

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Iva Novosádová

Imunologický profil experimentální autoimunitní
encefalomyelitidy

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Anna Fišerová, CSc.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Anny Fišerové, CSc. v Laboratoři přirozené buněčné imunity, Sektoru imunologie a gnotobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR 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

.....

Iva Novosádová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce MUDr. Anně Fišerové, CSc. za vedení a pomoc při vypracovávání mé diplomové práce. Dále chci poděkovat RNDr. Kataríně Čapkové, PhD. a Mgr. Janu Richterovi za pomoc při metodické práci a vyhodnocení výsledků a Dr. Hříbalové za pomoc při *in vivo* pokusech. Také děkuji všem dalším členům Laboratoře přirozené buněčné imunity MBÚ AV ČR za trpělivost, rady a cenné poznámky.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům a přátelům za psychickou i materiální podporu po dobu mého studia.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory grantu GAAV ČR IAA 601680801

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 (angl. T helper cell) Th1 a Th17 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. NK buňky na svém povrchu nesou širokou škálu inhibičních a aktivačních receptorů. V obou skupinách má své zastoupení skupina receptorů C-lektinové rodiny NKR-P1. Ligand aktivační formy NKR-P1C není dosud znám, z tohoto důvodu bylo sledováno jeho zapojení v EAE. Dalším cílem bylo použití léčiva s ohledem na zlepšení průběhu choroby.

Pro účel diplomové práce byly nejprve použity dva inbrední kmeny myší lišící se expresí NKR-P1 receptoru na NK buňkách. SJL/J myši (exprimují *inhibiční NKR-P1B*) a C57BL/6 (exprimují *aktivační NKR-P1C*).

U SJL myší byla pozorována střídavě recidivující encefalomyelitida a u C57BL/6 chronická forma EAE. U obou kmenů myší byly detekovány změny počtu NK buněk i v expresi jejich receptorů NKR-P1 a NKG2D. Interferon beta dále příznivě ovlivnil aktivitu NK buněk i hladinu jimi produkovaného 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 Th1 and Th17 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. NK cells express a wide range of inhibitory and activation receptors from the C-lectin-like receptor superfamily. The specific ligand of the activating NKR-P1C isoform is still unknown and thus this receptor's involvement in EAE was also observed. 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 (expression activating NKR-P1C).

SJL mice elicited a relapse-remitting of EAE, while C57BL/6 had chronic EAE. Both mouse strains exerted changes in the counts of NK cells and in the expression of their NKR-P1 and NKG-2D receptors. Moreover, interferon beta upregulated NK cell activity and their IL-10 production.

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování	3
Český abstrakt	4
Anglický abstrakt	5
Obsah	6
Seznam použitých zkratk	8
1. Literární úvod	10
1.1. Autoimunita	10
1.1.1. Roztroušená skleróza (RS)	11
1.1.2. Imunologické mechanismy zapojené v RS	12
1.2. Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE)	13
1.2.1. Indukce EAE	13
1.2.2. Imunologický profil EAE	15
1.2.2.1. Zapojení antigen-prezentujících buněk v indukci EAE	15
1.2.3. Zapojení výkonných buněk IS v rozvoji EAE	18
1.2.3.1. Změny poměru a funkcí CD4+ a CD8+ lymfocytů v průběhu EAE	20
1.2.4. Zapojení regulačních imunitních buněk na průběh EAE	21
1.2.4.1. NK buňky	21
1.2.4.2. NK-T lymfocyty	22
1.2.4.3. T lymfocyty	22
1.2.4.4. Regulační $\alpha\beta$ T lymfocyty (Treg)	22
1.2.4.5. B lymfocyty	23
2. Cíle práce	24
2.1. Sledované parametry	24
3. MATERIÁL	25
3.1. Experimentální zvířata	25
3.2. Chemikálie	25
3.3. Média a roztoky	26
3.4. Přístroje a pomůcky	28
3.5. Použité monoklonální protilátky pro FACS	29
4. METODY	30
4.1. Aplikace antigenu	30
4.1.1. Aktivní indukce EAE	30
4.1.2. Pasivní indukce EAE	30
4.1.2.1. Antigenní stimulace myelin specifických T lymfocytů in vitro	31
4.2. Klinické hodnocení	31
4.3. Protokol aplikace interferonu beta (IFN- β)	31
4.4. Izolace a příprava imunitních buněk	32
4.4.1. Příprava imunitních buněk z periferní krve pro FACS analýzy	32
4.4.2. Izolace mononukleárních buněk ze sleziny a uzlin	32
4.4.3. Magnetická separace (MACS)	33
4.5. Průtoková cytometrie (FACS)	33
4.5.1. Značení buněk pro určení povrchových znaků	34
4.5.2. Značení buněk pro určení intracelulárních znaků	34
4.6. Test NK buněčné cytotoxicity	35
4.6.1. Linie cílových buněk pro test cytotoxicity	36
4.7. Statistické vyhodnocení výsledků	36
5. Výsledky	37

5.1.	Postup vyhodnocení FACS analýz pro identifikaci povrchových znaků a i intracelulární detekci cytokinů	37
5.1.1.	Analýza povrchových znaků	37
5.1.2.	Intracelulární detekce cytokinů	38
5.2.	Klinický průběh a imunologický profil aktivně indukované EAE u SJL myší	39
5.2.1.	Klinické parametry	39
5.2.2.	Zastoupení NKp46+ CD3- NK buněk v periferní krvi SJL myší v průběhu EAE. Exprese receptorů NKR-P1B a NKG2D.....	40
5.2.3.	Relativní zastoupení NKp46- CD3+ T buněk nesoucích znak CD4 nebo CD8 v periferní krvi SJL myší v průběhu EAE.	42
5.3.	Klinický průběh a imunologický profil aktivně indukované EAE u C57BL/6 myší.....	42
5.3.1.	Klinické parametry	42
5.3.2.	Relativní zastoupení NKp46+ CD3- NK buněk v periferní krvi C57BL/6 myší v průběhu EAE. Exprese receptorů NKR-P1C a NKG2D.	44
5.3.3.	Relativní zastoupení NKp46- CD3+ T buněk nesoucích znak CD4 nebo CD8 v periferní krvi C57BL/6 myší v průběhu EAE.	45
5.4.	Porovnání imunologických změn ve slezině a periferní krvi u C57BL/6 myší 7. a 14. po aktivní indukci EAE	46
5.4.1.	Imunitní odpověď 7. den po indukci EAE	46
5.4.1.1.	<i>Relativní zastoupení NK buněk 7. den po indukci EAE a exprese aktivačních receptorů NKR-P1C a NKG2D na těchto buňkách.....</i>	46
5.4.1.2.	<i>Cytotoxická aktivita NK buněk 7. den po indukci EAE.....</i>	48
5.4.1.3.	<i>Relativní zastoupení CD4+ a CD8+ T lymfocytů a exprese NKR-P1 a NKG2D na těchto buňkách, 7. den po indukci EAE.....</i>	48
5.4.1.4.	<i>Syntéza cytokinů IFN-γ, TNF-α, IL-10 subpopulacemi NK a T lymfocytů, 7. den po indukci EAE.....</i>	50
5.4.2.	Imunitní odpověď 14. den po indukci EAE.....	52
5.4.2.1.	<i>Relativní zastoupení NK buněk 14. den po indukci EAE a exprese aktivačních receptorů NKR-P1C a NKG2D na těchto buňkách.....</i>	52
5.4.2.2.	<i>Cytotoxická aktivita NK buněk 14. den po indukci EAE.....</i>	53
5.4.2.3.	<i>Relativní CD4+ a CD8+ T lymfocytů a exprese NKR-P1C a NKG2D receptorů na těchto buňkách 14. den po indukci EAE.....</i>	54
5.5.	Vliv interferonu β na imunitní odpověď u C57BL/6 myší po aktivní indukci EAE	56
5.5.1.	Relativní zastoupení NK buněk a exprese receptorů NKR-P1C a NKG2D.....	56
5.5.2.	Vliv IFN- β na NK buněčnou cytotoxicitu	57
5.5.3.	Vliv IFN- β na syntézu cytokinů NK buněk a T lymfocytů	58
5.6.	Indukce EAE adoptivním transferem MOG ₃₃₋₅₅ - specifických T lymfocytů.....	59
6.	Diskuze	60
7.	Závěr	64
8.	Citovaná literatura	65

Seznam použitých zkratek

AI	autoimunita (autoimmunity)
APC	antigen prezentující buňka (antigen presenting cell)
BBB	hematoencefalická bariéra (blood – brain barrier)
BCR	receptor B lymfocytů (B cell receptor)
CFA	kompletní Freundovo adjuvans (complete Freund's adjuvans)
CSF	mozkomíšní tekutina (cerebrospinal fluid)
CTL	cytotoxický T lymfocyt (cytotoxic T lymphocyte)
DC	dendritické buňky (dendritic cells)
pDC	plazmacytoidní dendritické buňky (plasmacytoid DC)
dH2O	deionizovaná voda (deionized water)
DTR	receptor pro difterický toxin (diphtheria toxin receptor)
EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida (experimental autoimmune encephalomyelitis)
ER	endoplazmatické retikulum (endoplasmic reticulum)
FACS	průtoková cytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FPBS	fyzilogický roztok pro průtokovou cytometrii (FACS phosphate buffered saline)
FTS	fetální telecí sérum (fetal bovine serum)
gp	glykoprotein (glycoprotein)
IFN- β	interferon beta
Ig	imunoglobulin (immunoglobulin)
IL	interleukin
IS	imunitní systém (immune system)
KD	kostní dřeň (bone marrow)
MACS	magnetická separace buněk (magnetic associated cell sorting)
MBP	myelinový bazický protein (myelin basic protein)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MOG	myelinový oligodendrocytární glykoprotein (myelin oligodendrocyte glycoprotein)

NEAA	neesenciální aminokyseliny (non - essential amino acid)
NK	přirozené zabíječské buňky (natural killer cells)
PBMC	buňky periferní krve (peripheral blood mononuclear cells)
PLP	proteolipidový protein (proteolipid protein)
PMA	(Phorbol myristate acetate)
PTX	pertusový toxin (<i>Bordetella pertussis</i> toxin)
RS	roztroušená skleróza (multiple sclerosis)
SPF	bez specifických patogenů (specific pathogen free)
TH	pomocný T lymfocyt (T helper cell)

1. Literární úvod

1.1. Autoimunita

Autoimunitní onemocnění je multifaktoriální a vzniká tehdy, pokud se rozvine nekompenzovaná imunopatologická reakce proti vlastním tělním strukturám. Znamená to prolomení tolerance imunitních buněk vůči vlastním antigenům. Autoimunita je převážně způsobena kombinací buněčných i humorálních složek imunitního systému (IS). Na vzniku autoimunity má vliv genetické pozadí jedince, prodělané i probíhající infekce, hormonální rovnováha, imunodeficiencie, stres či užívání některých léčiv. Některé autoimunitní nemoci se s vyšším procentem vyskytují u lidí s určitými alelickými formami HLA molekul (*angl. human leukocyte antigen*) například roztroušená skleróza asociuje s molekulou HLA-DR2.

Autoimunitu můžeme charakterizovat i podle místa výskytu - systémová autoimunitní onemocnění nebo orgánově specifická. Organismus normálně udržuje imunitní reakci vůči vlastním tkáním v přísných mezích, jde o toleranci imunitních buněk k endogenním strukturám, která je udržována na centrální i periferní úrovni.

Centrální tolerance se nastavuje v kůře i dřeni thymu při vývoji T lymfocytů a v kostní dřeni při vývoji B lymfocytů. Negativně selektované T lymfocyty rozpoznávají komplex MHC – vlastní peptid s vysokou afinitou a hynou apoptózou (PALMER, 2003). Z některých těchto lymfocytů vznikají regulační T buňky (Treg). Pozitivně jsou selektovány T lymfocyty, které se slabou afinitou váží komplex MHC glykoproteinu s navázaným endogenním peptidem (VON BOEHMER, 1990; HOQUIST, 2005).

Nezralé B lymfocyty, které v kostní dřeni rozpoznávají vlastní rozpustné či membránové molekuly, jsou negativně selektovány. Hynou apoptózou nebo dostávají signál k přeskupení svého receptoru BCR (NEMAZEE, 2006). Pokud selže i editace receptoru, buňka hyne. Lymfocyt, který slabě rozeznává vlastní strukturu, může být funkčně utlumen a putovat do periferie v anergii.

Při vzniku autoimunit bývá prolomena převážně periferní tolerance, jež je zjišťována klonální delecí, anergií a aktivní supresí. V případě periferních B lymfocytů, které

rozeznají autoantigeny, se mohou zapojit inhibiční receptory bránící jejich aktivaci (FIFE, 2008).

1.1.1. Roztroušená skleróza (RS)

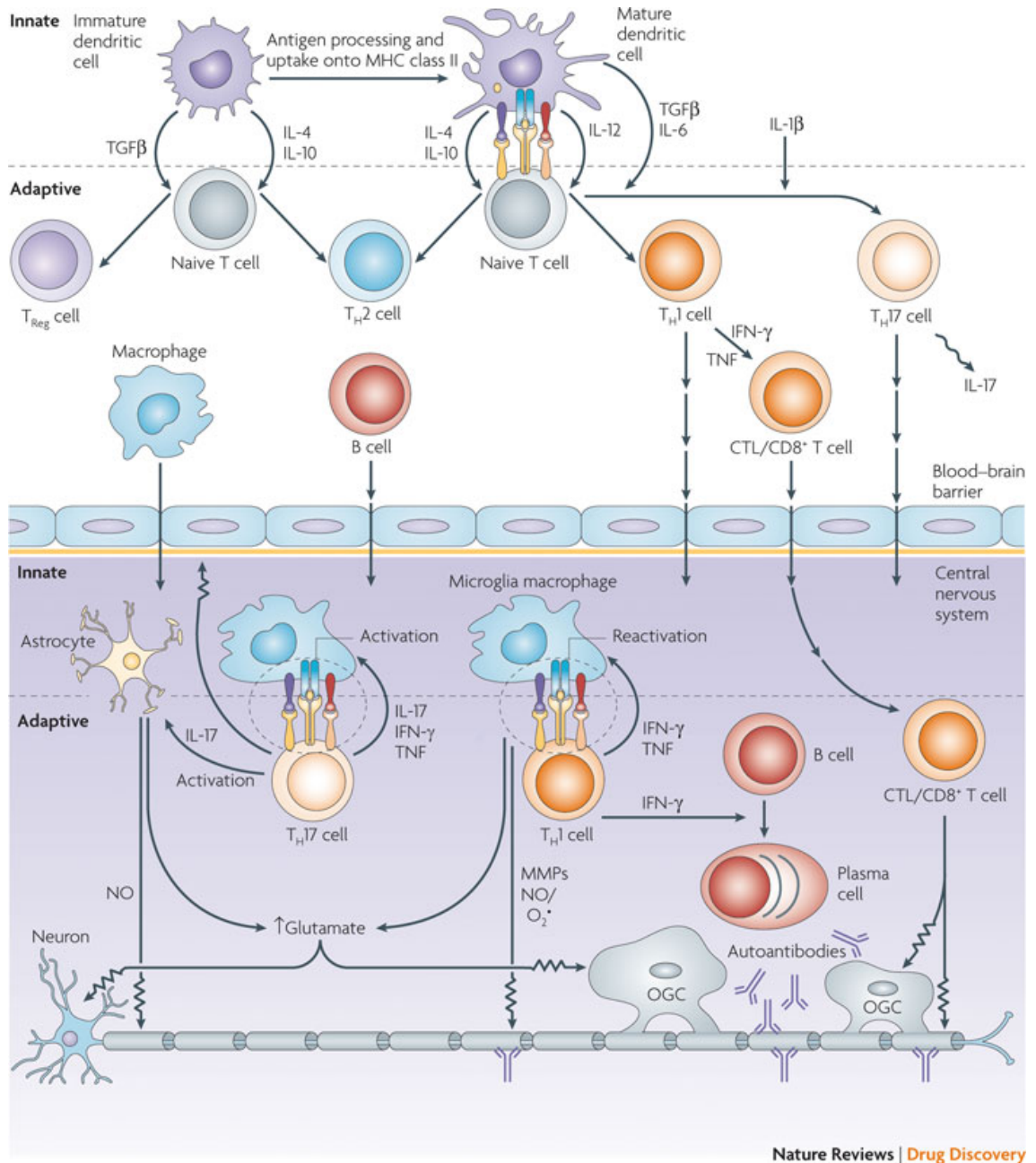
Roztroušená skleróza je orgánově specifické autoimunitní onemocnění CNS. Patologickým znakem je zánět, který sekundárně vede k demyelinizaci nervových vláken. Má progresivní průběh. Histologicky jsou průkazné šedě ohraničené plaky v bílé hmotě mozku a míchy s patrným úbytkem myelinu. V časně fázi nemoci převládá zánětlivý proces, v pozdní fázi probíhá proces degenerativní (WINKELMANN, 2007).

Přesná příčina vzniku RS není dosud známa. Pravděpodobně vzniká kombinací autoimunitních a genetických aspektů s vlivem okolního prostředí (FERREIRA, 2010). Aktivace autoreaktivních CD4+ Th lymfocytů a jejich diferenciaci v Th1 populaci je kritickým okamžikem iniciace a později dlouhodobého vývoje RS. Vlastní poškození centrální nervové tkáně je způsobeno jinými složkami IS – komplementem, protilátkami indukovanou buněčnou cytotoxicitou (ADCC reakce), CD8+ cytotoxickými T lymfocyty (CTL, Tc) a cytokiny. NK buňky a Th2 CD4+ buňky jsou pravděpodobně zapojeny ve střídavě recidivující či chronicky progresivní povaze RS (SOSPEDRA, 2005). Pacientův IS napadá myelinové a oligodendrocytární antigeny, což poškozuje myelinové pochvy, které obalují nervová vlákna a napomáhají přenášet nervové impulzy (viz Obrázek 1). Obnažení axonů má za následek poruchy přenosu signálu a tím různorodé neurologické symptomy.

Na chronickém charakteru RS se podílí řada virů např. virus Epstein – Baarové (Ascherio, 2010), lidský herpes virus 6, retroviry a další (HILAS, 2010). Rizikovými faktory je i etnický původ či geografie území (NOSEWORTHY, 2000).

Roztroušená skleróza je dělena do 4 různých forem: střídavě – recidivující (RR), sekundárně progresivní (SP), primárně progresivní (PP) a progresivně – recidivující (PR) (ANDERSSON, 1999; NOSEWORTHY, 2000). Lidé s roztroušenou sklerózou zpočátku trpí poruchami smyslů, chůze, rovnováhy, svalovou slabostí. Později se přidávají poruchy pozornosti, paměti, deprese, emocionální labilita, kloubní potíže, paralýza (FERREIRA, 2010; HILAS, 2010). Předpovědět progresi nemoci je obtížné.

1.1.2. Imunologické mechanismy zapojené v RS



Obrázek 1: Předpokládaný mechanismus působení imunitních buněk v patogenezi lidské roztroušené sklerózy. Převzato z (BRINKMANN, 2010)

1.2. Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE)

Experimentální autoimunitní encefalomyelitida poskytuje relevantní model patogeneze lidské demyelinizační chorobě – roztroušené skleróze. Je považována za její myší model (MILLER, 2007). Některé literární prameny uvádí název experimentální alergická encefalomyelitida. Histologickými znaky nemoci jsou změny v propustnosti hematoencefalické bariéry (*angl. blood-brain barrier*, BBB), perivaskulární zánětlivé infiltráty spojené s různými stupni demyelinizace, s rozpadem astrocytů a ztrátou oligodendrocytů. Demyelinizace axonálních drah může vést až k progresivní paralýze končetin. Léze se vytváří převážně v bílé hmotě míchy, ale mohou se objevit i v mozku, mozečku a mozkovém kmeni (XU, 1988). Četnost a rozmístění lézí v CNS určuje závažnost klinických příznaků. U různých kmenů myši má EAE odlišnou formu průběhu, například C57BL/6 myši trpí chronicky progresivní formou, SJL/J střídavě recidivující a B10.PL myši akutní encefalomyelitidou bez klinických ústupů nemoci (DITTER, 2000). Příznaky se projevují v závislosti na formě EAE, od 7. - 10. dne u akutní, u chronické přibližně 12-15. den (MILLER, 2007).

EAE umožňuje studovat patogenezi tkáňových poškození a imunoregulace zprostředkované CD4⁺ Th1/Th17 lymfocyty. Bylo prokázáno, že vzájemný poměr Th1 a Th17 společně s jimi produkovánými cytokiny má významný vliv na to, v jakém místě CNS zánět vypukne, zda v mozku či míše (STROMNES I. C., 2008).

