (Obrázek č. 11).

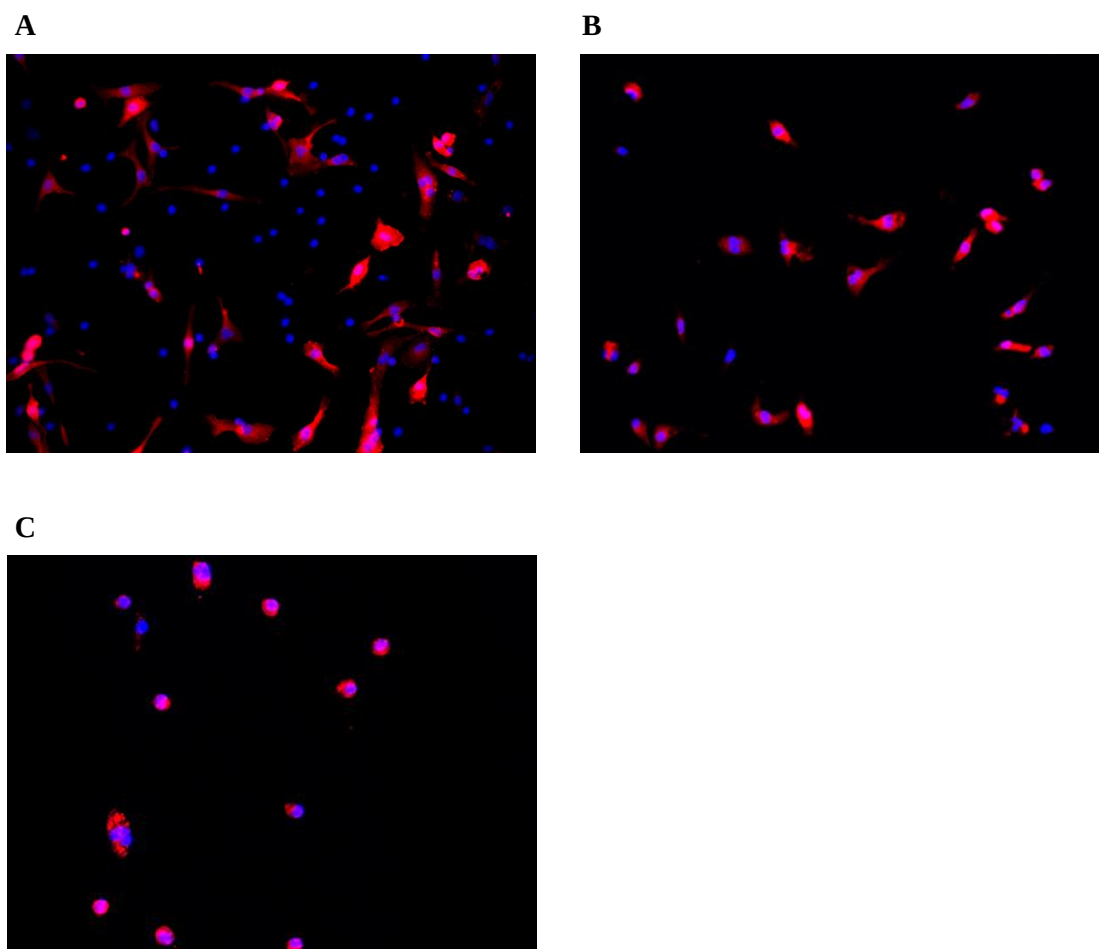


Obrázek č. 11: Efekt cytokinů nebo LPS a cytokinů na proliferaci B lymfocytů. Separované B lymfocyty byly kultivovány 72 hodin s cytokiny (**A**) nebo LPS a cytokiny (**B**), jejich proliferace byla měřena proliferčním testem využívajícím WST-1 činidlo. Data představují aritmetické průměry + SD ze 3 nezávislých pokusů. Hodnoty B lymfocytů stimulovaných cytokiny jsou srovnávány s nestimulovanými B lymfocyty, hodnoty B lymfocytů stimulovaných LPS a cytokiny jsou srovnávány s B lymfocyty stimulovanými LPS (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

6.7. Charakterizace adherentních peritoneálních buněk

Postup přípravy adherentních peritoneálních buněk dokumentují fluorescenčně značené mikroskopické preparáty. Byly připraveny 3 typy preparátů představující 3 hlavní kroky přípravy adherentních peritoneálních buněk: peritoneální buňky před oplachem neadherentních peritoneálních buněk, dále adherentní peritoneální buňky po oplachu neadherentních peritoneálních buněk a adherentní peritoneální buňky po působení stimulovaných B lymfocytů.

Buňky získané výplachem peritoneální dutiny byly kultivovány po dobu 24 hodin, následně fixovány a značeny (Obrázek č. 12A). Dále byly tyto buňky opláchnuty od neadherentních peritoneálních buněk, fixovány a značeny (Obrázek č. 12B). Adherentní peritoneální buňky byly kultivovány po dobu 48 hodin s B lymfocyty stimulovanými LPS, po inkubaci byly B lymfocyty odmyty, adherentní peritoneální buňky byly fixovány a značeny (Obrázek č. 12C). Buňky byly barveny DAPI, která značí buněčná jádra, a protilátkou proti F4/80 molekule, která představuje znak makrofágů (Austyn and Gordon 1981).



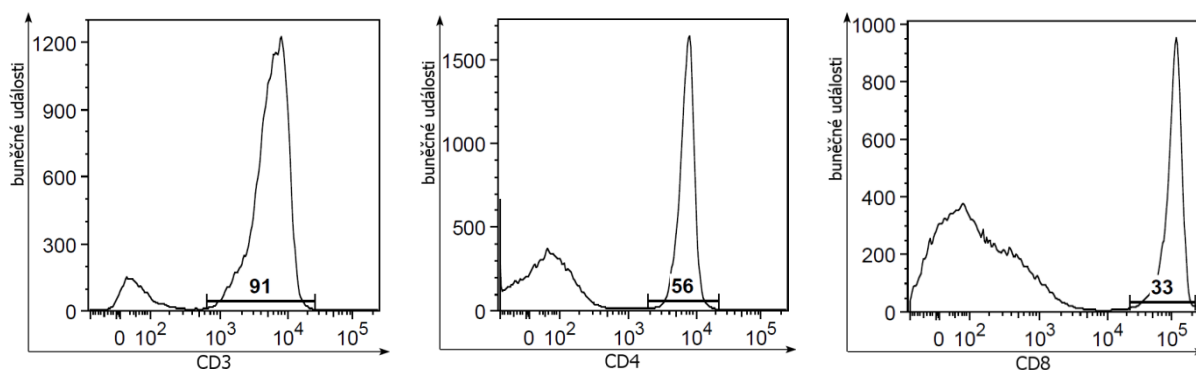
Obrázek č. 12: Charakterizace peritoneálních buněk. Buňky získané výplachem peritoneální dutiny byly kultivovány 24 hodin (**A**) a po oplachu byla získána populace adherentních peritoneálních buněk (**B**). Adherentní peritoneální buňky byly kultivovány 48 hodin s B lymfocyty stimulovanými LPS a následně byly B lymfocyty odmyty (**C**). Buňky byly značeny DAPI (modrá) a protilátkou proti F4/80 molekule (červená). Zvětšení 400×.

6.8. Průkaz funkční aktivity stimulovaných B lymfocytů

6.8.1. Fenotyp T lymfocytů

Separované T lymfocyty byly charakterizovány pomocí průtokové cytometrie k ověření účinnosti jejich separace ze suspenze slezinných buněk pomocí separace na nylonové vatě.

Bylo zjištěno, že populace separovaných T lymfocytů obsahovala přibližně 91 % CD3⁺ buněk, 56 % CD4⁺ buněk a 33 % CD8⁺ buněk (Obrázek č. 13).



