

## Český abstrakt

Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE) je uznávána jako myší model lidského autoimunitního onemocnění roztroušené sklerózy. Myší EAE je aktivně indukována imunizací vhodným myelinovým antigenem. Po imunizaci dochází k akumulaci CD4+ pomocných T lymfocytů v centrální nervové tkáni, které produkcí svých cytokinů zprostředkovávají zánětlivou reakci vedoucí k destrukci myelinu.

Hlavním cílem této práce bylo navození EAE s klinicky pozorovatelnými příznaky a sledování změn v počtech a změně fenotypu buněk, především NK buněk a T lymfocytů. Dalším cílem bylo použití léčiva s ohledem na zlepšení průběhu choroby a vlivu na imunitní odpovědi.

Pro účel diplomové práce byly nejprve použity dva inbrední kmeny myší lišící se polymorfizmem v rodině NKR-P1 receptorů na NK buňkách. U SJL/J myši je protilátkou anti-NK1.1 (PK136) detekována *inhibiční NKR-P1B* a u C57BL/6 *aktivační NKR-P1C* izoforma receptoru.

U SJL myši byla pozorována střídavě recidivující encefalomyelitida a u C57BL/6 chronická forma EAE. U obou kmenů myši byly detekovány změny v počtu NK buněk i v expresi jejich receptorů NKR-P1 a NKG2D. Terapie C57BL/6 myši IFN- $\beta$  ovlivnila především NK buňky a jejich cytotoxickou aktivitu. Zaznamenali jsme jejich zvýšený podíl v krvi i slezině, nárůst exprese NKG2D na krevních NK buňkách a snížení syntézy cytokinů TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-10.

## Anglický abstrakt

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is widely accepted as a murine model of human multiple sclerosis autoimmune disease. Murine EAE is usually actively induced by immunization with a suitable myelin antigen. Following immunization, CD4+ T helper lymphocytes accumulate in the nervous tissue and via the production of cytokines they mediate an inflammatory reaction and the subsequent destruction of myelin.

The main goal of this study was the induction of EAE with clinically observable symptoms and the observation of changes in the counts and phenotypes of cells, mainly NK and T cells. Another goal was the use of medication with regard to the disease progress improvement.

For the purposes of this study, two inbred murine strains with distinct NKR-P1 surface expression were used - the SJL/J strain (*expressing inhibitory NKR-P1B*) and C57BL/6 (*expressing activating NKR-P1C*).

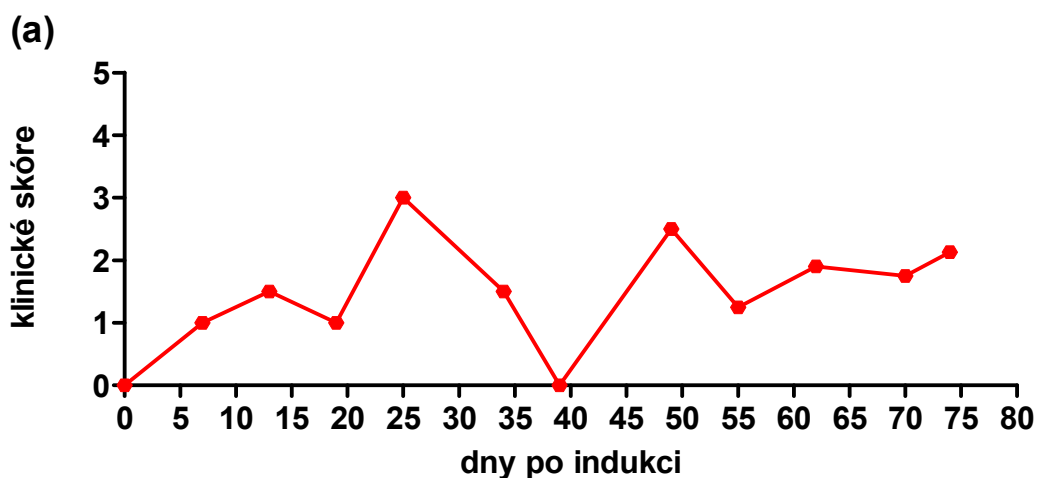
SJL mice elicited a relapse-remitting EAE, while C57BL/6 had chronic EAE progression. Both murine strains exerted changes in the counts of NK cells and in the expression of their NKR-P1 and NKG2D receptors. The IFN- $\beta$  treatment of C57BL/6 mice influenced preferentially the NK cells and their cytolytic activity and upregulated their distribution in blood and spleen. NKG2D expression was increased on blood NK cells only, the production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 was decreased.

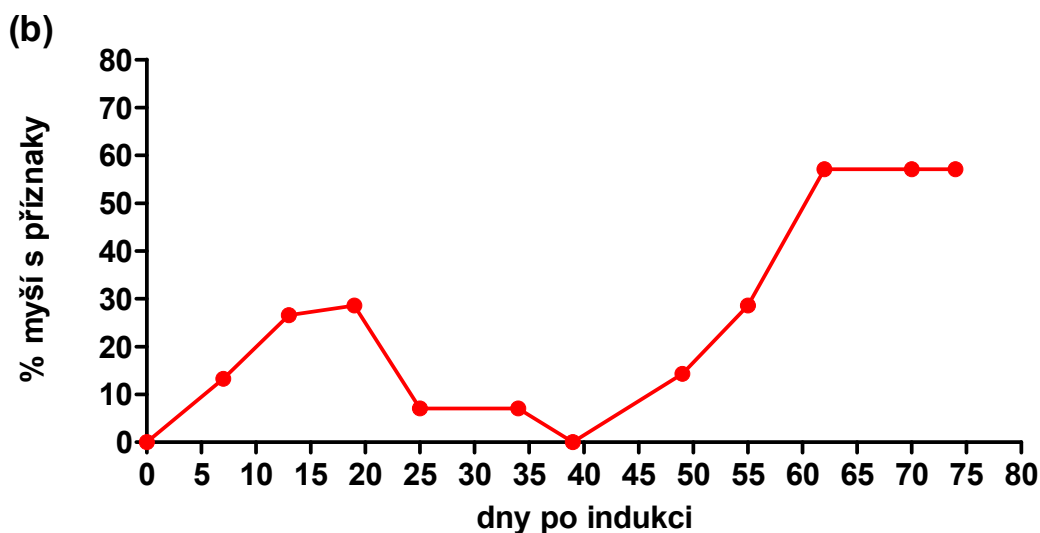
# 1. Výsledky

## 1.1. Klinický průběh a imunologický profil aktivně indukované EAE u SJL myší

### 1.1.1. Klinické parametry

Patnáct SJL/J myší bylo imunizováno peptidem proteolipidového proteinu PLP<sub>139-151</sub> ve směsi s CFA. Pertusový toxin aplikován nebyl. Jedna myš uhynula třetí den po imunizaci, u 8 myší byla pozorována střídavě-recidivující forma EAE. Myši byly pravidelně pozorovány a příznaky odečítány podle jejich závažnosti. Na obrázku 10a je vyneseno klinické skóre nemoci. Závažnost klinických příznaků v průběhu EAE byla zaznamenávána u jednotlivých myší. V části obrázku 10a je znázorněna vypočtená průměrná hodnota ze součtu všech stupňů závažnosti v daný den děleným počtem myší, u kterých byly příznaky patrné. Hodnoty na ose x odpovídají dnům, ve kterých došlo ke změnám, a osa y odpovídá průměrné hodnotě příznaků u skupiny myší. Již 13. den byla u 4 myší patrná kolébavá chůze a atonický ocas. Poté se dostaly do remisní fáze a naopak 25. den byla u jedné myši pozorována paralýza zadních končetin, tedy skóre nemoci na ose y odpovídá hodnotě tři. Pokles skóre nemoci do čtyřicátého dne odpovídá další remisní fázi. Před 50. dnem po indukci EAE se příznaky znovu objevily u 2 a postupně u dalších šesti myší z celkových čtrnácti. Podíl myší, u kterých se projeví motorické poruchy, je vyneseno na obrázku 10b. Osa x značí dny po indukci EAE a osa y znázorňuje počet myší v procentech z celkových 14, u kterých byly patrné příznaky.

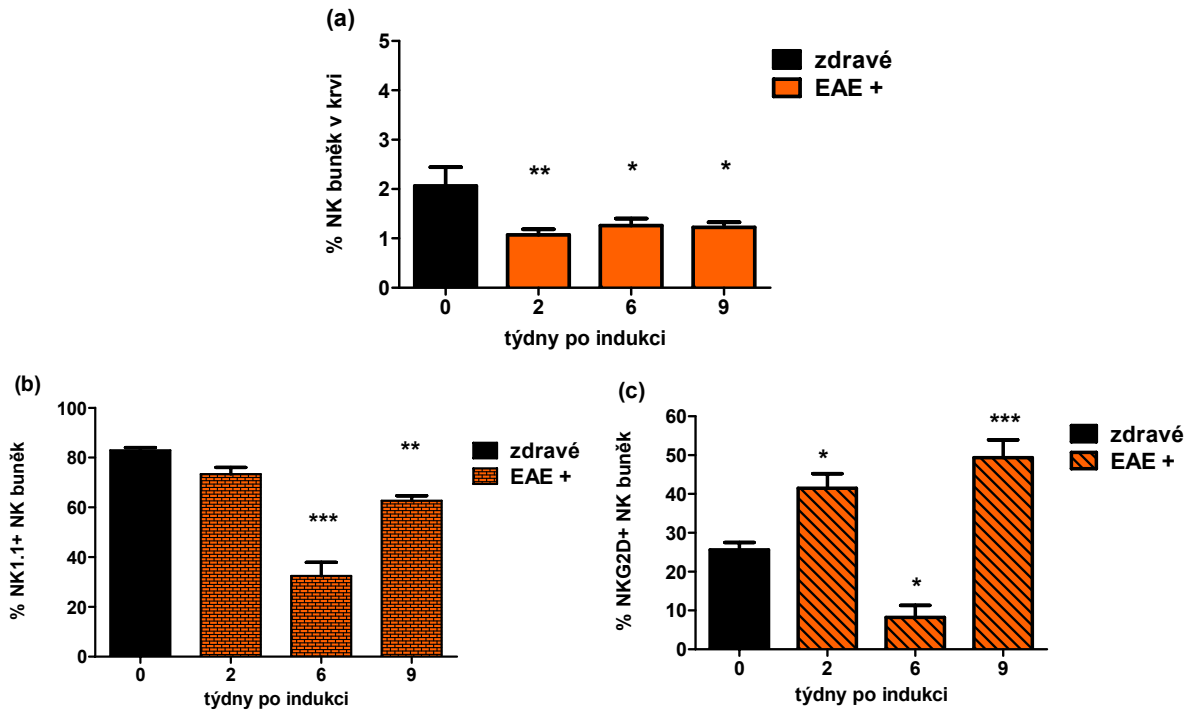




**Obrázek 1:** Průběh EAE u myši kmene SJL: (a) klinické skóre projevů nemoci, (b) podíl myši ve skupině (n=14) s příznaky nemoci.

### 1.1.2. Zastoupení NKp46+ CD3- NK buněk v periferní krvi SJL myši v průběhu EAE. Expresce receptorů NKR-P1B a NKG2D.

Na obrázku 11a jsou znázorněny změny v počtu NK buněk v periferní krvi v průběhu EAE. Po indukci EAE jejich počet z původních 2,1% klesl téměř na polovinu a po celý průběh nemoci byl statisticky významně redukován. Výsledek ANOVA testu prokázal, že změny jsou signifikantní pouze v porovnání imunizovaných myši se zdravou kontrolou (2. týden:  $p=0,0071$ ; 6. týden:  $p=0,036$ ; 9. týden:  $p=0,022$ ). Expresce receptoru NKR-P1B (obr. 11b), byla v celém průběhu EAE snížena, nejvýrazněji v šestém týdnu nemoci, kdy byl detekován pouze na 32,4% NK buněk. Toto snížení inhibičního receptoru pravděpodobně odpovídá zvýšené aktivaci NK buněk, které se podílí na remisi onemocnění, jež byla pozorována právě v šestém týdnu (obr. 10). V tabulce č. 5 jsou shrnuty statisticky signifikantní rozdíly v expresi NK1.1 (NKR-P1B) mezi jednotlivými týdny pomocí ANOVA testu. Vzestup exprese aktivačního receptoru NKG2D (obr. 11c) je výrazný při klinickém nástupu nemoci 2. a 9. týden. Naopak významný pokles exprese NKG2D byl pozorován v šestém týdnu při remisi EAE. U NK buněk pravděpodobně převažovala regulační funkce. Tabulka č. 6 sumarizuje statisticky významné rozdíly v expresi NKG2D.



**Obrázek 2:** Zastoupení NK buněk v krvi SJL myší (a). Expresse inhibičního NKR-P1B (b) receptoru a aktivačního receptoru NKG2D (c) na těchto buňkách. Statisticky významné hodnoty ANOVA testu EAE pozitivních myší ve 2., 6. a 9. týdnu vůči zdravým myším jsou označeny hvězdičkou (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Černé sloupce značí subpopulace buněk u zdravých a oranžové u imunizovaných myší.

Bonferroni's Test	Summary
0 vs 2	ns
0 vs 6	***
0 vs 9	**
2 vs 6	***
2 vs 9	ns
6 vs 9	***

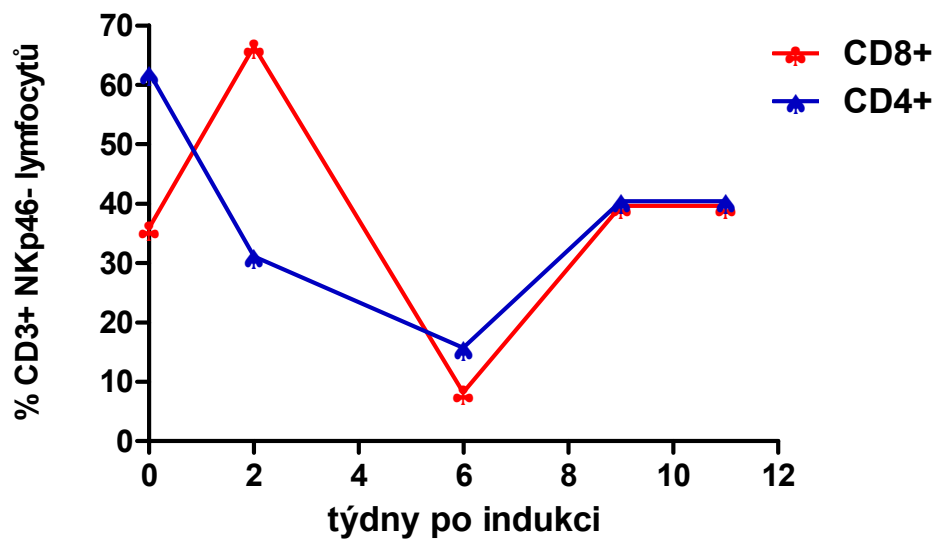
**Tabulka 1:** ANOVA test exprese NKR-P1B na NK buňkách.