1.2.1. Indukce EAE

EAE u myši je indukována aktivní imunizací myelinovým antigenem ve směsi s kompletním Freundovým adjuvans (CFA), nebo adoptivním přenosem *in vitro* aktivovaných myelin – specifických lymfocytů (STROMNES I. G., 2006). Zvířeti mohou být aplikovány neuroantigeny CNS ve formě intaktních proteinů - myelinový bazický protein (MBP), myelinový oligodendrocytární glykoprotein (MOG), proteolipidový protein či pouze jejich peptidové části (viz tabulka č. 1 s příklady). Peptid proteinu MOG (MOG₃₅₋₅₅) indukuje u C57BL/6 myši progresivní formu EAE (MILLER, 2007; SONOBE, 2007), PLP₁₃₉₋₁₅₁ u SJL střídavě - recidivující (MARTÍN-SAAVEDRA, 2007; MILLER, 2007). U některých antigenů je pro spolehlivou indukci EAE vyžadován pertusový toxin (PTX).

Myší kmen	H-2 typ	Antigen
C57BL/6	H-2 ^b	MOG 35-55 PLP 178-191
SJL	H-2 ^s	MBP 84-104 PLP 139-151 PLP 104-117 MOG 92-106
B10.PL	H-2 ^u	MBP 37-54 PLP 178-191 PLP 43-64
Balb/c	H-2 ^d	PLP 178-191
C3H	H-2 ^k	PLP 103-116
SWR	H-2 ^q	PLP 215-232

Tabulka 1: Peptidové sekvence myelinových proteinů používané k indukci EAE. Uvedené kmeny myší se liší typem MHC molekul.

Aktivně indukovanou EAE lze rozdělit na dvě fáze, indukční a efektorovou. Během indukční fáze, po imunizaci myši vybraným myelinovým epitopem ve směsi s CFA (viz odst. 4.1.1), začíná tvorba a proliferace myelin – specifických CD4+ T buněk podle platného modelu aktivace CD4+ pomocných T buněk (Th). Antigen je pohlcen antigen prezentujícími buňkami (APC), zpracován a vystaven na povrch v komplexu s MHC gp II. třídy. Adjuvans zvyšuje expresi kostimulačních molekul CD80 a CD86 důležitých pro aktivaci Th prekurzorové buňky. Pod vlivem přítomných cytokinů vzniká klon aktivovaných T lymfocytů s antigen-specifickým TCR (MILLER, 2007).

V efektorové fázi probíhá několik dílčích dějů. Prvním je migrace aktivovaných lymfocytů do CNS, zahrnující průchod mezi těsnými spoji endoteliálních buněk krevně – mozkové bariéry. Odtud lymfocyty produkují cytokiny a chemokiny, které působí na periferní mononukleární fagocyty a směřují je k parenchymu CNS. Zde dochází k aktivaci monocytů, makrofágů i mikroglíí, v jejímž důsledku jsou ničeny myelinové pochvy neuronů (MILLER, 2007). Destrukci myelinu významně podporují cytotoxické vlastnosti některých cytokinů – IL-17 aktivuje neutrofile, IFN- γ podporuje fagocytární aktivitu makrofágů, zvyšuje syntézu NO, TNF- α navozuje apoptózu oligodendrocytů (STROMNES I. C., 2008). Vysoká dávka antigenu indukuje apoptózu autoreaktivních T buněk, neboť je vytvářeno větší množství prozánětlivých cytokinů mimo jiné i TNF- α , a tím je zvýšena i

apoptóza oligodendrocytů. To poukazuje na duální úlohu tohoto cytokinu (WEISHAUPT, 2000).

Počáteční fáze u EAE indukované adoptivním přenosem lymfocytů probíhá v laboratoři. Následuje přenos pre-aktivovaných myelin – specifických CD4+ lymfocytů naivním myším. Klinické příznaky se projeví dříve, u chronické formy C57BL/6 myši 7. – 10. den.

1.2.2. Imunologický profil EAE

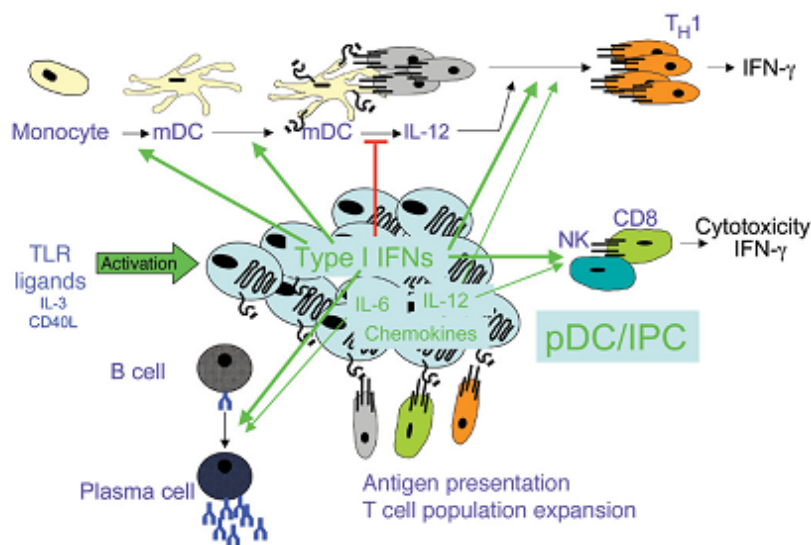
Zánětlivý proces je zprostředkován CD4+ Th lymfocyty. Zatímco před deseti lety byly Th1 buňky, vyvíjející se v prostředí IL-12, produkující IFN- γ a TNF- α , publikovány jako populace spouštějící EAE, po objevení subpopulace produkující IL-17 a označené jako Th17 byl demonstrován vliv obou těchto populací. Ačkoliv oba typy regulují jiné imunitní reakce, výsledkem je tatáž klinická manifestace (STROMNES I. C., 2008). Funkce Th17 při indukci encefalomyelitidy byly potvrzeny několika studii (LANGRISH, 2005; SONOBE, 2007; ARANAMI, 2008). Obě populace mají svou úlohu i v progresivním průběhu EAE.

1.2.2.1. Zapojení antigen-prezentujících buněk v indukci EAE

Mechanismus vedoucí k aktivaci encefalitogenních T lymfocytů nebyl příliš objasněn. Bylo publikováno, že konvenční dendritické buňky nemají na vývoj těchto lymfocytů výrazný vliv. Dendritické buňky (DC) jsou profesionální antigen-prezentující buňky. Na svém povrchu nesou velké množství receptorů rozpoznávajících mikrobiální vzory a produkují celou řadu cytokinů. Významně podporují aktivaci a diferenciaci naivních T lymfocytů (Lee G. K., 2006).

U transgenních myší (CD11c – receptor pro difterický toxin (DTR) v promotoru transfekovaného vektoru, na pozadí C57BL/6) byly DC odstraněny, a sice 1 den před imunizací proteinem MOG a osmý den po imunizaci. Na vznik EAE neměl tento krok žádný vliv. Také opakované odstraňování DC po dobu 10 dní po imunizaci stejných transgenních myší nemělo žádný vliv na vývoj nemoci (ISAKSSON M. L., 2012). Pro ověření role dalších APC v indukci EAE – plazmacytoidních DC, byla využita monoklonální protilátka proti jejich povrchové molekule Ag-1 a tím odstraněny tyto buňky skupině C57BL/6 myší, které byly následně imunizovány MOG₃₅₋₅₅. Depletované myši měly

méně závažné klinické příznaky i histologický obraz, ale také mnohem nižší koncentraci interferonů I. typu v séru než myši kontrolní. Neutralizací IFN-I však nebyl zlepšen průběh choroby, což vede k závěru, že IFN typu I mají pouze malý vliv na vývoj EAE. Slabší příznaky nemoci měly i myši, u kterých byly týden po imunizaci MOG odstraněny

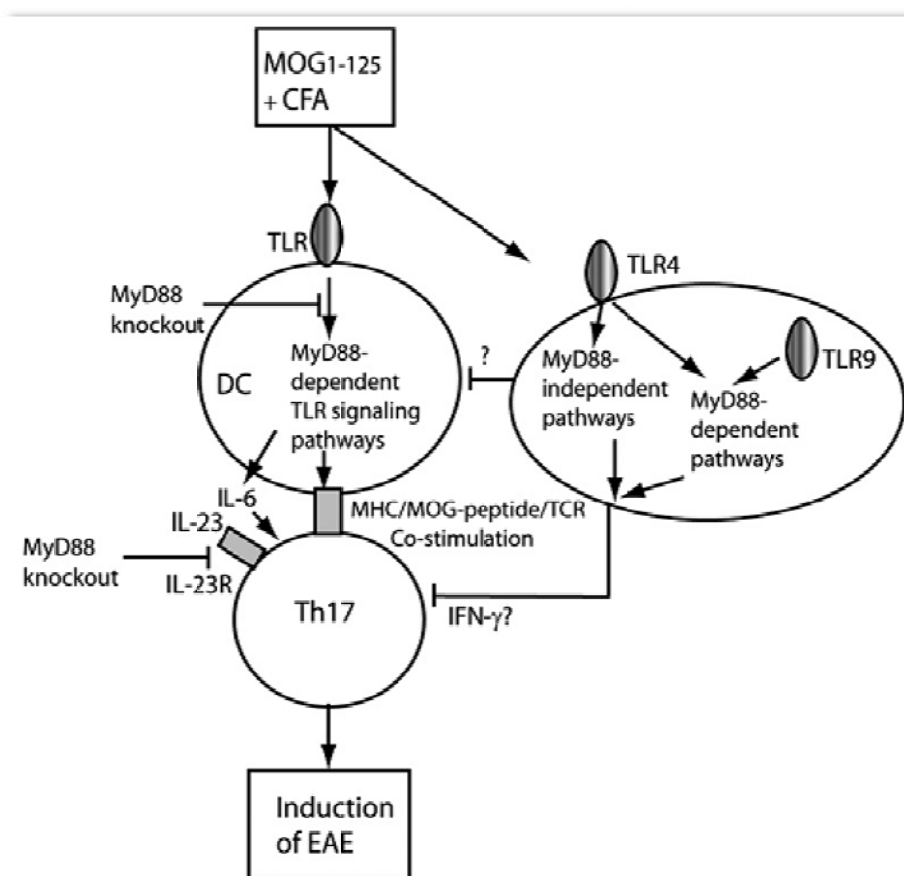


Obrázek 2: Schéma působení pDC. Plasmacytoidní DC produkují interferonů – I třídy a cytokinů regulují řadu buněčných populací. (COLONNA, 2004)

pDC. Také počet MOG specifických Th17 buněk ve slezině, ale nikoliv Th1 lymfocytů, byl u myši bez pDC nižší než u kontrolních. Plasmacytoidní DC tedy vyvolávají Th17 buněčnou odpověď indukovanou MOG a následně EAE (ISAKSSON M. A., 2009).

Dendritické buňky jsou velmi významnými regulátory imunitního systému, nejen CD4+ Th lymfocytů. Na svém povrchu mají receptory, tzv. pattern-recognition receptors (PRR), které váží patogenní a nebezpečné vzory, a spouští rozmanité buněčné děje. Do rodiny PRR patří i tzv. Toll – like receptory (TLR). Ty rozpoznávají celou řadu mikrobiálních vzorů jako např. bakteriální LPS, HSP60, ssRNA, bakteriální DNA, kyselinu lipoteichoovou atd. Myši mají 12 funkčních TLR (TLR1-9, TLR11-13), lidé pouze 10, TLR1-10 (KAWAI, 2010). TLR jsou lokalizovány nejen na cytoplazmatické membráně (TLR1,2,4,6), ale také na membráně buněčných organel (TLR 3,7,8,9) (Bell, 2003). Vazbou ligandu na TLR jsou aktivovány rozmanité signální dráhy, z nichž významná je signalizace přes adaptorový protein MyD88, jež vede k aktivaci MAP kinázové kaskády a transkripčního faktoru NF-κB (KAWAI, 2004). Role jednotlivých Toll – like receptorů v experimentální encefalomyelitidě nebyla příliš známa. Studie k jejímu objasnění byly prováděny na myších imunizovaných krysím proteinem MOG, deficientních v TLR a molekule MyD88 (TLR4^{-/-}, TLR9^{-/-}, MyD88^{-/-}) a kontrolními C57BL/6. MyD88 knock-out

(KO) myši byly kompletně rezistentní k EAE. Pro potvrzení výsledku byla kontrolním i KO myším aplikována vyšší dávka neuroantigenu. V séru MyD88^{-/-} myši nebyl detekován IL-17 ani Th17 lymfocyty, izolované DC ze sleziny produkovaly výrazně méně IL-6 a IL-23 nezbytných pro vývoj IL-17 produkujících Th buněk. TLR4 je aktivován pertusovým toxinem, který se používá při imunizaci myši proteinem i peptidy MOG. Toxin zvyšuje propustnost membrán, čímž usnadňuje průchod aktivovaných lymfocytů přes BBB (MILLER, 2007). TLR4^{-/-} i TLR9^{-/-} myši měly výrazně slabší symptomy EAE než myši kontrolní, což signalizuje regulaci závažnosti choroby těmito receptory. Izolované DC ze slezin TLR4^{-/-} myši produkovaly větší množství IL-6 a IL-23 než myši TLR9^{-/-}. TLR4 tedy reguluje aktivaci Th17 lymfocytů. Molekula MyD88 umožňuje přesmyk naivních pomocných T buněk na Th17 tím, že v DC iniciuje tvorbu cytokinů nezbytných k tomuto přesmyku, tedy IL-6 a IL-23 (MARTA, 2008).

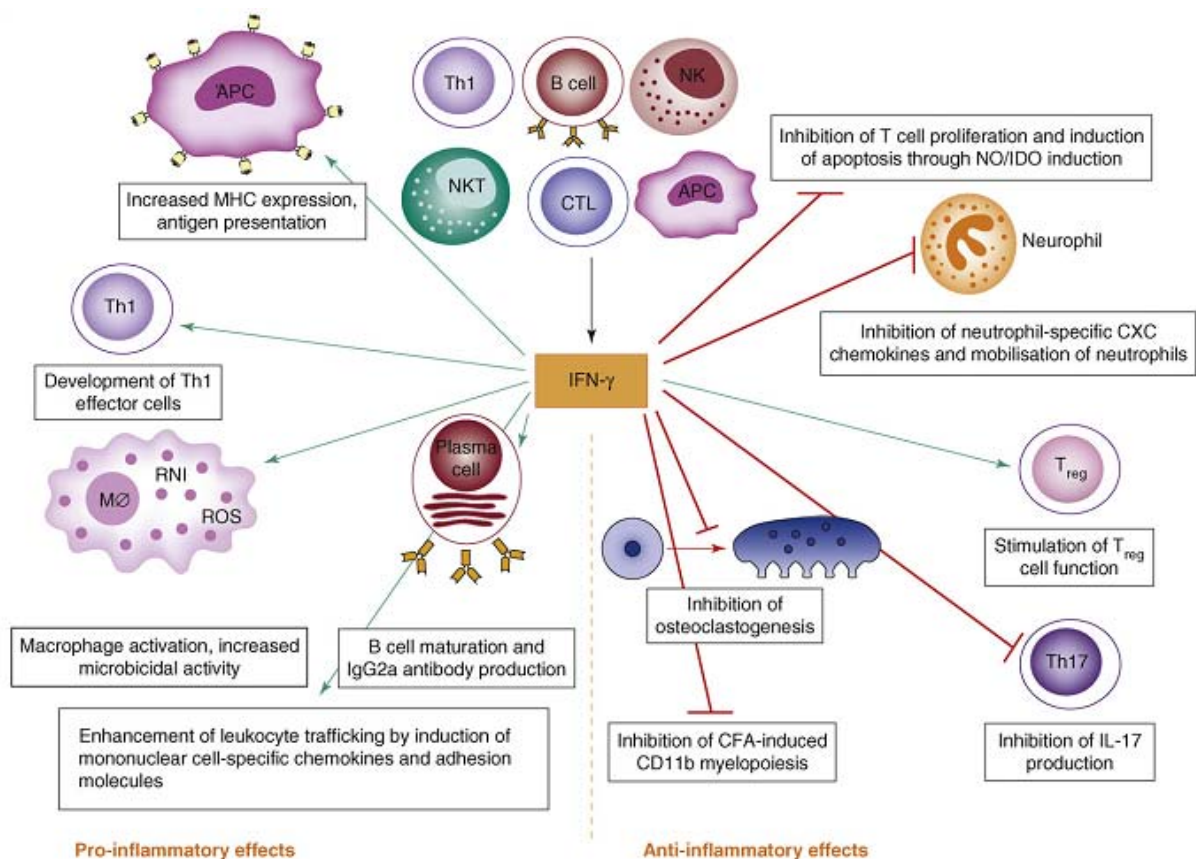


es

1.2.3. Zapojení výkonných buněk IS v rozvoji EAE

Ačkoliv se Th lymfocyty podílí na vývoji EAE, konkrétně Th1 produkující IFN- γ a Th17 produkující IL-17, přesná účast těchto populací je nejasná. Přestože CNS patří do imunologicky privilegovaných míst v organismu, aktivované T buňky bez ohledu na antigenní specifitu mají schopnost prostoupit přes neporušenou hematoencefalickou bariéru (WEKERLE, 1987). Oba uvedené klony buněk infiltrují do CNS, kde produkcí svých cytokinů podporují zánětlivou reakci a aktivují další efektorové buňky – mikroglie, astrocyty, neutrofilů i lymfocyty.

Populace Th1 lymfocytů se diferencuje v prostředí IL-12 produkovaným makrofágy a dendritickými buňkami. Charakteristickým transkripčním faktorem je T-bet. (MOSSMAN, 1996). V zánětlivých infiltrátech MOG specifické Th1 lymfocyty regulují funkce makrofágů a produkcí IFN- γ zvyšují jejich fagocytární aktivitu.

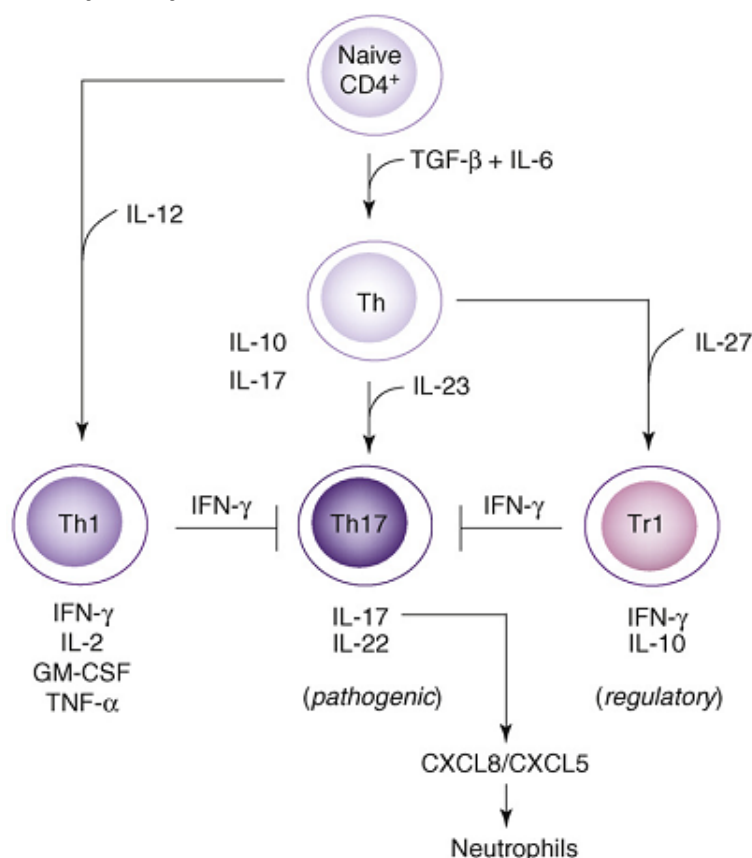


Obrázek 4: Souhrn duálního působení IFN- γ v imunitním systému- prozánětlivé i protizánětlivé. Převzato z (KELCHTERMANS, 2008)

Makrofágy aktivované IFN- γ produkují prozánětlivé cytokiny TNF- α , IL-1, IL-18 a syntetizují větší množství MHC i kostimulačních molekul (GEISSMANN, 2010). CD4⁺ Th1

buňky produkci IL-2 v místě zánětlivého infiltrátu aktivují myelin specifické cytotoxické lymfocyty (CTL), které indukují apoptózu oligodendrocytů. CTL nesou koreceptor CD8 a svými cytotoxickými mechanismy převážně způsobují lyzi buněk. Některé CD8+ T buňky mají regulační funkci např. populace nesoucí CD8+ CD122+ produkuje TGF- β i IFN- γ a v průběhu EAE potlačuje MOG – specifické imunitní odpovědi indukci regulačních FoxP3+ buněk či inhibicí proliferace CD4+ lymfocytů (NAJAFIAN, 2003). Pouze malá frakce těchto CD8+ Treg exprimuje FoxP3 a CD25 (CHEN, 2009). Další subpopulací Tc, která byla i popsána u EAE jsou tzv. Tc17 buňky produkující IL-17. Vznikají v prostředí TGF- β , IL-6 a IL-21 a produkují IFN- γ , nízké množství granzymu B, mají transkripční faktor ROR γ T i receptor pro IL-23. Poškození tkáně CNS pravděpodobně ovlivňují produkci IL-17, nikoliv cytolytickými mechanismy (HUBER, 2009).