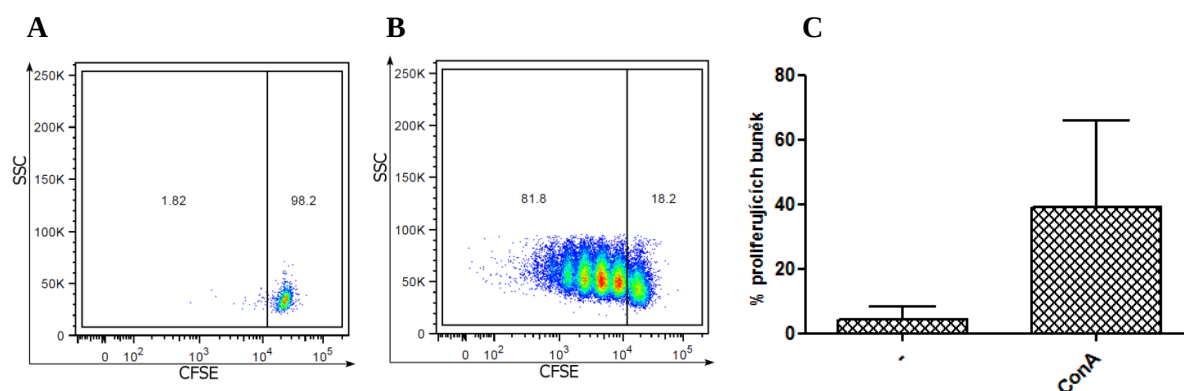
Obrázek č. 13: Fenotypová charakterizace T lymfocytů. T lymfocyty separované na nylonové vatě byly charakterizovány za účelem ověření účinnosti separace. Byla analyzována přítomnost povrchových znaků CD3, CD4 a CD8 na suspenzi T lymfocytů. Uveden je jeden výsledek ze 3 nezávislých pokusů.

6.8.2. Vliv ovlivněných makrofágů na proliferaci T lymfocytů

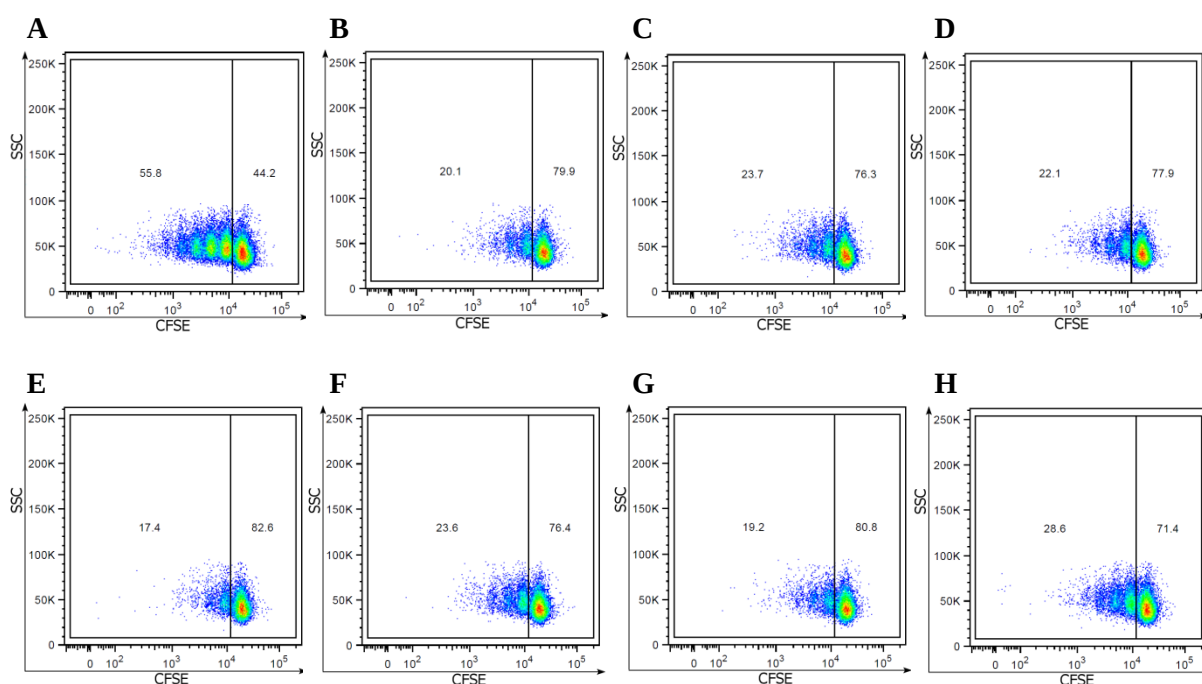
Funkční aktivita stimulovaných B lymfocytů byla zjišťována pomocí *in vitro* modelu proliferace aktivovaných T lymfocytů v přítomnosti adherentních peritoneálních buněk ovlivněných Bregs. Adherentní peritoneální buňky byly ovlivněny stimulovanými B lymfocyty. A následně tyto adherentní peritoneální buňky působily na T lymfocyty značené CFSE a stimulované ConA. Po 72 hodinách kultivace byla měřena proliferace T lymfocytů průtokovou cytometrií na základě snižování intenzity fluorescence CFSE.

Samotné neovlivněné adherentní peritoneální buňky nestimulovaly T lymfocyty k proliferaci. K proliferaci T lymfocytů byla nezbytná současná stimulace pomocí ConA. Populace T lymfocytů s nejvyšší intenzitou fluorescence představuje populaci T lymfocytů, která neproliferovala, každá následující populace s nižší intenzitou fluorescence CFSE znázorňuje jedno rozdělení původní buňky (Obrázek č. 14).

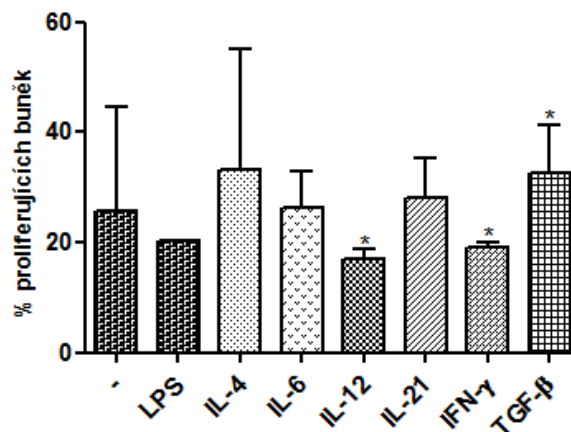
Adherentní peritoneální buňky ovlivněné různě stimulovanými B lymfocyty působily rozdílně na proliferaci T lymfocytů značených CFSE. Působení B lymfocytů stimulovaných LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ na adherentní peritoneální buňky vedlo k následnému signifikantnímu snížení proliferace T lymfocytů. Naopak působení B lymfocytů stimulovaných LPS v přítomnosti TGF- β na adherentní peritoneální buňky vedlo k signifikantnímu zvýšení proliferace T lymfocytů (Obrázek č. 15 a Obrázek č. 16). Intenzita fluorescence CFSE byla pro statistickou analýzu korelována ke kontrolním B lymfocytům stimulovaným pouze LPS, pro následnou analýzu pomocí Studentova t-testu byla použita Welchova korelace.



Obrázek č. 14: Vliv neovlivněných adherentních peritoneálních buněk na proliferaci T lymfocytů. T lymfocyty značené CFSE byly kultivovány 72 hodin s neovlivněnými adherentními peritoneálními buňkami v nepřítomnosti (A) nebo přítomnosti (B) ConA. Populace T lymfocytů s nejvyšší intenzitou fluorescence CFSE představuje neproliferující T lymfocyty. Stimulace pomocí ConA je nezbytná k proliferaci T lymfocytů (C). Data představují aritmetické průměry + SD a je uveden jeden výsledek z 5 nezávislých pokusů.