Bonferroni's Test	Summary
0 vs 2	*
0 vs 6	*
0 vs 9	***
2 vs 6	***
2 vs 9	ns
6 vs 9	***

**Tabulka 2:** ANOVA test exprese NKG2D na NK buňkách.

### 1.1.3. Relativní zastoupení NKp46- CD3+ T buněk nesoucích znak CD4 nebo CD8 v periferní krvi SJL myši v průběhu EAE.

Obrázek č. 12 znázorňuje zastoupení CD4+ a CD8+ T lymfocytů v periferní krvi myši v průběhu EAE. Ve druhém týdnu nemoci významně stoupl počet CD3+/CD8+ cytotoxických lymfocytů, zatímco CD3+/CD4+ pomocné buňky výrazně poklesly. Příčinou může být přesun CD8+ CTL do centrální nervové tkáně, zatímco CD4+ buňky již v CNS jsou. Šestý týden při remisi nemoci byla hodnota obou populací výrazně nízká, ovšem při recidivě onemocnění stoupala.



**Obrázek 3:** Změny v zastoupení subpopulací CD4 a CD8 z CD3+ NKp46- T lymfocytů v periferní krvi.

## 1.2. Klinický průběh a imunologický profil aktivně indukované EAE u C57BL/6 myši

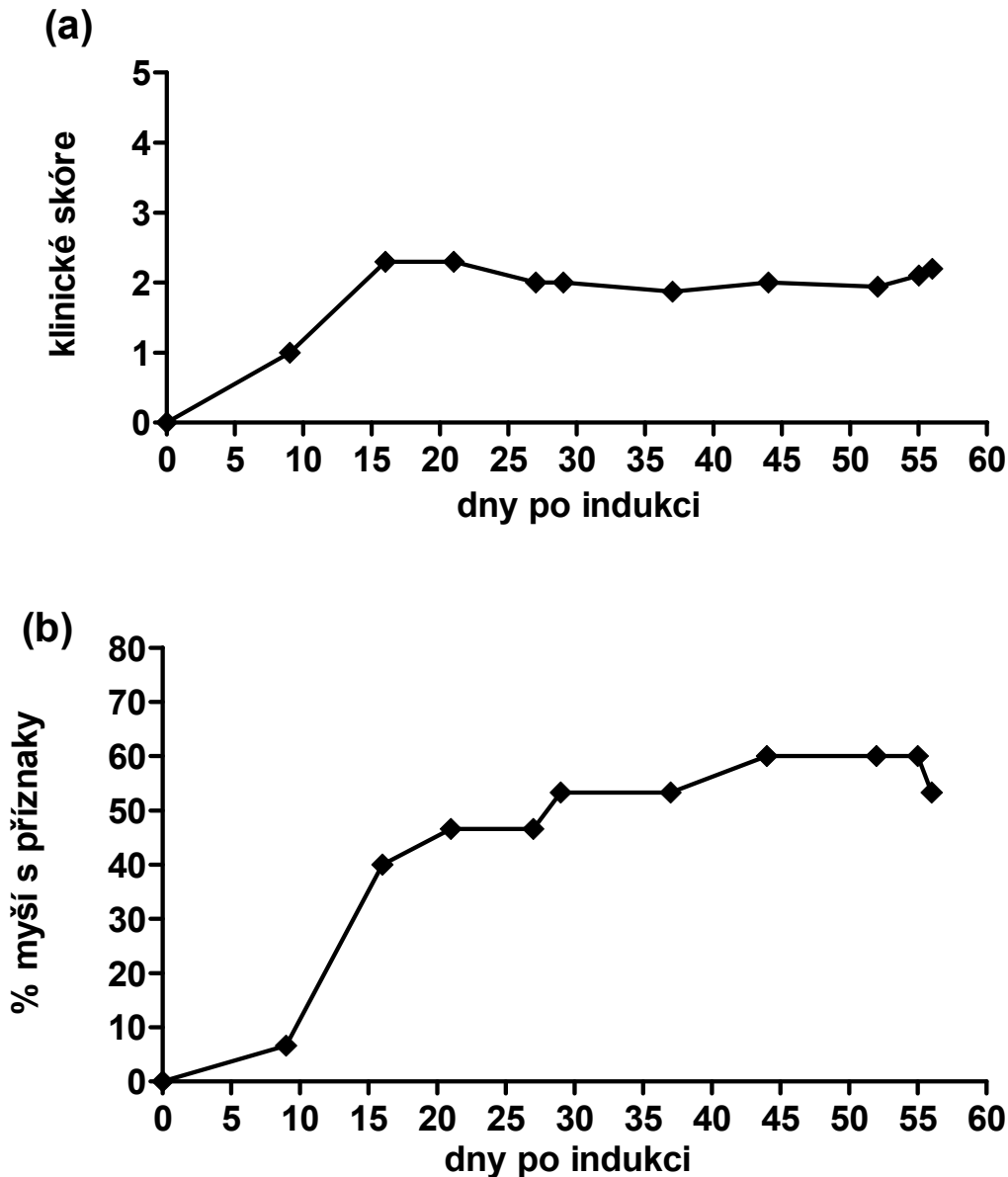
### 1.2.1. Klinické parametry

Patnáct myši kmene C57BL/6 bylo imunizováno peptidem myelinového oligodendrocytárního glykoproteinu MOG 35-55 ve směsi s CFA. Pertusový toxin byl aplikován ve třech dávkách, 0, 24 a 48 hod. U 9 myši byla pozorována chronická forma EAE. Myši byly pravidelně pozorovány a příznaky odečítány podle jejich závažnosti.

Klinické skóre nemoci (obr. 13a) i podíl myši s pozorovatelnými příznaky v daný den (obr. 13b) byl odečítán stejným způsobem jako u SJL myši (obr. 10). Hodnoty na osách x odpovídají dnům, kdy byly u myši pozorovány změny klinických parametrů; osa y

odpovídá průměrné hodnotě příznaků u celé skupiny myší (obr. 13a) respektive počtu myší s příznaky v procentech (obr. 13b).

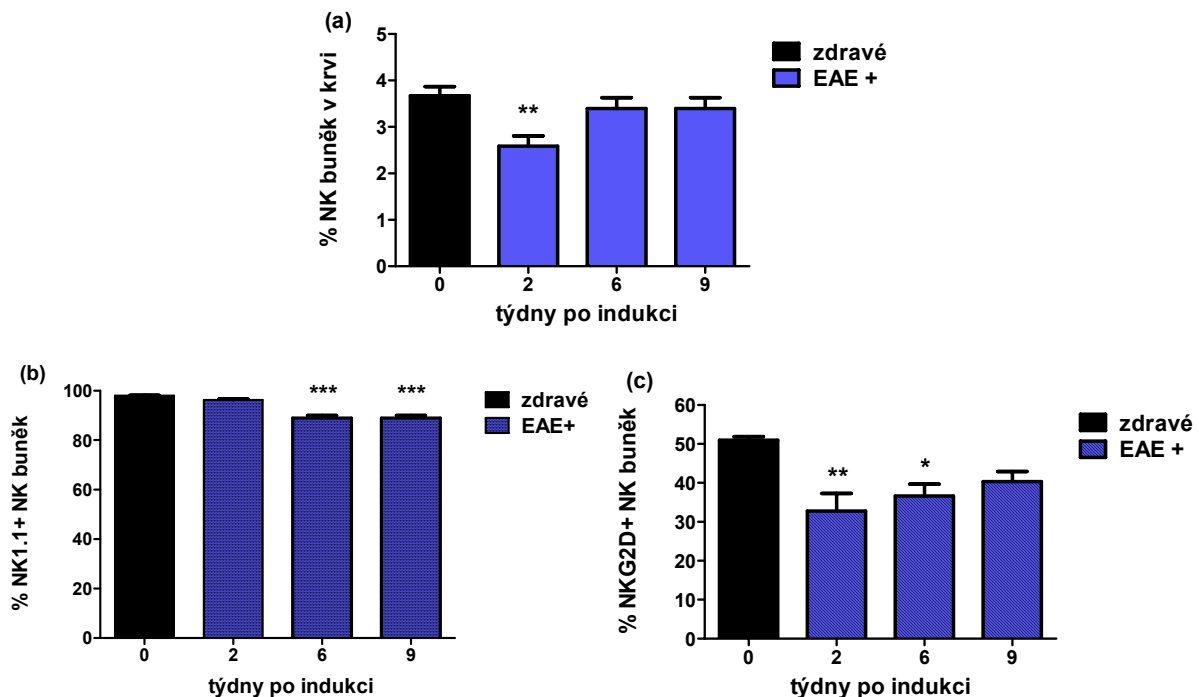
Šestnáctý den byly u 7 myší pozorovány klinické příznaky stupně dva (kolébavá chůze) a tři (paralýza zadních končetin). Chronický ráz nemoci podporuje také zvýšení počtu nemocných myší na 9 z 15. Myši trpěly částečným ochrnutím zadních končetin bez zlepšení klinických projevů nemoci.



**Obrázek 4:** (a) Klinické skóre znázorňuje chronickou formu EAE u C57BL/6 myší, první příznaky se projevily 10 den. (b) Podíl myší ve skupině (n=15) s pozorovatelnými příznaky v daný den.

### 1.2.2. Relativní zastoupení NKp46+ CD3- NK buněk v periferní krvi C57BL/6 myši v průběhu EAE. Expresí receptorů NKR-P1C a NKG2D.

Na obrázku 14a jsou znázorněny změny v zastoupení NK buněk periferní krve v průběhu EAE. Druhý týden po indukci EAE jejich počet z původních 3,7% významně klesl (ANOVA  $p=0,002$ ) s nástupem klinických příznaků EAE, ale v 6. a 9. týdnu vzrostl téměř k původní hodnotě. Obrázek 14b ukazuje změny v expresi aktivačního receptoru NKR-P1C na NK buňkách. NK buňky zdravých myši nesly tento receptor z 98%, zatímco v průběhu EAE jejich počet klesl až na 88,9%. Změny jsou statisticky významné nejen mezi zdravou kontrolou a imunizovanými myši, ale i ve srovnání s druhým týdnem, jak je uvedeno v tabulce č. 7 s výsledky testu ANOVA. Expresí aktivačního receptoru NKG2D (obr. 14c) ve druhém týdnu EAE na NK buňkách statisticky významně klesla a poté se zvolna zvyšovala v chronické fázi EAE. Tabulka č. 8 uvádí signifikantní rozdíly v expresi NKG2D NK buňkami vypočítané testem ANOVA.



**Obrázek 5:** (a) U zastoupení NK buněk v periferní krvi C57BL/6 myši byl statisticky významný pokles zaznamenán pouze 2. týden ( $p=0,002$ ) po imunizaci. (b) Expresí aktivačního receptoru NKR-P1C na NK buňkách C57BL/6 myši. (c) Expresí NKG2D na NK buňkách. Statisticky významné hodnoty ANOVA testu EAE pozitivních vůči zdravým myším menší nebo rovné 0,05 jsou označeny hvězdičkou (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Černé sloupce značí subpopulace buněk u zdravých a modré u imunizovaných myši.



Bonferroni's Test	Summary
0 vs 2	ns
0 vs 6	***
0 vs 9	***
2 vs 6	***
2 vs 9	***
6 vs 9	ns

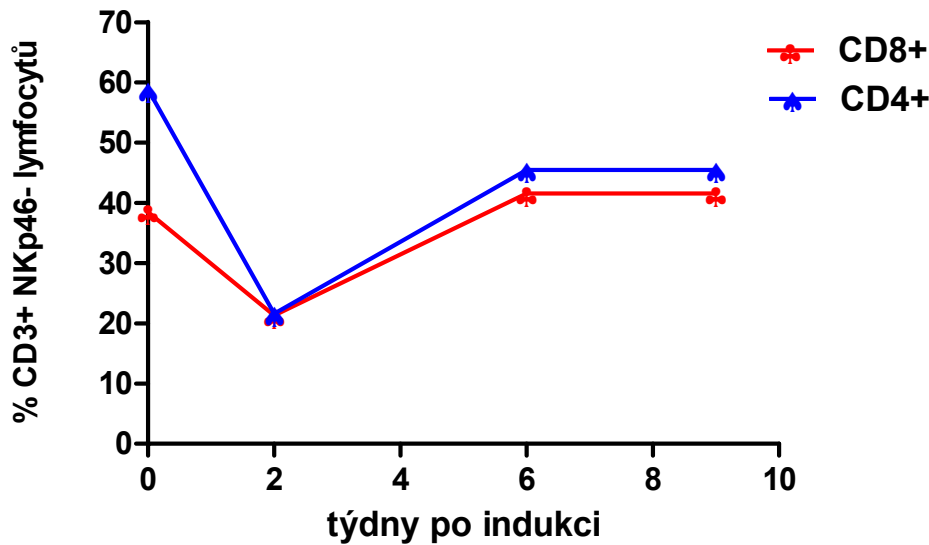
**Tabulka 3:** ANOVA test exprese NKR-P1C na NK buňkách v průběhu EAE.

Bonferroni's Test	Summary
0 vs 2	**
0 vs 6	*
0 vs 9	ns
2 vs 6	ns
2 vs 9	ns
6 vs 9	ns

**Tabulka 8:** ANOVA test exprese NKG2D na NK buňkách v průběhu EAE.

### 1.2.3. Relativní zastoupení NKp46- CD3+ T buněk nesoucích znak CD4 nebo CD8 v periferní krvi C57BL/6 myši v průběhu EAE.

Obrázek 15 znázorňuje zastoupení CD4+ a CD8+ T lymfocytů v periferní krvi C57BL/6 myši. Počet obou populací po indukci EAE je téměř na stejných hodnotách. Pokles je patrný ve druhém týdnu, kdy lymfocyty pravděpodobně prostoupily do CNS. Jejich zastoupení v krvi s progresí nemoci roste a přetrvává, alespoň u CD8+ buněk, na hodnotě jako u zdravých myši. Pomocné CD4+ lymfocyty jsou sníženy v celém průběhu.