Rezidentní buňky CNS v zánětlivých infiltrátech zprostředkovaných Th1 CD4+ buňkami vystavují odlišné membránové chemokiny než v infiltrátech vzniklých vlivem Th17 lymfocytů, a sice CXCL9, CXCL10 a CXCL11. Th17 indukují produkci CXCL1 a



Obrázek 5: Vztah mezi IFN- γ a IL-17. Převzato z (KELCHTERMANS, 2008)

CXCL2 (Kroenke, 2008). Vedle podpory zánětlivé reakce produkcí TNF- α a IL-2 usnadňují Th1 buňky infiltraci Th17 do lézí EAE (O'CONNOR, 2008).

Pomocné lymfocyty Th17 se vyvíjí v prostředí TGF- β a IL-6, transkripčním faktorem je ROR γ T. Produkují IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21. Autokrinně na Th17 působí IL-21, zvyšuje produkci IL-17, ovšem vývoj EAE u IL-21^{-/-} a IL-21R^{-/-} myši nebyl ovlivněn. K produkci IL-17 není nezbytný (SONDEREGGER, 2008; COQUET,

2008). Tvorba IL-17 u paměťových T buněk je indukována IL-23 v přítomnosti IL-1. Bylo prokázáno, že IL-23^{-/-} myši jsou rezistentní k vývoji EAE (CUA, 2003; LANGRISH, 2005). Samotný IL-23 je potřebný k přežívání Th17 buněk (KIMURA, 2010). Th17 lymfocyty poškozují BBB a podněcují zánět (KEBIR, 2007). Ten je charakterizován přesunem neutrofilů z periferie do CNS a likvidací myelinového obalu neuronů (KROENKE, 2008). Neutrofilů na rozdíl od makrofágů neprezentují antigeny T lymfocytům na MHC gp II. třídy. Hlavní produkt Th17 buněk IL-17 má vysoce pleiotropní účinky (FOSSIEZ, 1996). Indukuje produkci chemokinu IL-8, který je nejsilnějším chemoatraktantem pro neutrofilů, aktivuje je a zvyšuje jejich fagocytární aktivitu. V endoteliálních buňkách podporuje produkci prozánětlivého cytokinu IL-6 (KIMURA, 2010) a indukuje expresi membránového chemokinu CCL2, pro který mají Th17 lymfocyty receptor CCR2. Tato interakce se zdá klíčovou při rozvoji EAE a nabízí také možnost využití v terapii, a sice jejím zablokováním (ARANAMI, 2008).

Encefalitogenní lymfocyty a rezidentní buňky CNS, z nichž některé mají funkci APC - mikroglie, astrocyty, na sebe vzájemně působí a tím dochází k reaktivaci myelin specifických T lymfocytů. (MCQUILLAN, 2010). Aktivované mikroglie exprimují zvýšené množství kostimulačních molekul CD80, CD86, CD40 i MHC II. třídy. Mikroglie produkci IL-12 aktivují CD4⁺ Th1 lymfocyty, které v nich zpětně iniciují produkci IL-1 β , IL-6 či TNF- α . Diagnosticky se mikroglie od makrofágů rozlišují nižší hladinou exprese molekul CD11c a CD45 (Murphy, 2010). Reaktivace encefalitogenních CD4⁺ Th má za následek progresi EAE, případně opakované záchvaty nemoci střídané remisemi.

1.2.3.1. Změny poměru a funkcí CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů v průběhu EAE

Hladina lymfocytů se v průběhu nemoci u C57BL/6 myši mění, ve slezině i CNS. Výrazněji kolísá hladina CD4⁺ buněk. Nárůst CD4⁺ buněk ve slezině vrcholí během iniciační fáze EAE. V momentě, kdy se začínají projevovat klinické příznaky, se jejich počet postupně vrací na původní hodnotu. V CNS naopak jejich hladina prudce stoupá s národem příznaků choroby. Oproti tomu množství CD8⁺ lymfocytů ve slezině se v průběhu nemoci výrazně nemění, v CNS je patrný krátkodobý nárůst při rozvoji EAE. Zvýšená hladina CD8⁺ lymfocytů od počátku manifestace klinických příznaků přetrvává až do pozdní fáze nemoci, ovšem je výrazně nižší než hladina CD4⁺ buněk. Z měření koncentrace důležitých T buněčných cytokinů (IL-17, IL-4, IL-10, IFN- γ a TNF- α) oběma typy lymfocytů ve slezině i CNS byly vyvozeny tyto závěry: koncentrace IL-17 byla

nejvyšší při vrcholu nemoci a byl produkován převážně CD4+ buňkami. IL-4 nebyl vytvářen ani jednou sledovanou populací. Produkce IFN- γ i TNF- α byla zvýšená v celém průběhu EAE, ovšem jen nepatrná část pocházela z CD8+ lymfocytů. Oproti tomu produkce protizánětlivého IL-10 v CNS byla silnější CD8+ buňkami a jeho hladina od vrcholu nemoci až po její chronický průběh byla vyšší než prozánětlivých cytokinů. Z těchto zjištění vyplývá, že CD8+ lymfocyty v iniciační fázi podporují zánětlivou reakci, v pozdní fázi EAE mají funkci regulační (SONOBE, 2007).

1.2.4. Zapojení regulačních imunitních buněk na průběh EAE

1.2.4.1. NK buňky

NK buňky eliminují nádorové, virově infikované či stresované endogenní buňky. Cytolytické funkce zajišťuje systém perforin/granzym závislý na přítomnosti Ca²⁺ iontů a membránový Fas ligand (FasL). Dalším způsobem, který aktivuje cytotoxické mechanismy NK buněk, je ADCC, protilátkami zprostředkovaná buněčná cytotoxicita (antibody dependent cell cytotoxicity) (NIMMERJAHN, 2008). Mají také regulační funkce, z nichž nejvýznamnější je rychlá produkce IFN- γ . Dále produkují růstový faktor GM-CSF, chemokiny a cytokiny (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- β) (COOPER, 2011). NK buňky také nesou ligandy OX40L a CD40L pro kostimulační receptory lymfocytů.

Myší NK buňky jsou CD3-/NKp46+, slezinné NK buňky nesou i molekulu CD49b (klon DX5). Na svém povrchu mají sady inhibičních a aktivačních receptorů. Negativní signály jsou nezbytné, aby nedocházelo ke snadné aktivaci NK buněk (IIZUKA, 2003). Ke spuštění efektorových mechanismů je potřebná převažující stimulace aktivačními receptory jejich přemostěním. NK buňky myší mají několik strukturních rodin receptorů. Jednotlivé izoformy mohou aktivovat buněčné odpovědi, nebo je potlačovat. Jsou to skupiny receptorů Ly49, rozeznávající klasické MHC I molekuly, heterodimerní CD94/NKG2 vážící neklasické MHC molekuly HLA-E či lektinové NKR-P1, jejichž ligandy jsou molekuly příbuzné s lektiny - Clr/Ocil (z angl. C-lectin related/osteoclast inhibitory lectin) (CARLYLE, 2006). Aktivačními receptory jsou i Fc γ RIII, NKp46 či NKp44 (BIASSONI, 2001, COOPER, 2011) a ve své cytoplazmatické doméně mají tzv. ITAM motivy (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) asociující s kinázami, inhibiční receptory mají ITIM motivy (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Po

setkání receptoru se svým ligandem dochází k fosforylaci těchto motivů, jejímž výsledkem je buď spuštění signalizační kaskády, nebo její blokování.

NK buňky jsou významnými regulátory indukční i efektorové fáze EAE. Regulace NK buňkami se zdá být nezávislá na T, B i NK-T buňkách. Depletované myši bez NK buněk vyvinuly závažnější formu EAE. Testy *in vitro* indikují omezení proliferace T lymfocytů NK buňkami (ZHANG, 1997). IFN- β užívaný v léčbě lidské RS aktivuje funkce NK buněk (GALLIGAN, 2010).

1.2.4.2. NK-T lymfocyty

Tato populace nese buněčné znaky NK buněk i T lymfocytů, jako DX5 a CD3, TCR $\alpha\beta$ s omezenou antigenní diverzitou. Díky produkci protizánětlivých cytokinů (IL-4, IL-10, IL-13) jsou studovány jejich regulační úlohy v imunitních reakcích a tím možné terapeutické využití při AI. Produkci IL-10 indukují regulační T buňky Tr1 (SONODA, 2001). Počet NK-T lymfocytů u pacientů s RS a i myši EAE je výrazně nižší. NK-T buňky stimulované α -galaktosylceramidem (α -GalCer) produkují IL-10, IL-4 a IFN- γ napomáhají potlačovat patogenní reakce Th1/Th17 lymfocytů při EAE (NOVAK, 2010).

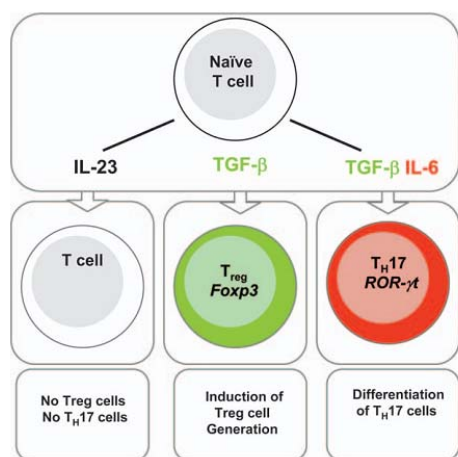
1.2.4.3. $\gamma\delta$ T lymfocyty

T lymfocyty nesoucí $\gamma\delta$ TCR jsou převážně CD4-, CD8- (TONEGAWA, 1988). K rozpoznání antigenu nepotřebují komplex MHC molekul s navázaným peptidem, obdobně jako B lymfocyty rozeznávají nativní antigeny. Jsou lokalizovány v mukózních tkáních dýchacího, urogenitálního a gastrointestinálního traktu. Svou funkcí jsou někdy řazeny k přirozené imunitě. Produkují prozánětlivé cytokiny: IFN- γ , TNF- α a IL-17, díky čemuž jsou studovány v souvislosti se záněty CNS u lidí i myších modelů (SARMA, 2010).

1.2.4.4. Regulační $\alpha\beta$ T lymfocyty (Treg)

Jsou charakteristické expresí povrchových molekul CD4, CD25 a transkripčním faktorem FoxP3. Jsou vysoce závislé na IL-2, který je pro ně růstovým i aktivačním faktorem. V prostředí TGF- β vznikají z CD4+ prekurzoru tzv. indukované Treg (iTreg). Společným působením TGF- β a IL-6 se vyvíjí Th17 lymfocyty, neboť IL-6 potlačuje vznik transkripčního faktoru FoxP3. Některé regulační T lymfocyty ztrácí nebo mají nestabilní expresi FoxP3. Fenotypově odpovídají aktivovaným paměťovým buňkám, produkují prozánětlivé cytokiny a stávají se potenciálně autoreaktivní (ZHOU, 2009). Nadprodukce

či poruchy regulace IL-6 potlačuje vznik CD4+ iTreg, což je významným faktorem vzniku autoimunitního onemocnění (Kimura, 2010).



Obrázek 6: Vznik Th17 a Treg.
Převzato z (Awasthi, 2009)

Populace Treg produkuje protizánětlivé cytokiny TGF-β a IL-10. Regulační T buňky nepřímo tlumí aktivaci autoreaktivních buněk, a sice působením na APC, ve kterých potlačuje expresi kostimulačních molekul. Transfer regulačních buněk příjemcům snížil závažnost EAE. Ovšem Treg v nepřítomnosti TGF-β nebo po léčbě mohou změnit svůj supresivní

fenotyp. Geneticky modifikované Treg, mající chimerní MOG-specifický TCR, potlačují

cytolytické mechanismy imunitních buněk k likvidaci myelinových struktur (FRANSSON, 2012).

1.2.4.5. B lymfocyty

Nezralé pozitivně selektované B lymfocyty (IgM+, IgD-, CD79+) opouští kostní dřeň a putují do periferních lymfatických orgánů, kde dozrávají a diferencují se na plazmatické buňky produkující protilátky.

K objasnění role B lymfocytů v RS byl opět využit model EAE. Myším byla podána MOG-specifická antiséra, nebo provedena deplece B buněk. Také byly použity myši deficientní v B buňkách (DE SAINT BASILE, 2008). Výsledky mnoha studií poukazují na komplexní roli B lymfocytů v EAE (RAY, 2011), některé pokusy vedly ke zvýšení závažnosti choroby (MATSUSHITA T. Y., 2008; MATSUSHITA T. I., 2010), jiné průběh choroby neovlivnily (HJELMSTROM, 1998; DITTEL, 2000), další zcela potlačily vznik EAE (MYERS, 1992). B buňky mají také antigen-prezentující funkci, prezentují peptidy v komplexu s MHC gp II pro T lymfocyty. Jsou nezbytné k indukci EAE myelinovými proteiny, zatímco při indukci peptidy myelinových proteinů esenciální roli nemají (LYONS, 1999). B lymfocyty také produkují některé cytokiny, které jsou významné v průběhu EAE, mezi nimi IL-6, čímž napomáhají utvářet T lymfocyty zprostředkovaný zánět při EAE i RS (BARR, 2012). Regulační B lymfocyty, uváděny jako B10 populace, produkují IL-10 a společně s CD4+ FoxP3+ Treg se podílí na remisi EAE (FILLATREAU, 2002).

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout optimální model experimentální autoimunitní encefalomyelitidy s pozorovatelnými klinickými příznaky a analýza imunologického profilu v průběhu rozvoje EAE. Na základě *in vitro* pokusů charakterizovat úlohu NK buněk a změny v expresi receptorů NKR-P1 a NKG2D. Dále identifikace změn v zastoupení CD4+ a CD8+lymfocytů a exprese receptoru NKR-P1 na obou těchto populacích. Po navození optimálního modelu EAE byla aplikována léčba interferonem beta (IFN- β) se zaměřením na snížení závažnosti EAE stimulací NK buněk.

2.1. Sledované parametry

- **Průběh a závažnost formy EAE u dvou kmenů myší (SJL a CD57BL/6)**
- **Počet NK buněk v periferní krvi a slezině**
- **Exprese receptorů NKR-P1 a NKG2D na NK buňkách**
- **Cytotoxická aktivita efektorových splenocytů proti buňkám myší nádorové linie**
- **Zastoupení T lymfocytů nesoucích molekuly CD4 a CD8**
- **Exprese NKR-P1 na CD4+ a CD8+ T lymfocytech**
- **Produkce cytokinů NK buňkami a T lymfocyty**
- **Vliv IFN- β na fenotyp a funkci NK buněk**

3. MATERIÁL

3.1. Experimentální zvířata

Pro účely diplomové práce byly použity samice inbredních myších kmenů C57BL/6 a SJL/J (AnLab, ČR) staré 10 týdnů. Byly chovány v SPF podmínkách Státního zdravotního ústavu v Praze (teplota 22°C, relativní vlhkost 60%, krmeny standardní komerční dietou *ad libitum*). Se zvířaty bylo zacházeno v souladu se Zákonem o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/ 1992 Sb.).

Oba kmeny jsou odlišné typem MHC molekul na povrchu buněk, zatímco C57BL/6 myši mají MHC glykoproteiny H2^b (MILLER, 2007), SJL/J pak MHC gp H2^s (SOBEL, 1991). Také se tyto kmeny myši liší expresí izoform receptů z rodiny NKR-P1, jež jsou majoritně vystavovány na NK buňkách, ale i na dalších buňkách IS. Oba kmeny mají stejnou expresi NKR-P1 izoform, ale jsou polymorfní (CARLYLE, 2006). Rozdíl je v detekci protilátkou PK 136 (anti NK1.1), která u C57BL/6 myši detekuje aktivační NKR-P1C a u SJL myši inhibiční NKR-P1B izoformu receptoru.

3.2. Chemikálie

ACK lyzační pufr	ÚMG AV, ČR
azid sodný (NaN ₃)	Serva, USA
Na ₂ ⁵¹ CrO ₄	PerkinElmer Wallac, Německo
EDTA	Sigma, USA
Ethanol 96%	Merck, Německo
Fetální telecí sérum	Gibco, USA
Ficoll PM 400	Sigma, USA
Gentamycin	Lek, Pharmaceutical & Chemical comp., Slovinsko
Heparin	Zentiva, ČR
HEPES	Sigma, USA
H - MEMd médium	ÚMG AV, ČR,
L - glutamin	ÚMG AV, ČR
MBP	Sigma, USA

MicroBeads CD19	Miltenyi Biotec, USA
MOG	ÚOCHaB AV, ČR
PBS	ÚMG AV, ČR
PLP	ÚOCHaB AV, ČR
RPMI 1640 médium	Sigma, USA
Telebrix 35	Léčiva, ČR
Toxin Bordetella pertussis	Sigma, USA
TritonX – 100	Sigma, USA
Türkův roztok	Sigma, USA
Želatina	Sigma, USA

Chemikálie pro přípravu roztoků a médií (Lachema s.r.o., ČR):

HCl, KHCO₃, Na₂EDTA.2H₂O, NaHCO₃, Na₂HPO₄.12H₂O, NaHPO₄.2H₂O, NaOH, NH₄Cl

3.3. Média a roztoky

- **Fosfátový fyziologický roztok (PBS)**

Na 1 l dH ₂ O	NaCl	9,00 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	1,20 g
	NaHPO ₄ x 2H ₂ O	0,23 g
	Upravit na pH 7,2 – 7,4 použitím HCl nebo NaOH	

- **Roztok pro průtokovou cytometrii (FPBS)**

Na 1 l PBS	azid sodný (NaN ₃)	0,2 g
	želatina	1,0 g

- **Türkův roztok pro počítání leukocytů**

Naředit výchozí roztok dH₂O v poměru 1:4

- **H – MEMd médium**

Na 1 l média	H – MEMd (10 x konc.)	100 ml
--------------	-----------------------	--------

Gentamycin 50 mg/l	2 ml
HEPES 238 mg/l	5 ml
Úprava na pH 7,0 přidáním 7,5% NaHCO ₃	

- **H – MEMd médium s heparinem**

Na 1 l média výše uvedené složky ve stejném poměru

Heparin	1 ml
---------	------

- **Kultivační médium CRPMI pro in vitro testy**

Na 1 l média	RPMI (5 x konc.)	200 ml
	Glutamin 3%	10 ml
	Gentamycin 50 mg/l	2 ml
	HEPES 238 mg/l	5 ml
	FTS	50 ml
Úprava na pH 7,0 přidáním 7,5% NaHCO ₃		

- **Kultivační médium pro dlouhodobé kultury**

Na 1l média

viz. CRPMI s přísadkami:	Pyruvát sodný	10 ml
	2 – merkaptoethanol	1 ml
	NEAA	10 ml
	FTS	100 ml
	FUNGISON	1 ml
	THIAMULIN	1 ml

- **Lyzační roztok ACK**

Na 250 ml roztoku	NH ₄ Cl	20,73 g
	HCO ₃	2,50 g
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	9,31 g
Zředit 10 x konc. ACK dH ₂ O v poměru 1:10		

- **Separáční roztok Ficoll – Telebrix**

Ficoll 40 g / 500 ml dH ₂ O	240 ml
Telebrix ředěný	100 ml
(100 ml TELEBRIX 35 + 44,2 ml dH ₂ O)	

- **Promývací roztok HBBS pro MACS**

0,5% hovězí sérum (BSA)	50 ml
2mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O	10g
PBS	200 ml

3.4. Přístroje a pomůcky

- **Analytické váhy** (Precisa Instrument AG, Švýcarsko)
- **autoMACS Pro Separator** (Bergish Gladbach, Německo)
- **Automatické mikropipety 2 - 5000µl** (Labnet International, USA)
- **Biologický laminární bezpečnostní box** (Jouan Inc, Francie)
- **Bürkerova komůrka** (Meopta, ČR)
- **Centrifuga HARRIER 15/80** (MSE, Velká Británie)
- **CO₂ inkubátor HeraCell 150** (Jouan, Francie)
- **Elektronická 8 - kanálová pipeta** (Eppendorf, USA)
- **Elektronické pipety** (PIPETMAN Concept, USA)
- **Kultivační destičky 24- jamkové** (Sarsted, Německo)
- **Kultivační 96- jamkové destičky** (NUNC, Dánsko)
- **Lednice** (Zanussi, Itálie)
- **Mrazicí box -20°C** (Zanussi, Itálie)
- **Optický mikroskop** (Opton Inc., Německo)
- **Průtokový cytometr BD LSR II** (Becton – Dickinson, USA)
- **PVC destičky** (Dynex, USA)
- **Scintilační počítač MicroBeta Trilux** (PerkinElmer Wallac, Německo)
- **Skleněný homogenizátor Elvehjem-Potter** (Pyrex Ltd., USA)

- **Univerzální chladičí centrifuga** (Labnet International, USA)
- **Vortexový mixér** (Labnet International, USA)

3.5. Použité monoklonální protilátky pro FACS

Tabulka 2: Monoklonální protilátky využitě k povrchovému značení buněk

Molekula	Fluorochrom	Ředění	Klon	Výrobce
NKp46	FITC	1:15	29 A 1.4	eBioscience
CD3	PE	1:50	145 - 2C11	eBioscience
CD4	PerCP	1:200	RM 4 - 5	BD Pharmingen
CD8	APC - eF780	1:100	53 - 6.7	eBioscience
CD11b	Alexa 700	1:100	M 1/70	eBioscience
NKG2D	Biotin	1:100	A 10	eBioscience
NK1.1	APC	1:100	PK 136	BD Pharmingen

Tabulka 3: Monoklonální protilátky využitě k intracelulárnímu značení buněk

	Molekula	Fluorochrom	Ředění	Klon	Výrobce
Extracelulární	CD49b	FITC	1:100	DX5	eBioscience
	CD3	V405	1:50	145-2C11	eBioscience
	CD4	PerCP	1:200	RM 4 - 5	BD Pharmingen
	CD8	APC - eF780	1:100	53 - 6.7	eBioscience
Intracelulární 1	IL-4	APC	1:40	11B11	BD Pharmingen
	IL-10	PE	1:40	JES5 - 16E3	BD Pharmingen
Intracelulární 2	IFN- γ	APC	1:40	XMG1.2	BD Pharmingen
	TNF- α	PE	1:40	MP6 - XT22	eBioscience

Sekundární značení Streptavidin Qdot605 1:200 Invitrogen

Životnost buněk DNA (AT páry) Hoechst33258 1 μ g/reakci Hoechst AG

4. METODY

4.1. Aplikace antigenu

4.1.1. Aktivní indukce EAE

Pro indukci EAE byl pro oba myší kmeny použit stejný antigen, a sice myelinový bazický protein (MBP) v koncentraci 100 µg na myš. MBP rozpuštěný v deionizované vodě (dH₂O) byl smíchán s kompletním Freundovým adjuvans (CFA) o koncentraci 4 mg/ml *M. tuberculosis*. Emulze o objemu 100 µl byla aplikována injekční stříkačkou subkutánně třemi vpichy podél páteře.