Obrázek č. 15: Reprezentativní dotploty ukazující vliv adherentních peritoneálních buněk ovlivněných různě stimulovanými B lymfocyty na proliferaci T lymfocytů v přítomnosti ConA. T lymfocyty značené CFSE byly kultivovány 72 hodin s ovlivněnými adherentními peritoneálními buňkami za současné stimulace ConA. Proliferace T lymfocytů byla měřena pomocí průtokové cytometrie na základě snižování intenzity fluorescence CFSE. Adherentní peritoneální buňky byly ovlivňovány nestimulovanými B lymfocyty (A), B lymfocyty stimulovanými LPS (B) nebo B lymfocyty stimulovanými LPS a IL-4 (C), IL-6 (D), IL-12 (E), IL-21 (F), IFN- γ (G) nebo TGF- β (H). Uveden je jeden výsledek z 5 nezávislých pokusů.

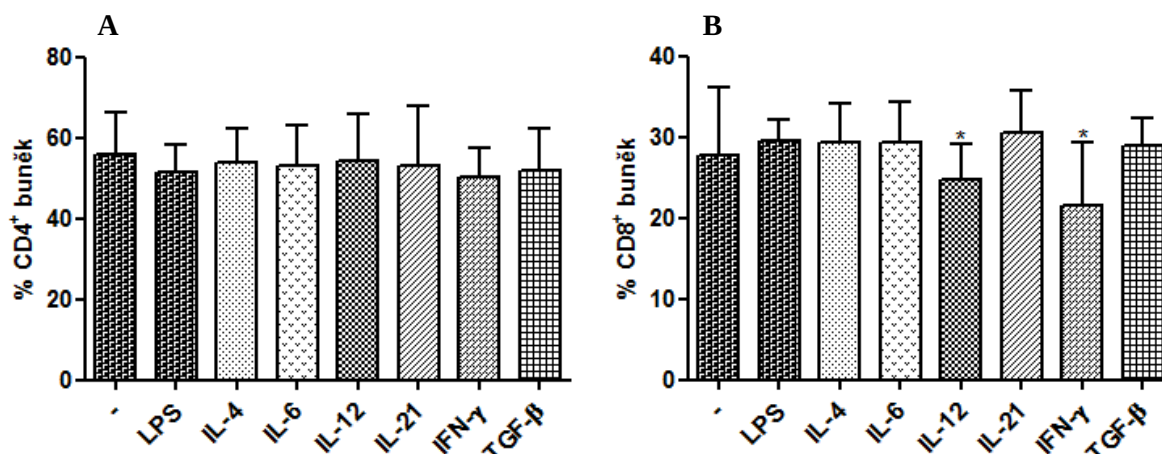


Obrázek č. 16: Vliv adherentních peritoneálních buněk ovlivněných různě stimulovanými B lymfocyty na proliferaci T lymfocytů v přítomnosti ConA. T lymfocyty značené CFSE byly kultivovány 72 hodin s ovlivněnými adherentními peritoneálními buňkami za současné stimulace ConA. Proliferace T lymfocytů byla měřena pomocí průtokové cytometrie na základě snižování intenzity fluorescence CFSE. Data představují aritmetické průměry + SD z 5 nezávislých pokusů (*P < 0,05 oproti B lymfocytům stimulovaným LPS).

6.8.3. Fenotyp proliferujících T lymfocytů

Funkční aktivita stimulovaných B lymfocytů byla zjišťována pomocí tlumení proliferace aktivovaných T lymfocytů v přítomnosti adherentních peritoneálních buněk ovlivněných Bregs. Adherentní peritoneální buňky byly ovlivněny stimulovanými B lymfocyty. Následně byly adherentní peritoneální buňky společně s ConA využity k ovlivnění T lymfocytů značených CFSE. Po 72 hodinách kultivace byla měřena proliferace T lymfocytů průtokovou cytometrií. T lymfocyty byly před měřením označeny monoklonálními protilátkami proti povrchovým znakům CD4 a CD8. Na základě snižování intenzity fluorescence CFSE byly T lymfocyty rozděleny na populaci buněk neproliferujících a proliferujících a u těchto buněk bylo dále analyzováno procento CD4⁺ a CD8⁺ buněk.

Adherentní peritoneální buňky ovlivněné různě stimulovanými B lymfocyty nepůsobily rozdílně na proliferaci CD4⁺ T lymfocytů. Naproti tomu působení B lymfocytů stimulovaných LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN-γ na adherentní peritoneální buňky vedlo k následnému signifikantnímu snížení proliferace CD8⁺ T lymfocytů (Obrázek č. 17).

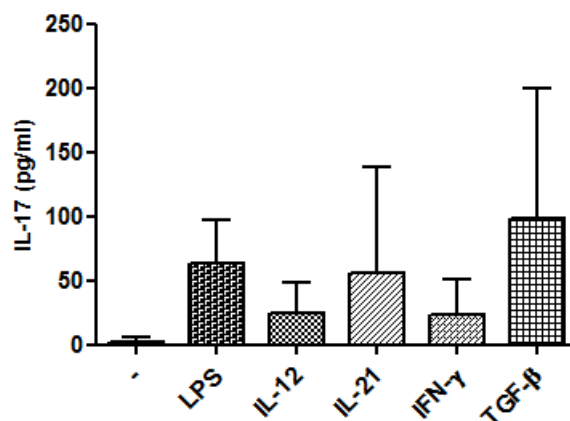


Obrázek č. 17: Vliv adherentních peritoneálních buněk ovlivněných různě stimulovanými B lymfocyty na proliferující CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty v přítomnosti ConA. T lymfocyty značené CFSE byly kultivovány 72 hodin s ovlivněnými adherentními peritoneálními buňkami za současné stimulace ConA. Proliferace T lymfocytů byla měřena pomocí průtokové cytometrie, T lymfocyty byly před měřením označeny monoklonálními protilátkami proti povrchovým znakům CD4 (A) a CD8 (B). Procenta CD4⁺ a CD8⁺ buněk jsou vynesena na proliferující populaci T lymfocytů. Data představují aritmetické průměry + SD ze 4 nezávislých pokusů (*P < 0,05 oproti B lymfocytům stimulovaným LPS).

6.8.4. Vliv stimulovaných B lymfocytů na produkci IL-17 T lymfocyty

Funkční aktivita stimulovaných B lymfocytů byla mimo jiné zjišťována pomocí inhibice produkce IL-17 aktivovanými T lymfocyty. Adherentní peritoneální buňky byly ovlivněny stimulovanými B lymfocyty. Následně byly adherentní peritoneální buňky využity k ovlivnění T lymfocytů, které byly současně stimulovány ConA. Po 72 hodinách kultivace byla měřena produkce IL-17 T lymfocyty pomocí ELISA testu.

V případě ovlivnění adherentních peritoneálních buněk B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN-γ je patrný trend snížení produkce IL-17 T lymfocyty. Naopak u ovlivnění adherentních peritoneálních buněk B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-21 nebo TGF-β je patrný trend zvýšení produkce IL-17 T lymfocyty (Obrázek č. 18).