**Obrázek 6:** Změny v zastoupení subpopulací T lymfocytů v krvi u C57BL/6 myši.

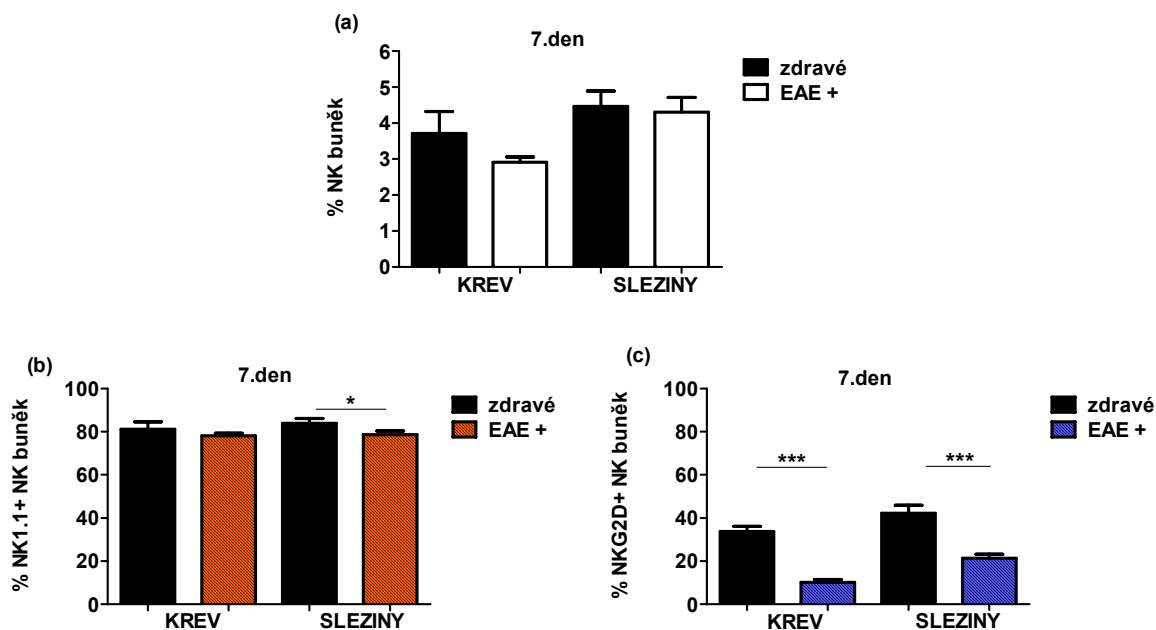
### 1.3. Porovnání imunologických změn ve slezině a periferní krvi u C57BL/6 myši 7. a 14. den po aktivní indukci EAE

#### 1.3.1. Imunitní odpověď 7. den po indukci EAE

K imunizaci MOG<sub>35-55</sub> (viz odst. 4.1.1.) bylo použito 10 samic C57BL/6 a 5 samic bylo ponecháno kontrolních. Tento kmen byl použit z důvodu chronického průběhu nemoci a také exprese aktivační izoformy NKR-P1 receptoru (NKR-P1C) na NK buňkách.

##### 1.3.1.1. Relativní zastoupení NK buněk 7. den po indukci EAE a exprese aktivačních receptorů NKR-P1C a NKG2D na těchto buňkách

Obrázek č. 16a znázorňuje změny v podílu NK buněk. Jejich počet v krvi klesl z původních 3,7% na 2,9%, ve slezinách přibližně o 0,5% z původních 4,8%. Počet NK buněk, které nesly aktivační receptor NKR-P1C (obr. 16b) se snížil v krvi i ve slezinách, kde toto snížení bylo statisticky významné ( $p = 0,025$ ). Exprese aktivačního receptoru NKG2D (obr. 16c) statisticky významně poklesla na krevních ( $p < 0,0001$ ) i slezinných NK buňkách ( $p < 0,0001$ ). Pokles exprese těchto receptorů na NK buňkách 7. den po indukci EAE implikuje jejich možný přesun do místa zánětu.

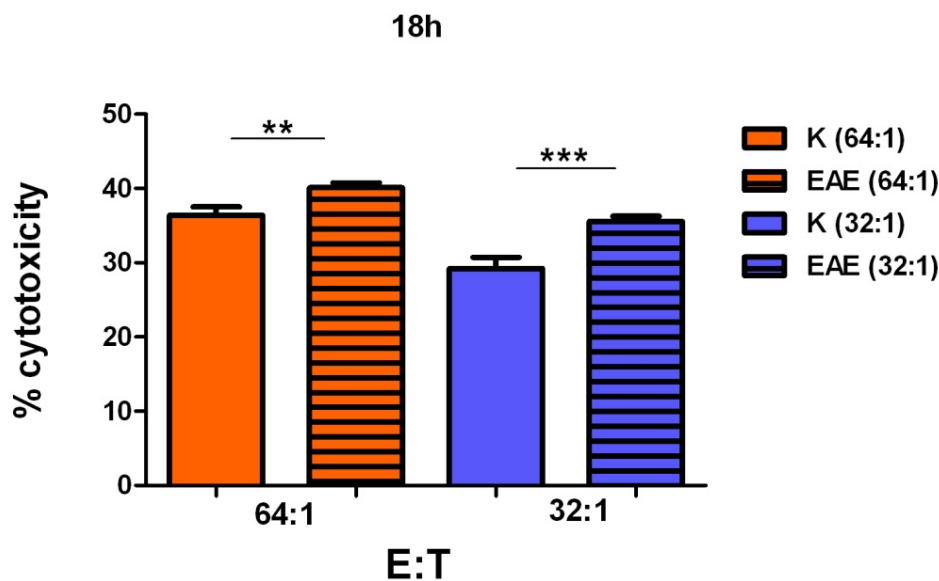


**Obrázek 7:** Zastoupení periferních a slezinných NK buněk C57BL/6 (a) 7. den po indukci EAE. Expresi NKR-P1a (b) a NKG2D (c) aktivačních receptorů na těchto NK buňkách. Černé sloupce znázorňují zastoupení NK buněk, expresi NKR-P1C a NKG2D na těchto buňkách zdravých myší; bílé sloupce NK buňky EAE myší v krvi i slezině, oranžové expresi NKR-P1C a modré expresi NKG2D na NK buňkách imunizovaných myší.

### 1.3.1.2. Cytotoxická aktivita SMC buněk 7. den po indukci EAE

Pro ověření cytolytické efektorové aktivity byl použit test buněčné cytotoxicity proti radioaktivně značeným nádorovým buňkám linie YAC-1. Efektorové buňky způsobují lyzi cílových buněk, jejímž výsledkem je uvolnění radioaktivního  $^{51}\text{Cr}$  do supernatantu, které se kvantitativně stanovuje.

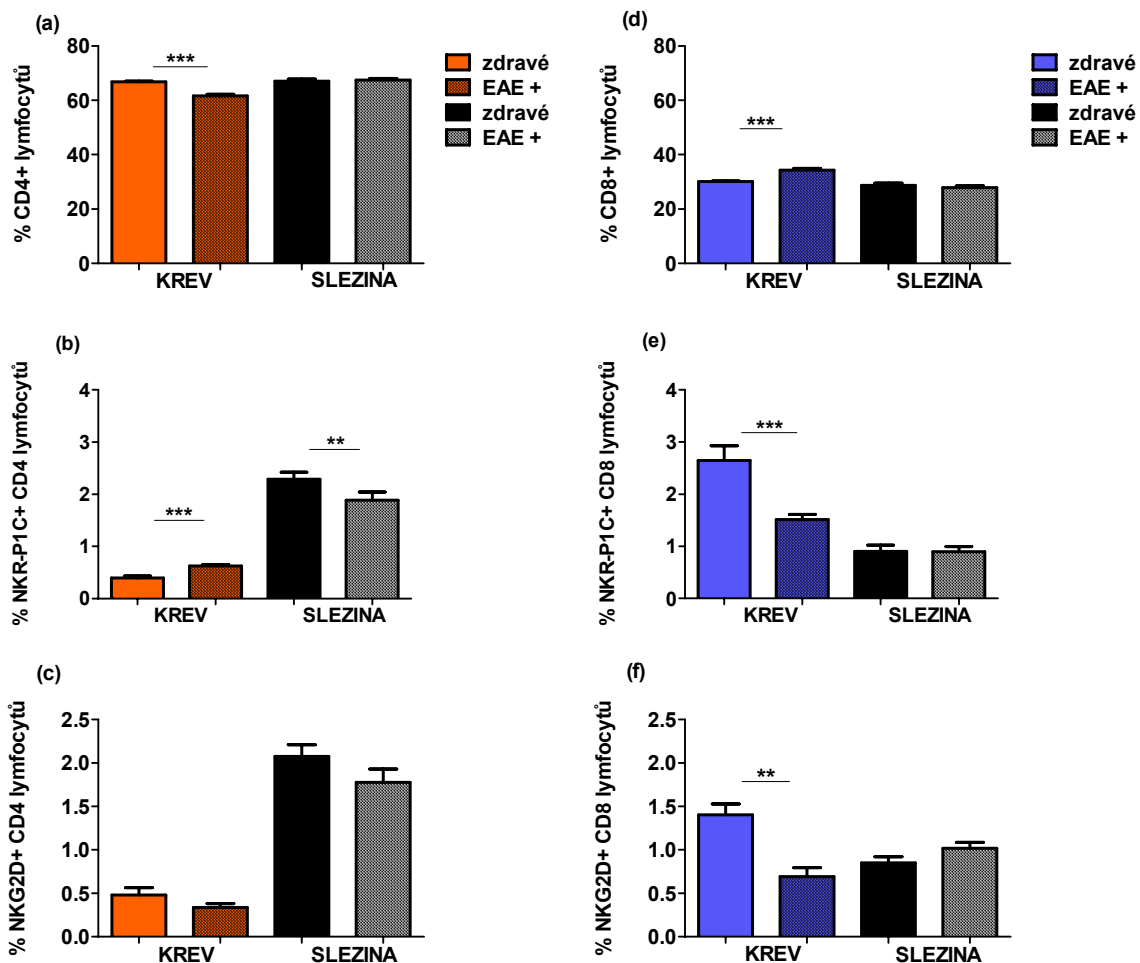
Obrázek č. 17 zobrazuje změnu cytotoxicity NK a cytotoxických T (CTL - cytotoxic T lymphocyte) buněk 7. den po indukci EAE. Buňky imunizovaných myší měly po 18ti hodinách inkubace s cílovými buňkami signifikantně vyšší cytotoxickou aktivitu. Toto bylo patrné v obou ředěních efektorových (E) a cílových (T; target) buněk 64:1 ( $p = 0,006$ ) i 32:1 ( $p < 0,0001$ ), které je vyneseno na ose x. Osa y odpovídá % cytotoxicity efektorových buněk. Toto zvýšení může být pravděpodobně dáno reakcí na CFA, jenž je obecným stimulem zánětu.



**Obrázek 8:** Cytotoxická aktivita splenocytů u EAE indukovaných myší je statisticky významně vyšší, než u zdravých kontrolních myší ( $p = 0,006$ ;  $p < 0,0001$ ). Jednotlivé sloupce znázorňují poměr efektorových k cílovým buňkám E:T = 64:1 (oranžové), E:T = 32:1 (modré). Oba pruhované sloupce znázorňují hodnoty cytotoxicity splenocytů imunizovaných buněk.

### 1.3.1.3. Relativní zastoupení CD4+ a CD8+ T lymfocytů a exprese NKR-P1 a NKG2D na těchto buňkách, 7. den po indukci EAE

Obrázek 18a znázorňuje zastoupení CD4+ T lymfocytů, jejichž počet v krvi zdravých myší byl 66,8% a u imunizovaných myší statisticky významně klesl ( $p < 0,0001$ ) na 61,6%. Zastoupení CD4+ T lymfocytů ve slezinách vzrostl o 0,3% na hodnotu 67,4%. Zastoupení těchto buněk nesoucích NKR-P1C receptor (obr. 18b) roste u EAE pozitivních myší v krvi ( $p < 0,0001$ ) a klesá ve slezině ( $p = 0,009$ ). Obrázek 18c znázorňuje expresi molekuly NKG2D na CD4+ T buňkách, která nebyla významně ovlivněna. Zastoupení CD8+ T lymfocytů (obr. 18d) v krvi imunizovaných myší se statisticky významně zvyšuje ( $p < 0,001$ ) na 34,4%, zatímco u zdravých myší bylo v krvi detekováno 30% CD4+ lymfocytů. Exprese NKR-P1C (obr. 18e) na těchto buňkách v krvi významně klesla ze 2,6% na 1,5% ( $p < 0,0001$ ), zatímco ve slezině se výrazně nezměnila. Hladina CD8+ T buněk s nízkou expresí aktivačního receptoru NKG2D (obr. 18f) v krvi se signifikantně snižuje ( $p = 0,002$ ) na poloviční hodnotu oproti zdravým kontrolám, které měly 1,4% těchto lymfocytů. Naopak zastoupení těchto CD8+ buněk nesoucích NKG2D ve slezině je u imunizovaných myší nepatrně vyšší.



**Obrázek 9:** Zastoupení CD4+ (a) a CD8+ (d) subpopulací T lymfocytů v krvi a slezině zdravých a EAE pozitivních myší. (b) a (e) znázorňují expresi NKR-P1C na těchto subpopulacích, zatímco (c) a (f) znázorňují expresi NKG2D. Statisticky významné rozdíly jsou označeny hvězdičkou (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Oranžovo – černé grafy na obrázku 18 prezentují subpopulace CD4+ buněk, modro – černé grafy subpopulace CD8+ buněk. Sloupce beze vzoru odpovídají zdravým, sloupce s kostičkovým vzorem odpovídají imunizovaným myším.