K navození EAE byl dále použit toxin z *Bordetella pertussis* (PTX) o koncentraci 400 ng u SJL a 200 ng u C57BL/6 myší. Toxin byl aplikován intraperitoneálně ve třech dávkách po 100 µl – 0, 24 a 48 hodin po aplikaci antigenu.

V dalších experimentech byly pro indukci EAE použity specifické peptidy PLP₁₃₉₋₁₅₁ o koncentraci 100 µg u SJL myší a MOG₃₅₋₅₅ u C57BL/6 o koncentraci 200 µg na myš. Aplikace PTX byla provedena ve stejném schématu, jak je uvedeno.

4.1.2. Pasivní indukce EAE

Pasivní indukce EAE byla provedena pouze u kmene C57BL/6. Myši byly imunizovány MOG₃₅₋₅₅ s CFA dle výše popsaného postupu. Pertusový toxin byl aplikován ve stejné koncentraci, ale pouze ve dvou dávkách, a to 0 a 48 hodin po podání antigenu. Sedmý den po aktivní indukci byly myši usmrceny a odebrány sleziny i uzliny. Izolace imunocytů je popsána v kapitole 4.4.2. Po izolaci imunokompetentních buněk byla provedena deplece CD19 pozitivních buněk (kap. 4.4.3.).

Selektované buňky (T lymfocyty a NK buňky) byly naředěny na 1 – 2 x 10⁶ na 1 ml kultivačního média a po dobu 3 dnů inkubovány s IL-2 a MOG₃₅₋₅₅ při 37° v 5% CO₂ (viz kapitola 4.1.2.1.).

Aktivované splenocyty bez B lymfocytů byly přeneseny intraperitoneálně v počtu 2 x 10⁷ buněk v 500 µl H – MEMd, zatímco buňky z uzlin byly aplikovány v počtu 1,5 x 10⁷ ve stejném objemu média. Příjemcům byl dále aplikován MOG₃₅₋₅₅ s CFA (kap. 4.1.1) a dvě dávky PTX, 0 a 48 hodin po transferu buněk (STROMNES I. G., 2006).

4.1.2.1. *Antigenní stimulace myelin specifických T lymfocytů in vitro*

Izolované lymfocyty z myši 7. den po indukci EAE (viz odst. 4.4.1.) a po depleci B lymfocytů (odst. 4.4.3.) byly naředěny na 10^6 buněk na 1 ml média a nasazeny na 24 – jamkovou kultivační destičku. Buňky byly pro zvýšení afinity T lymfocytů k antigenu kultivovány s MOG₃₅₋₅₅ v koncentraci $2,6 \mu\text{g} / 10^6$ buněk. Proliferace byla podpořena IL-2 v koncentraci $1,3 \mu\text{g} / 10^6$ buněk. Buňky byly inkubovány 3 dny v termostatu při 37°C a 5% CO_2 (Cravens, 2011). Po skončení inkubace byly buňky spočítány a lymfocyty izolované z uzlin naředěny v počtu $1,5 \times 10^7$ buněk v 500 μl H – MEMd. Tato dávka byla aplikována intraperitoneálně C57BL/6 myším. Splenocyty byly ředěny v počtu 2×10^7 buněk v 500 μl H – MEMd a taktéž myším aplikovány intraperitoneálně (STROMNES I. G., 2006).

4.2. Klinické hodnocení

Po indukci EAE byly myši denně pozorovány. Klinické příznaky nemoci byly zaznamenávány a hodnoceny na stupnici od nuly do pěti, jak je uvedeno v tabulce č. 4.

Tabulka 4: Klasifikace klinických příznaků

0	bez příznaků
1	atonický ocas
2	kolébavá chůze
3	paralýza zadních končetin
4	paralýza celého těla
5	uhynutí

4.3. Protokol aplikace interferonu beta (IFN- β)

Pro tento pokus bylo použito 20 samic kmene C57BL/6 starých 10 týdnů. Byly rozděleny do 2 skupin po 10 myších. U všech myší byla EAE indukována MOG₃₅₋₅₅ s CFA a PTX, koncentrace odpovídaly postupu (odst. 4.1.1.). Cílem pokusu bylo pozorování klinických změn nemoci u myší léčených a neléčených. Změny ve fenotypu nemoci byly sledovány v krvi i slezinách.

Interferon β je používán při léčbě lidské RS. K léčbě byl použit IFN- β v koncentraci 10^4 U. Kontrolní skupině bylo podáno 100 μ l PBS. Celkem byly myším podány 4 dávky léčiva. První dávka byla aplikována 7. den po indukci EAE a zbývající vždy následující 6. den.

První část zvířat byla usmrcena 21. den po indukci EAE, a sice 3 myši z každé skupiny, 28. den byly usmrceny opět 3 myši z každé skupiny a 35. den nemoci zbývající zvířata. Myším byla odebírána krev z ocasu, slezina a uzliny pro další imunologická vyšetření.

4.4. Izolace a příprava imunitních buněk

4.4.1. Příprava imunitních buněk z periferní krve pro FACS analýzy

Krev byla myším odebrána z ocasní žíly do 50 μ l sterilního média H – MEMd s heparinem na 96 – jamkové destičce. Destička byla centrifugována při 260x g po dobu 2 minut. Poté byl odebrán supernatant, destička protřepána na vortexu a k peletě bylo přidáno 200 μ l lyzačního pufru ACK. Obsah jamky byl promíchán špičkou a destička byla ponechána při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Pak byla centrifugována opět při 260x g po dobu 2 minut, odstraněn supernatant, peleta buněk protřepána na vortexu. Následně bylo přidáno 200 μ l ACK, ale destička byla ihned centrifugována při 260x g po dobu dvou minut. Poté byl odebrán supernatant, destička protřepána na vortexu a bylo přidáno 200 μ l FPBS. Opět následovala centrifugace za stejných podmínek. Po odebrání supernatantu a protřepání destičky na vortexu byly buňky periferní krve (PBMC) připravené k další manipulaci (značení protilátkami pro FACS analýzu).

4.4.2. Izolace mononukleárních buněk ze sleziny a uzlin

Po usmrcení myši cervikální dislokací byla slezina odebrána do zkumavky s 5ml H – MEMd, uzliny do zkumavky s 1ml H – MEMd. Slezina byla homogenizována na Petriho misce přes sterilní sítko plastovým pístem a opláchnuta 5ml H – MEMd. Za účelem odstranění hrubých zbytků tkáně byl filtrát centrifugován po dobu několika vteřin při 200x g (QUICK-mód centrifugy). Supernatant obsahující splenocyty byl přelit do sterilní zkumavky a centrifugován při 200x g po dobu 5 minut. Poté byl supernatant odstraněn, peleta roztřepána a zkumavka doplněna na objem 10 ml H – MEMd. Vzorek byl

navrstven na 2,5ml separačního roztoku Ficoll-Telebrix (FT) a centrifugován při 600x g po dobu 35 minut. Prstenec oddělených mononukleárních buněk byl odebrán do nové zkumavky, ty byly doplněny H – MEMd do stejného objemu a dvakrát promyty. Následně bylo z každého vzorku odebráno 50 μ l a smícháno s 950 μ l Türkova roztoku pro počítání splenocytů pod světelným mikroskopem v Bürkerových komůrkách.

Uzliny byly homogenizovány ve skleněných homogenizátorech, aby nedocházelo k velkým ztrátám buněk. Zkumavky s homogenátem byly centrifugovány použitím funkce QUICK. Supernatant obsahující buňky byl přelit do sterilní zkumavky a dvakrát promyt.

4.4.3. Magnetická separace (MACS)

Izolované slezinné buňky byly před počítáním přefiltrovány přes sítko do nové zkumavky. Po centrifugaci (300x g po dobu 10 minut) byl supernatant odlit a odsát špičkou. K peletě byl přidán pufr HBSS v poměru 9 μ l na 1 milion buněk a promíchán špičkou. Následně byl přidán roztok magnetických kuliček potažených protilátkou proti CD19, buněčnému znaku B lymfocytů, v objemu 1 μ l na 1 milion buněk. Poté byly vzorky inkubovány v lednici po dobu 15 minut. Po jejich vyjmutí byl k buňkám přidán 1 ml HBSS, vzorky byly 10 minut centrifugovány při 300x g. Supernatant byl odlit, odsán špičkou a přidáním 500 μ l HBSS byly vzorky připraveny k separaci. Negativně byly separovány B lymfocyty, které byly pro další pokusy nežádoucí.

4.5. Průtoková cytometrie (FACS)

Fluorescenční průtoková cytometrie je využívána ke kvantitativnímu i kvalitativnímu stanovení povrchových molekul buněk a vnitřních buněčných struktur či jejich produktů na základě jejich fyzikálních vlastností. Jak uvádí název, tato metoda je založena na fluorescenčním značení struktur. K tomu se používají monoklonální protilátky, které po vazbě na cílové znaky mohou být detekovány přístrojem. Vzorek je nasáván do úzké štěrbině tak, aby buňky procházely jednotlivě. Lasery o různých vlnových délkách excitují navázaná fluorescenční barviva a jejich emitované fluorescenční světlo je měřeno detektory (Ormerod, 2000).

Vzorky pro FACS byly značeny v 96-ti jamkových destičkách s kulatým dnem. Každá jamka obsahovala 5 – 7 x 10⁵ izolovaných buněk. Centrifugace vzorků na destičkách byla prováděna po dobu 2 minut při 260x g a 4°C.

4.5.1. Značení buněk pro určení povrchových znaků

Jednotlivé vzorky byly přeneseny do 96-ti jamkové destičky. Po centrifugaci dle výše uvedených parametrů byl rychlým vyklepnutím odstraněn supernatant, pelety protřepány (vortexový mixer) a resuspendovány v 200 µl FPBS. Destička byla znovu centrifugována, po odstranění supernatantu protřepána a vzorky znovu promyty 200 µl FPBS.

Promyté buňky po vyklepnutí supernatantu byly inkubovány s 10 µl směsi fluorescenčně značených primárních protilátek při 4°C ve tmě, po dobu 30 minut. Poté byly vzorky dvakrát promyty 200 µl chlazeného FPBS a centrifugovány (viz výše).

V případě použití primární protilátky značené biotinem byly vzorky inkubovány se sekundární protilátkou značenou streptavidinem Qdot-605 (10 µl po dobu 20 minut ve chladu a ve tmě a poté 2 x promyty 200 µl FPBS), který má k biotinu vysokou afinitu.

Po promytí byly buňky resuspendovány 80 – 100 µl FPBS a před vlastním měřením bylo přidáno 10 µl reagentie Hoechst 33258 (10µg/ml) pro odlišení mrtvých buněk.

4.5.2. Značení buněk pro určení intracelulárních znaků

Pro intracelulární značení buněk bylo použito stejné množství buněk. K izolovaným buňkám v médiu pro dlouhodobé kultivace bylo přidáno 25 µl PMA v koncentraci 50 ng / ml a 25 µl ionomycinu v koncentraci 1 µg / ml. Mitogeny byly přidány pouze k jedné polovině vzorků, druhá - kontrolní polovina zůstala bez stimulace. Následně bylo ke všem vzorkům dodáno 100 µl 1000 x ředěného Brefeldinu A, což je látka, která blokuje posun váčků z endoplazmatického retikula (ER) ke Golgiho aparátu. Poté byly vzorky inkubovány v CO₂ termostatu po dobu 5 hodin při teplotě 37°C.

Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány a 2x promyty 200 µl FPBS (viz výše). Po odstranění supernatantu následovalo značení povrchových molekul buněk přidáním 10 µl směsi protilátek a inkubace 30 minut při 4°C ve tmě. Po jejím skončení byly vzorky centrifugovány, 2x promyty 200 µl FPBS (viz výše) a fixovány 100 µl fixačního roztoku (eBioscience kit) po dobu 20 minut ve tmě a chladu. Po skončení

fixace byly vzorky centrifugovány a opět dvakrát promyty 200 μ l permeabilizačního roztoku, připraveného dle pokynů výrobce (eBioscience). Po odstranění supernatantu bylo přidáno 10 μ l směsi protilátek proti intracelulárním molekulám a vzorky inkubovány 30 minut v chladu a ve tmě. Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány a 2 x promyty 200 μ l permeabilizačního roztoku. V případě pozdějšího měření byly vzorky znovu fixovány 100 μ l fixačního roztoku (eBioscience).

4.6. Test NK buněčné cytotoxicity

Tento test prokazuje cytotoxickou aktivitu slezinných mononukleárních buněk zaměřenou na radioaktivně značené cílové buňky. Princip testu je založen na pohlcení ^{51}Cr cílovými buňkami a jejich inkubaci s cytotoxickými buňkami, jež vede k likvidaci cílových buněk a uvolnění ^{51}Cr do supernatantu, jehož množství se následně kvantifikuje.

Izolované efektorové buňky (viz odst. 4.4.2.) byly spočítány a naředěny v počtu $6,4 \times 10^6$ na 1 ml 5% CRPMI. Do 96 – jamkové destičky s kulatým dnem bylo nanášeno 100 μ l naředěných efektorových buněk, doplněno 50 μ l 5% CRPMI a přidáno 100 μ l naředěných ^{51}Cr značených cílových buněk (ředění 10^5 buněk na 1 ml 5% CRPMI). Vzorky byly aplikovány celkem ve třech poměrech efektorových buněk k cílovým – 64:1, 32:1, 16:1, a sice ve 4 jamkách pro každý poměr.

Pro určení spontánního rozpadu buněk bylo do jamek k tomu určených aplikováno 100 μ l cílových buněk doplněných 150 μ l 5% CRPMI.

Do jamek určených pro měření maximálního rozpadu bylo aplikováno 100 μ l cílových buněk, 100 μ l 5% CRPMI a 50 μ l 10% reagentie Triton X - 100.

Destičky byly inkubovány při 37°C a 5% CO_2 . Po 3,5 a 18 hodinách bylo z každé jamky odebráno 25 μ l supernatantu do PVC destičky a do každé jamky přidáno 75 μ l scintilačního roztoku. Destičky byly zalepeny průhlednou izolepou, po dobu 5 minut třepány na vortexu a poté centrifugovány 5 minut při 200x g. Uvolněná radioaktivita byla měřena pomocí scintilačního počítače Microbeta.

Ze získaných hodnot byla stanovena cytotoxická aktivita buněk v procentech cytotoxicity dle uvedeného vzorce:

$$\% \text{ ctx} = \frac{\text{cpm}_{\text{exp}} - \text{cpm}_{\text{spont}}}{\text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{\text{spont}}} \times 100$$

cpm_{exp} - množství ⁵¹Cr uvolněného ze směsi lymfocytů a cílových buněk

cpm_{spont} - množství ⁵¹Cr uvolněného pouze cílovými buňkami

cpm_{max} - maximální množství uvolněného ⁵¹Cr po použití detergentu (10% TritonX-100)

4.6.1. Linie cílových buněk pro test cytotoxicity

Pro test NK buněčné cytotoxicity byla použita linie myšího T lymfomu YAC-1 -/-/+ (negativní na expresi molekul H-2D^b a H-2D^d, pozitivní na expresi Rae-1 γ) připravené v Laboratoři přirozené buněčné imunity. Cílové buňky byly značeny ⁵¹Cr po dobu 90 minut v termostatu při 37°C, 5% CO₂ a 100% vlhkosti v poměru 100 μ Ci roztoku ⁵¹Cr na 10⁶ buněk.

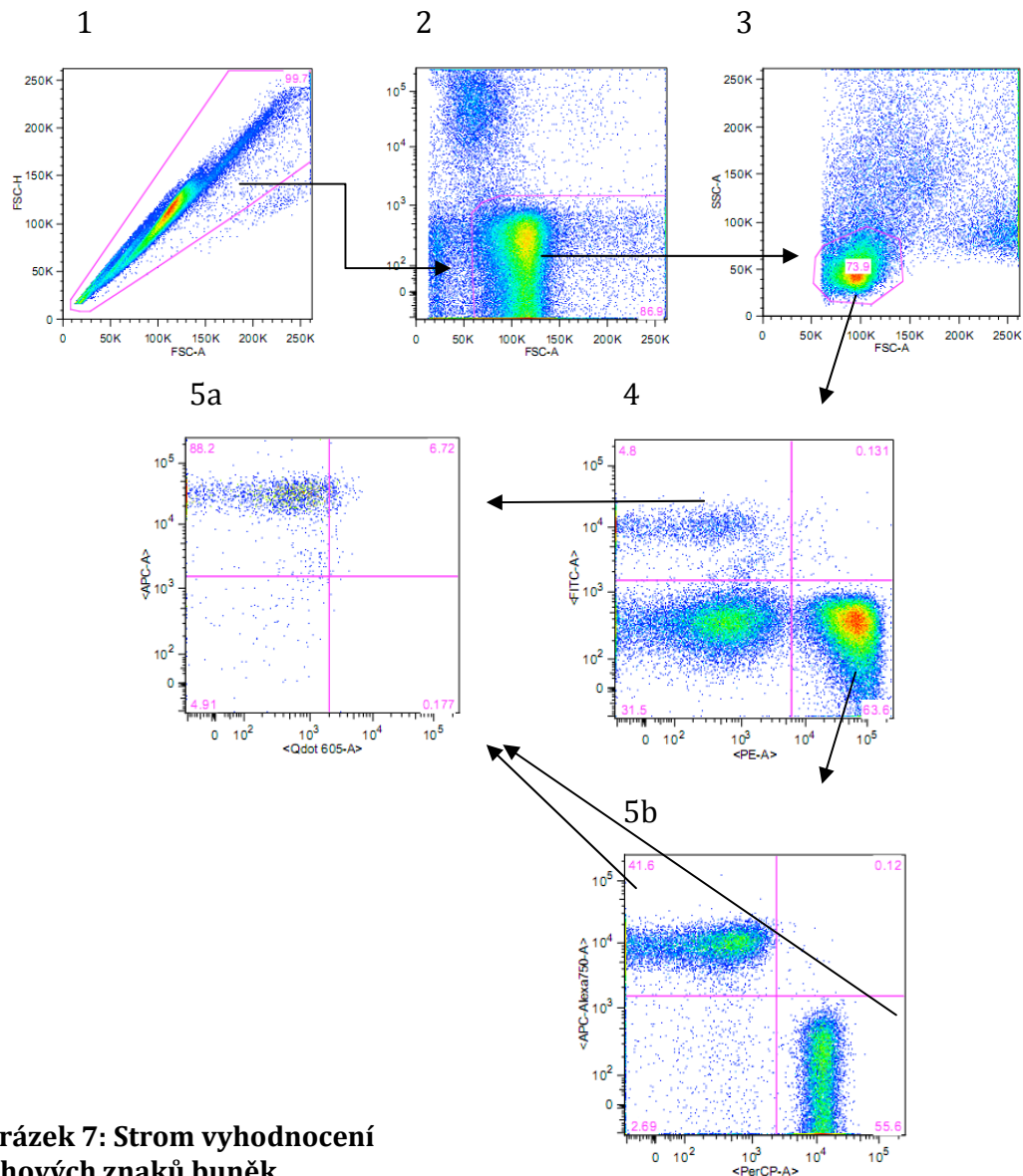
4.7. Statistické vyhodnocení výsledků

Získaná data byla převedena do MS Excel verze 2007. FACS analýzy byly vyhodnoceny v programu FlowJo verze 9.4.1 MAC. Ke grafickému i statistickému vyhodnocení dat byl použit program GraphPad Prism 5. Výsledky byly statisticky ověřeny nepárovým T-TESTEM s použitím metody nulové hypotézy, tedy že se soubory významně neliší. K rozhodnutí platnosti nulové hypotézy byl použit 95% interval spolehlivosti (p<0,05). Statisticky významné odchylky byly označeny hvězdami (p* < 0,05; p** < 0,01; p*** < 0,001). Pro skupinové porovnání souborů dat byl použit jednosměrný test ANOVA s následným Bonferroniho testem.