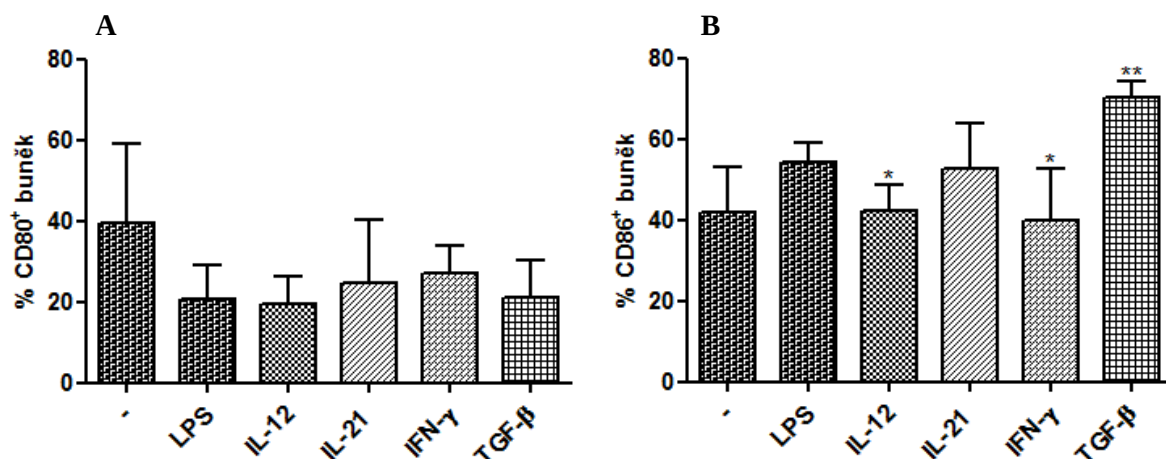
Obrázek č. 18: Vliv ovlivněných adherentních peritoneálních buněk na produkci IL-17 T lymfocyty v přítomnosti ConA. T lymfocyty byly kultivovány 72 hodin s ovlivněnými adherentními peritoneálními buňkami za současné stimulace ConA. Produkce IL-17 byla měřena pomocí ELISA testu. Data představují aritmetické průměry + SD z 5 nezávislých pokusů.

6.9. Mechanismy působení ovlivněných adherentních peritoneálních buněk

6.9.1. Exprese kostimulačních molekul u adherentních peritoneálních buněk

Expresa kostimulačních molekul byla u adherentních peritoneálních buněk měřena pomocí průtokové cytometrie. Adherentní peritoneální buňky byly ovlivněny různě stimulovanými B lymfocyty. Následně byly B lymfocyty odmyty a adherentní peritoneální buňky byly uvolněny do suspenze roztokem EDTA a trypsinu a byly označeny protilátkami proti povrchovým znakům CD80 a CD86, jejichž exprese byla měřena průtokovou cytometrií.

Ovlivnění adherentních peritoneálních buněk B lymfocyty stimulovanými LPS a vybranými cytokiny nevedlo ke změně v expresi kostimulační molekuly CD80 v porovnání s adherentními peritoneálními buňkami ovlivněnými B lymfocyty stimulovanými LPS. Ovlivnění adherentních peritoneálních buněk B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ vedlo k signifikantnímu snížení exprese povrchové molekuly CD86 na adherentních peritoneálních buňkách. Naproti tomu ovlivnění adherentních peritoneálních buněk B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti TGF- β vedlo k signifikantnímu zvýšení exprese molekuly CD86 oproti adherentním peritoneálním buňkám ovlivněnými B lymfocyty stimulovanými LPS (Obrázek č. 19).

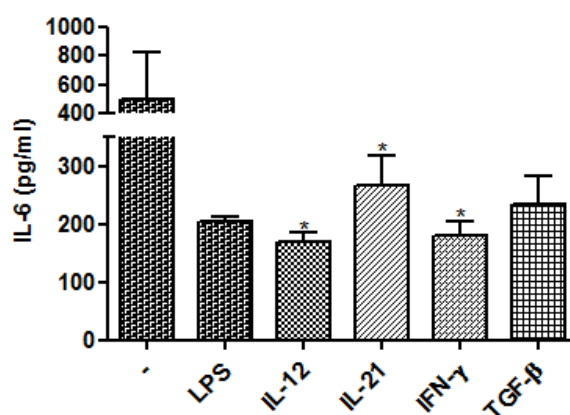


Obrázek č. 19: Expres kostimulačních molekul CD80 a CD86 u adherentních peritoneálních buněk. Adherentní peritoneální buňky ovlivněné různě stimulovanými B lymfocyty byly označeny protilátkami proti povrchovým znakům CD80 (A) a CD86 (B). Data představují aritmetické průměry + SD ze 3 nezávislých pokusů (*P < 0,05; **P < 0,01 oproti B lymfocytům stimulovaným LPS).

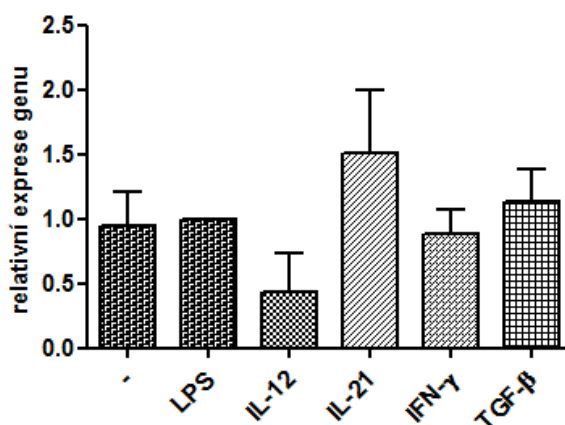
6.9.2. Vliv stimulovaných B lymfocytů na produkci IL-6 a expresi genu pro IL-1α adherentními peritoneálními buňkami

Adherentní peritoneální buňky byly ovlivněny B lymfocyty stimulovanými LPS a vybranými cytokiny. Následně byly B lymfocyty odmyty a adherentní peritoneální buňky byly kultivovány 48 hodin s LPS. Produkce IL-6 adherentními peritoneálními buňkami byla měřena pomocí ELISA testu. Genová exprese IL-1α u adherentních peritoneálních buněk byla měřena pomocí RT-PCR.

Produkce IL-6 adherentními peritoneálními buňkami byla signifikantně snížena u buněk ovlivněných B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN-γ. Produkce IL-6 těmito buňkami byla signifikantně zvýšena po kultivaci s B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-21 oproti adherentním peritoneálním buňkám kultivovaných s B lymfocyty stimulovanými LPS (Obrázek č. 20). U ovlivnění adherentních peritoneálních buněk B lymfocyty stimulovanými pouze LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN-γ je patrný trend snížení exprese genu pro IL-1α u adherentních peritoneálních buněk. Naopak u ovlivnění adherentních peritoneálních buněk B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-21 je patrný trend zvýšení exprese genu pro IL-1α u těchto buněk oproti adherentním peritoneálním buňkám ovlivněných B lymfocyty stimulovanými pouze LPS (Obrázek č. 21). Relativní genová exprese byla pro statistickou analýzu korelována k hodnotám adherentních peritoneálních buněk kultivovaných s B lymfocyty stimulovanými pouze LPS, pro následnou analýzu pomocí Studentova t-testu byla použita Welchova korelace.



Obrázek č. 20: Produkce IL-6 adherentními peritoneálními buňkami po ovlivnění různě stimulovanými B lymfocyty. Adherentní peritoneální buňky byly ovlivněny B lymfocyty stimulovanými LPS a cytokiny. B lymfocyty byly odmyty a adherentní peritoneální buňky byly kultivovány 48 hodin s LPS. Produkce IL-6 u adherentních peritoneálních buněk byla měřena pomocí ELISA testu. Data představují aritmetické průměry + SD ze 3 nezávislých pokusů (* $P < 0,05$ oproti B lymfocytům stimulovaným LPS).



Obrázek č. 21: Exprese genu pro IL-1 α u adherentních peritoneálních buněk po ovlivnění různě stimulovanými B lymfocyty. Adherentní peritoneální buňky byly ovlivněny B lymfocyty stimulovanými LPS a cytokiny. B lymfocyty byly odmyty a adherentní peritoneální buňky byly kultivovány 48 hodin s LPS. Exprese genu pro IL-1 α u adherentních peritoneálních buněk byla měřena pomocí RT-PCR. Data představují aritmetické průměry + SD ze 3 nezávislých pokusů.