#### 1.3.1.4. Syntéza cytokinů $IFN-\gamma$ , $TNF-\alpha$ , $IL-10$ subpopulacemi NK a T lymfocytů, 7. den po indukci EAE

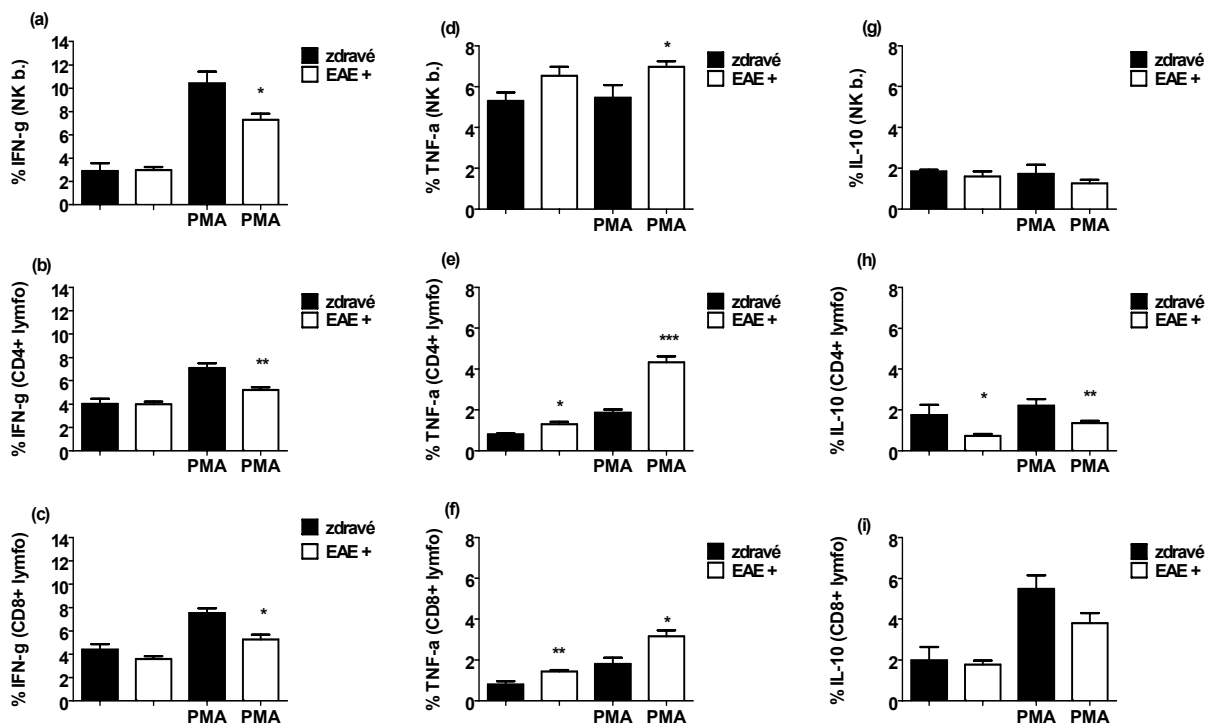
Izolované mononukleární buňky ze slezin byly stimulovány PMA v kombinaci s ionomycinem k produkci cytokinů. Aby nedošlo k extracelárnímu uvolnění byla přidána reagentie Brefeldin A. Buňky byly naneseny na 96ti - jamkovou destičku, od každého vzorku dvě jamky. Do jedné byly přidány stimulanty, druhá zůstala kontrolní pro spontánní produkci cytokinů. Brefeldin A byl přidán ke všem vzorkům. Sledovány

byly prozánětlivé cytokiny IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  a protizánětlivý IL-10. Produkce cytokinů NK buňkami i oběma populacemi T lymfocytů (CD4+, CD8+) je znázorněna na obr. 19.

Produkce IFN- $\gamma$  NK buňkami (obrázek 19a) imunizovaných myší (7,3%) byla výrazně nižší ( $p_{\text{PMA}} = 0,014$ ) než zdravých myší, u nichž dosahovala hodnoty 10,4%. Toto snížení je výraznější až po stimulaci buněk PMA + Ionomycin. Naopak produkce TNF- $\alpha$  NK buňkami (obr. 19d) imunizovaných myší je vyšší, u stimulovaných buněk (7%) statisticky významně vyšší ( $p_{\text{PMA}} = 0,034$ ) oproti 5,5% u buněk zdravých myší. IL-10 (obr. 19g) byl NK buňkami produkován slabě, u buněk EAE indukovaných myší byla produkce snížena o 0,4% v porovnání s NK buňkami zdravých myší (1,7%), ale změna nebyla statisticky signifikantní.

Produkce IFN- $\gamma$  u CD4+ T lymfocytů (obr. 19b) je signifikantně nižší u imunizovaných myší po stimulaci PMA ( $p_{\text{PMA}} = 0,003$ ), zatímco hladina TNF- $\alpha$  (obr. 19e) byla u stimulovaných lymfocytů EAE myší výrazně vyšší ( $p_{\text{PMA}} < 0,0001$ ). Produkce protizánětlivého IL-10 pomocnými CD4+ lymfocyty (obr. 19h) u EAE indukovaných myší byla signifikantně snížena ( $p_{\text{PMA}}=0,006$ ). Tyto výsledky potvrzují, že CD4+ lymfocyty v časně fázi EAE významně podporují zánět.

Produkce prozánětlivých cytokinů IFN- $\gamma$  (obr. 19c) i TNF- $\alpha$  (obr. 19f) CD8+ T lymfocyty má přibližně stejný průběh jako u CD4+ T lymfocytů, tj. snížená syntéza IFN- $\gamma$  a IL-10 a zvýšení TNF- $\alpha$ . Produkce IL-10 (obr. 19i) těmito buňkami po stimulaci PMA + Ionomycin je vyšší v porovnání s CD4+ i NK buňkami. I zde došlo k poklesu produkce tohoto cytokinu v případě imunizovaných myší, nebylo však statisticky významné z důvodu větších rozptylů hodnot mezi jednotlivými zvířaty ve skupině.



**Obrázek 10:** Detekce cytokinů ve slezině C57BL/6 myši. IFN $\gamma$  (a, b, c), TNF $\alpha$  (d, e, f) a IL-10 (g, h, i) u NK (a, d, g) buněk, CD4+ (b, e, h) a CD8+ (c, f, i) T lymfocytů. Černé sloupce reprezentují zdravé myši, bílé skupinu 7. den po indukci EAE.

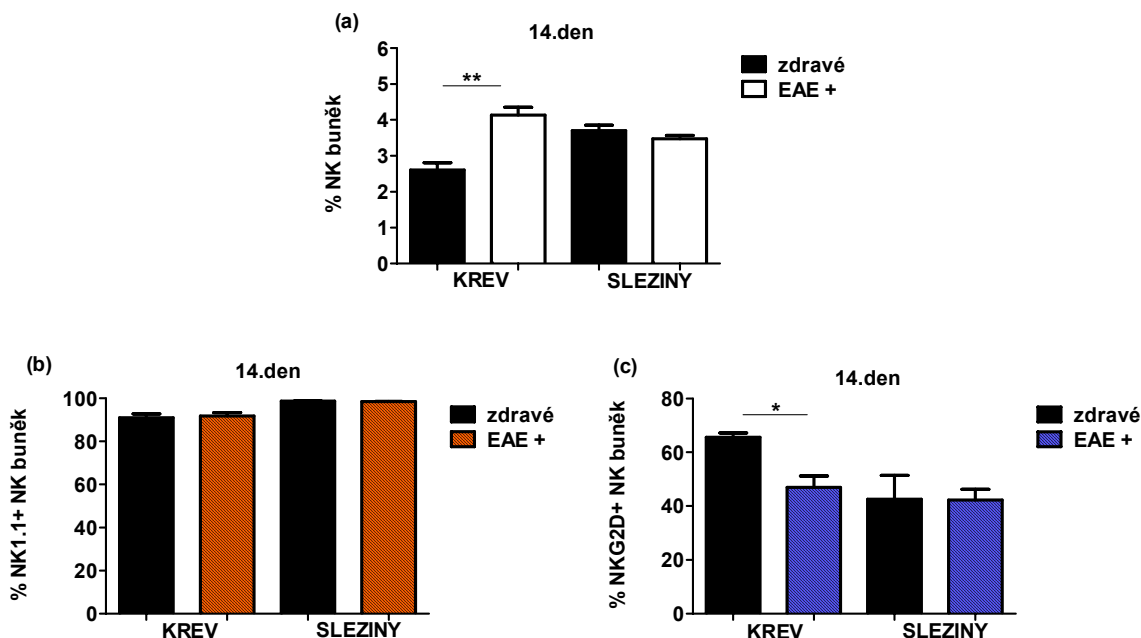
### 1.3.2. Imunitní odpověď 14. den po indukci EAE

K pokusu bylo použito 5 zdravých kontrolních myši kmene C57BL/6 a 10 myši, kterým byl aplikován MOG<sub>35-55</sub> s PTX (viz výše). Dvě myši do tří dnů uhynuly po výrazném váhovém úbytku (patrně velkým zatížením organismu použitými antigeny). U žádné myši nebyly pozorovány klinické příznaky EAE (na rozdíl od předchozího pokusu), přesto byly zaznamenány změny ve fenotypu vybraných populací imunitních buněk.

#### 1.3.2.1. Relativní zastoupení NK buněk 14. den po indukci EAE a exprese aktivačních receptorů NKR-P1C a NKG2D na těchto buňkách

Obrázek 20a znázorňuje zastoupení NK buněk v krvi a slezinách myši 14. den po indukci EAE. Jejich počet v krvi imunizovaných myši (4,1%) byl signifikantně zvýšen ( $p = 0,003$ ) oproti 2,6% u zdravých kontrol, zastoupení NKp46+ NK buněk ve slezinách nemocných myši nebylo významně odlišné. Počet NK buněk nesoucích NKR-P1C receptor (obr. 20b) se výrazně nezměnil ani v krvi ani ve slezinách. Obdobně se příliš

nelišil počet NK buněk s expresí NKG2D (obr. 20c) ve slezinách obou skupin myší (zdravé 42,6%, EAE 42,3%), ovšem v krvi byl patrný statisticky významný pokles ( $p = 0,03$ ) u EAE indukovaných myší, zdravé myši měly o 15% více těchto NKG2D+ NK buněk.



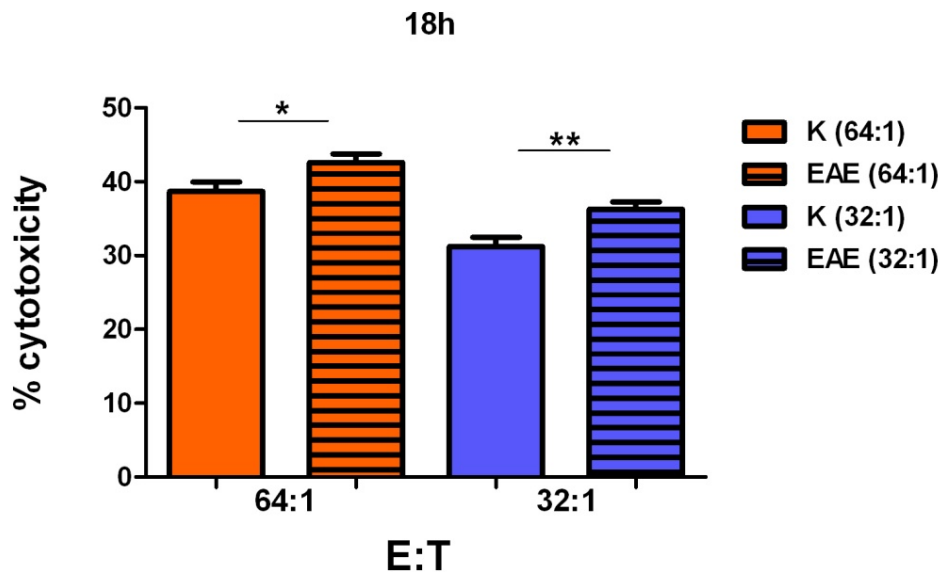
**Obrázek 11:** Zastoupení periferních a slezinných NK buněk (a) 14. den po indukci EAE. Expresí NKR1.1 (b) a NKG2D (c) aktivačních receptorů na těchto NK buňkách. Černé sloupce znázorňují zastoupení NK buněk, expresi NKR-P1C a NKG2D na těchto buňkách zdravých myší; bílé sloupce NK buňky EAE indukovaných myší v krvi i slezině, oranžové expresi NKR-P1C a modré expresi NKG2D na NK buňkách imunizovaných myší.

Pro ověření změny funkční aktivity NK buněk vyvolané odlišnou expresí aktivačních receptorů NKR-P1C a NKG2D byl opět proveden cytotoxický test.

### 1.3.2.2. Cytotoxická aktivita NK buněk 14. den po indukci EAE

Obrázek č. 21 znázorňuje změnu cytotoxicity NK buněk 14. den po indukci EAE. Buňky imunizovaných myší měly po 18 hodinách inkubace s cílovými buňkami signifikantně vyšší cytotoxickou aktivitu, a sice v obou ředěních efektorových (E) a cílových (T) buněk (64:1,  $p = 0,035$ ; 32:1,  $p = 0,0047$ ), které je vyneseno na ose x. Osa y odpovídá % cytotoxicity efektorových buněk.