5. Výsledky

5.1. Postup vyhodnocení FACS analýz pro identifikaci povrchových znaků a i intracelulární detekci cytokinů

5.1.1. Analýza povrchových znaků

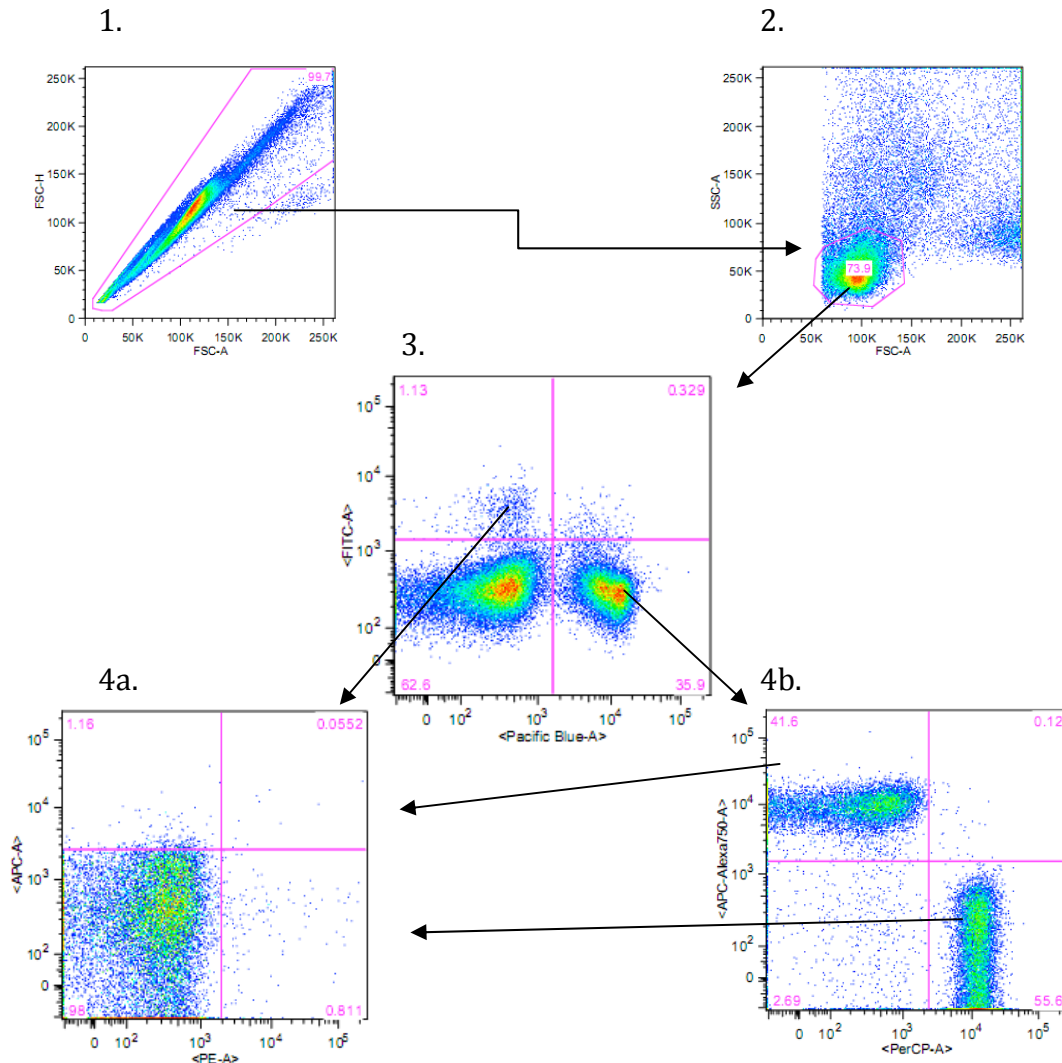


Obrázek 7: Strom vyhodnocení povrchových znaků buněk

Úsek (1) označuje diskriminaci buněk, které neprošly laserovým paprskem samostatně. Následně (2) byl z jednotlivých buněk ohraničen region lymfoidních buněk, ze kterého byly vybrány živé buňky (3). V úseku (4) je vyznačeno rozdělení buněk podle znaků NKp46 (Fitc) a CD3 (PE). Levý horní kvadrant NKp46+ CD3- byl dále dělen na NK1.1+ (APC) / NKG2D+ (Qdot-605; 5a). Pravý dolní kvadrant úseku (4) NKp46- CD3+ byl rozdělen na CD4+ (PerCP) / CD8+

(APC-Alexa750; 5b). Na obou populacích T lymfocytů (CD3+ CD4+, CD3+ CD8+) byl následně hodnocen poměr NK1.1 / NKG2D (viz úsek 5a).

5.1.2. Intracelulární detekce cytokinů



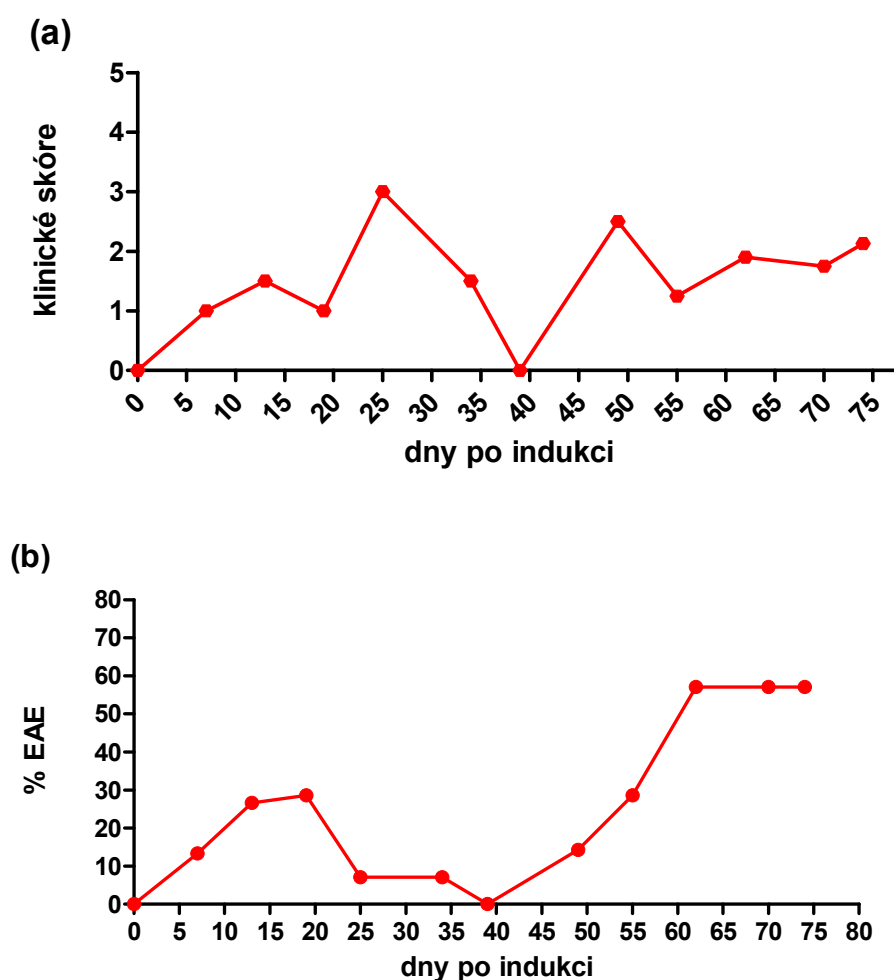
Obrázek 8: Strom vyhodnocení intracelulární produkce cytokinů.

Úsek (1) a (2) je shodný jako u postupu vyhodnocení extracelulárních znaků. Úsek (3) znázorňuje kvadranty NKp46+ (Fitc) v levém horním a CD3+ (Pacific Blue) v pravém dolním. Úsek (4a) znázorňuje vlastní produkci cytokinů NKp46+ buňkami, úsek (4b) rozdělení lymfocytů na CD4+ (PerCP - pravý dolní kvadrant) a CD8+(APC-Alexa750 - levý horní kvadrant). Na obou single-pozitivních populacích T lymfocytů je dále rozdělení podle produkce cytokinů (4a)

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

5.2.1. Klinické parametry

Patnáct SJL/J myší bylo imunizováno peptidem proteolipidového proteinu PLP₁₃₉₋₁₅₁ 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.



Obrázek 9: (a) Klinické skóre nemoci bylo hodnoceno u každé myši jednotlivě. Do grafu byla vynesena průměrná hodnota klinické manifestace u celé skupiny. Ta byla počítána součtem všech stupňů dělených počtem myší, u nichž byly příznaky pozorovány. (b) Graf znázorňuje počet myší ze skupiny v %, u kterých se v daný den manifestovaly příznaky EAE.

U SJL myši byla pozorována střídavě-recidivující forma EAE. Sedmý den byly pozorovány první příznaky. Myši měly atonický ocas, u jedné se projevila paralýza zadních končetin. Od 25. do 40. dne byly myši v remisi EAE, jejíž druhá ataka se nejvýrazněji projevila 50. den po indukci.

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

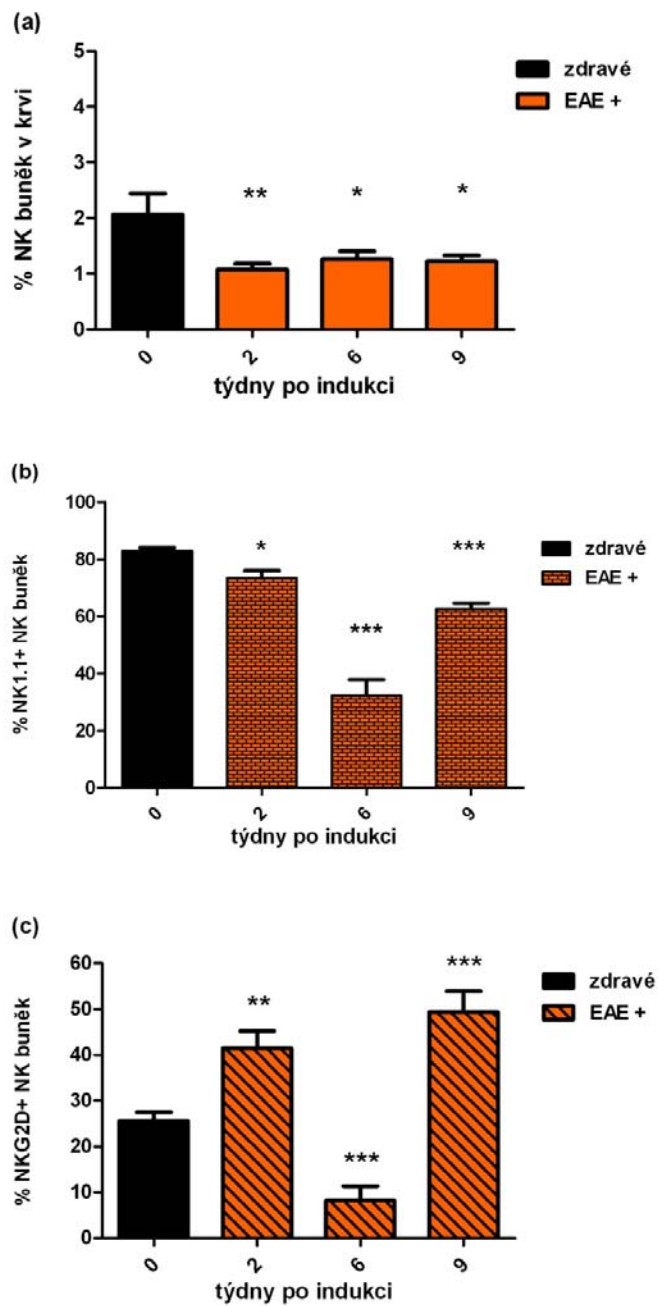
Na obrázku 10 (a) jsou znázorněny změny v počtu NK buněk v periferní krvi v průběhu EAE. Po celou dobu je jejich snížení u imunizovaných myši statisticky významné. Výsledek ANOVA testu prokázal, že změny jsou signifikantní pouze v porovnání se zdravou kontrolou. Statisticky významné jsou změny v expresi NKR-P1B receptoru (b), které jsou shrnuté v tabulce č. 5. Exprese NKG2D (c) je po celou dobu nemoci statisticky významná, viz tabulka č. 6.

Tabulka 5: ANOVA test exprese NKR-P1B

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 6: ANOVA test exprese NKG2D

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

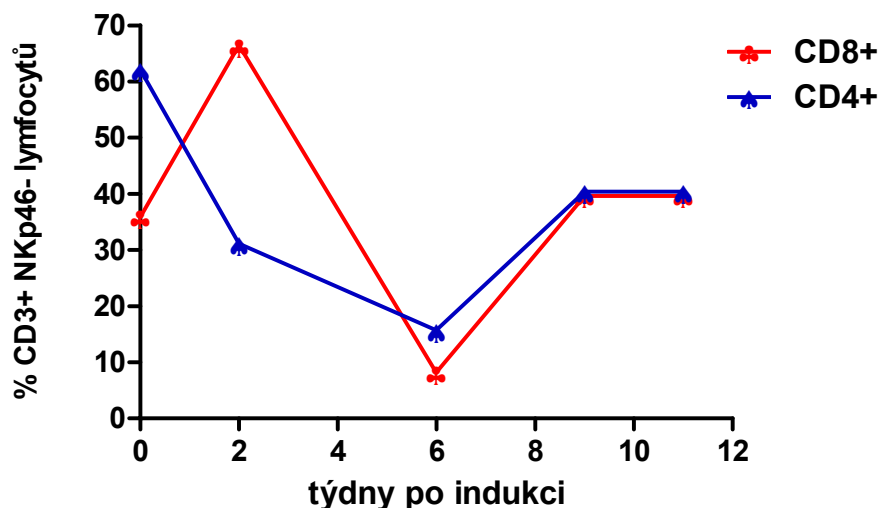


Obrázek 10

Obrázek č. 10: (a) Počet NK buněk v krvi SJL myší (2. týden: $p=0,0071$; 6. týden: $p=0,036$; 9. týden: $p=0,022$). (b) Expresse inhibičního NKR-P1B receptoru a aktivačního receptoru NKG2D (c).

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

Obrázek 11 znázorňuje zastoupení CD4+ a CD8+ lymfocytů v periferní krvi myši v průběhu EAE a je z něho patrné, že v počátcích progresu EAE se dramaticky mění poměr CD4:CD8.



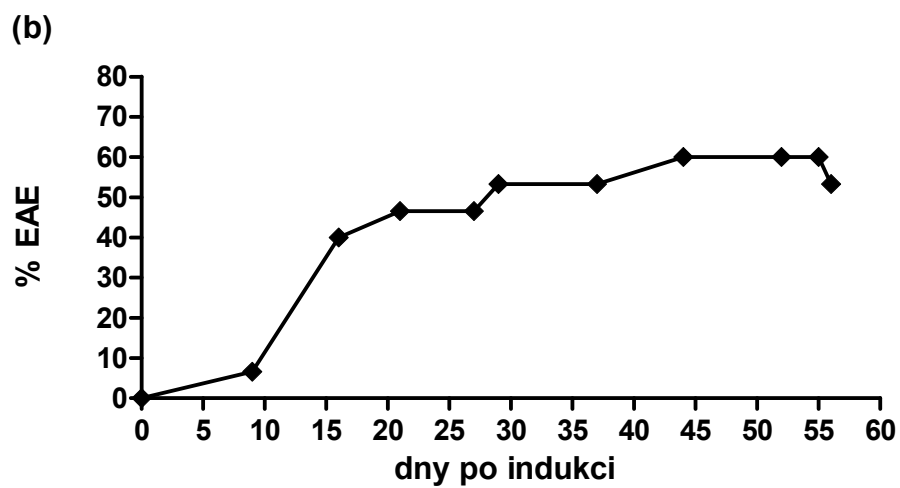
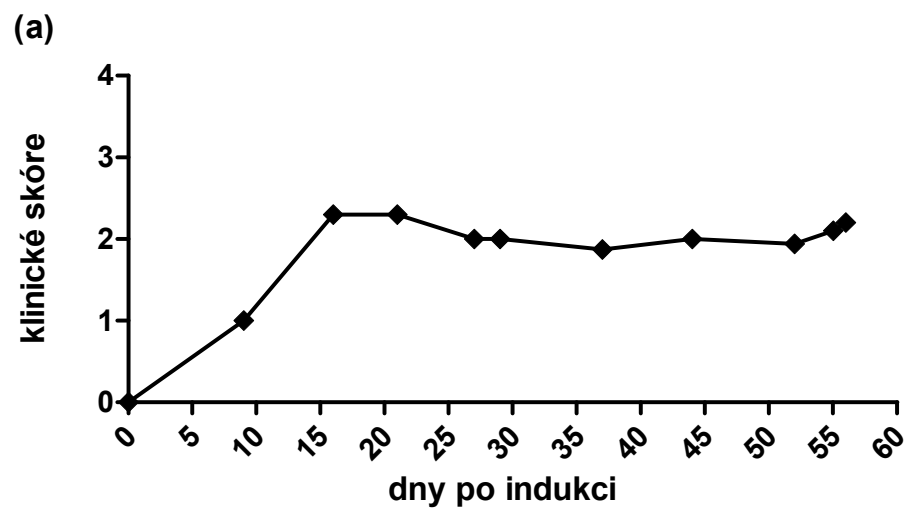
Obrázek 11: Změny v počtech T lymfocytů v periferní krvi.

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

5.3.1. Klinické parametry

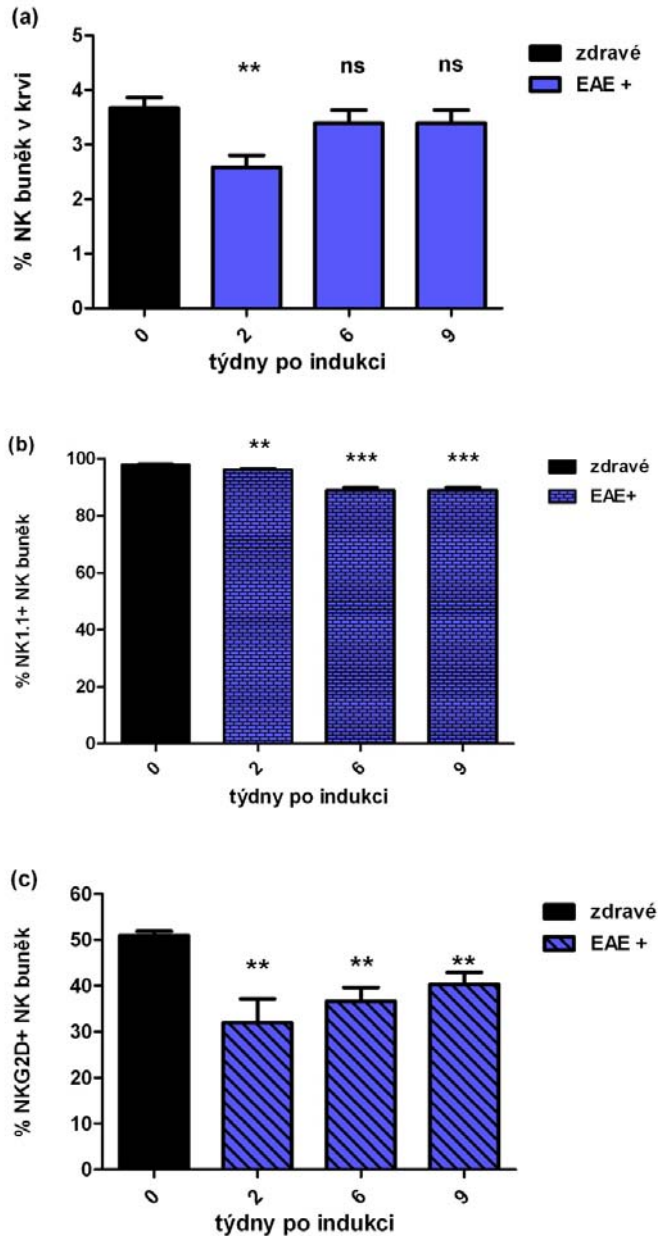
Patnáct C57BL/6 myši bylo imunizováno peptidem myelinového oligodendrocytárního glykoproteinu MOG 35-55 ve směsi s CFA. Pertusový toxin byl aplikován ve třech dávkách, 0, 24 a 48 hod. U 9 myši byla pozorována chronická forma EAE. Myši byly pravidelně pozorovány a příznaky odečítány podle jejich závažnosti.