7. Diskuze

Tato práce byla zaměřena na indukci supresivních Bregs ze slezinných B lymfocytů pomocí stimulace LPS a cytokiny u myši. Základní charakteristickou vlastnost Bregs představuje jejich schopnost produkovat IL-10 (Blair et al. 2009, Yanaba et al. 2008). V našem případě stimulace IFN- γ signifikantně zvyšovala produkci IL-10 u B lymfocytů stimulovaných LPS, naopak ovlivnění pomocí IL-21 nebo TGF- β vedlo k signifikantnímu snížení produkce IL-10 u B lymfocytů stimulovaných LPS. Tyto výsledky jsou v souladu s prací, ve které byl studován vliv cytokinů na vývoj Tregs a Bregs (Holan et al. 2014). V této práci však působení IL-12 signifikantně zvyšovalo produkci IL-10 u stimulovaných B lymfocytů, v našem případě stimulace IL-12 na celkovou produkci IL-10 u B lymfocytů stimulovaných LPS neměla signifikantní vliv. Tento rozdíl mohl být způsoben odlišným izolačním protokolem slezinných B lymfocytů. Působení IL-21 na B lymfocyty je v současnosti diskutabilní. Yoshizaki et al. (2012) zaznamenali, že IL-21 bez další stimulace u B lymfocytů zvyšuje jak produkci IL-10, tak počet B lymfocytů produkujících IL-10. Pozitivní vliv IL-21 na indukci Bregs popsali také Horikawa et al. (2013) a Xiao et al. (2015). Naproti tomu Margry et al. (2014) nezaznamenali souvislost mezi působením IL-21 a indukcí B lymfocytů produkujících IL-10. V práci Holan et al. (2014) byla v přítomnosti IL-21 produkce IL-10 B lymfocyty stimulovanými LPS snížena. Flores-Borja et al. (2013) popsali, že při působení IL-21 byly pouze CD19⁺CD38^{high}CD24^{high} B lymfocyty schopné udržet si svoje supresivní vlastnosti, ostatní subpopulace B lymfocytů tyto vlastnosti ztrácely. Tito autoři předpokládali, že za rozdílným vlivem IL-21 na B lymfocyty může stát také koncentrace IL-21 použitého ke stimulaci B lymfocytů.

Dále jsme zjišťovali, zda stimulace pomocí LPS a cytokinů vede ke změnám v počtu B lymfocytů produkujících IL-10 v populaci slezinných B lymfocytů. U B lymfocytů stimulovaných LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ bylo signifikantně zvýšeno procento B lymfocytů produkujících IL-10. U stimulace LPS v přítomnosti IL-21 nebo TGF- β bylo naopak patrné snížení podílu Bregs. Podstatná část B lymfocytů produkujících IL-10 se nacházela v populaci B1 buněk, což ale může být dáno současnou stimulací B lymfocytů pomocí LPS (Genestier et al. 2007). Tomu odpovídá i procentuální zastoupení B1 a B2 buněk v kultuře stimulované LPS oproti čerstvě izolovaným slezinným B lymfocytům, které vykazují převážně fenotyp B2 buněk (Hsueh et al. 2002).

Dále jsme testovali expresi genu pro molekuly FasL a PD-L1, kde pouze stimulace LPS v přítomnosti IFN- γ vyvolávala u B lymfocytů zvýšení exprese těchto molekul.

Schopnost B lymfocytů stimulovaných LPS a cytokiny tlumit imunitní reakce byla testována na *in vitro* modelu stimulace T lymfocytů v přítomnosti makrofágy ovlivněných B lymfocyty, které byly inkubovány s LPS a testovanými cytokiny. Tento model byl zvolen z důvodu vyloučení možného vlivu B lymfocytů jako buněk prezentujících antigen na T lymfocyty. Působení B lymfocytů stimulovaných LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ na makrofágy vedlo k následnému signifikantnímu snížení proliferace T lymfocytů. Naopak působení B lymfocytů stimulovaných LPS v přítomnosti IL-21 nebo TGF- β na makrofágy vedlo ke zvýšení proliferace T lymfocytů. V případě makrofágů ovlivněných B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti TGF- β bylo zvýšení proliferace T lymfocytů signifikantní.

Současně byl zjišťován fenotyp proliferujících T lymfocytů, u kterých bylo analyzováno procentuální zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů. Ovlivnění makrofágů pomocí B lymfocytů stimulovaných LPS a cytokiny nemělo vliv na proporci proliferujících CD4⁺ T lymfocytů, na rozdíl od populace proliferujících CD8⁺ T lymfocytů. Působení B lymfocytů stimulovaných LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ na makrofágy vedlo k signifikantnímu snížení procenta proliferujících CD8⁺ T lymfocytů. Vliv buněk prezentujících antigen na CD8⁺ T lymfocyty byl popsán v práci, kde účinnost chemoterapie závisela na IL-10, který přes snížení exprese IL-12 u dendritických buněk blokoval protinádorové působení CD8⁺ T lymfocytů (Ruffell et al. 2014).

Dále jsme u aktivovaných T lymfocytů v přítomnosti ovlivněných makrofágů zjišťovali jejich schopnost diferenciaci v Th17 lymfocyty na základě měření produkce IL-17. Ovlivnění makrofágů B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ vedlo ke snížení produkce IL-17 u T lymfocytů. Změny ve schopnosti buněk prezentujících antigen aktivovat nebo tlumit Th1/Th17 imunitní odpověď byly prokázány například po působení IL-33 (Jiang et al. 2012), komplementového C1q proteinu (Clarke et al. 2015) nebo v průběhu infekce plísní *Cryptococcus gattii* (Angkasekwinai et al. 2014).

Za účelem stanovení možných mechanismů působení makrofágů na T lymfocyty byla u nich měřena exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86, exprese genu pro IL-1 α a produkce IL-6.

Ovlivnění makrofágů B lymfocyty stimulovanými LPS a cytokiny nevedlo ke změně v expresi kostimulační molekuly CD80. Naproti tomu ovlivnění makrofágů B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ vedlo k signifikantnímu snížení exprese povrchové molekuly CD86 na těchto buňkách. Ovlivnění makrofágů B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti TGF- β vedlo k signifikantnímu zvýšení exprese molekuly CD86. Molekula CD86 byla popsána jako charakteristický znak pro prozánětlivé klasicky

aktivované makrofágy (Wang et al. 2015). Změny v expresi CD86 proto mohou souviset se změnou v počtu klasicky aktivovaných makrofágů po působení B lymfocytů stimulovaných LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ , případně mohlo dojít k omezení schopnosti makrofágů fungovat jako buňky prezentující antigen.

Dalším možným mechanismem, kterým mohly ovlivněné makrofágy působit na reaktivitu T lymfocytů, je produkce IL-6. Produkce IL-6 byla signifikantně snížena u makrofágů ovlivněných B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ . Produkce IL-6 těmito buňkami byla signifikantně zvýšena po kultivaci s B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-21. IL-6 hraje významnou roli v rozvoji Th17 imunitní odpovědi (Koch et al. 2013). Snížení produkce IL-6 u makrofágů ovlivněných B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ je tedy v souladu se zjištěnou sníženou produkcí IL-17 u T lymfocytů kultivovaných s těmito buňkami. Bylo popsáno, že podání protilátky proti receptoru pro IL-6 snižovalo u pacientů se SLE aktivaci lymfocytů (Shirota et al. 2013). Snížení produkce IL-6 u makrofágů ovlivněných B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ se také může podílet na tlumení T buněčné odpovědi prostřednictvím potlačení aktivace T lymfocytů.