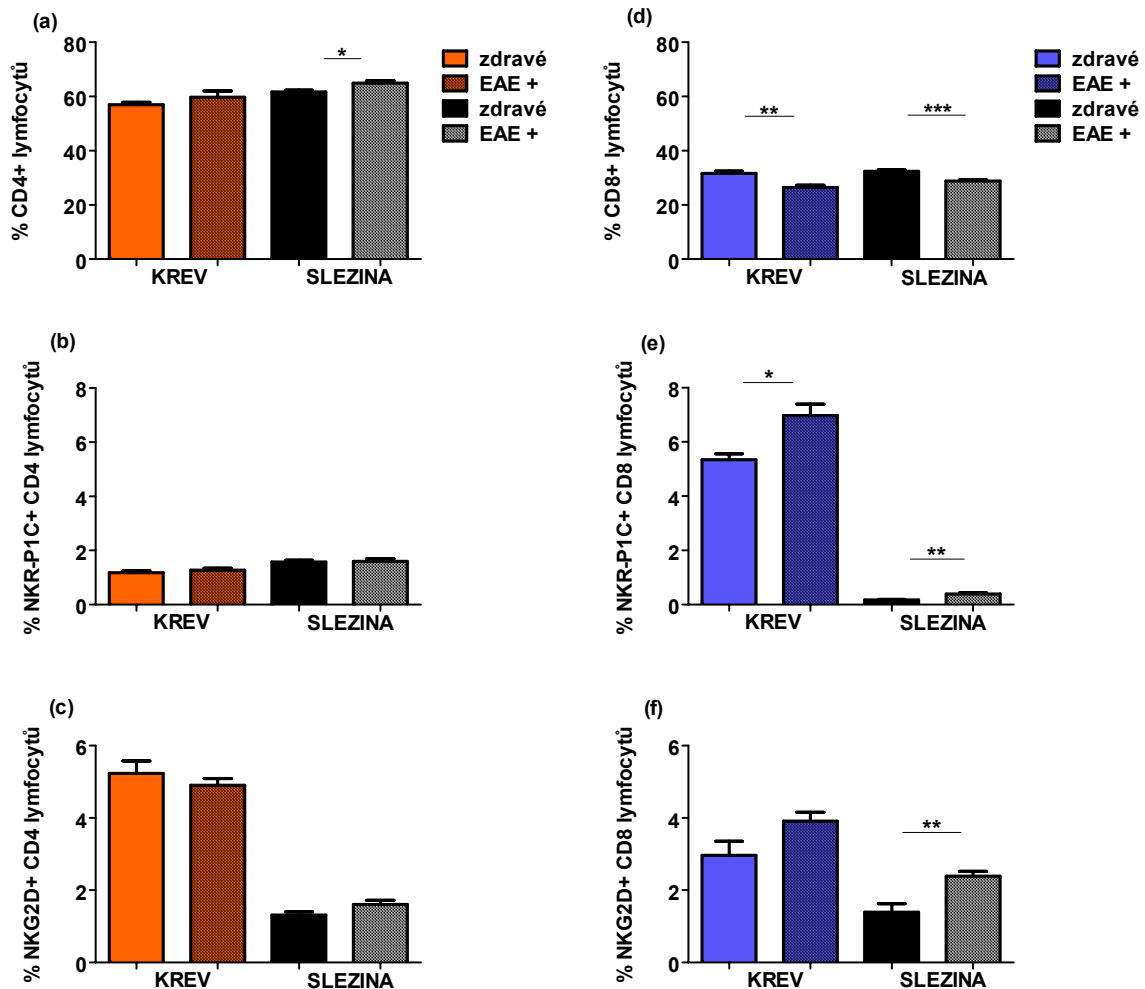




**Obrázek 12:** Cytotoxická aktivita splenocytů u EAE indukovaných myší je statisticky významně vyšší, než u zdravých kontrolních myší ( $p = 0,035$ ;  $p = 0,0047$ ). Jendotlivé sloupce znázorňují poměr efektorových a cílových buněk E:T=64:1 (oranžové), či E:T=32:1 (modré). Oba pruhované sloupce znázorňují hodnoty cytotoxicity splenocytů imunizovaných myší.

### 1.3.2.3. Relativní zastoupení $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocytů a exprese NKR-P1C a NKG2D receptorů na těchto buňkách 14. den po indukci EAE

Obrázek 22a znázorňuje zastoupení  $CD4^+$  T lymfocytů, jejichž počet ve slezině EAE+ myší statisticky významně stoupá ( $p = 0,023$ ). Exprese NKR-P1 receptoru (obr. 22b) na těchto buňkách není u EAE indukovaných myší významně odlišná, stejně jako exprese receptoru NKD2G (obr. 22c). Zastoupení  $CD8^+$  T lymfocytů v krvi i slezině (obr. 22d) statisticky významně klesá ( $p = 0,004$ ;  $p = 0,0008$ ), narozdíl od exprese NKR-P1 (obr. 22e) na těchto buňkách ( $p = 0,039$ ;  $p = 0,002$ ). Exprese NKG2D u  $CD8^+$  T buněk (obr. 22f) v krvi stoupá taktéž, signifikantně však pouze na buňkách sleziny ( $p = 0,003$ ).



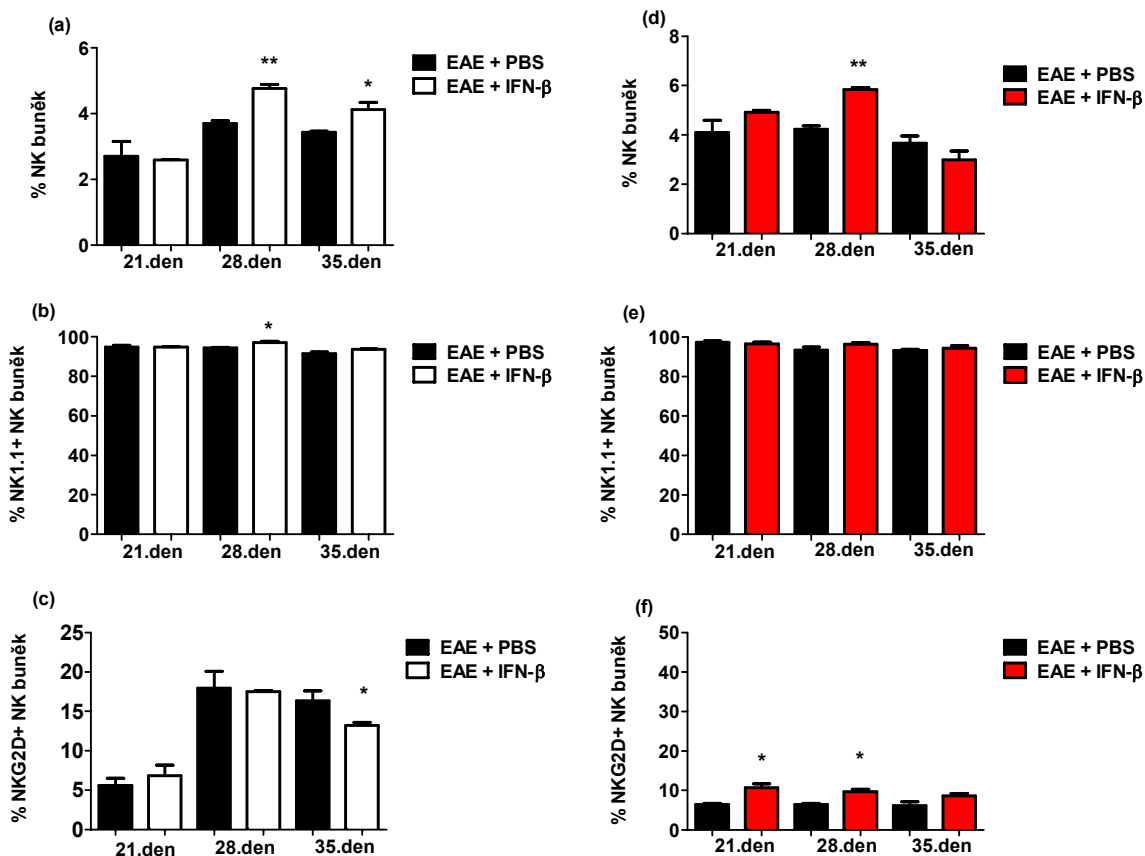
**Obrázek 13:** Zastoupení CD4+ (a) a CD8+ (d) T lymfocytů a exprese receptorů NKR-P1C (b, e) a NKG2D (c, f) na těchto buňkách v periferní krvi a slezinách zdravých a EAE pozitivních myší. Sloupce s výplní beze vzorů značí zastoupení NK buněk resp. NKR-P1C a NKG2D na těchto buňkách u zdravých myší, sloupce se šrafovanou výplní stejné parametry u imunizovaných myší. Grafy na obrázku 22 s oranžovo - černou kombinací znázorňují podíl CD4+ T lymfocytů a expresi obou receptorů, grafy modro - černé ukazují zastoupení CD8+ T lymfocytů a expresi obou receptorů na těchto buňkách.

#### 1.4. Vliv interferonu $\beta$ na imunitní odpověď u C57BL/6 myší po aktivní indukci EAE

U kontrolních myší, u kterých byla indukována EAE a kterým byl místo IFN- $\beta$  aplikován PBS, nebyly pozorovány klinické příznaky. Z tohoto důvodu nelze přesně říci, zda u léčených myší IFN- $\beta$  došlo k potlačení klinických projevů právě z důvodu léčby. Přesto byly pozorovány změny ve fenotypu a funkci NK buněk.

#### 1.4.1. Relativní zastoupení NK buněk a exprese receptorů NKR-P1C a NKG2D

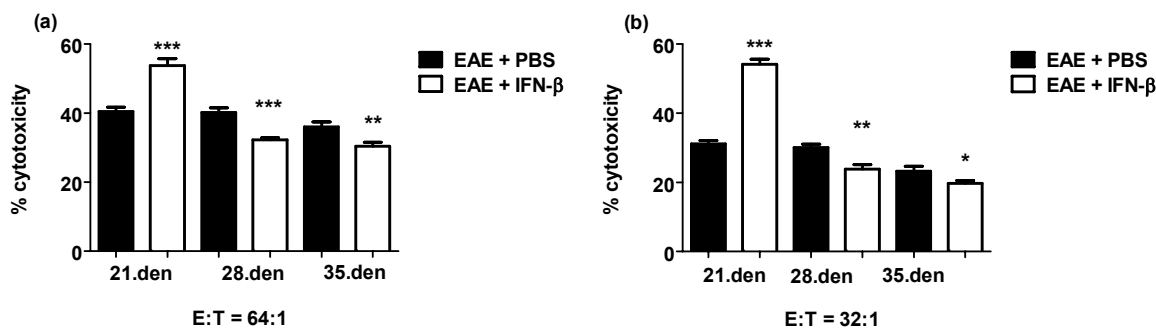
Obrázek 23a znázorňuje vliv IFN- $\beta$  na zastoupení NK buněk ve slezinách, kdy 21. den se jejich zastoupení (2. den po aplikaci léčiva) nezměnilo. Třetí den po aplikaci IFN- $\beta$  (28. den na obrázku) se jejich podíl v krvi významně zvýšil ( $p = 0,0046$ ). Zvýšený byl i u léčených myší 10. den po aplikaci léčiva ( $p = 0,044$ ). V krvi léčených myší (obr. 23d) byl třetí den po aplikaci IFN- $\beta$  (28. den) podíl NK buněk signifikantně vyšší ( $p = 0,0095$ ) než u neléčených. V posledním intervalu (35. den) je zastoupení NK buněk u léčených myší nižší (3%), zatímco u kontrolních bylo 3,7%. Přesto, že pokles není statisticky signifikantní, by důvodem tohoto poklesu mohla být dočasná deplece po jejich předchozí proliferaci způsobené IFN- $\beta$ , či jejich migrace do místa zánětu. Podíl NK buněk s vysokou expresí NKR-P1C má obdobné hodnoty ve slezinách (obr. 23b) i v krvi (obr. 23e) po celou sledovanou dobu. Po druhé dávce léčiva jejich hladina nepatrně klesla, přibližně o 2%, zatímco 28. den i 35. den je jejich hladina vyšší než u zdravých myší, a sice ve slezině 28. den signifikantně ( $p = 0,028$ ). Hladina NK buněk s nízkou expresí NKG2D receptoru ve slezinách (obr. 23c) léčených myší je 21. den o 1,2% vyšší než u myší kontrolních (5,6%). Ve zbývajících intervalech je ovšem hladina těchto buněk u léčených myší nižší, 35. den signifikantně ( $p = 0,037$ ). U kontrolní skupiny byl zaznamenán větší rozptyl hodnot mezi jednotlivými zvířaty. Zastoupení NKG2D exprimujících NK buněk v krvi (obr. 23f) léčených myší je ve všech intervalech zvýšené, statisticky významné je 21. den ( $p = 0,043$ ) a 28. den ( $p = 0,044$ ). Podíl NKG2D nesoucích NK buněk v krvi u neléčených myší v průběhu těchto tří týdnů byl v rozmezí 6,2-6,4%, ale u léčených myší v průběhu času léčby klesal: 21. den (10,7%), 28. den (9,7%) a 35. den (8,6%).



**Obrázek 14:** Vliv IFN- $\beta$  na relativní zastoupení NK buněk (a, d) a expresi receptorů NK1.1 (NKR-P1C) (b, e) a NKG2D (c, f) ve slezinách (a, b, c) a krvích (d, e, f) experimentálních zvířat. Černé sloupce reprezentují hodnoty neléčených imunizovaných C57BL/6 myší, bílé - léčených myší ve slezině a červené krevní subpopulace buněk léčených myší.

#### 1.4.2. Vliv IFN- $\beta$ na buněčnou cytotoxicitu

Cytotoxicita mononukleárních slezinných buněk proti nádorové linii YAC-1<sup>-/-</sup> je zobrazena na obrázku 24a znázorňuje ředění efektorových a cílových buněk (E:T) v poměru (64:1) a (obr. 24b) pak ředění (32:1). Cytotoxicita buněk léčených myší je významně vyšší v obou ředěních, a sice 21. den (pro obě E:T  $p < 0,0001$ ). Naopak v následných intervalech, v obou ředěních efektorových a cílových buněk je cytotoxická aktivita splenocytů léčených myší statisticky významně nižší: 28. den ( $p_{64:1} = 0,0002$ ;  $p_{32:1} = 0,002$ ) a 35. den ( $p_{64:1} = 0,002$ ;  $p_{32:1} = 0,041$ ).



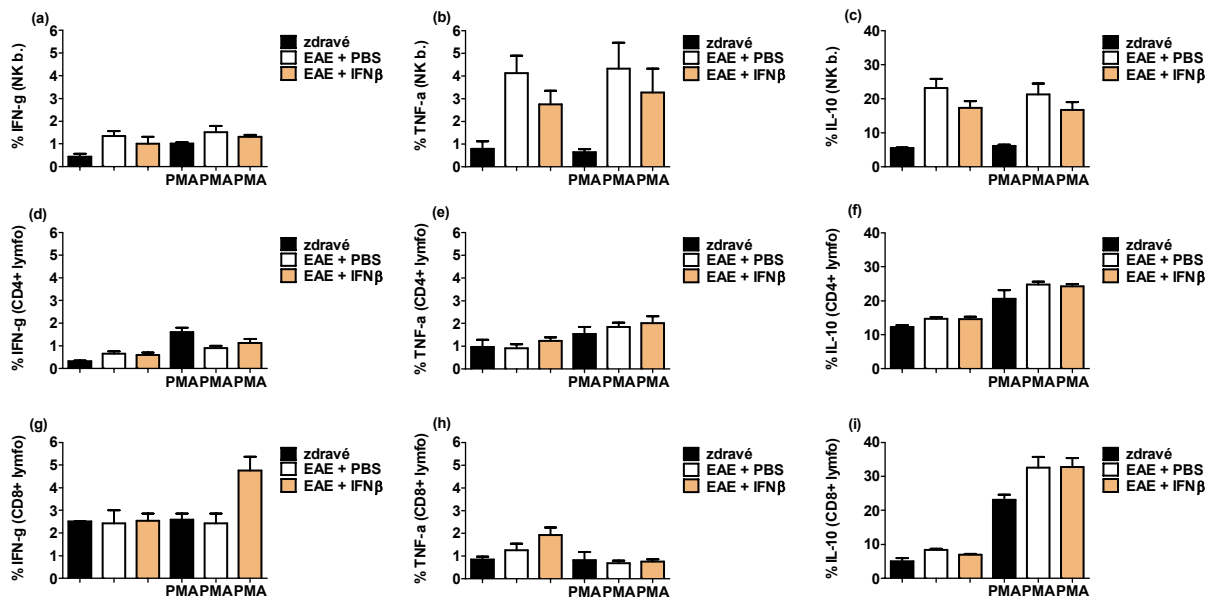
**Obrázek 15:** Cytotoxicita NK buněk myši léčených IFN- $\beta$  (bílé sloupce) statisticky významně vzrostla (21. den), později klesla oproti buňkám kontrolních myši. (a) znázorňuje poměr efektorových : cílovým buňkám 64:1, (b) poměr 32:1. Signifikance pro (a) jsou:  $p < 0,0001$ ;  $p = 0,0002$ ;  $p = 0,008$ ; pro (b):  $p < 0,0001$ ;  $p = 0,0022$ ;  $p = 0,041$ . Černé sloupce značí cytotoxicitu splenocytů neléčených a bílé sloupce léčených myši.