Klinické skóre nemoci i počet myši s pozorovatelnými příznaky v daný den byl odečítán stejným způsobem jako u SJL myši.



Obrázek 12: (a)Klinické skóre znázorňuje chronickou formu EAE, první příznaky se projevily 10 den. (b)Podíl myši s pozorovatelnými příznaky v daný den.

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



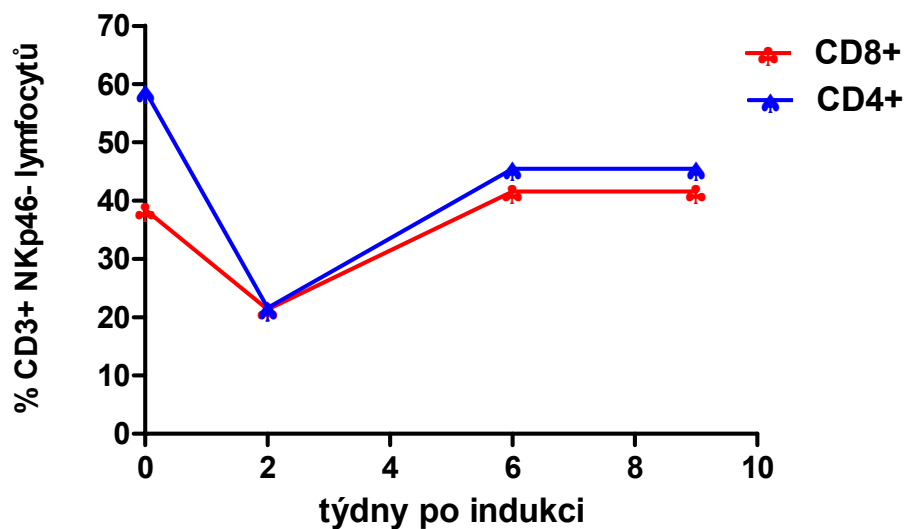
Obrázek 13: (a) U C57BL/6 myši byl statisticky významný pokles NK buněk zaznamenán pouze 2. týden ($p=0,002$) po imunizaci, v dalším průběhu nemoci se jejich podíl v krvi významně nezměnil. (b) Expresce aktivačního receptoru NKR-P1C na NK buňkách C57BL/6 myši byla také během celého průběhu EAE statisticky významně snížena (2. týden: $p=0,001$; 6. a 9. týden: $p<0,0001$). V tabulce č. 8 je uvedeno porovnání exprese mezi všemi týdny. (c) Expresce NKG2D na NK buňkách byla oproti zdravým kontrolám statisticky významně snížena v celém průběhu EAE (2. týden: $p=0,008$; 6. týden: $p=0,001$; 9. týden: $p=0,002$).

Tabulka 7: ANOVA test exprese NKR-P1C v průběhu EAE

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

5.3.3. 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 a poměr CD4:CD8 zůstává na rovdíl od SJL mžší po celou dobu progresu EAE relativně stejný.



Obrázek 14: Graf znázorňuje změny v počtu T lymfocytů v krvi u C57BL/6 myši.

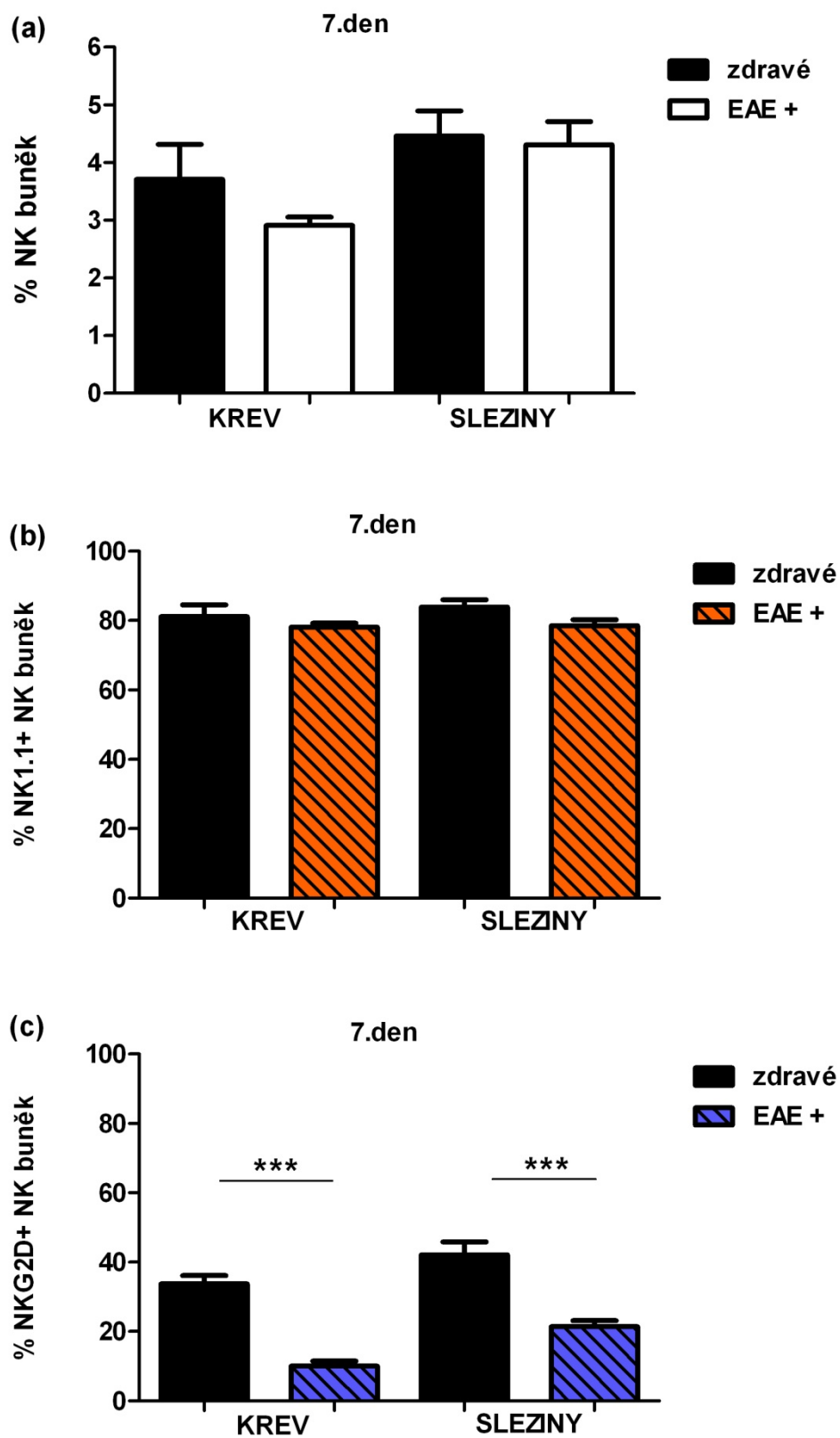
5.4. Porovnání imunologických změn ve slezině a periferní krvi u C57BL/6 myší 7. a 14. po aktivní indukci EAE

5.4.1. Imunitní odpověď 7. den po indukci EAE

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

K imunizaci MOG₃₅₋₅₅ (viz odst. 4.1.1.) bylo použito 20 samic C57BL/6 a 10 samic bylo ponecháno kontrolních. Ke každému pokusu bylo použito 10 imunizovaných a 5 kontrolních myší.

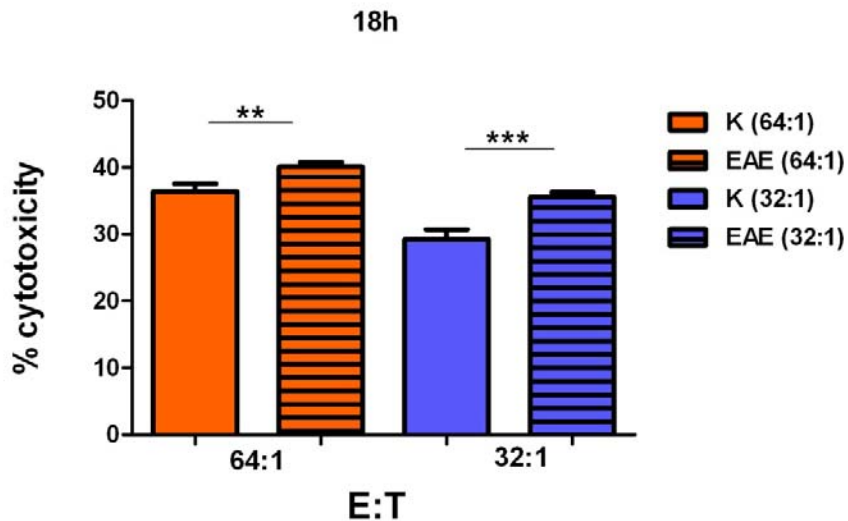
Obrázek č. 15 znázorňuje změny v počtu NK buněk (a), expresi aktivačního receptoru NKR-P1C (b) a expresi aktivačního receptoru NKG2D (c) na NK buňkách. Statisticky významná je pouze změna u exprese NKG2D, a sice v krvi i slezinách (7. den v krvi $p < 0,0001$ a slezinách $p < 0,0001$).



Obrázek 15: NK buňky 7. den po indukci EAE.

5.4.1.2. Cytotoxická aktivita NK buněk 7. den po indukci EAE

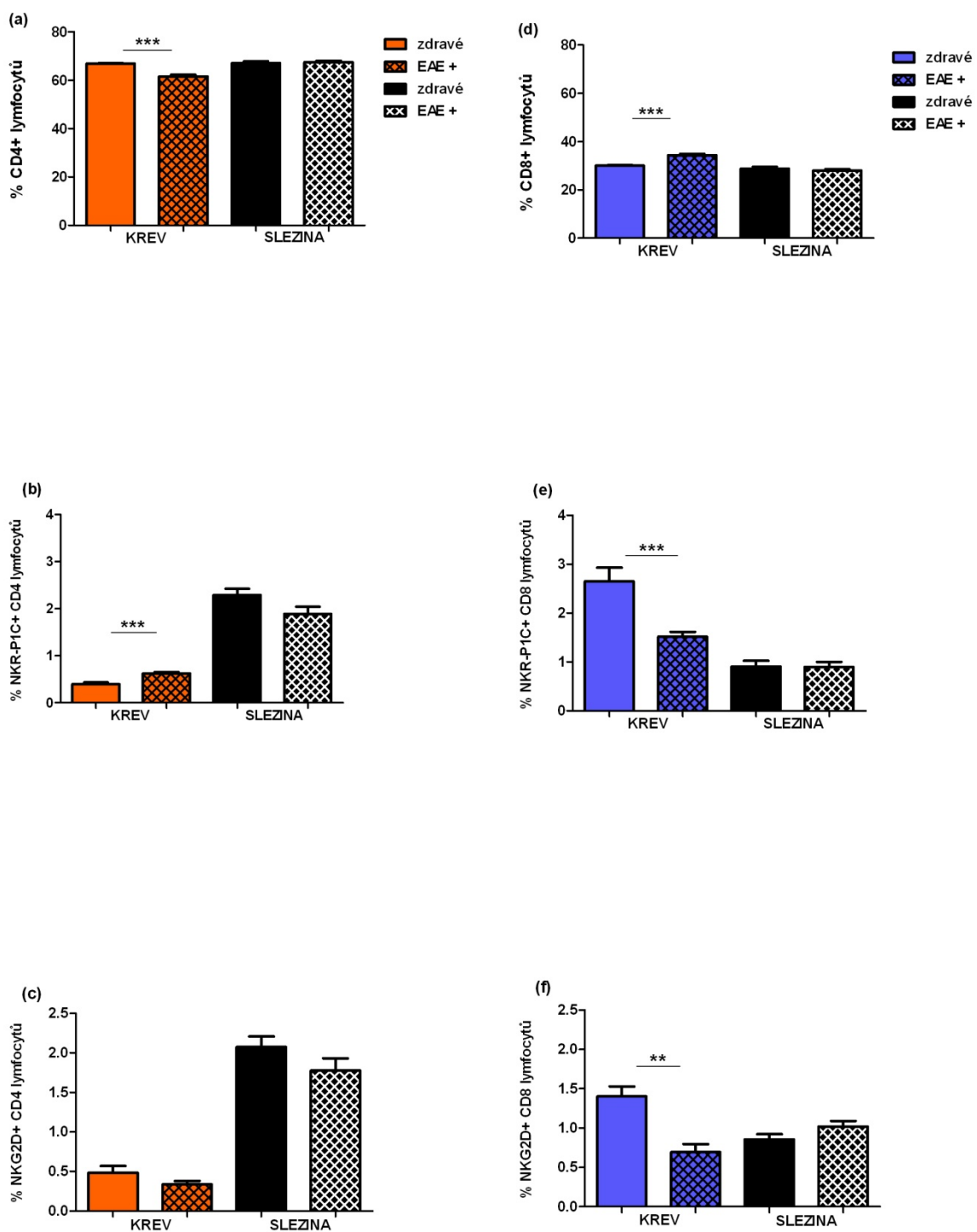
Obrázek č. 16 zobrazuje zvýšení cytotoxicity NK buněk 7. den po indukci EAE.



Obrázek 16: Cytotoxická aktivita NK buněk u EAE pozitivních myší je statisticky významně vyšší, než u zdravých kontrolních myší ($p=0,006$; $p<0,0001$)

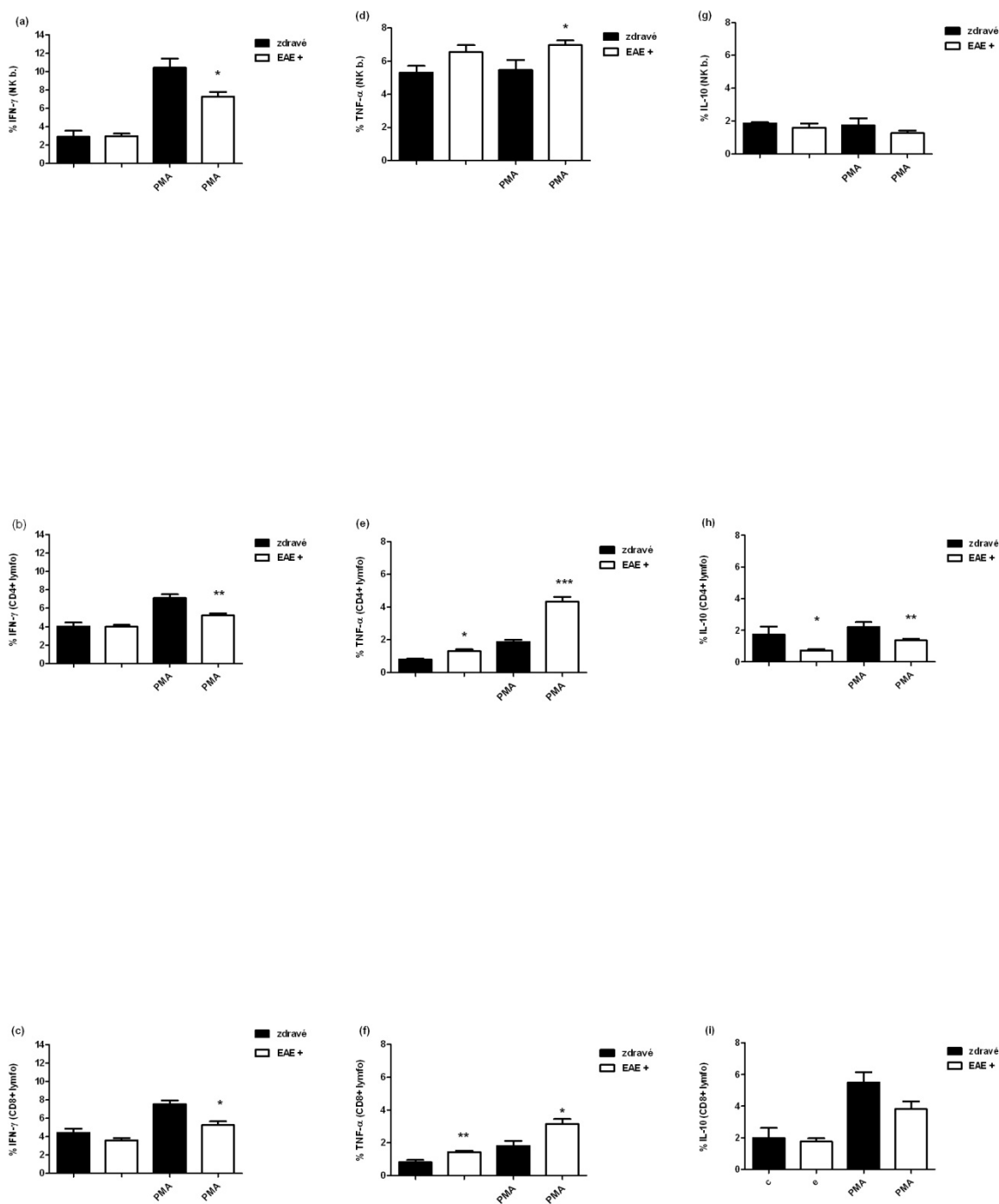
5.4.1.3. Relativní zastoupení $CD4+$ a $CD8+$ T lymfocytů a exprese NKR-P1 a NKG2D na těchto buňkách, 7. den po indukci EAE

Obrázek č. 17 (a) znázorňuje zastoupení $CD4+$ T lymfocytů, jejichž počet v krvi EAE+ myší statisticky významně klesá ($p<0,0001$). (b) exprese NKR-P1 receptoru na těchto buňkách je u EAE+ statisticky významně nižší ($p<0,0001$). (c) Exprese receptoru NKG2G se výrazně nemění. Zastoupení $CD8+$ T lymfocytů v krvi (d) se statisticky významně snižuje ($p<0,001$), stejně jako exprese NKR-P1 (e) na těchto buňkách ($p<0,0001$). Exprese NKG2D se u $CD8+$ T buněk v krvi signifikantně snižuje ($p=0,002$).