Dalším studovaným mechanismem působení makrofágů na T lymfocyty byla exprese IL-1 α . Makrofágy ovlivněné B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 exprimovaly IL-1 α ve sníženém množství, naopak u makrofágů ovlivněných B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-21 byla exprese genu pro IL-1 α zvýšena. Role IL-1 byla prokázána při rozvoji EAE u myši, kde IL-1 pozitivně působil na indukci Th17 buněk (Sutton et al. 2006). Přestože změny v expresi IL-1 α u makrofágů nebyly signifikantní, mohou tyto rozdíly souviset s ovlivněním vývoje Th17 lymfocytů.

Výsledky této práce ukazují, že stimulací B lymfocytů pomocí LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ je možné indukovat funkční Bregs. Mezi mechanismy působení Bregs indukovaných LPS v přítomnosti IFN- γ může být řazena zvýšená produkce IL-10 a zvýšená exprese genu pro FasL a PD-L1. Avšak pro ověření, zda Bregs indukované LPS v přítomnosti IFN- γ ke svému působení využívají tyto mechanismy synergicky, bude potřeba dalšího testování. U Bregs indukovaných LPS v přítomnosti IL-12 nebyl prokázán žádný z testovaných mechanismů působení, proto bude do budoucna nezbytné rozšířit škálu analyzovaných mechanismů možného působení těchto buněk.

Při testování vlivu Bregs na makrofágy jsme ukázali, že snižovaly u makrofágů expresi kostimulační molekuly CD86 a produkci prozánětlivého cytokinu IL-6. Tento supresivní posun v aktivitě makrofágů může následně ovlivňovat další imunitní reakce, proto

byl dále analyzován efekt takto ovlivněných makrofágů na T lymfocyty. Makrofágy ovlivněné indukovanými Bregs přispívaly k snížení proliferace aktivovaných T lymfocytů, specificky CD8⁺ T lymfocytů. T lymfocyty kultivované s ovlivněnými makrofágy také vykazovaly sníženou produkci prozánětlivého cytokinu IL-17. Získané výsledky souhrnně ukazují, že je možné indukovat Bregs pomocí LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ a že tyto buňky jsou schopné prokazatelně suprimovat imunitní odpovědi. Tyto poznatky mohou mít význam pro potenciální klinické využití u stavů, kde je žádoucí podpořit funkčnost Bregs. Pro aplikovatelnost Bregs indukovaných pomocí LPS v přítomnosti IL-12 a IFN- γ v terapii ale musí být provedeny další studie, zejména testování těchto Bregs v *in vivo* systémech.

8. Závěr

- IFN- γ vyvolává u B lymfocytů stimulovaných LPS zvýšenou produkci IL-10 a expresi genů pro FasL a PD-L1. Naopak IL-21 nebo TGF- β u B lymfocytů stimulovaných LPS snižuje produkci IL-10. LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ zvyšuje procento B lymfocytů produkujících IL-10.
- B lymfocyty stimulované LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ snižovaly schopnost makrofágů stimulovat proliferaci T lymfocytů. Naopak B lymfocyty stimulované LPS v přítomnosti TGF- β zvyšovaly schopnost makrofágů stimulovat proliferaci T lymfocytů.
- Při kultivaci T lymfocytů s makrofágy ovlivněnými B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ došlo ke snížení procenta proliferujících CD8⁺ T lymfocytů.
- Kultivace T lymfocytů s makrofágy ovlivněnými B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ vedla ke snížení produkce IL-17 u T lymfocytů.
- Působení B lymfocytů stimulovaných LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ na makrofágy vyvolalo snížení procenta CD86^{high} makrofágů v kultuře, naopak působení B lymfocytů stimulovaných LPS v přítomnosti TGF- β na makrofágy vyvolalo zvýšení procenta CD86^{high} makrofágů. Ovlivnění makrofágů B lymfocyty stimulovanými LPS a cytokiny nemělo vliv na expresi kostimulační molekuly CD80.
- Produkce prozánětlivého cytokinu IL-6 u makrofágů byla snížena po jejich kultivaci s B lymfocyty ovlivněnými LPS v přítomnosti IL-12 nebo IFN- γ , naopak produkce IL-6 byla zvýšena u makrofágů ovlivněných B lymfocyty stimulovanými LPS v přítomnosti IL-21.

9. Literatura

Akbari O., Stock P., Singh A. K., Lombardi V., Lee W. L., Freeman G. J., Sharpe A. H., Umetsu D. T., Dekruyff R. H. (2010): PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. *Mucosal Immunol.*, 3, 81-91.

Amu S., Saunders S. P., Kronenberg M., Mangan N. E., Atzberger A., Fallon P. G. (2010): Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 125, 1114-1124.

Angkasekwinai P., Sringkarin N., Supasorn O., Fungkrajai M., Wang Y. H., Chayakulkeeree M., Ngamskulrungraj P., Angkasekwinai N., Pattanapanyasat K. (2014): *Cryptococcus gattii* infection dampens Th1 and Th17 responses by attenuating dendritic cell function and pulmonary chemokine expression in the immunocompetent hosts. *Infect. Immun.*, 82, 3880-3390.

Austyn J. M., Gordon S. (1981): F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.*, 11, 805-815.

Berthelot J. M., Jamin C., Amrouche K., le Goff B., Maugars Y., Youinou P. (2013): Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*, 80, 18-22.

Blair P. A., Chavez-Rueda K. A., Evans J. G., Shlomchik M. J., Eddaoudi A., Isenberg D. A., Ehrenstein M. R., Mauri C. (2009): Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J. Immunol.*, 182, 3492-3502.

Blair P. A., Noreña L. Y., Flores-Borja F., Rawlings D. J., Isenberg D. A., Ehrenstein M. R., Mauri C. (2010): CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity*, 32, 129-140.

Bodhankar S., Wang C., Vandembark A. A., Offner H. (2011): Estrogen-induced protection against experimental autoimmune encephalomyelitis is abrogated in the absence of B cells. *Eur. J. Immunol.*, 41, 1165-1175.

Bodhankar S., Chen Y., Lapato A., Vandembark A. A., Murphy S. J., Offner H. (2014): Targeting immune co-stimulatory effects of PD-L1 and PD-L2 might represent an effective therapeutic strategy in stroke. *Front. Cell. Neurosci.*, 8, 228.

Brummel R., Lenert P. (2005): Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-Oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.*, 174, 2429-2434.

Carter L. L., Leach M. W., Azoitei M. L., Cui J., Pelker J. W., Jussif J., Benoit S., Ireland G., Luxenberg D., Askew G. R., Milarski K. L., Groves C., Brown T., Carito B. A., Percival K., Carreno B. M., Collins M., Marusic S. (2007): PD-1/PD-L1, but not PD-1/PD-L2, interactions regulate the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, 182, 124-134.

Clarke E. V., Weist B. M., Walsh C. M., Tenner A. J. (2015): Complement protein C1q bound to apoptotic cells suppresses human macrophage and dendritic cell-mediated Th17 and Th1 T cell subset proliferation. *J. Leukoc. Biol.*, 97, 147-160.

Couper K. N., Blount D. G., Riley E. M. (2008): IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.*, 180, 5771-5777.

Ding Q., Yeung M., Camirand G., Zeng Q., Akiba H., Yagita H., Chalasani G., Sayegh M. H., Najafian N., Rothstein D. M. (2011): Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J. Clin. Invest.*, 121, 3645-3656.

Douglas R. S., Woo E. Y., Capocasale R. J., Tarshis A. D., Nowell P. C., Moore J. S. (1997): Altered response to and production of TGF- β by B cells from autoimmune NZB mice. *Cell. Immunol.*, 179, 126-137.