### 1.4.3. Vliv IFN- $\beta$ na syntézu cytokinů NK buňkami a T lymfocyty

Sledovány byly prozánětlivé cytokiny IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  a protizánětlivý IL-10. Produkce NK buňkami i oběma populacemi T lymfocytů (CD4+, CD8+) je znázorněna na obrázku č. 25. V tomto pokusu byly použity i buňky zdravých C57BL/6 myši pro odlišení změn v produkci zdravých a imunizovaných resp. léčených myši.

Produkce IFN- $\gamma$  NK buňkami (obrázek 25a) léčených i neléčených myši byla oproti jeho produkci NK buňkami zdravých myši vyšší, ale nikoliv signifikantně. Obdobný průběh byl i u produkce TNF- $\alpha$  (obr. 25b) NK buňkami všech skupin, ovšem buňky imunizovaných myši produkovaly několikanásobně vyšší množství tohoto cytokinu oproti IFN- $\gamma$ . Tabulka č. 9 uvádí výsledky statistického ANOVA testu produkce TNF- $\alpha$  NK buňkami. Významně vyšší je množství NK buněk produkujících protizánětlivý IL-10 (obr. 25c). Tabulka č. 10 uvádí výsledky statistického ANOVA testu produkce IL-10 NK buňkami. Produkce IFN- $\gamma$  CD4+ T lymfocyty (obr. 25d) po stimulaci je nejvýraznější u těchto buněk zdravých myši. Ovšem hladina CD4+ T lymfocytů produkujících TNF- $\alpha$  (obr. 25e) je u zdravých myši nejnižší. Oba prozánětlivé cytokiny jsou však těmito buňkami produkovány výrazně méně, než protizánětlivý IL-10 (obr. 25f). Obě skupiny imunizovaných myši měly vyšší podíl CD4+ buněk produkujících IL-10 v porovnání se zdravými zvířaty, které v rámci skupiny měly větší rozptyly mezi jednotlivými zvířaty. Produkce IFN- $\gamma$  CD8+ T lymfocyty (obr. 25g) se zvýšila po stimulaci PMA u buněk myši léčených IFN- $\beta$ , posun není signifikantní z důvodu rozptylu hodnot ve skupině. Produkce

TNF- $\alpha$  CD8+ buňkami (obr. 25h) nebyla po stimulaci odlišná ani u jedné skupiny zvířat. Nepatrný nárůst byl pozorován u nestimulovaných buněk imunizovaných myši. Hladina CD8+ T buněk produkujících IL-10 (obrázek 25i) je významně vyšší ve srovnání s buňkami produkujícími prozánětlivé cytokiny IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ . Tabulka 11 uvádí výsledek ANOVA testu produkce IL-10 těmito buňkami. Lymfocyty imunizovaných myši produkovaly zvýšené množství tohoto cytokinu v porovnání s buňkami zdravých kontrolních myši (obr. 25i).



**Obrázek 16:** Produkce IFN- $\gamma$  NK buňkami (a), CD4+ T lymfocyty (d) a CD8+ T lymfocyty (g). Produkce TNF- $\alpha$  NK buňkami (b), CD4+ T lymfocyty (e) a CD8+ T lymfocyty (h). Produkce IL-10 NK buňkami (c), CD4+ T lymfocyty (f) a CD8+ T lymfocyty (i). Černé sloupce reprezentují zdravé myši, bílé sloupce EAE indukované a oranžové EAE indukované myši léčené IFN $\beta$ .

Bonferroni's Test	Summary
Z vs P	*
Z vs I	ns
P vs I	ns
<b>Z vs P</b>	<b>ns</b>
<b>Z vs I</b>	<b>ns</b>
<b>P vs I</b>	<b>ns</b>

**Tabulka 9:** ANOVA test produkce TNF- $\alpha$  NK buňkami. Tučně jsou sloupce stimulovaných buněk. Z - zdravé myši, P - EAE + PBS, I - EAE + IFN- $\beta$ .

Bonferroni's Test	Summary
-------------------	---------

Z vs P	**
Z vs I	*
P vs I	ns
<b>Z vs P</b>	<b>**</b>
<b>Z vs I</b>	<b>*</b>
<b>P vs I</b>	<b>ns</b>

**Tabulka 10:** ANOVA test produkce IL-10 NK buňkami. Tučně jsou sloupce stimulovaných buněk. Z – zdravé myši, P – EAE + PBS, I – EAE + IFN- $\beta$ .

Bonferroni's Test	Summary
Z vs P	**
Z vs I	ns
P vs I	ns
<b>Z vs P</b>	<b>ns</b>
<b>Z vs I</b>	<b>ns</b>
<b>P vs I</b>	<b>ns</b>

**Tabulka 11:** ANOVA test produkce IL-10 CD8+ T lymfocyty. Tučně jsou sloupce stimulovaných buněk. Z – zdravé myši, P – EAE + PBS, I – EAE + IFN- $\beta$ .

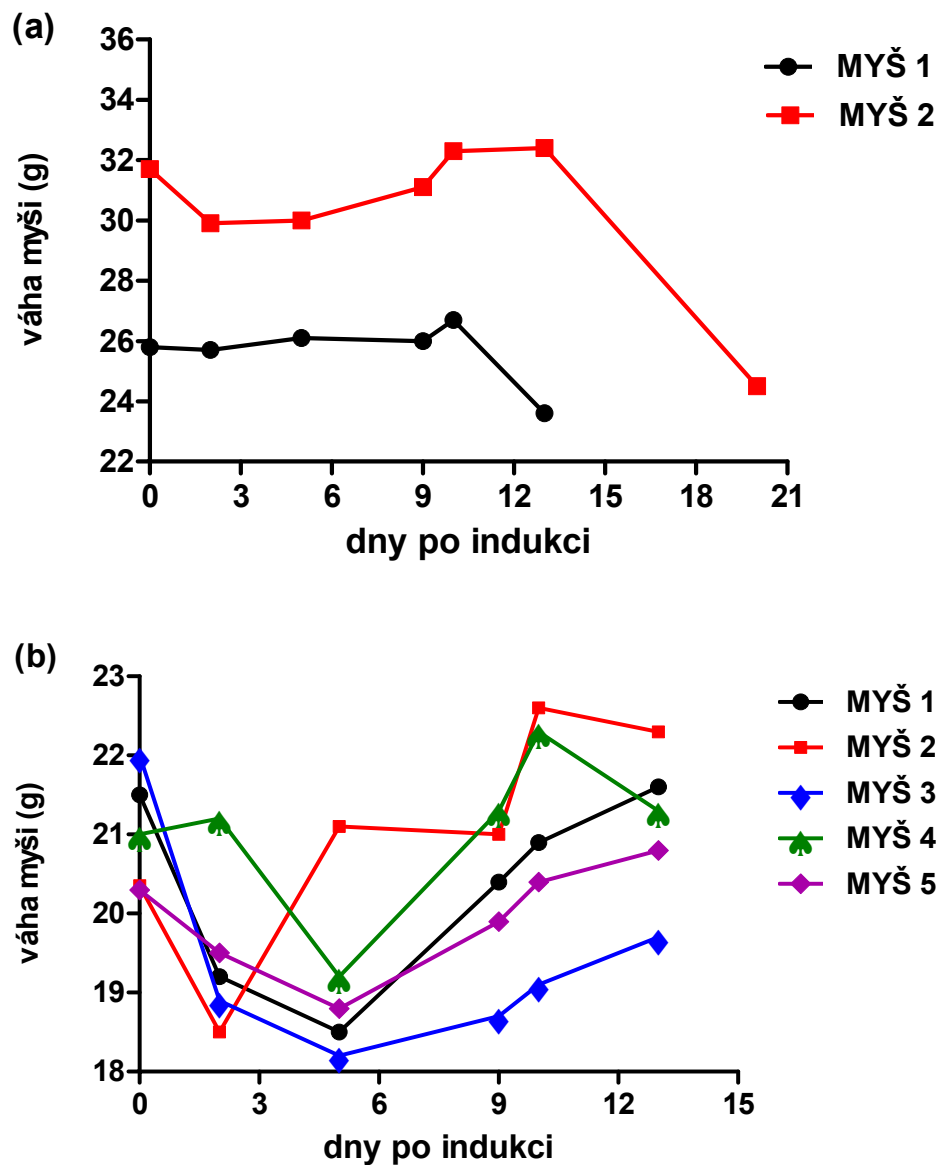
## 1.5. Indukce EAE adoptivním transferem MOG<sub>33-55</sub> - specifických T lymfocytů

C57BL/6 myši imunizované MOG<sub>35-55</sub> s CFA a dvěma dávkami PTX byly 7. den usmrceny a byly odebrány sleziny a uzliny, z nichž byly v laboratoři izolovány mononukleární buňky. Po depleci B buněk magnetickou separací byly preaktivované buňky inkubovány s MOG a IL-2 po dobu 3 dnů při 37°C. Po skončení inkubace byly buňky spočítány a naředěny do požadovaného množství pro aplikaci zdravým C57BL/6. Spolu s aplikací aktivovaných lymfocytů byl aplikován MOG<sub>35-55</sub> s CFA a dvěma dávkami PTX. Tato metoda byla použita za účelem navození klinických příznaků EAE, jež nebyly pozorovány v předchozím pokusu, ve kterém byl skupině myší aplikován IFN- $\beta$ . Obrázek č. 26 dokumentuje klinické projevy EAE vyvolané transferem *in vitro* pre-aktivovaných lymfocytů.

Obě myši (obrázek 26a) měly závažné paralýzy zadních končetin. Myš č. 1 se již sedmý den po transferu pohybovala kolébavě, s úbytkem váhy zároveň gradovala paralýza. Z toho důvodu byla myš 14. den po transferu usmrcena. U myši č. 2 se EAE

začala projevovat 13. den po indukci EAE, totální paralýza zadních končetin nastala 20. den a rovněž byla z toho důvodu usmrcena.

Myši, kterým byly přenášeny aktivované buňky slezin (obr. 26b), neměly motorické poruchy. Reakce na přenos buněk se projevila pouze v úbytku váhy. Ani 23. den se neprojevíly paralytické příznaky, proto byly myši usmrceny.



**Obrázek 17:** (a) Úbytek váhy myši, jimž byly přeneseny aktivované lymfocyty z uzlin. (b) Úbytek váhy myši, jimž byly přeneseny aktivované lymfocyty ze slezin.



## 2. Diskuze

Experimentální autoimunitní encefalomyelitida je považována za myší model lidské autoimunitní nemoci - roztroušené sklerózy. Společnými rysy obou chorob je poškození myelinových obalů nervových výběžků v důsledku imunopatologické reakce, vedoucí k poškození přenosu nervového signálu. Roztroušená skleróza u lidí je diagnostikována tehdy, jsou-li lékařským vyšetřením prokázány minimálně dva plaky v bílé hmotě CNS s patrným úbytkem myelinu (Sospedra, 2005). U lidí se tyto plaky vytváří v mozku i míše se současnou manifestací nejrůznějších klinických příznaků od poruch soustředění, paměti, depresí až po ztrátu motorických funkcí končetin a ochrnutí. U myší převládá poškození nervových drah míchy, neboť neuroantigen se převážně aplikuje subkutánně podél páteře od úrovně předních končetin směrem dolů k ocasu (Miller, 2007). Klinicky se choroba projevuje motorickými poruchami – atonický ocas, kolébavá chůze, paralýza končetin až uhybnutí zvířete (Stromnes, 2006). Dalším znakem navozené EAE může být úbytek váhy pokusného zvířete (Fagone et al., 2011).

Roztroušená skleróza je multifaktoriální onemocnění. Na její vznik mají vliv prodělané i latentní virové infekce, prostředí, stres i genetické pozadí jedince (Ascherio, 2010, Hilas, 2010). U myší řada infekcí interferuje s onemocněním, proto jsou chovány ve speciálních podmínkách - ve vzniku a rozvoji EAE je pak zapojena pouze reakce IS na podání antigenu s CFA. Zánětlivá reakce u lidí i myší je podněcována vznikem a proliferací autoreaktivních klonů Th buněk. Jejich funkce podporují fagocytující buňky, které aktivují další efektorové subpopulace (Stromnes, 2008).