Obrázek 17

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



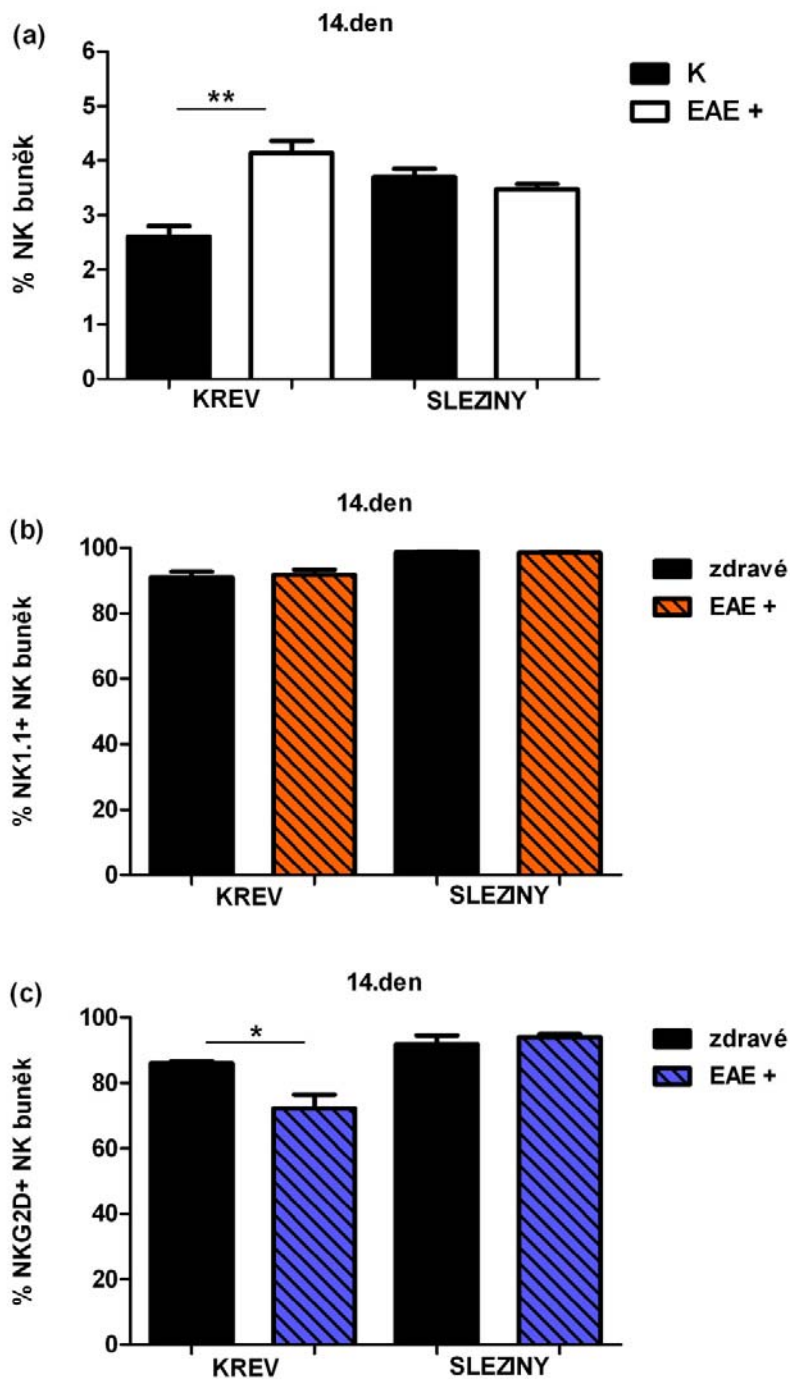
Obrázek 18: Detekce cytokinů u NK buněk a T lymfocytů

Izolované mononukleární buňky slezin byly stimulovány PMA a ionomycinem. K potlačení extracelulární produkce cytokinů byl ke vzorkům přidán Brefeldin A. Buňky byly následně po dobu 5 hodin inkubovány při 37°C.

Produkce $\text{INF-}\gamma$ po stimulaci buněk PMA (obrázek 20) se statisticky významně u lymfocytů imunizovaných myší zvýšila, u NK buněk (a) $p=0,014$; CD4+ T lymfocytů (b) $p=0,003$; i CD8+ T lymfocytů (c) $p=0,033$. Produkce $\text{TNF-}\alpha$ byla u NK buněk (d) signifikantní po jejich stimulaci ($p=0,034$). U CD4+ T buněk (e) byla zvýšená i u nestimulovaných buněk ($p=0,024$; $P<0,0001$) a stejná změna v produkci byla i u CD8+ T lymfocytů (f) tedy ($p=0,002$; $p=0,032$). Produkce protizánětlivého IL-10 u NK buněk (g) se statisticky významně nezměnila, podobně jako jeho produkce u CD8+ T lymfocytů (i). (h) Signifikantní zvýšení bylo v produkci IL-10 u CD4+ T buněk ($p=0,011$; $p=0,006$).

5.4.2. Imunitní odpověď 14. den po indukci EAE

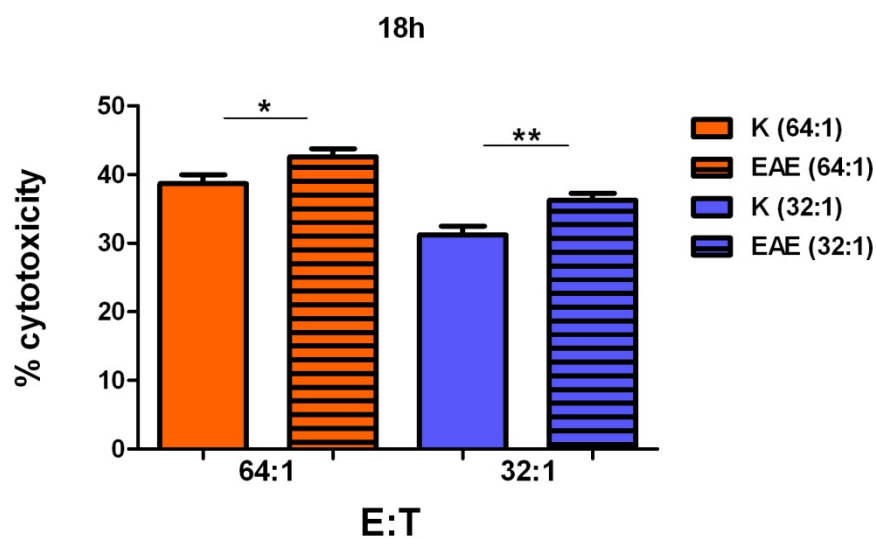
5.4.2.1. Relativní zastoupení NK buněk 14. den po indukci EAE a exprese aktivačních receptorů NKR-P1C a NKG2D na těchto buňkách



Obrázek 19: NK buňky 14. den po indukci EAE

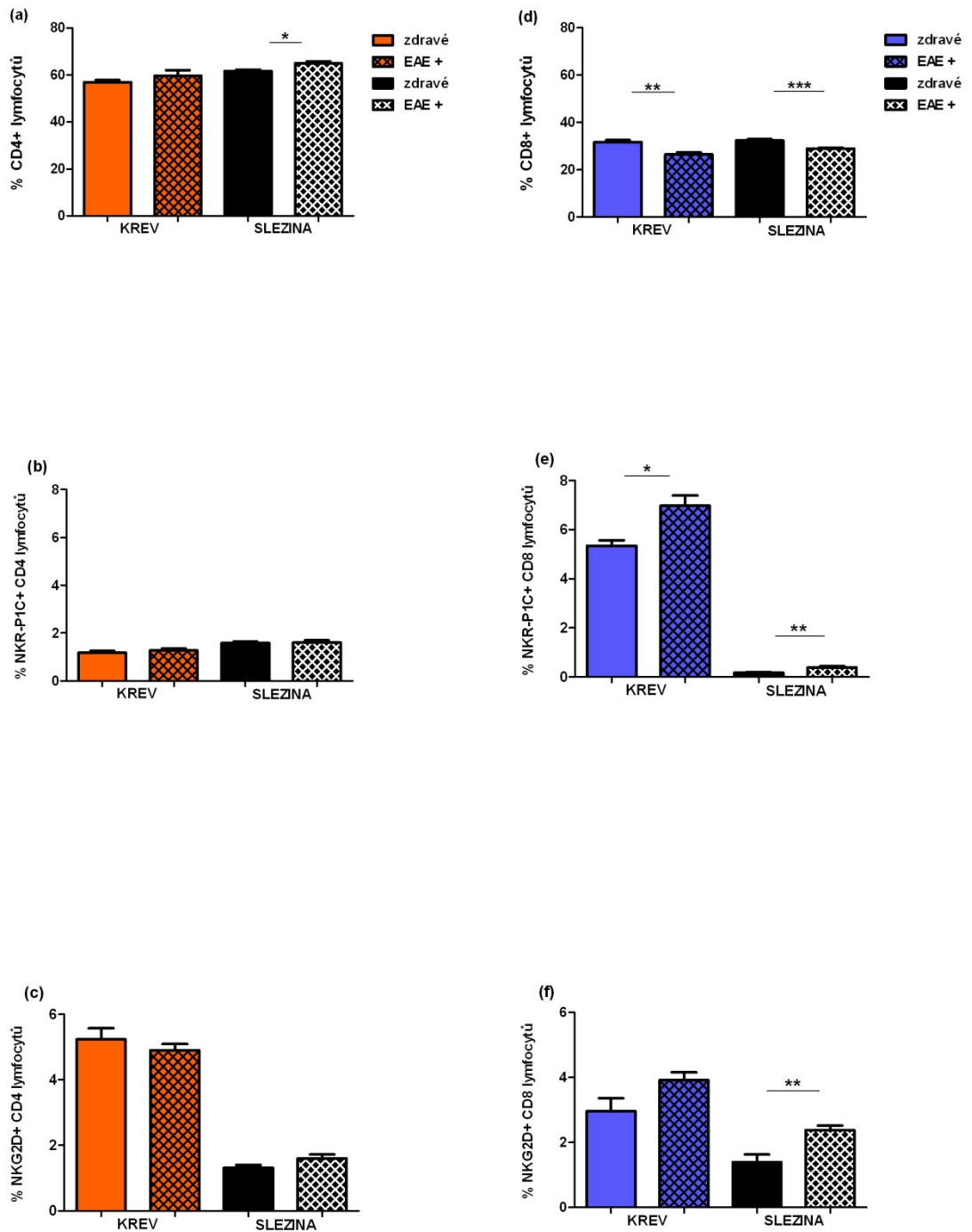
Obrázek č. 19 znázorňuje změny v počtu NK buněk (a), expresi aktivačního receptoru NKR-P1C (b) a expresi aktivačního receptoru NKG2D (c) na NK buňkách. Statisticky významné je zvýšení NK buněk v krvi ($p=0,003$) a snížení exprese NKG2D na NK buňkách v krvi ($p=0,03$).

5.4.2.2. Cytotoxická aktivita NK buněk 14. den po indukci EAE



Obrázek 20: Cytotoxická aktivita NK buněk u EAE pozitivních myší je statisticky významně vyšší, než u zdravých kontrolních myší ($p=0,035$; $p=0,0047$).

5.4.2.3. Relativní CD4+ a CD8+ T lymfocytů a exprese NKR-P1C a NKG2D receptorů na těchto buňkách 14. den po indukci EAE

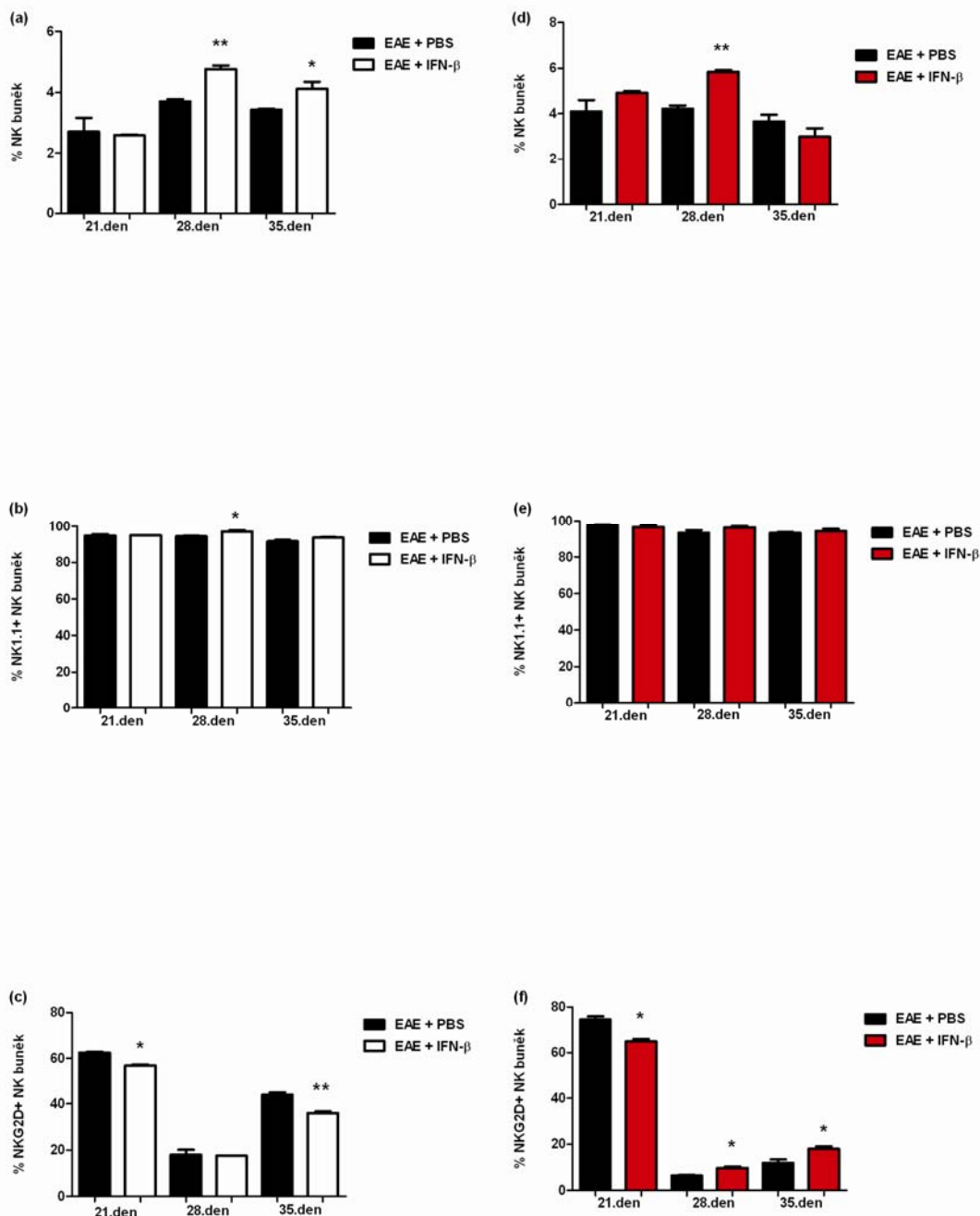


Obrázek 21: (a) znázorňuje zastoupení CD4+ T lymfocytů, jejichž počet ve slezině EAE+ myši statisticky významně stoupá ($p=0,023$). (b) exprese NKR-P1 receptoru na těchto buňkách není u EAE+ významná stejně exprese receptoru NKD2G se výrazně nemění jako (c). Zastoupení CD8+ T lymfocytů v krvi i slezině (d) statisticky významně stoupá ($p=0,004$; $p=0,0008$). E xpresa NKR-P1 (e) na těchto buňkách signifikantně stoupá

($p=0,039$; $p=0,002$). Exprese NKG2D u CD8+ T buněk v krvi stoupá, signifikantně však na buňkách sleziny ($p=0,003$).

5.5. Vliv interferonu β na imunitní odpověď u C57BL/6 myši po aktivní indukci EAE

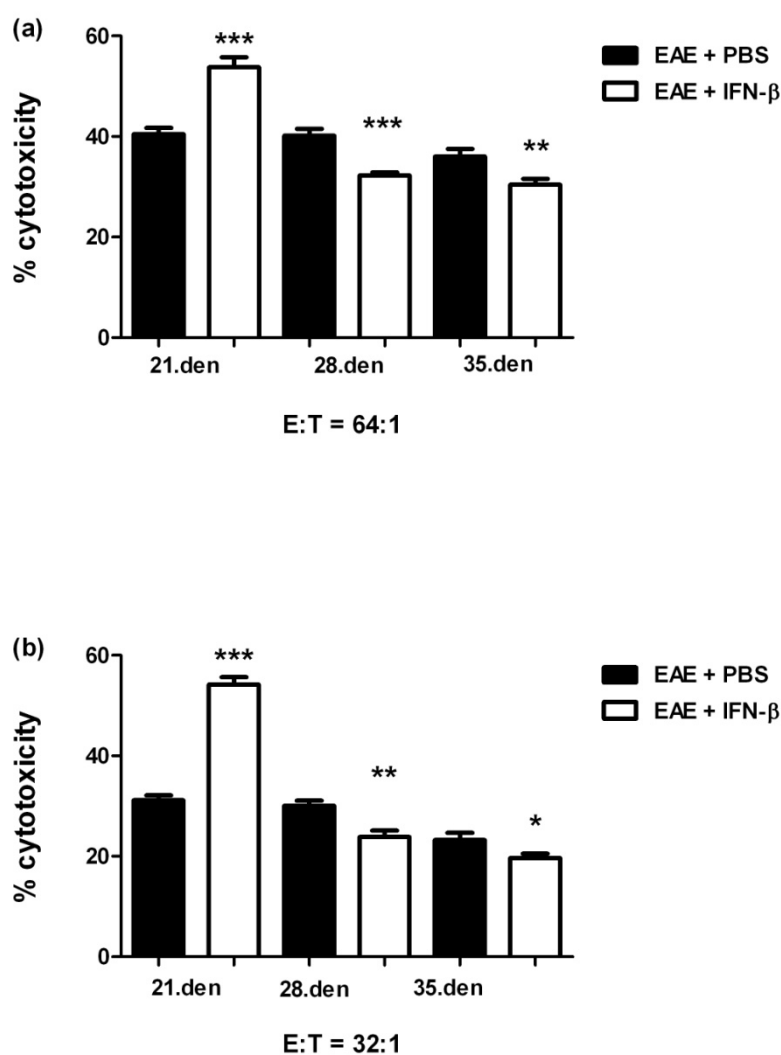
5.5.1. Relativní zastoupení NK buněk a exprese receptorů NKR-P1C a NKG2D



Obrázek 22: Signifikantní nárůst NK buněk u myši léčených IFN- β je ve slezině (a) 28. den ($p=0,0049$) i 35. den ($p=0,043$) a 28. den v krvi (d) $p=0,0095$. Exprese NKR-P1C statisticky vzrostla pouze 28. den na NK buňkách slezin léčených myši (b) $p=0,028$. Na krevních NK buňkách se exprese NKR-P1C výrazně nezměnila (e). Exprese NKG2D na NK buňkách krve byla u

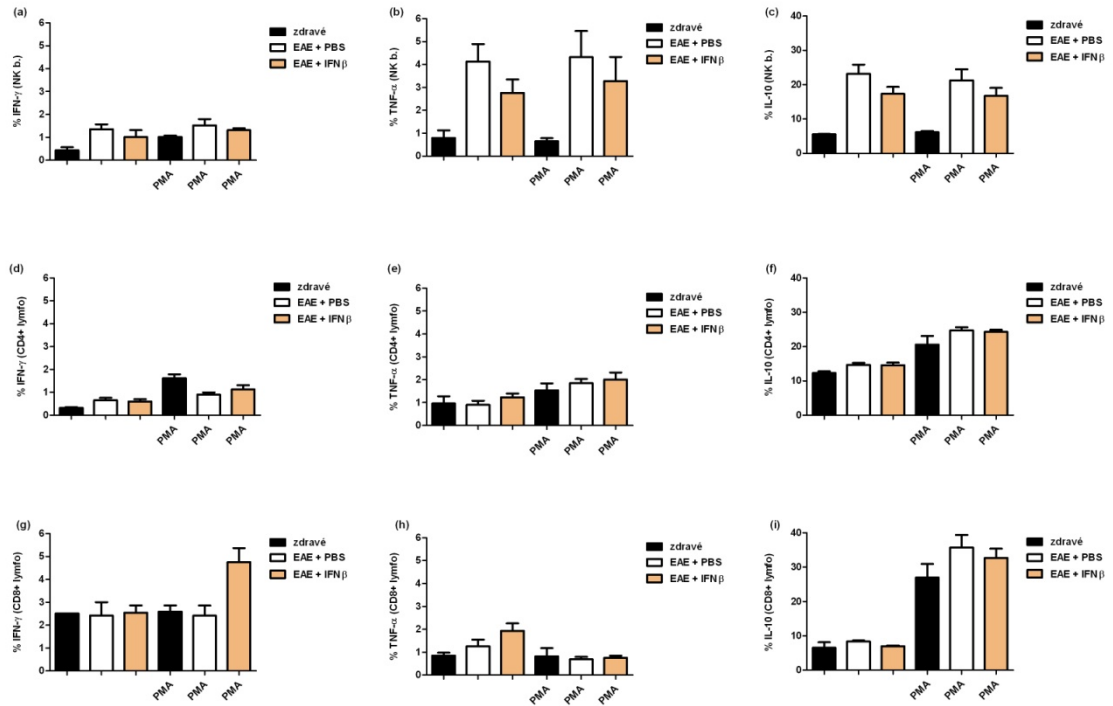
myši léčených IFN- β nižší ($p=0,014$; $p=0,002$) (c). Expres NKG2D na NK buňkách slezin (f) myši léčených IFN- β se statisticky významně nejprve snížila, poté byla vyšší než u kontrolních myši ($p=0,034$; $p=0,044$; $p=0,039$).