Evans J. G., Chavez-Rueda K. A., Eddaoudi A., Meyer-Bahlburg A., Rawlings D. J., Ehrenstein M. R., Mauri C. (2007): Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. Immunol.*, 178, 7868-7878.

Fillatreau S., Sweenie C. H., McGeachy M. J., Gray D., Anderton S. M. (2002): B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.*, 3, 944-950.

Flores-Borja F., Bosma A., Ng D., Reddy V., Ehrenstein M. R., Isenberg D. A., Mauri C. (2013): CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci. Transl. Med.*, 5, 173ra23.

Genestier L., Taillardet M., Mondiere P., Gheit H., Bella C., Defrance T. (2007): TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol.*, 178, 7779-7786.

Gonnella P. A., Waldner H. P., Weiner H. L. (2001): B cell-deficient (μ MT) mice have alterations in the cytokine microenvironment of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) and a defect in the low dose mechanism of oral tolerance. *J. Immunol.*, 166, 4456-4464.

Gray M., Miles K., Salter D., Gray D., Savill J. (2007): Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 14080-14085.

Haskó G., Cronstein B. N. (2004): Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.*, 25, 33-39.

Holan V., Zajicova A., Javorkova E., Trosan P., Chudickova M., Pavlikova M., Krulova M. (2014): Distinct cytokines balance the development of regulatory T cells and interleukin-10-producing regulatory B cells. *Immunology*, 141, 577-586.

Horikawa M., Weimer E. T., DiLillo D. J., Venturi G. M., Spolski R., Leonard W. J., Heise M. T., Tedder T. F. (2013): Regulatory B cell (B10 Cell) expansion during *Listeria* infection governs innate and cellular immune responses in mice. *J. Immunol.*, 190, 1158-1168.

Hsueh R. C., Roach T. I. A., Lin K., O'Connell T. D., Han H., Yan Z. (2002): Purification and characterization of mouse splenic B lymphocytes. *AfCS Research Reports*, 1.

Iwata Y., Matsushita T., Horikawa M., Dilillo D. J., Yanaba K., Venturi G. M., Szabolcs P. M., Bernstein S. H., Magro C. M., Williams A. D., Hall R. P., St Clair E. W., Tedder T. F. (2011): Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117, 530-541.

Jiang H. R., Milovanović M., Allan D., Niedbala W., Besnard A. G., Fukada S. Y., Alves-Filho J. C., Togbe D., Goodyear C. S., Linington C., Xu D., Lukic M. L., Liew F. Y. (2012): IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur. J. Immunol.*, 42, 1804-1814.

Kaku H., Cheng K. F., Al-Abed Y., Rothstein T. L. (2014): A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. *J. Immunol.*, 193, 5904-5913.

Kemp T. J., Moore J. M., Griffith T. S. (2004): Human B cells express functional TRAIL/Apo-2 ligand after CpG-containing oligodeoxynucleotide stimulation. *J. Immunol.*, 173, 892-899.

Kessel A., Haj T., Peri R., Snir A., Melamed D., Sabo E., Toubi E. (2012): Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun. Rev.*, 11, 670-677.

Koch S., Mousset S., Graser A., Reppert S., Übel C., Reinhardt C., Zimmermann T., Rieker R., Lehr H. A., Finotto S. (2013): IL-6 activated integrated BATF/IRF4 functions in lymphocytes are T-bet-independent and reversed by subcutaneous immunotherapy. *Sci. Rep.*, 3, 1754.

Lampropoulou V., Hoehlig K., Roch T., Neves P., Calderón Gómez E., Sweenie C. H., Hao Y., Freitas A. A., Steinhoff U., Anderton S. M., Fillatreau S. (2008): TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol.*, 180, 4763-4773.

Latchman Y., Wood C. R., Chernova T., Chaudhary D., Borde M., Chernova I., Iwai Y., Long A. J., Brown J. A., Nunes R., Greenfield E. A., Bourque K., Boussiotis V. A., Carter L. L., Carreno B. M., Malenkovich N., Nishimura H., Okazaki T., Honjo T., Sharpe A. H., Freeman G. J. (2001): PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.*, 2, 261-268.

Lee K. M., Kim J. I., Stott R., Soohoo J., O'Connor M. R., Yeh H., Zhao G., Eliades P., Fox C., Cheng N., Deng S., Markmann J. F. (2012): Anti-CD45RB/anti-TIM-1-induced tolerance requires regulatory B cells. *Am. J. Transplant.*, 12, 2072-2078.

Lee K. M., Stott R. T., Zhao G., Soohoo J., Xiong W., Lian M. M., Fitzgerald L., Shi S., Akrawi E., Lei J., Deng S., Yeh H., Markmann J. F., Kim J. I. (2014): TGF- β -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur. J. Immunol.*, 44, 1728-1736.

Lenert P., Brummel R., Field E. H., Ashman R. F. (2005): TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J. Clin. Immunol.*, 25, 29-40.

Letterio J. J., Roberts A. B. (1998): Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu. Rev. Immunol.*, 16, 137-161.

Lin W., Cerny D., Chua E., Duan K., Yi J. T., Shadan N. B., Lum J., Maho-Vaillant M., Zolezzi F., Wong S. C., Larbi A., Fink K., Musette P., Poidinger M., Calbo S. (2014): Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate. *J. Immunol.*, 193, 2258-2266.

Lundy S. K., Boros D. L. (2002): Fas ligand-expressing B-1a lymphocytes mediate CD4(+)-T-cell apoptosis during schistosomal infection: induction by interleukin 4 (IL-4) and IL-10. *Infect. Immun.*, 70, 812-819.

Lundy S. K., Fox D. A. (2009): Reduced Fas ligand-expressing splenic CD5⁺ B lymphocytes in severe collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 11, R128.

Mann M. K., Maresz K., Shriver L. P., Tan Y., Dittel B. N. (2007): B cell regulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 178, 3447-3456.

Margry B., Kersemakers S. C., Hoek A., Arkesteijn G. J., Wieland W. H., van Eden W., Broere F. (2014): Activated peritoneal cavity B-1a cells possess regulatory B cell properties. *PLoS One*, 9, e88869.

Matsushita T., Yanaba K., Bouaziz J. D., Fujimoto M., Tedder T. F. (2008): Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.*, 118, 3420-3430.

Mauri C., Gray D., Mushtaq N., Londei M. (2003): Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.*, 197, 489-501.

Mauri C., Bosma A. (2012): Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 30, 221-241.

Mizoguchi A., Mizoguchi E., Takedatsu H., Blumberg R. S., Bhan A. K. (2002): Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, 16, 219-230.

Montandon R., Korniotis S., Layseca-Espinosa E., Gras C., Mégret J., Ezine S., Dy M., Zavala F. (2013): Innate pro-B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, E2199-2208.

Moreau A., Blair P. A., Chai J. G., Ratnasothy K., Stolarczyk E., Alhabbab R., Rackham C. L., Jones P. M., Smyth L., Elgueta R., Howard J. K., Lechler R. I., Lombardi G. (2015): Transitional-2 B cells acquire regulatory function during tolerance induction and contribute to allograft survival. *Eur. J. Immunol.*, 45, 843-853.

Nagata S., Suda T. (1995): Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol. Today*, 16, 39-43.

Natarajan P., Singh A., McNamara J. T., Secor E. R. Jr., Guernsey L. A., Thrall R. S., Schramm C. M. (2012): Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a murine model of allergic airway disease are CD5⁺, express TGF- β , and co-localize with CD4⁺Foxp3⁺ T cells. *Mucosal. Immunol.*, 5, 691-701.

Neta R., Salvin S. B. (1974): Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J. Immunol.*, 113, 1716-1725.

Niedbala W., Wei X. Q., Cai B., Hueber A. J., Leung B. P., McInnes I. B., Liew F. Y. (2007): IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.*, 37, 3021-3029.