Pro účely diplomové práce byly vybrány dva inbrední kmeny myší – SJL/J a C57BL/6. Oba kmeny se liší exprimovaným haplotypem MHC molekul, SJL nesou H-2<sup>s</sup> a C57BL/6 mají H-2<sup>d</sup>. SJL myši jsou standardně používány při studiu lidských autoimunitních onemocnění (Hutchings, 1986). V porovnání s C57BL/6 mají výrazně nižší počet NK buněk, to je asi 1-2% v krvi, zatímco C57BL/6 mají 4-6%. NK buňky obou kmenů jsou polymorfní v expresi receptorů NKR-P1. Dvě nejstudovanější izoformy, tedy *inhibiční* izoforma NKR-P1B u SJL myší a *aktivační* NKR-P1C u myší C57BL/6, jsou rozeznávány protilátkou PK136 (Carlyle, 2006). Ačkoliv NKR-P1C izoforma aktivuje cytolytické mechanismy a produkci cytokinů a NKR-P1B funkce NK buněk inhibuje, obě molekuly asociují se stejnou tyrozinovou kinázou p56<sup>lck</sup> (Ljutic, 2005). Myší chromozóm 6 kóduje několik genů pro receptory NKR-P1, tedy *Nkrp1a, b, c, d, f;* a také pseudogeny *Nkrp1e, g.*

Společně s receptory NKR-P1 jsou kódovány i geny jejich ligandů ze skupiny *Ocil/Clr*. Strukturální epitop NK1.1, jenž je detekován monoklonální protilátkou PK136, není sdílen všemi izoformami NKR-P1 receptorů ani stejnými izoformami u různých kmenů myší. NK1.1 mají NKR-P1B<sup>SJL</sup>, NKR-P1B<sup>Sw</sup>, NKR-P1C<sup>C57BL/6</sup>, ale ani NKR-P1C<sup>Balb/c</sup> tento epitop nemá (Carlyle, 2006). Lidské CD4<sup>+</sup> Th17 lymfocyty exprimují analog myšího NKR-P1, tedy CD161 (Annunziato et al., 2008). Receptor NKR-P1 mají i cytotoxické lymfocyty, které se nevyvíjí v thymu. U potkanů je exprimován CTL lymfocyty s receptorem TCR $\alpha\beta$  i subpopulací s TCR $\gamma\delta$  (Yrlid et al., 1996). Také je nesou NK-T lymfocyty. Molekula NKG2D rozpoznává MHC-podobné molekuly a stresové proteiny. Tento znak nesou i cytotoxické T lymfocyty a byl objeven i na CD4<sup>+</sup> T buňkách (Dai, 2009). Z těchto důvodů jsme sledovali expresi těchto receptorů i na T lymfocytech C57BL/6 myší.

EAE, stejně jako roztroušená skleróza, má více forem klinických příznaků. Může se projevit jako chronická, střídavě recidivující či akutní. U různých kmenů myší se k její indukci používají specifické peptidy myelinových proteinů či intaktní proteiny.

Pro účely této práce byly k navození EAE použity peptidy MOG<sub>35-55</sub> ve směsi s CFA a pertusovým toxinem pro C57BL/6 myši a PLP<sub>139-151</sub> ve směsi s CFA u SJL myší (Miller, 2007). U C57BL/6 myší se v první fázi experimentů klinické příznaky začaly projevovat atonií ocasu a přibližně 20. den dospěla nemoc do chronické vrcholné fáze bez remise. U SJL myší byly závažné příznaky pozorovány již sedmý den, nicméně vrcholná fáze nastoupila přibližně 20. den. Ataka byla vystřídána remisí, při níž nebyly pozorovány žádné příznaky a další záchvat nemoci se projevil kolem 50. dne po indukci. Námi pozorovaný průběh nemoci koreluje s literárními daty (Fagone et al., 2011) a vyvolává otázku, zda je příčinou této odlišnosti rozdílná exprese MHC molekul, či NKR-P1 polymorfismus těchto kmenů myší.

Zastoupení NK buněk v krvi SJL myší bylo v celém průběhu EAE statisticky významně nižší (obr. 9a). Počet NK buněk v krvi C57BL/6 výrazně klesl ve druhém týdnu po indukci EAE a poté byla jejich hladina srovnatelná s původní u zdravých myší. Hladina periferních NK buněk tak u žádného ze sledovaných myších kmenů nekoreluje s průběhem EAE. Exprese NKR-P1B izoformy u NK buněk SJL myší významně klesla šestý týden po indukci, kdy byly myši v remisi. Exprese NKG2D byla v remisní fázi také mnohokrát snížena, ovšem jeho hladina při atacích nemoci byla oproti původní hodnotě signifikantně zvýšena. Exprese NKR-P1B a NKG2D tak přímo kopíruje střídavý průběh EAE u SJL kmene myší. Zastoupení NK buněk C57BL/6 myší v krvi bylo nejnižší při

počátlích klinických projevů nemoci, tedy ve druhém týdnu po indukci EAE. Expres aktivních receptorů NKR-P1C i NKG2D byla statisticky významně snížena z počátku EAE a poté se pomalu začala vracet k původním hodnotám. Klinické projevy EAE se ovšem nezlepšovaly, což by spíše ukazovalo na zapojení NK buněk v počáteční indukci onemocnění, ne v jejím celém průběhu. Tuto hypotézu podporují i výsledky druhé série pokusů ze 14. dne po indukci, kde se počet NK buněk naopak zvýšil, a při pokusech s léčbou IFN- $\beta$  cytokinový profil PBS léčených EAE myší vykazoval vyšší produkci IL-10, zatímco klinické projevy EAE stále nebyly patrné u obou experimentů. Na NK buňkách tak u C57BL/6 kmene bude patrně závislá pouze indukce onemocnění, zatímco u SJL kmene stav NK buněk kopíruje i progresi EAE.

Zatímco u SJL kmene byl poměr Th:CTL (CD4:CD8 T buněk) v počátku onemocnění značně ve prospěch CTL, u C57BL/6 myší se přes pokles obou populací jejich poměr nijak neměnil. Tento markantní rozdíl v zastoupení T buněk by mohl mít souvislost s remisí/chronickou formou onemocnění a mohl by být příčinou změn v NK buněčné imunitě.

Pro další výzkum byly použity pouze samice kmene C57BL/6. Pro podrobnější představu o imunologickém profilu počáteční fáze EAE bylo sedmý den po indukci EAE dle výše uvedeného postupu (odst. 4.4.1.) a 14. den po indukci usmrceno 10 EAE indukovaných myší a 5 zdravých kontrol.

Podíl CD4+ buněk v krvi 7. den u imunizovaných C57BL/6 myší klesl, což může znamenat jejich přesun do periferních lymfoidních orgánů. Ve slezině se však jejich podíl nezměnil. Čtrnáctý den po imunizaci myší byl podíl CD4+ T lymfocytů v krvi i slezině snížen. Podíl CD8+ T lymfocytů v krvi 7. den stoupl, ovšem ve slezinách se nezměnil. Oproti tomu 14. den jejich podíl klesl v krvi i ve slezině. Sonobe se svým kolektivem hodnotili podíl CD4+ i CD8+ buněk ve slezině i CNS. Podíl CD4+ buněk ve slezině nejvýrazněji stoupl 12. den po indukci EAE, tedy ještě předtím, než se projeví první příznaky EAE. Počet CD8+ buněk ve slezině také nejvíce vzrostl 12. den po indukci, ovšem jejich zastoupení oproti CD4+ T lymfocytům bylo výrazně menší. V CNS byl nábor obou subpopulací T lymfocytů patrný se vzrůstem závažnosti klinických příznaků až do chronické fáze nemoci. Počáteční změny u NK buněk přes svou podobnost s hodnotami v druhém týdnu se neprokázaly statisticky významné, pouze jejich exprese NKG2D výrazně klesla. Hladina CTL 7. den v periferní krvi vzrostla na úkor poklesu Th a relativní zastoupení NKG-2D+ CD4 T lymfocytů pokleslo. Cytotoxicita splenocytů byla

ovšem signifikantně zvýšená i přes to, že ve slezinách k měřitelným odchylkám v zastoupení subpopulací nedošlo a v produkci cytokinů všemi populacemi převládlo zvýšení TNF $\alpha$  na úkor IFN $\gamma$ , což mohlo ovlivnit cytotoxickou aktivitu efektorových splenocytů po 18h inkubaci. TNF- $\alpha$  indukuje apoptózu mozkových endoteliálních buněk, ve kterých aktivuje kaspázu – 3. IFN- $\gamma$  podporuje fagocytární aktivitu makrofágů, které jsou ze slezin izolovány také, čímž nepřímo může podporovat lyzi cílových buněk a zapojení dalších efektorových mechanismů. Pro ověření funkce obou cytokinů plánujeme v dalších experimentech např. kvantifikaci exprese jejich mRNA u NK buněk i obou subpopulací T lymfocytů, či otestovat cytotoxickou aktivitu NK buněk a následně CTL po jejich pozitivní selekci.

Zastoupení NK buněk v krvi u imunizovaných myší 14. den bylo významně vyšší než u kontrolních myší, ovšem exprese NKG2D na těchto buňkách významně poklesla. Exprese NKR-P1C se nezměnila ani na NK buňkách ani na T lymfocytech z krve či slezin. Cytotoxická aktivita byla opět u EAE indukovaných myší vyšší, i přes stagnaci NK a pokles v zastoupení CTL buněk. Toto zvýšení se pak dá připsat zvýšené expresi aktivačních NKR-P1C a NKG2D na CD8+ CTL, nebo zapojení dalších buněčných subpopulací nesledovaných v těchto experimentech.

K ověření účinku IFN- $\beta$ , který se používá při léčbě lidské roztroušené sklerózy (Galligan, 2010), jsme po navození modelu EAE v dalším pokusu aplikovali IFN- $\beta$  jedné skupině myší. U kontrolních myší, kterým místo IFN- $\beta$  byl aplikován PBS, se neprojevil klinické příznaky, tudíž efekt IFN- $\beta$  na projev EAE můžeme pouze odhadnout na základě změn v imunologickém profilu. Interferon  $\beta$  zvýšil u léčených myší zastoupení NK buněk s vysokou expresí NKR-P1C a to ve slezinách i v krvi. V krvi také zvýšil expresi receptoru NKG2D na NK buňkách. Ve slezinách ovšem exprese NKG2D receptoru klesla, tedy tři dny po aplikaci dávky IFN- $\beta$ , a cytotoxická aktivita splenocytů byla nižší než u buněk neléčených myší. Léčené myši měly menší hladinu NK buněk produkujících IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ale také IL-10, ovšem CTL produkujících IFN- $\gamma$  měly výrazně vyšší zastoupení v porovnání s neléčenými zvířaty. Zastoupení T buněk produkujících protizánětlivý IL-10 nebyl výrazně odlišný u léčených a neléčených myší. Z těchto dat nemůžeme přesně vyvodit, jaký účinek má aplikace IFN- $\beta$  na zmírnění průběhu EAE. Patrně bude třeba přepracovat schéma aplikace léčiva, doplnit imunologický profil i v dřívějších intervalech a především zvážit, zda používáme vhodné koncentrace jednotlivých látek při indukci EAE. Miller a spol. uvádí tři dávky PTX (Miller, 2007), jiné protokoly dávky

pouze dvě (Barr, 2012). Také koncentrace *M. tuberculosis* je uváděna v rozmezí 200 - 500 µg/1ml nekompletního Freundova adjuvna.

Z důvodu nízké úspěšnosti vzniku a vývoje EAE aktivní indukci jsme vyzkoušeli druhý mechanismus navození EAE, a sice přenos aktivovaných MOG<sub>35-55</sub> specifických lymfocytů. Ze sedmi dárcovských myší, kterým byla aktivně indukována EAE, jsme získali dostatečný počet buněk na přenos sedmi C57BL/6 myším (Stromnes, 2006). Myši, kterým byly přeneseny *in vitro* aktivované buňky izolované z uzlin, vyvinuly závažné paralytické příznaky nemoci (skóre 3-4).

Jakým směrem se může náš výzkum dále zaměřit? Zapojení a nezbytnost NK buněk, Th či CTL v iniciaci a progresi EAE můžeme v budoucnu dále studovat jejich řízenou deplecí z IS pokusných zvířat a následnou indukci onemocnění. Sledování rozdílů mezi nativním a NK, Th či CTL depletovaným modelem by mohlo přinést nové informace a postřehy, nutné k pochopení mechanismů vedoucích k rozvoji a progresi EAE. Další možností je vytvoření knock-out kmenů myší, postrádající NKRP1C (či NKRP1B u SJL kmene) a pozorovat rozdíly v indukci a progresi onemocnění.

### **3. Závěr**

Závěrem práce můžeme shrnout, že NK buňky se v průběhu progresu EAE aktivují jak cytotoxicky, tak cytokin-sekrecně a že mají na průběh onemocnění nezanedbatelný vliv. Tento vliv je dále závislý na kmeni použitých myší - u SJL imunologický profil NK buněk

kopíruje klinické příznaky, u C57BL/6 se mění nejvýrazněji při indukci onemocnění. Dále bylo z dat patrné, že poměr CD4:CD8 lymfocytů periferní krve se u obou kmenů z počátku EAE značně liší a může stejně jako exprese odlišných (aktivační/inhibiční) izoformem NKR-P1 ovlivňovat průběh indukce a průběhu EAE.

Klinické příznaky se u C57BL/6 myši projevily pouze v první sérii pokusů (myši sledovány až do 9. týdne), kde byl v závislosti na projevech nemoci patrný pokles hladiny NK buněk a NKR-P1C+ subpopulace. V dalším pokusu, kdy do 14. dne ještě klinické příznaky EAE nebyly patrné, se zastoupení NK buněk, stejně jako jejich NKG2D+ subpopulace zvyšovala.

Relativní distribuce CD4+ T lymfocytů je 7. den snížena a současně narůstá počet NKR-P1C+ Th buněk v krvi ale ne ve slezině. Ve 14. dnu je jejich zastoupení ve slezině vyšší zřejmě v důsledku jejich proliferace.

Podíl cytotoxických CD8+ T lymfocytů 7. den po indukci EAE v periferní krvi stoupl ale exprese NKR-P1C i NKG2D receptorů klesala. Naproti tomu 14. den jsou podíly CTL sníženy v krvi i slezině a exprese obou aktivačních receptorů stoupá.

Aplikace IFN- $\beta$  ovlivnila především NK buňky, u T lymfocytů nebyly nalezeny signifikantní změny. Došlo ke zvýšení jejich podílu v krvi i ve slezině, zvýšení počtu NKG2D+ NK buněk a exprese NKR-P1C receptoru se vrátila na hodnoty zdravých kontrolních myší. Dalším pozitivním účinkem terapie IFN- $\beta$  bylo snížení produkce TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  a IL-10 NK buňkami a aktivace cytolytické výkonné funkce.

## 4. Seznam použité literatury

ANNUNZIATO, F., COSMI, L., LIOTTA, F., MAGGI, E. & ROMAGNANI, S. 2008. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol*, 20, 1361-8.