5.5.2. Vliv IFN- β na NK buněčnou cytotoxicitu



Obrázek 23: Cytotoxicita NK buněk myši léčených IFN- β statisticky významně vzrostla, později klesla oproti NK buňkám kontrolních myši. (a) signifikance: $p<0,0001$; $p=0,0002$; $p=0,008$. (b) signifikance: $p<0,0001$; $p=0,0022$; $p=0,041$

5.5.3. Vliv IFN- β na syntézu cytokinů NK buněk a T lymfocytů

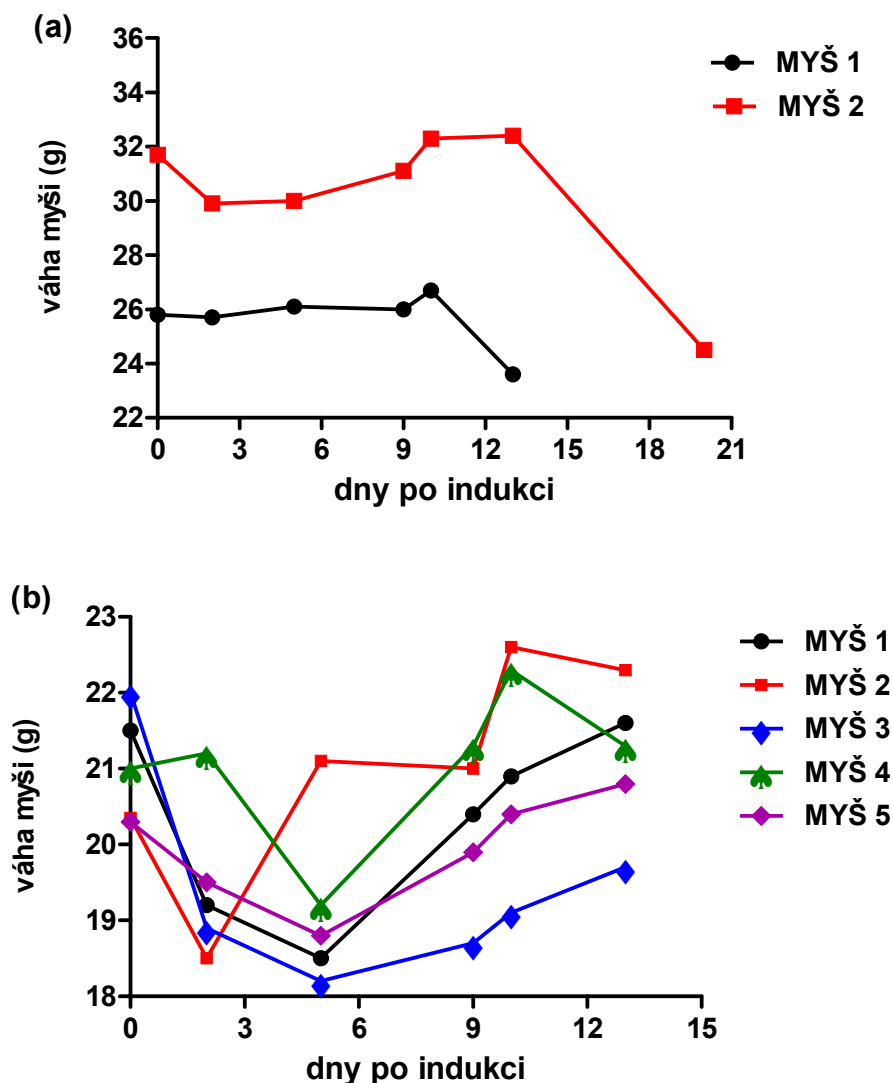


Obrázek 24: Produkce IFN- γ NK buňkami (a), CD4+ T lymfocyty (d) a CD8+ T lymfocyty (g). Produkce TNF- α NK buňkami (b), CD4+ T lymfocyty (e) a CD8+ T lymfocyty (h). Produkce IL-10 NK buňkami (c), CD4+ T lymfocyty (f) a CD8+ T lymfocyty (i). Statisticky významné rozdíly jsou pouze v produkci IL-10 (tab. 10), která je vyšší u imunizovaných myší.

Tabulka 8: ANOVA test produkce IL-10 NK buňkami. Červená značí sloupce stimulovaných buněk. Z - zdravé myši, E - EAE + PBS, F - EAE + IFN- β .

Bonferroni's Test	Summary
Z vs E	**
Z vs F	*
E vs F	ns
Z vs E	**
Z vs F	*
E vs F	ns

5.6. Indukce EAE adoptivním transferem MOG₃₃₋₅₅ - specifických T lymfocytů



Obrázek 25: (a) Úbytek váhy myši, jimž byly přeneseny aktivované lymfocyty z uzlin. (b) Úbytek váhy myši, jimž byly přeneseny aktivované lymfocyty ze slezin.

Obě myši (a) 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 zabita. U myši č. 2 se EAE začala projevovat 13. den po indukci EAE, totální paralýza zadních končetin nastala 20. den. Z toho důvodu byla myš usmrcena.

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

6. Diskuze

Experimentální autoimunitní encefalomyelitida je považována za myší model lidské autoimunitní 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 a tím se manifestují nejrůznější klinické příznaky 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 uhynutí zvířete (STROMNES I. G., 2006). Dalším znakem navozené EAE je úbytek váhy pokusného zvířete (slovní komentář Dr. Hříbalové).

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 zapojen pouze imunitní systém myši. Zánětlivá reakce u lidí i myší je podněcována vznikem a proliferací autoreaktivních klonů Th buněk. Jejich funkce podporují fagocytující buňky a aktivují další efektorové buňky.

Pro účely diplomové práce byly vybrány dva inbrední kmeny myší – SJL/J a C57BL/6. Oba kmeny se liší formou MHC molekul, SJL nesou H-2^s a C57BL/6 mají H-2^d. SJL myši jsou standardně používány při studiu lidských autoimunitních i nádorových nemocněních (HUTCHINGS, 1986). V porovnání s C57BL/6 mají výrazně nižší počet NK buněk, to je asi 1-2% v krvi, zatímco C57BL/6 mají 4-5%. NK buňky obou kmenů jsou polymorfní v receptorech NKR-P1. SJL/J myši nesou *inhibiční* izoformu NKR-P1B a C57BL/6 *aktivační* NKR-P1C. 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^{lck}. Obě formy jsou detekovatelné

protilátkou PK-136, která váže společnou strukturní molekulu *NK1.1* jimi sdílenou (LJUTIC, 2005).

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

Pro účely této práce byly k navození EAE použity peptidy MOG₃₅₋₅₅ ve směsi s CFA a pertusovým toxinem pro C57BL/6 myši a PLP₁₃₉₋₁₅₁ ve směsi s CFA u SJL myši (MILLER, 2007). U C57BL/6 myši se klinické příznaky začaly projevovat atonií ocasu a přibližně 20. den dospěla nemoc do chronické vrcholné fáze bez remise. U SJL myši byly závažné příznaky pozorovány již sedmý den, nicméně vrcholná fáze se manifestovala 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 poznatky v literatuře.

V průběhu nemoci byla myším odebírána krev z ocasní žíly a prováděna analýza počtu NK buněk a T lymfocytů a také byla sledována exprese NKR-P1 molekul. Myši NK buňky mohou nést 5 izoform těchto receptorů, *inhibiční* NKR-P1B,D a *aktivační* NKR-P1A, C, F. Lidské NK buňky exprimují pouze jeden NKR-P1 receptor označený CD161. Právě tato molekula byla také popsána u lidských CD4+ Th17 lymfocytů. V té souvislosti jsme sledovali přítomnost a změny v její hladině na povrchu CD4+ T buněk. Molekula NKG2D se na NK buňkách vyskytuje jako heterodimerní receptor společně s podjednotkou CD94 a spouští cytotoxické mechanismy. Tento znak nesou i cytotoxické T lymfocyty a byl objeven i na CD4+ T buňkách (DAI, 2009).

Zastoupení NK buněk v krvi SJL myši 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 myši. Expese NKR-P1B izoformy u NK buněk SJL myši významně klesla šestý týden po indukci, kdy byly myši v remisi. Expese NKG2D byla v remisní fázi také mnohokrát snížena, ovšem jeho hladina při atacích nemoci byla oproti původní hodnotě signifikantně zvýšena. Zastoupení NK buněk C57BL/6 myši v krvi bylo nejnižší při počátcích klinických projevů nemoci, tedy ve druhém týdnu po indukci EAE, tedy. Expese aktivačních receptorů NKR-P1C i NKG2D byla statisticky významně snížena po dobu průběhu EAE. Získaná data podporují teorii o regulační funkci NK buněk při autoimunitách.

Hladina CD4⁺ T lymfocytů v krvi SJL v průběhu EAE klesala, nejnižší hodnota byla při remisní fázi. Poté při druhém ataku nemoci jejich počet rostl. Počet CD8⁺ T lymfocytů v krvi SJL výrazně vzrostl 2. týden po indukci pravděpodobně přesunem těchto buněk do CNS. Nejnižší byl opět v remisi. Zastoupení CD4⁺ i CD8⁺ lymfocytů v krvi C57BL/6 koreluje s průběhem nemoci. Ve druhém týdnu, kdy se začínají objevovat příznaky, byla jejich hladina nejnižší, což je pravděpodobně způsobeno akumulací těchto buněk v CNS. Při chronické fázi EAE jejich počet v krvi stoupal a poté se držel na konstantní úrovni. Zde je patrné, že poměr CD4:CD8 je u obou kmenů značně rozdílný v závislosti na průběhu nemoci a může tak souviset s remisním/chronickým projevem onemocnění.

Pro další výzkum byly použity pouze samice kmene C57BL/6. Pro podrobnější představu imunologického 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 pozitivních myší a 5 zdravých kontrol.

Zastoupení NK buněk v krvi a slezinách nesoucí NKR-P1C u EAE+ myší bylo nižší než u kontrolních, avšak statisticky významný pokles byl jen v expresi NKG2D receptoru. Cytotoxická aktivita NK imunizovaných myší ale přesto signifikantně vzrostla.

Počet CD4⁺ T lymfocytů s vysokou expresí NKR-P1 v krvi významně klesl. Expresie molekuly NKG2D na CD4⁺ T buňkách nebyla významně ovlivněna. Hladina CD8⁺ lymfocytů s nízkou expresí aktivačních receptorů NKR-P1 i NKG2D v krvi statisticky významně vzrostla.

Funkční aktivita NK buněk a obou populací T lymfocytů 7. den byla ověřena intracelulární produkcí cytokinů. Prozánětlivý IFN- γ byl všemi populacemi u imunizovaných myší oproti zdravým kontrolám produkován ve výrazně nižší koncentraci. Naopak koncentrace TNF- α byla statisticky významně vyšší u všech sledovaných lymfocytů izolovaných z EAE pozitivních myší. Produkce IL-10 těmito populacemi nebyla příliš odlišná.

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. Expresie NKR-P1C se nezměnila. Cytotoxická aktivita NK buněk EAE pozitivních myší byla vyšší než u kontrolních buněk.

Hladina CD4+ T lymfocytů u imunizovaných myší vzrostla pouze ve slezinách. Změny v expresi NKR-P1 i NKG2D nejsou statisticky významné. Naopak počet CD8+ T lymfocytů s vysokou expresí NKR-P1 a NKG2D se v krvi i slezině výrazně snížil.

Po navození modelu EAE jsme v dalším pokusu aplikovali jedné skupině myší IFN- β , který se používá při léčbě lidské roztroušené sklerózy. První dávka byla aplikována při imunizaci MOG₃₅₋₅₅, druhá byla aplikována 6. den po indukci EAE, třetí dávka 12. den po indukci a poslední dávka 18. den. Myši byly zabity ve třech intervalech: první skupina 21. den po imunizaci (dva dny po třetí dávce léčiva), další skupina 28. den (tři dny po aplikaci poslední dávky) a zbylé myši usmrceny 35. den po indukci EAE. U kontrolních myší, kterým místo IFN- β byl aplikován PBS, se neprojevily klinické příznaky, tudíž efekt IFN- β můžeme pouze odhadnout na základě změn v imunologickém profilu. Z těchto dat můžeme vyvodit, že buďto nemá IFN- β aplikace vliv na zmírnění průběhu EAE, nebo zda používáme vhodné koncentrace jednotlivých látek při indukci EAE. (MILLER, 2007) uvádí tři dávky PTX, jiné protokoly dávky pouze dvě. Také koncentrace *M. tuberculosis* je uváděna v rozmezí 200 - 500 μ g / 1ml nekompletního Freundova adjuvna. Rozhodli jsme se indukovat EAE přenosem aktivovaných MOG₃₅₋₅₅ specifických lymfocytů. Ze sedmi dárcovských myší, kterým byla aktivně indukována EAE, jsme získali dostatečný počet buněk na přenos sedmi C57BL/6 myším (STROMNES I. G., 2006). Myši, kterým byly přeneseny aktivované buňky izolované z uzlin, vyvinuly paralytické příznaky nemoci.

7. 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. Dále bylo z dat patrné, že poměr CD4:CD8 lymfocytů periferní krve se u obou kmenů značně liší a může stejně jako exprese různých izoform NKR-P1 ovlivňovat průběh progresu EAE.

8. Citovaná literatura

- Abbas, A. e. (2011). *Cellular and Molecular Immunology, 7th edition.*
- Andersson, P. W. (1999). Multiple sclerosis hat is progressive from the time of onset. *Arch Neurol* , 1138-46.
- Araki, M. K. (2003). Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.* , 279-88.
- Aranami, T. Y. (2008). Th17 Cells and Autoimmune Encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergology International* , 115-20.
- Ascherio, A. a. (2010). Epstein–Barr Virus Infection and Multiple Sclerosis:. *J. Neuroimmune Pharmacol* , 271-77.
- Awasthi, A. a. (2009). Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *International Immunology* , 489-98.
- Barr, T. e. (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. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *TRENDS in Immunology* , 528-33.
- Benveniste, E. (1997). Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J.Mol.Med* , 165-73.
- Biassoni, C. C. (2001). Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunological Reviews,181:* , 203-14.
- Brinkmann, V. B. (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery,9:* , 883-97.
- Carlyle, J. M. (2006). Molecular and Genetic Basis for Strain-Dependent NK1.1 Alloreactivity of Mouse NK Cells. *The Journal of Immunology* , 176 , 7511-24.
- Colonna, M. T.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology* , 1219-26.
- Cooper, M. F. (2011). The biology of human natural killer-cell subsets. *TRENDS In Immunology* , 633-40.
- Coquet, J. C. (2008). Cutting Edge: IL-21 Is Not Essential for Th17 Differentiation or Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* , 7097-7101.

- Cravens, P. H. (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. S. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* , 744-48.
- Dai, Z. T. (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. M. (2008). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Reviews* , 568-79.
- Dittel, B. U. (2000). Relapsing and remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in B cell deficient mice. *J. Autoimmun.*14 , 311-18.
- Ditter, B. (2000). Evidence that Fas and FasL contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* , 381-8.
- Donia, M. M. (2010). Specific and Strain-Independent Effects of Dexamethasone in the Prevention and Treatment. *Basic Immunology* , 396-407.
- Ferreira, M. (2010). Cognitive deficits in multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* , 632-41.
- Fife, B. a. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways . *Immunological Reviews* , 166-82.
- Fillatreau, S. S. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* , 944-50.
- Fossiez, F. D. (1996). T cell interleukin- 17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* , 2593-2603.
- Fransson, M. P. (2012). CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *Journal of Neuroinflammation*,9: , 112-21.
- Furlan, R. B. (2003). Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* , 1830-38.
- Galligan, C. P.-z. (2010). Interferon- β is a key regulator of proinflammatory events in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler* , 1458-72.

- Gandhi, R. L. (2010). Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* , 7-14.
- Geissmann, F. M. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* , 656-61.
- Gerosa, F. B.-G. (2002). Reciprocal Activating Interaction between Natural Killer Cells and Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* , 327-33.
- Hardy, R. a. (2001). B cell development pathways. *Annual reviews of Immunology* 19: , 595-622.
- Hilas, O. P. (2010). Disease Modifying Agents for Multiple Sclerosis. *The Open Neurology Journal* , 4 , 15-24.
- Hjelmstrom, P. J. (1998). B-cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization. *J. Immunol.* 161 , 4480-83.
- Hoehling, K. e. (2012). Activation of CD4+Foxp3+ regulatory T cells proceeds normally in the absence of B cells during EAE. *Eur. J. Immunol.* , 1164-73.
- Hoquist, K. B. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology* , 772-82.
- Huber, L. H. (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8+ cells with reduced cytotoxic activity. *Eur. J. Immunol.* , 1716-25.
- Hutchings, P. V. (1986). Immunological defects in SJL mice. *Immunology* , 445-50.
- Chen, M. Y. (2009). Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF-b- and IFN-c- dependent mechanism. *Eur J. Immunol* , 3423-35.
- Iizuka, K. N. (2003). Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR1 family of natural killer cell receptors. *Natur Immunology* , 801-07.
- Isaksson, M. A. (2009). Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur. J. Immunol.* , 2925-35.
- Isaksson, M. L. (2012). Conditional DC depletion does not affect priming of encephalitogenic Th cells in EAE. *Eur. J. Immunol.* , 1-9.
- Kawai, T. a. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* , 373-84.
- Kawai, T. a. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews* , 499-511.

- Kebir, H. K.-D. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood–brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med* , 1173-75.
- Kelchtermans, H. B. (2008). How interferon-g keeps autoimmune diseases in check. *Trends in Immunology* , 479-85.
- Kimura, A. a. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol* , 1830-35.
- Kroenke, M. C. (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. e. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* , 233-40.
- Lee, G. K. (2006). T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. *Immunity* , 369-79.
- Lee, Y. H. (2008). Essential role of CD81CD1221 regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* , 825-32.
- Ljutic, B. C. (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. S. (1999). B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalomyelitis peptide. *Eur. J. Immunol.* 29 , 3432-39.
- Marta, M. A. (2008). Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* , 365-75.
- Marta, M. M. (2009). Regulation of autoimmune encephalomyelitis by toll-like receptors. *Autoimmunity Reviews* 8 , 506-509.
- Martínez-Rodríguez, J. L.-B. (2011). Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clinical Immunology*, 141: , 348-56.
- Martín-Saavedra, F. F.-M. (2007). Beta-interferon unbalances the peripheral T cell proinflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular Immunology* , 3597-3607.
- Matsushita, T. I. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J. Immunol.* 185 , 2240-52.

- Matsushita, T. Y. (2008). Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.* 118 , 3420-30.
- McQuillan, K. L. (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. K. (2007). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* , unit 15.1.
- Mossman, T. a. (1996). The expanding universe subsets: Th1, Th2 and more. *IMMUNOLOGY TODAY* , 138-46.
- Murphy, Á. L. (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. S. (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. C. (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. (2008). Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8: , 34-47.
- Noseworthy, J. L. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med*; 343: , 938-52.
- Novak, J. a. (2010). Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine* , 1-8.
- O'Connor, R. P. (2008). Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol* , 3750-54.
- Ormerod, M. (2000). *Flow Cytometry, 3rd edition*. OXFORD, GB: OXFORD UNIVERZITY PRESS.
- Palmer, E. (2003). Negative selection - cleaning out the bad apples from T cell repertoire. *Nature Reviews Immunology* , 383-91.
- Rao, A. a. (2000). Molecular aspects of T-cell differentiation. *British Medical Bulletin* , 969-984.

- Ray, A. M. (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.
- Rolink, A. S. (2001). Selection events operating at various stages in B cell development. *Current Opinion in Immunology*.13: , 202-07.
- Russel, J. a. (2002). LYMPHOCYTE-MEDIATED CYTOTOXICITY. *Annu. Rev. Immunol.* , 323-70.
- Sarma, J. (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. T. (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.
- Sonderregger, I. J. (2008). IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur. J. Immunol.* , 1833-38.
- Sonobe, Y. J. (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. F.-S. (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. (2005). IMMUNOLOGY OF MULTIPLE SCLEROSIS. *Annu. Rev. Immunol.* 23 , 683–747.
- Stromnes, I. C. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by TH1 and TH17 cells. *Nat Med.*
- Stromnes, I. G. (2006). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols* , 1952-60.
- Takahashi, K. A. (2004). The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain*, 127: , 1917-27.
- Tonegawa, S. (1988). Antibody and T-cell receptors. *JAMA*. 259 , 1845–1847.
- Veldhoen, M. H. (2006). Signals mediated by transforming growth factor- β initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic. *Nature Immunology* , 1151-56.
- von Boehmer, H. a. (1990). Self-Nonself Discrimination by T Cells. *Science* , 1369-73.

- Wan, Y. a. (2009). How diverse - CD4+ effector T cells and their functions. *Journal of Molecular and Cell Biology* , 20-38.
- Weishaupt, A. e. (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. S.-W. (1987). Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J. Exp. Biol.* , 43-57.
- Winkelmann, A. E. (2007). Cognitive impairment in Multiple Sclerosis. *J. Neurol. suppl* 2. , 35-42.
- Xu, S. J. (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.
- Zelinsky, G. B. (2004). Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection. *Virology* 330 , 365-74.
- Zhang, B. Y. (1997). Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Natural Killer (NK) Cells. *J. Exp. Med.* , 1677-87.
- Zhao, J. e. (2011). IFN- γ - and IL-10-expressing virus epitope-IFN- γ - and IL-10-expressing virus epitope-nervous system during encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* , 1571-77.
- Zhou, X. e. (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature Immunology* , 1000-08.