Noh J., Choi W. S., Noh G., Lee J. H. (2010): Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B cells in human peripheral blood mononuclear cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cell (Breg). *Immune Netw.*, 10, 247–249.

Pillai S., Cariappa A., Moran S. T. (2004): Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol. Rev.*, 197, 206-218.

Qian L., Qian C., Chen Y., Bai Y., Bao Y., Lu L., Cao X. (2012): Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19^{hi}Fc γ IIb^{hi} regulatory B cells through IFN- β and CD40L. *Blood*, 120, 581-591.

Rafei M., Hsieh J., Zehntner S., Li M., Forner K., Birman E., Boivin M. N., Young Y. K., Perreault C., Galipeau J. (2009): A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat. Med.*, 15, 1038-1045.

Ray A., Basu S., Williams C. B., Salzman N. H., Dittel B. N. (2012): A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. *J. Immunol.*, 188, 3188-3198.

Ronet C., Hauyon-La Torre Y., Revaz-Breton M., Mastelic B., Tacchini-Cottier F., Louis J., Launois P. (2010): Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J. Immunol.*, 184, 886-894.

Rosser E. C., Oleinika K., Tonon S., Doyle R., Bosma A., Carter N. A., Harris K. A., Jones S. A., Klein N., Mauri C. (2014): Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. *Nat. Med.*, 20, 1334-1339.

Ruffell B., Chang-Strachan D., Chan V., Rosenbusch A., Ho C. M., Pryer N., Daniel D., Hwang E. S., Rugo H. S., Coussens L. M. (2014): Macrophage IL-10 blocks CD8⁺ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*, 26, 623-637.

Sattler S., Ling G. S., Xu D., Hussaarts L., Romaine A., Zhao H., Fossati-Jimack L., Malik T., Cook H. T., Botto M., Lau Y. L., Smits H. H., Liew F. Y., Huang F. P. (2014): IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. *J. Autoimmun.*, 50, 107-122.

Sedger L. M., Katewa A., Pettersen A. K., Osvath S. R., Farrell G. C., Stewart G. J., Bendall L. J., Alexander S. I. (2010): Extreme lymphoproliferative disease and fatal autoimmune thrombocytopenia in FasL and TRAIL double-deficient mice. *Blood*, 115, 3258-3268.

Shen P., Roch T., Lampropoulou V., O'Connor R. A., Stervbo U., Hilgenberg E., Ries S., Dang V. D., Jaimes Y., Daridon C., Li R., Jouneau L., Boudinot P., Wilantri S., Sakwa I., Miyazaki Y., Leech M. D., McPherson R. C., Wirtz S., Neurath M., Hoehlig K., Meinel E., Grützkau A., Grün J. R., Horn K., Köhl A. A., Dörner T., Bar-Or A., Kaufmann S. H., Anderton S. M., Fillatreau S. (2014): IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*, 507, 366-370.

Shirota Y., Yarboro C., Fischer R., Pham T. H., Lipsky P., Illei G. G. (2013): Impact of anti-interleukin-6 receptor blockade on circulating T and B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, 72, 118-128.

Schioppa T., Moore R., Thompson R. G., Rosser E. C., Kulbe H., Nedospasov S., Mauri C., Coussens L. M., Balkwill F. R. (2011): B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 10662-10667.

Siewe B., Wallace J., Rygielski S., Stapleton J. T., Martin J., Deeks S. G., Landay A. (2014): Regulatory B cells inhibit cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and elimination of infected CD4 T cells after in vitro reactivation of HIV latent reservoirs. *PLoS One*, 9, e92934.

Silva H. M., Takenaka M. C., Moraes-Vieira P. M., Monteiro S. M., Hernandez M. O., Chaara W., Six A., Avena F., Sesterheim P., Barbé-Tuana F. M., Saitovitch D., Lemos F., Kalil J., Coelho V. (2012): Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol. Med.*, 18, 733-743.

Skok J., Poudrier J., Gray D. (1999): Dendritic cell-derived IL-12 promotes B cell induction of Th2 differentiation: a feedback regulation of Th1 development. *J. Immunol.*, 163, 4284-4291.

Spencer N. F. L., Daynes R. A. (1997): IL-12 directly stimulates expression of IL-10 by CD5⁺ B cells and IL-6 by both CD5⁺ and CD5⁻ B cells: possible involvement in age-associated cytokine dysregulation. *Int. Immunol.*, 9, 745-754.

Stolp J., Turka L. A., Wood K. J. (2014): B cells with immune-regulating function in transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.*, 10, 389-397.

Sutton C., Brereton C., Keogh B., Mills K. H., Lavelle E. C. (2006): A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 203, 1685-1691.

Tao H., Lu L., Xia Y., Dai F., Wang Y., Bao Y., Lundy S. K., Ito F., Pan Q., Zhang X., Zheng F., Shu G., Fang B., Jiang J., Xia J., Huang S., Li Q., Chang A. E. (2015): Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10. *Eur. J. Immunol.*, 45, 999-1009.

Tian J., Zekzer D., Hanssen L., Lu Y., Olcott A., Kaufman D. L. (2001): Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.*, 167, 1081-1089.

Vadasz Z., Haj T., Balbir A., Peri R., Rosner I., Slobodin G., Kessel A., Toubi E. (2014): A regulatory role for CD72 expression on B cells in systemic lupus erythematosus. *Semin. Arthritis Rheum.*, 43, 767-771.

van de Veen W., Stanic B., Yaman G., Wawrzyniak M., Söllner S., Akdis D. G., Rückert B., Akdis C. A., Akdis M. (2013): IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 131, 1204-1212.

Vitale G., Mion F., Pucillo C. (2010): Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity. *Mol. Immunol.*, 48, 1-8.

Wang J., Cao Z., Zhang X. M., Nakamura M., Sun M., Hartman J., Harris R. A., Sun Y., Cao Y. (2015): Novel mechanism of macrophage-mediated metastasis revealed in a zebrafish model of tumor development. *Cancer Res.*, 75, 306-315.

Wang L., Qiu J., Yu L., Hu X., Zhao P., Jiang Y. (2014): Increased numbers of CD5⁺CD19⁺CD1d^{high}IL-10⁺ Bregs, CD4⁺Foxp3⁺ Tregs, CD4⁺CXCR5⁺Foxp3⁺ follicular regulatory T (TFR) cells in CHB or CHC patients. *J. Transl. Med.*, 12, 251.

Watanabe R., Ishiura N., Nakashima H., Kuwano Y., Okochi H., Tamaki K., Sato S., Tedder T. F., Fujimoto M. (2010): Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J. Immunol.*, 184, 4801-4809.

Wolf S. D., Dittel B. N., Hardardottir F., Janeway C. A. Jr. (1996): Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 184, 2271-2278.

Xiao S., Brooks C. R., Sobel R. A., Kuchroo V. K. (2015): Tim-1 is essential for induction and maintenance of IL-10 in regulatory B cells and their regulation of tissue inflammation. *J. Immunol.*, 194, 1602-1608.

Yanaba K., Bouaziz J. D., Haas K. M., Poe J. C., Fujimoto M., Tedder T. F. (2008): A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 28, 639-650.

Yanaba K., Bouaziz J. D., Matsushita T., Tsubata T., Tedder T. F. (2009): The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol.*, 182, 7459-7472.

Yoshizaki A., Miyagaki T., DiLillo D. J., Matsushita T., Horikawa M., Kountikov E. I., Spolski R., Poe J. C., Leonard W. J., Tedder T. F. (2012): Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*, 491, 264-268.

Zampoylaki A., Choulaki Ch., Gergianaki I., Papadaki G., Fanouriakis A., Sidiropoulos P., Boumpas D. T., Bertsias G. (2013): Regulation of expression and function of negative immunomodulatory receptors in B-cells: implications for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, 72, A40.