- ARANAMI, T., YAMAMURA, T. 2008. Th17 Cells and Autoimmune Encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergology International*, 115-20.
- ASCHERIO, A. A. M., K.L. 2010. Epstein-Barr Virus Infection and Multiple Sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol*, 271-77.
- AWASTHI, A. A. K., V.K. 2009. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *International Immunology*, 489-98.
- BARR, T. A. E. A. 2012. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 1001-09.
- BELL, J. K., MULLEN, G.E.D., LEIFER, C.A., MAZZONI, A., DAVIES, D.R., SEGAL, D.M. 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *TRENDS in Immunology*, 528-33.
- BIASSONI, R., CANTONI, C., PENDE, D., SIVORI, S., PAROLINI, S., VITALE, M., BOTTINO, C. & MORETTA, A. 2001. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunological Reviews*, 181, 203-214.
- BRINKMANN, V., BILLICH, A., BAUMRUKER, T., HEINING, P., SCHMOUDER, R., FRANCIS, G., ARADHYE, S., BURTIN, P. 2010. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 883-97.
- CARLYLE, J. R., MESCI, A., LJUTIC, B., BELANGER, S., TAI, L.H., ROUSSELLE, E., TROKE, A.D., PROTEAU, M.F. AND MAKRIGIANNIS, A.P. 2006. Molecular and Genetic Basis for Strain-Dependent NK1.1 Alloreactivity of Mouse NK Cells. *The Journal of Immunology*, 176, 7511-24.
- COLONNA, M., TRINCHIERI, G., LIU, Y-J. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology*, 1219-26.
- COOPER, M. A., FEHNIGER, T.A., CALIGUIRI, M.A. 2011. The biology of human natural killer-cell subsets. *TRENDS In Immunology*, 633-40.
- COQUET, J. M., CHAKRAVARTI, S., SMYTH, M. J. & GODFREY, D. I. 2008. Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*, 180, 7097-7101.
- CRAVENS, P. D., HUSSAIN, R.Z., STÜVE, O. ET AL. 2011. Lymph node,drived donor encephalitogenic CD4+ T cells in C57BL/6 mice adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis highly express GM-CSF and T-bet. *Journal of Neuroinflammation*.
- CUA, D. J., SHERLOCK, J., CHEN, Y., MURPHY, C. A., JOYCE, B., SEYMOUR, B., LUCIAN, L., TO, W., KWAN, S., CHURAKOVA, T., ZURAWSKI, S., WIEKOWSKI, M., LIRA, S. A., GORMAN, D., KASTELEIN, R. A. & SEDGWICK, J. D. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421, 744-748.
- DAI, Z., TURTLE, C.J., GROH, V. ET AL 2009. Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus. *The Journal of Experimental Medicine*, 793-805.
- DE SAINT BASILE, G., MÉNASCHÉ, G., FISCHER, A. 2008. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Reviews*, 568-79.
- DITTEL, B. N., URBANIA, T. H. & JANEWAY, C. A. 2000. Relapsing and remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in B cell deficient mice. *Journal of Autoimmunity*, 14, 311-318.

- DITTER, B. N. 2000. Evidence that Fas and FasL contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 381-8.
- FAGONE, P., MANGANO, K., QUATTROCCHI, C., MOTTERLINI, R., DI MARCO, R., MAGRO, G., PENACHO, N., ROMAO, C. C. & NICOLETTI, F. 2011. Prevention of clinical and histological signs of proteolipid protein (PLP)-induced experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice by the water-soluble carbon monoxide-releasing molecule (CORM)-A1. *Clin Exp Immunol*, 163, 368-74.
- FERREIRA, M. L. B. 2010. Cognitive deficits in multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr*, 632-41.
- FIFE, B. T. A. B., J.A. 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways *Immunological Reviews*, 166-82.
- FILLATREAU, S., SWEENIE, C. H., MCGEACHY, M. J., GRAY, D. AND ANDERTON, S. M. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.*, 944-50.
- FOSSIEZ, F., DJOSSOU, O., CHOMARAT, P. ET AL. 1996. T cell interleukin- 17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.*, 2593-2603.
- FRANSSON, M., PIRAS, E., BURMAN, J. ET AL. 2012. CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 112-21.
- GALLIGAN, C. L., PENNEL, L.M., MOOROKA, T.T., BAIG, E., MAJCHR-ZAK, K., RAHBAR, E., FISH, E.N. 2010. Interferon-  $\beta$  is a key regulator of proinflammatory events in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler*, 1458-72.
- GEISSMANN, F., MANZ, M.G., JUNG, S, SIEWEKE, M.H., MERAD, M., LEY, K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 656-61.
- HILAS, O. P., P.N., LAM, S. 2010. Disease Modifying Agents for Multiple Sclerosis. *The Open Neurology Journal*, 4, 15-24.
- HJELMSTROM, P., JUEDES, A. E., FJELL, J. & RUDDLE, N. H. 1998. Cutting edge: B cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization. *Journal of Immunology*, 161, 4480-4483.
- HOGQUIST, K. A., BALDWIN, T. A. & JAMESON, S. C. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*, 5, 772-82.
- HUBER, L., HEINK, S. ET AL. 2009. A Th17-like developmental process leads to CD8+ cells with reduced cytotoxic activity. *Eur. J. Immunol*, 1716-25.
- HUTCHINGS, P. R., VAREY, A.M. AND COOKE, A. 1986. Immunological defects in SJL mice. *Immunology*, 445-50.
- CHEN, M. L., YAN, B.S., KORORIZ, D., WEINER, H.L. 2009. Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF- $\beta$ - and IFN- $\gamma$ - dependent mechanism. *Eur J. Immunol*, 3423-35.
- IIZUKA, K., NAIDENKO, O.V., PLOUGASTEL, B.F.M., FREMONT, D.H., YOKOYAMA, W.M. 2003. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR1P family of natural killer cell receptors. *Natur Immunology*, 801-07.
- ISAKSSON, M., ANDERSJÖ, B., RÖNNBLUM, L., KÄMPE, O., LASSMANN, H., ELORANTA, M.L., LOBELL, A. 2009. Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur. J. Immunol.*, 2925-35.
- ISAKSSON, M., LUNDGREN, B.A., AHLGREN, K.M., KÄMPE, O., LOBELL, A, 2012. Conditional DC depletion does not affect priming of encephalitogenic Th cells in EAE. *Eur. J. Immunol.*, 1-9.



- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11, 373-384.
- KAWAI, T. A. A., S. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews*, 499-511.
- KEBIR, H., KREYMBORG, K., IFERGAN, I., DODELET-DEVILLERS, A., CAYROL, R., BERNARD, M., GIULIANI, F., ARBOUR, N., BECHER, B., PRAT, A. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med*, 1173-75.
- KELCHTERMANS, H., BILLIAU, A. AND MATTHYS, P. 2008. How interferon-g keeps autoimmune diseases in check. *Trends in Immunology*, 479-85.
- KIMURA, A. A. K., T. 2010. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol*, 1830-35.
- KROENKE, M. A., CARLSON, T.J., ANDJELKOVIC, A.V., SEGAL, B.M. 2008. IL-12 and IL-23 - modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J. Exp. Med.*, 1535-41.
- LANGRISH, C. L., CHEN, Y., BLUMENSCHNEIN, W. M., MATTSON, J., BASHAM, B., SEDGWICK, J. D., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R. A. & CUA, D. J. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 201, 233-240.
- LEE, G. R., KIM, S.T., SPILIANIKIS, C.G., FIELDS, P.E., FLAVELL, R.A. 2006. T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. *Immunity*, 369-79.
- LJUTIC, B., CARLYLE, J.R., FILIPP, D. ET AL. 2005. Functional Requirements for Signaling through the Stimulatory and Inhibitory Mouse NKR-P1 (CD161) NK Cell Receptors. *The Journal of Immunology*, 4789-96.
- LYONS, J. A., SAN, M., HAPP, M.P., CROSS, A.H. 1999. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *Eur. J. Immunol.* 29 3432-39.
- MARTA, M., ANDERSSON, A., ISAKSSON, M., KÄMPE, O., LOBELL, A. 2008. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.*, 365-75.
- MARTA, M., MEIER, U.C., LOBEL, A. 2009. Regulation of autoimmune encephalomyelitis by toll-like receptors. *Autoimmunity Reviews* 8, 506-509.
- MARTÍN-SAAVEDRA, F. M., FLORES, N., DORADO, B., EGUILUZ, C., BRAVO, B., GARCÍA-MERINO, A., BALLESTER, S. 2007. Beta-interferon unbalances the peripheral T cell proinflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecula Immunology*, 3597-3607.
- MARTINEZ-RODRIGUEZ, J. E., LOPEZ-BOTET, M., MUNTEIS, E., RIO, J., ROQUER, J., MONTALBAN, X. & COMABELLA, M. 2011. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clinical Immunology*, 141, 348-356.
- MATSUSHITA, T., HORIKAWA, M., IWATA, Y. & TEDDER, T. F. 2010. Regulatory B Cells (B10 Cells) and Regulatory T Cells Have Independent Roles in Controlling Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Initiation and Late-Phase Immunopathogenesis. *Journal of Immunology*, 185, 2240-2252.
- 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. *Journal of Clinical Investigation*, 118, 3420-3430.
- MCQUILLAN, K., LYNCH, M.A., MILLS, K.H.G. 2010. Activation of mixed glia by Ab-specific Th1 and Th17 cells and its regulation by Th2 cells. *Brain, Behavior and Immunity*, 597-607.

- MILLER, S. D., KARPUS, W.J., DAVIDSON T.S. 2007. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol*, unit 15.1.
- MOSSMAN, T. R. A. S., S. 1996. The expanding universe subsets: Th1, Th2 and more. *IMMUNOLOGY TODAY*, 138-46.
- MURPHY, Á. C., LALOR, S.J., LYNCH, M.A., MILLS, K.H.G. 2010. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, Behavior and Immunity*, 641-51.
- MYERS, K. J., SPRENT, J., DOUGHERTY, J.P., RON, Y. 1992. Synergy between encephalitogenic T cells and myelin basic protein-specific antibodies in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*41, 1-8.
- NAJAFIAN, N., CHITNIS, T., SALAMA, A. D., ZHU, B., BENOUE, C., YUAN, X., CLARKSON, M. R. ET AL. 2003. Regulatory functions of CD81 CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J. Clin. Invest.*, 1037-48.
- NEMAZEE, D. 2006. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 728-40.
- NIMMERJAHN, F. A. R., J.V. 2008. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8:, 34-47.
- NOVAK, J. A. L., A. 2010. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine*, 1-8.
- O'CONNOR, R. A., PRENDERGAST, C.T., SABATOS, C.A., LAU, C.W., LEECH, M.D., WRAITH, D.C., ANDERTON, S.M 2008. Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol*, 3750-54.
- ORMEROD, M. G. 2000. *Flow Cytometry, 3rd edition*, OXFORD, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS.
- PALMER, E. 2003. Negative selection - cleaning out the bad apples from T cell repertoire. *Nature Reviews Immunology*, 383-91.
- RAY, A., MANN, M.K., BASU, S., DITTEL, B.N. 2011. A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 230, 1-9.
- SARMA, J. D. 2010.  $\gamma\delta$  T cells and IL-17/IL-17R signaling axis in CNS inflammation. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, 149-55.
- SOBEL, R. A., TUOHY, V.K., LEES, M.B. 1991. PARENTAL MHC MOLECULE HAPLOTYPE EXPRESSION IN (SJL/J X SWR)F MICE WITH ACUTE EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS INDUCED WITH TWO DIFFERENT SYNTHETIC PEPTIDES OF MYELIN PROTEOLIPID PROTEIN. *The Journal of Immunology*, 543-49.
- SONDEREGGER, I., KISIELOW, J., MEIER, R., KING, C. & KOPF, M. 2008. IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *European Journal of Immunology*, 38, 1833-1838.
- SONOBE, Y., JIN, S., WANG, J., KAWANOKUCHI, J., TAKEUCHI, H., MIZUNO, T., SUZUMURA, A. 2007. Chronological changes of the CD4+ and CD8+ T cell subsets in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis. *Tohoku J. Exp. Med.*, 329-39.

- SONODA, K. H., FAUNCE, D.E., TANIGUCHI, M., EXLEY, M., BALK, S., STEIN-STREILEIN, J. 2001. NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J. Immunol.*, 42-50.
- SOSPEDRA, M. A. M., R. 2005. IMMUNOLOGY OF MULTIPLE SCLEROSIS. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683-747.
- STROMNES, I. M., CERRETTI, L.M., LIGGITT, D., HARRIS, R.A., GOVERMAN, J.M. 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by TH1 and TH17 cells. *Nat Med.*
- STROMNES, I. M., GOVERMAN, J.M. 2006. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, 1952-60.
- TONEGAWA, S. 1988. Antibody and T-cell receptors. *JAMA.* 259, 1845-1847.
- VON BOEHMER, H. & KISIELOW, P. 1990. Self-nonsel self discrimination by T cells. *Science*, 248, 1369-73.
- WEISHAUPT, A. E. A. 2000. Molecular Mechanisms of High-Dose Antigen Therapy in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Rapid Induction of Th1-Type Cytokines and Inducible Nitric Oxide Synthase. *J Immunol*, 7157-63.
- WEKERLE, H., SUN, D., OROPEZA-WEKERLE, R.L., MEYERMANN, R. 1987. Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J. Exp. Biol.*, 43-57.
- WINKELMANN, A., ENGE, L. C., APEL, C., ZETTL, U.K. 2007. Cognitive impairment in Multiple Sclerosis. *J. Neurol. suppl* 2., 35-42.
- XU, S., JORDAN, K., LI, W., YANG, Y., CHESNICK, S.A., WEBSTER, H., BROCKE, S., QUIGLEY, L., MCFARLAND, H.F., FRANK, J.A. 1988. In Vivo Three-dimensional MR Microscopy of Mice with Chronic Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis after Treatment with Insulin-like Growth Factor-I. *AJNR Am J Neuroradiol*, 653-58.
- YRLID, U., PETERSSON, E., DOHLSTEN, M. & HEDLUND, G. 1996. TCR alpha beta+ anti-tumor cytolytic T lymphocytes express NKR-P1 while the anti-tumor activity of TCR gamma delta+ T lymphocytes is not correlated to NKR-P1 expression. *Cellular Immunology*, 173, 287-94.
- ZHANG, B. B., YAMAMURA, T., KONDO, T., FUJIWARA, M., TABIRA, T. 1997. Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Natural Killer (NK) Cells. *J. Exp. Med.*, 1677-87.
- ZHOU, X. E. A. 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature Immunology*, 1000-08.

Opravy stávajícího souboru:

- český abstrakt: upřesněn
- anglický abstrakt: oprava překladu
- výsledky: grafická úprava (zvětšení), podrobnější popisy obrázků
- diskuze: upravena a rozšířena
- závěr: rozšířen
- seznam pramenů: změna formátu citací, změna seznamu literatury